UNIVERSIDADE SANTA CECÍLIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SUSTENTABILIDADE DE ECOSSISTEMAS COSTEIROS E MARINHOS

AMANDA BÜTTNER PUSTIGLIONE

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ACIDIFICAÇÃO DOS OCEANOS SOBRE A TOXICIDADE DE 17α-ETINILESTRADIOL

SANTOS/SP
2019

AMANDA BÜTTNER PUSTIGLIONE

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ACIDIFICAÇÃO DOS OCEANOS SOBRE A TOXICIDADE DE 17α-ETINILESTRADIOL

Dissertação apresentada a Universidade Santa Cecília como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, sob a orientação do Prof. Dr. Fábio Hermes Pusceddu.

SANTOS/SP

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total deste trabalho, por qualquer que seja o processo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos.

577.2752 Pustiglione, Amanda Büttner.
P989a Avaliação dos efeitos da acidificação dos oceanos sobre a toxicidade de 17α-etinilestradiol / Amanda Büttner Pustiglione. – 2019.
- 40 pág.

Orientador: Fábio Hermes Pusceddu

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Santa Cecília, Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade de Ecossistemas Costeiros e Marinhos, Santos, SP, 2019.

1. acidificação dos oceanos. 2. CO_2. 3. toxicidade
4. 17α-etinilestradiol.

I. Pusceddu, Fábio Herme. II. Avaliação dos efeitos da acidificação dos oceanos sobre a toxicidade de 17α-etinilestradiol.

Elaborada pelo SIBi – Sistema Integrado de Bibliotecas – Unisanta

Dedico este trabalho a minha família,

por todo suporte.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre me mostrar sempre o melhor caminho a ser trilhado, por me permitir chegar aos meus objetivos e estar presente em minha vida.

A Sonia Aparecida Büttner, por sempre lutar por mim até mesmo quando eu acredito que já não posso mais.

Ao Rodrigo Burgarelli, pelo companheirismo, apoio, suporte, por sempre acreditar em mim e batalhar ao meu lado a realização dos nossos sonhos.

Ao meu orientador, Fabio Hermes Pusceddu, por aceitar o desafio de orientar um trabalho tão importante, em tão pouco tempo, pela paciência, incentivo e aprendizado.

A professora Luciana Guimarães, por ser a primeira a depositar confiança no meu potencial, por permitir que eu aprendesse ainda mais, pelas conversas e apoio. Aprendi a te admirar ainda mais!

A Mariana Souza, por correr junto, pela preocupação, ajuda e amizade que criamos.

Ao pessoal dos laboratórios de Ecotoxicologia da UNISANTA e UNIFESP pelos ensinamentos e ajuda.

A minha irmã, Flávia Junqueira, não mais presente entre nós, mas que lá atrás foi a primeira a plantar a sementinha, e despertou o meu interesse pela vida acadêmica. Te levo sempre comigo!

A todos os professores do PPG-ECOMAR que contribuíram para minha evolução pessoal e profissional.

Agradeço a Zuleica Burgarelli e Marcio Burgarelli pela compreensão e ajuda sempre que necessária.

Aos amigos, que souberam ser pacientes, por me incentivarem sempre!

A CAPES, pela concessão de bolsa.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram com esse trabalho.

Não faça para dar certo, e sim até dar certo.
(Wilton Neto)

RESUMO

A acidificação dos oceanos é uma realidade e tem sido alvo de muitos estudos. Atualmente foi encontrado uma quantidade significativa de CO_2 nos corpos hídricos, o mesmo que se acredita ser responsável pelo efeito estufa, é absorvido pela água e resulta na diminuição do pH oceânico. Apesar do processo de CCS ser considerada a melhor forma de redução na emissão de CO_2, há riscos de vazamento. Outra realidade que vem sido muito estuda é a presença de produtos farmacêuticos e de higiene pessoal no meio ambiente. A presença desses produtos no ambiente pode se dar desde a falta de tratamento das águas dos esgotos e que acabam em nos corpos aquáticos, como ao descarte inadequado. O 17α-etinilestradiol é um dos produtos mais perigosos para o meio aquáticos, e já foi encontrado em diversas localidades. É um hormônio sintético presente na maioria dos métodos contraceptivos, e eliminado do organismo humano principalmente pela urina. Seus efeitos conhecidos são: diminuição na eclosão de ovos de pássaros, peixes e tartarugas, feminização de peixes machos, indução de vitelogenia de peixes, falhas na reprodução de peixes, répteis, pássaros e mamíferos, alterações imunológicas em mamíferos aquáticos, entre outros. Diante desse quadro, o presente estudo objetivou avaliar os efeitos do impacto ambiental da acidificação dos oceanos associada a toxicidade do EE2, considerando o desenvolvimento embriolarval de *Echinometra lucunter,* expondo-os a diferentes pHs, por injeção de CO_2. Os resultados obtidos demonstraram que o EE2 causou retardo no desenvolvimento embriolarval de ouriços do mar em concentrações a partir de 10 ng/L. Estes dados, por si só, já demonstram os potenciais riscos deste composto ao ambiente marinho, uma vez que os efeitos ocorreram em concentrações ambientalmente relevantes. A partir dos resultados foi possível ainda observar efeitos a 50% dos organismos expostos a partir do pH 7,73. Por outro lado, quando considerados os efeitos do EE2 em diferentes cenários de acidificação oceânica, foi observada diminuição da toxicidade do composto. Os efeitos tóxicos mais severos observados em pH mais elevado podem estar relacionados a sub-produtos de degradação do EE2, que ocorrem em função de pHs mais elevados. Os dados gerados no presente estudo poderão subsidiar estudos de avaliação de risco ambiental, assim como tomadas de decisão e regulamentação de poluentes diante de um cenário de acidificação oceânica.

Palavras Chave: acidificação dos oceanos, CO_2, toxicidade, 17α-etinilestradiol.

ABSTRACT

Ocean acidification is a reality and has been the subject of many studies. A significant amount of CO_2 has been found in the water bodies, which is believed to be responsible for the greenhouse effect, is absorbed by water and results in a decrease in ocean pH. Although the CCS process is considered the best way to reduce CO_2 emissions, there is a risk of leakage. Another reality that has been much studied is the presence of pharmaceuticals and personal hygiene in the environment. The presence of these products in the environment can occur from the lack of treatment of the waters of the sewers and that end up in the aquatic bodies, as to the inadequate disposal. 17α-ethynylestradiol is one of the most dangerous products for the aquatic environment, and has been found in several locations. It is a synthetic hormone present in most contraceptive methods, and eliminated from the human body mainly by the urine. Its known effects are: decreased hatching of bird eggs, fish and turtles, feminization of male fish, induction of fish vitelogenia, breeding failures of fish, reptiles, birds and mammals, immunological changes in aquatic mammals, among others. The objective of this study was to evaluate the effects of the environmental impact of ocean acidification associated with EE2 toxicity, considering the embryonal development of *Echinometra lucunter*, exposing them to different pHs by CO_2 injection. The results showed that EE2 caused a delay in embryonal development of sea urchins at concentrations of 10 ng / L. These data, in turn, already demonstrate the possibilities of damages caused by the marine environment, since the effects of a series of environmental events are relevant. From the results it was still possible to observe the existence of 50% of organisms exposed from pH 7.73. On the other hand, it considers the effects of the EE2 in different scenarios of oceanic acidification, being observed greater toxicity of the compound. The more severe toxic effects observed at pH may be more related to the degradation byproducts of EE2, which are the function of higher pHs. The data generated in the present study can support the environmental risk assessment studies, as well as the decision making and the extension of pollutants in a scenario of ocean acidification.

Keywords: acidification of the oceans, CO_2, toxicity, 17α-ethinylestradiol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular do 17α-etinilestradiol (a) e do 17β-estradiol (b). 4

Figura 2 – Localização do Rio Itaguaré, em Bertioga – SP (ponto de coleta de água). 8

Figura 3 – pHmetro. 9

Figura 4 – Injeção de CO_2 na caixa através de mangueira. 10

Figura 5 – Obtenção de gametas femininos de *Echinometra lucunter.* 11

Figura 6 – Larvas Pluteus com desenvolvimento embriolarval normal. 13

Figura 7 – Larvas Pluteus com alterações morfológicas e/ou retardo no desenvolvimento. 13

Figura 8 – Resultado do ensaio de toxicidade para avaliação de efeito crônico do EE2 para *E. lucunter* após 42h de exposição em pH 8,1. *Diferença significativa em relação ao controle (ANOVA - p≤ 0,05). 15

Figura 9 – Resultado do ensaio de toxicidade para avaliação de efeito crônico do EE2 para *E. lucunter* após 42h de exposição em pH 7,6. *Diferença significativa em relação ao controle (ANOVA - p≤ 0,05). 15

Figura 10 – Resultado do ensaio de toxicidade para avaliação de efeito crônico do EE2 para *E. lucunter* após 42h de exposição em pH 7,3. *Diferença significativa em relação ao controle (ANOVA - p≤ 0,05). 16

Figura 11 – Comparação entre os controles de cada pH 17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Larvas Pluteus com desenvolvimento embriolarval normal em pH 8,1 14

Tabela 2 – Larvas Pluteus com desenvolvimento embriolarval normal em pH 7,6 15

Tabela 3 – Larvas Pluteus com desenvolvimento embriolarval normal em pH 7,3 16

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Ocorrência do estrogênio sintético 17α-etinilestradiol no ambiente… 5

Quadro 2: Efeitos provocados pelo 17α-etinilestradiol em diferentes espécies.. 6

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	–	Micrograma
µL	–	Microlitro
µm	–	Micrometro
CCS	–	*Carbon Capture and Storage*
CENO	–	Concentração de Efeito Não Observado
CEO	–	Concentração de Efeito Observado
CO_2	–	Dióxido de carbono
DIU	–	Dispositivo Intra-Uterino
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
E2	–	17β-estradiol
EE2	–	17α-etinilestradiol
ETA	–	Estação de Tratamento de Água
ETE	–	Estação de Tratamento de Esgoto
FPCP	–	Fármacos e Produtos de Cuidados Pessoais
g	–	Grama
KCl	–	Cloreto de Potássio
L	–	Litro
mg	–	Miligrama
mL	–	Mililitro
ng	–	Nanograma
UV	–	Ultravioleta
VTG	–	Vitelogenina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 1

MATERIAL E MÉTODOS 8

1. Coletas 8

2. Ensaios de toxicidade 8

2.1. Sistema de injeção de CO_2 9

2.2. Ensaio para avaliação de desenvolvimento embriolarval 11

2.3. Análise de dados 13

RESULTADOS 14

DISCUSSÃO 18

CONCLUSÃO 21

REFERÊNCIAS 22

INTRODUÇÃO

A acidificação dos oceanos, através do Dióxido de Carbono (CO_2), vem sido alvo de estudos há tempos (ORR et al., 2005; CALDEIRA e WICKET, 2005; SZALAJ et al., 2016; PASSARELLI et al., 2017a; 2017b; 2018a; 2018b; 2018c), analisando também os danos causados ao ambiente.

As taxas de CO_2 aumentaram desde a era da Revolução Industrial, através do uso de combustíveis fósseis, apesar de muitas outras atividades ter o gás carbônico como fonte e uso. Acredita-se que, além de ser usado por diversos organismos (como plantas, para realização de fotossíntese), o dióxido de carbono está associado ao aquecimento global. Atualmente também foi encontrado nos oceanos uma maior concentração de CO_2, dada a absorção deste pela atmosfera (GATTUSO e HANSSON, 2011) que ao ser dissolvido na água, causa mudanças químicas no carbonato oceânico e gera um aumento de íons de bicarbonato, ocorrendo a diminuição do pH oceânico (ORR et al., 2005; GATTUSO e HANSSON, 2011).

Desde o período pré-industrial apresentou-se um decréscimo de 0,1 unidades no pH oceânico (JOOS et al., 2011). Caldeira e Wicket (2005) apontou que o pH da superfície da água do mar reduza 0,4 unidades até 2100 e 0,77 unidades até 2300.

Joos et al. (2011) ainda relata que emissões contínuas de carbono, neste século, iram causar mudanças climáticas de formas irreversíveis, mesmo que essas emissões sejam interrompidas no ano de 2100, irá agravar os impactos relacionados a acidificação dos oceanos por séculos.

O processo de Captura e Armazenamento de CO_2 (CCS) é considerado a melhor forma de redução de emissão de CO_2 na atmosfera, sendo 15% em 2025 e 60% em 2050 (PASSARELLI et al., 2017a; 2018a; 2018b). Esse processo baseia-se em separar o dióxido de carbono de fontes de energia, como usinas termoelétricas a carvão, biomassa ou gás, e transporta o CO_2 através de um tubo com certa profundidade, e o armazena em reservatórios geológicos, em tempo indefinido, em campos de petróleo (KESHIGI, CONINCKI e KESSELS, 2012; PASSARELLI et al., 2017b). Entretanto, estudos apontam que pode haver um vazamento durante o processo de CCS (KESHIGI, CONINCKI e KESSELS,

2012; SZALAJ et al., 2016; PASSARELLI et al. 2017a; 2017b; 2018a; 2018b; 2018c) e que ainda faltam pesquisas para apurar tais riscos.

No Brasil, tem crescido cada vez mais o número de projetos de CCS, inclusive na Bacia de Santos já está em operação, pela Petrobrás. Diante disso criou-se a preocupação com a vida marinha, uma vez que é sabido que CO_2, em meio aquático, reduz seu pH, acidificando os oceanos.

Essa acidificação causa efeitos no meio aquático que vão da reprodução ao desenvolvimento de organismos (SZALAJ et al., 2016; PASSARELLI et al., 2017a; 2017b; 2018a; 2018b; 2018c). Com todos os efeitos que a adsorção de CO_2 pode causar, a acidificação ainda facilita a mobilidade dos poluentes (PASSARELLI et al., 2017a; 2017b; 2018a; 2018b; 2018c).

Outro tema de grande importância que vem sido estudado nos últimos anos, são os produtos farmacêuticos e de cuidados pessoais (FPCP), encontrados cada vez mais no meio ambiente, assim como seus possíveis impactos (PONJANA et al., 2007; MARANHO et al., 2014; 2015; PEREIRA et al., 2016; CORTEZ et al., 2018; PUSCEDDU et al., 2018; PEÑA-GUZMÁN et al., 2019).

Com o crescimento populacional o uso de FPCP também aumentou, o que acabou acarretando em diversos impactos ambientais (MARANHO et al., 2015; PEREIRA et al., 2016; CORTEZ et al., 2018; PEÑA-GUZMÁN et al., 2019). De acordo com Peña-Guzmán (2019) o número de habitantes em áreas urbanas ainda pode aumentar cerca de 66%, até 2050.

O ecossistema aquático tem sido um dos mais impactados pelos FPCP, devido ficarem mais expostos a resíduos de água não tratada (PEREIRA et al., 2016). Tem sido encontrado frequentemente esses produtos, considerados emergentes e contaminantes potentes (MARANHO et al., 2015), já que não há monitoramento, pelas suas baixas concentrações (PUSCEDDU et al., 2018; PEÑA-GUZMÁN et al., 2019), e também, já que são transportados, facilmente, pelo esgoto, porque as Estações de Tratamento de Água (ETAs) não foram planejadas para remover tais compostos (PEREIRA et al., 2016).

Maranho et al. (2015) ainda diz que esses componentes podem persistir durante anos no meio ambiente e que mesmo em concentrações baixas pode trazer sérias consequências. Mesmo que haja sua degradação, esses contaminantes são frequentemente liberados no meio aquático.

Esses produtos, encontrados no meio aquático, foram divididos em grupos: fármacos, produtos de cuidado pessoal, filtros UV, disruptores endócrinos, hidrocarbonetos, drogas ilícitas, aditivos alimentares, metabólitos, retardadores de fogo e pesticidas (PEÑA-GUZMÁN et al., 2019). Um estudo realizado na Baía de Santos (PEREIRA et al., 2016) chegou a apontar 33 destes desses componentes.

O 17α-etinilestradiol (EE2) já foi encontrado em diversas localizações, e está na lista da EU Water Framework Directive, elaborada pela comissão Européia, juntamente com o 17β-estradiol (E2) e o diclofenaco, como as substâncias mais perigosas para o meio aquático (PEREIRA et al., 2016; PUSCEDDU et al., 2018).

São muitos os estudos ecotoxicológicos com EE2 (SOLÉ, PORTE e BARCELÓ, 2000; ALDA et al., 2002; BRAGA et al., 2005; PONJANA et al., 2007; ZHANG et al., 2009; 2011; FROEHNER et al., 2012; OROPESA et al., 2015; LUZIO et al., 2016; CHENG et al., 2017; SMOLARZ et al., 2017; VALCARCE et al., 2017).

Aprovado em 1962, no Brasil, o anticoncepcional é a forma mais utilizada como forma contraceptiva reversível. Por este motivo, as indústrias farmacêuticas têm investido no desenvolvimento de novos produtos, para atender o maior número de mulheres, seja desenvolvendo novas fórmulas ou até mesmo novas formas farmacêuticas. Sendo hoje já apresentada em pílulas anticoncepcionais orais, adesivos cutâneos, injeções, implantes sub-cutâneos, dispositivos intra-uterinos (DIU) e anéis vaginais, a eficácia do método é comprovada e permite que a mulher controle a concepção, facilitando o planejamento familiar e dando uma maior liberdade para a prática do coito (PEREIRA E ANGONESI, 2009).

A maioria desses métodos tem em sua composição o 17α-etinilestradiol, que é um hormônio sintético, com um radical etinil no carbono 17 da molécula do 17β-estradiol, hormônio natural (Figura 1), o que o torna mais potente como estrogênio e que seja mais resistente a biodegradação (CUNHA, 2014).

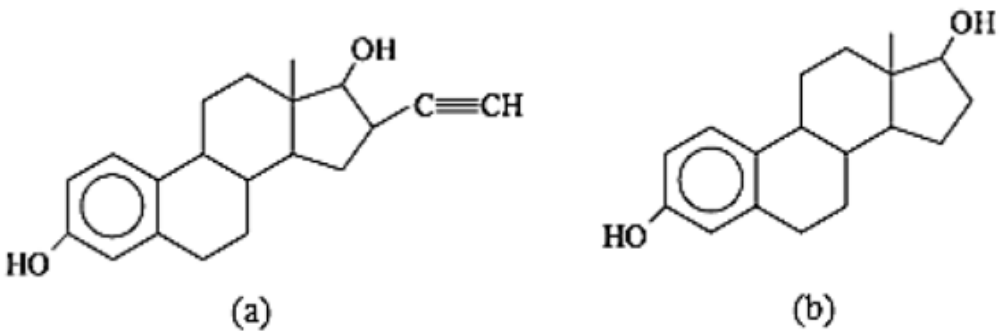

Figura 1 – Estrutura molecular do 17α-etinilestradiol (a) e do 17β-estradiol (b).
Fonte: (CUNHA, 2014)

Cunha (2014) também relata que esses hormônios sintéticos não são usados apenas como métodos preventivos de uma gravidez, podem ser usados em outros tratamentos com disfunções hormonais, como a menopausa, endometriose, ovário policístico e até em tratamento de acne.

Esses estrógenos são excretados através da urina e pelas fezes, e são descartados pelo esgoto doméstico (BILA E DEZOTTI, 2007; LEI et al., 2009; FERNANDES et al., 2011; BARREIROS et al., 2016). Acredita-se que são excretados 4,5 µg de EE2 pela urina e 6 µg pelas fezes, por pessoa, o que somaria 4,4 kg por ano a cada milhão de habitantes no mundo (BARREIROS et al., 2016).

Devido a esses esgotos domésticos acabarem em corpos d'água, principalmente em cidades onde há um grande crescimento populacional não planejado e a falta de infra-estrutura (PIMENTEL et al., 2016), são encontrados nos corpos hídricos, metabólitos resultantes do 17α-etinilestradiol, excretados por humanos e animais, como sua molécula original, essa última devido ao descarte incorreto de medicamentos, e também encontrado em lodo e sedimento marinho (TERNES et al., 2002; YING, KOOKANA e RU, 2002; PONJANA et al., 2007; BILA e DEZOTTI, 2007; LEI et al., 2009; ZHANG et al., 2011; SUN et al., 2010; ZHOU et al., 2011; BARREIROS et al., 2016; CHENG et al., 2017; VALCARCE et al., 2017).

O quadro 1 mostra locais onde já teve ocorrência de 17α-etinilestradiol no ambiente:

Quadro 1: Ocorrência do estrogênio sintético 17α-etinilestradiol no ambiente.

MATRIZ	LOCAL	CONCENTRAÇÃO RELATADA	REFERÊNCIA
Águas superficiais	Lagoa de Araruama RJ/Brasil	>LQ	LUCENA, 2013
ETE	Pequim	4,6 $ng.L^{-1}$	ZHOU et al., 2012
Sedimento	Litoral sul do Brasil	0,45 a 129,78 $ng.g^{-1}$	FROEHNER et al., 2011
Água potável	São Luiz – MA/Brasil	>LQ	VERBINNEN et al., 2010
Água potável	Seropédica – RJ/Brasil	>LQ	KUSTER et al., 2009
Águas superficiais	Rios Paraíba do Sul, Macaé, Guandu, Lagoa Rodrigo de Freitas e Lagoa de Jacarepaguá – RJ/Brasil	>LQ	
Água potável e águas superficiais	Espanha	>LQ	KUSTER et al., 2008
Águas superficiais	EUA	< 4,7 $ng.L^{-1}$	ZUO et al., 2006
ETE	Noruega, Suécia, Finlândia, Países Baixos, Bélgica, Alemanha, França e Suíça	1,1 $ng.L^{-1}$	JOHNSON et al., 2005
Água subterrânea	Áustria	0,9 $ng.L^{-1}$	HOHENBLUM et al., 2004
ETE	Alemanha	1,5 $ng.L^{-1}$	PAWLOWSKI et al., 2004
Afluente e efluente de ETE	França	4,9 a 7,1 $ng.L^{-1}$ e 2,7 a 4,5 $ng.L^{-1}$, respectivamente	CARGOUËT et al., 2004
ETE	Itália	< 1,6 $ng.L^{-1}$	LAGANÀ et al., 2004
Águas superficiais	França	1,1 a 2,9 $ng.L^{-1}$	CARGOUËT et al., 2004
Águas superficiais	EUA	0,2 $ng.L^{-1}$	KOLPIN et al., 2002
Águas superficiais	Inglaterra	>LQ	XIAO et al., 2001
Efluente de ETE	Alemanha	0,1 a 8,9 $ng.L^{-1}$	KUCH e BALLSCHMITTER, 2001
Águas superficiais	Alemanha	0,10 a 5,1 $ng.L^{-1}$	
Água potável	Alemanha	0,15 a 0,50 $ng.L^{-1}$	
Afluente e efluente de ETE	Itália	3,0 $ng.L^{-1}$ e 0,4 $ng.L^{-1}$, respectivamente	BARONTI et al., 2000
Águas superficiais	Itália	0,04 $ng.L^{-1}$	
Afluente de ETE	Itália	0,4 $ng.L^{-1}$	JOHNSON et al., 2000
Esgoto doméstico	Brasil	0,005 $\mu g.L^{-1}$	TERNES et al., 1999
Efluente de ETE	Alemanha	0,001 $\mu g.L^{-1}$	
Efluente de ETE	Canadá	0,009 $\mu g.\ L^{-1}$	
Efluente de ETE	Países Baixos	< 0,2 a 7,6 $ng.L^{-1}$	BELFROID et al., 1999
Águas superficiais	Países Baixos	< 0,1 a 4,3 $ng.L^{-1}$	
Efluente de ETE	Inglaterra	0,2 a 7,0 $ng.L^{-1}$	DESBROW et al., 1998
Esgoto doméstico	Suécia	4,5 $ng.L^{-1}$	LARSSON et al., 1999
Efluente de ETE	Suécia	2,0 $ng.L^{-1}$	
Lodo ativado	Alemanha	2,0 a 17 $ng.L^{-1}$	TERNES et al., 2002
Sedimento marinho	Alemanha	0,9 $ng.g^{-1}$	

Águas superficiais	EUA	0,25 a 0,52 $ng.L^{-1}$	SNYDER et al., 1999
Efluente de ETE	EUA	0,24 a 0,76 $ng.L^{-1}$	
Águas superficiais	Rio Licun – Qingdao/China	7,0 a 24,0 ng.L	ZHOU et al., 2011
Sedimento	Rio Licun – Qingdao/China	Não detectado a 5,1 µg. kg	

>LQ = abaixo do limite de quantificação

Adaptado pelo autor

Fonte: (BILA e DEZOTTI, 2007; CUNHA, 2014)

Por mais que suas concentrações encontradas no meio ambiente sejam baixas, existe a preocupação pela insistência na presença desse hormônio. E mesmo que ocorra sua degradação a algum momento, o 17α-etinilestradiol é lançado, principalmente através das ETEs, continuamente.

Sabe-se que o EE2 causa muitos efeitos em diversas espécies, como: diminuição na eclosão de pássaros, peixes e tartarugas, feminização de peixes machos, indução de vitelogenia de peixes, falhas na reprodução de peixes, répteis, pássaros e mamíferos, alteração imunológica de mamíferos aquáticos (FERNANDES et al., 2011).

O quadro 2 aponta alguns efeitos causados pelo EE2, encontrados em algumas espécies:

Quadro 2: Efeitos provocados pelo 17α-etinilestradiol em diferentes espécies

ESPÉCIE	EFEITO	REFERÊNCIA
Mexilhão	Indução da síntese de vitelogenia em machos	CIOCAN et al., 2010
	Diminuição da maturidade gonadal e desenvolvimento de gônadas hermafroditas	PONJANA et al., 2007
	Alteração funcional da glândula digestiva	CANESI et al., 2008
Peixes	Inibição da expressão de genes esteroidogênicas nas gônadas	LIU et al., 2012
	Declínio na reprodução	ROBINSON et al., 2000
	Indução da síntese de VTG	ROSE et al., 2002 FOLMAR et al., 2000
	Mortalidade da espécie	SCHMID et al., 2002
	Interferência na resposta	CHEN et al., 2017

	imune em bagres amarelos	
	Completa inibição na reprodução e feminização de peixes machos em peixes-zebra	FENSKE et al., 2005
Ouriço do mar	Alteração na morfogênese	KIYOMOTO et al., 2008

Adaptado pelo autor

Fonte: (BILA e DEZOTTI, 2007; CUNHA,2014)

Diante do cenário encontrado, com a acidificação dos oceanos, e os problemas causados pelo 17α-etinilestradiol em muitas espécies, este estudo parte da hipótese que a acidificação oceânica pode gerar efeitos ainda mais severos a vida marinha por meio da presença do EE2.

Por esse motivo, o objetivo desse estudo é de avaliar os potenciais impactos ambientais associados a acidificação dos ambientes marinhos a partir da toxicidade do composto 17α-etinilestradiol sobre organismos marinhos em água, considerando os efeitos do EE2, em água, sobre o desenvolvimento embriolarval de ouriços do mar (*Echinometra lucunter*), expondo-os a diferentes níveis de pH, através de injeção de CO_2.

MATERIAL E MÉTODOS

1. *Coletas*

Para realizar os testes, a água utilizada foi coletada no Rio Itaguaré, Bertioga – SP (Figura 2). A água foi armazenada em galões de 50 L e filtrada em malha de 45µm, para a retirada de plânctons e possíveis dejetos.

Figura 2 – Localização do Rio Itaguaré, em Bertioga – SP (ponto de coleta de água).

Fonte: Google Maps

Os ouriços do mar (*Echinometra Lucunter*), utilizados nos ensaios para avaliação de efeito crônico foram coletados através de mergulho livre na costa da Ilha das Palmas, em Santos – SP. Esses organismos foram levados em caixa térmica até o laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Santa Cecília (UNISANTA) e mantidos em tanques com água do mar e aeração, até a realização dos ensaios.

2. *Ensaios de toxicidade*

Os ensaios de toxicidade foram realizados no laboratório de Ciências do Mar, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), campus Maria Máximo, em Santos – SP, utilizando a metodologia adaptada a partir de Kita et al. (2013), por meio de um equipamento de injeção de CO_2 automático afim de expor os organismos a diferentes valores pH.

2.1. Sistema de injeção de CO_2

O sistema é compreendido por 3 caixas, por onde o CO_2 é injetado, sob condições controladas, de maneira independente em cada caixa, criando um cenário similar ao do efeito estufa.

A quantidade de CO_2 que é injetado é controlado por meio das medidas do pH da água do mar que contém nas caixas, sendo que o aumento de CO_2, causa a redução do pH. Cada caixa possui um pHmetro, que registra ininterruptamente o pH da água (Figura 3). Esses pHmetros são conectados, através de uma interface, a um computador.

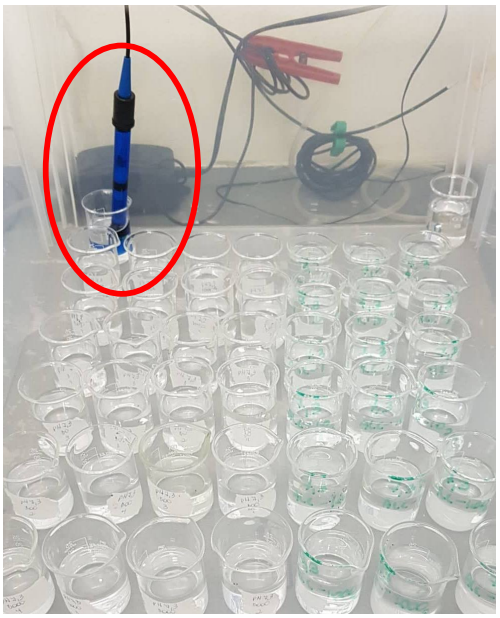

Figura 3 – pHmetro.

De outro lado, cada caixa possui uma válvula solenoide, que também esta conectada a esse computador e a uma fonte de injeção automática de CO_2, o que permite a entrada do gás nas caixas (Figura 4).

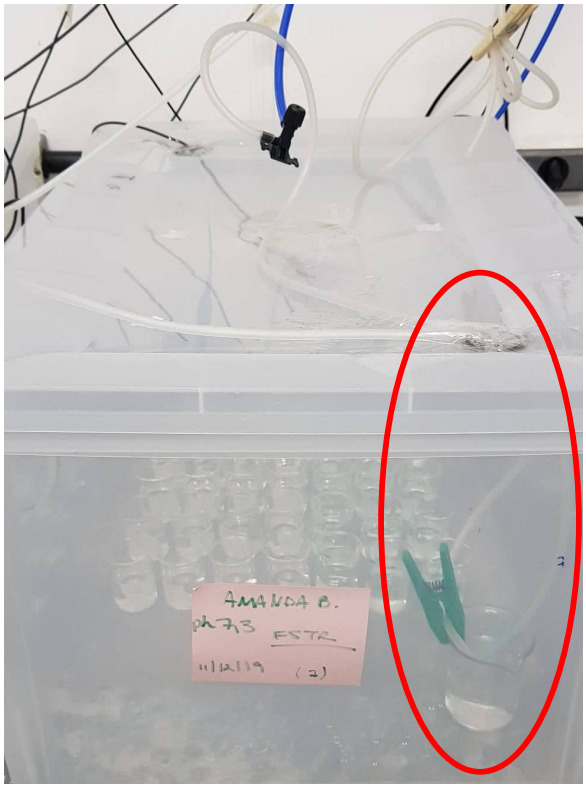

Figura 4 – Injeção de CO_2 na caixa através de mangueira.

Dentro das caixas foram colocados beckers, de 25 mL, para acomodar os organismos, facilitando expor diferentes concentrações e mantendo o pH.

Os valores do pH de cada caixa são monitorados através do *software* *ApexFusion*®. Através dele que se define o pH de cada caixa, quando o *software* sinaliza um valor de 0,01 superior do pH estipulado anteriormente, a válvula solenoide induz a injeção de CO_2, transportado através de mangueiras. E quando é apontado um valor de 0,01 inferior ao pH estipulado, essa válvula interrompe a injeção de CO_2. Dessa maneira consegue-se manter o mesmo pH durante todo o ensaio.

Os valores de pH escolhidos apontam cenários diferentes da acidificação:

- ~pH 8,1 – pH atual das áreas costeiras
- pH 7,6 – diminuição de ~0,5, previsto para o final do século (IPCC, 2014)
- pH 7,3 – cenário que visa um possível vazamento da atividade de CCS

2.2. Ensaio para avaliação de desenvolvimento embriolarval

O ensaio embriolarval com os ouriços do mar de espécie *Echinometra lucunter* foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pela USEPA (1995), com as adaptações de temperatura e tempo de exposição estabelecidas pela NBR 15350 (ABNT, 2012).

Para obter os gametas, os ouriços são estimulados através de injeção de cloreto de potássio (KCl) de 0,5 mol. A diferenciação dos gametas é feita visualmente, através da coloração, sendo que os gametas femininos são amarelo-alaranjados, e os masculinos são brancos.

Para a obtenção dos óvulos, a fêmea foi colocada com a superfície aboral para baixo, em um becker menor que seu diâmetro, com água reconstituída, com os parâmetros físico químicos aceitáveis para o ensaio (Figura 5). Após os óvulos decantarem para o fundo do becker, foi desprezado o sobrenadante e o restante foi filtrado em malha de 350 µm, para a retirada de qualquer dejeto que pudesse estar junto. Depois desse procedimento a solução foi avolumada, com água reconstituída, até 600 mL.

Figura 5 – Obtenção de gametas femininos de *Echinometra lucunter.*

Os espermatozoides foram obtidos com uma pipeta de Pasteur, e colocados em um becker de 30 mL, com gelo em volta para a conservação. Logo após, foi preparada uma solução de 0,5 mL de espermatozoide, avolumada para 25 mL, com água reconstituída. A solução foi agitada para evitar formação de

grumos.

Após a realização desses procedimentos, de 1,2 a 2 mL da solução de espermatozoides foi adicionado no recipiente com a solução de óvulos e agitado levemente por 2 horas, para ocorrer a fertilização. Passando esse período foram retiradas 3 sub-amostras de 10 µL dessa solução, para observação em câmara de Sedgwick-Rafter para a verificação da porcentagem de fertilização dos ovócitos, que para o ensaio ser válido deve ser de no mínimo 80% fertilizados.

As concentrações de 17α-etinilestradiol estabelecidas para o experimento foram de 1, 10, 100, 1000 ng/L, baseadas nas concentrações que apresentam efeitos, segundo a literatura (MARANHO et al., 2014; 2015).

Foram colocados 20 mL de cada solução com as concentrações, controle com água do mar e solvente (usado para diluição do 17α-etinilestradiol, o DMSO), em beckers de 25 mL, todos com 4 réplicas.

Nesses beckers, já com as soluções, e já com o pH desejado, foram adicionados cerca de 300 embriões, e mantidos pelo sistema de injeção de CO_2, com temperatura controlado em 26^{o}C (± 2^{o}C) e fotoperíodo de 16 horas com luz e 8 horas no escuro, por 42 horas.

Após completar o período de exposição, o experimento foi encerrado com formol tamponado com bórax, 1 mL em cada réplica. Cada réplica foi analisada em microscópio, em lâmina Sedgewick-Rafter, sendo contado os primeiros 100 embriões, observando o grau de desenvolvimento. Os embriões que atingiram seu estágio de larva Pluteus bem desenvolvido foram considerados normais, e aqueles que apresentaram alterações morfológicas e/ou retardo no seu desenvolvimento, foram considerados anômalos, como nas figuras 6 e 7.

Figura 6 – Larvas Pluteus com desenvolvimento embriolarval normal.

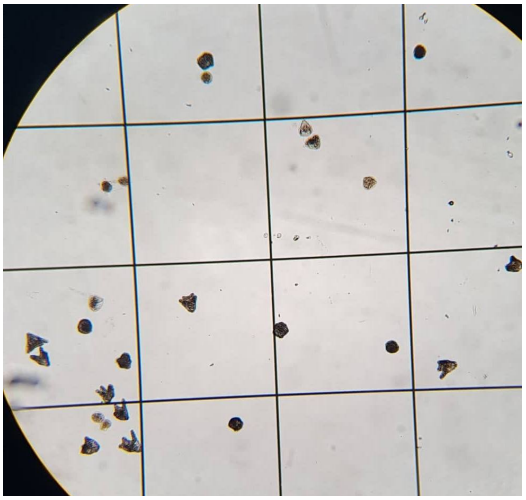

Figura 7 – Larvas Pluteus com alterações morfológicas e/ou retardo no desenvolvimento.

2.3. Análise de dados

As análises estatísticas para avaliação dos efeitos crônicos foram realizadas a partir do software TOXSTAT 3.5 (WEST & GULLEY, 1996) para determinação da CENO, que significa a maior concentração dos compostos onde não foram observados efeitos estatisticamente significativos, e também na determinação da CEO, que se refere a menor concentração dos compostos onde efeitos foram observados durante o período do ensaio.

Para o estabelecimento da CENO e da CEO, os dados foram analisados quanto à normalidade e homogeneidade de variância pelos métodos Chi-square e Barttlett, respectivamente. Posteriormente, os dados foram submetidos ao método de análise de variância (ANOVA – $p < 0,05$) por meio do método de Dunnett.

RESULTADOS

Para os ensaios de toxicidade para avaliação de efeito crônico do EE2 no desenvolvimento embriolarval de ouriço do mar, foram realizados ensaios com três tratamentos de pH diferentes (pH: 8,1; 7,6; 7,3).

Os resultados obtidos no tratamento com pH 8,1 apresentaram valores de concentração de efeito não observado (CENO) e concentração de efeito observado (CEO) de 1 e 10 ng/L, respectivamente. Com relação ao tratamento no pH 7,6 os valores do CENO foram observados em 100 ng/L e o valor de CEO foi de 1000 ng/L.

Já no tratamento de pH 7,3 não foi observado diferença significativa entre o controle e as diferentes concentrações. Os resultados das médias e desvios padrão dos ensaios em diferentes tratamentos de pH estão ilustrados nas tabelas 1, 2 e 3 e nos gráficos 1, 2 e 3.

Tabela 1 – Larvas Pluteus com desenvolvimento embriolarval normal em pH 8,1

pH 8,1 (Controle)					
[ ] ng/L	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**	**Média**
Controle	90	89	83	88	87,50
DMSO	85	85	90	91	87,75
1	81	78	74	62	73,75
10	69	66	67	78	70,00
100	68	70	58	66	65,50
1000	59	40	45	43	46,75

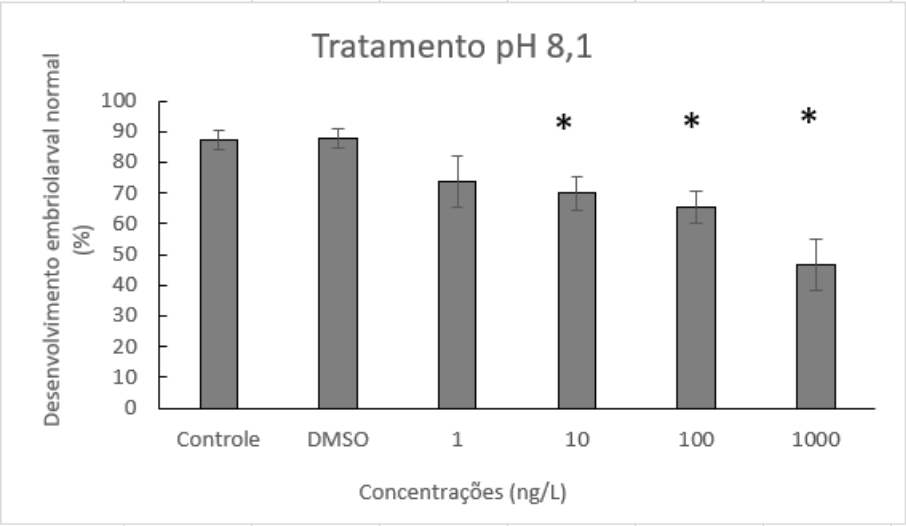

Figura 8 – Resultado do ensaio de toxicidade para avaliação de efeito crônico do EE2 para *E. lucunter* após 42h de exposição em pH 8,1. *Diferença significativa em relação ao controle (ANOVA - p≤ 0,05).

Tabela 2 – Larvas Pluteus com desenvolvimento embriolarval normal em pH 7,6

pH 7,6					
[ ] ng/L	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**	**Média**
Controle	23	16	9	13	15,25
DMSO	30	39	30	19	29,50
1	14	3	28	20	16,25
10	16	17	16	8	14,25
100	10	6	14	9	9,75
1000	10	6	11	7	8,50

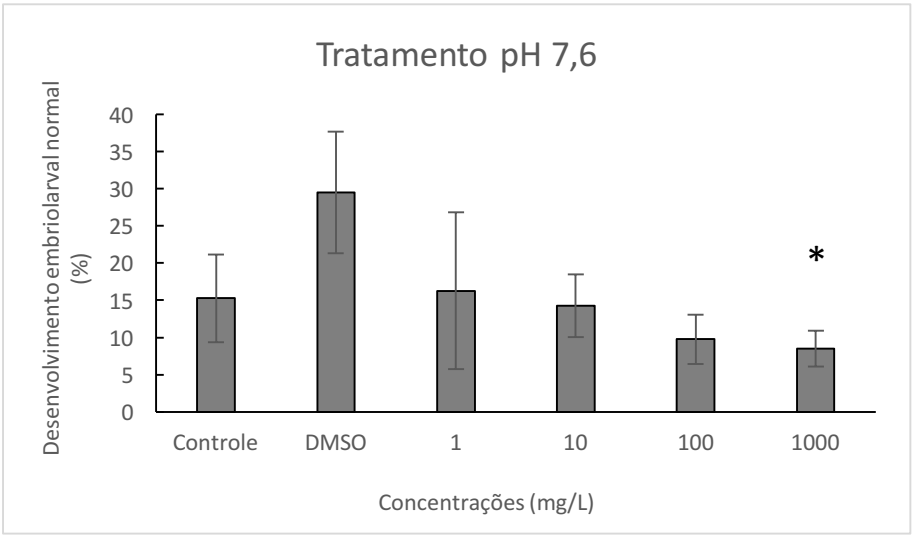

Figura 9 – Resultado do ensaio de toxicidade para avaliação de efeito crônico do EE2 para *E. lucunter* após 42h de exposição em pH 7,6. *Diferença significativa em relação ao controle (ANOVA - p≤ 0,05).

Tabela 3 – Larvas Pluteus com desenvolvimento embriolarval normal em pH 7,3

pH 7,3					
[ ] ng/L	**R1**	**R2**	**R3**	**R4**	**Média**
Controle	8	8	8	13	9,25
DMSO	14	16	11	17	14,5
1	13	14	7	7	10,25
10	13	3	12	16	11,00
100	13	9	7	6	8,75
1000	7	7	11	11	9,00

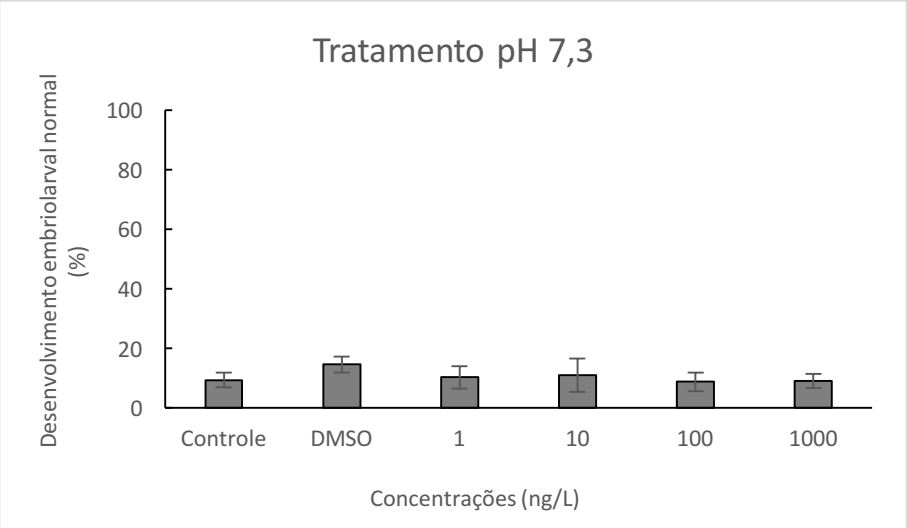

Figura 10 – Resultado do ensaio de toxicidade para avaliação de efeito crônico do EE2 para *E. lucunter* após 42h de exposição em pH 7,3. *Diferença significativa em relação ao controle (ANOVA - p≤ 0,05).

A partir dos resultados obtidos, foram comparados os controles dos diferentes tratamentos em relação a taxa média de desenvolvimento embriolarval normal, para se avaliar o efeito isolado do pH sobre o desenvolvimento dos organismos. Foi possível observar um nível de pH pontual responsável pelo efeito a 50% dos organismos analisados (EpH50 = 7,73). A gráfico 4 apresenta os dados obtidos para o EpH50.

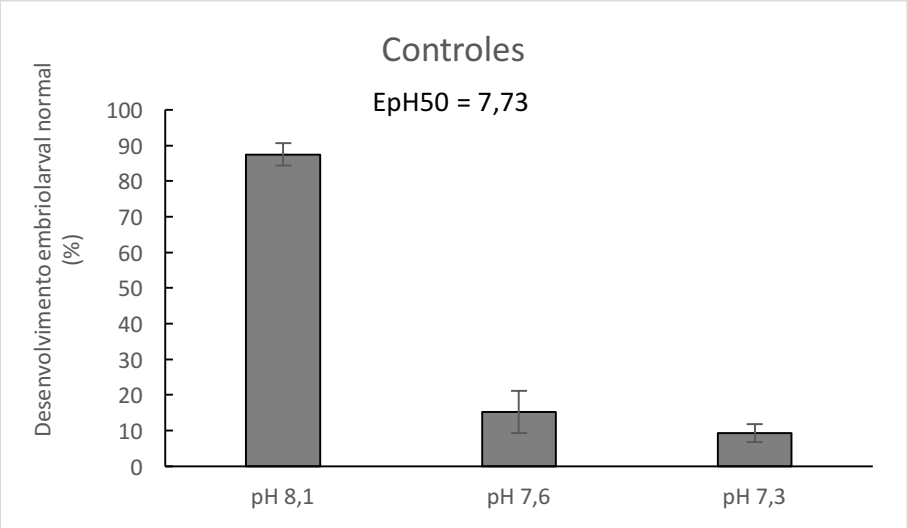

Figura 11 – Comparação entre os controles de cada pH

DISCUSSÃO

O EE2 é considerado um poluente de grande preocupação emergente e vem sendo encontrados em diferentes matrizes ambientais ao redor do mundo. Zhou et al. (2011) indicou a presença de 17α-etinilestradiol em concentrações de 7 a 24 $ng.L^{-1}$, em águas superficiais na China. Cargouët et al. (2004) relatou concentrações de 4,9 a 7,1 $ng.L^{-1}$ em afluente de ETE, 2,7 a 4,5 $ng.L^{-1}$ em efluentes de ETE e 1,1 a 2,9 $ng.L^{-1}$ em águas superficiais na França. Já na Suécia, Larsson et al. (1999) chegou a apontar concentrações de 4,5 e 2 $ng.L^{-1}$, em esgoto doméstico e efluente de ETE, respectivamente. E Kuch e Ballschmitter (2001) observou concentrações de 0,1 a 5,1 $ng.L^{-1}$, deste mesmo hormônio, em água (rio ou mar) na Alemanha.

No Brasil as concentrações são menores, porém apresentam riscos igualmente, principalmente pelo EE2 ser pseudo-persistente. Froehner et al. (2011) determinou concentrações de EE2 em sedimentos estuarinos variando num range de 0,45 a 129,78 $ng.g^{-1}$. Em águas superficiais alguns estudos apontam a presença do hormônio, porém em concentrações abaixo do limite de quantificação (LQ ≥ 1,51 $ng.L^{-1}$) na Lagoa de Araruama, Rios Paraíba do Sul, Macaé, Guandu, Lagoa Rodrigo de Freitas e Lagoa de Jacarepaguá (todos no estado do Rio de Janeiro) (KUSTER et al., 2009; LUCENA, 2013). O 17α-etinilestradiol também foi observado, em também quantidades abaixo de quantificação, em São Luiz – MA e Seropédica – RJ, em água potável (KUSTER et al., 2009; VERBINNEN et al., 2010). Ternes et al. (1999) indicou em seu estudo uma concentração de 0,005 $\mu g.L^{-1}$ de EE2 em esgoto doméstico em Penha – RJ.

Não existe uma legislação que indique concentrações de FPCP nocivas ao ambiente, no Brasil. O EE2 encontra-se apenas na listagem da EU Water Framework Directive, elaborada pela comissão Européia, mas, recentemente foi lançado um projeto de lei (PL 616/2019) que altera a Lei 6.360, de 23 de Setembro de 1976, de Vigilância Sanitária, para produtos farmacêuticos, cosméticos, entre outros produtos, cuja a toxicidade seja prejudicial aos recifes de corais, proibindo os protetores solares que apresentam tal efeito. O que ambientalmente é um começo para o Brasil, em relação a leis ambientais que tratam de FPCP.

O 17α-etinilestradiol no meio ambiente apresenta efeitos adversos para o ecossistema. Jürgens et al. (2002) aponta o hormônio desse estudo como o interferente endócrino mais potente para peixes. Dentre os efeitos já observados em estudos está a diminuição da maturidade gonadal e desenvolvimento de gônadas hermafroditas em mexilhões (PONJANA et al., 2007), mortalidade de peixes (SCHMID et al., 2002) e Alterações na morfogênese de ouriços do mar (KIYOMOTO et al., 2008).

No presente estudo, organismos expostos a EE2 em pH atual oceânico (pH 8,1) apresentaram efeito em concentrações a partir de 10 $ng.L^{-1}$. Esses dados foram semelhantes aos encontrados por Maranho et al. (2014), que observou efeitos em poliquetas em concentrações de 10 $ng.g^{-1}$ e 100 $ng.g^{-1}$. Nash et al. (2004), em testes crônicos, observou interferência na fecundidade de peixes em concentração de 5 $ng.L^{-1}$. Purdom et al. (1994) apontou em seu estudo que as concentrações de 0,1 a 15 $ng.L^{-1}$ altera o sexo de peixes expostos durante 10 dias e nas concentrações de 2 a 10 $ng.L^{-1}$ a fecundidade é alterada. Esses dados demonstram uma situação preocupante, uma vez que efeitos ocorrem em concentrações ambientalmente relevantes (próximas ao que já se vê em matrizes ambientais).

Por outro lado, quando a toxicidade do EE2 é observada em níveis de pHs mais baixos (7,6 e 7,3), foi constatado a diminuição da toxicidade intrínseca do 17α-etinilestradiol.

Esses resultados não corroboram a hipótese desse estudo, uma vez que se esperava uma toxicidade maior, por se tratar de um composto com estrutura molecular ácida. O EE2 tem características de um ácido fraco, onde um esse composto acaba por se dissociar mais facilmente em pHs mais altos, ocorrendo a formação de subprodutos. Por este motivo a toxicidade pode estar relacionada a características de degradação do EE2 em função o pH.

Em estudo realizado por Sun et al. (2010), foi demonstrado que, quanto maior o pH, maior a degradação do EE2 e assim a formação de subprodutos. Zhang et al. (2012) em seu estudo sobre a degradação de 17α-etinilestradiol por ozonização, afirma que em sua pesquisa, a degradação foi maior em valor de pH menor, porém com maior concentração de matéria orgânica natural, o que ele mesmo diz ser um resultado diferente do esperado, provavelmente pela

concentração maior de matéria orgânica natural, que consomem a molécula de ozônio e consequentemente diminui sua degradação.

Ainda no estudo de Sun et al. (2010), os autores mostram que em pH neutro (pH 7) o EE2 forma o produto intermediário EEO, que é isômero de EE2.

Ao comparar o presente estudo com os acima citados, pode-se sugerir a toxicidade mais elevada em pH 8,1 não seja da molécula de EE2 íntegra. É possível que seus produtos intermediários, gerados após a degradação, sejam mais ativas biologicamente, causando mais toxicidade.

CONCLUSÃO

A acidificação dos oceanos causada pelo excesso de CO_2 na atmosfera, conforme previsão do IPCC para o final deste século, afeta por si só o desenvolvimento embriolarval de ouriços do mar. Além disso, quando considerado o pH atual dos oceanos, o EE2 causou toxicidade aos embriões de ouriço do mar *Echinometra lucunter* em concentrações ambientalmente relevantes.

Embora o processo de acidificação oceânica tenha alterado a mobilidade do EE2, os efeitos causados pela diminuição do pH não potencializaram os efeitos do EE2 conforme a hipótese levantada no início desse estudo. O efeito tóxico mais severo do EE2 observado no pH atual está possivelmente relacionado a formação de subprodutos biologicamente ativos e mais tóxicos gerados em pH mais básico.

REFERÊNCIAS

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15350: **Ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica de curta duração – método de ensaio com ouriço do mar (Echinodermata: Echinoidea)**. P. 19. 2012.

ALDA, M. J. L.; GIL, A.; PAZ, E.; et al. **Occurrence and analysis of estrogens and progestogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry.** Analyst, v. 127 pág. 1299–1304. Setembro de 2002.

BARREIROS, L.; QUEIROZ, J. F.; MAGALHÃES, L. M.; et al. **Analysis of 17-β-estradiol and 17-α-ethinylestradiol in biological and environmental matrices — A review**. Microchemical Journal, v. 126 pág. 243-262. 2016.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. **Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências.** *Química Nova,* v. 30 n°.3 pág. 651-666. Fevereiro de 2007.

BRAGA, O.; SMYTHE, G. A.; SCHÄFER, A. I.; et al. **Steroid estrogens in ocean sediments**. Chemosphere, v. 61 pág. 827–833. 2005.

CALDEIRA, K.; WICKETT, M. E. **Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean**. J Geophys Res., v. 110 pág. 1–12. 2005.

CARGOUËT, M.; PERDIZ, D.; MOUATASSIM-SOUALI, A.; et al. **Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France**). Science of The Total Environment, v. 324 n°. 1–3 pág. 55–66. 2004.

CHEN, Y.; LI, M.; YUAN, L.; et al. **Growth, blood health, antioxidant status and immune response in juvenile yellow catfish Pelteobagrus fulvidraco exposed to α-ethinylestradiol (EE2)**. Fish & Shellfish Immunology, v. 69 pág. 1-5. Agosto de 2017.

CORTEZ, F. S.; SOUZA, L. S.; GUIMARÃES, L. P.; et al. **Ecotoxicological effects of losartan on the brownmussel Perna perna and its occurrence in seawater from Santos Bay (Brazil)**. Science of the Total Environment, v. 637–638 pág. 1363–1371. 2018.

CUNHA, D. L. **Avaliação do padrão de consumo do 17α – etinilestradiol no município de Santa Maria Madalena – RJ**. Rio de Janeiro: ENSP, 2014. 102 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2014.

FERNANDES, A. N.; GIOVANELA, M.; ALMEIDA, C. A. P. et al. **Remoção dos hormônios 17β-estradiol e 17α-etinilestradiol de soluções aquosas empregando turfa decomposta como material adsorvete.** Química Nova, v. 34 n°. 9 pág. 1526-1533. Junho de 2011.

FENSKE, M.; MAACK, G.; SCHÄFERS, C.; et al. **An environmentally relevant concentration of estrogen induces arrest of male gonad development in zebrafish, *Danio rerio***. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 24 n°. 5 pág. 1088–1098. 2005.

FROEHNER, S.; MACHADO, K. S.; STEFEN, E.; et al. **Occurrence of sexual hormones in sediments of mangrove in Brazil**. Water, Air, & Soil Pollution, v. 219 n°. 1-4 pág. 591–599. 2011.

FROEHNER, S.; MACHADO, K. S.; STEFEN, E.; et al. **Occurrence of selected estrogens in mangrove sediments**. Mar Pollut. Bull., v. 64 n°. 1 pág. 75–79. 2012.

GATTUSO, J.P.; HANSSON, L. **Ocean acidification: background and history**. In: GATTUSO, J.P.; HANSSON, L. Ocean Acidification, Oxford University Press: Oxford, 2011. P. 1-20. 2011.

IPCC – Intergovernmental Panel on Climate Change. **Summary for Policymakers**. In: Edenhofer, O.R.; Pichs-Madruga, Y.; Sokona, E.; et al. Climate Change 2014, Mitigation of Climate Change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press: Cambridge, United Kingdom and New York, NY USA, 2014.

JOOS, F.; FRÖLICHER, T. L.; STEINACHER, M.; et al. **Impact of climate change mitigation on ocean acidification projections**. In: GATTUSO, J.P.; HANSSON, L. Ocean Acidification, Oxford University Press: Oxford, 2011. P. 272-290.

JÜRGENS, M. D.; HOLTHAUS, K. I. E.; JOHNSON, A. C. et al. **The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers**. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 21 n°. 3 pág. 480–488. 2002.

KHESHGI, H.; CONINCK, H.; KESSELS, J. **Carbon dioxide capture and storage: Seven years after the IPCC special report**. Mitig Adapt Strateg Glob Change, v. 17 pág. 563–567. Maio de 2012.

KITA, J.; KIKKAWA, T.; ASAI, T.; et al. **Effects of elevated pCO2 on reproductive properties of the benthic copepod Tigriopus japonicus and gastropod Babylonia japónica**. Marine Pollution Bulletin, v. 73 pág. 402-408. 2013.

KIYOMOTO, M.; KIKUCHI, A.; MORINAGA, S.; et al. **Exogastrulation and interference with the expression of major yolk protein by estrogens administered to sea urchins**. Cell Biology and Toxicology, v. 24 n°. 6 pág. 611–620. 2008.

KUCH, H. M.; BALLSCHMITER, K. **Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by**

HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. Environmental science & technology, v. 35 n°. 15 pág. 3201–3206. 2001.

KUSTER, M.; AZEVEDO, D. A.; LÓPEZ DE ALDA, M. J.; et al. **Analysis of phytoestrogens, progestogens and estrogens in environmental waters from Rio de Janeiro (Brazil)**. Environment International, v. 35 n°. 7, pág. 997–1003. 2009.

LARSSON, D. G. J.; ADOLFSSON-ERICI, M.; PARKKNEN, J.; et al. **Ethinyloestradiol — an undesired fish contraceptive?** Aquatic Toxicology, v. 45 pág. 91-97. Abril de 1999.

LEI, B.; HUANG, S.; ZHOU, Y.; et al. **Levels of six estrogens in water and sediment from three rivers in Tianjin area, China**. Chemosphere, v. 76 pág. 36–42. 2009.

LUCENA, W. S. **Determinação de estrogênios em afluentes da lagoa de Araruama – RJ**. Rio de Janeiro: ENSP, 2013. 102 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, Rio de Janeiro, 2013.

LUZIO, A.; SANTOS, D.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. A.; et al. **Effects of 17α-ethinylestradiol at different water temperatures onzebrafish sex differentiation and gonad development.** Aquatic Toxicology, v. 174 pág. 22–35. Fevereiro de 2016.

MARANHO, L. A.; BAENA-NOGUERAS, R. M.; LARA-MARTÍN, P. A.; et al. **Bioavailability, oxidative stress, neurotoxicity and genotoxicity of pharmaceuticals bound to marine sediments. The use of the polychaete *Hediste diversicolor* as bioindicator species**. Environmental Research, v. 134 pág. 353–365. Setembro de 2014.

MARANHO, L. A.; ANDRÉ, C.; DELVALLS, T. A.; et al. **Toxicological evaluation of sediment samples spiked with human pharmaceutical products: Energy status and neuroendocrine effects in marine polychaetes *Hediste diversicolor***. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 118 pág. 27–36. Abril de 2015.

NASH, J. P.; KIME, D. E.; VAN DER VEN, L. T. M.; WESTER, P. W.; et al. **Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish**. Environmental Health Perspectives, v. 112 n°.17 pág. 1725–1733. 2004.

OROPESA, A. L.; MARTÍN-HIDALGO, D.; FALLOLA, C.; et al. **Effects of exposure to 17-alpha-ethynylestradiol on sperm quality of tench (*Tinca tinca*)**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 120 pág. 318–325. Junho de 2015.

ORR, J. C.; FABRY, V. J.; AUMONT, O.; et al. **Anthropogenic Ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms**. Nature, v. 437 n°. 29 pág. 681–686. Setembro de 2005.

PASSARELLI, M. C.; RIBA, I.; CESAR, A.; et al. **Assessing the influence of ocean acidification to marine amphipods: A comparative study**. Sci. Total. Environ., v. 595 pág. 759–768. 2017a.

PASSARELLI, M. C.; CESAR, A.; RIBA, I.; et al. **Comparative evaluation of sea-urchin larval stage sensitivity to ocean acidification**. Chemosphere, v. 184 pág. 224-234. Junho de 2017b.

PASSARELLI, M. C.; RIBA, I.; CESAR, A.; et al. **What is the best endpoint for assessing environmental risk associated with acidification caused by CO2 enrichment using mussels?** Marine Pollution Bulletin, v. 128 pág. 379-389. 2018a.

PASSARELLI, M. C.; RIBA, I.; CESAR, A.; et al. **Using a mesocosm approach to evaluate marine benthic assemblage alteration associated with CO2 enrichment in coastal environments**. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 157 pág. 29-39. 2018b.

PASSARELLI, M.C.; RAY, S.; CESAR, A.; et al. **Effects of CO2 enrichment on metal bioavailability and bioaccumulation using Mytilus galloprovincialis**. Marine Pollution Bulletin, v. 133 pág 124-136. 2018c.

PEÑA-GUZMÁN, C.; ULLOA-SÁNCHEZ, S.; MORA, K.; et al. **Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature.** Journal of Environmental Management, v. 237 pág. 408-423. 2019.

PEREIRA, P. V. S.; ANGONESI, D. **Efeitos do uso prolongado de contraceptivos orais**. Infarma, v. 21 no. 7/8 pág. 21-28. 2009.

PEREIRA, C. D. S.; MARANHO, L. A.; CORTEZ, F. S.; et al. **Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone**. Science of the Total Environment, v. 548–549 pág. 148–154. 2016.

PIMENTEL, M. F.; DAMASCENO, E. P.; JIMENEZ, P. C.; et al. **Endocrine disruption in *Sphoeroides testudineus* tissues and sediments highlights contamination in a northeastern Brazilian estuary**. Environ Monit Assess., v. 188 pág. 298. Abril de 2016.

POJANA, G.; GOMIERO, A.; JONKERS, N.; et al. **Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon**. Environment International, v. 33 pág. 929–936. Junho de 2007.

PURDOM, C. E.; HARDIMAN, P. A.; BYE, V. V. J.; et al. **Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works**. Chemistry and Ecology, v. 8 no. 4 pág 275-285. 1994.

PUSCEDDU, F. H., CHOUERI, R. B., PEREIRA, C. D. S., et al. **Environmental risk assessment of triclosán and ibuprofen in marine sediments using individual and sub-individual endpoints**. Environ. Pollut., v. 232 pág. 274–283. 2018.

SCHMID, T.; GONZALEZ-VALERO, J.; RUFLI, H.; et al., **Determination of Vitellogenin Kinetics in Male Fathead Minnows (*Pimephales promelas*)**. Toxicology Letters, v. 131 pág. 65-74. 2002.

SMOLARZ, K.; HALLMANN, A.; ZABRZANKA, S. et al. **Elevated gonadal atresia as biomarker of endocrine disruptors: Field and experimental studies using Mytilus trossulus (L.) and 17-alpha ethinylestradiol (EE2)**. Marine Pollution Bulletin, v. 120 pág. 58-67. 2017.

SOLÉ, M.; PORTE, C.; BARCELÓ, D. **Vitellogenin Induction and Other Biochemical Responses in Carp, *Cyprinus carpio*, After Experimental Injection with 17α-Ethynylestradiol.** Arch. Environ. Contam. Toxicol., v. 38 pág. 494–500. 2000.

SUN, W.; LI, S.; MAI, J.; et al. **Initial photocatalytic degradation intermediates/pathways of 17α-ethynylestradiol: Effect of pH and metanol**. Chemosphere, v. 81 pág. 92–99. Junho de 2010.

SZALAJ, D.; DE ORTE, M. R.; GOULDING, T. A.; et al. **The effects of ocean acidification and a carbon dioxide capture and storage leak on the early life stages of the marine mussel *Perna perna* (Linneaus, 1758) and metal bioavailability**. Environ Sci Pollut Res. Outubro de 2016.

TERNES, T. A.; KRECKEL, P.; MUELLER, J. **Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants-II**. Aerobic batch experiments with activated sludge. The Science of the total environment, v. 225 n°. 1-2 pág. 91–99. 1999.

TERNES, T. A.; ANDERSEN, H.; GILBERG, D.; et al. **Determination of Estrogens in Sludge and Sediments by Liquid Extraction and GC/MS/MS**. Analytical Chemistry, v. 74 n°. 14 pág. 3498-3504. Maio de 2002.

VALCARCE, D.G.; VUELTA, E.; ROBLES, V.; et al. **Paternal exposure to environmental 17-alpha-ethinylestradiol concentrations modifies testicular transcription, affecting the sperm transcript content and the offspring performance in zebrafish**. Aquatic Toxicology, v. 193 pág. 18-29. 2017.

VERBINNEN, R. T.; NUNES, G. S.; VIEIRA, E. M. **Determination of estrogens in drinking water using HPLC-DAD**. Química Nova, v. 33 n°. 9 pág. 1837–1842. 2010.

WEST, Inc; GULLEY, D. Western Ecosystems Technology. TOXTAT 3.5 Computer Program, 1996.

YING, G.G.; KOOKANA, R. S.; RU, Y.J. **Occurrence and fate of hormone**

steroids in the environment. Environment International, v. 28 pág. 545– 551. 2002.

ZHANG, X.; LI, Q.; LI, G.; et al. **Levels of estrogenic compounds in Xiamen Bay sediment, China**. Marine Pollution Bulletin, v. 58 pág. 1210–1216. 2009.

ZHANG, X.; GAO, Y.; LI, G.; et al. **Estrogenic Compounds and Estrogenicity in Surface Water, Sediments, and Organisms from Yundang Lagoon in Xiamen, China**. Arch Environ Contam Toxicol., v. 61 pág. 93–100. 2011.

ZHANG, Z.; ZHU, H.; WEN, X.; et al. **Degradation behavior of 17α-ethinylestradiol by ozonation in the synthetic secondary effluent**. Journal of Environmental Sciences, v. 24 no. 2 pág. 228–233. 2012.

ZHOU, X.; LIAN, Z.; WANG, J.; et al. **Distribution of estrogens along Licun River in Qingdao, China**. Procedia Environmental Sciences, v. 10 pág. 1876–1880. 2011.