

SETSUKO SATO ACHANDO

AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE DOSAGEM DE PREGNANDIOL URINÁRIO POR  
CROMATOGRAFIA A GÁS.

*Tese apresentada ao Instituto de  
Bióciências da Universidade de  
São Paulo, Departamento de Fisiologia  
Geral, para obtenção do título de  
"Mestre em Fisiologia" sob a orientação do Prof. Dr. Bernardo  
Léo Wajchenberg.*

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Instituto de Biociências  
Departamento de Fisiologia Geral

Instituto de Energia Atômica  
Coordenadoria de Aplicações  
de Radioisótopos e Radiações  
à Medicina.

1975

A Serafim

Ao PROF. DR. BERNARDO LÉO WAJCHENBERG

*Orientador*

Ao PROF. DR. PAULO SAWAYA

*Co-Orientador (Departamento de Fisiologia Geral*

Ao PROF. DR. RÔMULO RIBEIRO PIERONI

*Superintendente do Instituto de Energia Atômica*

Aos Médicos da Unidade de Diabetes e Supra -Renal da 1a. Clínica

*Médica do Hospital das Clínicas da FMSP.*

Aos colegas da Coordenadoria de Aplicações de Radioisótopos e Ra-

*diacões à Medicina.*

A todos , que de alguma forma , direta ou indiretamente , con -

*tribuíram para a realização deste trabalho,*

*nossoe agradecimentos.*

ABREVIATURAS

<i>P'DIOL</i>	<i>Pregnandiol</i>
<i>PG</i>	<i>Progesterona</i>
<i>PT</i>	<i>Pregnantriol</i>
<i>AloP'diol</i>	<i>Alopregnandiol</i>
$\bar{x}$	<i>Média</i>
$s$	<i>Desvio padrão</i>
<i>c.v.</i>	<i>Coefficiente de variação</i>
<i>I.C.</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
<i>r</i>	<i>Coefficiente de correlação</i>
$\alpha$	<i>Nível de significância</i>

\*\*\*\*\*

## ÍNDICE

	<i>Página</i>
<i>Abreviaturas</i>	
1. <i>INTRODUÇÃO</i> .....	1
2. <i>MATERIAIS E MÉTODO</i> .....	8
2.1. <i>Material Biológico</i> .....	8
2.2. <i>Reagentes</i> .....	8
2.2.1. <i>Para hidrólise e extração</i> .....	8
2.2.2. <i>Para acetilação</i> .....	9
2.2.3. <i>Padrões dos esteróides</i> .....	9
2.3. <i>Preparo dos reagentes</i> .....	9
2.3.1. <i>Padrões</i> .....	9
2.3.2. <i>Soluções</i> .....	9
2.4. <i>Purificação de álcool etílico</i> .....	10
2.5. <i>Material utilizado no cromatógrafo a gás</i> .....	10
2.6. <i>Método</i> .....	11

	<i>Página</i>
2.6.1. <i>Hidrólise ácida</i> .....	11
2.6.2. <i>Extração</i> .....	13
2.6.3. <i>Acetilação</i> .....	13
2.6.4 <i>Condições de trabalho do cromatógrafo a gás</i>	14
2.6.5 <i>Cálculo</i> .....	14
3. <i>AVALIAÇÃO DA SEQUÊNCIA OPERACIONAL PARA O ENSAIO DE PREG NANDIOL NA URINA</i> .....	16
3.1. <i>Especificidade</i> .....	16
3.2. <i>Sensibilidade de detecção no cromatógrafo a gás</i>	17
3.3. <i>Sensibilidade do método</i> .....	17
3.4. <i>Precisão</i> .....	17
3.5. <i>Exatidão</i> .....	18
4. <i>RESULTADOS</i> .....	20
5. <i>DISCUSSÃO</i> .....	40
6. <i>CONCLUSÕES</i> .....	44
7. <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i> .....	45

\*\*\*\*\*

## 1. INTRODUÇÃO

Desde que Marrian (1929), isolou o pregnandiol da urina humana e o identificou como um dos mais importantes metabolitos da progesterona, a análise de pregnandiol urinário tem sido considerada como uma maneira conveniente de se estimar a secreção de progesterona (30).

Com efeito, é conhecido que a excreção de pregnandiol aumenta em situações, onde a produção de progesterona está aumentada, como em gravidez e na fase lútea do ciclo menstrual. Entretanto, a injeção diária de progesterona em doses de 50 mg/dia, por um período de 2 semanas para homens e mulheres em menopausa, resultaram na recuperação, em termos, de pregnandiol urinário correspondente a quantidade de apenas 12,2 % do hormônio administrado.

Resultados semelhantes foram obtidos com o uso de traçadores radioativos (Romanoff, 1962 e 1963), utilizando o pregnandiol urinário para calcular a taxa secretória de progesterona, após a injeção do precursor radioativo, através de atividades específicas do seu metabolito urinário em consideração.

Diversas outras substâncias, além de progesterona, são

excretado do pregnandiol urinário e em certas circunstâncias, sendo secretadas em quantidades suficientes, para invalidar a suposição - de que o ensaio de pregnandiol na urina reflete exatamente o nível - de secreção de progesterona.

Os esteróides que eventualmente contribuem, de uma maneira importante para o pregnandiol excretado na urina, são além de progesterona, a pregnenolona e a desoxicorticosterona. Enquanto que a desoxicorticosterona é, provavelmente, de pequena importância, desde que a sua conversão para o pregnandiol, se admite ocorrer somente a limitada extensão.

O papel precursor de pregnenolona poderia ser mais importante, especialmente no homem, onde se pode constituir em precursor importante do pregnandiol.

Todavia, o grau exato de conversão de cada um deles é incerto, além do fato de que Arcos e outros (1964) apresentaram evidência indireta de que sulfato de pregnenolona pudesse também ser secretado e participar do "pool" pregnandiol<sup>(30)</sup>.

Contudo, apesar de todas estas limitações, pode-se seguramente indicar de que para o uso clínico, a excreção do pregnandiol urinário, em mulheres, salvo em condições excepcionais, pode ser utilizada como um teste fiel da secreção de progesterona pelo ovário.

Nestas condições, achamos útil rever a biosíntese -



da progesterona que se acredita seguir a determinada sequência enzimática, a partir de acetato, através do colesterol e pregnenolona como é classicamente descrito (Fig. 1).

Os metabolitos de progesterona podem ser classificados em 3 grupos, com base no grau de redução progressiva (Fig. 2).

1º) *Pregnandionas*:— A redução da dupla ligação entre  $C_4$  e  $C_5$ , (enzima catalizadora  $\Delta^4-5\alpha$  ou  $\Delta^4-5\beta$  redutase), produz 2 compostos isômeros: pregnandiona (H, em  $C_5$ , na posição  $\beta$ ) e o alopregnandiona (H, em  $C_5$ , na posição  $\alpha$ ).

2º) *Pregnanolonas*:— resultantes da redução do grupo ceto em  $C_3$  (enzima catalizadora  $3\alpha$  ou  $3\beta$  hidroxisteroide desidrogenase). Os metabolitos urinários são preponderantemente de configuração  $\alpha$ , embora o grupo hidroxila possa estar nas posições  $\alpha$  ou  $\beta$ .

3º) *Pregnandiois*:— A redução do grupo ceto em  $C_{20}$  (enzima catalizadora  $20\alpha$  ou  $20\beta$  hidroxisteroide desidrogenase) produz metabolitos isômeros, o pregnandiol e o alopregnandiol.

Como no caso dos pregnanolonas, os metabolitos contendo a hidroxila do  $C_{20}$  em posição  $\alpha$  são quantitativamente mais importantes. Estes metabolitos reduzidos, conjugados com o ácido glicurônico são excretados como glicuronatos de pregnandiol ou alopregnandiol, solúveis em meio aquoso.

A conjugação com o ácido glicurônico se faz no  $C_3$  da mo -

Fig. 1 - BIOSINTESE DA PROGESTERONA

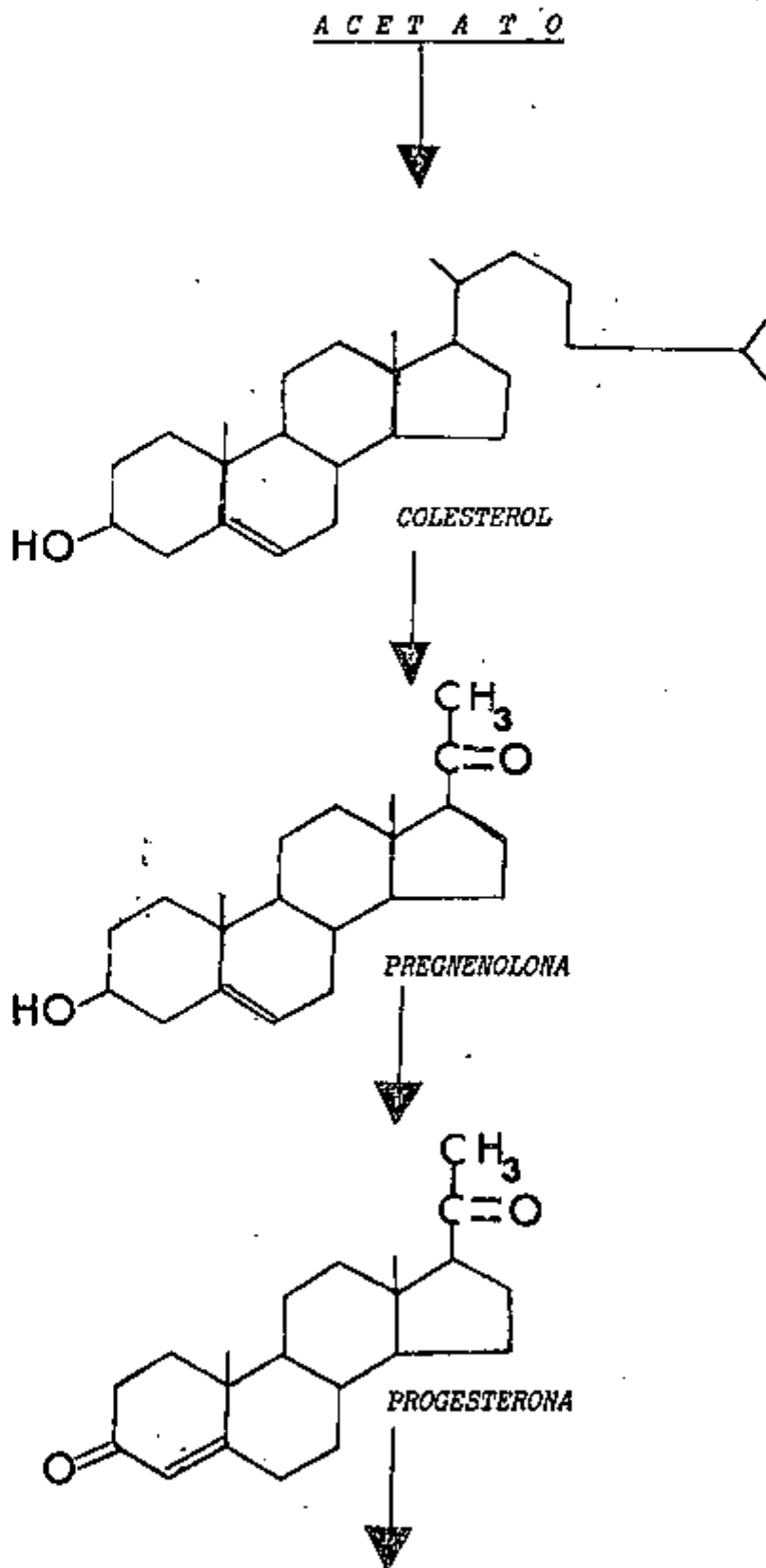
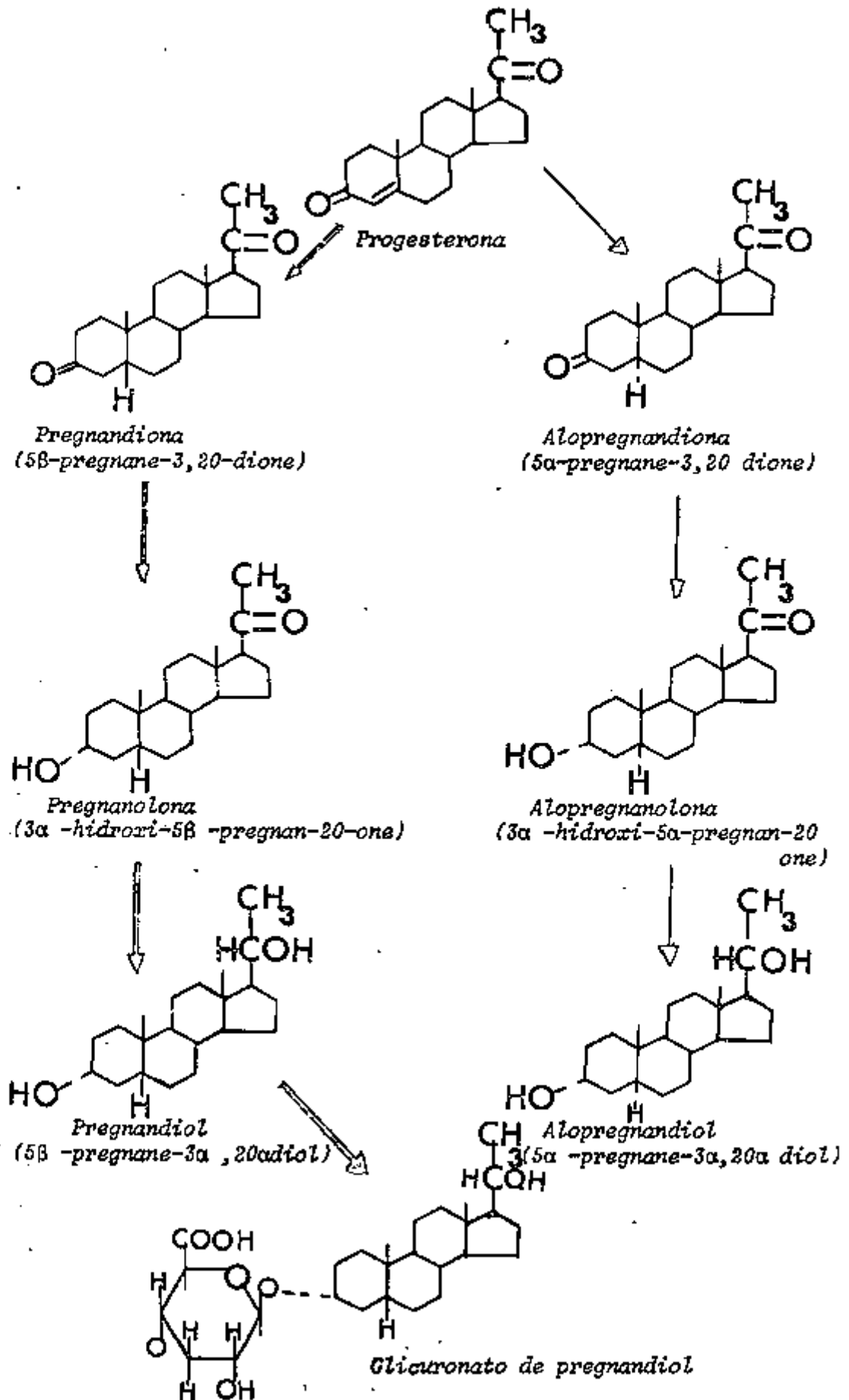


Fig. 2- METABOLISMO DA PROGESTERONA



*lêcula para formar o pregnandiol glicuronato ou glicuronato de - pregnandiol , que é facilmente hidrolizado na urina, liberando-se o esteróide livre , insolúvel.*

*A excreção de pregnandiol , como índice da função ovariana e placentária , tem sido exclusivamente avaliada por métodos químicos clássicos (Klopper 1956 e Loraine 1958).*

*Suas medidas , quando realizadas sequencialmente , tornam-se significantes na demonstração da produção de progesterona e presumivelmente da ocorrência de ovulação.*

*Todos os procedimentos analíticos requerem, inicialmente , a separação da glicose , em caso de pacientes diabéticos.*

*A aplicação de cromatografia a gás , para a análise dos hormônios esteróides , trouxe para o laboratório procedimentos com os quais os métodos químicos não podiam competir , quer na velocidade, quer na sensibilidade .Este novo instrumento foi logo aplicado para a análise do pregnandiol<sup>(35)</sup>.*

*Vários métodos de determinação de pregnandiol , usando - cromatografia a gás , têm sido publicados<sup>(5,12,15 e 31)</sup> e muitos destes foram , de uma maneira preliminar, sem suficientes provas de sua validade ou praticabilidade , além de serem utilizados para medidas em conjuntos com outros metabolitos , fazendo a estimativa do pregnandiol um procedimento relativamente longo.*

*As principais etapas na análise do pregnandiol , descri-*

tas na literatura <sup>(20)</sup>, são geralmente as seguintes:-

- a) Hidrólise ácida ,
- b) Extração com o tolueno ,
- c) Cromatografia em camada delgada ou sílica gel,
- d) Eluição de pregnandiol pelo álcool etílico ,
- e) Determinação final por cromatografia a gás.

Entretanto, a sensibilidade e a especificidade desta técnica não foram discutidas por seus introdutores mas , segundo eles , a exatidão encontrada foi satisfatória , com recuperação em torno de 80 a 90 %.

Hotiz e colaboradores , exploraram em profundidade a validade deste método , sendo a especificidade , sensibilidade , precisão e exatidão comparados favoravelmente com o estabelecido pela técnica clássica descrita por Klopper <sup>(19)</sup>. Por estas razões foi escolhida a cromatografia a gás para a determinação da dosagem de pregnandiol no Instituto de Energia Atômica.

No presente trabalho , está descrita a experiência com a análise do pregnandiol por cromatografia a gás , mostrando as excelentes características operacionais do método , sem qualquer necessidade de purificação prévia do extrato urinário (fase de cromatografia em camada delgada ou sílica gel).

\*\*\*\*\*

## 2. MATERIAIS E MÉTODO.

### 2.1. MATERIAL BIOLÓGICO:-

#### 2.1.1. Urina total de 24 horas.

As urinas foram coletadas dos pacientes e funcionárias do Hospital das Clínicas, da Universidade de São Paulo. O material foi colhido com o timol e conservado em congelador, a (-20°C) até o momento da dosagem.

### 2.2. REAGENTES:-

#### 2.2.1. Para hidrólise e extração.

Ácido clorídrico conc. P.A. (Merck)

Acetona para cromatografia RS (Carlo Erba)

Álcool etílico P.A. (Carlo Erba)

Cloridrato de m-fenilenodiamina P.A. (Merck)

Hidróxido de sódio P.A. (Merck)

Cloreto de sódio P.A. (Merck)

Sulfato de sódio anidro (Merck)

Tolueno para cromatografia RS (Carlo Erba)

*Cloridrato de fenilhidrazina (Merck)*

*Tolueno P.A. (Baker)*

*Papel Filtro Toyo nº 1*

2.2.2. Para acetilação

*Piridina R.P. (Carlo Erba)*

*Anidrido acético P.A. (Merck)*

2.2.3. Padrão dos Esteróides

*Pregnandiól (5 $\beta$ -pregnane-3 $\alpha$ ,20 $\alpha$  diól)-Schwara/Mann*

*Progesterona ( $\Delta^4$ -pregnen-3,20 dione) - " "*

*Pregnantriól (5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,20 $\alpha$  triól) "*

*Colesterol propionato (C<sub>27</sub>H<sub>45</sub>O C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>) - Sigma*

*Alopregnandiól (5 $\alpha$ -pregnane-3 $\alpha$ -20 $\alpha$  diól)- "*

2.3. PREPARO DOS REAGENTES

2.3.1. Padrões:-

*Pregnandiól - 10 mg/50 ml de álcool etílico bidest.*

*Progesterona- 10 mg/50 ml de álcool etílico bidest.*

*Pregnantriól- 10 mg/50 ml de álcool etílico bidest.*

*Colesterol propionato-10mg/50ml de álcool etil. bidest.*

*Alopregnandiól-10mg/50 ml de álcool etílico bidest.*

2.3.2. Soluções:-

*Solução 1N de NaOH (40 g de NaOH em 1 litro de água - destilada ).*

*Solução 25 % de NaCl 1N NaOH (250 g de NaCl em 1 litro de NaOH 1 N).*

#### 2.4. PURIFICAÇÃO DE ÁLCOOL ETÍLICO

Num balão de 3 litros colocamos 10 g de cloridrato de m-fenilendiamina e 2 litros de álcool etílico P.A. e deixamos em repouso durante 24 horas, agitando-o umas três vezes, durante este período. Levamos a refluxo durante 6 horas. Filtramos com papel filtro e destilamos. Temperatura de destilação 77,5 - 77,8°C. Desprezamos a porção inicial, recolhendo apenas o terço médio, que foi tratado com sulfato de sódio anidro. Filtramos e redestilamos, utilizando apenas o terço médio que não deve desenvolver cor na presença de cloridrato de fenilhidrazina mais ácido sulfúrico (12).

#### 2.5. MATERIAL UTILIZADO NO CROMATÓGRAFO A GÁS. (Modelo 1800 da Varian Aerograph)

Nitrogênio U (Oxigênio do Brasil) ou SS (White Martins)

Ar comprimido (White Martins)

Gerador de hidrogênio - Modelo 9.652 (Varian Aerograph)

Seringa "Hamilton" de 10 ul

Coluna de vidro 6 pés de comprimento, 1/4 de polegadas de diâmetro interno.

Detetor de ionização de chama

Boleômetro, para mensuração dos fluxos dos gases utilizados no cromatógrafo.

Papel para registrador (Varian Aerograph)

Registrador modelo 20 (Varian Aerograph)

Água deionizada e destilada em quartzo, preparada na Coordenadoria de Engenharia Química do Instituto de Energia Atômica



#### 2.4. PURIFICAÇÃO DE ÁLCOOL ETÍLICO

Num balão de 3 litros colocamos 10 g de cloridrato de m-fenilendiamina e 2 litros de álcool etílico P.A. e deixamos em repouso durante 24 horas, agitando-o umas três vezes, durante este período. Levamos a refluxo durante 6 horas. Filtramos com papel filtro e destilamos. Temperatura de destilação 77,5 - 77,8°C. Desprezamos a porção inicial, recolhendo apenas o terço médio, que foi tratado com sulfato de sódio anidro. Filtramos e redestilamos, utilizando apenas o terço médio que não deve desenvolver cor na presença de cloridrato de fenilhidrazina mais ácido sulfúrico (12).

#### 2.5. MATERIAL UTILIZADO NO CROMATÓGRAFO A GÁS. (Modelo 1800 da Varian Aerograph)

Nitrogênio U (Oxigênio do Brasil) ou SS (White Martins)

Ar comprimido (White Martins)

Gerador de hidrogênio - Modelo 9.652 (Varian Aerograph)

Seringa "Hamilton" de 10 ul

Coluna de vidro 6 pés de comprimento, 1/4 de polegadas de diâmetro interno.

Detetor de ionização de chama

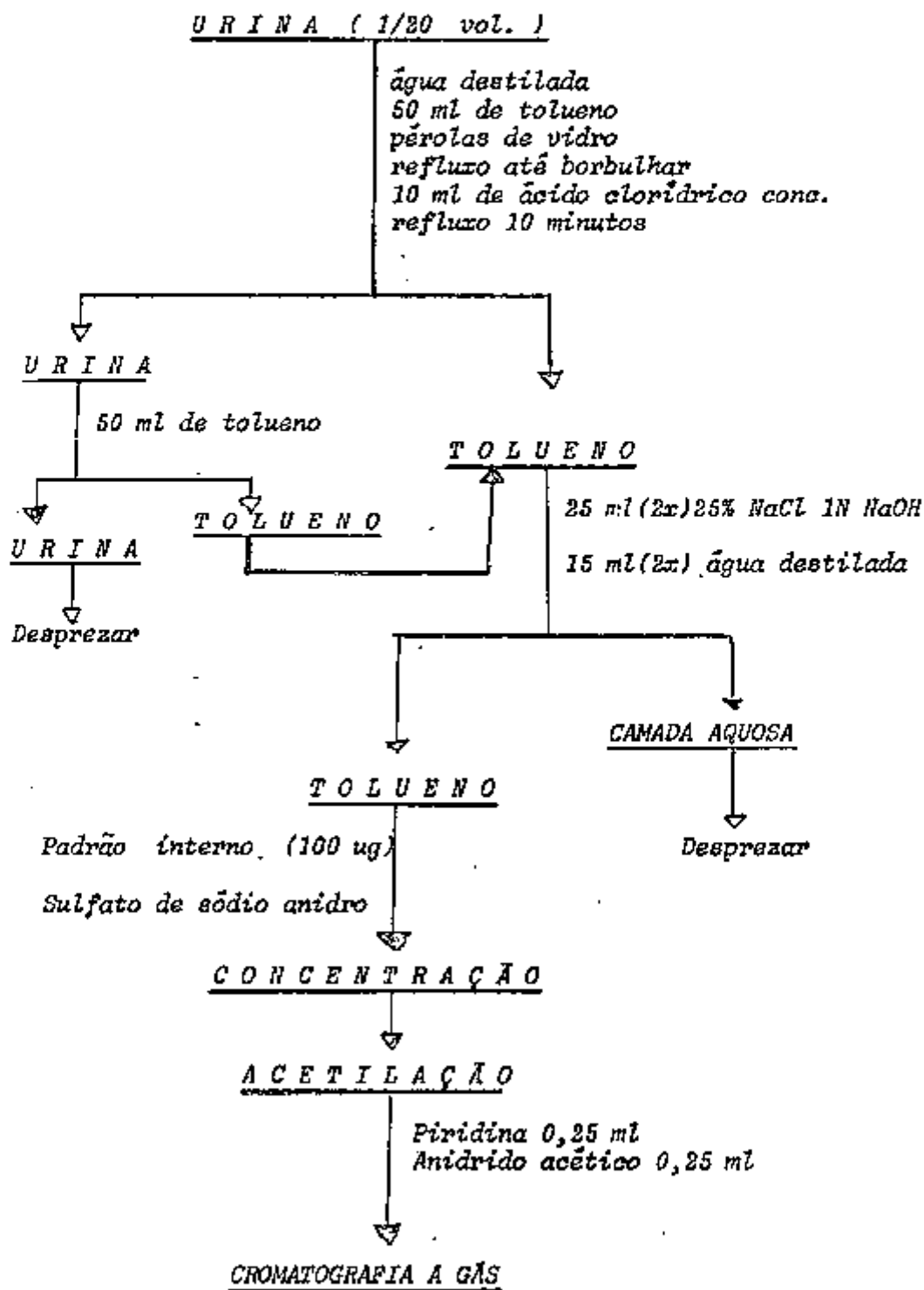
Boleômetro, para mensuração dos fluxos dos gases utilizados no cromatógrafo.

Papel para registrador (Varian Aerograph)

Registrador modelo 20 (Varian Aerograph)

Água deionizada e destilada em quartzo, preparada na Coordenadoria de Engenharia Química do Instituto de Energia Atômica

Fig. 3

ESQUEMA DO MÉTODO PARA DOSAGEM DE PREGNANDIOL URINÁRIO.

### 2.6.2. Extração

Transfere-se o material hidrolizado para um funil de separação, com capacidade de 300 ml, e agitando-o vigorosamente durante 2 minutos, separando a urina do tolueno o qual foi recolhido em um erlenmeyer. À urina acrescentamos 50 ml de tolueno e agitamos, desprezando a urina e conservando o solvente orgânico, que foi adicionado ao previamente recolhido no erlenmeyer. Lavamos o tolueno 2 vezes com 25 ml de solução alcalina (25 % de NaCl em 1 N de NaOH). Esta solução não somente quebra a emulsão mas também remove os ácidos e os componentes fenólicos (estrogênicos). Despreza-se a camada aquosa e lava-se com 10 ml de água destilada, 2 vezes, verificamos o p.H que deve ser o mesmo daquele da água. Caso contrário, lavamos novamente com a água destilada para eliminar os elementos alcalinos.

Transferimos o tolueno purificado para um erlenmeyer de 300 ml e acrescentamos 100 ug de colesterol propionato (padrão interno) e 10 g de sulfato de sódio anidro, com o fim de desidratar o tolueno. Foi filtrado com papel Toyo nº 1, num balão de 250 ml. Concentrou-se com o evaporador rotatório (Buchler-Instrument) a vácuo, em banho-maria, à temperatura de aproximadamente 50 °C.

O concentrado foi dissolvido, cuidadosamente, com 5 ml de acetona e o transferimos, com uma pipeta de Pasteur, para um tubo de ensaio. Este tubo, contendo o solvente orgânico (acetona), foi evaporado sob nitrogênio, em banho-maria à temperatura de mais ou menos 55°C (H-Evap -Modelo -106 da "Organomation Assoc.").

### 2.6.3. Acetilação

Ao extrato seco , adicionamos uma mistura de piridina e anidrido acético em partes iguais (0,25 ml). A mistura foi homogeneizada e deixada em repouso durante 24 horas , à temperatura ambiente , em um dessecador a vácuo. Preparamos paralelamente para cada série de dosagens um padrão (100 ug) de igual quantidade de pregnandiol e colesterol propionato (padrão interno) que foram acetilados do mesmo modo que o extrato urinário. Secamos os tubos sob nitrogênio , à temperatura de 55°C. O extrato seco foi dissolvido em 200 microlitos de acetona e injetou-se um microlito com a seringa "Hamilton" , no cromatógrafo a gás.

#### 2.6.4. Condições de trabalho do cromatógrafo a gás.

Temperatura da coluna -	250 °C
Temperatura do detetor -	280 °C
Temperatura do injetor -	270 °C
Fluxo de nitrogênio -	35 ml/min.
Fluxo de hidrogênio -	35 ml/min.
Fluxo do ar comprimido -	350 ml/min.
Velocidade do registrador -	1 polegada em 10 min.
Sensibilidade de atenuação de 1 a 32 X	$10^{-10}$

#### 2.6.5. Cálculo

$$\text{mg de P'diol/24 horas} = \frac{R_{St} \cdot R_u \cdot I \cdot \text{Vol. Total}}{\text{Vol. usado} \cdot 1000}$$

onde:-

$$R_{St} = \frac{\text{Altura do Pico Padrão interno (100 ug)}}{\text{Altura do Pico P'diol (100 ug)}}$$

$$R_u = \frac{\text{Altura do Pico P'diol na urina}}{\text{Altura do Pico Padrão interno na urina}}$$

$$I = \text{ug de padrão interno adicionado (100 ug)}$$

3. AVALIAÇÃO DA SEQUÊNCIA OPERACIONAL PARA O ENSAIO DE PREGNANDIOL  
NA URINA.

3.1. Especificidade

Pode ser definida como o grau a que somente o esteróide a ser ensaiado é medido, livre da interferência de outras substâncias. A especificidade depende portanto, em nosso estudo, de como o esteróide pode ser completamente separado de outros constituintes urinários e de substâncias com o mesmo tempo de retenção. A especificidade foi avaliada de 6 maneiras :-

a) Mistura de padrões de Pregnandiol, Progesterona e Pregnantriol (100 ug).

b) Urina adicionada de Pregnandiol, Progesterona e Pregnantriol antes da hidrólise ácida.

c) Urina adicionada de Pregnandiol, Progesterona e Pregnantriol depois da hidrólise ácida.

d) Urina sem adição de esteróides.

e) Mistura de padrões Pregnandiol e Alopregandiol (100 µg)

f) Urina adicionada de Pregnandiol e Alopregandiol.

### 3.2. Sensibilidade de detecção no cromatógrafo a gás.

É definida como a menor quantidade de esteróide detectada no cromatógrafo .

### 3.3. Sensibilidade do método.

É definida como sendo a menor quantidade de hormônio, adicionada à urina , que pode ser medida. Foi avaliada através da análise quintuplicada de uma mistura de urinas de baixo nível ("pool"-baixo B) a que foram adicionadas quantidades crescentes do esteróide , 0, 2 , 4 e 8 µg.

### 3.4. Precisão

A precisão é definida através de um dado número de medidas, da mesma amostra , que dêem resultados concordantes entre si que sejam muito próximos , quanto possível , um do outro. Uma estimativa da precisão foi obtida calculando-se o coeficiente de variação - das medidas em 2 etapas diferentes:

a) Reprodutibilidade intra-ensaio: utilizando-se uma mistura de urinas com concentração baixa de pregnandiol ("pool"-baixo ) da qual 7 aliquotas foram dosadas no mesmo dia. Foram calculados a

média , o desvio padrão , o coeficiente de variação e o intervalo de confiança de 95 %.

b) *Reprodutibilidade inter-ensaio* : a cada semana, estudou-se preparando amostras iguais de uma mistura de urinas com concentração baixa de pregnandiol ("pool" baixo) dosando uma alíquota , em duplicata , durante 7 semanas sucessivas.

### 3.5. Exatidão

Este parâmetro foi avaliado através da recuperação de quantidades conhecidas de pregnandiol adicionadas a uma mistura de urinas ("pool" baixo -B) , previamente quantificada .Esta avaliação foi efetuada em 3 etapas.

a) Pela adição de quantidades progressivamente maiores de uma mistura de urinas de concentração alta ("Pool" alto-A) a uma mistura de concentração baixa ("Pool" baixo-B) , de volume constante , conforme a Tabela A.

TABELA A

Amostra nº	Fração de urina vol. /24 horas	
	B	A
1 e 2	1/80	1/640
3 e 4	1/80	1/340
5 e 6	1/80	1/160
7 e 8	1/80	1/ 80



b) Pela adição de quantidades progressivamente maiores de uma mistura de urinas de concentração baixa ("pool" baixo-B) a uma mistura de concentração alta ("pool" alto-A), de volume constante, como indicado na Tabela B.

TABELA B

Amostra nº	Fração de urina vol. / 24 horas	
	A	B
1 e 2	1/40	1/320
3 e 4	1/40	1/160
5 e 6	1/40	1/80
7 e 8	1/40	1/40

c) Pela adição de quantidades progressivamente maiores de pregnandiol a uma mistura de urinas de concentração baixa ("pool" baixo-B), de volume constante e previamente determinada, conforme a Tabela C.

TABELA C

Amostra nº	Fração de urina vol./24 horas B	Pregnandiol adicionado ug
1 e 2	1/40	50
3 e 4	1/40	100
5 e 6	1/40	200

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. Especificidade

A especificidade foi avaliada na cromatografia a gás, pela capacidade de separação de pregnandiol dos demais metabólitos urinários, realizando a cromatografia da mistura de padrões, pregnandiol, progesterona e pregnantriol, submetida à acetilação e observamos os seguintes tempos de retenção (Fig. 4)

Progesterona .....	5,40 min.
Pregnandiol .....	7,15 min.
Pregnantriol .....	10,45 min.

Do mesmo modo, a adição destes esteróides, nas mesmas quantidades, 100 ug, à urina (1/20 vol, 24 horas), com excreção de pregnandiol 2,35 mg/24 horas (Fig. 5), mostrou tempo de retenção, similar ao obtido com a mistura dos padrões (Fig. 6).

É de se observar que não houve redução de altura do pico correspondente à quantidade do esteróide adicionado, antes e após a hidrólise ácida, indicando não haver destruição do esteróide, pregnandiol, com a hidrólise ácida (Figs. 6 e 7).

Com efeito, recuperou-se 99,9 % e 94,2 % do esteróide,

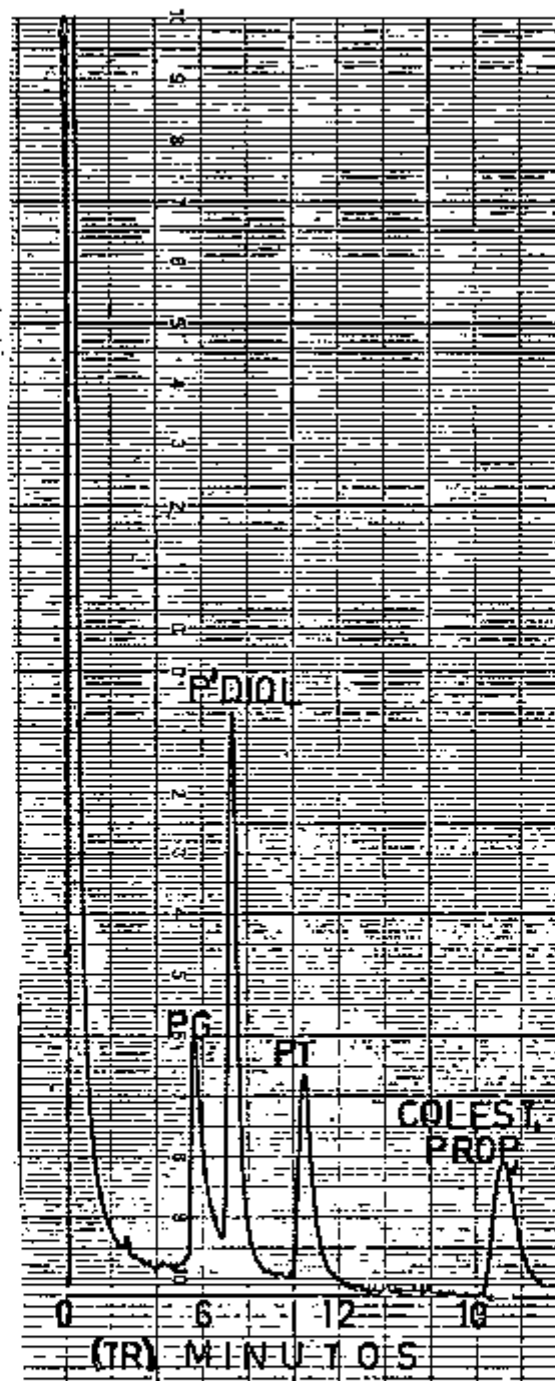


Fig. 4 - Cromatograma a gás de uma mistura de esteróide: Progesterona (PG), Pregnan<sub>3</sub>diol (P'diol), Pregnan<sub>20</sub>triol (PT) e Colesterol propionato, em uma coluna SE-30 a 3%. Temperatura da coluna 250. 9C e fluxo de N<sub>2</sub> = 35 ml/min. Sensibilidade de atenuação  $2 \times 10^{-10}$ .

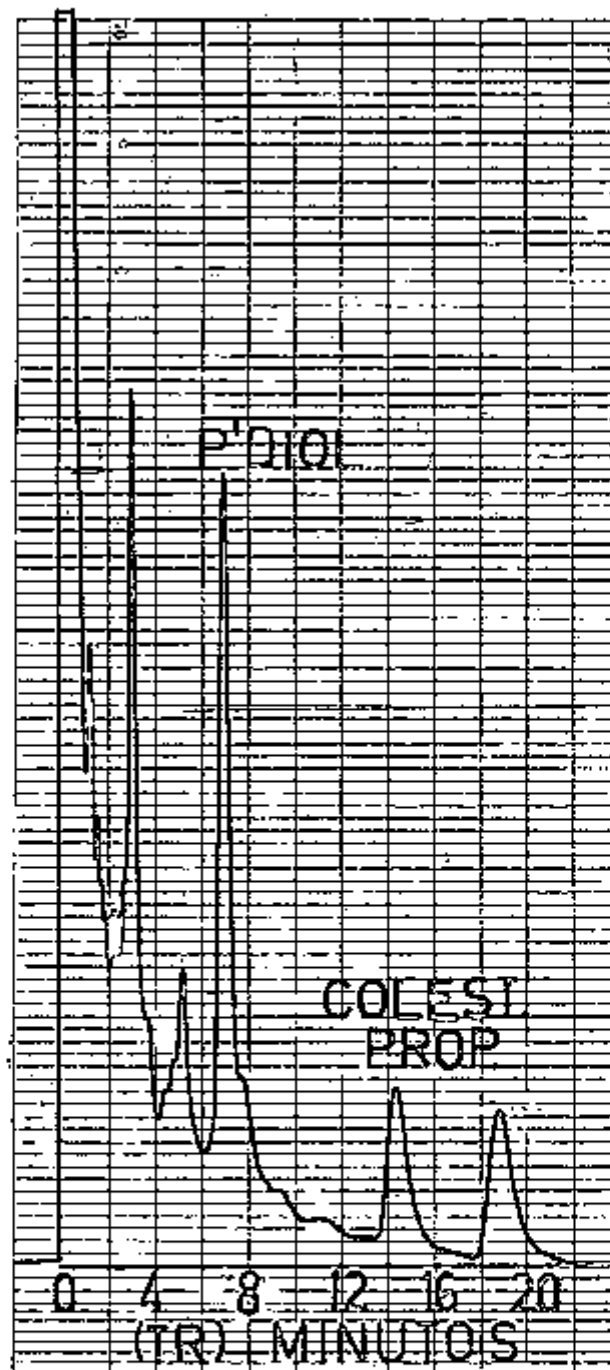


Fig. 5 - Cromatograma a gás de um extrato urinário de excreção de P'diol 2,35 mg/24 horas, em uma coluna SE-30 a 3 %. Temperatura da coluna 250°C e fluxo de  $N_2 = 35$  ml/min. Sensibilidade de atenuação  $4 \times 10^{-10}$ .

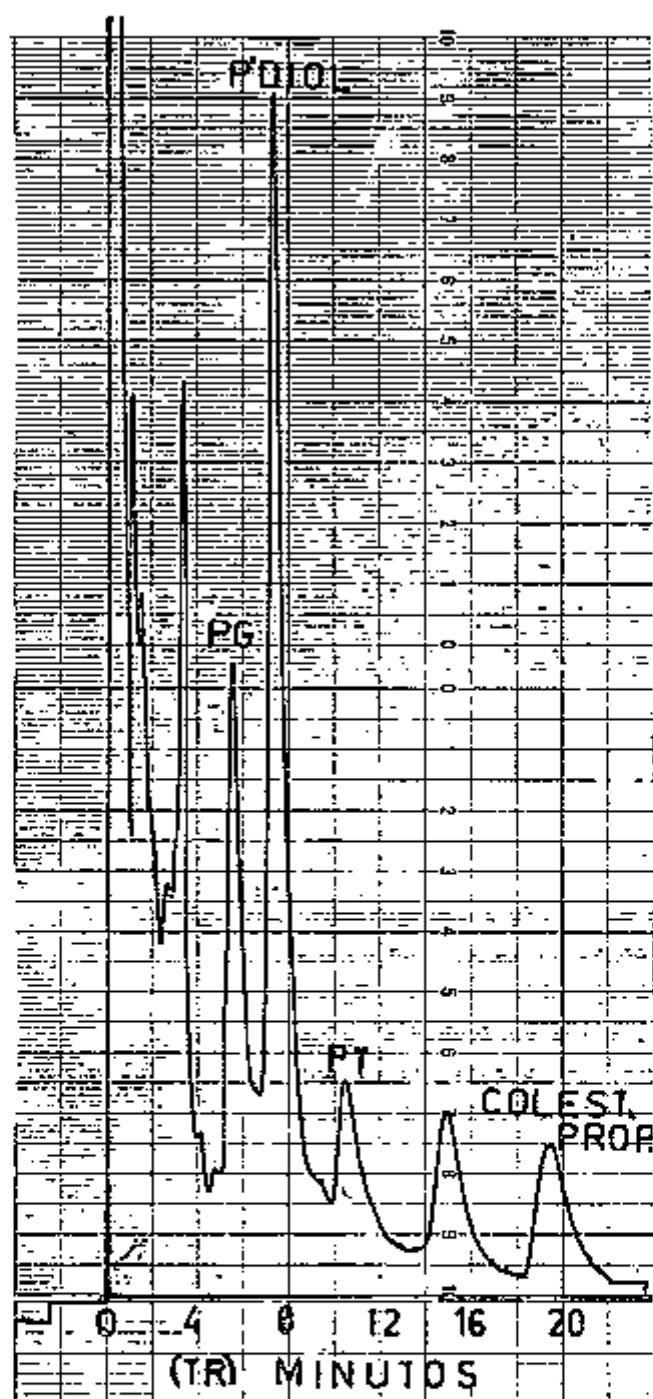


Fig. 6 - Cromatograma a gás de um extrato urinário correspondente à excreção igual a 2,35 mg/24 horas com adição de esteróides (100 ug) de PG,PT e P'diol antes da hidrólise ácida, em uma coluna SE-30 a 3%. Temperatura da coluna 250°C. Fluxo de  $N_2$  igual 35 ml/min. Sensibilidade de atenuação  $4 \times 10^{-10}$ .

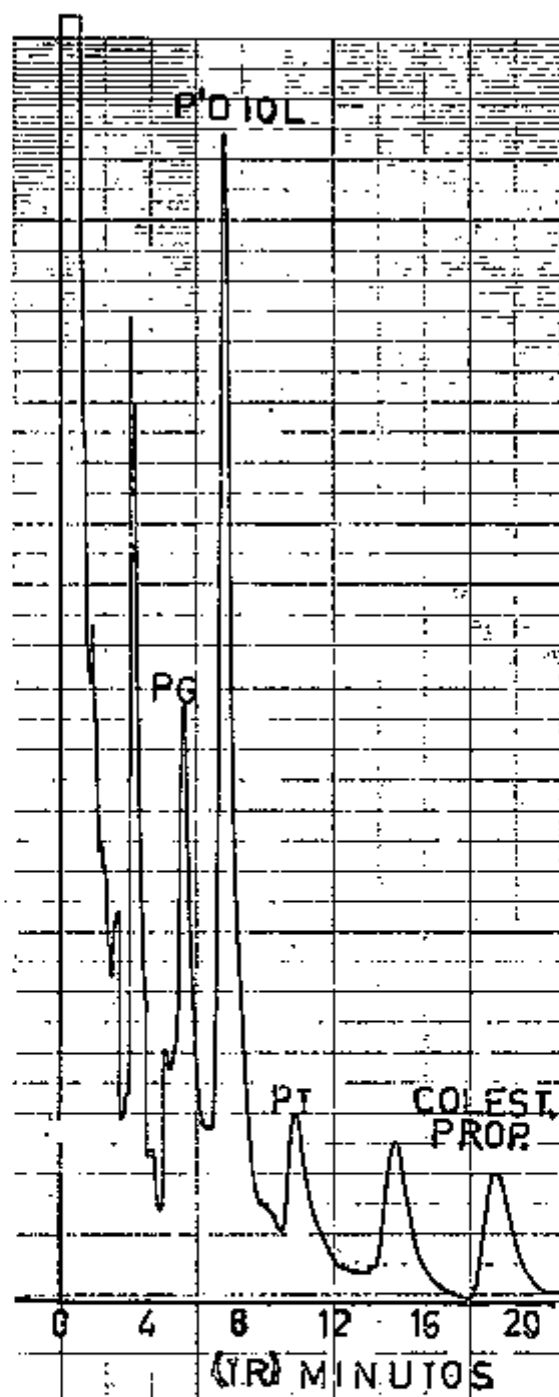


Fig. 7 - Cromatograma a gás de um extrato urinário correspondente a excreção de 2,36 mg/24 horas, com adição de esteróides (100 ug) de PG, PT e P'diol após a hidrólise ácida, em uma coluna SE-30 a 3%. Temperatura da coluna 250°C e fluxo de  $N_2=35$  ml/min. Sensibilidade de atenuação  $4 \times 10^{-10}$ .

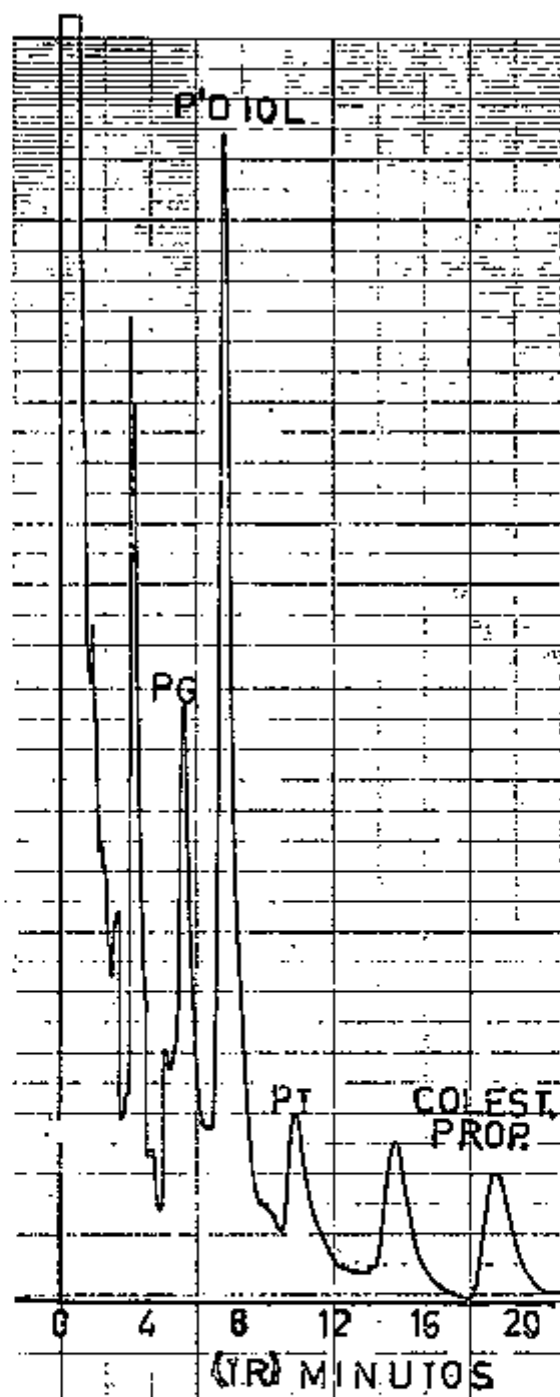


Fig. 7 - Cromatograma a gás de um extrato urinário correspondente a excreção de 2,36 mg/24 horas, com adição de esteróides (100 ug) de PG, PT e P'diol após a hidrólise ácida, em uma coluna SE-30 a 3%. Temperatura da coluna 250°C e fluxo de  $N_2=35$  ml/min. Sensibilidade de atenuação  $4 \times 10^{-10}$ .

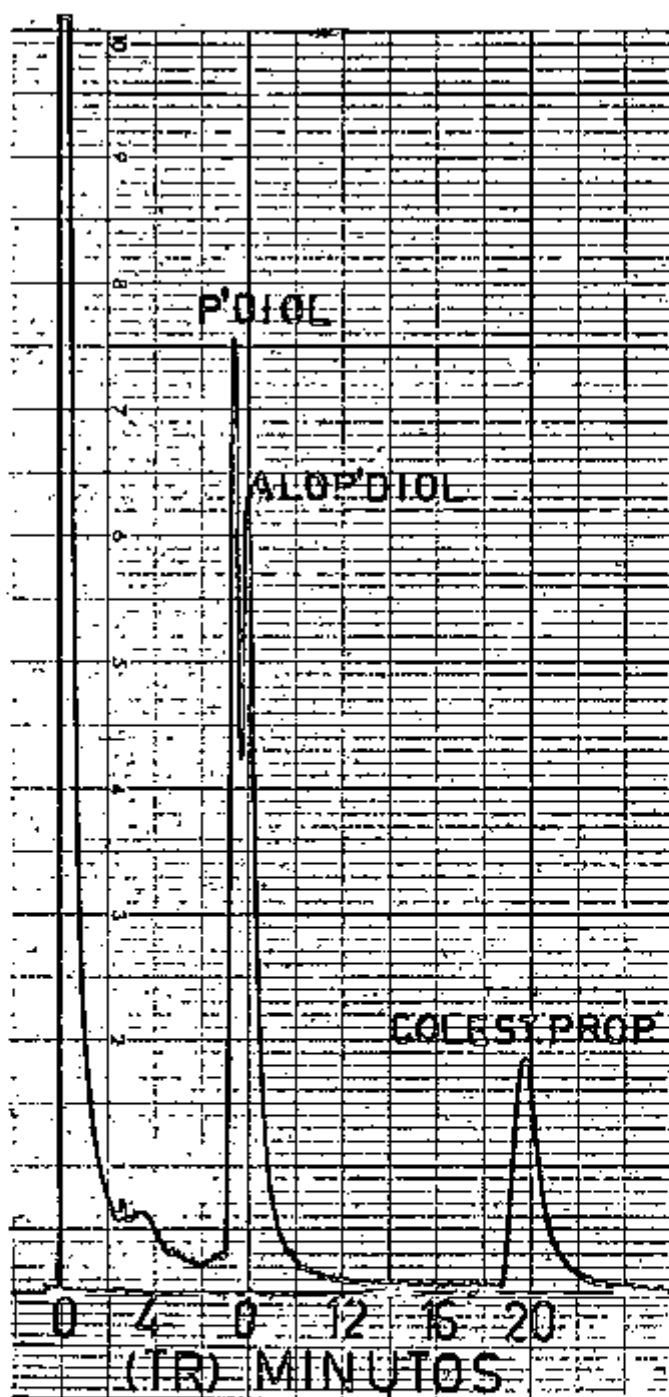


Fig. 8 - Cromatograma a gás de uma mistura de esteróides P'diol e Alop'diol (100 ug) de cada , em uma co-  
luna SE-30 a 3% .Temperatura da coluna 250°C e  
fluxo de  $N_2 = 35$  ml/min. Sensibilidade de atenua-  
ção  $8 \times 10^{-10}$ .



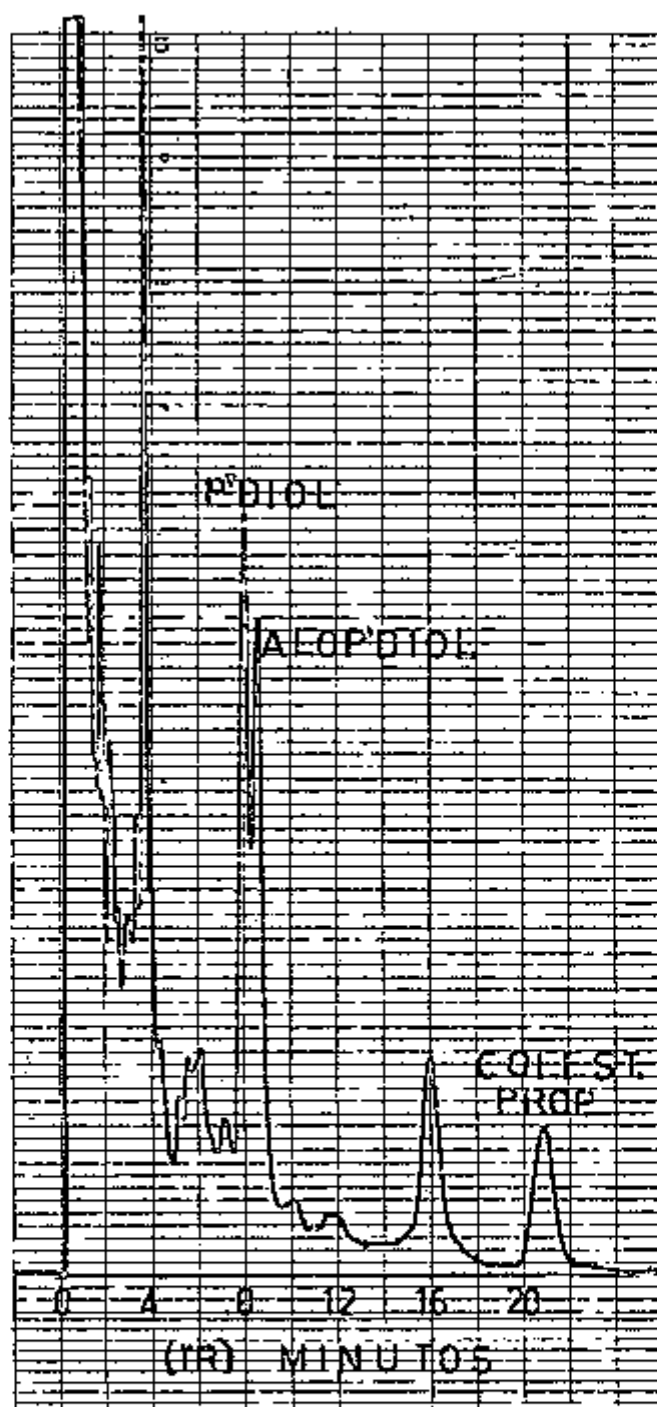


Fig. 9 .. Cromatograma a gás de um extrato urinário, correspondente a excreção de P'diol de 2,18 mg / 24 horas , com a adição de 100 ug de P'diol e Alop'diol , em uma coluna SE-30 a 3 %. Temperatura da coluna 250°C.

adicionado antes e após o desenvolvimento da hidrólise , respectivamente , nos experimentos indicados nas Figs. 6 e 7 .Por outro lado, quando o padrão foi adicionado à água , ao invés de urina , obteve-se uma recuperação de 103,0 %.

O tempo de retenção dos demais esteróides adicionados , antes ou após a hidrólise , não se alterou , não havendo pois interferência na detecção do pregnandiól.

Pelo fato do alopregnanidiól ser um isômero (forma 5  $\alpha$ ) do pregnandiól (forma 5  $\beta$ ) , procuramos verificar se seria possível a sua separação pelo método estudado, realizando a cromatografia de mistura dos padrões , pregnandiól e alopregnanidiól, submetendo à acetilação e foram observados os seguintes tempos de retenção:

Pregnanidiól ..... 7,15 min.

Alopregnanidiól ..... 8,05 min. (Fig. 8)

Do mesmo modo , a adição de 100  $\mu$ g de alopregnanidiól à urina (1/20 vol. 24 horas ) com excreção de pregnandiól 2,18 mg/24-horas (Fig. 9), mostrou haver tempo de retenção similar ao obtido com a mistura de padrões , sem interferência na quantificação de pregnandiól , embora a base das curvas fosse comum. Com efeito , recuperou-se 110 % do alopregnanidiól adicionado.

#### 4.2. Sensibilidade de detecção de pregnandiól no cromatógrafo a gás.

Na Tabela II está indicada a sensibilidade de detecção , avaliada em 6 determinações , pela adição de quantidades decrescentes de pregnandiól , capaz de ser detectada pelo cromatógrafo .Nesta Tabela são também mostrados as médias, os desvios-padrão e os coefi-

cientes de variação , onde se pode verificar que os coeficientes de variação foram menores do que 5 % o que pode ser considerado excelente (Melo ,1970). Estas quantidades de pregnandiol detectado corresponderiam a excreções diárias de 0,04 a 0,2 mg/24 horas , (P'diol de 2 a 10 ug) , utilizando-se 1/20 do vol. urinário para o ensaio.

#### 4.3. Sensibilidade do método

O método mostrou-se sensível a todos os níveis de adição do padrão , de 2 a 8  $\mu$ g , com a recuperação sempre acima de 92 % , conforme indicado na Tabela III.

#### 4.4. Precisão

A Tabela IV reúne as 7 determinações inter e intra-ensaios , da mesma mistura de urinas , com as respectivas médias , desvios - padrão , coeficientes de variação e intervalos de confiança .O coeficiente de variação foi de 2,28 % para as dosagens efetuadas no mesmo dia e para as dosagens realizadas semanalmente foi de 3,66 %.

#### 4.5. Exatidão

Na tabela V ,VI e VII estão indicados os resultados dos experimentos realizados para o estudo desta característica operacional. Os coeficientes de correlação (r) para  $\alpha \neq 0,05$  ,variaram de 0,98 a 1.

TABELA ISEPARAÇÃO DOS ESTERÓIDES EM UMA COLUNA SE-30 A 3 % SOB CONDIÇÕESDO ENSAIO:

<i>Esteróides</i>	<i>Tempo de retenção</i>	
	<i>(Tr)</i>	<i>min.</i>
<i>Progesterona (17 <math>\alpha</math>-hidroxi pregn-4-ene-3,20 dione)</i>		<i>5,40</i>
<i>Pregnandiól (5<math>\beta</math>-pregnane-3<math>\alpha</math>,20<math>\alpha</math> diól)</i>		<i>7,15</i>
<i>Pregnantriól (5<math>\beta</math>-pregnane-3<math>\alpha</math>,17<math>\alpha</math>,20 <math>\alpha</math> triól)</i>		<i>10,45</i>
<i>Alopregnandiól (5<math>\alpha</math>-pregnane-3<math>\alpha</math>,20<math>\alpha</math>-diól)</i>		<i>8,05</i>

*A coluna foi operada a temperatura de 250°C  
com fluxo de nitrogênio igual a 35 ml/min.*

TABELA II

SENSIBILIDADE DE DETECÇÃO DE PREGNANDIOL NO CROMATÓGRAFO A GÁS.

10 µg	8 µg	4 µg	2 µg
* 0,518	0,397	0,181	0,087
0,515	0,396	0,183	0,068
0,493	0,392	0,178	0,070
0,483	0,387	0,161	0,072
0,495	0,389	0,180	0,065
0,488	0,395	0,179	0,066
$\bar{X} = 0,499$	$\bar{X} = 0,393$	$\bar{X} = 0,177$	$\bar{X} = 0,068$
$s = 0,0145$	$s = 0,0040$	$s = 0,0080$	$s = 0,0026$
c.V. = 2,899%	c.V. = 1,027%	c.V. = 4,531%	c.V. = 3,838%

\* Relação :- Pico P'diol / Pico Colesterol Propionato.

TABELA III  
SENSIBILIDADE DO MÉTODO

<i>Fração de urina vol./24hs.</i>	<i>Valor teórico ug/ml B</i>	<i>Valor obtido ug/ml B+ 2ug*</i>	<i>Valor calculado ug/ml obt - B</i>	<i>Recupe- ração %</i>	<i>Valor obtido ug/ml B + 4 ug*</i>	<i>Valor calculado ug/ml obt - B</i>	<i>Recupe- ração %</i>	<i>Valor obtido ug/ml B + 8ug*</i>	<i>Valor calculado ug/ml obt - B</i>	<i>Recupe- ção %</i>
1/40	4,20	6,04	1,84	92,0	8,00	3,80	95,0	12,00	7,80	97,5
1/40	4,30	6,22	1,92	96,0	8,12	3,82	95,5	11,90	7,30	95,0
1/40	4,32	6,30	1,98	99,0	8,20	3,88	97,0	12,20	7,88	98,5
1/40	4,35	6,32	1,96	98,0	8,22	3,93	96,5	12,40	8,04	100,5
1/40	4,36	6,30	1,95	97,5	8,18	3,83	95,7	12,30	7,95	99,4
$\bar{X} = 6,236$ $s = 0,116$ $N = 5$					$\bar{X} = 8,144$ $s = 0,088$ $N = 5$			$\bar{X} = 12,160$ $s = 0,270$ $N = 5$		

\* Padrão Pregnandiol adicionado  
Obt. = Obtido

TABELA IV

ANÁLISE DA REPRODUTIBILIDADE DE 14 DOSAGENS , EFETUADAS EM UMA MIS-  
TURA DE URINAS DE CONCENTRAÇÃO BAIXA DE P'DIOL ,PREVIAMENTE CONHE-  
CIDA .

INTRA -ENSAIO	INTER -ENSAIO
mg / 24 horas	
0,492	0,472
0,484	0,466
0,473	0,470
0,470	0,469
0,488	0,457
0,468	0,436
0,464	0,432
$\bar{X} = 0,477$	$\bar{X} = 0,457$
s = 0,0108	s = 0,0167
c.V. = 2,28 %	c.V. = 3,66 %
I.C. = 0,477 $\pm$ 0,026	I.C. = 0,457 $\pm$ 0,041

TABELA V

RECUPERAÇÃO DO PREGNANDIOL:- MISTURA DE URINAS COM TEOR ELEVADO(A),  
A UM VOLUME CONSTANTE DE URINA COM TEOR BAIXO (B) DO ESTERÓIDE.

Fração de urina		Valor obtido da mistura ug/ml	Valor obtido isoladamente		Valor teórico da mistura ug/ml B+A	Recuperação %
vol/24 horas UB	UA		ug/ml UB	UA		
1/40	1/320	129,0	127,0	2,2	129,2	99,0
		128,0	126,0	2,0	128,0	100,0
1/40	1/160	134,4	127,0	4,5	131,5	102,2
		132,4	125,7	4,3	130,0	102,0
1/40	1/80	137,6	127,0	9,1	136,1	101,1
		137,0	126,0	9,2	136,0	100,0
1/40	1/40	144,0	127,0	18,2	145,2	99,2
		143,0	126,0	17,0	143,0	100,0

O coeficiente de correlação (r) entre os valores teóricos e obtidos foi de 0,98 para  $\alpha = 0,05$ .



TABELA VI

RECUPERAÇÃO DE PREGNANDIOL:- MISTURA DE URINAS COM TEOR BAIXO (B1 e B2 ), DE VOLUME CONSTANTE, A UMA MISTURA COM ELEVADO TEOR ( A )  
EM QUANTIDADES PROGRESSIVAMENTE MAIORES.

Fração de urina vol/24 horas B <sub>2</sub> A		Valor obtido da mistura ug/ml	Valor obtido isoladamente ug/ml B <sub>2</sub> A		Valor teórico da mistura ug/ml B + A	Recuperação %
1/80	1/640	10,8	6,8	3,5	10,3	104,8
		10,2	5,3	4,7	10,0	101,0
1/80	1/320	13,8	6,8	7,0	13,8	100,0
		12,0	5,0	7,5	12,5	96,0
B <sub>1</sub> 1/80	1/160	24,2	10,5	14,0	24,5	98,7
		25,4	10,0	15,0	25,0	100,0
1/80	1/80	38,6	10,5	28,0	38,5	100,0
		39,4	10,0	30,0	40,0	98,5

O coeficiente de correlação (r) entre os valores teóricos e obtidos foi de 0,994 para  $\alpha = 0,05$ .

TABELA VII

PROVAS DE RECUPERAÇÃO , ADICIONANDO QUANTIDADES CRESCENTES DE P'DIOL  
A UMA MISTURA DE URINAS COM TEOR BAIXO (B).

Fração de urina vol/24horas	Urina sem adição de pregnan - diol µg/ml	Padrão preg nandiol α- dicionado µg	Valor obtido µg/ml	Valor cal- culado obtido-B µg/ml	Recupe- ção %
1/40	48,2	50	101,8	53,6	107,2
1/40	48,3	50	99,0	50,7	101,4
1/40	48,2	50	97,4	50,2	100,4
1/40	48,2	100	148,4	100,2	100,1
1/40	47,2	100	148,1	100,5	100,5
1/40	48,0	100	148,6	100,6	100,6
1/40	48,5	200	248,0	199,5	99,7
1/40	48,2	200	248,5	200,3	100,3
1/40	48,3	200	248,2	199,9	99,9

O coeficiente de correlação (r) entre os valores  
teóricos e obtidos foi de 1,0 para  $\alpha = 0,05$ .

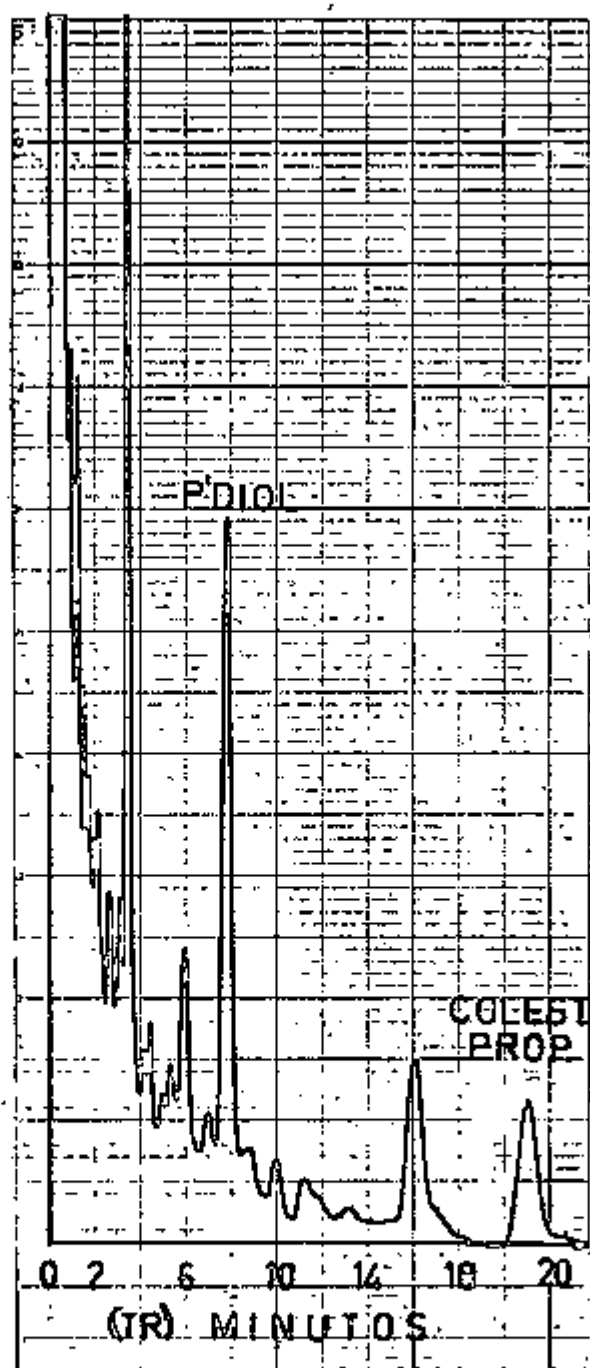


Fig. 10 - Cromatograma a gás de um extrato urinário fase folicular ( 89 dia) com a excreção de P'diol 1,02 mg/24 horas em uma coluna SE-30 a 3%. Temperatura da coluna 250 °C e fluxo de  $N_2 = 35$  ml/min. Sensibilidade de atenuação  $1 \times 10^{-10}$ .

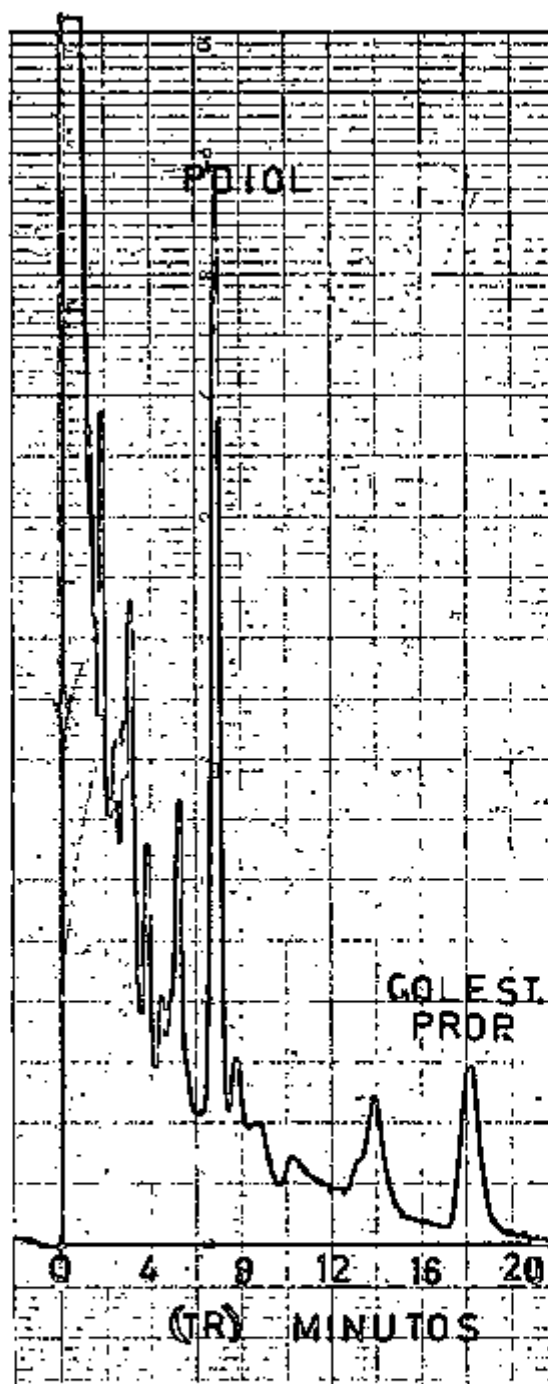


Fig. 11 - Cromatograma a gás de um extrato urinário fase lútea ( 20ª dia ) com a excreção de P'diol 3,66 mg/24 horas em uma coluna SE-30 a 3% . Temperatura da coluna 250 °C e fluxo de  $N_2 = 35$  ml/min. Sensibilidade de atenuação  $8 \times 10^{-10}$ .

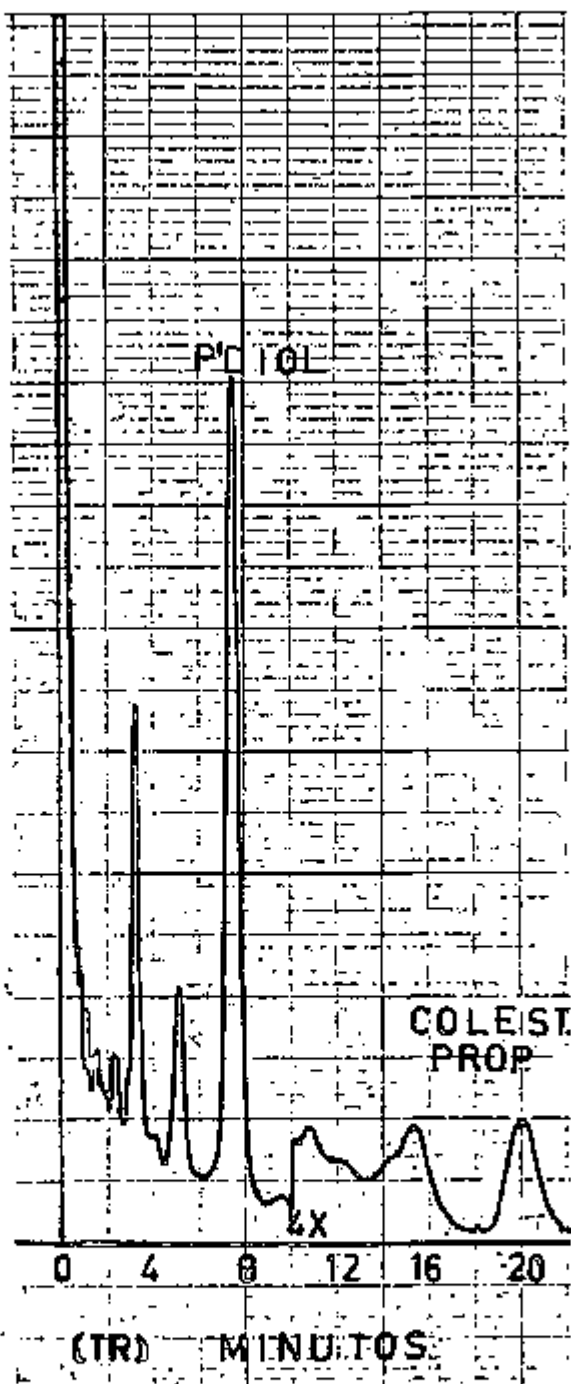


Fig. 12 - Cromatograma a gás de um extrato urinário de gestante (6 meses) com a excreção de P'diol-17,4 mg/24 horas, em uma coluna SE-30 a 3%. Temperatura da coluna 250°C e fluxo de  $N_2 = 35$  ml/min. Sensibilidade de atenuação  $16 \times 10^{-10}$ .

TABELA VIIINÍVEIS DE PREGNANDIOL URINÁRIO DURANTE O CICLO MENSTRUAL  
NORMAL EM 6 PACIENTES.FASE FOLICULAR

<i>Nome</i>	<i>Idade</i>	<i>Dia do ciclo</i>	<i>Duração dias</i>	<i>P'diol mg/24horas.</i>
T.P	26	4	28	0,103
M.P	27	7	28	0,492
M.L	30	8	30	0,504
S.S	28	10	26	0,550
N.S	25	11	32	1,020
T.S	22	12	28	1,100
M.L	26	13	28	1,180

FASE LÚTEA

N.S	25	14	32	1,100
T.P	26	16	28	2,570
M.P	27	17	28	3,100
S.S	28	18	26	2,160
M.L	30	20	28	3,660
M.P	27	21	28	6,000
S.S	28	21	26	2,370
N.D	22	22	32	1,160
N.S	25	22	30	4,000
M.P	30	24	30	3,350
N.D	22	25	32	6,000
M.P	27	28	26	3,340
N.D	22	28	32	1,780
M.L	30	28	30	2,240

## 5. DISCUSSÃO

*Análise dos resultados e alguns aspectos mais importantes da técnica desenvolvida nesta tese: As condições de hidrólise - utilizadas foram as recomendadas por Klopper (1955)<sup>(16)</sup> em que a urina é aquecida com 15 ml de ácido clorídrico concentrado mais o tolueno.*

*Como existem algumas evidências de que uma porção de - pregnandiol total é destruído pelo tratamento ácido , diluímos a urina com água destilada e foi adicionado o tolueno para assim minimizar a perda do esteróide durante a hidrólise <sup>(4)</sup>.*

*Embora , teóricamente , a hidrólise enzimática permita condições mais suaves com maior rendimento , na prática , a hidrólise ácida é um procedimento aceitável, pois obtivemos recuperação - acima de 94 % acrescentando o esteróide (100 µg) antes e após a hidrólise (Figs. 6 e 7).*

*A escolha do acetato , como derivado , para cromatografia foi baseada na evidência relatada por Kirschner e Lipssett (1964) <sup>(14)</sup> de que há pelo menos um componente urinário com um tempo de retenção semelhante a do pregnandiol coincidente com a mancha correspondente ao pregnandiol na cromatografia em camada delgada. Os derivados éter trimetilsilílico ou trifluoroacetato usualmente empregados em cromatografia a gás dos esteróides urinários, não permitem a re*

solução destas 2 substâncias , somente com acetilação foi possível a separação destes 2 componentes.

Necessidade de purificação prévia do extrato não foi necessária (Figs. 10, 11 e 12 ) , havendo perfeita identificação dos picos , sem interferência dos outros esteróides.

A única possibilidade seria a presença , na urina , do isômero de pregnandiol, o alopregnanadiol que apenas está presente, em baixas concentrações , na urina gravídica. Embora estes esteróides sejam perfeitamente discriminados , têm base comum e eventualmente , poderia haver dificuldade para sua separação.

Nas gestantes , por nós estudadas , não observamos entre tanto interferência de alopregnanadiol em nenhuma das dosagens.

Em nossa experiência , mesmo com a eficiência da coluna relativamente baixa, com número de pratos teóricos 614 a 960 , pode ser usada para determinar o pregnandiol em urinas normais e de gestante , com considerável segurança.

A sensibilidade do aparelho detecta uma concentração - equivalente a 0,2 mg/24 horas (usando 1/20 do vol. para hidrólise), com o coeficiente de variação menor que 5 % , mostrando que mesmo para valores extremamente baixos , o método é sensível e excelente, de acordo com as observações feitas por Chatteraj<sup>(3)</sup>.

A mais importante evidência , para a validade do método , foi obtida por comparação com os valores de excreção usando métodos de cromatografia a gás, é o procedimento clássico de Kloppser (1955). Assim , duas publicações indicam que no mínimo na faixa de 1 mg/24 horas ou mais , há excelente coincidência entre os 2 métodos (Cor , 1963) e Kirschner e Lipsitt , 1964.



Quando a excreção de pregnandi $\text{ol}$  cai , abaixo do valor - de 1mg/24 horas, o ensaio clássico tende a dar leituras consideravelmente maiores do que o método de cromatografia a gás.

A níveis muito baixos , o método de Klopfer é menos exa $\text{to}$  devido a não especificidade do cromógeno com ácido sulfúrico . Finalmente , a excelente correlação das verificações clínicas com os valores de excreção de pregnandi $\text{ol}$  <sup>(30)</sup> reflete a utilidade e a validade do presente método.

Na análise estatística do método , realizando a acetilação dos esteróides similares , em estrutura química , e efetuando a cromatografia a gás em coluna SE-30 a 3% , verificamos a separação nítida entre pregnandi $\text{ol}$  , progesterona , pregnantri $\text{ol}$  e alo - pregnandi $\text{ol}$  (Tabela I ).

O alopregnan $\text{diol}$  , embora um isômero , permite a sua identificação , pois o tempo de retenção foi diferente (8,05 min.) da $\text{quele}$  do pregnandi $\text{ol}$  ( 7,15 min. ) Fig. 8.

Na técnica utilizada , quer a progesterona quer o pregnantri $\text{ol}$  não foram detectados , por outro lado , pela hidrólise ácida não foram destruídas completamente a progesterona e o pregnantri $\text{ol}$  - (Figs. 6 e 7 ) adicionadas à urina.

A sensibilidade do método , testada através de adição do pregnandi $\text{ol}$  puro em quantidades crescentes , de 2 a 8  $\mu\text{g/ml}$  (1/40 vol. de 24 horas) , e analisando cada amostra , antes e após a adição do esteróide foi obtida uma recuperação acima de 92 % (Tabela III)

Quanto aos demais parâmetro a precisão avaliada através - de reprodutibilidade intra e inter-ensaio (Tabela IV ) mostrou -se excelente , pois o coeficiente de variação foi de 2,28 % para a av $\text{g}$  liação intra -ensaio e de 3,66 % para inter-ensaio.

A exatidão (Tabelas V, VI e VII) foi também excelente pois o coeficiente de correlação (r) variou de 0,98 a 1,0 entre os valores teóricos e obtidos.

Em 6 ciclos menstruais, os valores obtidos foram os seguintes :- Fase folicular 0,103 -1,18 mg/24 horas e Fase lútea de 1,10 - 6,0 mg/24 horas.

Em todos os casos, a ocorrência de ovulação foi documentada pela determinação da temperatura basal.

Após a ovulação, a ocorrência de menstruação teve lugar entre 10 e 17 dias.

A data da ovulação foi tomada para separar a fase folicular da fase lútea. Os valores mais altos foram obtidos ao redor dos dias 19 e 22 para os ciclos normais, sendo que o seus valores variaram entre 2 -5 mg /24 horas.

A excreção diária de pregnandiol em 6 pacientes, com ciclos ovulatórios normais, está indicada na Tabela VIII.

## 6. CONCLUSÕES

1. *Foi padronizado um método de dosagem de pregnandiol urinário por cromatografia a gás, após hidrólise ácida, extração e acetilação.*
2. *A análise estatística da metodologia demonstrou haver elevado grau de especificidade, exatidão, sensibilidade, recuperação (98,5 a 107,2 %) e precisão (c.V. de 2,28 % intra-ensaio e 3,66 % inter-ensaio) o que nos permitiu quantificar níveis de pregnandiol quer em urinas normais, quer no ciclo menstrual.*

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARRETT, S. A. & BROWN, J.B. *An evaluation of the method of Cox for the rapid analysis of pregnanediol in urine by gas liquid chromatography.* J.Endocr., Oxford, 47:471- 80, 1970.
2. BARRY, R.D. et alii. *Comparison of four methods of determining urinary pregnanediol.* Analyt.Chem., Easton, Pa., 38: 983-6 , 1966.
3. CHATTORAJ, S.C. & SCOMMEGNA, A. *A gas chromatographic technique for the simultaneous determination of urinary pregnanediol and pregnanetriol after ammonium sulfate precipitation .* Steroids, San Francisco, Calif., 9(3) :327-45, 1967.
4. CHATTORAJ, S.C. & WOTIZ, H.H. *A routine method for the gas-chromatographic determination of pregnanediol.* Fert. Steril, New York , 18 (3) :342-52 , 1967.
5. COX, R.I. *Gas chromatography in the analysis of urinary pregnanediol .* J. Chromat., Amsterdam, 12:242-5, 1963.
6. DOREMAN, R.I. Methods in hormone research. New York, Academic

- Press, 1968. v.1, p.229-67.
7. EIK-NES, K.B. & HORNING, E.C. Gas phase chromatography of steroids. New York, Springer, 1968. v.2, p.188.
8. HEFTMAN, E. & MOSETTIG, E. Biochemistry of steroids. New York, Reinhold, 1960. p.93.
9. HORNING, E.C. et alii. Quantitative aspects of gas chromatographic separation in biological studies. Analyt. Chem., Easton Pa., 35: 526-32, 1963.
10. HORNING, E.C. et alii. Separation and determination of steroids using gas chromatography. In: GLICK, D., ed. Methods of biochemical analysis. New York, Interscience, 1963. v.2, p.69-148.
11. JANSEN, A.P. Determination of pregnanediol in urinary extracts by gas-liquid chromatography. Clinica chim. Acta, Amsterdam, 8: 785-7, 1963.
12. JAYLE, M.P. Analyse des stéroïdes hormonaux, v.1. Méthodes générales; v.2. Méthodes de dosage. Paris, Masson, 1961/62.
13. JONES, F.E.D. et alii. The determination of urinary pregnanediol by gas liquid chromatography. Fert. Steril., New York, 13: 544-9, 1962.
14. KIRSCHNER, M.A. & LIPSETT, M.B. The analysis of urinary ste-

- roids using gas liquid chromatography. Steroids, San Francisco, Calif., 3: 277-94, 1964.
15. KLOPPER, A.I. The excretion of pregnanediol during the normal menstrual cycle. J. Obstet. Gynaec. Br. Commonw., London, 64: 504-11, 1957.
16. KLOPPER, A.I. et alii. A method for the determination of urinary pregnanediol. J. Endocr., Oxford, 12: 209-19, 1955.
17. KLINE, W. The chemistry of the steroids. Rev. ed. London, Methuen, 1965.
18. LIPSETT, M.B. Gas chromatography of steroids in biological fluids. New York, Plenum, 1965.
19. LORAINÉ, J.A. & BROWN, J.B. J. Endocr., Oxford, 18: 77, 1959.
20. LORAINÉ, J.A. & BELL, E.T. Hormone assays and their clinical application. 2. ed. Edinburgh, Livingstone, 1966. p. 304-43.
21. McNAIR, H.M. & BONELLI, E.J. Basic gas chromatography. 5. ed. Walnut Creek, Calif, Varian Aerograph, 1969.
22. Melo, E.H.L. Padronização laboratorial dos lípidos séricos, em especial dos adultos normais. Goiânia, Faculdade de Medicina, UFG, 1970. (Tese de livre docência).

- ~~23.~~ MENINI, E. & NORIMBERSKI, J.K. An approach to the systematic analysis of urinary steroids. J. Bioch., 99:1-16, 1965.
- ~~24.~~ NETTER, F.H. A compilation of paintings on the anatomy and pathophysiology of the endocrine system and selected metabolic diseases. S.I.p., Ciba Pharmaceutical Co., 1965 (The Ciba collection of medical illustrations, 4).
25. OERTEL, G.W. & GROOT, K. Estimation of pregnanediol and pregnanetriol in urine. Clinica Chim. Acta, Amsterdam, 11:512-8, 1965.
- ~~26.~~ PODMORE, D.A. Routine determination of urinary pregnanediol using a gas chromatograph with automatic sample application. J. Clin. Path., London, 12:619-21, 1966.
- ~~27.~~ RAHMAN, M. A simultaneous determination of pregnanetriol and pregnanediol by gas liquid chromatograph. Clinica chim. Acta, Amsterdam, 51:233-40, 1974.
- ~~28.~~ RAMAN, P.B. et alii. A method for the determination of pregnanediol, pregnanetriol and pregnanetriolone by gas chromatography. Steroids. San Francisco, Calif., 6:177-93, 1965.
- ~~29.~~ ROGERS, M. & CHAMBERLAIN, J. The use of the steroid analyser - in conjunction with a semi-automatic gas chromatography in the routine analysis of urinary pregnanediol. Clinica chim. Acta, Amsterdam, 39:439-47, 1972.

30. SCOMMEGNA ,A. et alii. *The clinical application of a gas - chromatographic method for the routine determination of urinary pregnanediol.* Fert. Steril., New York, 18(2) :257-71 , Mar./apr., 1967.
31. SOCIETY FOR ENDOCRINOLOGY , Cambridge. The gas liquid chromatography of steroids: proceedings of a symposium held at the University of Glasgow, on 4 to 6 April 1966. Cambridge , 1967. (Memoirs of the Society for Endocrinology , 16).
32. TURNER ,D.A. et alii. *Determination of urinary pregnanediol by gas chromatography.* Analyt. Biochem., New York , 5:99-106, 1963.
33. VANDER MOLEN, H. J. & GROEN,D. *Determination of progesterone in human peripheral blood using gas liquid chromatography with electron capture detection.* In: LIPSETT, M.B. Gas chromatography of steroids in biological fluids. New York, Plenum, 1965. p.153-68.
34. VELA,B.A. et alii. *Simultaneous determination of urinary - pregnanelone, pregnanediol, and pregnanetriol by gas liquid chromatography.* Am. J.Obstet. Gynec., St. Louis, 103:179 - 88, 1969.
35. WOTIZ, H,H . *Studies in steroid metabolism: the rapid determination of urinary pregnanediol by gas chromatography.* Biochim. Biophys. Acta, New York, 69: 415-6 , 1963.



- ~~36.~~ WOTIZ, H.H. & CLARK, S.J. *Gas chromatography in the analysis of steroid hormone*. New York, Plenum, 1966, p. 129-49.

\*\*\*\*\*