

ESCOLA TÉCNICA ESTADUAL PROF. ARMANDO JOSÉ FARINAZZO
CENTRO PAULA SOUZA

Leonel da Silva Rodrigues
Maria Eduarda Soares Comar
Vinícius Siqueira de Oliveira

ESTUDO SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DE PROGESTERONA EM
ÁGUA POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

Fernandópolis
2019

Leonel da Silva Rodrigues
Maria Eduarda Soares Comar
Vinícius Siqueira de Oliveira

ESTUDO SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DE PROGESTERONA EM ÁGUA POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção da Habilitação Profissional Técnica de Nível Médio de **Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio**, no Eixo Tecnológico de **Controle e Processos Industriais**, à Escola Técnica Estadual Professor Armando José Farinazzo, sob orientação da Professora **Flávia Meira Cotrim**.

Fernandópolis
2019

Leonel da Silva Rodrigues
Maria Eduarda Soares Comar
Vinícius Siqueira de Oliveira

ESTUDO SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DE PROGESTERONA EM ÁGUA POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção da Habilitação Profissional Técnica de Nível Médio de **Técnico em Química Integrado ao Ensino Médio**, no Eixo Tecnológico de **Controle e Processos Industriais**, à Escola Técnica Estadual Professor Armando José Farinazzo, sob orientação da Professora **Flavia Meira Cotrim**.

Examinadores:

Alex de Lima

Ângela Aparecida Battaglia Nogueira

Flavia Meira Cotrim

Fernandópolis
2019

DEDICATÓRIA

Agradecimentos aos companheiros de TCC, por se entregaram completamente para a finalização dessa pesquisa. Também a Jeová Deus, os professores e familiares, que trabalham e modelam o ensinamento em nossas vidas: Perfeitos e eternos mentores.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a orientadora Flávia Meira Cotrim e o Profº Joel Gouveia Baptista por disponibilizarem do seu tempo para auxiliar na formação, não só de um trabalho, mas também acompanhar e instigar a nossa evolução como eternos aprendizes. Aos professores, em especial ao Alex de Lima somos gratos por dispor de seu tempo extraclasse e fomentar diversos componentes do desenvolvimento, aos amigos e familiares por toda a confiança depositada à nós, de modo que estivéssemos sempre animados para toda e qualquer problemática que viesse a surgir. Por último, agradecemos a Deus pela oportunidade de aprendizado diante três anos de curso e, agora, realizar esta última etapa de conclusão de curso para que em nosso caminho, novas oportunidades possam surgir.

EPÍGRAFE

"Quando algo é importante o suficiente, você realiza, mesmo que as chances não estejam a seu favor" - Elon Musk

ESTUDO SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DE PROGESTERONA EM ÁGUA POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

Leonel da Silva Rodrigues
Maria Eduarda Soares Comar
Vinícius Siqueira de Oliveira

RESUMO: Na natureza encontram-se diversas substâncias, entre elas os Desreguladores Endócrinos, substâncias capazes de causar disfunções nos sistemas endócrinos dos seres vivos. Em ambientes aquáticos, as mudanças nos animais têm efeitos como a feminização dos peixes machos, redução da ovulação de ovos e redução das populações dos mesmos, destacando-se entre os DE's o hormônio progesterona. A ocorrência deste hormônio em águas superficiais se dá por meio da ingestão de anticoncepcionais que são eliminados pelo corpo e se dirigem as estações de tratamento, contudo devido a ineficácia do tratamento para sua retirada, os mesmos acabam por encaminhar-se para seus corpos receptores. Assim, tem-se a necessidade do monitoramento deste composto, sendo as técnicas comumente empregadas a Cromatografia Gasosa e a Líquida, com grande eficácia, porém com alto custo de análise e baixa acessibilidade. Diante disto, o trabalho teve como propósito utilizar a Espectrofotometria UV para a quantificação da progesterona em água, visto que é uma técnica analítica simples e de baixo custo. Para a obtenção dos dados, foi realizado o espectro de absorção do composto e a curva analítica, que revela a linearidade do método em determinada faixa de trabalho, o que possibilita a análise da concentração do composto dentro de um intervalo de confiança. Deveras, não foi possível análise na matriz aquosa pelo fato de a progesterona apresentar características lipídicas, assim não diluindo em água.

Palavras-chave: Desreguladores Endócrinos. Espectrofotometria Uv-vis. Hormônios Progesterona.

ABSTRACT: In nature there are various substances, among other Endocrine Disrupters, substances that can cause dysfunctions in the endocrine systems of living things. In aquatic environments, changes in animals have effects such as feminization of male fish, reduction of egg ovulation and reduction of egg populations, especially progesterone hormone. The occurrence of this hormone in surface waters occurs through the ingestion of contraceptives that are eliminated by the body and directed to the treatment stations, however due to the ineffectiveness of the treatment for their withdrawal, they eventually go to their receiving bodies. Thus, there is a need for monitoring this compound, and the techniques commonly employed are Gas Chromatography and Liquid Chromatography, with great efficiency, but with high cost of analysis and low accessibility. Given this, the purpose of this work was to use UV spectrophotometry to quantify progesterone in water, since it is a simple and low cost analytical technique. To obtain the data, the compound absorption spectrum and the analytical curve were performed, revealing the linearity of the method in a certain working range, which allows the analysis of the

concentration of the compound within a confidence interval. Indeed, it was not possible to analyze the aqueous matrix because progesterone has lipid characteristics, thus not diluting with water.

KEYWORDS: Endocrine Disrupter. Hormone. Progesterone. UV/vis spectrometry.

RESUMEN: En la naturaleza hay varias sustancias, incluidos los disruptores endocrinos, sustancias que pueden causar disfunciones en los sistemas endocrinos de los seres vivos. En ambientes acuáticos, los cambios en los animales tienen efectos tales como la feminización de los peces machos, la reducción de la ovulación del huevo y la reducción de las poblaciones de huevos, especialmente la hormona progesterona. La aparición de esta hormona en las aguas superficiales ocurre a través de la ingestión de anticonceptivos que son eliminados por el cuerpo y dirigidos a las estaciones de tratamiento, sin embargo, debido a la ineficacia del tratamiento para su retirada, eventualmente van a sus cuerpos receptores. Por lo tanto, existe la necesidad de monitorear este compuesto, y las técnicas comúnmente empleadas son la cromatografía de gases y la cromatografía líquida, con gran eficiencia, pero con un alto costo de análisis y baja accesibilidad. Dado esto, el propósito de este trabajo fue utilizar la espectrofotometría UV para cuantificar la progesterona en el agua, ya que es una técnica analítica simple y de bajo costo. Para obtener los datos, se realizaron el espectro de absorción del compuesto y la curva analítica, revelando la linealidad del método en un cierto rango de trabajo, lo que permite el análisis de la concentración del compuesto dentro de un intervalo de confianza. De hecho, no fue posible analizar la matriz acuosa porque la progesterona tiene características lipídicas, por lo que no se diluye con agua.

Palabras clave: Alteradores endocrinos. Espectrofotometría UV-vis. Hormona Progesterona.

1. INTRODUÇÃO

Os hormônios, incluindo os naturais e os de origem sintética (utilizados na fabricação de remédios e em alimentos animais), são apontados como os principais responsáveis por grande parte dos efeitos desreguladores do sistema endócrino em organismos aquáticos identificados nos últimos anos (BONAN; TEIXEIRA; NAKANO, 2017).

Os desreguladores endócrinos (DE) são substâncias químicas - derivados de fármacos, hormônios sexuais e produtos industriais - que, quando ingeridas em concentrações elevadas ou por tempo prolongado, afetam o sistema

endócrino de organismos aquáticos. Alguns efeitos da exposição a estes poluentes são a diminuição na eclosão de ovos de pássaros e de espécies aquáticas, feminização de peixes machos, diminuição de espécies e alteração de seus sistemas imunológicos (BILA; DEZOTTI, 2007).

A presença de desreguladores endócrinos em águas superficiais ocorre mediante ao seu descarte nos ambientes aquáticos em forma de esgoto sanitário e industrial tratados. Porém, o método atual de tratamento é ineficiente na remoção desses compostos, colocando os animais em exposição. A transformação dos habitats em receptores de esgoto tratado tem sido a principal preocupação da fonte de contaminação das águas (RAPOSO, 2017).

Entre os desreguladores endócrinos, observa-se a atuação da progesterona, hormônio feminino utilizado na indústria de produção de anticoncepcionais, como um preventivo para a gravidez. Assim ao ser ingerido, boa parte do medicamento é eliminada na urina, sendo levado para os postos de tratamentos de efluentes. Porém, por ser encontrado em concentrações muito baixas na água - da ordem de $\mu\text{g/L}$ - este hormônio é difícil de ser detectado e removido em estações de tratamento de efluente. (BILA; DEZOTTI, 2007).

A presença de progesterona nas águas de abastecimento público da região de Campinas foi relatada em estudo feito por Ghiselli (2006), do Instituto de Química da Unicamp. Ao entrarem em contato com organismos vivos, a progesterona, acarreta nas problemáticas supracitadas a respeito dos DE's.

As técnicas mais comumente reportadas para análise de hormônios sexuais são: Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM), Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM) no modo tandem e Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (CL-EM). A técnica de cromatografia gasosa é menos utilizada do que cromatografia líquida em análise de estrogênios. Tal fato se deve à alta dificuldade na etapa de preparação da amostra incluindo a necessidade de derivatização, mesmo a Cromatografia Gasosa sendo uma técnica mais precisa. (SILVA, 2016).

A utilização das técnicas supracitadas na quantificação de hormônios é devido à precisão e eficiência de tais métodos, além de serem rápidas e terem poder de detectar substâncias em baixas concentrações. Ao mesmo tempo destes benefícios, tais técnicas demandam de um alto custo de realização, do próprio

equipamento e combustível utilizado. Sendo por consequência, ao fator econômico, encontrada em poucos locais que realizam as análises (SILVA, 2016).

Estudos de novas técnicas, atualmente, são capazes de identificar fármacos e substâncias ditas desreguladores endócrinos (VIALI, 2014). Diante disto, percebeu-se a necessidade de pesquisar uma metodologia eficaz e mais acessível para viabilizar futuramente a quantificação de progesterona em água, permitindo assim, mais estudos voltados para a quantificação e remoção do hormônio feminino em meio aquoso. A espectrofotometria UV-VIS foi selecionada como metodologia analítica neste trabalho, considerando a propriedade do analito em apresentar absorção no espectro ultravioleta (FABBRIS; NICOLINI, 2016).

A técnica de espectrofotometria UV-VIS é muito utilizada para realização de análises por ser um método quantitativo relativamente simples e eficaz. Destaca-se também a rentabilidade econômica, disponibilidade e geração de resultados de fácil compreensão. O espectrofotômetro utiliza da absorção de radiações eletromagnética nos campos visíveis e ultravioletas do espectro. Assim, analisando a absorção de luz e relacionado com a concentração do analito (EWING, 1971). Segundo Silverstein, Bassler e Morrill (1994) apud Fabbris e Nicolini (2016), ocorre a absorção de energia na região de 240 nm (ultravioleta) devido aos grupos insaturados carbonilas e cadeias cíclicas de seis carbonos presentes na estrutura da progesterona.

Diante disto, observou-se a lacuna de pesquisa em relação à estudos sobre a quantificação de progesterona em meio aquoso por meio da espectrofotometria UV-VIS. Assim, o objetivo do presente trabalho é estudar a análise de progesterona em águas (por meio dessa análise instrumental quantitativa), visando à aplicação de medidas para a concentração da ordem de $\mu\text{g/L}$.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. DESREGULADORES ENDÓCRINOS

Segundo as definições estabelecidas pela da União Europeia, durante a Conferência de Weybridge, no Reino Unido, desregulador endócrino é toda e

qualquer substância capaz de alterar, afetar, perturbar ou interferir no sistema endócrino dos seres vivos. Por conta disso e das diversas traduções de termos, os DEs também podem ser chamados de perturbadores endócrinos, disruptivos ou disruptores endócrinos, interferentes endócrinos, estrogênios ambientais, dentre outras, observando assim, que não se trata de um termo universal (GHISELLI; JARDIM, 2007).

São caracterizados como substâncias poluentes e capazes de causar mudanças no sistema endócrino dos seres vivos. Ao serem encontrados no meio ambiente, estão presentes em quantidades da ordem $\mu\text{g L}^{-1}$ e ng L^{-1} . Os efeitos provocados pela exposição a estes compostos são alterações no sistema imunológico das espécies, feminização de peixes machos, diminuição da eclosão de ovos e diminuição da população de espécies aquíferas (BILA; DEZOTTI, 2007).

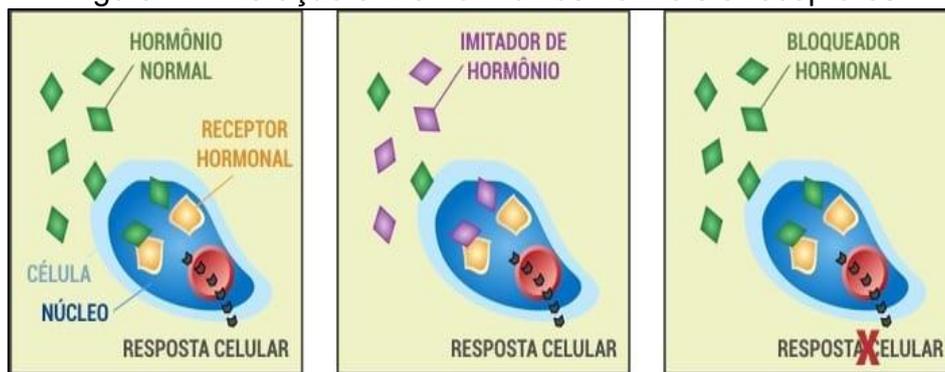
2.1.1. Formas de atuação dos desreguladores endócrinos

Os DEs agem em diversos estágios dos processos hormonais - produção de hormônios, ligação aos receptores, ação hormonal, excreção e biotransformação - podendo de maneira direta, danificar a interconexão com o sistema nervoso e imunológico. (BILA; DEZOTTI, 2007).

Dentro das condições exatas do organismo, os hormônios naturais se arranjam aos seus receptores e ativam os genes do núcleo, produzindo um resultado biológico. Porém, algumas substâncias químicas podem interagir a estes receptores hormonais imitando os hormônios naturais, resultando em diversas alterações, como o bloqueio dos sítios receptores em uma célula, o aumento da produção e secreção de hormônios naturais, a desativação das enzimas responsáveis pela liberação de hormônios, inviabilização da interação dos hormônios com seus receptores celulares, gerando respostas adversas que provocam alterações prejudiciais nas atividades celulares (VIEIRA; SANTOS; FILHO, 2007).

Tal efeito, ocasionado nas células dos organismos, encontra-se ilustrado na Figura 1.

Figura 1. Interação entre hormônios normais e receptores.



Fonte: (Zorron, 2017).

2.1.2 Classificação

Em relação à classificação dos DEs, diversas organizações mundiais listaram substâncias que podem ser enquadrados como um desregulador endócrino. Ainda não há dados científicos que informem como é realizada a classificação dos mesmos, para isso a União Europeia (UE), disponibilizou uma lista que pode ser os primórdios para a elaboração de uma lista que comprove o efeito desregulador hormonal de compostos (DEZZOTI; BILA, 2007).

Nesta classificação estão listados tanto compostos sintéticos quanto naturais. Sendo agrupada em duas classes segundo sua finalidade de uso ou produção: 1º substâncias sintéticas – São amplamente utilizadas na agricultura e em seus subprodutos como eliminadores de pragas; utilizados no setor industrial na forma de fármacos e nos subprodutos do mesmo setor; 2º substâncias naturais – hormônios sexuais e os fitoestrogênios que são idênticos a hormônios humanos, porém são produzidos pelas plantas (DEZZOTI; BILA,2007).

2.1.3. Ocorrência dos desreguladores endócrinos no meio ambiente

A fiscalização da presença dos desreguladores endócrinos atualmente cresce na comunidade científica. Tais substâncias então presentes nas águas superficiais e no subsolo, nas estações de tratamento de esgoto (ETE), até mesmo

na água potável e nos solos. Os hormônios, incluindo os naturais e os de origem sintética (utilizados na fabricação de remédios e em alimentos animais), são apontados como os principais responsáveis por grande parte dos efeitos desreguladores endócrinos em organismos aquáticos identificados nos últimos anos (BONAN; TEIXEIRA; NAKANO, 2017). A Tabela 1 a seguir ilustra a presença de compostos hormonais em diferentes matrizes ambientais, segundo pesquisas realizadas por Brandt (2012). Estes compostos podem ser rastreados em quantidades consideradas detectáveis e são capazes de provocar mudanças nos ecossistemas, danificar a qualidade da água e impactar seu consumo. (AMÉRICO et al, 2012).

Tabela 1. Presença de compostos hormonais em diferentes matrizes ambientais.

Classe	Composto	Ocorrência (ng·L ⁻¹)				Referência
		Esgoto sanitário	Efluente de ETE	Água superficial	Água de abastecimento	
Hormônios naturais e sintéticos	Estrona	40	-	-	-	(1)
		-	-	-	< 250	(2)
		4.830	4.130	3.500 - 5.000	-	(4)
		< 48 - 560	< 48 - 280	-	-	(5)
		870 - 1.380	< LD	-	-	(6)
		-	-	-	-	(6)
	17β-estradiol	21	-	-	-	(1)
		-	-	-	< 320	(2)
		-	-	106 - 6.800	-	(3)
		6.690	5.560	1.900 - 6.000	2.100 - 2.600	(4)
		< 64 - 300	< 64	-	-	(5)
		1.330 - 2.270	490 - 760	-	-	(6)
		-	-	< 4 - 63	-	(7)
		-	-	< 1 - 37	-	(8)
	17α-etinilestradiol	-	-	-	< 90	(2)
		5.810	5.040	1.200 - 3.500	1.600 - 1.900	(4)
		< 100 - 1.380	< 100 - 1.000	-	-	(5)
		600 - 1.260	< LD - 470	-	-	(6)
		-	-	< 5 - 64	-	(7)
		-	-	< 1 - 54	-	(8)
	Progesterona	-	-	-	< 50	(2)
		3.570	2.930	1.400 - 4.200	1.100 - 1.500	(4)

(1) Terres *et al.* (1999); Rio de Janeiro (RJ); (2) Sodré *et al.* (2010); Campinas (SP); (3) Raimundo (2007); Campinas (SP); (4) Ghiselli (2006); Campinas (SP); (5) Pessoa *et al.* (2011); Fortaleza (CE); (6) Froehner *et al.* (2011); Curitiba (PR); (7) Moreira *et al.* (2011); Ouro preto, Itabirito, Rio Acima, Nova Lima (MG); (8) Moreira *et al.* (2009); Belo Horizonte (MG)

LD: limite de detecção

Fonte: (Brandt, 2012).

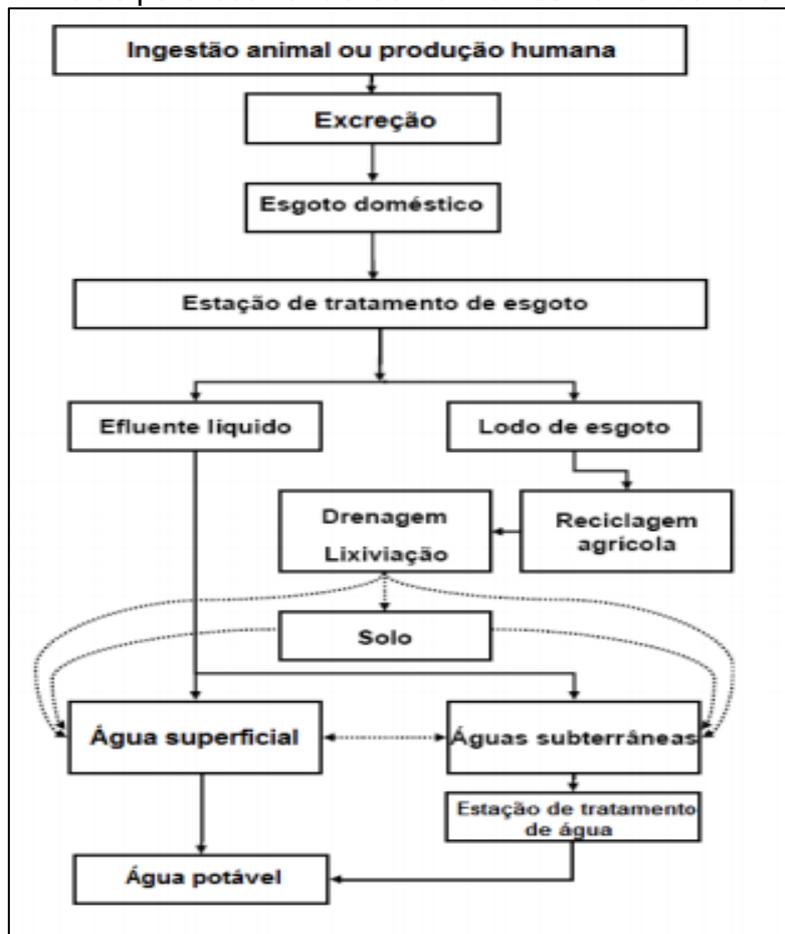
A exposição ocorre de inúmeras formas, como no contato direto com o local de trabalho - ou em casa - e o contato indireto com o consumo de água, alimentos, solos ou outras formas que estão contaminadas. Sendo a principal forma de contaminação humana, os alimentos que os contém (BILA; DEZOTTI, 2007). Os

hormônios femininos são observados no ambiente aquático - Brasil, Alemanha, Inglaterra, Estados Unidos, Canadá, Suécia, Holanda e Itália (AMÉRICO et al, 2012).

Compostos hormonais interagem bem com a gordura e estão contidos em carnes de peixes, frangos, ovos, entre outros alimentos. Alguns desses hormônios sexuais são presentes nas carnes, devido ao seu uso na criação de animais para consumo, porém em alguns países essa prática já é proibida (BILA; DEZOTTI, 2007).

Descartes incorretos do esgoto doméstico, atividades agrícolas e atividades urbanas, também fornece a presença dos DEs em águas potáveis e em lençóis freáticos. Além de que essas substâncias normalmente não são removidas pelas formas tradicionais, colocando em risco essa preciosa fonte de vida (BILA; DEZZOTI, 2007). As rotas para ocorrência de hormônios humanos no ambiente encontram-se ilustradas na Figura 2.

Figura 2. Rotas para ocorrência de hormônios humanos no ambiente.



Fonte: (Ferreira, 2014).

2.1.4. Legislação

A Comissão Europeia definiu um conjunto de normas jurídicas a respeito dos estudos, dirigidos pela mesma, sobre os DEs em produtos químicos e industriais (separados em níveis de perigos e seus respectivos riscos). Além de que, a comissão se responsabiliza na avaliação de cada produto ativo produzido, como pesticidas e biocidas (COMISSÃO EUROPEIA, 2016).

O uso demasiado de desreguladores endócrinos por grande parte da população, contribui com que o descarte seja inadequado, logo, por meio desta consequência, acabamos por reutilizar o mesmo hormônio proveniente do descarte incorreto. Vale ressaltar que, a Portaria 2914 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011), responsável por estabelecer padrões de qualidade a água potável, não contempla os compostos hormonais. Por toda maneira, alguns fármacos fazem parte da lista de substâncias prioritárias para monitoramento por agências estrangeiras (LIMA, 2017).

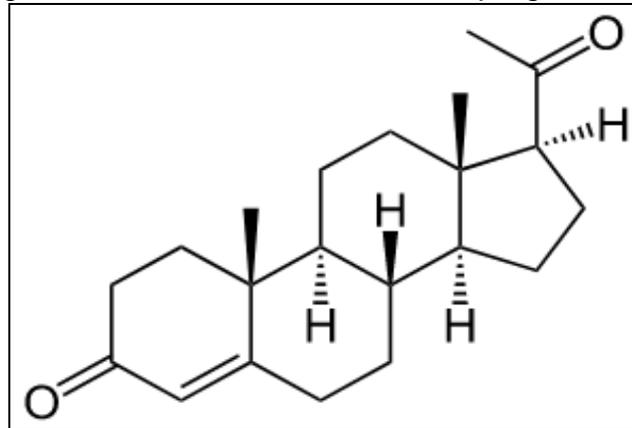
2.2. PROGESTERONA

A ação deste hormônio é preparar o útero para uma possível gestação, a qual irá receber o óvulo fecundado e estimular a produção do leite (GONÇALVES, 2008). A progesterona é produzida no corpus luteum sob estímulo da HGC (gonadotrofina coriônica), após a ovulação pelo folículo ovariano. Esse hormônio é responsável por manter a secreção do endométrio, que é de suma importância para o embrião, assim como para o desenvolvimento do feto na gestação. Esse hormônio é o pioneiro na biossíntese dos corticostéóides supra-renais, que são responsáveis pelo controle do stress, e de todos os outros hormônios sexuais (RAY, 2019).

O hormônio submete-se pela substância natural, a qual o próprio organismo produz, e a substância ativa, visto hoje como fármaco disponível a mais de 50 anos no comércio desde que foi sintetizado pela primeira vez. O remédio tem sido amplamente utilizado no tratamento de distúrbios ginecológicos, como hiperplasia endometrial, disfunção do ciclo menstrual, fase lútea inadequada,

síndrome pré-menstrual e síndrome da menopausa (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2012).

Figura 3. Estrutura da molécula de progesterona.



Fonte: (Mundo Educação, 20-?).

Fórmula: $C_{21}H_{30}O_2$

Massa molar: 314,46 g/mol

Ponto de fusão: 126°C

2.2.1. Progestagênio

São hormônios sintéticos derivados dos hormônios progesterona ou testosterona, quem tem função semelhante ao hormônio progesterona. Podem ser aplicados em tratamentos hormonais, em caso de menopausa, ou serem encontrados isoladamente ou em conjunto com o estrogênio, nos anticoncepcionais (RAY, 2019).

Estas substâncias, no entanto, não possuem composição química tão semelhante a progesterona. Elas podem realizar ligações tanto com os receptores de progesterona quanto com outros receptores no organismo, como os de estrogênio ou androgênios, podendo gerar efeitos colaterais, podendo ativar ou bloquear o receptor desses hormônios (RAY, 2019).

2.3. MÉTODOS DE ANÁLISE E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS HORMONAIS

As técnicas utilizadas, em abundância, nas análises de hormônios são: Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM) no modo tandem, Cromatografia Gasosa com Espectrometria de Massa (CG-EM) e Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (CL-EM). A técnica de cromatografia gasosa tem menor quantidade de aproveitamento relacionando à cromatografia líquida, ao analisar os estrogênios. (SILVA, 2016).

Tal fato se deve à necessidade de derivatização e à alta dificuldade na preparação da amostra, mesmo a Cromatografia Gasosa sendo uma técnica mais precisa. Além disso, observa-se a dificuldade de se encontrar métodos analíticos confiáveis, visto que depende da matriz em que serão realizados os estudos e a porcentagem de hormônios no meio (TOMSÍKOVÁ et al, 2012).

A utilização das técnicas supracitadas na quantificação de hormônios é devido à precisão e sensibilidade de tais métodos, além de serem rápidos e terem poder de detectar substâncias em baixas concentrações. Ao mesmo tempo destes benefícios, tais técnicas demandam de um alto custo de realização, do próprio equipamento e combustível utilizado. Sendo por consequência, ao fator econômico, encontrada em poucos locais que realizam as análises. (SILVA, 2016).

No que se refere a espectrofotometria UV-Vis, estudos feitos por Fabbris e Nicolini (2016) relatam a quantificação de progesterona em tecidos vegetais de alface, por meio desta técnica analítica, como medida indireta da contaminação da água.

2.4. ESPECTOFOTOMETRIS UV-VIS

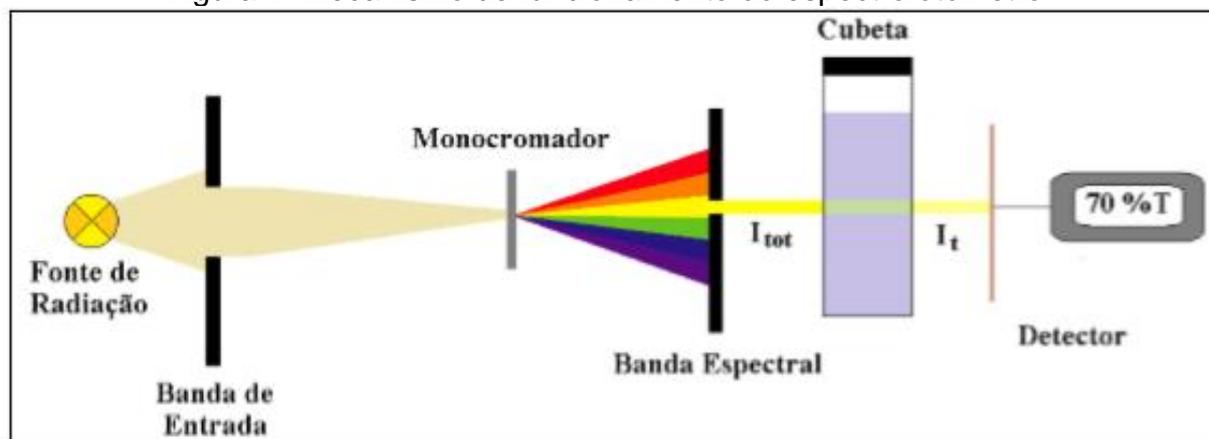
A espectrofotometria UV-VIS é uma técnica analítica quantitativa e qualitativa que trabalha com as ondas eletromagnéticas absorvidas no espectro ultravioleta visível, excitando as moléculas – tirando-a do seu estado fundamental – gerando um resultado.

O método instrumental de espectrofotometria UV-VIS é de deves importância para a química analítica, por ser fácil de manusear e rentável ao laboratório. Esse fator benéfico se deve ao fato de o instrumento possibilitar, em escalas laboratoriais, análises de caráter orgânicas e caráter inorgânico (SANTOS; NEVES; BRANCO, 2010)

2.4.1. Lei de Lambert-Beer

A base da espectrofotometria Uv-Vis é a Lei de Lambert-Beer. Resumidamente, quando um feixe de luz monocromática atravessa um meio transparente homogêneo, cada camada deste meio absorve igual à fração de luz que o atravessa, independentemente da intensidade da luz que o incide (MENDES, 2009). Desta forma, Lambert percebeu que a absorbância é diretamente proporcional à concentração da solução da amostra.

Figura 4. Mecanismo de funcionamento do espectrofotômetro.



Fonte: (Gonçalves et al, 2017).

A técnica de espectrofotometria está fundamentada na Lei de Lambert Beer, cuja lei expressa matematicamente a relação entre a concentração e a absorção da radiação por uma amostra, nas regiões do visível, ultravioleta e infravermelho do espectro eletromagnético (MENDES, 2009). Para a determinação da absorção em um comprimento de onda, tem se:

$$A = \epsilon bc$$

Onde:

A - É a absorvância;

ϵ – É a absorvidade molar, grandeza característica da espécie absorvente, onde sua magnitude depende do comprimento de onda da radiação incidente;

c- Concentração da espécie absorvente;

b- Distância percorrida pelo feixe através da amostra.

2.4.2. Espectro de absorção

Quando uma solução é submetida a leituras de absorvância ao longo de uma faixa de comprimentos de onda eletromagnética, obtemos informações sobre sua capacidade em absorver luz. A representação gráfica dos valores de comprimento de onda (λ) alternativamente à absorvância é denominada espectro de absorção (MENDES, 2009).

2.4.3. Curva Analítica

Uma curva analítica ou curva de calibração elucida a resposta de um método analítico para análise de quantidades conhecidas de constituinte. As soluções contendo concentrações conhecidas de constituinte são chamadas de solução padrão. A solução contendo os reagentes e solventes usados na análise, sem adição do constituinte de interesse, são chamadas de solução em branco. A solução em branco mede a resposta instrumental do procedimento analítico para impurezas ou espécies interferentes nos reagentes. A curva analítica serve, portanto, para verificar a validade da lei de Beer para uma dada análise

espectrofotométrica, ou seja, se a variação da absorbância é diretamente proporcional à variação da concentração da solução da amostra. (HARRIS, 1948).

A equação de uma linha reta é:

$$y = bx + a$$

y = variável dependente (Média dos valores de y);

x = variável independente (Média dos valores de x);

b = inclinação da reta;

a = intersecção no eixo dos y.

3. METODOLOGIA

O presente trabalho foi desenvolvido por meio de pesquisa bibliográfica exploratória, em artigos, revistas e jornais, sobre o estudo para a quantificação de progesterona por Espectrofotometria UV-Vis. Teve-se como base a metodologia referente ao trabalho de Fabbris e Nicolini (2016) sobre a detecção de progesterona em tecidos vegetais de *lactuca sp.* por espectroscopia de UV e adaptações foram realizadas para adequação a proposta de trabalho. Caracteriza-se também por uma pesquisa experimental por se tratar da execução de metodologia analítica para quantificação de progesterona em água por meio de espectrofotometria UV-Vis.

4. DESENVOLVIMENTO

Para a realização do presente trabalho, elaborou-se uma série de análises para obtenção de dados de absorção e linearidade da curva analítica para análise de progesterona por espectrofotometria UV-Vis. As análises consistem, após o preparo da solução, em realizar a obtenção do espectro de absorção nas faixas entre 200 a 300 nm, a fim de obter o pico de absorção máxima do composto. Assim gerar com os resultados, por fim, uma curva analítica indicando o grau de detecção e

sensibilidade da análise, conforme a diminuição da concentração das alíquotas. Para aplicação da proposta à análise de amostra água, tomou-se como base o trabalho citado na metodologia, no qual a quantificação de progesterona na água deu-se por método indireto de absorção do composto por espécie vegetal, representando um indicador de contaminação da água.

4.1. MATERIAIS E REAGENTES

Observa-se no Quadro 1, os materiais utilizados nas metodologia.

Quadro 1. Materiais e reagentes usados em todo desenvolvimento.

ETAPAS DO DESENVOLVIMENTO	MATERIAIS	REAGENTES
Preparo de solução estoque e soluções diluídas	<ul style="list-style-type: none"> • Agitador magnético • Balão Volumétrico – 10 mL • Balão volumétrico - 500mL • Pipeta volumétrica - 50 mL 	<ul style="list-style-type: none"> • Etanol • Progesterona – 200mg
Espectro de absorção	<ul style="list-style-type: none"> • Balão volumétrico • Cubeta de Quartzo • Espectrofotômetro Uv – Vis • Papel absorvente 	<ul style="list-style-type: none"> • Etanol • Solução alcoólica de progesterona 10 µg/mL.
Curva analítica	<ul style="list-style-type: none"> • Balão volumétrico • Cubeta de Quartzo • Espectrofotômetro Uv – Vis • Papel absorvente 	<ul style="list-style-type: none"> • Água destilada • Soluções diluídas de progesterona.

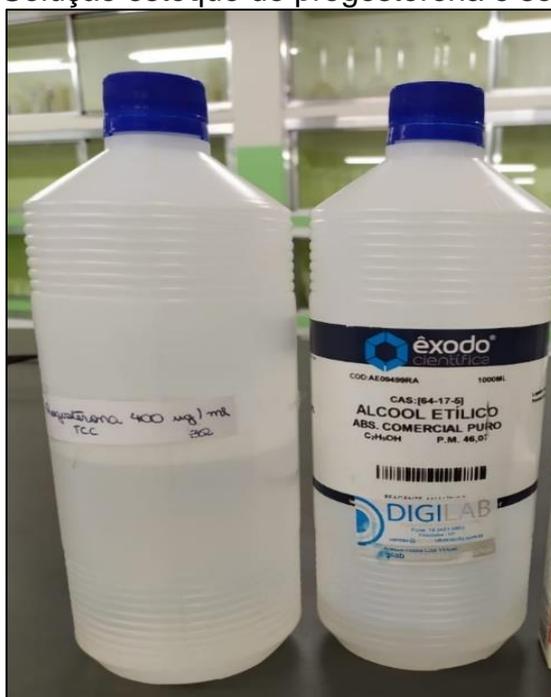
Fonte: (Dos próprios autores, 2019).

4.2. PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE E SOLUÇÕES DILUÍDAS

Preparou-se uma solução de progesterona em um balão de 500 mL, utilizando 200 mg de progesterona, diluindo-a em etanol, devido a solubilidade do composto neste solvente, uma vez que a progesterona apresenta baixa solubilidade em água devido a presença de vários grupos hidrofóbicos na molécula, sendo eles as carbonilas e seus anéis aromáticos. Obteve-se assim, uma solução estoque de concentração 400 µg/ mL, ou 400 mg/L.

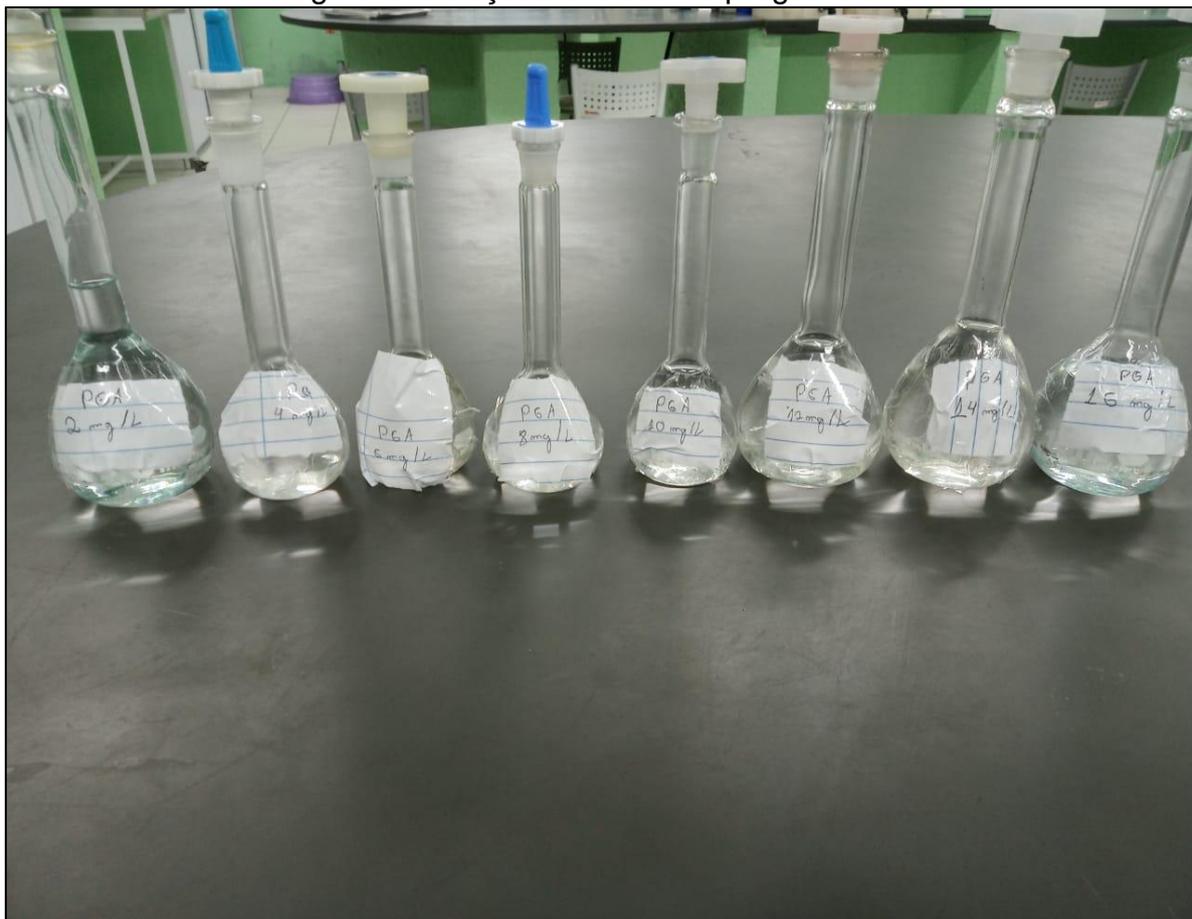
Utilizou-se da solução padrão estoque para preparar as soluções diluídas de progesterona em etanol, para a obtenção da curva analítica, destarte, empregou-se do seguinte cálculo de diluição: $C_1.V_1 = C_2.V_2$, onde: C_1 = Concentração inicial; C_2 = Concentração Final; V_1 = Volume inicial; V_2 = Volume Final. Com a descoberta dos volumes finais, fez-se a passagem dos volumes para balões de 10mL, completando o menisco. Assim, obtiveram-se soluções de 16mg/L; 14 mg/L; 13 mg/L; 12 mg/L, 10 mg/L, 8 mg/L, 6 mg/L, 4 mg/L e 2 mg/L. Observe, assim, na Figura 5 e 6 abaixo, a solução estoque e as soluções diluídas, respectivamente.

Figura 5. Solução estoque de progesterona e solvente etanol.



Fonte: (Dos próprios autores, 2019).

Figura 6. Soluções diluídas de progesterona.



Fonte: (Dos próprios autores, 2019).

4.3. OBTENÇÃO DO ESPECTRO DE ABSORÇÃO

Para verificar a faixa de absorção da progesterona, foi realizado em espectrofotômetro de feixe único, uma varredura nos comprimentos de onda de 200 a 300 nm, com o auxílio de uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A utilização de cubeta de quartzo se fez necessária uma vez que cubetas de vidro absorvem na faixa do ultravioleta, interferindo no resultado da medida.

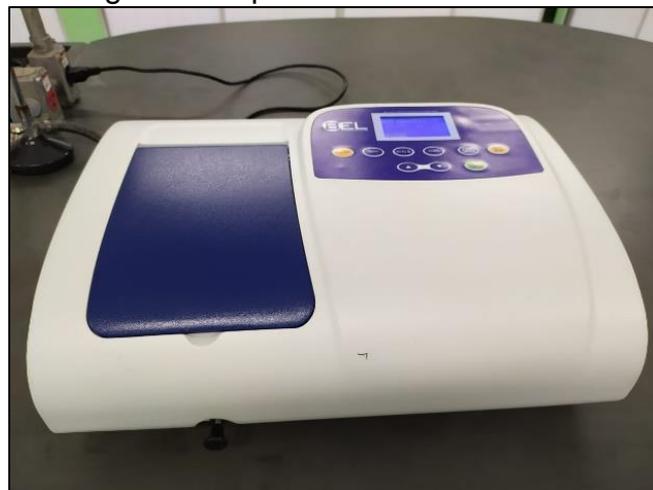
Para a calibração do branco, usou-se etanol puro, uma vez que este é o solvente empregado na solução. Para a varredura do intervalo de comprimento de onda de 200 nm a 300 nm empregou-se uma solução de progesterona de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, feita a partir da diluição da solução estoque de 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As Figuras 7 e 8 ilustram a cubeta de quartzo, o espectrofotômetro e a solução utilizada na medição.

Figura 7. Solução para análise do espectro de absorção e cubetas de quartzo.



Fonte: (Dos próprios autores, 2019).

Figura 8. Espectrofotômetro UV-Vis.



Fonte: (Dos próprios autores, 2019).

4.3.1. Resultados

A Tabela 2 a seguir ilustra o resultado das leituras de absorção da solução alcoólica de progesterona no intervalo de 200 a 300 nm.

Tabela 2. Resultados dos picos de absorção do composto nas faixas de 200 a 300nm.

Comprimento de onda	Absorção	Comprimento de onda	Absorção
200	0,050	236	0,130
210	0,090	238	0,128
220	0,111	240	0,122
222	0,117	250	0,087
224	0,122	260	0,046
226	0,128	270	0,025
228	0,130	280	0,020
230	0,134	290	0,017
232	0,134	300	0,013
234	0,132		

Fonte: (Dos próprios autores, 2019).

O Gráfico 1 a seguir refere-se ao espectro de absorção da progesterona em solvente etanol, no intervalo de 200 a 320 nm:

Gráfico 1. Espectro de absorção da Progesterona.



Fonte: (Dos próprios autores, 2019).

Assim, após a elaboração do espectro de absorção, observou-se o pico de absorção máxima da progesterona, no comprimento de onda de 232 nm. Destarte, nota-se a absorção no ultravioleta fora do espectro visível, no espectrofotômetro Uv-Vis. A utilização da espectrofotometria no ultravioleta para quantificação de progesterona está prevista na Farmacopeia Brasileira (2010) para leitura em 240 nm (ANVISA, 2009), cuja absorção é referente aos grupos insaturados carbonilas e cadeias cíclicas de seis carbonos presentes na estrutura da progesterona. (FABBRIS; NICOLINI, 2016). Dessa forma, nota-se que a absorção no comprimento de onda, deve-se, por conta de contaminantes - excipientes e componentes da cápsula da progesterona - sendo possível a ocorrência de desvios dos comprimentos de onda. Os excipientes na formulação do Utrogestan são: óleo de amendoim e lecitina de soja; os componentes da cápsula são: gelatina, glicerol e dióxido de titânio. (UTROGESTAN, 2012).

4.4. OBTENÇÃO DA CURVA ANALÍTICA

Para realizar a detecção da quantidade de progesterona presente na amostra, fez-se o processo de produção da curva analítica. O método consiste na produção de diversas soluções padrões diluídas de progesterona, a partir da solução estoque. Depois de realizada essa etapa, compara-se as amostras com uma solução em branco – solução contendo somente a matriz, ou seja, neste caso etanol– com leitura no comprimento de onda de 240 nm, valor de referência para o composto.

4.4.1. Resultados

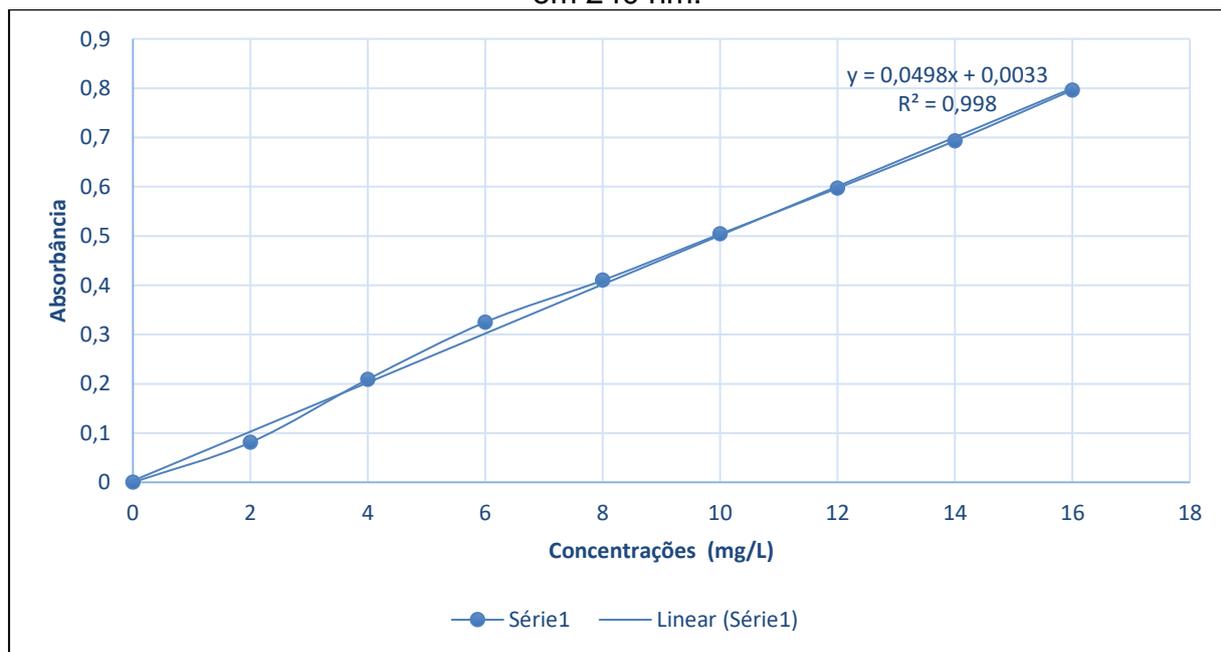
Os resultados para a curva analítica na faixa de trabalho de concentrações de 2 mg/L a 16 mg/L, encontram-se expressos na Tabela 4 a seguir, com seu respectivo gráfico, sendo ele o Gráfico 2:

Tabela 4. Resultados de absorvância proveniente das soluções diluídas.

Concentração (mg/L)	Absorvância
0	0
2	0,081
4	0,693
6	0,597
8	0,504
10	0,410
12	0,323
14	0,209
16	0,796

Fonte: (Dos próprios autores, 2019).

Gráfico 2. Curva analítica utilizada para determinação de progesterona, com leitura em 240 nm.



Fonte: (Dos próprios autores, 2019).

Observa-se, assim, que a curva analítica, na faixa de 240 nm, apresenta o coeficiente de regressão linear de 0,998; ou seja, já que a resolução RE nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003) estabelece um valor mínimo de r (coeficiente de regressão linear) = 0,99; o resultado obtido, na matriz etanol, mostrou-se linear nas concentrações de 0 mg/L á 16 mg/L.

4.5. ANÁLISE DA AMOSTRA DE ÁGUA

Não foi possível quantificar a progesterona na amostra de água a partir da curva analítica gerada, devido aos efeitos de interferência da matriz (água) sobre o solvente utilizado para a curva analítica (etanol). A amostra de água não pode ser aplicada ao método de curva analítica descrito anteriormente, de maneira direta, uma vez que as matrizes são diferentes. Faz-se necessário, portanto, métodos de extração, purificação e concentração do analito (progesterona) na amostra, primeiramente. A necessidade de métodos de extração em fase sólida ou extração líquido-líquido, nos quais se aplicam princípios de cromatografia, inviabiliza a realização desta análise, devido à ausência de equipamentos disponíveis.

Foram realizadas tentativas de solubilização da progesterona em água para realização da curva analítica neste solvente, porém devido a baixa solubilidade do composto a curva analítica não apresentou resultados plausíveis neste solvente.

No entanto, Fabbris e Nicolini (2016) utilizaram de metodologia de Espectrofotometria UV, por adição de padrão (atenua o efeito da matriz), para analisar a presença de progesterona em amostra de tecido vegetal exposto à água contaminada, sem a necessidade de métodos complexos de extração e concentração do analito, utilizando etanol para extração e curva por adição de padrão para análise, o que apresenta-se como uma possibilidade para estudos futuros e continuidade deste trabalho.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho se justifica por meio dos impactos ambientais causados pelos desreguladores endócrinos, em particular a progesterona. Seus efeitos ambientais são vistos principalmente nas espécies aquáticas, que além de sofrerem com a redução da população, por meio da baixa ovulação dos ovos, sofrem com alterações em seus sistemas endócrinos.

Com base nesta problemática, o trabalho teve como objetivo uma maneira alternativa de quantificação da progesterona em águas, a

espectrofotometria. A espectrofotometria se encontra como um método acessível e de baixo custo para as análises laboratoriais. Após os testes feitos por meio do método, constatou-se a eficácia na obtenção da curva analítica para quantificação, sendo ela linear na faixa de 2mg/L a 16 mg/L de progesterona em etanol. Essa linearidade representa a proporcionalidade da relação entre absorvância e concentração, em que a absorvância aumenta igualmente à concentração.

No entanto, houve dificuldades de adequação do método à matriz na qual se propôs a análise. Propõe-se, portanto, a continuação deste trabalho. Entre as possibilidades de continuação, tem-se o estudo de possibilidades do aumento da sensibilidade para o composto incolor analisado e o emprego de um método que atenuar os efeitos interferentes da matriz, como por exemplo, a obtenção da curva por adição de padrões para quantificação da progesterona em água a partir de solução padrão do composto preparada em etanol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMÉRICO, J. H. P; et al. Desreguladores endócrinos no meio ambiente e seus efeitos na biota e saúde humana. **Pesticidas: R. ecotoxicol. e meio ambiente**. Curitiba, v. 22, p. 17-34, jan./dez. 2012

ANVISA. **Consulta Pública nº 9, de 23 de março de 2009**. Disponível em:< [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[25181-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[25181-1-0].PDF)>. Acesso em: out. 2019.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 1 -16, mai/jun. 2007. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000300027>. Acesso em: out. 2019.

BRANDT, E. M. F. **Avaliação da remoção de fármacos e desreguladores endócrinos em sistemas simplificados de tratamento de esgoto (Reatores UASB seguidos de pós tratamento)**. 128 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento e Meio Ambiente), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2012.

BONAN, C.; TEIXEIRA, L. A.; NAKANO, A. R. Absorção e metabolização dos hormônios sexuais e sua transformação em tecnologias contraceptivas: percursos do pensamento médico no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 1, p. 107-116. 2017.

COMISSÃO EUROPEIA. **Comissão apresenta critérios científicos para identificar desreguladores endócrinos no domínio dos pesticidas e biocidas**. 2016.

Disponível em: <https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/pt/IP_16_2152>. Acesso em: out. 2019.

EWING, W. G. **Métodos instrumentais de análise química**. Volume 1. Nova Jersey: Blucher, 1971. 312p.

FABBRIS, E. Z; NICOLINI, K. P. DETECÇÃO DE PROGESTERONA EM TECIDOS VEGETAIS DE LACTUCA SP. POR ESPECTROSCOPIA DE UV. **Mundi.**, Paraná, v. 1, n. 2, p. 9 -16, jan/dez. 2016. Disponível em:

<[http://periodicos.ifpr.edu.br/index.php?journal=MundiSB&page=article&op=view&path\[0\]=254&path\[1\]=74&fbclid=IwAR0dYL2s7HvNATRuszMjcu5sl2wXjnWJ5S-8T7FtSjv_QWoS2I5ALVOQrgs](http://periodicos.ifpr.edu.br/index.php?journal=MundiSB&page=article&op=view&path[0]=254&path[1]=74&fbclid=IwAR0dYL2s7HvNATRuszMjcu5sl2wXjnWJ5S-8T7FtSjv_QWoS2I5ALVOQrgs)>. Acesso em: nov. 2019.

FERREIRA, A.P. Ocorrência e detecção de desreguladores endócrinos em estações de tratamento de esgoto: complicações ao meio ambiente. **Rev. Bras. Farm.** Rio de Janeiro, v 93, n. 2, p. 255-264, mar. 2012. Disponível em:

<<http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-2012-93-2-20.pdf>>. Acesso em: out. 2019.

FOGAÇA, J. R. V. **Progesterona**. Disponível em:

<<https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/quimica/progesterona.htm>>. Acesso em: nov. 2019.

GHISELLI, G. **Avaliação da Qualidade das Águas Destinadas ao Abastecimento Público na Região de Campinas: Ocorrência e Determinação dos Interferentes Endócrinos (IE) e Produtos Farmacêuticos e de Higiene Pessoal (PFHP)**. 2006. 190 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

GHISELLI, G.; JARDIM, W. F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova.**, São Paulo, vol. 30, n. 3, p 1-20, maio/junho. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000300032>. Acesso em: Ago. 2019.

GONÇALVES, F. S. **Progesterona**. 2008. Disponível em:

<<https://www.infoescola.com/hormonios/progesterona/>>. Acesso em: out. 2019.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. São Paulo: LTC Editora, 2012. 920 p.

LIMA, P. **Tecnologias para desinfecção de água e esgotos: ozonização**.

Disponível em: <<http://boaspraticasnet.com.br/tecnologias-para-desinfeccao-de-agua-e-esgotos-desinfeccao-por-ozonizacao/>>. Acesso em: nov. 2019.

MENDES, M. F. A. **Espectrofotometria**. 2009. Disponível em:

<http://www.ufrgs.br/leo/site_espec/conceito.html>. Acesso em: out. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. **Portaria nº 2914**. São Paulo. 38 p.

RAPOSO, C. **Resíduos de medicamentos e hormônios na água preocupam cientistas**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/secom/ciencia/residuos-de-medicamentos-e-hormonios-na-agua-preocupam-cientistas/>>. Acesso em: abr. 2019.

RAY, L. **Tudo sobre a progesterona**. Disponível em: <<https://helloclue.com/pt/artigos/ciclo-a-z/tudo-sobre-a-progesterona>>. Acesso em: out. 2019.

SANTOS, D. N. D.; NEVES, G. N.; BRANCO, R. N. C. **Espectroscopia na Região do Ultravioleta/Visível**. 2010. 38 slides. Disponível em: <<https://www.docsity.com/pt/slides-espectroscopia-na-regiao-do-uv-vis/4809817/>>. Acesso em: out. 2019.

SILVA, N. M. **Determinação de desreguladores endócrinos na água e no sedimentos do açude santo anastácio na cidade de Fortaleza/CE**. 2016. 97 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de ciências, Departamento de química analítica e físico-química, Universidade Federal Do Ceará, Fortaleza, 2016.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 5. ed. Estados Unidos: Wiley, 1991. 432 p.

TOMŠÍKOVÁ, et al. High-Sensitivity Analysis of Female-Steroid Hormones in Environmental Samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. República Tcheca. v. 34, n. 1. p. 35-58, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/234316297_High-Sensitivity_Analysis_of_Female-Steroid_Hormones_in_Environmental_Samples>. Acesso em: set. 2019.

UTROGESTAN. Responsável técnico Dra. Talita T. Menezes. São Paulo: Besins Healthcare Brasil, 2012. Bula de remédio.

VIALI, M. A. **Avaliação da eficiência da remoção de hormônios em estações de tratamentos de efluentes**. 2014. 71 f. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia Ambiental e Sanitarista) – Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.

VIEIRA, E. M.; SANTOS, R. L.; FILHO, R. W. R. Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos. **Ciências da Engenharia Ambiental**. São Carlos, v. 2, n. 3, p. 1-7, jan/mar. 2007.

ZORRON, M. **Desreguladores Endócrinos: Você Sabe o que São e Onde Encontrá-los?**. 2017. Disponível em: <<https://www.portalped.com.br/especialidades-da-pediatria/alergia-e-imunologia/desreguladores-endocrinos-voce-sabe-o-que-sao-e-onde-encontra-los/>>. Acesso em: out. 2019.