

## Sobre a dosagem fluorométrica da riboflavina na urina\*

Por

Gilberto G. Villela

(Chefe de laboratório do Instituto Osvaldo Cruz)

(Com 4 figs. no texto)

A vitamina B<sub>2</sub> que corresponde à fração termo-resistente do complexo B e tem ação nítida sobre o crescimento do rato foi identificada à riboflavina depois dos estudos de Kuhn e colaboradores, Ellinger e Koschara, Karrer e de Euler. As substâncias corantes (flavinas) isoladas do leite (lactoflavina), do ovo (ovoflavina), do fígado (hepatoflavina) e da urina (uroflavina) são hoje consideradas como uma mesma substância, atualmente denominada de riboflavina (1). O grupo dos pigmentos soluveis na água é também conhecido com o nome de liocromo (Koschara) em oposição ao dos lipocromos que são soluveis nos solventes lipídicos (carotenóides).

A riboflavina encerra um núcleo aloxazina por fórmula C<sub>17</sub> H<sub>20</sub> O<sub>6</sub> N<sub>4</sub> sendo quimicamente denominada de 6,7-dimetil-9-(d-l-ribitol)-iso-aloxazina. Uma das propriedades características desta flavina é a fluorescência amarelo-esverdeada que apresenta quando irradiada pela luz ultra-violeta. Em meio neutro ou levemente ácido a riboflavina se transforma, depois de irradiada, em lumicromo, e em meio alcalino em lumiflavina, ambas podendo ser extraídas pelo clorofórmio após acidificação. A lumiflavina é amarela e dá uma fluorescência idêntica à da riboflavina, ao passo que o lumicromo amarelo-palha, em meio neutro produz uma fluorescência azul ou azul-esverdeada e em meio alcalino uma fluorescência amarela. A fluorescência da riboflavina é mais intensa no pH de 3 a 9 (máximo de 6 a 8), isto é, quando a molécula está eletricamente neutra (Kuhn e Moruzzi) (2). Sob a ação redutora do hiposulfito de sódio a riboflavina se descora (leuco-derivado), mas a cor se regenera pela passagem de oxigênio atmosférico. A adsorção da riboflavina se faz com a terra de infusório em solução normal de ácido, com a "Frankonite" em meio neutro ou com o carvão animal em meio ácido. O sulfato de chumbo foi também usado como adsorvente por Koschara e por Emmerie. Neste caso a eluição é obtida com uma mistura de ácido acético e piridina.

---

\* Recebido para publicação a 26 de agosto e dado à publicidade em setembro de 1942.

A riboflavina existe no organismo sob duas formas : livre e combinada. Na retina, no leite e na urina toda a flavina, praticamente, acha-se em estado livre. Nos tecidos a flavina faz parte da enzima ou fermento amarelo de Warburg, estando unida ao ácido fosfórico e a uma proteína. É um transportador de hidrogênio de grande importância para o metabolismo celular e foi também isolado do músculo por Banga e Szent-Györgyi que a denominaram de *citoflav*.

A urina deve a sua cor amarelo-alaranjada a diversos pigmentos nela contidos. Foi Thudichum, que em 1864 descreveu o pigmento urinário, batizando-o com o nome de urocromo. Outros autores também descreveram os corantes urinários até que se descobriu a urobilina (Jaffé), a uroeritrina (Zoja, Riva, Garrod) e as porfirinas (Garrod). Todos esses compostos contribuem para formar o corante total da urina. Weiss considerou o urocromo como um produto de oxidação do urocromogênio contribuindo somente parcialmente para a cor total da urina. Segundo Heilmeyer e Will, na urina normal a urobilina contribue com 1 %, a uroeritrina com 15 % e as porfirinas com quase nada do pigmento total. Heilmeyer e Otto isolaram duas frações do urocromo (A e B) usando o sulfato de amônio saturado como precipitante. A fração I que fica em solução (urocromo A) pode ser subdividida em duas : uma solúvel no butanol e outra insolúvel neste álcool. O urocromo A corresponde a 26-42 % do total. A parte precipitada (fração II) encerra o urocromo B que compreende 50 a 74 % do pigmento total, a uroeritrina (0 a 15 %) e a urobilina (0 a 1 %) (3). Só a primeira fração (urocromo A) que é sensível à oxidação pelo permanganato de potássio.

Em 1925, Kinnersley e colaboradores acharam que a substância fluorescente azul da urina era o urocromo. Numerosos tecidos contêm substâncias azuis e que foram notadas por numerosos autores desde Helmholtz (Bence Jones, Langecker, Rosenheim, Euler e Adler, Peters, Kuhn, Barger, etc.). Kinnersley, O'Brien e Peters denominaram de "quinocromos" às substâncias de fluorescência azul da urina e dos tecidos do organismo.

Koschara verificou que o liocromo da urina (uroflavina) é idêntica à lactoflavina de Kuhn. Além da uroflavina, Koschara mostrou que existem na urina outras flavinas que foram por ele isoladas pela análise cromatográfica e a fotólise alcalina. Estas flavinas são uma aquaflavina e dois liocromos. Os liocromos compreendem várias flavinas com propriedades semelhantes. A quantidade de liocromo eliminada normalmente é muito pequena cerca de 10 $\gamma$  no inverno e 30 a 50 $\gamma$  para 100cc no verão (Koschara) (4). O liocromo é um corante solúvel na água e pode ser adsorvido pela terra de infusório ao passo que o urocromo não se adsorve neste adsorvente. A adsorção é feita na urina acidificada com ácido acético (5).

Emmerie, empregando o método de Koschara, modificou-o e adaptou-o à análise da urina. Os resultados expressos em lactoflavina deram para 5 indivíduos normais a eliminação de 54 a 83 $\gamma$  para 100cc de urina e 819 a 1250 $\gamma$  para 24 horas (6). A eliminação horária é constante (27 a 42 $\gamma$ ). Quando aumenta o consumo de alimentos ricos em flavina a eliminação cresce sensivelmente. Numa experiência realizada durante 30 dias as respostas apresentadas pela eliminação urinária da riboflavina foram proporcionais à quantidade ingerida desta flavina (7).

A eliminação normal de riboflavina, que poderemos denominar de *riboflavinúria*, pode variar muito sem que se observem sinais clínicos de deficiência. Najjar e Holt verificaram que numa pessoa normal submetida a uma dieta isenta de riboflavina esta desaparece na urina depois de 14 a 15 dias sem que se observem sintomas de arriboflavinose (8). Em casos humanos de deficiência tem-se encontrado valores baixos (Spies, Bean e Ashe) como também na arriboflavinose experimental (Vivanco, Frazer e colaboradores, Axelrod e colaboradores). Entretanto, até agora ainda não foi possível estabelecer qual o valor mínimo normal para a riboflavinúria abaixo do qual aparece um deficiência em vitamina B<sub>2</sub>.

A ministração de riboflavina por injeção ou por ingestão determina nos indivíduos em dieta normal um grande aumento da riboflavinúria, ao passo que nas pessoas em carência os valores pouco se elevam. Esta prova pode portanto fornecer dados uteis para o estudo das deficiências em vitamina B<sub>2</sub>. Para que esta prova de carga tenha significação, torna-se mister que as doses ministradas sejam pequenas, conforme mostraram Najjar e Holt. Assim é que Axelrod, Spies e Elvehjem não lograram obter diferenças sensíveis entre doentes e normais, usando doses elevadas como teste de saturação (9).

A riboflavina pode ser dosada pelos métodos biológico, microbiológico e físico-químico.

O método biológico baseia-se na ação da vitamina sobre o crescimento de ratos mantidos em dieta deficiente. Este método não é utilizavel para a dosagem na urina. Um método bastante empregado ultimamente é o método microbiológico de Snell e Strong. Sendo a riboflavina um fator de crescimento para o "Lactobacillus casei" é possível cultivar este microorganismo em meio basal sintético adicionado de quantidades conhecidas de riboflavina. O desenvolvimento da cultura é medido pelo grau de turvação num nefelômetro ou pela produção de ácido titulavel. Estabelecem-se então curvas padrões com riboflavina pura. Os valores obtidos com as amostras de material adicionadas às culturas em meio de cultura idêntico são facilmente comparaveis aos valores das curvas padrões (10). Os métodos físico-químicos medem a

intensidade da cor amarela da flavina, num colorímetro, antes e depois de eliminar os demais pigmentos, ou utilizam a propriedade da riboflavina de fluorescer sob a ação da luz ultra-violeta. Ultimamente também se tem procurado determinar a riboflavina pela análise polarográfica.

Dentre os métodos colorimétricos deve ser mencionado o de Koschara modificado por Emmerie. A urina é tratada pelo sulfureto de chumbo que adsorve a riboflavina. O precipitado de chumbo é lavado e eluído com a mistura ácido acético-água-piridina que retira toda a flavina adsorvida. O líquido da eluição é oxidado rapidamente com permanganato de potássio em solução a 5 % e adicionado de peróxido de hidrogênio a 3 % para retirar o excesso de permanganato. A cor obtida é lida no fotômetro gradual de Pulfrich com o filtro S 47 e na cuba de 3cm (11). Com esta técnica o volume de urina inicial deve ser de 50 a 100 cc para que a cor seja bem intensa. A extinção encontrada pode ser referida em riboflavina sabendo-se que 0,5  $\gamma$  por 1 cc dá uma extinção de 0,4. Para maior facilidade construímos uma curva com riboflavina sintética (Hoffman-LaRoche) dissolvida em água destilada no pH de 7.0 (Fig. 1).

A riboflavina sendo intensamente fluorescente em solução aquosa, a sua dosagem baseada nesta propriedade foi estudada por Euler, Adler, Vivanco e Fesrebec. A conversão da riboflavina em lumiflavina, que é solúvel no clorofórmio, também serviu de base para a sua determinação (Kuhn e colaboradores; Charite e Khaustov). Entretanto, Theorell não conseguiu recuperar toda a flavina adicionada pela técnica da lumiflavina. Mais adiante damos o resultado de experiências por nós executadas pela técnica da transformação em lumiflavina mas determinando por diferença. Neste caso os resultados foram satisfatórios.

Os métodos fluorométricos têm a vantagem de ser mais sensíveis e portanto de empregar quantidades muito menores de urina. Nas urinas pobres em riboflavina, o método fluorométrico é o único aplicável com segurança. Ferrebee procurou dosar a riboflavina da urina por meio de duas técnicas: a direta e a indireta. Na primeira a urina é diluída e os pigmentos não flavínicos são oxidados, sendo a fluorescência medida antes e depois da oxidação num aparelho especial que é o fluorofotômetro. Na técnica indireta, principalmente indicada para as urinas pobres em riboflavina, separa-se esta pela adsorção com floridina (terra de infusório especial) ou supersorb (adsorvente sintético). O adsorvente depois de lavado é submetido à eluição com uma mistura de piridina e ácido acético a 20%. O eluato é oxidado pelo permanganato de potássio a 5% e descorado pelo peróxido de hidrogênio a 3%. A solução é então levada ao fluorofotômetro e a fluorescência lida no galvanômetro. O valor obtido é comparado ao de uma solução

padrão de riboflavina ou é lido diretamente no gráfico. Na técnica direta a urina, depois de diluída e os pigmentos oxidados, como na técnica anterior, é levada ao fluorômetro e a fluorescência medida. Os volumes de urina empregados são de 1 a 3cc. A prova em branco é feita com a mesma diluição da urina onde se colocou um cristal de hiposulfito de sódio que reduz a flavina para a sua forma leuco não fluorescente. A diferença entre a prova em branco e a outra determinação exprime a quantidade de riboflavina da amostra de urina (12).

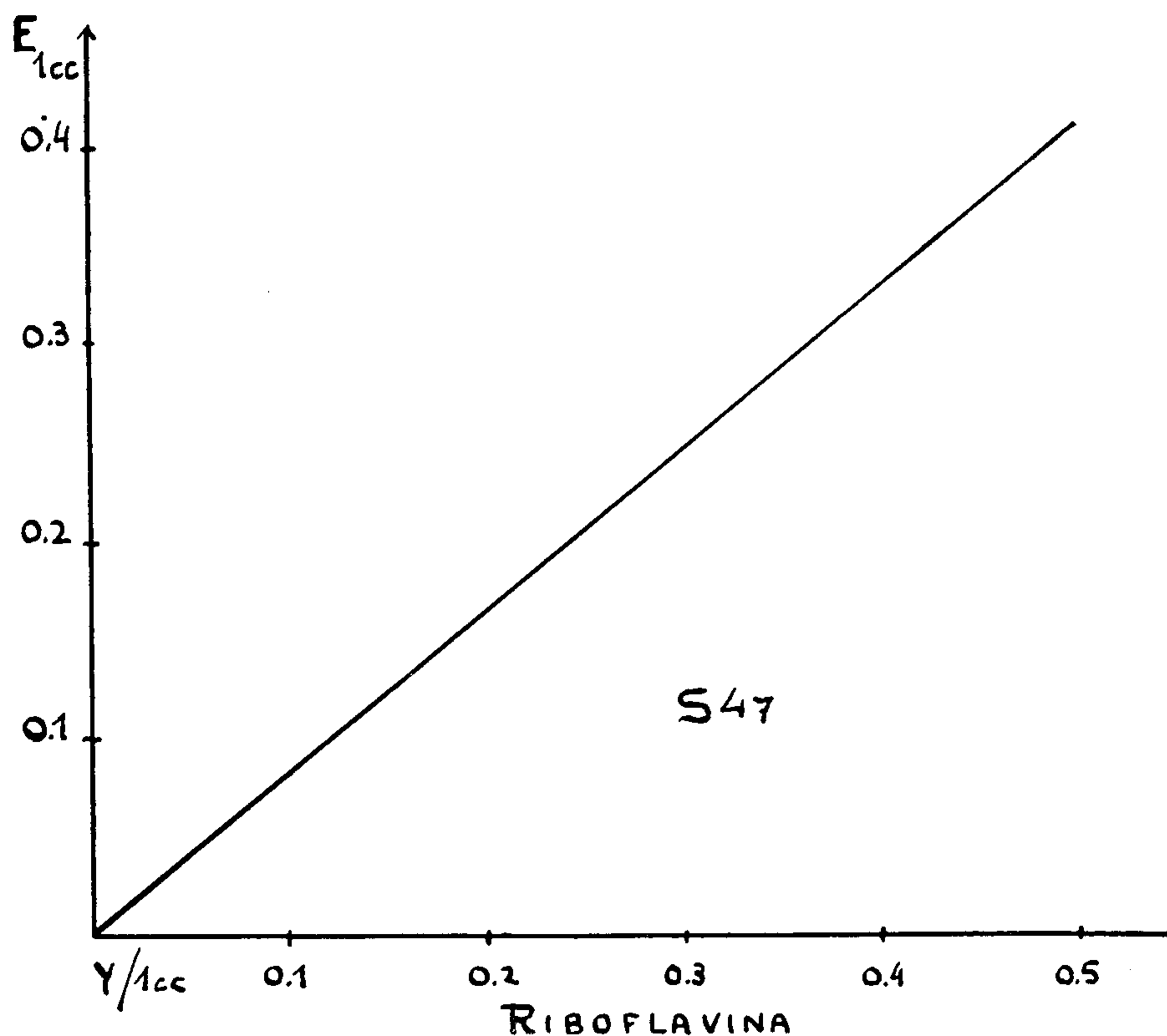


Fig. 1

Curva fotométrica da riboflavina obtida com o fotômetro de Pulfrich

Najjar em trabalho recente modificou a técnica de Ferrebee empregando além da mistura de piridina também o butanol que é miscível com esta mas não com a água, permitindo uma separação nítida das camadas líquidas. Praticamente toda a riboflavina é retida na camada de piridina. Acha este autor que o uso de um meio aquoso para as determinações da fluorescência é pouco indicado devido à formação de pequenas bolhas gasosas que ficam dispersas no meio e aumentam a fluorescência quando da adição do peróxido

de hidrogênio. (13). Najjar acha que é útil também neste caso fazer um padrão tendo como solvente a piridina e o butanol. A dosagem indireta que se deve fazer com as urinas muito pigmentados ou pobres em flavina pode ser feita pela combinação das técnicas de Emmerie e de Ferrebee como propôs Najjar. Neste caso a urina no volume de 10 a 30cc é adicionada de sulfureto de chumbo que se prepara no mesmo dia. Tomam-se 40cc de uma solução de acetato de chumbo a 5 % contendo ácido acético a 0,25 % e faz-se passar uma corrente de gás sulfídrico. O sulfureto formado é lavado com água (300cc) três a quatro vezes. Ao precipitado ainda úmido junta-se a urina e agita-se durante uns 10 minutos. Filtra-se lentamente num filtro Jena (N. 3 G4) e lava-se 3 a 4 vezes com água, evitando-se que o precipitado apresente fissuras. Ao precipitado adicionam-se 20cc da mistura de 70cc de água, 30cc de piridina e 2cc de ácido acético glacial. Filtra-se lentamente e o eluato é adicionado de 3cc de ácido acético e 2cc da solução de permanganato de potássio a 5 %. Após um minuto de oxidação juntam-se 2cc de água oxigenada a 3 % para descorar. Completa-se o volume do eluato até 30cc com água. Toma-se 10cc desta solução e junta-se sulfato de sódio anidro e 10cc de álcool butílico. Agita-se bem e separa-se a camada de piridina e butanol que se leva ao fluorômetro. O padrão é tratado de maneira idêntica partindo-se de uma solução mãe contendo 10mg de riboflavina por litro que é mantida no escuro e em baixa temperatura. O padrão diário faz-se diluindo na proporção de 1 : 50 com água e tomando 5cc desta (contendo 1 microg. de riboflavina) para se proceder como no caso da urina. As comparações entre a intensidade da fluorescência da urina e do padrão são feitas na mesma hora.

As técnicas de fluorescência acima descritas foram por nós repetidas e verificadas em seus detalhes. Descreveremos a seguir as várias causas de erro e as variantes que podem ser empregadas na determinação da riboflavina da urina.

#### *Substâncias fluorescentes da urina.*

Aproveitamos a oportunidade para passar em revista as diversas substâncias fluorescentes que tem sido descritas na urina normal e patológica e que podem de algum modo interferir nas determinações da riboflavina. Em alguns casos a medida da fluorescência da urina tem sido utilizada para o estudo de certas perturbações do metabolismo.

Alem dos pigmentos já referidos (urobilina, uroeritrina, porfirinas, urocromos, indigorrubina, etc), a urina encerra substâncias que produzem fluorescência de dois tipos : amarelo-esverdeada e azulada. A pesquisa dos liocromos da urina feita por Koschara, revelou a existência de pelo menos dois pigmentos fluorescentes. Um deles se encontra na urina normal na con-

centração de 1 : 1.000.000 e foi denominado de uropterina. É uma substância pertencendo ao grupo das purinas e dotada de fluorescência esverdeada em meio ácido. No pH de 7 a 11 a fluorescência é azulada lembrando a do tiorcromo. As demais substâncias xânticas da urina também podem apresentar fluorescência. A bilirrubina de fluorescência amarela, sendo oxidada, transforma-se em biliverdina de fluorescência verde. A indigorrubina existente nas urinas ricas em indican é dotada de fluorescência azulada (Yoneyama) (14).

A oxidação com o permanganato de potássio reduz grandemente a cor da urina e das substâncias fluorescentes não flavínicas. O extrato urinário acidificado pelo ácido acético e depois extraído pelo álcool amílico apresenta uma fluorescência amarela (Yoneyama). A extração com o isobutanol também retira certas substâncias fluorescentes azuladas. Em 1940, Koschura conseguiu isolar outra substância da urina normal contendo 20% de enxofre e possuindo uma fluorescência amarelo-oliva à luz ultra-violeta. Este pigmento foi denominado por Koschura de urotion (15). É interessante notar que o fígado humano também encerra este composto. A significação fisiológica do urotion é ainda desconhecida.

A urina das pessoas que tomam certos medicamentos como a aspirina, a codeína, e a quinina, mostra uma fluorescência azulada intensa que fornece uma prova em branco elevada (Borson) (16). Os doentes de anemia perniciosa eliminam também uma substância fluorescente que parece relacionar-se com a gravidade da doença.

Najjar e Wood notaram que a urina normal quando adsorvida pela permutita (zeolite sintética) e esta tratada pelo KCl e pela soda, apresenta um eluato com fluorescência azulada que pode ser medida no fluorômetro (17). Esta substância foi denominada de  $F_2$  e existe na urina de indivíduos normais, mas desaparece na urina dos doentes de pelagra. Em compensação, a urina dos pelagrosos contem outra substância fluorescente designada como  $F_1$  que se encontra no eluato de zeolite não alcalinizada. Na pelagra, quanto mais adiantado é o caso, tanto maior é a quantidade de  $F_1$  e menor a de  $F_2$ . O tratamento pelo ácido nicotínico faz com que desapareça  $F_1$  e aumente  $F_2$ . Nos indivíduos normais a quantidade de  $F_1$  é insignificante.

Para Najjar e Holt o aumento de  $F_1$  e o seu desaparecimento pelo emprego do ácido nicotínico indicam que deve haver alguma relação entre a substância fluorescente e o metabolismo do ácido nicotínico. Foi o que eles procuraram estudar em outro trabalho (18). O espectro da fluorescência na luz de Wood da substância  $F_2$  da urina assemelha-se ao do nuclotídeo de difosfopiridina. Parece que esta substância fluorescente tem como precursor o ácido nicotínico. Os indivíduos normais quando ingerem ácido nicotínico

ou nicotinamida eliminam logo nas 4 primeiras horas 8 a 10 vezes mais da substância fluorescente ( $F_2$ ). A medida desta fluorescência se faz comparando-a com a fluorescência de uma solução de sulfato de quinina contendo 10 a 25 microg. para 100cc de ácido sulfúrico 0.1 N. A fluorescência é expressa em unidades Najjar-Wood, sendo que 1 unidade equivale à fluorescência causada por 1 microg. de sulfato de quinina. A fração  $F_1$  pode também ser aumentada nos doentes de pelagra e no normal pela ministração de piridoxina (Singal e Seydenstricker) (19). Quanto às substâncias de fluorescência azulada da urina deve ser lembrada ainda o tiocromo que é o produto de oxidação da tiamina (vitamina  $B_1$ ). Um derivado da tiamina, contendo um grupo carbinol na cadeia lateral do núcleo tiazólico, também é eliminado pela urina e apresenta fluorescência esbranquiçada (Kofler e Sternbach) (20).

#### *Colheita da urina e conservação.*

A urina deve ser colhida em frasco escuro contendo 1 a 2 % de ácido acético glacial. As manipulações para a dosagem devem ser feitas na luz vermelha ou difusa. Procedemos sempre evitando a luz direta e sempre que possível colocamos a urina tratada em ambiente escuro (suportes fechados, filtrações em câmara escura, etc.). A riboflavina conserva-se bem na urina quando em meio ácido em temperatura fresca e abrigada completamente da luz. Em algumas determinações verificamos que em 3 dias a perda não ultrapassou de 22 % do valor inicial. Em 24 horas praticamente a conservação é perfeita.

#### *Técnica empregada.*

Para as urinas pouco pigmentadas ou para aquelas em que a eliminação da riboflavina é elevada (acima de 0,5 microg. por 1cc) aplica-se a técnica simples ou direta, sem adsorção. A urina no volume de 2,4cc é colocada em tubo de ensaio graduado e adicionada de 6cc de água destilada. Agita-se sem fazer espuma e deitam-se 2 a 3 gotas da solução de permanganato de potássio a 5 %. Deixa-se 1 a 2 minutos para completar a oxidação e clareia-se com 2 a 4 gotas de peróxido de hidrogênio a 3 %. Agita-se bem. nesta fase a solução fica incolor. As bolhas de gás devem ser eliminadas com um bastão fino de vidro. Completam-se 12cc com água destilada (1cc fica igual a 0,2cc de urina) e passa-se para a cuba do fluorofotômetro onde a fluorescência é medida.

Em outro tubo graduado colocam-se 2,4cc de urina e completam-se 12cc com água destilada. Deitam-se 1 a 2 cristais de hiposulfito de sódio. Mistura-se bem sem produzir bolhas, passa-se para a cuba do fluorofotômetro e mede-se a fluorescência. Esta constitui a prova em branco cujo valor se



subtrai do da medida anterior. Ao mesmo tempo prepara-se uma solução padrão diluída de riboflavina contendo 0,4 microg. para 1cc. Para isso toma-se 1,2cc (equivalente a 4,4 microg.) da solução concentrada de riboflavina contendo 50 mg para 1000cc de água que é conservada adicionando-se 2cc de acetona em vidro escuro e na geladeira e dilui-se para 12cc com água (1cc fica sendo igual a 0,4 microg.). Esta solução é colocada na cuba do aparelho e a fluorescência lida. Todas as 3 determinações são feitas no mesmo momento e rapidamente para evitar qualquer perda da fluorescência. O resultado da determinação da urina subtraído da prova em branco, expresso em unidades do galvanômetro, é dividido pelo valor encontrado para o padrão e multiplicado por 0,4 e por 500 para se obter a riboflavina em 100cc de urina.

Pela técnica indireta, que é indispensável para as urinas pobres e muito pigmentadas, a urina é tratada pelo sulfureto de chumbo ou pela terra de infusório em meio neutro. A adsorção pelo sulfureto de chumbo já foi descrita mais acima. No caso da floridina ou do supersorb faz-se passar a urina no volume de 2 a 10cc através de uma coluna de adsorvente com 1cm de diâmetro e 15cm de comprimento. A urina deve ser previamente acidulada com ácido acético até o pH de 5.0 e conservada em frasco escuro. A passagem da urina deve levar de 8 a 10 minutos. Lava-se o adsorvente com água 2 a 3 vezes e procede-se à eluição com 20cc de uma mistura de piridina a 20 % em água contendo 2 % de ácido acético. O eluato é oxidado pela solução de permanganato de potássio e descorado pelo peróxido de hidrogênio. Completa-se o volume para 25cc com água destilada. Passa-se para a cuba do fluorômetro e mede-se a fluorescência em comparação com a de uma solução padrão de riboflavina. Quando se usa a terra de infusório (Merck) a urina deve ser neutralizada.

#### *Fluorômetro e fluorofotômetro.*

Existem vários tipos de fluorômetros. Um dos primeiros construídos para as determinações quantitativas do tiocromo e da riboflavina foi o de Cohen (21). Compõe-se o aparelho de uma lâmpada de luz ultra-violeta (vapor de mercúrio) cuja radiação passa através de um filtro de óxido de níquel, indo atingir a cuba com o líquido a ser medido. A fluorescência produzida impressiona uma célula fotoelétrica de selênio depois de passar através de um filtro "euphos" que evita as radiações U.V. parasitas. A corrente da célula é medida num galvanômetro de espelho, bastante sensível. O fluorômetro de Cohen foi muito usado pelos pesquisadores holandeses (Cohen, Emmerie, Westenbrink).

Nós empregamos o fluorofotômetro da firma Pfalz e Bauer Inc. modelo A que se baseia no mesmo princípio do fluorômetro de Cohen, possuindo

porem maior sensibilidade. O esquema do aparelho, para maior esclarecimento, acha-se representado na Fig. 2. A lâmpada geradora dos raios U.V. é uma lâmpada de vapor de Hg de 85 wts. e de fabricação G.E. A luz é filtrada através de uma placa filtrante que só deixa passar o espectro U.V. (máximo de intensidade de 3700 Å) evitando qualquer radiação visível. Entre a cuba e a fotocélula lateral, sensível à luz fluorescente, se interpõe 2 filtro, um amarelo-alaranjado (Jena O G 1) e outro azul (Jena B G 12) que são especiais para a fluorescência da riboflavina e do tiocromo. O aparelho traz outra fotocélula para medir a intensidade da luz U.V. emitida pela lâmpada (luz transmitida) e que pode ser regulada por um diagrama e por um reostato. A medida faz-se num galvanômetro de espelho com grande sensibilidade (aproximadamente  $3 \times 10^{-9}$  amp. por mm.) e com a resistência de 600 ohms. As cubas são de vidro especial transparente à luz U.V. e de material não fluorescente.

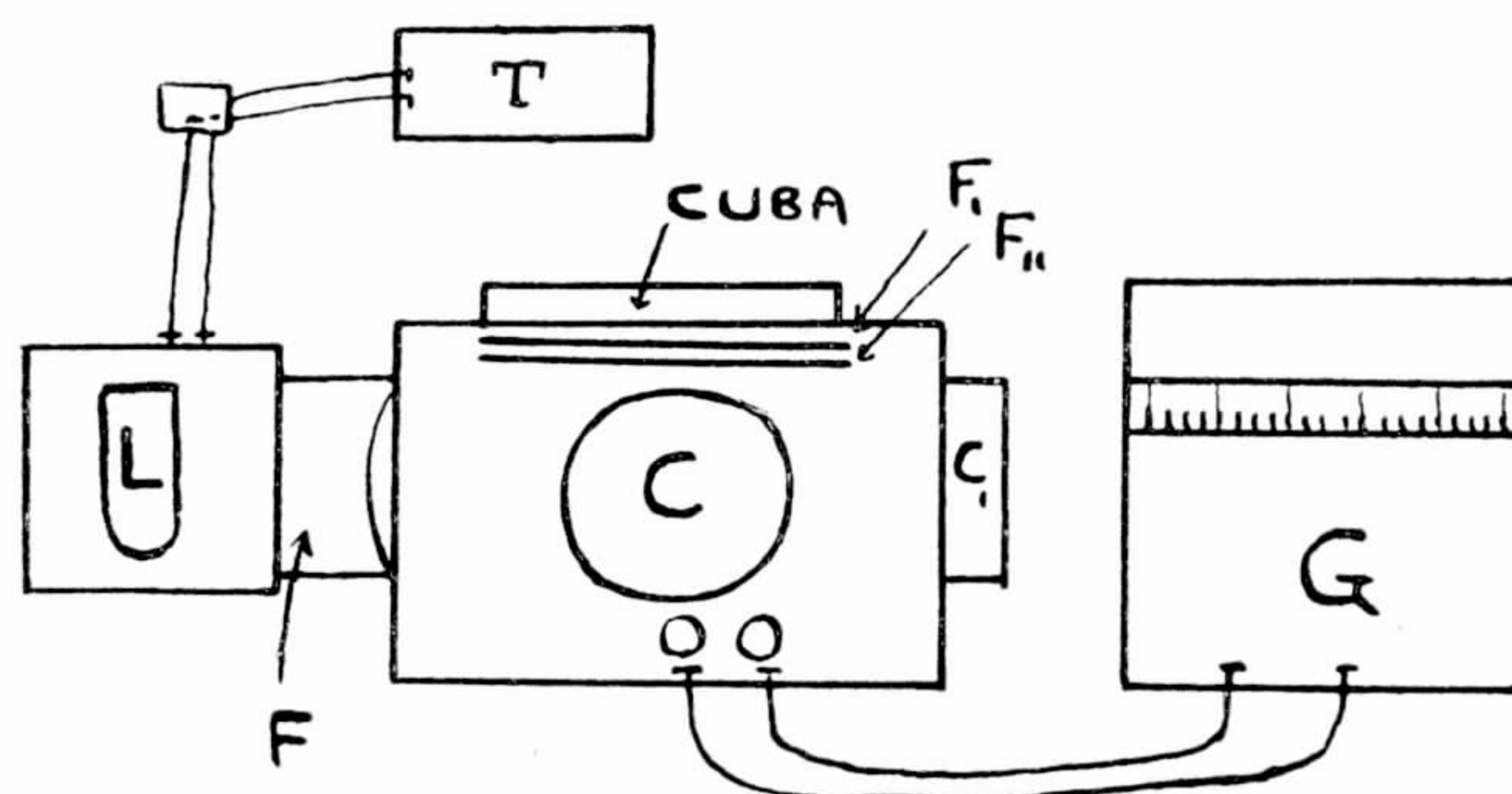


Fig. 2

Esquema do fluorofotômetro de Pfalz e Bauer

Na fig 2 tem-se C e C' que são as duas fotocélulas, F, F' e F'' os filtros, L a lâmpada, G o galvanômetro e T o transformador.

Desde que a fluorescência é diretamente proporcional à concentração da riboflavina, quando se mede na mesma intensidade da luz ultra-violeta, pode-se aferir o fluorômetro fazendo-se determinações da fluorescência em várias intensidades e com soluções de concentrações crescentes. Como é difícil conseguir-se em dias diferentes, uma intensidade perfeitamente igual, achamos mais conveniente fazer a determinação da fluorescência do padrão na mesma ocasião em que se procede à determinação na urina. Entretanto, reproduzimos na Fig. 3 um gráfico onde se encontram os valores lidos no galvanômetro em função de várias concentrações de riboflavina e numa mesma intensidade. Na Fig. 4 veem-se as variações obtidas quando se modificam as intensidades da luz transmitida.

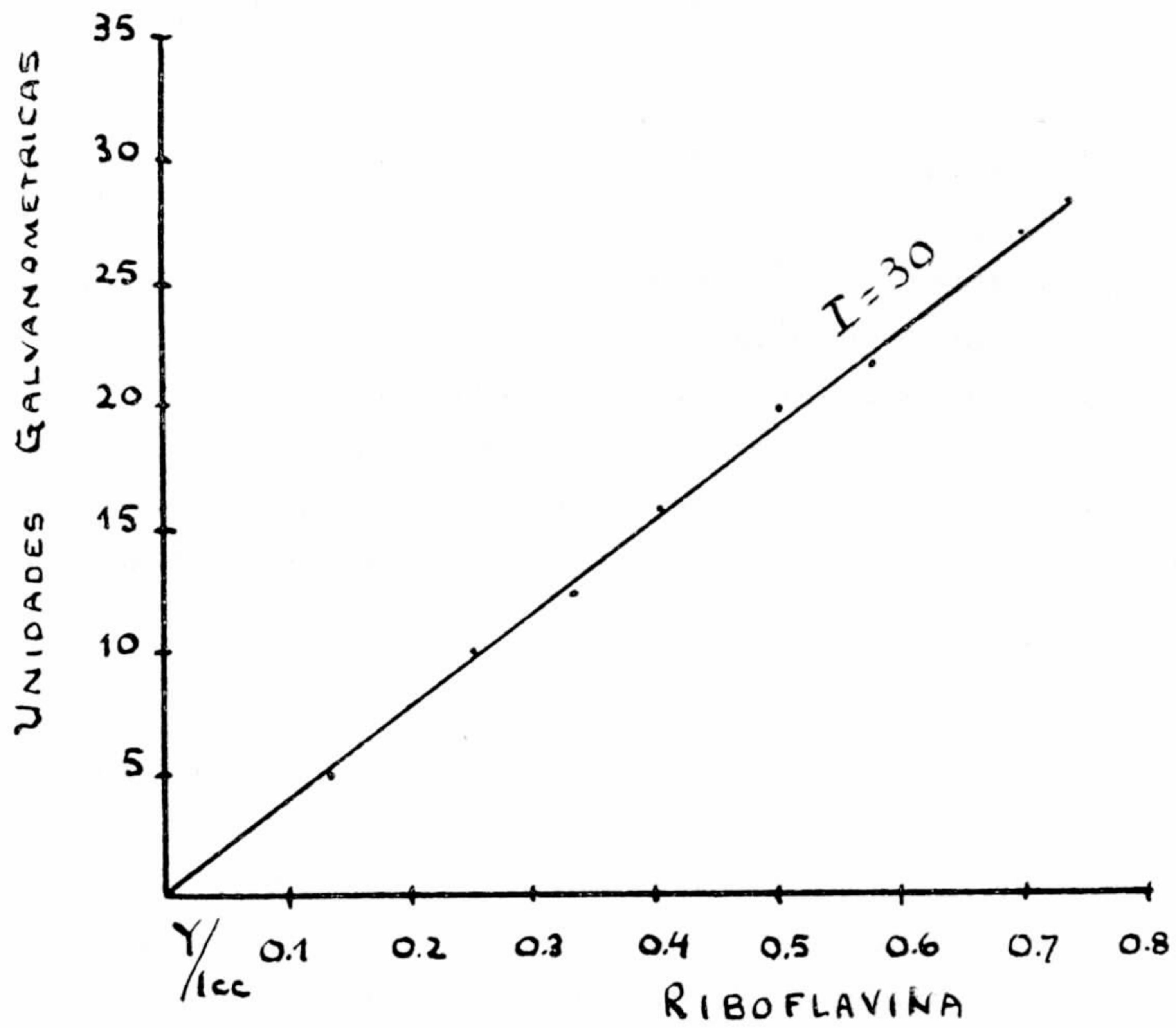


Fig. 3

Relação entre os valores lidos no galvanômetro e a concentração de riboflavina

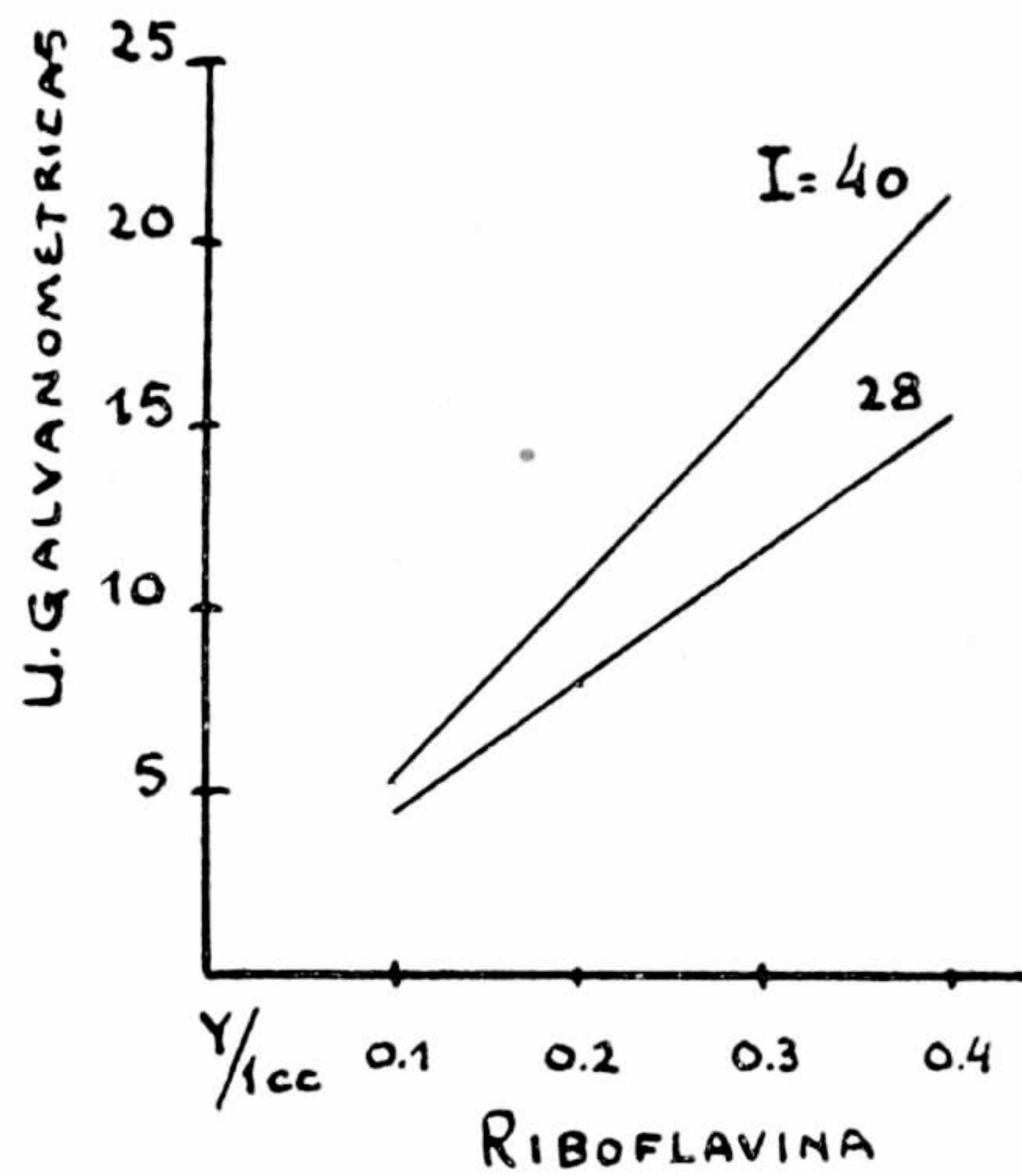


Fig. 4

Variações das leituras no galvanômetro em função da intensidade da luz transmitida

Para maior uniformidade nos resultados, procuramos trabalhar sempre com uma intensidade pouco variavel (diafragma em 30 e reostato em 1,2) que para o padrão de 4 microg. de riboflavina no volume de 12cc (0,4 microg/1cc) dá em geral o desvio no galvanômetro de 16-18, na intensidade de 30-32. Cada vez torna-se necessário acertar a intensidade por meio de pequenos movimentos do diafragma. Fazendo-se a determinação no momento com a urina e com o padrão a regulagem fica muito simplificada. Observamos que nos circuitos muito carregados, como nos laboratórios em que existem vários aparelhos elétricos em funcionamento, a corrente apresenta quedas periódicas que se observam no galvanômetro. Para isso devem-se fazer duas leituras, uma no máximo e outra no mínimo, para todos os casos, porque representam duas intensidades diferentes.

#### *Substâncias que interferem.*

Alem das substâncias fluorescentes já mencionadas existem outras ainda mal conhecidas e que possuem um espectro de fluorescência semelhante ao da riboflavina. Mas como estas substâncias existem em quantidade muito diminuta pode-se considerá-las como não significativas. A concentração dos sais também fornece material fluorescente que mesmo na urina diluída pode falsear os resultados. Nesse caso a técnica de adsorção é a única recomendavel.

A reação da urina é outro ponto a ser considerado. Como a fluorescência da riboflavina varia com o pH, é necessário que este não seja muito variavel. Achamos que o pH de 5.0 a 6.0 é o mais conveniente.

#### *Adsorventes.*

Antes de se processar na adsorção da urina pelo método indireto deve-se verificar o poder de adsorção do adsorvente a ser empregado. É interessante notar que nem sempre o melhor adsorvente se presta para o caso porque retem também outras substâncias pigmentares indesejaveis e a eluição é incompleta. Abaixo damos o resultado por nós encontrado com vários adsorventes e expressos em unidades galvanométricas.

<i>Adsorvente</i>	<i>Riboflavina em microg.</i>	<i>pH</i>	<i>unidades galvanométricas</i>
terra de infusório (Merck) . . . . .	4	3	9
terra de infusório (Merck) . . . . .	4	7	1
carvão animal (Merck) p. a. . . . .	4	3	1
carvão animal (Merck) p. a. . . . .	4	7	6
supercel . . . . .	4	7	15
testemunhas . . . . .	4	7	18

Como se pode deduzir dos resultados acima, tanto o carvão como a terra de infusório adsorvem bem quando em pH apropriado. Para o caso da urina

o carvão não se presta visto reter todos os pigmentos e ser de eluição difícil. A floridina ou o supersorb são preferíveis, conforme mostrou Ferrebee (11).

Para todos os casos é indispensável fazer-se uma prova em branco com o adsorvente porque este pode conter substâncias dotadas de fluorescência.

#### *Recuperação da riboflavina.*

Quando se adiciona uma certa quantidade da solução padrão de riboflavina à urina, os valores lidos no galvanômetro não são equivalentes à soma das fluorescências da urina e do padrão adicionado. Há sempre um erro que pode atingir de 20 a 50 %. A recuperação é melhorada quando se adicionam quantidades variáveis do padrão à mesma urina em natureza, isto é, sem destruir outros pigmentos pela oxidação com o permanganato de potássio. A oxidação aumenta sempre os valores da fluorescência. Quando se adiciona o padrão à urina tratada pela técnica de Emmerie ou de Najjar as recuperações são mais satisfatórias, bem que não sejam perfeitas. Devemos lembrar aqui o fato mencionado por Spies, Bean e Ashe (20) de que a fluorescência da flavina urinária difere da que se produz com a riboflavina sintética em concentração equivalente. A cor da fluorescência da riboflavina sintética é amarelo-esverdeada e a da uroflavina é azulada. Quando se injeta riboflavina na veia a substância eliminada (flavina) também apresenta uma fluorescência amarelo-esverdeada. Nos dias seguintes a fluorescência volta a ser azulada. Parece, portanto, que a uroflavina não é completamente idêntica à riboflavina, mas deve ser substância quimicamente muito próxima e resultante do metabolismo da flavina.

Pela irradiação com lâmpada ultra-violeta (Hanau de vapor de Hg) durante 20 minutos, da urina diluída e da urina adicionada de riboflavina, depois de alcalinizada e posteriormente extraídas com clorofórmio, obtivemos os resultados abaixo. A fluorescência é analisada na camada aquosa, depois da extração clorofórmica.

#### Recuperação da riboflavina (valores em unidades do galvanômetro)

	<i>Antes da irradiação</i>	<i>Depois</i>
Urina (2,4cc.) diluída para 12cc. com água . . . . .	21	3
Urina (2,4cc.) adicionada de 4 microg. de riboflavina e diluída para 12cc. com água . . . . .	33	20
Riboflavina (4 microg.) em 12cc. de água . . . . .	26	5

A urina adicionada de riboflavina deu um valor exatamente igual a soma dos dois outros valores, o que prova ter sido boa a recuperação.

#### *Prova de carga e eliminação normal.*

A eliminação da uroflavina (riboflavina) é proporcional à quantidade existente na alimentação. Nos indivíduos em deficiência da vitamina B<sub>2</sub>

a urina é muito pobre em flavina. A injeção ou ingestão de riboflavina nos indivíduos normais mostra a retenção de 30 a 70 % da dose. Na primeira meia hora, segundo Najjar e Holt, a eliminação já é completa em pessoas normais com a dose de 1mg. dada na veia. Em dois casos normais verificamos que a maior eliminação se faz depois de 2 a 5 horas, quando a riboflavina é injetada por via intramuscular na dose de 1mg. (Lactoflavina Bayer)

### PROVA DE CARGA

<i>Caso I</i>	<i>microg./1cc</i>	<i>microg./100cc</i>	<i>Volume de urina em cc.</i>	<i>Total em microg.</i>
antes . . . . .	0,62	62	730	446
depois de 2 hs.	1,24	124	110	136
depois de 5 hs.	1,7	170	420	697
<i>Caso II</i>				
antes . . . . .	1,0	100	160	160
depois de 2 hs.	1,8	180	420	756
depois de 5 hs.	0,8	80	450	360

Os valores normais são bastante variáveis quando a alimentação não é uniforme. Em 12 casos normais por nós dosados encontramos os valores variando de 12 a 145 microg. para 100cc. Em 4 casos a eliminação diária variou de 76 a 1300 microg. Em um caso normal seguido durante 25 dias, as variações foram de pequena monta. Neste caso os afastamentos não ultrapassaram 12 microg. para 100cc.

### ABSTRACT

Urinary determinations of riboflavine were done with the methods of Emmerie, Ferrebee and Najjar. Recovery experiments gave better results with the method of Ferrebee and the modification of Najjar. Some details are presented and calibration curves are constructed for the use of the Pulfrich fotometer and the Pfalz and Bauer fluorphotometer. In two normal cases it was observed that the excretion of riboflavine is great after 2 to 5hs of the injection of 1mg. of synthetic riboflavine. Normal cases excreted in an adequate diet 12 to 145 microg. of riboflavine per 100cc. of urine and 76 to 1300 microg. per day.

### BIBLIOGRAFIA

- 1) COUNCIL ON PHARMACY AND CHEMISTRY — Rept. A. Med. Ass. 1938, p. 167.
- 2) KUHN (R) e MORUZZI (G) — Ber. Deut. Chem. Ges. 67. (5), 888, 1934.
- 3) HEILMEYER (L) e OTTO (W) — Zeit. ges. exp. Med. 74, 490, 1930.
- 4) KOSCHARA (W) — Ber. Deut. Chem. Ges. 67, 761, 1934.
- 5) KOSCHARA (W) — Zeit. physiol. Chem. 232, 101, 1935.
- 6) EMMERIE (A) — Acta Brev. Neerl. 6, 1, 1936.

- 7) EMMERIE (A) — *Acta Brev. Neerl.* 7, 1, 1937
  - 8) NAJJAR (V.A.) e HOLT (E.Jor.) — *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 69, 476, 1941.
  - 9) AXELROD (A.E), SPIES (T) e ELVEHJEM (C.A) — *Jour. Clin. Invest.* 20, 229, 1941.
  - 10) SNELL (E.E) e STRONG (F.M) — *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 11, 346, 1939.
  - 11) EMMERIE (A) — *Acta Brev. Neerl.* 6, 1, 1936.
  - 12) FERREBEE (J.W) — *Jour. Clin. Invest.* 19, 251, 1940.
  - 13) NAJJAR (V.A) — *Jour. Biol. Chem.* 141, 355, 1941.
  - 14) YONEYAMA (Y) — *Zeit. ges. exp. Med.* 76, 680, 1931.
  - 15) KOSCHARA (W) — *Zeit. physiol. Chem.* 263, 78, 1940.
  - 16) BORSON (H.J) — *Ann. Int. Med.* 14, 1, 1940.
  - 17) NAJJAR (V.A) e WOOD (R.W) — *Science*, 93, 20, 1941.
  - 18) NAJJAR (V.A) e WOOD (R.W) — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 44, 386, 1940.
  - 19) SINGAL (S.A) e SEYDENSTRICKER (V.P), — *Science*, 94, 545, 1942.
  - 20) KOFLER (M) e STERNBACH (L) — *Helv. Chim. Acta*, 24, 1014, 1941.
  - 21) COHEN (F.H.) — *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 54, 133, 1935.
-