

DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA DE COPROPORFIRINA URINÁRIA *

BENJAMIM ALVES RIBEIRO **

HERBERT M. A. STETTINER ***

As porfirinas são pigmentos largamente encontrados na natureza, em cuja estrutura química fundamental se encontra o anel da porfina, constante de quatro núcleos pirrólicos ligados entre si por quatro grupos metenílicos. Conforme os radicais que substituem os oito hidrogênios dos núcleos pirrólicos, têm-se as várias porfirinas.

Na coproporfirina, as substituições se fazem com grupos metílicos e carboxietílicos, donde a possibilidade de quatro isômeros, embora na natureza só ocorram os de tipo I e III. A despeito do que se supunha, quando essa porfirina foi assim denominada por Hans Fischer (no grego, kópros = excremento), a coproporfirina ocorre normalmente não só nas fezes como na urina, tal qual sucede também com outra porfirina conhecida como uroporfirina. Nos casos de absorção ou intoxicação plúmbica, observa-se um aumento da coproporfirina urinária, que corre por conta do isômero de tipo III (1,3,5,8-tetrametil-2,4,6,7-tetracarboxietil-porfina).

Embora conhecida há longo tempo, a elevação da coproporfirinúria no saturnismo tornou-se objeto de renovado e grande interêsse a partir de 1948, quando de Langen e ten Berg⁷ chamaram a atenção para a precocidade de sua ocorrência que, de regra, precedia a do aumento da basofilia sangüínea, até então considerado como um dos primeiros sinais do plumbismo; e, simultaneamente, descreveram um método simples de determinação semiquantitativa da coproporfirina urinária. Interêsse mais do que justificado, pois, em que pese o fato de o acréscimo de coproporfirinúria não ser patognômico do saturnismo, o que aliás também acontece com a basofilia sangüínea, não se poderia subestimar o valor de uma prova de fácil e rápida execução, fadada a substituir, até certo ponto, os métodos laboriosos e demorados de determinação do chumbo na urina ou sangue, e a revelar precocemente a ocorrência da absorção excessiva de chumbo, muito antes de surgir o quadro manifesto da intoxicação. Ademais, como significado de dano orgânico, a elevação da coproporfirinúria é mais expressiva do que a do chumbo na

Entregue para publicação em 14-1-1959.

* Trabalho realizado na Cadeira de Higiene do Trabalho da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

** Professor Catedrático da Cadeira de Higiene do Trabalho.

*** Assistente da Cadeira de Higiene do Trabalho.

urina ou no sangue, já que esta, a rigor, indica apenas o nível em que se processam a absorção, transporte e eliminação do metal.

Segundo a marcha da prova semi-quantitativa, descrita por de Langen e ten Berg, 20 ml de urina, num tubo de ensaio, são acidificados por algumas gotas de ácido acético glacial e, a seguir, adicionados de 2 ml de éter etílico. Após agitação, o tubo é exposto à radiação ultravioleta, o que provoca a fluorescência da camada etérea, de grau variável conforme a quantidade de coproporfirina presente.

Uma revisão da literatura disponível mostrou-nos que várias modificações dessa marcha, nem sempre concordantes, foram posteriormente propostas e justificadas por seus autores, tôdas visando, evidentemente, imprimir à prova maior sensibilidade e precisão. Pareceu-nos pois interessante, senão indispensável, proceder a um estudo comparativo do significado dessas modificações, visando à fixação da melhor técnica de determinação semi-quantitativa de coproporfirina urinária, não só para uso do nosso laboratório, como para responder às consultas que sôbre o assunto nos são formuladas e, sobretudo, para oferecer aos pequenos laboratórios, anexos a serviços de medicina industrial, um roteiro simples e seguro com que, mediante freqüentes análises, possam acompanhar o grau de absorção de chumbo em trabalhadores expostos e, assim, prevenir males maiores.

O Quadro I mostra, em resumo, que as principais modificações do método original dizem respeito às quantidades absolutas e relativas de urina, ácido acético e éter, ao emprêgo adicional de peróxido de hidrogênio, à maneira de agitação do tubo, e à observância de um período de repouso antes da leitura da fluorescência. O estudo destas particularidades técnicas, bem como das condições de conservação da amostra de urina, constituem o objeto do presente trabalho, cujos resultados serão adiante referidos.

MÉTODO DE TRABALHO

Não dispondo, ao iniciar-se o estudo, de equipamento para determinação quantitativa de coproporfirina nem de quantidade apreciável dessa substância, decidimos seguir uma marcha empírica que consistiu em registrar os efeitos das variações dos fatores acima mencionados, isolada ou combinadamente, sôbre os resultados da determinação procedida segundo uma técnica conhecida, tomada como base. Para efeito dessa referência básica, e após ensaios preliminares, escolhemos o método da Divisão de Higiene Ocupacional, do Departamento de Trabalho e Indústria do Estado de Massachusetts, Estados Unidos².

Consiste o método de Massachusetts em juntar a 5 ml de urina, num tubo de ensaio, 6 gotas de ácido acético 6N e 5 ml de éter dietílico. O tubo, depois de fechado com rôlha de cortiça e brandamente agitado, é deixado em repouso por 30 minutos, sendo ocasionalmente reagitado durante êsse período de espera. Transporta-se então o tubo para uma câmara

QUADRO I — Modificações da prova semiquantitativa de coproporfirina urinária

Autor	Urina ml	Ácido acético	Peroxido de hidrogênio (3%), gotas	Éter ml	Agitação	Período de repouso, minutos
de Langen & ten Berg ⁷	20	Glacial, gotas	—	2	“Shake to and fro some times”	—
Meek, Mooney & Harrold ¹¹	20	Glacial, 2 ml	2	2	“Shake briefly”	—
Waldman & Seideman ¹³	10	Glacial, 2 gotas	2	1,5	“Shake on its long axis”	—
Malooof ⁸	5	6N, 6 gotas	—	5	“Shaken”	—
Johnson & Whitman ⁶	5	Glacial, 6 gotas	—	5	“Shaken vigorously”	—
Jour. Amer. Med. Ass. ⁵	10	Glacial, 2 gotas	2	1,5	“Actively shaken”	—
McCord ¹⁰	10	Glacial, 2 gotas	2	2	“Shaken on its long axis about 20 times”	10-15
Brooks ¹	5	Glacial, 1 ml	3	5	“Inverted a few times”	10 pelo menos
Harrold, Meek & Padden ³	20	Glacial, 0,5 ml	2	$\left\{ \begin{array}{l} 2 \text{---} \rightarrow \\ + \\ 2 \text{---} \rightarrow \end{array} \right.$	“Shake briefly” “Shake very vigorously”	—
Mass. Dept. Labor ⁹	5	6N, 6 gotas	—	5	“Shake gently in horizontal axis”	30, “shaking occasionally”
U. S. Navy ²	5	Glacial, 6 gotas	3	5	“Shake 30 seconds”	—
Wyllie ¹⁴	2,5	6N, 3-5 gotas (pH 6)	—	2 (acetato de etila)	“Inclined on its long axis 10 times (violent shaking is unnecessary)”	2-3

escura e expõe-se à radiação de uma lâmpada de "luz negra". Nos casos normais, a camada de éter fluorescerá com uma côr azul ou verde azulada, e será lida como de grau 0. Quando há aumento da coproporfirina, e conforme a quantidade desta, a fluorescência variará do róseo leve ao vermelho e será lida como de grau 1, 2, 3 ou 4.

A distinção dos graus de fluorescência não apresenta dificuldade maior para quem está familiarizado com a prova. Todavia, para maior garantia de nossas observações, que eram estritamente comparativas, preparamos 5 padrões contendo quantidades conhecidas e predeterminadas, não de coproporfirina, de que não dispúnhamos, mas de hematoporfirina, que nos davam uma escala satisfatória de graus de fluorescência. Esses padrões, de preparação freqüentemente renovada e conservados ao abrigo da luz, se obtinham pela adição de 0, 30, 100, 200 e 400 microgramas de hematoporfirina a 100 ml de urina reconhecidamente normal. Porções de 5 ml de cada um deles, numeradas de 0 a 4 e tratadas pelo método básico, eram utilizadas em todos os ensaios, para fins comparativos do grau de fluorescência. Quando a fluorescência da amostra em estudo não coincidia com a de um padrão, atribuíamos-lhe o grau do padrão mais próximo, afetado, segundo o caso, do sinal + ou —.

RESULTADOS E COMENTÁRIOS

Volume da urina — A quantidade de urina, sôbre que recai a determinação semiquantitativa, varia conforme o autor (Quadro I) de 2,5 a 20 ml. Nossos ensaios preliminares nos convenceram de que o volume de 5 ml, aliás empregado pela maioria dos autores, deve ser adotado, pois representa o melhor compromisso entre a economia de material, dum lado, e segurança de obtermos, doutro lado, quantidade de coproporfirina suficiente para a extração e satisfatória distinção dos vários graus de fluorescência.

Acidificação — Levando em conta a concentração do ácido empregado e admitindo que a uma gôta dêle corresponda o volume de 0,05 ml, é fácil deduzir, do Quadro I, que a proporção de ácido acético puro varia, relativamente ao volume de urina, de aproximadamente 2 a 20%. Com exceção de Wyllie¹⁴ que, trabalhando com acetato de etila ao invés de éter etílico, menciona a vantagem de operar com um pH 6, medido com papel indicador, nenhum outro autor se refere a um grau preciso de acidificação.

Em conseqüência às observações que fizemos, numa primeira série exploratória de 14 urinas, empregando concentrações e quantidades várias de ácido acético, nossa escolha recaiu, para prosseguimento do estudo, no ácido de título 6N.

Tomamos então, como série definitiva, 21 urinas, acidificando cada exemplar com quantidades de ácido acético 6N variáveis de 1 a 12 gôtas. A idade destas urinas (tempo decorrido após a emissão), ao iniciar-se a determinação, variava de 1 a 8 horas, com a média de 4.5. Esta segunda

série nos mostrou que, dum modo geral, a fluorescência cresce com a acidificação, atingindo o máximo quando a urina (5 ml) é tratada com 4 gôtas da solução ácida, e não se altera sensivelmente pela adição de maior número de gôtas. A esta regra escapam alguns exemplares, correspondentes a urinas de maior acidez natural ou muito ricas em coproporfirina, em que o máximo de fluorescência já se verifica com a adição de 3, 2 ou mesmo 1 gota do ácido 6N. De acôrdo com estas observações, portanto, e adotado o volume de 5 ml de urina para a prova semiquantitativa de rotina, a acidificação deve fazer-se com quatro gôtas no mínimo de ácido acético 6N.

Em 10 destas 21 urinas, o pH natural, medido com papel indicador especial Merck ao iniciar-se a determinação, situou-se entre 5,4 e 7,0 com a média de 6,1. Pela adição das 4 gôtas do ácido 6N, êstes valores baixaram para 4,0-4,4 e 4,1, respetivamente. Estas últimas verificações não confirmam a observação de Wyllie¹¹ relativa a um pH ótimo de 6, ressalvado o fato de êste autor empregar acetato de etila, ao invés de éter etílico, como agente de extração.

Éter — A quantidade de éter etílico, empregado como agente de extração, varia, conforme o autor (Quadro I), de 1,5 a 5 ml e, relativamente ao volume de urina, de 10 a 100%. Trabalhando com 5 ml de urina, preferimos empregar 5 ml de éter (100%), proporção também adotada pela maioria dos autores.

Em nossa experiência, não há necessidade de recorrer a éter etílico puro, isento de peróxidos. Em porções duplas de 23 urinas, extraídas umas com éter quimicamente puro e outras com éter de tipo comercial (reação positiva ao iodeto de potássio) *, o grau de fluorescência foi rigorosamente idêntico em cada par de 18 urinas (78,3%); houve levíssima discrepância, que esteve longe de atingir um grau inteiro de fluorescência nos 5 pares restantes, a favor do éter puro em 3 (13,0%) e do éter comercial em 2 (8,7%).

Não vemos vantagem no emprêgo do acetato de etila, preconizado por Wyllie¹⁴, ao invés do éter etílico, na prova semiquantitativa. A intensidade e sobretudo os matizes de fluorescência são menos marcados com aquêle do que com êste. E o pequeno inconveniente de leve fluorescência verde azulada própria, imputado ao éter comercial, não lhe é absolutamente exclusivo, porque também presente no tipo comercial de acetato de etila.

Peróxido de hidrogênio — Em 1948, Meck e cols.¹¹ aconselharam a adunção de algumas gôtas de H₂O₂ a 3%, o que, em sua opinião, acentuava a côr da fluorescência. Argumentando que os agentes oxidantes aceleram a transformação, que se efetua pela exposição à luz, de porfirinogênio em porfirina, a sugestão foi adotada, dois anos após, por Waldman e Seideman¹³ e, a seguir, por outros autores. Wyllie¹⁴, entretanto, não

* Éter etílico de fabricação Rhodia.

faz uso do peróxido de hidrogênio, achando que seu emprêgo é “raramente necessário”.

Em determinações duplas de 29 urinas de várias idades (tempo decorrido após a emissão), com e sem o emprêgo de 3 a 6 gôtas de H_2O_2 a 3%, o grau de fluorescência das urinas tratadas com peróxido foi, comparativamente ao das não tratadas, idêntico em 17 casos (58,6%), ligeiramente superior em 8 (27,6%) e ligeiramente inferior em 4 (13,8%). Aqui, como no caso do estudo comparativo do éter puro e éter comercial, a discrepância nas últimas 12 urinas esteve muito aquém de um grau inteiro de fluorescência.

Nossa opinião, pois, no particular, confirma a de Wyllie, de que a adjução de H_2O_2 é dispensável na prova semiquantitativa.

Agitação — A técnica de agitação do tubo de ensaio, após a adição de éter etílico, importa não só para a mais completa extração de coproporfirina como para a obtenção de uma camada sobrenadante de éter livre de emulsões. É curioso notar, entretanto, pelos resumos constantes do Quadro I, que essa técnica varia de autor para autor.

Com o objetivo de esclarecer o assunto, procedemos à determinação de coproporfirina em 12 urinas, submetendo cada uma delas a diversas modalidades de agitação, quer quanto à posição do tubo, quer quanto à direção, duração e ritmo de agitação. Desta série de ensaios chegamos à conclusão de que o melhor método de agitação consiste em manter o tubo de ensaio verticalmente, segurando-o pela extremidade superior, e imprimindo-lhe um movimento aproximadamente pendular de cêrca de 7 centímetros de amplitude, mediante curtos e alternados movimentos de supinação e pronação da mão que segura o tubo. Uma vez juntado o éter, o tubo de ensaio é, por essa forma, agitado 40 vêzes em aproximadamente 5 segundos, isto é, executa cêrca de 8 oscilações pendulares completas por segundo.

Verificamos mais que é vantajoso repetir a agitação durante o período de repouso que precede a observação da fluorescência à luz ultravioleta. Numa segunda série de 11 urinas, cada uma delas reagitada ou não subsequêntemente, observamos que os melhores resultados se obtinham nas urinas que, além da agitação inicial de 40 vêzes, eram reagitadas por 20 vêzes ao 10.º e 20.º minuto do período de repouso. Dos procedimentos técnicos referidos no Quadro I, apenas a Divisão de Higiene Ocupacional de Massachusetts aconselha a reagitação do tubo durante o período de repouso.

Repouso — Dos autores constantes do Quadro I, apenas quatro recomendam um período de repouso, variável de 2 a 30 minutos, entre a agitação do tubo, que se segue à adição de éter, e a leitura da fluorescência. Os demais são omissos a respeito, parecendo que procedem à leitura imediatamente após a agitação, isto é, sem repouso intermediário.

Em nossos ensaios, com uma série de 25 urinas, cada uma delas submetida a períodos de repouso de duração vária entre 0 e 60 minutos, verificamos, sem discrepância, que o máximo de fluorescência se obtém após 30 minutos de repouso. Em 50% das urinas, a diferença de fluorescência, entre a leitura sem repouso e com repouso de 30 minutos, atinge a um grau inteiro. Doutra lado, o prolongamento do repouso, além de 30 minutos, sôbre desnecessário, é por vêzes contraproducente, ou seja, pode resultar num decréscimo, embora diminuto, da fluorescência.

Outro pormenor importante a referir, durante o período de repouso, é o relativo à exposição à luz. Numa série de 8 urinas, submetidas a determinações duplas, em que, durante os 30 minutos de repouso, metade dos pares ficou exposta à luz difusa do dia e metade foi mantida em completa obscuridade, a fluorescência foi sempre mais acentuada nos tubos expostos à luz, e por excesso mínimo de um grau inteiro em 5 pares (63%).

Segundo a observação de Holecek e Penickova¹, o precursor da coproporfirina, quando dissolvido em éter ou acetato de etila, transforma-se rapidamente em coproporfirina sob a ação da luz. O efeito favorável observado, da exposição luminosa durante o período de repouso, pode ser, pois, interpretado como decorrente dessa transformação. E possivelmente aqui se encontre também a explicação da desnecessidade, atrás referida, da adjunção de peróxido de hidrogênio, já que, em nossos ensaios, observamos sempre um longo período de repouso (30 minutos), com exposição dos tubos à luz difusa do dia; ao passo que os autores que empregam o peróxido, além de não serem explícitos quanto à exposição luminosa dos tubos, após a adição dos reagentes, parecem não observar, em sua maioria, um período de repouso antes da leitura da fluorescência (v. Quadro I). Estas hipóteses mereceriam uma verificação em têrmos quantitativos que, infelizmente, ultrapassa os limites traçados para o presente trabalho.

Em suma, de acôrdo com nossas observações, é necessário manter as preparações em repouso, à luz difusa do dia e durante 30 minutos, antes de proceder à leitura da fluorescência.

Radiação ultravioleta — A fonte de radiação ultravioleta correntemente empregada é o arco de vapor mercurial provido de filtro de Wood. Na observação da fluorescência, Johnson e Whitman⁶ e Wyllie¹⁴ encarecem a importância do comprimento de onda de 366 milimícrons. Já Harrold e cols.³, empregando fontes cuja emissão máxima se concentrava na faixa de 350 a 410 milimícrons, consideram como ideal e quase ideal, respectivamente, os comprimentos de 401 e 357 milimícrons. Em seu método "aperfeiçoado" de determinação quantitativa de coproporfirina, Schwartz e cols.¹² preferem o comprimento de 405 milimícrons.

Não dispúnhamos de equipamento que nos permitisse investigar as variações da fluorescência em função do comprimento de onda. Baste-nos

dizer que, experimentando uma lâmpada original Hanau e uma lâmpada de "luz negra" Philips que, segundo os fabricantes, apresentavam emissão máxima a 366 e 366,5 milimícrons, respetivamente, demos preferência à segunda, com a qual se conseguem intensidades maiores e matizes mais distintos de fluorescência. Nos ensaios que estamos descrevendo foi sistematicamente empregada a lâmpada de "luz negra" Philips.

Por motivos de economia e simplicidade de operação, cremos que uma lâmpada de "luz negra" seja a fonte indicada para pequenos laboratórios. *

A observação da fluorescência deve fazer-se em câmara escura. Aos pequenos laboratórios, que não dispuserem de tal câmara, sugerimos a construção de uma caixa para êsse fim, cuja forma e dimensões podem corresponder às da que mandamos construir para o nosso laboratório. Essa caixa tem-nos prestado excelente serviço e foi também empregada em todos os ensaios do presente estudo. Dela damos a seguir sucinta descrição.

Construída tôda de cedro compensado, a caixa, em seu contôrno fundamental, tem a forma de um paralelepípedo, de 25×30 cm de base e 32,5 cm de altura. A cobertura é de duas águas que não se unem no tôpo; antes, se imbricam intimamente, guardando todavia entre si 0,5 cm de distância, o que não só cria uma fenda de ventilação ao longo de tôda a cumieira como reduz ao mínimo a penetração de luz no interior.

Para facilitar a colocação ou remoção da lâmpada bem como a inspeção eventual do interior da caixa, foi esta construída em duas secções, no sentido da altura, de simples e fácil encaixe uma na outra. Dos 32,5 cm de altura total das arestas verticais, 20 correspondem à secção inferior e 12,5 à superior. Cada uma das duas faces menores e opostas, da secção inferior, é provida de uma abertura retangular, de 16×18 cm, permanentemente fechada por um pano prêto que, à guisa de cortina, é fixado externamente, junto ao bordo superior da abertura. Estas aberturas destinam-se à introdução das mãos do observador e dos tubos de ensaio. Uma terceira abertura retangular, de 8×11 cm, se situa na parte central e mais elevada de uma das faces maiores dessa mesma secção inferior. Esta última abertura é recoberta por um saliente de forma aproximadamente prismática, todo de madeira, exceto numa de suas faces que é envidraçada para permitir a observação dos tubos. Através de pequeno orifício situado numa das faces menores da secção superior, o cordão de ligação, procedente do transformador, penetra na caixa e termina logo num soquete, fixado na superfície interna e destinado a receber a lâmpada.

* Aos interessados, acrescentaremos que a lâmpada Philips com que trabalhamos, adquirida no mercado, é do modelo HPW-125W, n.º 57.202-E/70, e seu emprêgo requer o concurso de um transformador, catalogado pelo fabricante sob n.ºs 59.203-BT/00 (110 volts) e 58.205-AH/03 (220 volts).

A superfície interna de toda a caixa é pintada de preto, com exceção das vertentes da cobertura que, para maior rendimento da radiação, é revestida de folha de alumínio.*

A figura anexa, além de objetivar esta descrição, oferece outros pormenores aos interessados.

Conservação da urina — As determinações de coproporfirina podem recair sobre urinas de uma única micção ou, melhor e quando possível, sobre urinas de 24 horas. Segundo o consenso geral as determinações devem efetuar-se tão logo quanto possível após a obtenção da amostra. Quando não, conservar as amostras em lugar fresco, de preferência em geladeira, desaconselhando-se o emprego de conservadores químicos.

Quando, em 1951, o grupo de Minnesota¹² publicou seu método, denominado “aperfeiçoado”, de determinação quantitativa de coproporfirina urinária, foi salientada a importância de conservar as urinas a um pH predominantemente alcalino (6,5 a 9,5), mediante adição de carbonato de sódio, sem o que se corria o risco de perder, em média, 39% de coproporfirina, por destruição da maior parte do seu precursor em meio ácido. Segundo estes investigadores, ao ser a urina emitida, cerca de metade da coproporfirina III se encontra sob a forma de precursor, que nela se converte dentro de 24 horas, a um pH de 6,5 a 9,5. A radiação luminosa não afetaria essa conversão, podendo conservar-se as urinas em frasco de vidro claro.

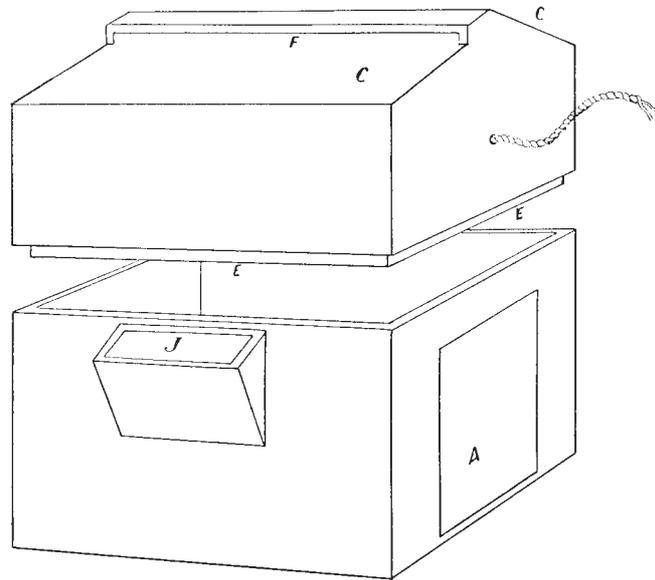
Em recente e interessante trabalho sobre a excreção urinária de coproporfirina no saturnismo, Holecek e Penickova⁴ chegam, entre outras, às seguintes conclusões: 1) a coproporfirina total, ao ser a urina emitida, em casos de saturnismo, é constituída de 1 a 12% de coproporfirina preformada e 88 a 99% de precursor; 2) no saturnismo, o aumento de coproporfirina urinária total corre por conta do aumento da excreção do precursor e não da coproporfirina preformada; 3) após a micção, o precursor é rapidamente transformado em coproporfirina, no escuro e na presença de oxigênio do ar; 4) sob a ação da luz, o precursor se desintegra rapidamente em substâncias não porfirínicas, em certos casos dentro de duas horas, sendo pois indispensável subtrair totalmente à ação da luz as amostras de urina destinadas à determinação de coproporfirina. (“It is imperative that urine samples for coproporphyrin estimations are not exposed to light even for a short period”).

Sem entrar no mérito destes achados, até certo ponto contraditórios, pareceu-nos interessante verificar a influência que poderiam ter na determinação semiquantitativa de coproporfirina urinária.

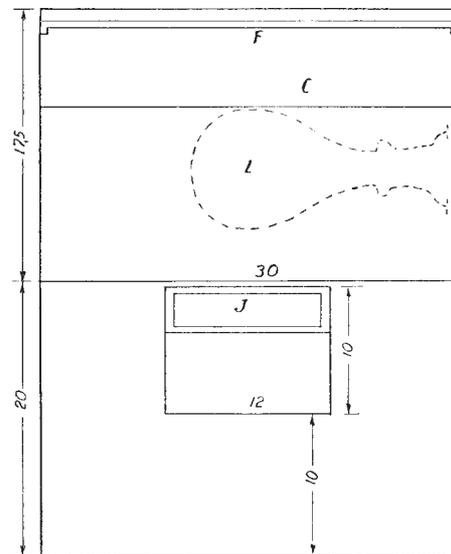
Numa série de 7 urinas, procuramos verificar as variações da coproporfirina no decurso do tempo, procedendo às determinações 1, 3, 6, 12, 24

* A feitura da caixa custou-nos, em 1957, Cr\$ 800,00, e o conjunto lâmpada-transformador Cr\$ 2.385,60.

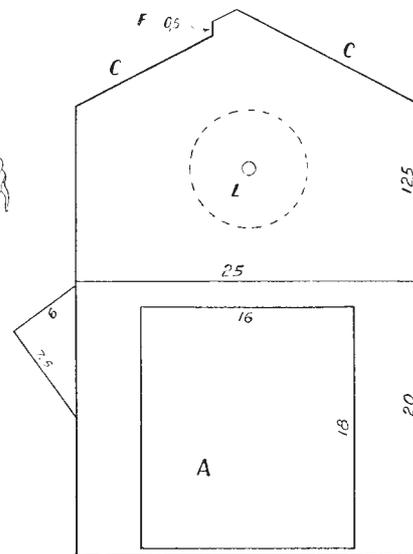
CÂMARA ESCURA PORTÁTIL



VISTA DE CONJUNTO



PROJEÇÃO, DE FRENTE



PROJEÇÃO, DE LADO

Legenda:

A = Abertura de manipulação
C = Coberta
E = Encaixe

F = Fenda de ventilação
J = Janela de observação
L = Lâmpada de "luz negra"

Os números correspondem a dimensões externas em cm.

e 48 horas após a micção. Lamentamos não nos ter sido possível, por dificuldades práticas, efetuar a determinação também na hora zero, ou seja, imediatamente após a micção. Logo após a colheita, aproximadamente às 9 horas da manhã, e antes do seu transporte para o laboratório, cada urina era repartida em quatro frascos, dos quais dois adicionados de carbonato de sódio, na proporção de 0,5%, e dois sem carbonato; e de cada par destes frascos, um era de vidro âmbar e o outro de vidro claro. Daí em diante, durante o transporte e, a seguir, durante sua permanência no laboratório, os frascos de vidro âmbar foram mantidos em rigorosa obscuridade e os de vidro claro expostos à luz difusa do dia.

Os resultados desta série, pelo interesse que apresentam, encontram-se no Quadro II, cabendo esclarecer que, quanto aos frascos conservados à luz, a exposição evidentemente se interrompeu durante a noite, ou seja, por dois períodos de cerca de 12 horas cada um. O pH das urinas, medido com papel indicador especial Merck, variou, na 1.^a hora, entre 5,7 e 6,8 nas urinas sem carbonato, e entre 7,5 e 9,5 nas com carbonato; e, na 48.^a hora, entre 5,4 e 7,4 naquelas, e entre 7,7 e 10,0 nestas.

O exame do Quadro II mostra-nos que, em tôdas as urinas e respetivas subséries, a intensidade da fluorescência tende a diminuir com o decurso do tempo, a partir da 3.^a hora. A diminuição é brusca nas urinas sem carbonato, conservadas à luz, cuja maioria acusa fluorescência nula da 6.^a hora em diante. Nas demais o decréscimo da fluorescência é gradual. Nas subséries sem carbonato, é notável a diferença entre as que permanecem na obscuridade e as que ficam expostas à luz. A fluorescência destas, em geral menor já na 1.^a hora, fica de dois a três graus abaixo da daquelas a partir da 3.^a-6.^a hora. Já nas subséries com carbonato, a diferença é nula ou insignificante entre as urinas que ficam na obscuridade e as que são expostas à luz. Doutro lado é também nula ou insignificante a diferença entre as urinas que, com ou sem carbonato, permanecem no escuro.

Poder-se-ia supor que, nesta série comparativa, as urinas tratadas com carbonato ficassem inferiorizadas pelo fato de o seu pH, ao serem extraídas com éter, ser algo mais elevado do que o das não tratadas. De fato, sendo a mesma a técnica de determinação para tôdas, após a adição de 6 gôtas de ácido acético 6N o pH das urinas sem carbonato desceu para 3,0-4,0, ao passo que o das carbonatadas veio para 4,0-4,8.

Colhemos então mais 5 urinas, repartindo cada uma em três frascos, o primeiro sem carbonato e os dois outros com carbonato, e conservando todos os frascos ao abrigo da luz. A determinação das frações do 1.^o e 2.^o frasco, sem e com carbonato, se fez com a adição das 6 gôtas do ácido, enquanto que as do 3.^o, com carbonato, foram tratadas com tantas gôtas do ácido quantas bastassem para que seu pH igualasse o das frações do 1.^o, no momento da determinação. As análises se procederam na 1.^a, 3.^a, 6.^a, 24.^a e 48.^a hora, e os resultados, além de confirmarem conclusões ensejadas pela série anterior, indicaram que a correção do pH não influenciou sensivelmente no grau de fluorescência das urinas carbonatadas.

QUADRO II — Variação da fluorescência em função da radiação luminosa e alcalinização

Urina	Idade (Horas)	Sem Na ₂ CO ₃		Com Na ₂ CO ₃	
		Luz	Escuro	Luz	Escuro
1	1	1+	2	2	2
	3	1	2	2—	2—
	6	0	2	2—	2—
	12	0	2—	1+	1+
	24	0	2—	1	1
	48	0	2—	1—	1—
2	1	3—	4+	4+	4+
	3	1—	4	4—	4+
	6	1	4	4—	4
	12	0	4—	4—	4—
	24	0	4—	4—	4—
	48	0	3—	3	4—
3	1	2	3—	3—	3—
	3	1	3—	3—	3—
	6	0	3—	3—	3—
	12	0	3—	3—	3—
	24	0	3—	3—	3—
	48	0	1	0	2—
4	1	4+	4+	4+	4+
	3	4+	4+	4+	4+
	6	4+	4+	4+	4+
	12	4	4+	4+	4+
	24	4—	4+	4+	4+
	48	0	4	4—	4+
5	1,5	2—	2	2	2
	3	1—	2—	2—	2—
	6	0	2—	2—	2—
	12	0	2—	2—	1+
	24	0	2—	2—	2—
	48	0	2—	1	0
6	1,5	2—	2	2	2
	3	1—	2—	2—	2—
	6	0	2+	2—	2—
	12	0	2—	1+	1+
	24	0	2—	1	1
	48	0	2—	1—	0
7	1	2—	2—	2—	2+
	3	0	2—	2—	2—
	6	0	2—	1+	2—
	12	0	2—	1+	2—
	24	0	1+	1	1+
	48	0	1—	0	1

Do que precede, parece lícito concluir que as urinas, para determinação semiquantitativa de coproporfirina, devem ser conservadas rigorosamente ao abrigo da luz, o que é uma confirmação dos achados de Holecck e Penickova. O carbonato de sódio, juntado à urina, protege-a satisfatò-

riamente quando exposta à luz, sendo entretanto dispensável se a urina fôr mantida na obscuridade.

Em tôdas estas observações, as urinas, quer no escuro, quer à luz difusa, foram conservadas à temperatura do laboratório que variou, nos dias de ensaio, entre 20,5 e 29,0°C.

QUADRO III — Variação da fluorescência em função da radiação luminosa

Urina	Idade (Horas)	Frasco âmbar no escuro	Frasco vermelho à luz	Frasco âmbar à luz
1	1	4—	—	—
	3	3—	3	3—
	6	3—	3	3—
	24	3—	3—	2+
	48	2—	2	1
2	1	2—	—	—
	3	1—	1	1+
	6	1—	1+	1
	24	0	0	0
	48	—	—	—
3	1	2+	—	—
	3	2—	2—	1+
	6	2—	2—	1+
	24	2—	2—	0
	48	1+	1+	0
4	1	2—	—	—
	3	2—	2	2—
	6	2—	2—	1
	24	1+	2—	1—
	48	2—	2	1—
5	1	1+	—	—
	3	1+	1+	1
	6	1+	1	1
	24	1	1	1—
	48	1—	1—	0

Dada a influência nociva da luz e visando ao nosso objetivo último que, como se disse páginas atrás, era o de chegar a uma receita de segura e fácil execução em pequenos laboratórios de serviços médico-industriais, procuramos investigar se os frascos correntes de vidro âmbar ofereciam proteção suficiente às urinas colhidas, quando deixados sôbre a mesa do laboratório. Para êsse fim colhemos 5 urinas que, transportadas para o laboratório em completa obscuridade e sem carbonato de sódio, foram analisadas 1 hora após. Feito o que, repartimos cada urina em 3 frascos,

dos quais um era de vidro vermelho Pyrex ("low actinic") e os dois outros de vidro âmbar comum. Dêstes dois, um foi mantido em completa obscuridade (câmara escura) e o outro, assim como o frasco vermelho, à luz difusa do dia. As análises prosseguiram espaçadamente até a 48.^a hora e os resultados se encontram no Quadro III, evidenciando que a intensidade da fluorescência dos frascos expostos à luz, quando comparada à dos mantidos no escuro, não acusa variações apreciáveis nos de vidro vermelho e é sensivelmente menor nos de vidro âmbar comum. A quem, portanto, não dispuser de frascos de vidro especial, aconselha-se a conservação das urinas em frascos de vidro âmbar comum envolto em papel prêto ou a colocação dêsses frascos em local inteiramente escuro.

CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES FINAIS

Do que precede, decorre a marcha da determinação semiquantitativa de coproporfirina urinária, presentemente adotada em nosso laboratório, e que não difere, senão em alguns pormenores, da que é seguida pela Divisão de Higiene Ocupacional de Massachusetts. Passamos a descrevê-la, recomendando-a aos interessados.

A 5 ml de urina, num tubo de ensaio, juntam-se 4 gôtas de ácido acético 6N e, a seguir, 5 ml de éter etílico. Fecha-se o tubo com rólha nova de cortiça e agita-se durante cêrca de 8 segundos, segurando-o pela extremidade superior e imprimindo-lhe aproximadamente 40 vibrações pendulares de vai-vém. Deixa-se o tubo repousar durante 30 minutos, à luz difusa do dia, repetindo a agitação, com cêrca de 20 vibrações cada vez, ao 10.^o e 20.^o minuto. Em local escuro, expõe-se então o tubo à radiação ultravioleta e observa-se a fluorescência da camada sobrenadante de éter, classificando-a num dos seguintes graus: 0 — azul ou verde azulada (urina normal); 1 — lilás (azul levemente rosado); 2 — rosa nítido; 3 — rosa forte tendendo ao vermelho; 4 — vermelho.

Tendo o presente trabalho o objetivo primordial de divulgação de um método para pequenos laboratórios anexos a serviços de medicina industrial, permitimo-nos acrescentar as seguintes recomendações. 1) Na seleção dos tubos de ensaio, preferivelmente de vidro de boa qualidade, devem ser recusados os que apresentam fluorescência própria à radiação ultravioleta. Suas dimensões externas podem ser aproximadamente de 180 mm de comprimento e 18 mm de diâmetro. 2) A solução de ácido acético não precisa ser rigorosamente 6N. Consegue-se um título suficientemente aproximação tomando 36 ml de ácido acético glacial e diluindo com água destilada até perfazer 100 ml. Pode conservar-se em frasco de vidro claro e é preferível utilizá-la com um conta-gôtas. 3) O éter etílico (éter sulfúrico) não carece ser quimicamente puro ou isento de peróxidos. Um tipo comercial, de boa procedência, satisfaz plenamente, convindo conservá-lo em frasco de vidro escuro. Altamente volátil e inflamável como é, deve ser mantido bem

fechado e manipulado na ausência de chamas expostas e corpos incandescentes ou aquecidos a temperaturas elevadas (bicos de gás, fósforos e cigarros acesos, resistências elétricas, etc.).

RESUMO

O método de determinação semiquantitativa de coproporfirina urinária, originalmente descrito por de Langen e ten Berg, tem sido modificado por autores diversos, principalmente no que respeita ao volume de urina utilizado, quantidade e variedade dos reagentes, técnica de agitação e observância dum período de repouso antes da leitura da fluorescência. Estas modificações são submetidas, no presente trabalho, a um estudo analítico comparativo, visando à fixação da melhor marcha da prova, para sua divulgação entre os pequenos laboratórios anexos a serviços médico-industriais. Recomenda-se o emprêgo de uma lâmpada de "luz negra" como fonte de radiação ultravioleta e descreve-se uma pequena câmara escura portátil para a observação da fluorescência. Acentua-se a importância de conservar as amostras de urina ao rigoroso abrigo da luz, a partir do momento de coleta.

SUMMARY

The method of semiquantitative determination of urinary coproporphyrin, originally described by de Langen and ten Berg, has been modified by various authors, mainly as to the volume of urine used, quantity and types of reagents, manner of shaking and the observation of a standing time before reading the fluorescence.

In the present report these modifications are subjected to a comparative analytic study, with a view to ascertaining the best procedure for the test, to be used in small laboratories annexed to medico-industrial services. Use of a "black light" lamp as the source of ultraviolet radiation is recommended and a small portable dark chamber for the observation of fluorescence is described. The importance of keeping the samples of urine strictly protected from light once they are collected is stressed.

BIBLIOGRAFIA

1. Brooks, A. L.: An appraisal of a urinary porphyrin test in detection of lead absorption. *Indust. Med. & Surg.* **20**:390-2, 1951.
2. Correlation between urinary lead concentration and urinary porphyrin determinations. *M. News Letter (U. S. Navy)* **22**:35-6, 1953. Cit. em 14.
3. Harrold, C. G.; Meek, S. F. & Padden, D. A.: A coproporphyrin III test as a measure of lead damage. II. Considering lead dusts of relatively large particle size. *A. M. A. Arch. Indust. Hyg. & Occup. Med.* **6**:24-31, 1952.

4. Holecek, V. & Penickova, M.: Excretion of urinary coproporphyrin in lead poisoning. Part I: Level of the precursor of coproporphyrin and preformed coproporphyrin in fresh urine. Part II: Distribution of urinary coproporphyrin isomers I and III. *Brit. J. Indust. Med.* **14**:198-208, 1957.
5. *J. A. M. A.* **143**:940 ("Queries and Minor Notes"). 1950.
6. Johnson, W. S. & Whitman, N. E.: Coproporphyrinuria as an index of lead absorption. *A. M. A. Arch. Indust. Hyg. & Occup. Med.* **2**:170-4. 1950.
7. Langen, C. D. de & Berg, J. A. G. ten: Porphyrin in the urine as a first symptom of leadpoisoning. *Acta Med. Scandinav.* **130**:37-44. 1948.
8. Maloof, C. C.: Role of porphyrins in occupational diseases. I. Significance of coproporphyrinuria in lead workers. *A. M. A. Arch. Indust. Hyg. & Occup. Med.* **1**:296-307, 1950.
9. Massachusetts Dept. of Labor and Industries, Division of Occupational Hygiene. Bull. ns. 631 e 632. 1952.
10. McCord, C. P.: The porphyrins. The significance of porphyrins in occupational diseases. *Indust. Med. & Surg.* **20**:185-90. 1951.
11. Meek, S. F.; Mooney, T. & Harrold, G. C.: Urinary porphyrins in lead poisoning. *Indust. Med.* **17**:469-71. 1948.
12. Schwartz, S.; Zieve, L. & Watson, C. J.: An improved method for the determination of urinary coproporphyrin and an evaluation of factors influencing the analysis. *Lab. & Clin. Med.* **37**:843-59. 1951.
13. Waldman, R. K. & Seideman, R. M.: Reliability of the urinary porphyrin test for lead absorption. *A. M. A. Arch. Indust. Hyg. & Occup. Med.* **1**:290-5. 1950.
14. Wyllie, J.: Urinary porphyrins in lead absorption. *A. M. A. Arch. Indust. Health*, **12**:396-405. 1955.