

**IEA-PUB-28**



COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR

Publicação

IEA — N.º 28

**ELIMINAÇÃO DA VITAMINA B-12 E RECUPERAÇÃO URINÁRIA DA VITAMINA MARCADA (B-12, Co-60)<sup>o</sup>**

*ROMULO RIBEIRO PIERONI, ALCIDIO ABRAO, VICTÓRIO MASPES e MICHEL JAMRA*



**INSTITUTO DE ENERGIA ATÔMICA**  
SÃO PAULO



**C. N. E. N.**

Presidente — Almirante Octacilio Cunha

**I. E. A.**

Diretor — Prof. Dr. Marcello Damy de Souza Santos

**1.<sup>a</sup> C. M.**

Catedrático — Prof. Dr. Antonio Barros de Ulhôa Cintra

**ELIMINAÇÃO DA VITAMINA B-12 E RECUPERAÇÃO  
URINÁRIA DA VITAMINA MARCADA (B-12, Co-60)**

*ROMULO R. PIERONI, ALCÍDIO ABRÃO, VICTÓRIO MASPES  
e MICHEL JAMRA*

*Os conceitos emitidos na presente publicação representam opiniões de seus autores, e são de sua exclusiva responsabilidade.*

*A Comissão Nacional de Energia Nuclear não se responsabiliza pela exatidão, originalidade ou utilidade das informações contidas no presente relatório, e tampouco garante que o uso de qualquer informação, método, processo ou aparelho divulgados ou descritos no presente trabalho não possam infringir direitos de outrem.*

**ELIMINAÇÃO DA VITAMINA B-12 E RECUPERAÇÃO  
URINÁRIA DA VITAMINA MARCADA (B-12, Co-60)**

## ELIMINAÇÃO DA VITAMINA B-12 E RECUPERAÇÃO URINÁRIA DA VITAMINA MARCADA (B-12, Co-60)<sup>o</sup>

Rômulo R. Pieroni \*  
Victório Maspes \*\*\*

Alcídio Abrão \*\*  
Michel Jamra \*\*\*\*

### 1 — Introdução

1 — A quantidade de vitamina B-12 eliminada pela urina e avaliada por métodos microbiológicos é cerca de mil vezes menor do que a introduzida no organismo pela dieta ordinária e absorvida. A discrepância entre a quantidade absorvida e a eliminada pela urina pode ser explicada por uma das três hipóteses seguintes, que não se excluem mutuamente: a) há degradação da vitamina B-12, que passa a formas biologicamente inativas; b) há acumulação da vitamina em certos órgãos ou tecidos; c) a excreção se dá por alguma outra via de forma significativa.

2 — Okuda e cols.<sup>1)</sup>, estudando a questão, excluem, desde logo, a primeira hipótese por acharem que os dados disponíveis não fornecem

<sup>1)</sup> Trabalho realizado em conjunto pela Divisão de Radiobiologia do Instituto de Energia Atômica (I.E.A.) e o Serviço de Hematologia da 1.<sup>a</sup> Clínica Médica da F.M. da U.S.P. Para sua execução contou-se com a cooperação da C.N.E.N.

\* Chefe da Divisão de Radiobiologia do I.E.A.

\*\* Assistente da Divisão de Radioquímica do I.E.A.

\*\*\* Assistente do Serviço de Hematologia.

\*\*\*\* Chefe do serviço de Hematologia da 1.<sup>a</sup> C. M. (Prof. A. B. Ulhôa Cintra).

elementos capazes de sustentá-la e, ao mesmo tempo, acham que a segunda deve ser posta de lado, pois, a retenção continuada da vitamina B-12 levaria, em algumas décadas, ao acúmulo de alguns miligramas no organismo. E, sabe-se, não ser êste o caso. Restando a terceira hipótese, procuraram encontrar via extra-renal de eliminação.

2.1 — Tendo em vista as qualidades de órgãos excretor apresentadas pelo fígado e o fato de grande número de drogas serem eliminadas seletivamente por êle e levando em conta a quantidade de bile excretada (500 ml a 1300 ml por dia), chegam à conclusão de que a via biliar é a procurada, postulando ainda, uma eliminação através das paredes do intestino.

2.2 — Empregaram vitamina B-12 marcada (Co-60) e experimentaram em ratos. Para que não pairassem dúvidas quanto à quantidade absorvida, usaram a via parenteral. Aceitando, inicialmente, que a quantidade eliminada pela bile aparece nas fezes, chegam à conclusão de que a excreção pela via biliar é, num mesmo período (cêrca de 30 dias), dupla da eliminada pela urina. Empregando doses “flushing” chegam a **resultado semelhante**.

3 — Os resultados apresentados por Okuda e cols. chegaram a nosso conhecimento em época na qual alguns do grupo estudavam a determinação da radiocianocobalamina na urina<sup>1</sup> e a depuração da vitamina B-12 (Co-60) administrada por via intramuscular<sup>12</sup>. Esta circunstância levou-nos a examinar a aplicabilidade de tais resultados à espécie humana (ao menos quando são usadas doses “flushing”), assim como verificar a possibilidade de pôr à prova a primeira hipótese (degradação da vitamina B-12).

## II — Material e método

1 — Empregou-se vitamina B-12 (Co-60) preparada para uso parenteral a partir da Radiocianocobalamina fornecida pelos Abbott Laboratories. Foram realizadas quatorze provas, seis com a vitamina em veículo aquoso e oito em veículo gelatinoso, e usou-se doses de vitamina B-12 com atividade de cêrca 0,5  $\mu$ c de Co-60. Para reduzir ao mínimo a irradiação do organismo dos pacientes (normais), ministrava-se duas doses “flushing”, uma contemporaneamente com a aplicação do material radioativo e outra 24 horas após.

2 — Determinou-se, a quantidade injetada em cada caso, por pesagem, fazendo-se a diferença entre a massa da seringa com o material ati-

vo e preparada para a injeção e a massa após a aplicação. Da solução empregada para a administração, preparou-se um padrão, por diluição de cerca de um grama em 500 ml.

3 — Foram feitas colheitas de urina em períodos de 0-6 horas; 6-12 horas; 12-24 horas e 24-48 horas. As amostras foram “contadas” em contador de cintilação com cristal de “poço”. Estudou-se a atividade retida por carvão ativo e por resina sendo os resultados comparados com os obtidos “contando-se”, diretamente, alíquotas de urina. Sabe-se que o carvão ativo retira em uma ou duas extrações sucessivas, praticamente toda a vitamina B-12 (Co-60) da urina, o que não ocorre com resinas. Contudo, ocorrendo degradação da vitamina, uma resina R-H é eficiente para reter o material ativo, ao mesmo tempo que cai muito a eficiência do carvão. Assim sendo, a comparação da atividade média diretamente na urina, com a retida pelo carvão e pela resina, pode permitir detectar a presença de produtos de degradação da vitamina.

### III — Resultados

1 — No quadro seguinte, reunimos os resultados obtidos para a recuperação urinária. A quantidade administrada foi transformada em “contagens por minuto” por comparação da massa injetada com a do padrão e contagem deste.

2 — A porcentagem de material ativo eliminado em 48 horas, através da urina variou de 58,0% a 85,6% da dose administrada com valor médio igual a 74,86%.

3 — Paralelamente observou-se que, em cinco casos, a atividade urinária era pouco retida pelo carvão ativo: tais urinas, percoladas numa resina R-H, deixavam a maior parte de sua atividade ligada à mesma. Observou-se ainda que enquanto a eluição da atividade retida por tal resina, quando atravessada por solução de vitamina B-12 (Co-60) era difícil, nos casos em questão era fácil, deixando transparecer que se tratava de cobalto iônico decorrente de eventual quebra da estrutura da molécula da vitamina B-12 (Co-60). Acresce ainda que enquanto a resina usada retinha pequena fração da atividade da solução de vitamina B-12 (Co-60), retirava quasi inteiramente a atividade de tais urinas. Em três dos cinco casos em que o fato foi observado, as urinas haviam sido colhidas recentemente, nos outros dois foi analisada uma semana após. Urinas nas quais não se constatou essa possível degradação da vitamina B-12, guardadas durante quatro semanas e reanalisadas, mostravam suas características iniciais.

Paciente	Quant. adm. c/min.	Períodos	Quant. elim. c/min.	Porc. da quant. adm.	Total elim. p. urina 48 h %
A.L.C.	331000 (S.G.)	0-12 h	265800	80,3	84,7
		12-24 h	11021	3,3	
		24-48 h	3700	1,1	
D.D.A.	365424 (S.G.)	0-6 h	229040	62,7	77,9
		6-12 h	48282	13,2	
		12-24 h	7215	2,0	
A.F.	379326 (S.G.)	0-6 h	238620	62,9	85,6
		6-12 h	32320	8,5	
		12-24 h	10488	2,8	
H.S.	365424 (S.G.)	0-6 h	289303	79,3	84,79
		6-12 h	14480	4,0	
		12-24 h	1066	0,3	
		24-48 h	7344	2,0	
C.P.P.	367410 (S.G.)	0-6 h	283716	77,29	83,0
		6-12 h	22380	6,1	
		12-24 h	3111	0,9	
		24-48 h	1872	0,5	
H.S.	375354 (S.G.)	6 h	270336	72,0	77,3
		6-12 h	31995	8,5	
		12-24 h	3204	0,8	
		24-48 h	6300	1,7	
C.A.L.	540370 (S.G.)	0-6 h	237600	64,0	64,4
		6-12 h	48714	13,1	
		12-24 h	5500	0,2	
		0-6 h	157140	43,0	
A.F.	365424 (S.G.)	6-12 h	58370	15,9	84,7
		12-24 h	8313	2,3	
		24-48 h	11655	3,2	
M.M.S.	433600 (S.A.)	0-12 h	365540	83,	73,6
		12-24 h	7470	1,7	
		24-48 h	n.d.		
A.L.C.	424900 (S.A.)	0-12 h	311300	73,	70,6
		12-24 h	2875	0,6	
		24-48 h	n.d.		
D.G.C.	524365 (S.A.)	0-6 h	296200	56,5	66,3
		6-12 h	52900	10,1	
		12-24 h	15700	3,0	
I.O.	478570 (S.A.)	24-48 h	5300	1,0	60,6
		0-6 h	293400	61,2	
		6-12 h	17550	3,7	
		12-24 h	2970	0,6	
J.B.	537540 (S.A.)	24-48 h	3915	0,8	58,0
		0-6 h	266000	49,5	
		6-12 h	46280	8,6	
		12-24 h	9450	1,8	
H.F.	353090 (S.A.)	24-48 h	3525	0,7	58,0
		0-6 h	152028	43,1	
		6-12 h	37987	10,8	
		12-24 h	7480	2,1	
		24-48 h		2,0	

4 — Os resultados apresentados no quadro acima, indicam ainda, que nos casos em que a vitamina B-12 (Co-60) foi administrada em veículo gelatinoso, a recuperação urinária média atingiu 79,29%, ao passo que naqueles em que se usou veículo aquoso, não ultrapassou 68,97%.

## V — Comentários

1 — A presença de vitamina B-12 na urina de seres humanos e de animais de laboratórios (ratos, particularmente), tem sido pesquisada por diferentes grupos de investigadores, com resultados nem sempre concordantes. Assim, em 1950, Chow e cols.<sup>5</sup> relatam que somente conseguem detetar a vitamina B-12 na urina de ratos, depois da administração oral de doses elevadas: encontram, porém, uma grande proporção da dose na urina de 24 horas, se recorrem à via parenteral. Conley e cols.<sup>6</sup> e Chesterman e cols.<sup>4</sup> encontram resultados semelhantes na espécie humana, tanto em indivíduos normais como em portadores de anemia perniciosa. Em 1952, Mollin e Ross<sup>10</sup> conseguem determinar a quantidade de vitamina B-12 eliminada por dia na urina e encontram, em indivíduos normais, de 0,11 a 0,27  $\mu\text{g}/\text{dia}$ . Unglaub e cols.<sup>16</sup> recorrendo também a métodos microbiológicos, obtêm de 0,013 a 0,205  $\mu\text{g}/\text{dia}$ : administrando até 25  $\mu\text{g}$  de vitamina B-12 por via parenteral recuperam na urina de 24 horas quantidade grosseiramente proporcional à dose injetada. Baker e cols.<sup>2</sup> procuram explicar a diferença dos resultados obtidos por métodos microbiológicos, pela diversa especificidade dos microorganismos utilizados pelos vários pesquisadores: usando *Ochromona malhenensis*, *Lactobacillus leishmannii* e *Euglena gracilis*, recuperam de 0,6 a 38 de 50  $\mu\text{g}$  injetados, na urina das oito horas seguintes à administração. Empregando vitamina B-12 marcada, E. L. Smith<sup>14, 15</sup> verifica que usando doses de 20  $\mu\text{g}$  por via parenteral, recupera a maior parte na urina, em 24 horas: a proporção cai muito se a dose é de apenas 1  $\mu\text{g}$ . Esse mesmo autor indica que a quantidade E eliminada pela urina, nas oito horas seguintes à injeção parenteral, pode ser expressa em função da dose D administrada, pela equação,

$$E = D - 1,2 D^{0,89}$$

Booth e Mollin<sup>3</sup> empregando vitamina B-12 (Co-56), por via oral, em doses de 1  $\mu\text{g}$ , obtêm uma recuperação urinária de 0,2% (em 24 horas), em indivíduos normais. Associando à dose oral, uma injeção intramuscular de 1 mg de vitamina não marcada, conseguem recuperar de 24 a 34% em 24 horas. Notemos que foi a observação de que uma dose parenteral elevada de vitamina não marcada determina a eliminação uri-

nária, em curto prazo, de proporção elevada da vitamina marcada absorvida, que levou Schilling<sup>13</sup> a introduzir o teste que hoje traz o seu nome.

1.1 — A comparação dos dados relatados por pesquisadores que empregaram métodos microbiológicos com os indicados por outros, que recorreram à vitamina marcada e determinaram a recuperação urinária pela radioatividade, evidencia que os primeiros traduzem uma menor eliminação urinária da vitamina B-12 absorvida pelo intestino. O problema não passou despercebido a E. L. Smith (1952)<sup>15</sup> que formulou desde logo a hipótese de que parte da radioatividade urinária poderia não mais representar vitamina B-12. Com o fito de esclarecer a questão realizou, inicialmente, experiências em ratos e constatou que quando a vitamina era injetada, a determinação microbiológica e a radioativa não davam resultados muito diversos. Contudo, quando era introduzida por via oral, uma fração elevada da atividade urinária não era reconhecida, microbiologicamente, como devida à vitamina B-12. Com a colaboração de J. N. M. Chalmers, fez uma determinação em um indivíduo normal e observou que 1% da radioatividade dada por via oral era recuperada na urina e que a fração reconhecível como associada à vitamina B-12 era desprezível. Tendo usado vitamina com cobalto e com fósforo radioativos (dupla marcação) pode concluir que a degradação da vitamina não levava à quebra da ponte que liga o fósforo ao cobalto.

1.2 — Em cinco dos quatorze casos que estudamos, encontramos resultados que traduzem a ocorrência de uma degradação da vitamina B-12 introduzida por via parenteral: em verdade, poderá ter ocorrido uma degradação, em grau não suficiente para dar lugar a uma eficiente retenção dos metabolitos pela resina, em maior número de casos. Caso a observação de E. L. Smith referida acima seja válida para a espécie humana, isto é, caso se constate que, também nesta, a vitamina B-12 sendo introduzida por via oral dá lugar ao aparecimento de maior proporção de metabolitos na urina, parece-nos lícito admitir que tal degradação teria lugar — ao menos parcialmente — no próprio intestino, fato este que em sendo verificado determinará uma revisão dos métodos de avaliação da absorção intestinal da vitamina.

1.3 — Por outro lado, não padece dúvidas de que quando se emprega doses “flushing” a via de eliminação mais importante, na espécie humana, é a renal. Em nenhum de nossos casos a recuperação urinária, em 48 horas foi menor do que 58%: atingiu em média 74,86%. Resultados inteiramente semelhantes foram obtidos recentemente por Kulhback e cols.<sup>9</sup>: estudando a excreção da vitamina B-12 (Co-60) administrada por via parenteral em pacientes com insuficiência renal, encontraram

para o grupo “contrôle” (dez indivíduos) uma recuperação urinária de 72,15% em 48 horas.

2 — Alguns investigadores têm estudado na espécie humana, a eliminação extra-renal da vitamina B-12. Assim, Halsted e cols.<sup>6</sup> injetando 9,4  $\mu$ g de vitamina B-12 com 2  $\mu$ c de radioatividade, em um paciente, recuperaram 1,7% da dose, nas fezes, num período de 11 dias. Administrando a outro paciente 0,5  $\mu$ g de vitamina marcada, conseguiram recuperar 2,5% da dose nas fezes. A um terceiro paciente, com fístula biliar, forneceram por via oral 2  $\mu$ g de vitamina B-12 marcada, recuperando 42% nas fezes e não conseguindo detectar radioatividade na bile. Concluem que tanto a vitamina injetada como a administrada por via oral, é eliminada pela bile em quantidade insignificante. Já Grasbeck e cols.<sup>7</sup> fazem observações um pouco diversas. Injetando uma dose traçadora de vitamina B-12 marcada em cinco voluntários e em seis pacientes com dreno em T no ducto biliar comum e seguindo a eliminação pela urina e fezes, assim como pela bile (nos seis pacientes) verificam que depois do terceiro dia o “esquema” de excreção era alterado. Com efeito, a partir do quarto dia a quantidade eliminada diminui sensivelmente, pelas três vias. Até o terceiro dia a eliminação pela urina foi duas vezes a biliar e cinco a fecal. Depois do quarto dia a eliminação urinária cai a 2% da biliar. Não indicam, porém, qual a recuperação que conseguem pelas diferentes vias, em tempo maior.

2.1 — Com os dados disponíveis, o papel preciso da eliminação pela bile, em condições fisiológicas, não pode ainda ser inteiramente estabelecido. Com efeito, as experiências feitas com vitamina B-12 marcada administrada por via oral, não são inteiramente concludentes. De fato, a quantidade total de vitamina B-12 existente no organismo é da ordem de 3,9 mg, sendo que 0,03% acha-se no plasma. Uma dose de 0,5  $\mu$ g, representa 0,013% da quantidade total no organismo, mas é fração elevada da que existe no plasma: não seria, em verdade, uma dose traçadora, pois, certamente perturba o equilíbrio de distribuição existente. Quando se emprega dose flushing não há dúvida de que esse equilíbrio é seriamente afetado, além disso ocorre uma “saturação” da capacidade das proteínas plasmáticas se ligarem é vitamina B-12.

## VI — Conclusões

- 1 — Quando são usadas doses “flushing” a via mais importante para a eliminação da vitamina B-12 marcada é a urinária.
- 2 — Há indicações de que a vitamina B-12 é parcialmente degradada. Caso essa degradação ocorra no intestino, é necessário um reexame

dos métodos de avaliação da absorção intestinal da vitamina. Por outro lado, a ocorrência de degradação da vitamina B-12 invalida os resultados de balanço metabólico da mesma, feitos em base a determinações microbiológicas. E, a hipótese a) formulada em I-1, para explicar a discrepância entre a quantidade absorvida e a eliminada pela urina, não pode ser sumariamente posta de lado, sem exames mais cuidadosos.

3 — Os dados disponíveis não permitem ainda fixar-se de forma definitiva qual a importância relativa das várias vias de eliminação da vitamina B-12, em condições perfeitamente fisiológicas.

## VII — Referências

- 1 — Abrão, A., Lima, F. W. and Pieroni, R. R. — Improved urinary excretion test for assay vitamin B-12 tagged with Cobalt — 60 — Anais da Associação Brasileira de Química — 18: 167-178, 1959.
- 2 — Baker, H., Sobotka, H., Pasher, I. and Hutner, S. H. — Comparative study of vitamin B-12 assay in urine — Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 91: 636-638, 1956.
- 3 — Booth, C. C. and Mollin, D. L. — Plasma, tissue and urinary radioactivity after oral administration of Co-56 labelled vitamin B-12 — Brit. Jour. Haemat. 2: 223-236, 1956.
- 4 — Chesterman, D. C., Cuthbertson, W. F. J. and Pegler, H. F. — Biochem J. 48: Proc. ii.
- 5 — Chow, B. F., Barrows, L. and Lang, C. A. — J. Nutrit. 42: 405-1950.
- 6 — Conley, C. L., Krevans, J. R., Chow, B. F., Barrows, L. and Lang, C. A. — Jour. Lab. & Clin. Med. 38: 84, 1951.
- 7 — Grasbeck, R., Byberg, W., Reizenstein, P. Biliary and fecal vitamin B-12 excretion in man. An isotope study — Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 97: 780, 1958.
- 8 — Halsted, J. A., Lewis, P. M., Hvolboll, E. E., Gasster, M. and Swendseid, M. E. An evaluation of the fecal recovery method for determining intestinal absorption of Cobalt<sup>60</sup> labeled Vitamin B<sub>12</sub> — Jour. Lab. & Clin. Med. 48: 92-101, 1956.
- 9 — Kuhlback, B. and Grasbek, R. — The urinary excretion of parenterally administered radiovitamin B-12 in renal failure — Scand. Jour. Clin. & Lab. Invest. 10: 231-232, 1958.

- 10 — Mollin, D. L. and Ross, G. I. M. — The vitamin B-12 concentrations of serum and urine of normals and of patients with megaloblastic anaemias and other diseases. — *Jour. Clin. Path.* 5: 129-139, 1952.
- 11 — Okuda, K., Grasbek, R. and Chow, B. F. — Bile and vitamin B-12 absorption *Jour. Lab. & Clin. Med.* 51: 17-23, 1958.
- 12 — Pieroni, R. R., Maspes, V. y Jamra, M. — Depuración de la Vitamina B-12 (Co-60) inyectada en la región deltoidea — *Sangre* 5: 67-76, 1960.
- 13 — Schilling, R. F. — Recent Studies of Intrinsic Factor and the Utilization of Radioactive Vitamin B-12 — *Fed. Proc.* 13: 769-775, 1954.
- 14 — Smith, E. L. — In *Isotopes Techniques. Proc. of the Isotopes Techniques Conference-Oxford, July-1951, vol. 1* — Her's Majesty Stationery Office-London.
- 16 — Unglaub, W. G., Rosenthal, H. L. and Goldsmith, G. A. — Studies of Vitamin B-12 in Serum and Urina Following Oral and Parenteral Administration-*Jour. Lab. & Clin. Med.* 43: 143-155, 1954.
- 15 — Smith, E. L. — Radioactive Penicilin and Vitamin B-12 — *Brit. Med. Bull.* 8: 203-205, 1952.