

TATSUYA SAKUMA

Fls. No.	66
Proc. N.	889/75
ROD. N.	<i>[Handwritten signature]</i>

DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO 3-METOXI-4-HIDROXIMANDÉLICO
URINÁRIO (ÁCIDO VANILMANDÉLICO) POR ELETROFORESE
DE BAIXA VOLTAGEM EM PAPEL

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo para
obtenção do grau de Mestre

SÃO PAULO - BRASIL
1975

Fis. No	61
Proc. N.	198/73
Rubrica	<i>freder</i>

TATSUYA SAKUMA

DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO 3-METOXI-4-HIDROXIMANDÉLICO
URINÁRIO (ÁCIDO VANILMANDÉLICO) POR ELETROFORESE
DE BAIXA VOLTAGEM EM PAPEL

Dissertação apresentada à
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo para
obtenção do grau de Mestre

SÃO PAULO - BRASIL
1975

Fle. N.º	62
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>J. Martí</i>

A

meus

país.

Fls. N.º	63
Proc. N.	198/23
Rúbrica	<i>[assinatura]</i>

Ao

Dr. Günter Höxter,

nosso agradecimento, pelo des-
prendimento e dedicação ao en-
sino e orientação criteriosa
do presente trabalho.

AGRADECIMENTOS

Fls. N.º	64
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>[assinatura]</i>

Aos Professores

Alexandre La Rocca Rossi

Bruno Strufaldi

Durval Mazzei Nogueira

Paulo S. Minami,

pelas sugestões e correções do presen
trabalho:

Aos Professores do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de aprendizado que nos tem proporcionado;

Aos Professores da U.E.M.T. pelo incentivo à iniciação ao magistério e à pesquisa;

À CAPES e à U.E.M.T., pela concessão de bol
sas de estudo;

A todos que direta ou indiretamente,
contribuíram na elaboração desse trabalho,

Fis. No	65
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>[assinatura]</i>

NOSSO AGRADECIMENTO.

Fila. No	66
Proj. N	198/73
Rub. 4	<i>flavio</i>

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - Biossíntese das catecolaminas	1
1.2 - Funções das catecolaminas	2
1.3 - Feocromocitoma, Ganglioneuroma e Neuroblastoma	6
1.4 - Metabolismo da adrenalina e noradrena lina	9
1.5 - Métodos para determinação de VMA urinário	13
 2. PROPOSIÇÃO	 18
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 19
3.1 - Colheita do material	19
3.2 - Aparelhagem utilizada	19
3.2.1 - Fonte de eletroforese	19
3.2.2 - Cuba eletroforética	19

3.2.3 - Espectrofotômetro 20

3.3 - Reativos 20

3.3.1 - Soluções eletroforéticas 20

3.3.2 - Solução padrão de ácido 3-metoxi-4-hidroximandêlico 20

3.3.3 - Solução de p-nitroanilina 21

3.3.4 - Solução de nitrito de sódio 21

3.3.5 - Solução de carbonato de sódio a 10% 21

3.3.6 - Diazo-reativo (solução reveladora) 21

3.3.7 - Metanol anidro 22

3.3.8 - Solução de carbonato de sódio a 2% 22

3.3.9 - Solução alcalina de metanol 22

3.4 - Métodos 22

3.4.1 - Determinação de ácido 3-metoxi-4-hidroximandêlico na urina pelo método de EICHHORN & RUTENBERG¹⁸.. 22

3.4.2 - Método modificado para deter- minação de ácido 3-metoxi-4- hidroximandélico urinário	24
4. RESULTADOS	27
4.1 - Separação de ácido 3-metoxi-4-hidroxi- mandélico pelo método modificado	27
4.2 - Separação de ácido 3-metoxi-4-hidroxi- mandélico pela técnica de EICHHORN & RUTENBERG ¹⁸	27
4.3 - Comparação dos resultados da determina- ção de ácido vanilmandélico em mg/l pelo método de EICHHORN & RUTENBERG e o modificado	31
4.4 - Recuperação de ácido vanilmandélico adicionado em várias amostras de u- rina	31
4.5 - Reprodutibilidade do método modifica- do para determinação de VMA urinário ..	33

Fls. N.º 69
Proc. N.º 198/73
Rúbrica jlled

Pág.

4.6 - Curva de calibração de VMA no comprimento de onda de 520 nm	33
4.7 - Mobilidade eletroforética da vanilina pelo método de EICHHORN & RUTENBERG modificado	36
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	48
7. RESUMO	49
8. SUMMARY AND CONCLUSIONS	50
9. BIBLIOGRAFIA	51

Fis. N.º	70
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>[assinatura]</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1 - BIOSÍNTESE DAS CATECOLAMINAS

As catecolaminas mais importantes produzidas no nosso organismo são: epinefrina (adrenalina), norepinefrina (noradrenalina) e dopamina [β (3,4-dihidroxifeniletilamina)].

As células cromafínicas da medula adrenal, pulmão, coração, fígado, intestino, cérebro e os nervos adrenérgicos são os locais importantes na síntese das catecolaminas. Na medula adrenal o hormônio produzido em maior quantidade é a adrenalina, enquanto que nos nervos simpáticos posganglionares destaca-se a noradrenalina. As catecolaminas sintetizadas são armazenadas nas partículas que são denominadas de grânulos cromafínicos na medula adrenal e vesículas granuladas³⁹ nas terminações dos nervos simpáticos.

A liberação de catécolaminaş dos tecidos adrenérgicos em resposta a impulsos simpáticos é

Fls. N.º	71
Proc. N.	198/23
Rúbrica	J. L. L. L.

dependente de cálcio⁴¹.

O esgotamento desses hormônios dos grânulos pode ser provocado através da administração de reserpina ou outros agentes farmacológicos.

O precursor mais importante para a biossíntese das catecolaminas é o aminoácido aromático L-tirosina (FIG. 1). Usualmente, a tirosina utilizada³⁴ é proveniente da alimentação ou é sintetizada no fígado por intermédio de hidroxilação da fenilalanina. Na primeira etapa para a biossíntese de catecolamina ocorre uma hidroxilação da tirosina para produzir dihidroxifenilalanina (DOPA). Logo em seguida, ocorre a decarboxilação³³ de DOPA originando a primeira catecolamina (DOPAMINA) que sofre uma hidroxilação³⁰ produzindo noradrenalina. Esta, após a metilação¹⁰, transforma-se em adrenalina.

1.2 - FUNÇÕES DAS CATECOLAMINAS

Epinefrina e norepinefrina promovem uma resposta fisiológica rápida em casos de emoções intensas, esforço muscular, traumatismos em geral, que

Fls. N.º 72
Prec. N. 198/73
Rúbrica *ylledt*

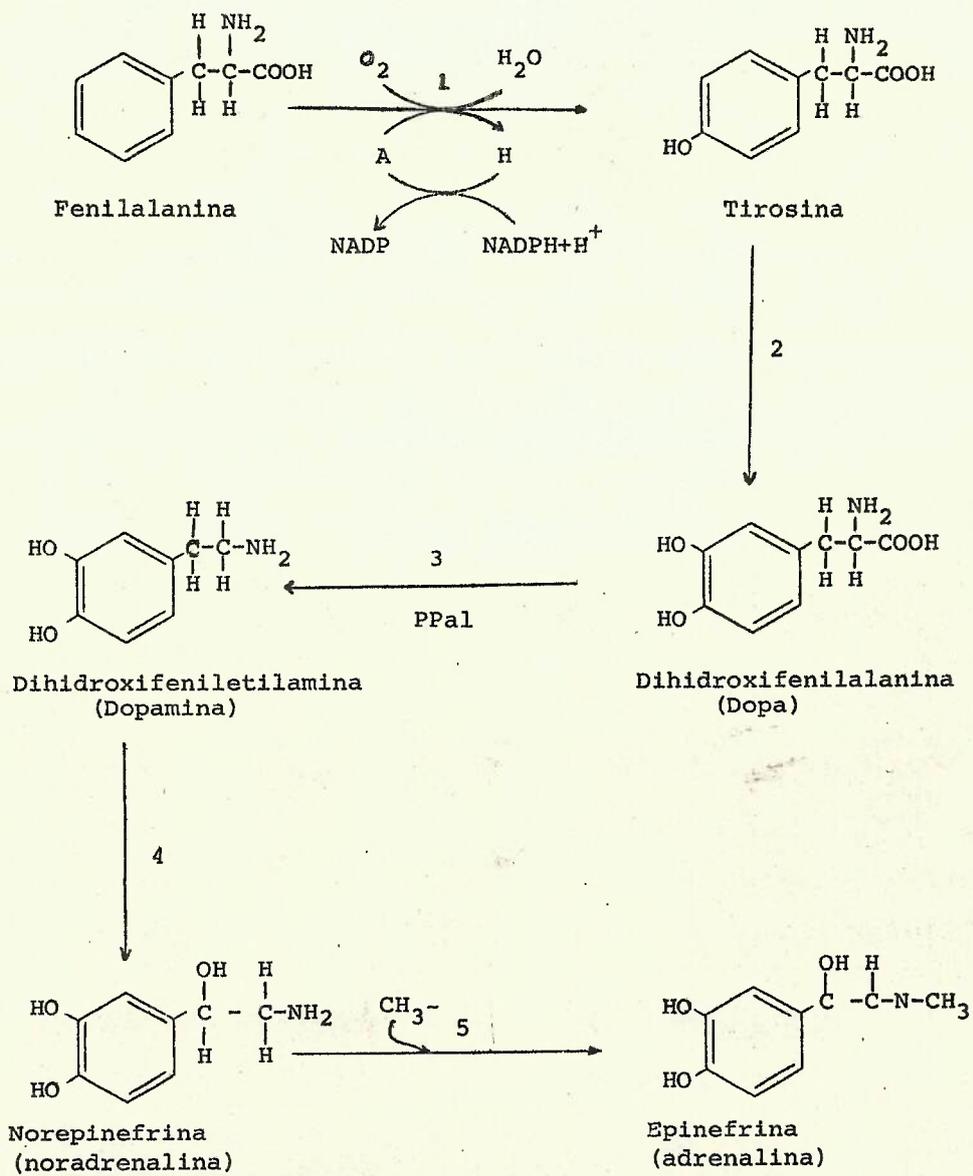


FIGURA 1. BISSÍNTESE DAS CATECOLAMINAS

- | | |
|---------------------------------|---|
| A - Tetrahidropterina | 3 - Decarboxilase da Dopa |
| B - Dihidropterina | 4 - β oxidase da Dopamina |
| 1 - Hidroxilase da Fenilalanina | 5 - N-metil transferase da feniletanolamina |
| 2 - Hidroxilase da Tirosina | |

Fls. N.º	73
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>[assinatura]</i>

maduras, grandes mudanças de pressão, exposição ao frio, e ao calor, hemorragias, infecções, efeito de alérgenos, injeção de doses excessivas de hormônios, desnutrição, fome, sede, excesso de insolação etc. Seus efeitos fisiológicos se manifestam na musculatura lisa e estriada, no sistema nervoso central, nos eosinófilos e no metabolismo dos carboidratos e lipídeos.

Quando, esses compostos são administrados em pequenas quantidades, apresentam ações bem distintas no sistema cardiovascular. Se forem administradas doses muito superiores aos limites fisiológicos não se verificará muita diferença.

Epinefrina atua provocando vasoconstricção das arteríolas que irrigam pele, mucosa e vísceras e vasodilatação de arteríolas dos músculos esqueléticos. Atua no coração estimulando-o, aumentando a velocidade e força de contração do músculo cardíaco, provocando, conseqüentemente, aumento no débito cardíaco.

Fls. N.º	74
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>Alled</i>

Em geral, a epinefrina provoca efeito vasodilatador, excetuando os casos acima citados enquanto a norepinefrina exerce efeito vasoconstritor.

A norepinefrina tem menor efeito no débito cardíaco do que a epinefrina, embora apresente um efeito excitante em muitas áreas do sistema cardiovascular. Ambos os hormônios elevam a pressão sanguínea, exercendo a norepinefrina efeito mais acentuado.

A epinefrina provoca relaxamento do músculo liso dos brônquios⁴², estômago, intestino, brônquiolos e bexiga. A norepinefrina tem ação menos potente. O efeito broncodilatador não é importante quando estes compostos são administrados em indivíduos normais. Entretanto, é acentuado quando os brônquios estão contraídos por alguns agentes farmacológicos como histamina.

A epinefrina e a norepinefrina elevam a glicose sanguínea por estimular a glicogenólise hepática¹¹ e por inibir a secreção de insulina³⁵. Esses

hormônios também estimulam a degradação do glicogênio muscular³¹ e aumentam a concentração de lactato no plasma quando o músculo está em atividade. A glicogenólise é facilitada em virtude das catecolaminas provocarem um aumento de AMP-cíclico ao ativarem a adenil ciclase^{12,19} e subseqüentemente ativação da fosforilase.

No tecido adiposo a epinefrina ativa a lipólise⁴⁸ liberando, rapidamente, ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos liberados servem como fonte energética e podem facilitar a gliconeogênese no fígado.

1.3 - FEOCROMOCITOMA, GANGLIONEUROMA E NEUROBLASTOMA

Feocromocitoma é um tumor do tecido cromafínico. Esse tumor secreta grandes quantidades de catecolaminas e sua localização mais frequente⁴³ é na porção medular da glândula supra-renal. Entretanto, pode desenvolver-se em qualquer parte da cadeia simpática abdominal, apresentando certa propensão a loca-

Fis. N.º	76
Proc. N.	198/73
Rúbrica	feocrom.

lizar-se ao redor da aorta e ao nível da artéria mesentérica inferior. Aparece, também, na região perisuprarenal, na cavidade vesical, nas paredes uretrais, na cavidade torácica e na região cervical.

O quadro clínico varia de acordo com a quantidade de catecolaminas secretada pelo tumor. Todo paciente apresenta hipertensão intermitente⁴³, que pode progredir até hipertensão permanente e levar, eventualmente, à morte devido a complicações como insuficiência das coronárias, fibrilação ventricular e edema pulmonar. Durante a crise hipertensiva¹³ o paciente pode apresentar cefaléia, palpitações e encefalopatia hipertensiva. Nos casos graves há manifestação de insuficiência cardíaca congestiva.

O diagnóstico pode ser realizado por meio de provas farmacológicas, radiológicas e determinação de catecolaminas e de seus derivados.

Prova com grande especificidade para diagnóstico de feocromocitoma⁵⁶ é a determinação da excreção urinária de ácido 3-metoxi-4-hidroxi mandélico (VMA),

Fls. N.º	77
Proc. N.	198/73
Rúbrica	J. J. J.

importante metabólito da adrenalina e noradrenalina. As provas farmacológicas não são tão exatas como as de determinações do VMA urinário sendo, por este fato, raramente indicadas.

Além de feocromocitoma, alguns tumores neurais ⁵¹ (neuroblastoma, ganglioneuroma e ganglio neuroblastoma) secretam grande quantidade de catecolaminas. O neuroblastoma ⁵⁷ é um tumor altamente maligno, mais frequente nas crianças e nos adolescentes juntamente com o tumor de Wilms, o glioma e a leucemia. No embrião em desenvolvimento, os neuroblastos amadurecem e formam células ganglionares. Do mesmo modo, alguns neuroblastos podem sofrer maturação espontânea e dar origem a tumor benígno, denominado ganglioneurona ⁵⁷. Durante a transição, encontram-se os dois elementos nos tumores, tendo-se então ganglioneuroblastoma.

Em consequência, muitas das manifestações gerais características de feocromocitoma verificam-se também em pacientes com outros tumores de origem neural. Os sinais mais comuns são hipertensão, rubor, palidez, exantemas, poliúria e polidipsia.

Fls. N.º	78
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>J. Hall</i>

Grande porcentagem de pacientes com estes tumores tem aumento de excreção de dopa, dopamina, noradrenalina, normetanefrina, ácido homovanílico e ácido vanilmandélico⁵⁷ (VMA).

Os pacientes com feocromocitoma excretam adrenalina, noradrenalina, metanefrina, normetanefrina e ácido vanilmandélico (VMA). Os portadores de ganglioneuroma e neuroblastoma excretam, além das substâncias acima referidas, grande quantidade de ácido homovanílico⁵⁶, cuja determinação serve como excelente meio para o diagnóstico diferencial.

1.4 - METABOLISMO DA ADRENALINA E NORADRENALINA

O conhecimento do metabolismo desses hormônios abriu novas perspectivas para o diagnóstico de feocromocitoma e de outros tumores de origem neural. Tanto a epinefrina como a norepinefrina são metabolizadas por metilações e oxidações sucessivas da cadeia lateral formando o ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico (VMA), o qual pode ser determinado no plasma e na

Fls. N.º	79
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>J. L. Costa</i>

urina. Em 1957, ARMSTRONG¹ demonstrou a presença de VMA na urina de pessoas normais e valores muito elevados nos pacientes portadores de feocromocitoma. Estes valores são muito superiores aos das catecolaminas que o originaram, inclusive em períodos intercríticos, quando as mesmas se encontram normais.

Investigações subsequentes^{2,3,20,37,44,45}, confirmaram estas observações e as vias de metabolismo da norepinefrina, que estão sumarizadas na Figura 2.

Normalmente, apenas 3 a 6 por cento da norepinefrina é excretado na urina sem alteração metabólica, o restante é distribuído em quatro ou mais metabólitos urinários^{20, 21}.

Os estudos de AXELROD & col.^{4,5,6} afirmam que por ação de O-metil transferase, a norepinefrina pode sofrer O-metilação para formar normetanefrina. Porções da normetanefrina, produzida por esta reação, são excretadas na urina na forma livre e conjugada com ácido sulfúrico. Outra parte da normetanefrina sofre deaminação oxidativa pela ação da monoaminoxidase

Fls. N.º 80
Proc. N. 198/73
Rúbrica: *México*

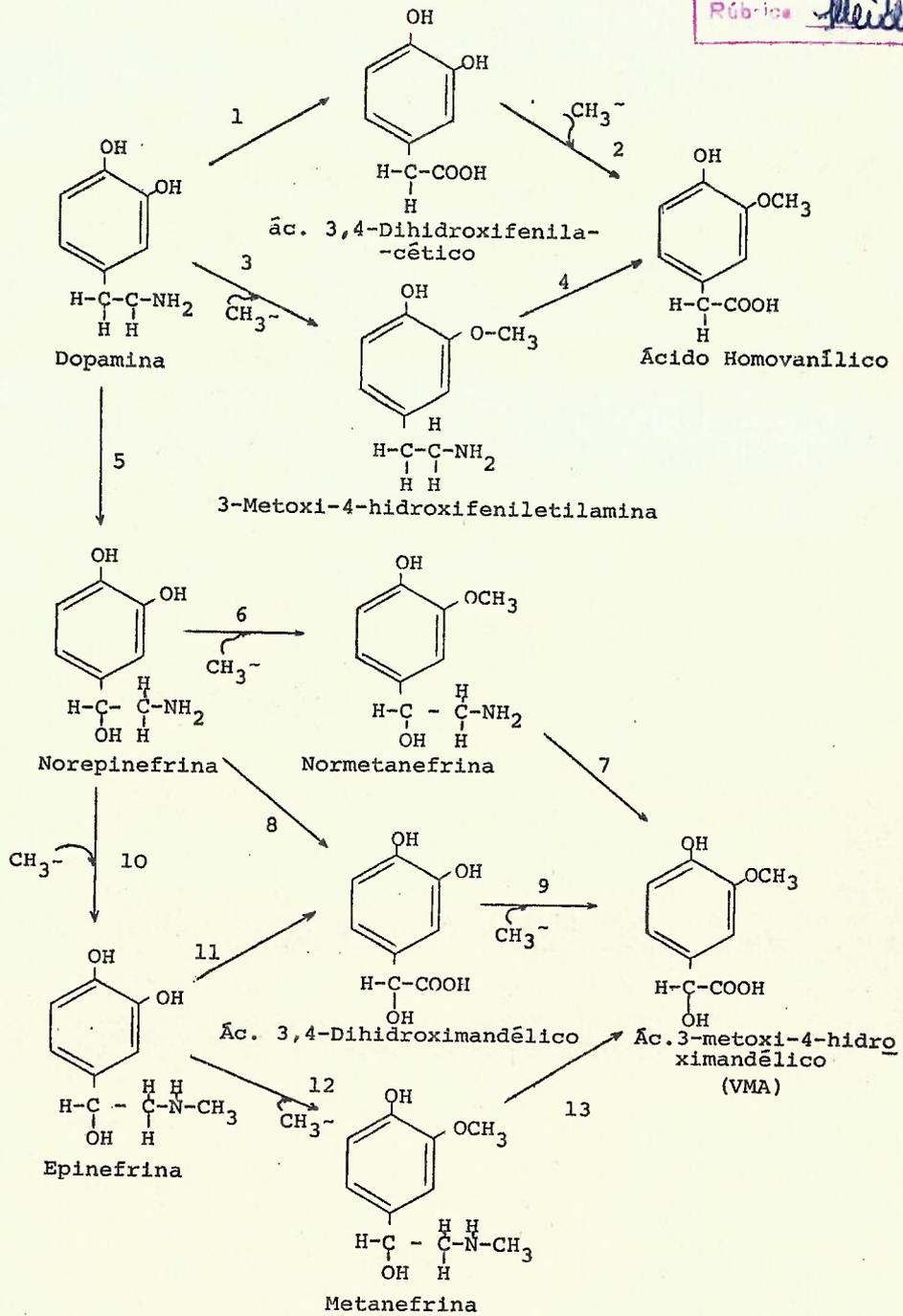


FIGURA 2. METABOLISMO DAS CATECOLAMINAS. 1,4,7,8,11 e 13= aminooxidase; 5 = β oxidase da Dopamina; 2,3,6,9 e 12 = O-metil transferase; 10 = N-metil transferase da feniletanolamina.

Fls. N.º	81
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>Frederick</i>

para produzir ácido vanilmandélico^{7, 46}.

Mediante via alternativa, a norepinefrina pode ser deaminada oxidativamente a ácido 3,4-dihidroxi mandélico^{2, 52}; uma porção deste catabólito é excretada na urina, porém uma fração maior sofre O-metilação para formar ácido vanilmandélico^{2,4}.

Vários trabalhos realizados^{20,21,52} sugerem que 20 a 40 por cento de norepinefrina endógena é excretado como normetanefrina livre e conjugada, sendo o restante excretado, principalmente, como ácido vanilmandélico em associação com quantidades menores de outros derivados de ácido mandélico.

As vias metabólicas da epinefrina são análogas àquelas da norepinefrina^{27,32}, levando a excreção de metanefrina livre e conjugada, ácido vanilmandélico e a outros derivados de ácido mandélico. KETY & col.²⁶, em 1961, estudaram a composição dos metabólitos urinários, após a injeção de epinefrina marcada e os seguintes resultados foram encontrados:

Fls. N.º	83
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>[assinatura]</i>

- Reação de copulação do ácido vanilmandélico com sal de diazônio de p-nitroanilina para formar um azo derivado que pode ser determinado espectrofotometricamente.

Os primeiros métodos para a determinação de ácido vanilmandélico eram complexos⁹, entretanto, SANDLER & RUTHVEN⁴⁷ simplificaram empregando a colorimetria. Em 1960, GITLOW & col.²² introduziram técnica colorimétrica que se baseia na extração de VMA da urina com acetato de etila. Após o tratamento com p-nitroanilina o azoderivado formado era medido espectrofotometricamente. O método apresenta desvantagem pelo fato do acetato de etila extrair, além do ácido vanilmandélico outros ácidos fenólicos.

Em 1961, KLEIN & CHERNAIK²⁹ determinaram o VMA na urina utilizando a eletroforese de baixa voltagem em papel de filtro. A técnica apresenta certa desvantagem porque a substância, em análise, precisa ser extraída, previamente, da urina, a fim de ser aplicada no suporte eletroforético.

Fis. N.º	84
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>[assinatura]</i>

Nesse mesmo ano, PISANO & col.³⁸ descreveram uma técnica ainda muito utilizada. Esta compreende a extração urinária de ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico com acetato de etila; a seguir o extrato é tratado com periodato para converter o VMA em vanilina que é determinada espectrofotometricamente. Esta técnica é razoavelmente específica, embora muito operosa devido as extrações sucessivas.

Em 1963, EICHHORN & RUTENBERG¹⁸ adaptaram nova técnica de eletroforese em papel de filtro, utilizando duas soluções de concentrações diferentes, para a análise de ácido vanilmandélico e de outros ácidos fenólicos na urina. O ácido vanilmandélico, separado por eletroforese, é determinado, colorimetricamente no eluato. Trata-se de método simples e específico. Tem sua vantagem porque não há necessidade do tratamento prévio da urina, porém mostra o inconveniente de ser uma análise demorada.

HERMAN, em 1964, modificou a técnica proposta por STUDNITZ & HANSON⁵³, que utilizava eletroforese de alta tensão para determinação do VMA

Fis. N.º	85
Proc. N.º	198/73
Rúbrica	<i>J. L. L.</i>

urinário. As modificações resumiam-se em utilizar fitas de acetato de celulose em vez de papel de filtro, baixa voltagem, tampão de pH e força iônica diferentes. Nestas condições pode-se determinar o VMA urinário em 4 horas ou menos. Sem dúvida nenhuma, é um método rápido e específico; entretanto, é necessário fazer uma extração prévia do VMA urinário com acetato de etila.

Em 1965, ANNINO & col.⁸ desenvolveram técnica para a determinação do VMA na urina utilizando cromatografia em camada delgada. A urina é tratada com ácido clorídrico e Florisil, extraíndo o VMA com acetato de etila. O extrato é cromatografado em sílica gel, utilizando-se, como solvente, uma mistura de butanol, ácido acético e água. A fração do VMA é detectada por meio de uma solução alcalina de p-nitroanilina diazotado. Após a eluição a leitura é feita no espectrofotômetro. Embora este método seja um pouco demorado, oferece bons resultados e é relativamente simples.

Recentemente, KAHANE & col.²⁸ descreveram método para análise do ácido vanilmandélico uri-

Fl. N.º	86
Proc. N.º	198/73
	J. L. L. L.

nário usando cromatografia a gás. Neste método o VMA, extraído da urina com acetato de etila, é oxidado a vanilina por periodato de sódio. A vanilina é transformada, primeiramente, em O-metil oxima pela reação com cloreto de metoxiamina em piridina. Logo a seguir, tratando a O-metil oxima com Sil-Prep, forma-se o éter O-metil oxima-trimetilsilil que é determinado a baixa temperatura em cromatógrafo a gás. É um método que ainda não pode ser adotado por muitos laboratórios clínicos devido a necessidade de equipamentos caros e, além disso, os resultados das determinações são similares aos de outros métodos.

Fis. N.º	82
Proc. N.	148/73
Rúbrica	<i>[assinatura]</i>

2. PROPOSIÇÃO

Para o nosso estudo sobre a determinação do VMA urinário escolhemos o método eletroforético de baixa voltagem em papel de filtro, preconizado por EICHHORN & RUTENBERG¹⁸.

Procuramos introduzir modificações nessa técnica com a finalidade de realizar a análise em menor tempo possível tornando-a mais simples e ao alcance de muitos laboratórios de rotina.

Fls. N.º	88
Proc. N.	198/23
Rúbrica	<i>[assinatura]</i>

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - COLHEITA DO MATERIAL

Utilizamos urina de 24 horas, colhida num recipiente contendo 2 ml de HCl concentrado, de diversos pacientes sem nenhuma recomendação dietética.

3.2 - APARELHAGEM UTILIZADA

3.2.1 - Fonte de eletroforese

Utilizamos duas: uma de procedência inglesa marca "EEL" com capacidade para 600 V e 50 mA e outra construída no nosso laboratório com capacidade para 250 V.

3.2.2 - Cuba eletroforética

Utilizamos cuba nacional marca "Permatron" a qual comporta um suporte de até 15 cm, e a cuba "Elphor" que pode utilizar suporte de até 30 cm. O papel de filtro utilizado foi o de marca Whatman 3 MM.

3.2.3 - Espectrofotômetro

Para as leituras espectrofotométricas utilizamos o Espectrofotômetro marca Coleman Junior II-Modelo 6/20.

3.3 - REATIVOS

3.3.1 - Soluções eletroforéticas

- a) Solução de ácido acético* a 2,5%
v/v para o compartimento catódico.
- b) Solução de ácido acético* a 0,75%
v/v para o compartimento anódico.

3.3.2 - Solução padrão de ácido 3-metoxi-4-hidroximandêlico**

A solução padrão contendo 0,1 mg/ml foi preparada dissolvendo-se 10 mg de ácido 3-metoxi-4-hidroximandêlico em 100 ml de ácido clorídrico 0,01 N. Essa solução foi guardada na geladeira em frasco escuro.

* Reagente da Merck, PA.

** Reagente da Sigma, PA.

Fls. N.º	90
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>[assinatura]</i>

3.3.3 - Solução de p-nitroanilina*

Para o preparo dessa solução foram dissolvidos 10 g de p-nitroanilina em 20 ml de ácido clorídrico concentrado e o volume completado a 1 litro com água destilada. A solução foi conservada em frasco escuro, no refrigerador.

3.3.4 - Solução de nitrito de sódio*

Essa solução contendo 2 g por litro em água destilada, foi preparada semanalmente e conservada na geladeira em frasco escuro.

3.3.5 - Solução de carbonato de sódio** a 10%.

3.3.6 - Diazo-reativo (solução reveladora)

Para o preparo deste reativo, mistura-se 7,5 ml da solução de p-nitroanilina com 10 ml da solução de nitrito de sódio e após 1 minuto, adiciona-se 20 ml de carbonato de sódio a 10%. Esse reagente era preparado sempre no momento de uso.

* Reagente da Merck, PA.

**Reagente da Reagen, PA.

Fis. N.º	91
Proc. N.	198/73
Rúbrica	J. K. K.

3.3.7 - Metanol anidro*

3.3.8 - Solução de carbonato de sódio a 2%

3.3.9 - Solução alcalina de metanol

Essa solução foi preparada adicionando-se vagarosamente 2 volumes de metanol anidro a um volume de solução de carbonato de sódio a 2%.

3.4 - MÉTODOS

3.4.1 - Determinação de ácido 3-metoxi-4-hidroxi-mandélico na urina pelo método de EICH-HORN & RUTENBERG 18

Aplica-se 0,2 ml de urina, de 24 horas, em cada uma das fitas (4 x 30 cm) de papel de filtro Whatmann 3 MM** dispostas no suporte eletroforético. Para cada corrida eletroforética foram utilizadas duas fitas. Em uma das fitas, aplica-se 0,1 ml da solução padrão de ácido vanilmandélico. A secagem do material aplicado é feita com o auxílio de corrente de

* Reagente da Merck, PA.

** Na técnica original foi utilizado um volume correspondente a 1/20000 da urina de 24 horas em cada uma das fitas de papel de filtro Schleicher & Schull 2043 b.

Fls. N.º	92
Proc. N.	198/73
Rúbrica	J.lliott.

ar quente. Após ter enchido o compartimento catódico com solução de ácido acético a 2,5% e o anódico com ácido acético a 0,75%, molha-se as extremidades das fitas com as respectivas soluções. As fitas são colocadas adequadamente na cuba eletroforética. Quando as fitas estiverem completamente úmidas, aplica-se uma corrente constante de 1 mA por fita durante 17 horas. No fim desse período, secam-se as fitas a temperatura ambiente e depois se aquece por 30 minutos a 80°C. Em seguida as fitas são mergulhadas por 30 segundos no diazo-reativo; logo após se observam bandas púrpuras a 9 cm da origem que correspondem ao ácido 3-metoxi-4-hidroximandêlico. Enquanto as fitas estiverem molhadas, cortam-se as bandas de VMA que são identificadas pelo padrão e são colocadas em tubos de hemólise. Num outro tubo, coloca-se uma banda de outra parte do papel do mesmo tamanho que servirá de branco. Aos três tubos, adicionam-se 4 ml de metanol alcalino. O conjunto é guardado em lugar escuro durante 30 minutos, agitando-se ocasionalmente. Logo a seguir, faz-se a leitura espectrofotométrica utilizando comprimento de onda de 520 nm.

Fls. N.º	93
Proc. N.	198/73
Rúbrica	J. Almeida

Cálculo:

$$\frac{D \times V}{P - D} \times 0,05 = \text{mg de VMA/24 horas}$$

onde

D = Absorbância do Desconhecido

P = Absorbância do Padrão mais o Desconhecido

V = Volume de urina de 24 horas

Valores normais: 2 - 11 mg/24 horas

3.4.2 - Método modificado para determinação de ácido 3-metoxi-4-hidroximandélico urinário

Em duas fitas de papel (4 x 15 cm) de filtro Whatmann 3 MM dispostas no suporte eletroforético*, coloca-se 0,2 ml de urina em cada uma das fitas; em uma delas adiciona-se 0,1 ml da solução padrão de ácido vanilmandélico. A origem ou ponto de

* Foi realizada uma adaptação no suporte eletroforético para que as fitas possam ficar bem esticadas (Figura 3).

Fis. N.º	94
Proc. N.	198/73
Rúbrica	filadito

aplicação fica mais ou menos a 5 cm de uma das extremidades das fitas. Com uma pipeta, molha-se o lado mais comprido das fitas com a solução de ácido acético a 0,75%. O lado mais curto, molha-se com a solução de ácido acético a 2,5% de tal modo que as duas frentes de líquido se encontrem na região de origem onde estão as manchas de urina. Logo após, apertam-se os parafusos do suporte* para que as fitas fiquem bem esticadas. Finalmente o conjunto é colocado na cuba tomando-se o cuidado de deixar a origem próxima do polo negativo. Liga-se o aparelho, ajustando-se a 220 V e procede-se a corrida eletroforética durante 5 horas. Para evitar que gotas de condensação caiam em cima das fitas, forra-se a tampa, por dentro, com papel de filtro. Após a corrida eletroforética, secam-se as fitas à temperatura ambiente e depois numa estufa a 80°C durante 30 minutos. A seguir, as fitas são colocadas num recipiente contendo diazo-reagente, ficando mergulhadas nessa solução durante 30 segundos. O ácido va-

* Foi realizada uma adaptação no suporte eletroforético para que as fitas possam ficar bem esticadas (Figura 3).

Fls. N.º	95
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>[assinatura]</i>

nilmandélico produz mancha púrpura aproximadamente a 5 cm da origem. Decorridas 2 horas, as manchas são recortadas e uma parte não colorida de cada fita servirá de prova em branco. Imediatamente, as tiras são e-luídas com 4 ml de solução de metanol alcalino por 30 minutos, no escuro, agitando-se ocasionalmente. A seguir é feita a leitura espectrofotométrica no comprimento de onda de 520 nm.

Cálculo:

$$\frac{D \times V}{P - D} \times 0,05 = \text{mg de VMA/24 horas}$$

onde

D = Absorbância do Desconhecido

P = Absorbância do Padrão mais o Desconhecido

V = Volume de urina de 24 horas

Valores normais: 2 - 11 mg/24 horas

Fis. No.	96
Proc. N.	198/23
Rúbrica	<i>Mecid</i>

4. RESULTADOS

4.1 - SEPARAÇÃO DE ÁCIDO 3-METOXI-4-HIDROXIMANDÉLICO PELO MÉTODO MODIFICADO

Após a corrida eletroforética da alíquota de urina de 24 horas pelo método descrito, o ácido vanilmandélico foi localizado a cerca de 5 cm de distância da origem.

A separação do ácido vanilmandélico dos outros ácidos fenólicos é muito nítida. O VMA apresenta-se numa banda bem estreita de coloração púrpura (FIGS. 3 e 4).

4.2 - SEPARAÇÃO DE ÁCIDO 3-METOXI-4-HIDROXIMANDÉLICO PELA TÉCNICA DE EICHORN & RUTENBERG¹⁸

Para tal finalidade as experiências foram realizadas nas condições já citadas e as manchas de ácido vanilmandélico apareceram aproximadamente a 9 cm de distância do ponto de origem (FIG. 5).

Fla. N.º	97
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>[assinatura]</i>

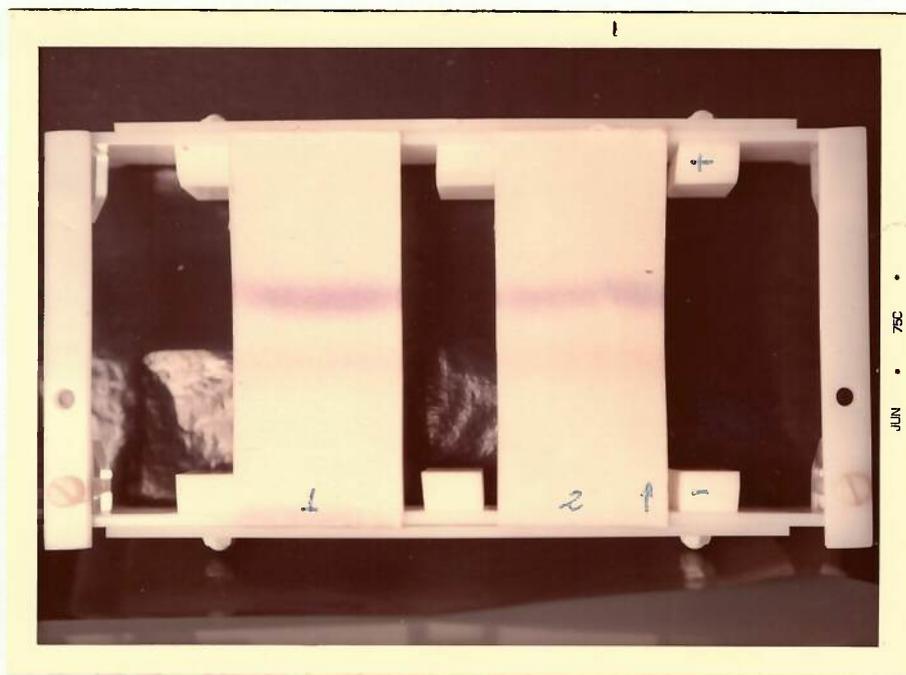


FIGURA 3. SEPARAÇÃO DE ÁCIDO 3-METOXI-4-HIDROXIMANDÉLICO PELO MÉTODO MODIFICADO.

1. Foi aplicado 0,2 ml de urina de 24 horas mais 0,1 ml de solução padrão de VMA.
2. Foi aplicado 0,2 ml de urina de 24 horas.

Fis. N.º	98
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>J. L. L.</i>



FIGURA 4. SEPARAÇÃO DE ÁCIDO 3-METOXI-4-HIDROXIMANDÉLICO PELO MÉTODO MODIFICADO.

- I - Foi aplicado 0,2 ml de urina de 24 horas mais 0,1 ml de solução padrão de VMA.
- II - Foi aplicado 0,2 ml de urina de 24 horas.
- III - Foi aplicado 0,1 ml de solução padrão de VMA.

Ácidos Fenólicos

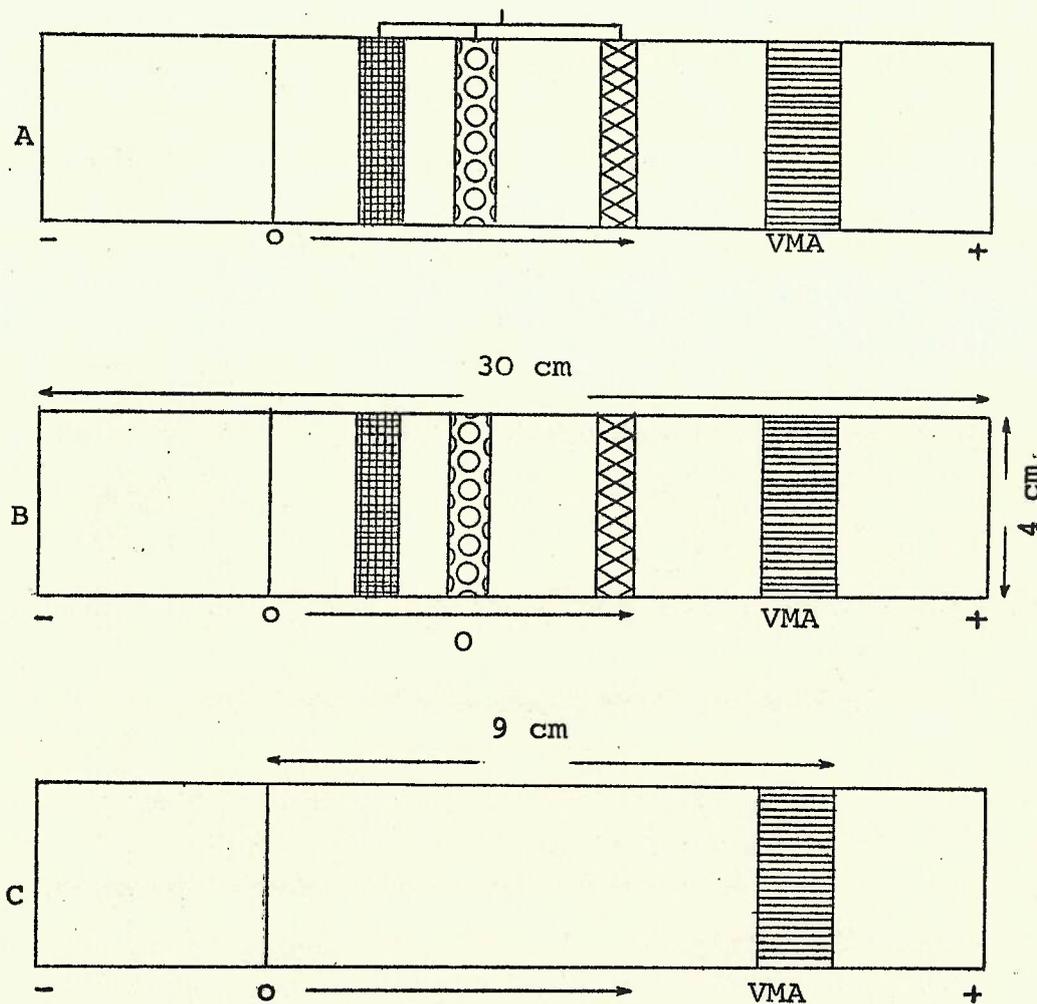


FIGURA 5. SEPARAÇÃO E MOBILIDADE ELETROFORÉTICA DE VMA PELO MÉTODO DE EICHORN & RUTENBERG¹⁸.

- A- Foi aplicado 0,2 ml de urina de 24 horas.
- B- Foi aplicado 0,2ml de urina de 24 horas + 0,1 ml de solução padrão de VMA.
- C- Foi aplicado 0,1 ml de solução padrão de VMA.

Fls. N.º	100
Proc. N.	198/73
Rúbrica	placard

4.3 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO VANILMANDÉLICO EM MG/L PELO MÉTODO DE EICHHORN & RUTENBERG E O MODIFICADO

Foram realizadas determinações em duplicata de 17 amostras de urina de diversos pacientes pelos dois métodos e os resultados estão representados na Tabela I. Aplicando aos nossos dados o teste não paramétrico de Kolmogorov Smirnov, verificamos ausência de diferenças significativas.

4.4. - RECUPERAÇÃO DE ÁCIDO VANILMANDÉLICO ADICIONADO EM VÁRIAS AMOSTRAS DE URINA

Para procedermos a prova de recuperação fizemos as determinações de ácido vanilmandélico em 12 amostras de urina. Feito isto, adicionamos concentrações adequadas de ácido vanilmandélico que variavam de 5 a 100 mg/l de ácido vanilmandélico e processamos novamente a análise.

A média de recuperação foi de 98,19% e um desvio padrão da média de $\pm 1,57$. Todas determina-

Fls. N.º	101
Proc. N.	198/73
Rúbrica	J. L. S. L.

TABELA I

Comparação dos resultados da determinação de VMA
urinário em mg/l pelo método de EICHHORN &
RUTENBERG modificado

Método de EICHHORN & RUTENBERG mg/l	Método modificado mg/l	Diferença %
17,0	16,6	-2,4
16,0	17,4	+8,8
15,3	15,0	-2,0
14,7	15,1	+2,7
22,4	23,8	+6,3
33,0	32,5	-1,5
34,0	34,3	+0,9
13,0	15,0	+15,4
13,0	12,8	-1,5
20,7	20,4	-1,4
19,0	18,8	-1,1
320,0	335,0	+4,7
83,0	90,0	+8,4
57,5	53,2	-7,5
6,3	6,0	-4,8
4,2	4,4	+4,8
8,1	7,9	-2,5

Fis. N.º	102
Proc. N.	198/73
Rúbrica	geral

ções foram realizadas pelo método modificado e os resultados estão expressos na Tabela II.

4.5 - REPRODUTIBILIDADE DO MÉTODO MODIFICADO PARA DETERMINAÇÃO DE VMA URINÁRIO

Escolhemos 4 amostras de urina de diferentes concentrações de VMA e realizamos a determinação de cada amostra 15 vezes em duplicata. A média (\bar{x}) das determinações da amostra A foi de 8,37 mg/l com desvio padrão (s) \pm 0,56 e coeficiente de variação (CV) de 6,69; a amostra B apresentou \bar{x} equivalente a 21,56, s \pm 0,77 e CV igual a 3,57; a amostra C apresentou \bar{x} de 33,17 mg/l, s \pm 0,52 e CV de 1,56, enquanto que a amostra D, \bar{x} igual a 86,28 mg/l, s \pm 3,57 e CV de 4,13. Os resultados acham-se expressos na Tabela III.

4.6 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DE VMA NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 520 nm

Para a realização dessa experiência foram aplicados os seguintes volumes de uma solução de

Fls. N.º	103
Proc. N.	198/73
	J.lli. dt.

TABELA II

Recuperação de VMA adicionado em várias amostras de
urina

VMA encontrado na urina mg/l	VMA adicionado na urina mg/l	VMA recuperado na urina mg/l	Recuperação %
4,4	5,0	8,7	92,5
7,5	5,0	11,4	91,2
32,0	5,0	38,0	102,7
4,4	10,0	15,0	104,1
5,0	10,0	13,0	86,7
7,5	10,0	17,4	99,4
2,0	10,0	12,8	106,6
65,3	10,0	72,9	96,8
5,0	20,0	23,0	92,0
2,0	20,0	22,6	102,7
20,0	20,0	38,0	95,0
32,0	20,0	56,0	107,7
6,0	30,0	32,5	90,3
65,3	30,0	103,2	108,3
3,0	50,0	49,8	93,9
10,0	50,0	57,2	95,3
65,3	50,0	112,8	97,8
8,2	100,0	113,1	104,5
		Média	98,19
		S_x^-	± 1,57

S_x^- = desvio padrão da média

Fls. N.º 104
Proc. N.º 198/73
Rúbrica *[assinatura]*

TABELA III

Reprodutibilidade do método modificado para determinação de VMA urinário

Amostra A VMA em mg/l	Amostra B VMA em mg/l	Amostra C VMA em mg/l	Amostra D VMA em mg/l
9,0	21,3	33,6	89,0
8,9	21,8	32,1	92,0
8,4	20,0	33,3	79,6
8,7	21,5	32,7	85,0
8,6	22,1	33,4	87,1
8,8	21,6	33,5	86,3
7,0	21,9	32,9	90,0
8,1	20,3	33,8	85,3
8,4	22,0	34,0	91,4
8,7	23,0	33,0	84,8
8,5	20,8	32,6	86,9
7,5	22,3	32,8	87,3
8,9	21,0	33,1	86,0
7,8	21,8	33,0	83,5
8,3	22,0	33,8	80,0
\bar{x} 8,37	21,56	33,17	86,28
s \pm 0,56	0,77	0,52	3,57
CV = 6,69	3,57	1,56	4,13

\bar{x} = média aritmética

s \pm = desvio padrão

CV = coeficiente de variação

Fls. N.º	105
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>[assinatura]</i>

VMA a 10 mg% nas fitas eletroforéticas: 0,05 ml (5 µg de VMA), 0,1 ml (10 µg de VMA), 0,15 ml (15 µg de VMA), 0,2 ml (20 µg de VMA), 0,25 ml (25 µg de VMA) e 0,30 ml (30 µg de VMA). Após as aplicações, foram feitas as corridas eletroforéticas nas mesmas condições já descritas para o método modificado na determinação de VMA urinário. Os resultados estão apresentados na Tabela IV e no gráfico 1. Todos esses dados indicam a grande correlação de absorbância com a concentração de VMA. A linearidade de absorção de VMA é superior a 30 µg.

4.7 - MOBILIDADE ELETROFORÉTICA DA VANILINA PELO MÉTODO DE EICHHORN & RUTENBERG MODIFICADO

Segundo PISANO & col.³⁸ a vanilina apresenta a mesma mobilidade de ácido vanilmandélico quando se processa a eletroforese em tampão fosfato de pH 7,4. No entanto, utilizando-se soluções diferentes de ácido acético (para o compartimento catódico, 2,5% e para o compartimento anódico, 0,75%) a mobilidade de vanilina foi quase nula enquanto que o ácido vanilmandélico migrou aproximadamente 5 cm durante as 5 horas de

Fls. N.º 106
Proc. N.º 198/73
Rúbrica [assinatura]

TABELA IV

Correlação entre a absorbância e concentração de VMA

Volume de VMA aplicado ml	Quantidade de VMA μg	Absorbância de VMA
0,05	5	0,08
0,10	10	0,17
0,15	15	0,28
0,20	20	0,38
0,25	25	0,45
0,30	30	0,54

Fis. N.º 107
Proc. N.º 198/73
Pública *M. L. S.*

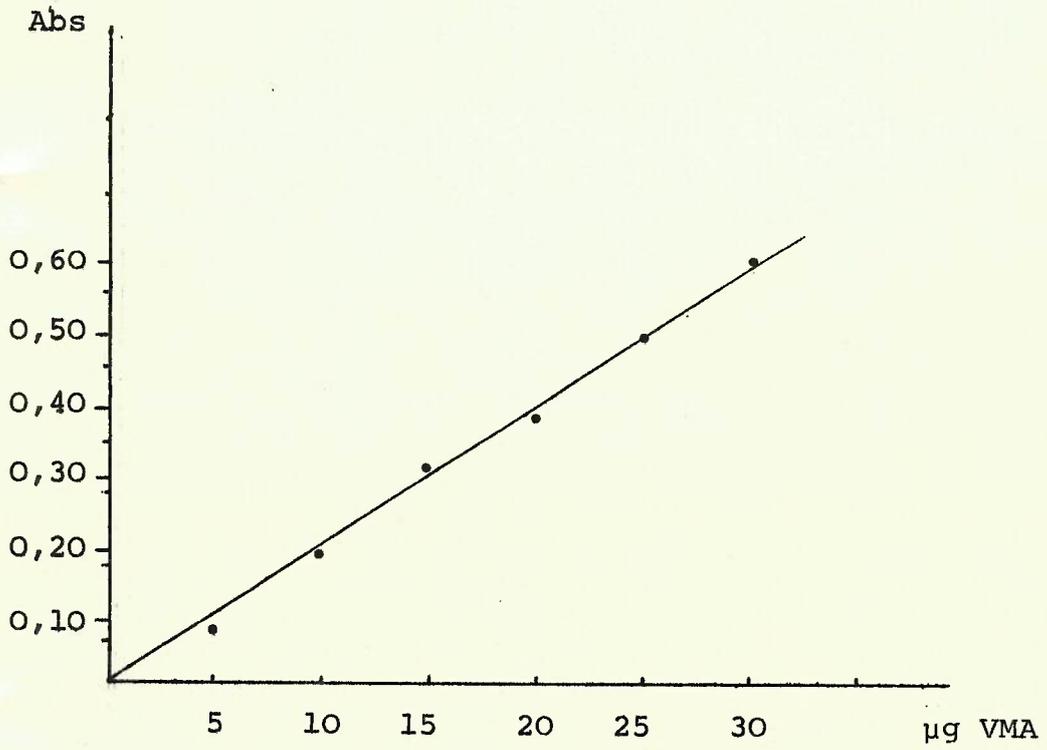


GRÁFICO 1. CURVA DE CALIBRAÇÃO DE VMA NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 520 nm.

Fls. N.º	108
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>J. M. Costa</i>

corrida eletroforética (FIG. 6). A detecção dessas substâncias no suporte eletroforético foi feito por meio de eluição, utilizando-se solução de ácido clorídrico 0,01N como eluente e leitura do eluato no comprimento de onda de 348 nm visto que esses dois compostos apresentam maior absorção nesse comprimento de onda.

A experiência foi realizada aplicando-se em uma fita 0,1 ml de uma solução contendo 0,1mg/ml de ácido vanilmandélico e noutra 0,1 ml de uma solução com 0,1 mg/ml de vanilina.

Fis. N.º 109
Proc. N.º 198/73
Rúbrica *Medlo*

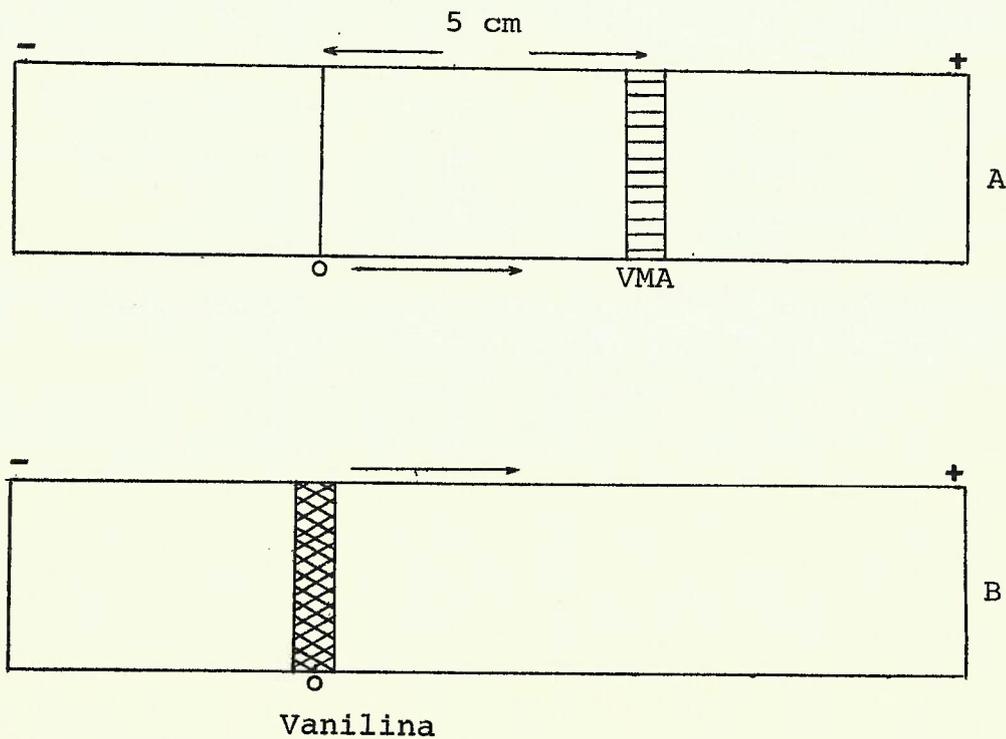


FIGURA 6. MOBILIDADE ELETROFORÉTICA DE VANILINA PELO MÉTODO DE EICHORN & RUTENBERG MODIFICADO. Na fita A foi aplicado 0,1 ml de solução de VMA a 0,1 mg/ml e em B, 0,1 ml de vanilina a 0,1 mg/ml.

Fls. N.º	110
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>M. C. L.</i>

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico laboratorial de feocromocitoma pode ser feito empregando-se provas farmacológicas e químicas, sendo estas mais precisas.

As provas farmacológicas são perigosas e não são de muita confiança porque ocorrem muitos resultados falso-positivos e falso-negativos. Nos casos positivos, podem dar complicações tais como: choque, infarto de miocárdio e hemorragia cerebral.

Há dois tipos de provas farmacológicas: adrenolítica e provocadora.

A prova adrenolítica consiste na administração de substâncias bloqueadoras (Regitina) dos receptores adrenérgicos. Em caso positivo, ocorre diminuição de hipertensão devido a redução de catecolaminas na circulação.

O tipo provocador, baseia-se na administração de substâncias (histamina) que liberam cateco

Fls. N.º	111
Proc. N.	198/73
Rúbrica	J. L. L.

laminas dos tumores e terminações nervosas simpáticas. Nas pessoas com feocromocitoma, ocorre elevação de pressão sanguínea. Essa prova é indicada para pessoas com pressão sanguínea normal ou ligeiramente elevada.

As provas químicas visam a determinação de catecolaminas urinárias ou de seus metabólitos. As catecolaminas são excretadas pelo rim, cerca de 6% na forma não alterada e o restante como vários metabólitos. Dentre os metabólitos o ácido vanilmandélico encontra-se na proporção maior (41%) do que a metanefrina (40%). Portanto, para o diagnóstico de feocromocitoma pode ser feita determinação tanto das catecolaminas urinárias como do ácido vanilmandélico (VMA) ou metanefrina. A determinação do VMA urinário leva vantagem sobre as demais provas porque ocorre menor flutuação da concentração do VMA entre as amostras urinárias colhidas durante o dia e a noite. Além disso, as quantidades do VMA excretadas são maiores do que seus precursores e seus métodos de triagem são mais práticos do que os de catecolaminas e metanefrina.

Fls. N.º	112
Proc. N.	148/73
Rúbrica	<i>[assinatura]</i>

Vários trabalhos realizados confirmam que a determinação do ácido vanilmandélico é um excelente meio para o diagnóstico de feocromocitoma^{22,29,55}, neuroblastoma⁵⁷ e ganglioneuroma¹³.

Para a determinação do VMA urinário, os pacientes podem ingerir produtos contendo vanilina³⁸, baunilha, banana, café, chá, chocolate etc, sem nenhum prejuízo no resultado. Já houve muitas divergências a respeito da presença de vanilina na amostra pois muitas técnicas de determinação envolvem a oxidação do VMA a vanilina que é medida espectrofotometricamente.

PISANO & col.³⁸ sugeriram que, no seu método, a vanilina alimentar não interfere, porém estes autores não fizeram nenhuma experiência nesse sentido. SANDERMAN & col.⁴⁹ e SANDLER & RUTHVEN⁴⁷ não fizeram nenhum comentário a respeito, nos seus trabalhos. Entretanto, os últimos autores foram criticados por MIYAKE & col.³⁶ por não corrigirem a vanilina proveniente dos alimentos. VARLEY⁵⁴ descreveu no seu trabalho, que a vanilina alimentar é excretada na urina e portanto um "branco" de urina não oxidada é necessário para a devida correção.

Fls. N.º	113
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>[assinatura]</i>

HERMAN & MORNEX²⁵ afirmam que os alimentos contendo vanilina causam erros nos métodos de análise do VMA urinário e aconselham uma dieta livre de vanilina antes e durante a colheita da amostra.

GREEN & WALKER²⁴ chegaram à conclusão de que a vanilina alimentar não interfere nos resultados alimentando, diariamente, vários pacientes com dieta rica em vanilina e determinando o VMA urinário pelo método de PISANO & col.³⁸. Além disso, afirmam que não há necessidade de fazer um "branco" da urina não oxidada para corrigir a vanilina de origem dietética.

Utilizando o método eletroforético de duas soluções diferentes de ácido acético para a determinação de VMA urinário, verificamos que não há riscos de interferência de vanilina alimentar visto que a mobilidade eletroforética desse produto é quase nula, embora sua mobilidade seja análoga a de VMA, quando se usa tampão fosfato de pH 7,4.

A fonte eletroforética, construída em nosso laboratório, pode ser utilizada com proveito na de

Fis. N.º	114
Proc. N.	198/73
Rúbrica	Yllcalt-

terminação do VMA urinário e, obviamente, para separações de proteínas de interesse biológico. Oferece resultados comparáveis com aqueles obtidos com fontes eletroforéticas de outras procedências. Em virtude do preço reduzido na aquisição de materiais para sua construção, da simplicidade na montagem e das separações eletroforéticas satisfatórias, esse aparelho pode ser conseguido por qualquer laboratório clínico de rotina.

Em razão do VMA ser muito instável, é interessante, para ter maior reprodutibilidade do método, estabelecer um determinado período após a revelação da fita para proceder a eluição e posterior leitura. No nosso trabalho, a eluição foi feita 2 horas após a revelação das fitas, período em que as fitas ainda se mantêm úmidas. A eluição é rápida e completa.

As fitas devem ser colocadas de maneira que as mesmas fiquem bem esticadas e retas no suporte. Essas precauções são importantes para obter bons resultados.

No decorrer do nosso trabalho tentamos modificar a concentração das soluções de ácido acético

Fis. N.º	115
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>J. Almeida</i>

utilizadas na cuba eletroforética, com finalidade de obter melhores resultados, porém fomos infelizes nessa tentativa. As concentrações das soluções de ácido acético (2,5% para o compartimento catódico e 0,75% para o compartimento anódico) descritas no método de EICHORN & RUTENBERG são mais eficazes porque oferecem separações mais nítidas.

A medida de recuperação de VMA urinário foi de 98,19%, conforme a Tabela II, confirmando os resultados de KLEIN & CHERNAIK²⁹. Por outro lado, o nosso resultado foi um pouco inferior ao de PISANO & col.³⁸ que conseguiram a média de 99,0%. Entretanto, a faixa de variação das nossas experiências é de 86,7 a 108,3% ao passo que no método de PISANO atinge 87 a 110%. Diante desses resultados o método modificado pode ser considerado bastante exato além de ser reprodutível como mostra a Tabela III. Essa reprodutibilidade é bem superior a do método de ANNINO & col.⁸.

O método estudado para determinação do VMA urinário, pela sua simplicidade, pelo fato de não exigir equipamentos de alto custo, por não sofrer

Fis. N.º	116
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>J. M. S.</i>

interferência de vanilina alimentar, é de grande utilidade no laboratório clínico. Além disso, em virtude desse método ser baseado nos princípios eletroforéticos que podem separar partículas que diferem entre si por pequena diferença de carga elétrica e sem alterar a estrutura química da substância oferece grande especificidade na análise do VMA urinário.

Fis. N.º	117
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>J. M. S.</i>

6. CONCLUSÕES

1. Introduziu-se modificação no método de EICHHORN & RUTENBERG para determinação do VMA urinário conseguiu-se reduzir o tempo de análise de 17 horas para apenas 5 horas.
2. Os resultados do método modificado são comparáveis aos do método original.
3. Foi comprovada a reprodutibilidade e a especificidade do método.
4. A vanilina alimentar não interfere na determinação do VMA urinário pelo referido método.
5. O método descrito é recomendado para qualquer laboratório clínico de rotina pela sua maior praticabilidade e baixo custo, em comparação a outras técnicas de determinação do VMA urinário.

Fis. N.º	118
Proc. N.	198/73
Rúbrica	Jillett.

7. RESUMO

A determinação do VMA urinário é importante para diagnóstico de feocromocitoma, ganglioglioma e neuroblastoma.

Descreve-se um método simples e econômico para determinação desse metabólito urinário baseado na modificação do método de EICHORN & RUTENBERG.

Pela modificação proposta conseguiu-se a redução do tempo de análise de 17 horas para 5 horas.

Fis. N.º	119
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>[Signature]</i>

8. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The determination of the urinary excretion of vanilmandelic acid is important for the diagnosis of pheochromocytoma, ganglioneuroma and neuroblastoma.

A simple and economic method is described for the analysis of this urinary metabolite, based upon a modification of the technique of EICHORN & RUTENBERG.

The modified method is shown to be comparable to the original technique both in precision and specificity.

There is no interference from vanillin in the food and therefore no necessity for dietary restrictions, usually required in other analytical processes.

The proposed modification reduces the time of analysis from 17 hours to 5 hours.

9. BIBLIOGRAFIA*

1. ARMSTRONG, M.D., McMILLAN, A. & SHAW K.N.F. - 3-Methoxy-4-hydroxy-D-mandelic acid, a urinary metabolite of norepinephrine. Biochim. biophys. Acta, Amsterdam, 25: 422-423, 1957.
2. ARMSTRONG, M.D. & McMILLAN, A. - Studies on the formation of 3-methoxy-4-hydroxy-D-mandelic acid, a urinary metabolite of norepinephrine and epinephrine. Pharmacol. Rev., Baltimore, 11:394-401, 1959.
3. AXELROD, J. - The metabolism of catecholamines in vivo and in vitro. Pharmacol. Rev., Baltimore, 11:402-408, 1959.

* De acordo com as normas preconizadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos de periódicos estão de acordo com o World Medical Periodicals, 3rd ed., New York, 1961.

Fls. N.o	121
Proc. N.	198/73
Rúbrica	Jellwell

4. AXELROD, J. - O-methylation of epinephrine and other catechols in vitro and in vivo. Science, Washington, 126: 400-401, 1957.

5. AXELROD, J.; INSCOE, J.K.; SENOH, S.; WITKOP, S. & WITKOP, B. - O-methylation, the principal pathway for the metabolism of epinephrine and norepinephrine in the rat. Biochim. biophys. Acta, Amsterdam, 27: 210-211, 1958.

6. AXELROD, J. & TOMCHIK, R. - Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. J.biol.Chem., Baltimore, 233: 702-705, 1958.

7. AXELROD, J. - Presence, formation and metabolism of normetanephrine in the brain. Science, Washington, 127: 754-755, 1958.

8. ANNINO, J.S.; LIPSON, M. & WILLIAMS, L.A. - Determination of 3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid (VMA) in urine by thin-layer chromatography. Clin.Chem., New York, 11: 905-913, 1965.

Fis. N.º	122
Proc. N.	198/73
Rúbrica	Medic.

9. ARMENDARIS, R.; LITVAK, J.; OBERHAUSER, E.; WORTSMANN, J. & VALDIVIESCO, R. - Determination colorimetrica del acido vanillyl mandelico en el diagnostico del feocromocitoma. Rev. méd.Chile, Santiago, 93: 18-21, 1965.
10. AXELROD, J. - Methylation reaction in the formation and metabolism of catecholamines and other biogenic amines. Pharmacol. Rev., Baltimore, 18: 95-113, 1966.
11. ANTONIS, A.; CLARK, M.L.; HODGE, R.L.; MOLONY, M. & PILKINGTON, T.R.E. - Receptor mechanisms in the hyperglycemic response to adrenaline in man. Lancet, London, 1: 1135-1137, 1967.
12. BURNS, T.W.; LANGLEY, P.E. & ROBISON, G.A. - Adrenergic receptors and cyclic AMP in the regulation of human adipose tissue lipolysis. Ann. N.Y.Acad. Sci., New York, 185: 115-128, 1971.
13. BEESON, B.P. & McDERMOTT, W. - Tratado de Medicina

Fis. N.º	123
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>[Handwritten Signature]</i>

Interna de Cecil-Loeb, Decima Tercera Edicion, Mexico, Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C. V., 1972, p. 1918-1921.

14. CROUT, J.R.; PISANO, J.J. & SJOERDSMA, A. - Catecholamine metabolism in pheochromocytoma. Clin. Res., New York, 8: 24, 1960.
15. CROUT, J.R. - Pheochromocytoma. Pharmacol. Rev., Baltimore, 18: 651-657, 1966.
16. DIRSCHERL, W.; THOMAS, H. & SCHRIEFERS, H. - Vanillin säure als endprodukt des abbaues von adrenalin und noradrenalin. Acta endocr., Kolsenhavn, 39: 385-394, 1962.
17. DIRSCHERL, W. & BRISSE, B. - Vanillinsäure als endprodukt des abbaues von adrenalin und noradrenalin. Acta endocr., Kolsenhavn, 45:641-646, 1964.
18. EICHHORN, F. & RUTENBERG, A. - A simple low-voltage paper electrophoretic method for the determina-

Fls. N.o	124
Proc. N.	198/73
Rúbrica	Levede

tion of urinary vanillylmandelic acid (VMA). Clin. Chem., New York, 9: 615-619, 1963.

19. EXTON, J.H.; LEWIS, S.B.; HO, R.J.; ROBISON, G.A. & PARK, C.R. - The role of cyclic AMP in the interaction of glucagon and insulin in the control of liver metabolism. Ann. N.Y. Acad. Sci., New York, 185: 85-100, 1971.
20. GOODALL, M. - Metabolic products of adrenaline and noradrenaline in human urine. Pharmacol. Rev., Baltimore, 11: 416-425, 1959.
21. GOODALL, M.; KIRSHNER, N. & ROSEN, L. - Metabolism of noradrenalin in the human. J. clin. Invest., New Haven, 36: 707-714, 1959.
22. GITLOW, S.E.; ORISTEIN, L.; MENDLOWITZ, M.; KHASSIS, S. & KRUK, E. - A simple colorimetric urine test for pheochromocytoma. Amer. J. Med., New York, 28: 921-926, 1960.

File No.	125
Proc. N.	198/73
Pub. No.	J. J. J.

23. GITLOW, B.E.; MENDELWITZ, M.; KHASSIS, S.; COHEN, G. & SHA. J. - The diagnosis of pheochromocytoma by determination of urinary 3-methoxy-4-hydroxy-mandelic acid. J. clin. Invest., New Haven, 39: 221-226, 1960.
24. GREEN, M. & WALKER, G. - Dietary vanillin does not affect the VMA method of Pisano et al. Clin.Chim. Acta, Amsterdam, 189: 189-190, 1970.
25. HERMAN, H. & MORNEX R. - Tumors secreting catecholamines. Oxford-1964, p.100, Ref. 45.
26. KETY, S.S.; KOPIN, I.J.; AXELROD, J. & LABROSSE, E. H. - Metabolism of 7-H²-Epinephrine-d-bitartrate in normal young men. J. clin. Invest. New Haven. 40: 253-260, 1961.
27. KIRSHNER, N.; GOODALL, M. & ROSEN, L. - Metabolism of dl-adrenaline-2-C¹⁴ in the human. Proc. Soc. exp. Biol., New York, 98: 627-630, 1958.

File No.	126
Proc. N.	198/73
Rúbrica	Alente

28. KAHANE, Z.; MOWAT, J.H. & VESTERGAARD, P. - Gas-chromatographic estimation of urinary vanillylmandelic acid after transformation to vanillin methoxime trimethylsilyl ether. Clin. chim. Acta, Amsterdam, 26: 307-311, 1969.
29. KLEIN, D. & CHERNAIK, J.M. - Determination of urinary 3-methoxy-4-hidroxymandelic acid (vanillylmandelic acid) by paper electrophoresis. Clin. Chem., New York, 7: 257-264, 1961.
30. KAUFMAN, S. & FRIEDMAN, S. - Dopamine- β -hydroxylase. Pharmacol. Rev., Baltimore, 17: 71-100, 1965.
31. KREBS, E.G.; DELANGE, R.J.; KEMP, R.G. & RILEY, W. D. - Activation of skeletal muscle phosphorylase. Pharmacol. Rev., Baltimore, 18: 163-171, 1966.
32. LABROSSE, E.H.; AXELROD, J. & KETY, S.S. - O-methylation, the principal route of metabolism of epinephrine in man. Science, Washington, 128: 593-594, 1958.

Fis. N.º	127
Proc. N.	198/73
Rúbrica	Alcald

33. LOVENBERG, W.; WEISSBACH, H. & UDENFRIEND, S. - Aromatic L-Amino Acid Descarboxylase. J. Biol.Chem., Baltimore, 237: 89-93, 1962.
34. LEVINE, R.J. & CONN, H.O. - Tyrosine metabolism in patients with liver disease. J. Clin. Invest., New Haven, 46: 2012-2020, 1967.
35. MAYHEW, D.A.; WRIGHT, P.H. & ASHMORE, J. - Regulation of insulin secretion. Pharmacol. Rev., Baltimore, 21: 183-212, 1969.
36. MIYAKE, H.; YOSHIDA, H. & IMAIZUMI, R. - Japan J. Pharmacol., Tokyo, 12: 79, 1962, Ref. 46.
37. PELLERIN, J.; LEDUC, J. & D'IOURO, A. - Biogenesis and metabolism of catecholamines. Rev. canad. Biol., Montréal, 17: 267-298, 1958.
38. PISANO, J.J.; CROUT, J.R. & ABRAHAM, D. - Determination of 3-methoxy-4-hidroxymandelic acid in urine. Clin.chim.Acta, Amsterdam, 7:285-291, 1962.

Fls. N.o	128
Proc. N.	198/73
Rúbrica	XII Cole

39. PORTER, L.T. & AXELROD, J. - Subcellular localizati
on of catecholamines in tissues of the rat. J.
Pharmacol. exp. Theor., Baltimore, 142: 291-298,
1963.
40. ROBINSON, R.; RATCLIFFE, J. & SMITH, P. - A screen-
ing test for pheochromocytoma. J. clin. Path.,
London, 12: 541-543, 1959.
41. RUBIN, R.P. - The role of calcium in the release of
neurotransmitter substances and hormones. Pharma-
col. Rev., Baltimore, 22: 389-428, 1970.
42. ROSENBERG, E.L. & BONDY, K.P. - Duncan's Diseases of
Metabolism-Endocrinology. Seventh Edition, Phila-
delphia, W.B. Saunders Company, 1974. p.1203-1211.
43. SEARCY, L.R. - Diagnostic Biochemistry. New York, Mc
Graw-Hill Book Company, 1969, p. 143-151.
44. SJOERDSMA, A. - Catecholamine metabolism in patients
with pheochromocytoma. Pharmacol. Rev., Baltimo-

File No.	129
Proc. N.	148/73
Rúbrica	Recall

re, 11: 374-376, 1959.

45. SJOERDSMA, A.; LEEPER, L.C.; TERRY, L.L. & UDEN-FRIEND, S. - Studies on the biogenesis and metabolism of norepinephrine in patients with pheochromocytoma. J. clin. Invest., New Haven, 38: 31-38, 1959.
46. SOURKES, T.L. - Oxidative pathways in the metabolism of biogenic amines. Rev. canad. Biol., Montréal, 17: 328-366, 1958.
47. SANDLER, M. & RUTHVEN, C.R.J. - Quantitative colorimetric method for estimation of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in urine. Value in Diagnosis of Pheochromocytoma. Lancet, London, 2: 114 - 115, 1959.
48. STEINBERG, D. - Catecholamine stimulation of fat mobilization and its metabolic consequences. Pharmacol. Rev., Baltimore, 18: 217-235, 1966.

Fls. No.	130
Proc. N.	198/73
Rúbrica	juice

49. SUNDERMAN JUNIOR, F.W.; CLEVELAND, P.D.; LAW, N.C.
& SUNDERMANN, F.W. - A method for the determination of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid (vanil mandelic acid) for the diagnosis of pheochromocytoma. Amer. J. Clin. Path., Baltimore, 34: 293-312, 1960.
50. THOMAS, H. & DIRSCHEHL, W. - 3-methoxy-4-hydroxy-benzaldehyd (vanillin) als metabolit von adrenalin und noradrenalin. Acta endoc., Kopenhagen, 47: 69-75, 1964.
51. TIETZ, W.N. - Química Clínica Moderna, Primeira Edición, Mexico, Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V., 1972, p. 588-600.
52. VON EULER, U.S. - Distribution and metabolism of catechol hormones in tissues and axones. Recent Progr. Hormone Res., New York, 14: 483-493, 1958.
53. VON STUDNITZ, W. & HANSON, A. - Determination of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid in urine of high-

Fis. N.º	131
Proc. N.	198/73
Rúbrica	<i>J. L. L.</i>

volt age paper electrophoresis. Scand. J. clin. Lab. Invest., Oslo, 11: 101-105, 1959.

54. VARLEY, A. - Fraternal Clinical Biochemistry, London, 4th ed., 1967, p. 693.

55. WOIWOD, A.J. & KNIGHT, R. - The determination of 3-methoxy-4-hydroxy mandelic acid in urine. J. clin. Pathol., London, 14: 502-504, 1961.

56. NELSON, W.E.; VAUGHAN, V.C. & MCKAY, R.J. - Tratado de Pediatría. Sexta Edición, Barcelona, Salvat Editores S.A., 1971, p. 1240-1259.

57. WILLIAMS, M.C. & GEER, M. - Diagnosis of neuroblastoma by quantitative gas chromatographic analysis of urinary homovanillic and vanilmandelic acid. Clin. Chim. Acta, Amsterdam, 7:877-880, 1962.

Fls. N.º 132
Proc. N.º 198/73
Rúbrica *M. L. L.*

