UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

CARLOS ROBERTO SANT'ANA FILHO

Síntese de uréia enriquecida com o isótopo ^{13}C e/ou ^{15}N

PIRACICABA

2011

CARLOS ROBERTO SANT'ANA FILHO

Síntese de uréia enriquecida com o isótopo ^{13}C e/ou ^{15}N

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. José Albertino Bendassolli

PIRACICABA

2011

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Sant´Ana Filho, Carlos Roberto
Síntese de uréia enriquecida com o isótopo ^{13}C e/ou ^{15}N / Carlos Roberto Sant´Ana Filho; orientador José Albertino Bendassolli. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 5890 de 2010. - - Piracicaba, 2011.
154 p.: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Compostos de nitrogênio 2. Enriquecimento isotópico 3. Fertilizantes nitrogenados 4. Isótopos estáveis 5. Traçadores isotópicos I. Título

CDU 621.039.85:(616-071+631.841)

Aos meus pais Carlos Roberto de Sant'Ana e
Elaine Aparecida Bellanga de Sant'Ana
pelo Amor, carinho e incansável apoio ao longo de toda a minha vida.

Ao meu irmão
Rafael de Sant Ana pelo apoio e carinho.

A minha namorada
Josiane Cristina Margato pela compreensão, carinho e amor em todos os momentos.

Em especial a minha
avó Helena,
minha tia Lúcia e
meu tio Osvaldo Campos
pelo apoio a minha caminhada acadêmica, Amor e carinho.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, meus agradecimentos ao Prof. Dr. José Albertino Bendassolli, que sempre esteve disposto a me ajudar e, acima de tudo, foi o grande incentivador de novos desafios.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e à Universidade de São Paulo, que me ofereceram apoio institucional e infraestrutura necessária para o desenvolvimento das atividades de pesquisa.

À Fundação de Amparo e Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa e a bolsa de estudos.

Aos pesquisadores do Laboratório de Isótopos Estáveis do CENA/USP, Prof. Dr. Paulo C. O. Trivelin, Prof. Dr. Jefferson Mortatti e Prof. Dr. Helder de Oliveira pela amizade e colaborações.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Isótopos Estáveis do CENA/USP: Bento M. M. Neto, Clelber V. Prestes, José A. Bonassi, Hugo H. Batagelo, Juliana G. Giovannini, Miguel Baldessin, Glauco A. Tavares e Magda G. Bartolamei pelo carinho e auxílio na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Tadeu dos Santos Dias pesquisador do Departamento de Ciência Exatas da ESALQ/USP e ao Dr. Marcelo Corrêa Alves (Seção Técnica de Informática da ESALQ) pelo auxílio na interpretação dos dados estatísticos do trabalho.

Ao Prof. Dr. Cassio Hamilton Abreu Junior pesquisador do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do CENA/USP, Dr. Felipe Carlos Alvarez Villanueva e a Henriqueta M. G. Fernandes (bióloga e técnica do laboratório).

Ao Sr. José Mamprin Neto (Engenheiro Agrônomo) e Sr. Juliano Airton Basso (Supervisor de Laboratório) da empresa Vale Fertilizantes S/A pelo auxílio na execução do trabalho, em particular pela colaboração nas análises do projeto.

A Marilia pelo auxílio na edição da tese e as funcionárias da biblioteca do CENA/USP.

Aos companheiros de Pós Graduação do Laboratório de Isótopos Estáveis: Carlos Faro, Henrique, Alexssandra, Claudinéia, Josiane, Raul, Alexandre, Murilo, Graziela, Diego, Oriel, Danilo, Carol, Felipe, João, Rafael, Renato, Anderson, Diego, João Paulo pela amizade e colaboração no trabalho. Da mesma forma, agradeço aos estagiários do departamento: Laila Facin, André Vargas Ferreira, Carol, Rômulo pela agradável convivência.

Aos meus amigos e companheiros de Pós Graduação: Fernanda, Silvio, Paula e Anderson que fizeram dos nossos curtos encontros momentos inesquecíveis.

Ao desenhista João Geraldo Brancalion pelo apoio técnico no desenvolvimento do trabalho.

Ao Engenheiro Elétrico Sr. Denilson pelo apoio técnico (desenvolvimento de software, etc..) para análise isotópica realizadas no espectrômetro de massas ATLAS MAT, modelo CH4.

Ao técnico Osmir Pereira pelo apoio técnico, na pessoa de quem agradeço a todos os funcionários do setor de manutenção do CENA/USP.

A todos os professores do CENA/USP, pela convivência e conhecimentos transmitidos.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho.

Pouco conhecimento faz com que as pessoas se sintam orgulhosas.

Muito conhecimento, que se sintam humildes.

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

SANT'ANA FILHO, C. R. **Síntese de uréia enriquecida com o isótopo ^{13}C e/ou ^{15}N**. 2011. 154 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

No presente trabalho foi sintetizada a $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, enriquecida em ^{13}C e/ou ^{15}N, a partir da reação entre ^{13}CO, $^{15}NH_3$, S e CH_3OH (meio líquido), sob baixa pressão e temperatura, com simultânea produção de H_2S. A reação ocorreu em reator de aço inoxidável, revestido internamente com politetrafluoretileno. Inicialmente, adicionou-se S no interior do reator. Na sequência, esse foi fechado e, sob pressão reduzida (10^{-3} MPa) e temperatura de 4 ºC, transferiu-se o CH_3OH, H_2S, $^{15}NH_3$ e ^{13}CO. Logo após, o reator foi colocado em um sistema de aquecimento (100 ºC), sob agitação mecânica. Ao final do tempo de reação (150 minutos), desligou-se o aquecimento e o reator foi resfriado (± 25 ºC). Os gases resultantes do processo de síntese como $^{15}NH_3$ e H_2S foram recuperados em soluções de H_2SO_4 e H_2O_2:NaOH. Em seguida, abriu-se o reator e removeu-se a mistura ($^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, CH_3OH e S) que foi submetida a procedimentos (filtração à vácuo, purificação química (CH_3COCH_3) e físico-química (resinas catiônica e aniônica)) para retirada de impurezas. Após, a $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ foi cristalizada (50 ºC) e realizaram-se análises físico-químicas (teor (%) de N, ponto de fusão (ºC), teor (%) de biureto, análise multielementar (mg/kg)), microbiológicas (bactérias, fungos e leveduras) e isotópicas (% em átomos de ^{13}C e/ou ^{15}N). As análises isotópicas foram realizadas em um espectrômetro de massas ATLAS-MAT, modelo CH4 (determinações absolutas), com admissão de amostras já convertida na forma gasosa. Desta forma, a obtenção do $^{13}CO_2$ e $^{15}N_2$ foi realizada utilizando o método via seca, onde a amostra de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ foi oxidada com CuO à 550 ºC em tubos de vidro (borossilicato), sob vácuo. Em seguida, os gases ($^{15}N_2$, $^{13}CO_2$ e H_2O), foram conduzidos por uma linha sob baixa pressão (10^{-3} MPa), acoplada "on line" ao sistema de admissão do espectrômetro. Esse procedimento tem a finalidade de eliminar as impurezas (interferências isobáricas) e vapor de H_2O, utilizando-se da criogenia, admitindo-se o $^{13}CO_2$ e/ou $^{15}N_2$ ao espectrômetro para análise. Com o sistema proposto, envolvendo a reação entre $^{15}NH_3$, ^{13}CO e S (6.13, 1,12 e 1,28 g, respectivamente), tendo ainda, 40 mL de CH_3OH e 40 mg de H_2S, foi possível obter, em média, 1,96 g de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ (rendimento de 81,97 %). O processo completo, por batelada, demanda de oito a nove horas, dependendo da fonte isotópica. A $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ sintetizada apresentou boa qualidade físico-química (46,2 % de N, ponto de fusão de 132,5 ºC, 0,55 % de biureto e teor (mg/kg) de elementos abaixo da concentração permitida pelo órgão fiscalizador) e microbiológica (< 10 UFC/g para bactéria, fungos e leveduras). Os resultados obtidos das determinações isotópicas de N e/ou C (% em átomos de ^{15}N e/ou ^{13}C) indicam a viabilidade do método analítico, não sendo verificada interferência nos níveis isotópicos. A utilização do sistema "on line" acoplado ao espectrômetro de massa proporcionou maior velocidade analítica e facilidade no preparo das amostras para determinação isotópica de C e/ou N. Os custos de produção da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, enriquecida em ^{13}C e/ou ^{15}N mostraram-se competitivos com os valores (preço FOB) de comercialização no mercado internacional.

Palavras-chave: ^{15}N. ^{13}C. Isótopos estáveis. Uréia. Compostos enriquecidos.

ABSTRACT

SANT'ANA FILHO, C.R. **Synthesis of ^{13}C- and/or ^{15}N-enriched urea**. 2011. 154 f. Tese (Doutorado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

In the present work $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ was synthesized from ^{13}CO, $^{15}NH_3$, S and CH_3OH reaction, at low pressure and temperature, with simultaneous H_2S production. The reaction proceeded in a stainless steel reactor, internally lined with polytetrafluoroethylene. Initially, S was added to the reactor and, after its shutting, under reduced pressure (10^{-3} MPa) and 4 °C, CH_3OH, H_2S, $^{15}NH_3$ and ^{13}CO were shifted. The reactor was placed in a heating system (100 °C), under magnetic stirring. At the end of the reaction (150 minutes), the heating was turned off and the reactor was cooled (± 25 °C). The resulting synthesis gases, like $^{15}NH_3$ and H_2S, were recovered in H_2SO_4 and H_2O_2:NaOH solutions. The mixture ($^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, CH_3OH and S) was removed and subjected to processes for removal of impurities (vacuum filtration, chemical and physical purification (CH_3COCH_3 and cationic and anionic resins, respectively)). The $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ was crystallized (50 °C) and physico-chemical (N content (%), melting point (°C), biuret content (%), multielemental analysis (mg kg^{-1})), microbiological (bacteria, fungi and yeasts) and isotopic (^{13}C and/or ^{15}N atoms %) analyses were carried out. The ^{13}C and/or ^{15}N analyses were performed using an ATLAS MAT-CH4 mass spectrometer (absolute determinations), with converted samples admission into gaseous form. Thus, $^{13}CO_2$, and $^{15}N_2$ were obtained by dry process, where $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ sample was oxidized with CuO at 550 ºC in borosilicate glass tubes, under vacuum. The gases ($^{15}N_2$, $^{13}CO_2$ and H_2O) were led by a line under low pressure (10^{-3} MPa), "on-line" coupled with the intake system of the mass spectrometer. This procedure aimed to eliminate impurities (isobaric interferences) and H_2O vapor, using cryogenics, admitting $^{13}CO_2$ and $^{15}N_2$ into the spectrometer for analysis. With the proposed system, involving the reaction among $^{15}NH_3$, ^{13}CO and S (6.13, 1.12 and 1.28 g, respectively), and further 40 mL of CH_3OH and 40 mg of H_2S was possible to obtain, on average, 1.96 g of $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ (81.97 % of yield). The entire process, in batch, demands eight to nine hours, depending on the isotopic source. The $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ showed good physico-chemical (46,2 % of N, melting point 132,5 ºC, 0,55 % biuret and elements content (mg kg^{-1}) lower than acceptable limits by legislation) and microbiological quality (< 10 CFU g^{-1} for bacteria, fungi and yeasts). The results of ^{15}N and/or ^{13}C isotopic determinations indicated the feasibility of the analytical method, with no isotopic interference. The "on-line" system coupled with mass spectrometry provided greater analytical speed and ease sample preparation. The production costs of $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ were competitive with FOB values in the international market.

Keywords: Synthesis. Urea. ^{15}N. ^{13}C. Stable isotope

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma de fabricação da $CO(NH_2)_2$, usando-se reciclagem total (Chemical Construction Co. e Chemical Engineering) (NORRIS; BRINK, 1997) 24

Figura 2 - Ciclo resumido do nitrogênio no solo (CANTARRELLA, 2007) 29

Figura 3 - Invasão das células epiteliais do estômago e do duodeno pelo *Helicobacter pylori* (HP), publicado pela Academia Australiana de Ciências (DESIGNPOINT, 2007) 35

Figura 4 - Kit registrado (AUST R 146728) por distribuidor Australiano, como "Diabact® UBT 50mg de $^{13}CO(NH_2)_2$", utilizado no diagnóstico da infecção por *H. pylori* 39

Figura 5 - Reator de pressão com revestimento de PTFE (vaso de reação e tampa de aço inoxidável) 46

Figura 6 - Reator para síntese de $CO(NH_2)_2$ enriquecida no isótopo ^{13}C e/ou ^{15}N 47

Figura 7 - Sistema de aquecimento com controle de temperatura e agitação mecânica ... 47

Figura 8 - Linha de fornecimento de CO para síntese de $CO(NH_2)_2$ 48

Figura 9 - Reservatórios de armazenamento e transferência da NH_3 (R_1) e do CO (R_2) para o reator 48

Figura 10 - Sistema de produção (A) e recipiente de armazenamento (R_V) do H_2S (B) 49

Figura 11 - Proteção de acrílico para reator de pressão 49

Figura 12 - Central de distribuição de N_2 (Comercial) com dois manômetros de duplo estágio e válvula de segurança 50

Figura 13 - Sistema completo (linha de vidro, reator de aço inoxidável, recipientes de vidro e aço inoxidáveis) utilizado no processo de síntese da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida em ^{13}C e/ou ^{15}N 51

Figura 14 - Sistema para a produção e armazenamento do H_2S 52

Figura 15 - Linha de vidro (borosilicato) para realização de vácuo no reator de síntese 54

Figura 16 - Processo de transferência do CH_3OH (l) ou CH_3CH_2OH (l) para reservatório de vidro (R_S) 55

Figura 17 - Processo de transferência da NH_3(g) para reservatório de aço inoxidável (R_1)..... 56

Figura 18 - Procedimento para admissão de NH_3(g) (R_1), CH_3OH ou CH_3CH_2OH (R_S) e H_2S (R_V) no reator 58
Figura 19 - Procedimento para transferência de CO (g) (R_2) para o reator de síntese 59
Figura 20 - Procedimento para adição de N_2 (g) no reator de síntese 60
Figura 21 - Sistema de aquecimento com controle da temperatura e agitação mecânica ... 62
Figura 22 - Reciclagem dos gases exauridos do reator em solução de H_2SO_4 e H_2O_2:NaOH, respectivamente 63
Figura 23 - Sistema de separação do CH_3OH acoplado diretamente ao reator de produção 64
Figura 24 - Procedimento de filtração à vácuo para retirada de impurezas da $CO(NH_2)_2$ .. 65
Figura 25 - Procedimento de purificação utilizando colunas com resina catiônica (A) e aniônica (B) para retirada de impurezas da $CO(NH_2)_2$. (C) Colunas de vidro acopladas em série para o procedimento..... 66
Figura 26 - Sistema de destilação de solventes orgânicos (Laboratório de Tratamento de Resíduos do CENA/USP) 68
Figura 27 - Espectrômetro de massas ANCA-GSL (sistema com analisador automatizado) 70
Figura 28 - Tubo de Teflon (PTFE) de 65 mL, pressão até 20 bar e temperatura de 200 ºC (A) e rotor (Multiprep) com capacidade para 41 amostras simultâneas (B). 73
Figura 29 - Micro-ondas Milestone, modelo Ethos Plus Microwave Labstation e computador acoplado, rotor suporta até 41 tubos de digestão simultaneamente 74
Figura 30 - Espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) localizado no Laboratório de Nutrição de Plantas do CENA/USP 75
Figura 31 - Procedimento para estrangulamento da parte superior da ampola de vidro (borossilicato) 77
Figura 32 - Realização de vácuo e fechamento das ampolas contendo $CO(NH_2)_2$ 77
Figura 33 - Frascos âmbares e ampolas (borossilicato) contendo $CO(NH_2)_2$ 78
Figura 34 - Fluxograma do processo de diluição isotópica entre $CO(NH_2)_2$ com abundância isotópica natural (1,07 % em átomos de ^{13}C) e altamente enriquecida (99,7 % em átomos de ^{13}C) 79
Figura 35 - Procedimento para estrangulamento da parte superior do tubo de vidro (borossilicato) 81

Figura 36 - Fechamento do tubo de vidro após realização de vácuo 82
Figura 37 - Forno mufla utilizado na combustão da $^{13}CO(NH_2)_2$ 82
Figura 38 - Linha de admissão do $^{13}CO_2(g)$ diretamente ("on line") ao sistema de admissão do espectrômetro de massas Atlas Mat, CH4. (1) - Armadilha criogênica contendo $CO_2(s)$ e C_2H_5OH (1) (-70 ºC); (2) – Armadilha criogênica contendo N_2 (l) (-196 ºC) 83
Figura 39 - Espectrômetro de massas ATLAS MAT, modelo CH4 84
Figura 40 - Espectro de massas de $^{13}CO_2$, massa 44, 45 e 46, para amostra de $^{13}CO(NH_2)_2$ com 50 % em átomos de ^{13}C 85
Figura 41 - Fluxograma para obtenção da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ duplamente marcada 86
Figura 42 - Processo de transferência do $^{13}CO(g)$ para reservatório de aço inoxidável (R_2) 90
Figura 43 - Sistema completo de produção de $^{15}NH_3$ anidra (BEDASSOLLI et al., 2002). 92
Figura 44 - Balanço de massa (%) dos principais reagentes (NH_3 e CO) durante a avaliação do rendimento de síntese da $CO(NH_2)_2$ em função da quantidade (0, 25, 50, 100, 150, 200, 300 e 350 % em excesso) de NH_3 na reação 97
Figura 45 - Balanço (%) de massa dos reagentes principais (NH_3 e CO) durante a avaliação do rendimento de síntese da $CO(NH_2)_2$ em função da quantidade (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 % em excesso) de CO e S na reação 100
Figura 46 - Curva de solubilidade da $CO(NH_2)_2$ em CH_3OH e CH_3CH_2OH (Adaptada de BINGRONG et al., 1990) 107
Figura 47 - Soluções obtidas no processo de reciclagem (A) solução residual e (B) CH_3OH recuperado 108
Figura 48 - Soluções obtidas no processo reciclagem (A) Solução residual (B) CH_3COCH_3 recuperada 109
Figura 49 - Regressão Linear simples entre os valores da determinação (% em átomos de ^{13}C) isotópica teórica (ABUTEO) e experimental (ABUEXP), em amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$, por espectrometria de massas (IRMS) 127
Figura 50 - Regressão Linear simples entre os valores da determinação (% em átomos de ^{15}N e ^{13}C) isotópica teórica (ABUTEO) e a experimental (ABUEXP), em amostras de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, por espectrometria de massas (IRMS) 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Isótopos do elemento nitrogênio e carbono 18

Tabela 2 - Comparação entre processo de fabricação de $CO(NH_2)_2$ 25

Tabela 3 - Efeito das variáveis no tempo de reação de síntese do COS e da $CO(NH_2)_2$ 26

Tabela 4 - Concentração dos elementos na solução padrão multielementar de verificação da calibração (SVC) e da amostra certificada NIST 1515 72

Tabela 5 - Programa de aquecimento no forno de micro-ondas 74

Tabela 6 - Abundância isotópica teórica de ^{15}N e ^{13}C (% em átomos), das amostras de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, utilizando o processo de diluição isotópica 86

Tabela 7 - Rendimento da síntese de $CO(NH_2)_2$ em função da quantidade de NH_3 (0, 25, 50, 100, 150, 200, 300 e 350 % em excesso), CO (1,12 g) e S (1,28 g) na reação global. (n = 3) 96

Tabela 8 - Rendimento da síntese de $CO(NH_2)_2$ em função da quantidade de CO e S (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 % em excesso) e 1,36 g de NH_3 na reação global. (n = 3) 99

Tabela 9 - Rendimento da síntese de $CO(NH_2)_2$, obtida após processo de purificação química, em função do tempo (60, 90, 120 e 150 min) de reação e da presença do H_2S (C/H_2S e S/H_2S). (n = 3) 102

Tabela 10 - Rendimento da síntese de $CO(NH_2)_2$ em função da pressão (0,59; 0,78 e 0,98 MPa), com admissão de N_2 (gás inerte), na reação de síntese. (n = 3) 104

Tabela 11 - Rendimento da síntese de $CO(NH_2)_2$ em função da temperatura (80, 90, 100 e 110 ºC) na reação de síntese. (n = 3) 105

Tabela 12 - Rendimento da síntese de $CO(NH_2)_2$ em função meio líquido (CH_3OH e CH_3CH_2OH) da reação de síntese. (n = 3) 106

Tabela 13 - Determinação do teor (%) N das amostras de $CO(NH_2)_2$ utilizando espectrômetro de massas (ANCA-GSL) 110

Tabela 14 - Determinação do teor (%) de N das amostras de $CO(NH_2)_2$ utilizando método convencional (digestão e destilação Kjeldahl) 111

Tabela 15 - Determinação do teor (%) de N das amostras de $CO(NH_2)_2$ utilizando sistema com analisador automatizado 112

Tabela 16 - Teor (%) de N da amostra de $CO(NH_2)_2$ utilizando método convencional e sistema com analisador automatizado 113
Tabela 17 - Determinação do teor (%) de N das amostras de $CO(NH_2)_2$ por CF-IRMS (ANCA-GSL) 114
Tabela 18 - Determinação do ponto de fusão (ºC) e teor (%) de biureto nas amostras de $CO(NH_2)_2$. (n = 3) 115
Tabela 19 - Teor dos elementos determinados nos materiais certificados (SVC e NIST 1515) por ICP-MS. (n = 3) 117
Tabela 20 - Teor ($mg.kg^{-1}$) dos elementos inorgânicos, contido nas amostras de $CO(NH_2)_2$, obtidos após digestão em forno MW e determinação por ICP-MS (média ± desvio padrão; n = 3) 119
Tabela 21 - Contagem (UFC/g) de microrganismos viáveis, fungos e leveduras nas amostras de $CO(NH_2)_2$. (n = 3) 122
Tabela 22 - Determinação isotópica de C (% em átomos de ^{13}C) em função da quantidade (mg) de CuO e $^{13}CO(NH_2)_2$ 123
Tabela 23 - Determinação isotópica de C (% em átomos de ^{13}C) em função do tempo (3, 6 e 12 horas) de oxidação das amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$ 124
Tabela 24 - Determinação isotópica de C (% em átomos de ^{13}C) em dois diferentes espectrômetros de massas 125
Tabela 25 - Determinação isotópica de C (% em átomos de ^{13}C), em amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$, utilizando- se o método via seca 126
Tabela 26 - Determinação isotópica de C e N (% em átomos de ^{15}N e ^{13}C), em amostras de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, utilizando-se o método via seca 128
Tabela 27 - Custo fixos e variáveis na produção, por batelada, da $^{13}CO(NH_2)_2$ enriquecido a 99,2 % em átomos de ^{13}C 131
Tabela 28 - Custo fixos e variáveis na produção da $CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecido a 90,0 % em átomos de ^{15}N 133
Tabela 29 - Custo fixos e variáveis na produção da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecido a 73,6 e 99,2 % em átomos de ^{15}N e ^{13}C, respectivamente 135

SUMÁRIO

1.	**INTRODUÇÃO**	17
2.	**REVISÃO DA LITERATURA**	22
2.1	Síntese da uréia	22
2.2	Uréia como fonte nitrogenada	28
2.3	Uréia enriquecida em ^{13}C para diagnóstico da *Helicobacter pylori* (HP)	34
3.	**MATERIAL E MÉTODO**	42
3.1	Materiais	42
3.1.1	Vidrarias e acessórios	42
3.1.2	Equipamentos	42
3.1.3	Reagentes	43
3.1.4	Isótopos	44
3.1.5	Gases	44
3.1.6	Detalhamento do sistema utilizado para síntese de $CO(NH_2)_2$ enriquecida em ^{13}C e/ou ^{15}N	45
3.2	Métodos	50
3.2.1	Produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S)	50
3.2.2	Síntese de $CO(NH_2)_2$	53
3.2.2.1	Processo de carga do reator	53
3.2.2.2	Reação de síntese da $CO(NH_2)_2$	61
3.2.2.3	Reciclagem dos gases de exaustão e recuperação do CH_3OH	62
3.2.2.4	Processo de purificação da $CO(NH_2)_2$	65
3.2.3	Reciclagem dos solventes orgânicos (CH_3OH e CH_3COCH_3) utilizados no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$	67
3.2.4	Análise da qualidade físico-química da $CO(NH_2)_2$ sintetizada	69
3.2.4.1	Determinação do teor (%) de N	69
3.2.4.2	Determinação do ponto de fusão (ºC)	70
3.2.4.3	Análise do teor (%) de biureto	71
3.2.4.4	Determinações multielementares por espectrometria de massas, com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), nas amostras de $CO(NH_2)_2$ sintetizadas	71
3.2.4.4.1	Amostras e padrões	71

3.2.4.4.2 Preparo das amostras de $CO(NH_2)_2$ (digestão nítrica em sistema fechado) ... 73
3.2.4.4.3 Análise dos extratos por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) ... 75
3.2.5 Análise da qualidade microbiológica da $CO(NH_2)_2$ ... 76
3.2.5.1 Acondicionamento da $CO(NH_2)_2$ ... 76
3.2.5.2 Análise microbiológica da $CO(NH_2)_2$ ... 78
3.2.6 Método para determinação isotópica de C (% em átomos de ^{13}C), nas amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$, fazendo-se uso da espectrometria de massas (IRMS) ... 79
3.2.6.1 Obtenção das amostras de $CO(NH_2)_2$ enriquecida em ^{13}C ... 79
3.2.6.2 Método de oxidação da $^{13}CO(NH_2)_2$ por via seca ... 80
3.2.6.3 Determinação isotópica de C (% em átomos de ^{13}C) ... 83
3.2.7 Determinação isotópica simultânea C e N (% em átomos de ^{13}C e ^{15}N), em amostras de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, por espectrometria de massas ... 85
3.2.7.1 Obtenção de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ duplamente marcada em ^{13}C e ^{15}N ... 85
3.2.7.2 Método de Oxidação da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ por via seca ... 87
3.2.7.3 Determinação isotópica simultânea de N e C (% em átomos de ^{15}N e ^{13}C) ... 87
3.2.8 Síntese de $CO(NH_2)_2$ enriquecida em ^{13}C e/ou ^{15}N ... 89
3.3 Análise estatística dos resultados ... 93
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO ... 94
4.1 Produção do sulfeto de hidrogênio (H_2S) ... 94
4.2 Síntese da $CO(NH_2)_2$ ... 94
4.3 Reciclagem dos solventes orgânicos (CH_3OH e CH_3COCH_3) utilizados no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$ ... 107
4.4 Análise da qualidade físico-química da $CO(NH_2)_2$ ... 110
4.4.1 Determinação do teor (%) de N ... 110
4.4.2 Determinação do ponto de fusão (ºC) e do teor (%) de biureto nas amostras de $CO(NH_2)_2$ ... 115
4.4.3 Determinação multielementar nas amostras de $CO(NH_2)_2$ por ICP-MS ... 117
4.5 Análise da qualidade microbiológica da $CO(NH_2)_2$ sintetizada ... 121
4.6 Análise isotópica ... 122
4.6.1 Preparo das amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$ para determinação isotópica de C ... 123
4.6.2 Determinação isotópica de C (% em átomos de ^{13}C) ... 125

4.6.3 Determinação isotópica simultânea de N e C (% em átomos de ^{15}N e ^{13}C) ... 127
4.7 Síntese da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida no isótopo de ^{15}N e/ou ^{13}C 129
5. CONCLUSÕES 137
REFERÊNCIAS 139

1. INTRODUÇÃO

O carbono tem papel central na estrutura e função do sistema Terra-Atmosfera-Biosfera, uma vez que a matéria orgânica viva é composta principalmente de carbono. Os ciclos de outros elementos importantes como nitrogênio e oxigênio são influenciados pelo ciclo do carbono e as alterações antrópicas em muitas fases do seu ciclo biogeoquímico influenciam no equilíbrio de vários ecossistemas e da atmosfera global (MARTINELLI et al., 2009). Não por menos, o ciclo do nitrogênio vem sendo bastante estudado em função de seu papel no metabolismo de aminoácidos e proteínas. O nitrogênio é considerado um fator limitante para a produção primária, tanto na terra como no ambiente aquático, uma vez que o mesmo é o principal componente das enzimas que controlam as reações bioquímicas nas quais o carbono é reduzido e oxidado (SCHELSINGER, 1991).

Os elementos carbono e nitrogênio apresentam vários isótopos estáveis e radioativos, como pode ser observado na Tabela 1. O isótopo estável ou nuclídeo estável é definido como os átomos de um determinado elemento que possuem o mesmo número de prótons e diferente número de nêutrons. Por exemplo, todos os isótopos de carbono têm seis prótons (Z = 6), mas o isótopo estável de massa atômica 13 (^{13}C) tem um nêutron a mais (N = 7) que o seu isótopo estável mais abundante o ^{12}C (N = 6). Devido ao mesmo número de prótons, eles ocupam a mesma ("iso") posição ("topo") na tabela periódica e possuem diferentes massas, porém apresentam propriedades químicas idênticas. Certos isótopos, como o ^{14}C, são radioativos e sofrem decaimento no decorrer do tempo (meia vida de 5730 anos), emitindo partículas β^-. Por outro lado, o ^{13}C não se desintegra, permanecendo estável permanentemente. A existência dos isótopos raros mais pesados, do carbono (^{13}C) e do nitrogênio (^{15}N), possibilita a produção de compostos marcados ou enriquecidos nestes isótopos, caracterizados por apresentarem abundâncias isotópicas acima da natural. Estes compostos por sua vez possibilitam o uso da técnica isotópica do traçador, na elucidação de muitos aspectos relacionados em diversas áreas da ciência.

A técnica isotópica que emprega os isótopos de ^{15}N e/ou ^{13}C como traçadores consiste, basicamente, em fornecer ao organismo em estudo um composto químico no qual a razão isotópica ($^{15}N/^{14}N$ e/ou $^{13}C/^{12}C$) do composto considerado é diferente da natural, e em seguida avaliar a distribuição do isótopo no sistema em estudo. Em muitos trabalhos de pesquisa, envolvendo a técnica isotópica com ^{15}N e/ou ^{13}C, em especial na área biomédica, existe a necessidade de utilização de compostos altamente enriquecidos nos isótopos de interesse, devido à diluição isotópica dos sistemas em estudo (KNOWLES; BLACKBURN, l993).

Esses compostos até recentemente não eram produzidos no Brasil e América do Sul, devido a dificuldades de ordem metodológica, e para as pesquisas envolvendo estes compostos, existia a necessidade de importação dos Estados Unidos, da Europa ou Ásia.

Deve-se ressaltar que a tecnologia de enriquecimento e síntese de compostos químicos marcados no isótopo estável de ^{15}N e/ou ^{13}C não é repassada pelos países que a detêm, em razão de interesses de ordem econômica e, muitas vezes, estratégicos, o que torna extremamente importante o desenvolvimento de novas tecnologias para o enriquecimento e síntese de compostos marcados no Brasil.

Tabela 1 - Isótopos do elemento nitrogênio e carbono

Isótopos	Abundância isotópica natural (%)	Tipo de desintegração	$T_{½}$ (meia vida)
^{12}N		β^+	0,011 s
^{13}N		β^+	9,97 min.
^{14}N	99,635	Estável	
^{15}N	0,365	Estável	
^{16}N		β^-	7,2 s
^{17}N		B^- (n)	4,16 s
^{18}N		β^-	0,63 s
^{11}C		β^+	20,3 min.
^{12}C	98,892	Estável	
^{13}C	1,108	Estável	
^{14}C		β^-	5730 anos
^{15}C		β^-	2,45 s
^{16}C		β^-	0,75 s

Fonte: adaptado de DAVID, 2005; BOUTTON, 1991.

Na maioria dos estudos com isótopos estáveis (traçador), empregam-se os isótopos dos elementos leves e, o nitrogênio e seus isótopos têm grande importância nos estudos dos sistemas biológicos, além de participarem na maioria das reações biogeoquímicas (FRITZ; FONTES, 1989). Em diversas áreas das ciências agronômicas (fertilidade e química do solo, nutrição de plantas, entre outras), as técnicas isotópicas com ^{15}N revelaram-se uma importante ferramenta, cabendo ressaltar aqui alguns trabalhos publicados recentemente por pesquisadores brasileiros (BOARETTO et al., 2007; FENILLI et al., 2007; FARONI et al.,

2007; DUETE et al., 2008; DAMIN et al., 2010a; 2010b; entre outros). Cabe salientar, ainda, que há uma tendência internacional voltada para o uso dos isótopos estáveis em trabalhos de campo, sempre que possível, restringindo, desta forma, o uso de compostos radiomarcados em experimentos dessa natureza (ZHAO et al., 2001; TRIVELIN, 2002; BENDASSOLLI et al., 1997).

Na literatura médica, vários estudos destacam-se utilizando isótopos estáveis de nitrogênio, principalmente em estudos de metabolismo proteico, cujas finalidades específicas são a evolução no esclarecimento do metabolismo dos aminoácidos no homem e o estabelecimento das necessidades básicas diárias desses nutrientes (WATERLOW, 1981; STACK et al., 1989; YOUNG, et al., 1995; DICHI, et al., 1997; MAESTA et al., 2008). O interesse em se conhecer as necessidades básicas diárias dos aminoácidos reveste-se de particular importância em saúde pública, estendendo desde a elaboração dos protocolos de alimentação em determinados grupos populacionais. Um dos métodos, utilizando o isótopo de ^{15}N, para estimar a cinética total corpórea das proteínas foi a administração de ^{15}N-Glicina (98 % em átomos) (BASILE FILHO; MARCHINI, 2004).

As aplicações dos isótopos estáveis de carbono podem ser feitas com compostos enriquecidos no isótopo naturalmente menos abundante do elemento (^{13}C) ou, com uso das variações na razão ($^{13}C/^{12}C$) isotópica natural, expresso na terminologia delta por mil ($\delta‰$), relativo ao padrão internacional (*PeeDee Belemnite*-PDB). Segundo Friedman e O'Neil (1977), citados por Ducatti et al. (1979), padrão PDB é aceito universalmente na comparação das composições isotópicas do carbono. Trata-se do fóssil carbonatado sólido da era cretáceos, denominado Belemnitela americana, da formação PeeDee da Carolina do Sul, Estados Unidos, o qual foi empregado inicialmente como padrão por Craig (1957).

Na área ambiental, a medida da razão ($^{13}C/^{12}C$) isotópica do carbono é usada para monitorar variações climáticas e o impacto da atividade humana, na geoquímica para o acompanhamento de atividades vulcânicas (ZANASI et al., 2006). Em nutrição animal é útil em estudos de identificação de dietas naturais, determinação de digestabilidade e até mesmo em estudos de metabolismo de diferentes tecidos. Nessa área pode-se citar os estudos com aves (CARRIJO et al., 2000; DENADAI et al., 2006), peixes (ZUANON et al., 2006) e outras espécies de animais.

Na Ciência do Solo, os valores de $\delta‰$ ^{13}C tem sido usados na avaliação do "turnover" da matéria orgânica do solo (BOUTTON, 1996). No sistema solo-planta a razão natural dos isótopos de carbono ($^{13}C/^{12}C$), no carbono orgânico do solo, contém informações relativas à presença ou ausência de plantas do ciclo fotossintético C3 (baixa razão $^{13}C/^{12}C$) e C4 (alta

razão $^{13}C/^{12}C$) na comunidade de plantas do passado e a contribuição relativa da comunidade na produtividade primária líquida, no tempo. Mudanças e alterações na produtividade relativa de plantas C3 e C4 em um ecossistema, no tempo, são frequentemente atribuída às mudanças ou distúrbios no regime ou clima (VITORELLO et al., 1989; NEILL et al., 1997; GEHRING; VLEK, 2004; PESSENDA et al., 2010). Em pesquisa sobre aspectos relacionados à fisiologia de plantas, é importante, uma vez que as razões ($^{13}C/^{12}C$) entre esses dois tipos de plantas podem auxiliar diretamente no estudo da fotossíntese, na determinação dos ciclos fotossintéticos, na translocação e na alocação de carbono e estresse hídrico (EHLERINGER et al., 1993).

Recentemente a técnica isotópica, com medida de $\delta‰$ ^{13}C, tem-se se destacado em avaliações da origem vegetal de alimentos e bebidas (OLIVEIRA et al., 2002; QUEIROZ et al., 2009), e vem se tornando um interessante instrumento analítico para confirmar a qualidade dos produtos alimentícios (KAROUI et al., 2007; SOUZA-KRULISKI et al., 2010)

A técnica utilizando materiais enriquecidos no isótopo de ^{13}C é de grande importância em pesquisas médicas, como marcadores biológicos, inócuo ao homem. Destacando-se estudos do metabolismo de substâncias de alta relevância fisiológica, como os ácidos graxos, os carboidratos e os aminoácidos (MATTHEWS; BIER, 1983; BASILE FILHO et al., 1998) e em testes respiratórios para examinar a função hepática microssomal (OLIVEIRA et al., 2006) e no diagnóstico (não invasivo) da infecção por *Helicobacter pylori* (CASTRO et al., 2004). A técnica com uso de isótopos estáveis de C é ainda mais importante à medida que cada vez mais substitui a utilização do isótopo radioativo ^{14}C e para validar e complementar estudos com o uso do isótopo estável (COLEMAN; FRY, 1991). Mesmo assim o seu uso ainda é limitado pela dificuldade de obtenção e considerável preço no mercado internacional, variando proporcionalmente com o enriquecimento e composto. Como exemplo pode-se mencionar a $CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida a 98 % em átomos de ^{15}N com preço médio de US$ 253.00/g, enquanto a $^{13}CO(NH_2)_2$, enriquecida a 99 % em átomos de ^{13}C, tem preço FOB de US$ 126.00/g . Esse valor (US$) é ainda maior para a $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ duplamente enriquecida (99 e 98 % em átomos de ^{13}C e ^{15}N, respectivamente), tendo custo médio de US$ 693.00/g do composto (CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES INC., 2010).

Especificamente com relação à separação isotópica de elementos leves (^{15}N, ^{10}B e ^{34}S) e a produção, no Brasil, de compostos marcados nos isótopos pesados de elementos leves, destaca-se o Laboratório de Isótopos Estáveis do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). Nesse foi desenvolvido no início dos anos setenta o primeiro sistema para enriquecimento isotópico ($^{15}NH_4^+$), por cromatografia de troca iônica, em sistema de colunas

contendo resina catiônica (TRIVELIN, l976; TRIVELIN et al., l979). A partir de 1996, foi avaliada nova metodologia para separação dos isótopos de nitrogênio (MAXIMO, 1998), envolvendo a regeneração da resina catiônica com solução de $(NH_4)_2SO_4$ em substituição à solução de H_2SO_4 (TRIVELIN et al., 1979), objetivando redução nos custos de produção. Os autores utilizaram de três sistemas de colunas de resina catiônica que foram acoplados em sistema cascata (MAXIMO et al., 2000), sendo possível à obtenção de $(^{15}NH_4)_2SO_4$ com um nível de enriquecimento de até 95 % em átomos de ^{15}N. Assim, foi possível a produção de outros compostos nitrogenados: $^{15}NH_3$(aq) e $^{15}NH_3$ anidra (BENDASSOLLI et al., 1988; 2002); $CO(^{15}NH_2)_2$ (BENDASSOLLI et al., 1989a); uran-^{15}N (BENDASSOLLI et al., 1989b); mistura de $CO(^{15}NH_2)_2/(^{15}NH_4)_2SO_4$ e $CO(^{15}NH_2)_2$/KCl em pérolas (BENDASSOLLI et al., 1991); $(^{15}NH_4)_2{}^{34}SO_4$ (MAXIMO et al., 2005); Alanina-^{15}N (OLIVEIRA, 2001); Glicina- ^{15}N (TAVARES et al., 2006); $H^{15}NO_3$ (SANT ANA FILHO et al., 2008); Glifosato-^{15}N (TAVARES et al., 2010).

Outro fato importante é que o CENA/USP possui laboratórios de espectrometria de massas e pessoal qualificado para análise de isótopos estáveis com tradição de mais de 30 anos, facilitando o desenvolvimento de métodos para determinação isotópica nos compostos produzidos. Ressalta-se, ainda, que os custos de produção dos compostos enriquecidos, no país, têm se mostrado inferiores em relação ao preço FOB (comercialização internacional). A disponibilidade de compostos marcados no isótopo ^{15}N, no país, impulsionou significativamente as pesquisas com o emprego de traçador não radioativo.

Portanto esses fatores justificam a realização do trabalho proposto, que tem como objetivo geral o estabelecimento de método para produção da $CO(NH_2)_2$ enriquecida no isótopo ^{13}C e/ou ^{15}N, abrindo amplas perspectivas de aplicação do composto em diversas áreas da ciência, principalmente na área agronômica e biomédica.

O desenvolvimento do trabalho em apreço compreende alguns objetivos específicos, como: a) Avaliar o rendimento (%) da síntese de $CO(NH_2)_2$, em triplicata, em função dos parâmetros (quantidade de reagentes, tempo de reação, admissão de H_2S, pressão no reator, meio líquido e temperatura da reação) envolvidos no processo; b) Análise da qualidade (físico-química e microbiológica) da $CO(NH_2)_2$ sintetizada e reciclagem dos resíduos gerados no processo; c) Desenvolvimento de método para determinação isotópica de C e/ou N (% em átomos de ^{13}C e/ou ^{15}N), em amostras de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, por espectrometria de massas (IRMS); d) Síntese da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida no isótopo ^{13}C e/ou ^{15}N e avaliação econômica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Síntese da uréia

A uréia ($CO(NH_2)_2$), isolada da urina por Rouller em 1773, foi o primeiro composto orgânico sintetizado artificialmente em 1828 por Friedrich Wohler's, obtido a partir do aquecimento do cianato de amônio (NH_4CNO), de acordo com a reação 1. Quando Wohler tratou cianato de prata (AgOCN) com cloreto de amônio (NH_4Cl), ele isolou um material cristalino branco com as mesmas propriedades do cianato. Esse material foi testado contra $CO(NH_2)_2$ (isolado da urina) e constatou que os dois eram idênticos. Assim, descobriu que o NH_4CNO tinha rearranjado para forma de $CO(NH_2)_2$ (BATCHELOR et al., 1998).

$$NH_4CNO(l) \xrightarrow{\Delta} CO(NH_2)_2(s) \qquad (1)$$

Durante muitos anos, este composto ($CO(NH_2)_2$), foi de importância industrial relativamente pequena e era obtido pela hidrólise ácida do cianeto de cálcio ($CaCN_2$), como pode ser observado na reação 2. Em 1933, a Du Pont começou a produzi-la em Belle, Virginia Ocidental e até 1950 foi o único produtor americano obter em escala comercial a $CO(NH_2)_2$ sólida (NORRIS; BRINKS, 1977).

$$CaCN_2 + 3H_2O \rightarrow CO(NH_2)_2 + Ca(OH)_2 \qquad (2)$$

Atualmente, a produção da $CO(NH_2)_2$ é um processo muito importante, praticado em diversos países, com aproximadamente 700 plantas de diferentes capacidades, sendo a produção mundial da ordem de 80 milhões de toneladas por ano. As melhorias no processo capazes de produzir redução do consumo energético são, evidentemente, muito importantes tanto no ponto de vista econômico como também no ambiental (BOZZANO et al., 2003).

A $CO(NH_2)_2$ é sintetizada comercialmente a partir da reação entre a amônia (NH_3) e dióxido de carbono (CO_2), sob condições que dependem da tecnologia empregada na planta industrial. Na maioria dos processos a reação de síntese é realizada na fase líquida (solução), sob pressão de 13 a 25 MPa e temperatura de 170 a 200 ºC. No entanto, na prática industrial a temperatura de reação excede 210 ºC, devido que as duas reações (3 e 4) da síntese

combinadas são exotérmicas e, em geral, é necessário efetuar o resfriamento. O completo levantamento das tecnologias (sistemas operacionais) de produção foi publicado por Chao (1967) e posteriormente por Uchino (1986) e Stamicarbon Staff (1986).

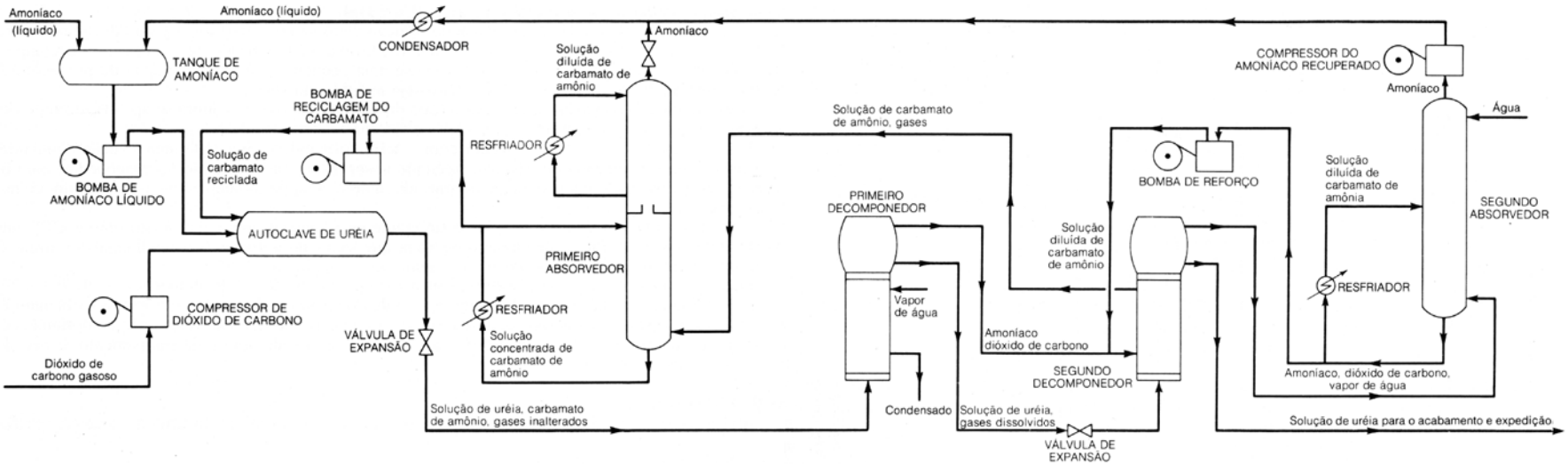
$$CO_2 + 2NH_3 \rightarrow NH_4CO_2NH_2 \quad \Delta H = -\ 37.000 \text{ kcal/mol} \qquad (3)$$

$$NH_4CO_2NH_2 \rightarrow CO(NH_2)_2 + H_2O \quad \Delta H = +\ 10.000 \text{ kcal/mol} \qquad (4)$$

O produto da reação de síntese tem a formação do carbamato de amônio ($NH_4CO_2NH_2$) como intermediário, que em seguida, desidrata formando a $CO(NH_2)_2$ (reação 4). Em pressões elevadas essa dissociação de formação do $NH_4CO_2NH_2$ é rápida e completa, enquanto que a desidratação é mais lenta (ISLA et al., 1993). A conversão de equilíbrio geralmente atinge valores na faixa de 50 a 80 %, com base na proporção de NH_3/CO_2 no reator (LEMKOWITZ et al., 1973). Além disso, estudos relatados na literatura, revelaram a formação de biureto ($NH_2CONHCONH_2$), que é a principal de impureza do processo de produção da $CO(NH_2)_2$ (MIKKELSEN, 2007). O composto (biureto) se forma por aquecimento do fertilizante ($CO(NH_2)_2$) a 150-160 ºC em certas fases do processo de fabricação, como nos granuladores por evaporação (reação 5). Como biureto é tóxico para as plantas, seu teor em fertilizantes tem de ser mantido o mais baixo possível.

$$2\ CO(NH_2)_2 \xrightarrow{\Delta} NH_2CONHCONH_2 + NH_3 \qquad (5)$$

Para superar essas limitações, impostas pelo equilíbrio químico na conversão da $CO(NH_2)_2$, várias tecnologias no processo de produção foram desenvolvidas nas unidades comerciais. Esses processos normalmente são classificados como: de uma só passagem, reciclagem parcial e reciclagem total (ISLA et al., 1993; IRAZOQUI et al., 1993; NORRIS; BRINKS, 1977). No processo de reciclagem total, que é amplamente empregado, toda a NH_3 que deixar a seção de síntese é reciclada para o reator e a conversão global (NH_3 a $CO(NH_2)_2$) atinge rendimento de 99 % (HAMIDIPOUR et al., 2005). A Figura 1 e a Tabela 2 representam o processo de reciclo total em fase aquosa da Chemical Construction Co. que opera a 22,29 MPa (220 atm) e entre 182 e 193 ºC (NORRIS; BRINKS, 1977). Processos Stamicarbon e Snomprogetti são os mais comuns exemplos dessa tecnologia (DENTE et al., 1988; SATYRO et al., 2003).



Por 1000 kg de $CO(NH_2)_2$

NH_3 líquido	590 Kg
CO_2 gasoso	760 Kg
Conversão ($NH_4CO_2NH_2$ à $CO(NH_2)_2$	40-60 %
Eletricidade	182 kWh
Vapor de H_2O (10 atm, Sat)	2000 Kg
H_2O refrigeração (por ºF de elevação)	83 m^3

Figura 1 - Fluxograma de fabricação da $CO(NH_2)_2$, usando-se reciclagem total (Chemical Construction Co. e Chemical Engineering.) (NORRIS; BRINK, 1997)

Em projetos de usinas de grande porte, os decomponedores, apresentados na Figura 1, são substituídos por uma torre de decomposição e de extração a quente. Nessa torre, o $NH_4CO_2NH_2$ é decomposto, e o NH_3 (g) quente e o CO_2 que não reagiu são comprimidos e retornam ao reator de $CO(NH_2)_2$ (CHAUVEL; LEFEBVRE, 1989; NORRIS; BRINKS, 1977). Com isso há uma economia muito grande de mão de obra e equipamentos, principalmente nas grandes fábricas.

Tabela 2 - Comparação entre processo de fabricação de $CO(NH_2)_2$

Processo	Utilidades necessárias por tonelada de $CO(NH_2)_2$		
	Vapor (kg)	Eletricidade (kWh)	H_2O Refrigeração (m^3)
Convencional	1.089-1.452	132-170	61-110
SNAM	862	105	57
Stamicarbon*	953●	125●	55●
Weatherly	1.270◘	15◘	87◘
Mitsui Toatsu	726♦	130♦	61♦
Processo D	771	155	-
Mavrovic convencional	581	115	55

*As usinas mais recentes operam 5-10 %; ●São disponíveis 136 Kg de vapor em excesso, a 3,4 atm; ◘Compressor movido a vapor; ♦Compressor elétrico.
Fonte: NORRIS; BRINK, 1997

Apesar dos inúmeros métodos de produção de $CO(NH_2)_2$, utilizando vários reagentes, apenas um processo baseado na reação de CO_2 e NH_3 a altas pressões (13-20 MPa) e temperaturas (180-200 ^oC) é utilizado na indústria brasileira. O processo requer equipamentos especiais, pelas condições de trabalho e características específicas da reação (alta corrosividade e tendência de cristalização), além de ser um processo em multiestágio que envolve grande investimento de capital e alto consumo de energia (KARMAZINOV et al., 1971; MCDOWELL, 1974; KUCHERYAVYI et al., 1976).

Desde que a $CO(NH_2)_2$ tornou-se um dos fertilizantes mais usados, sua produção é importante para a indústria petroquímica, havendo muitas tentativas para modelar e simular o reator de produção da $CO(NH_2)_2$ como centro do processo (DENTE et al., 1995; HAMIDIPOUR et al., 2005).

A síntese da $CO(NH_2)_2$ fazendo-se uso da reação química que envolve CO (monóxido de carbono), NH_3 (amônia) e S (enxofre), a 100 ^oC, na presença do solvente CH_3OH (metanol), é um método alternativo ao processo convencional. Esse procedimento foi realizado, inicialmente em escala laboratorial (ou piloto), em reator tipo A-4, spec. 94-40376 com volume de 1,8 L (FRANZ; APPLEGATH, l96l). Nesse método avaliaram-se a influência da temperatura e quantidade de reagentes no rendimento do processo. De acordo com os resultados obtidos um decréscimo na temperatura de reação de 100 para 70 ^oC promoveu um aumento muito pequeno no tempo de reação do S na formação do COS (sulfeto de carbonila), no entanto, resultou em um aumento significativo no tempo de produção da $CO(NH_2)_2$. Na Tabela 3, podem-se observar os efeitos das variáveis do processo no tempo de reação.

Tabela 3 - Efeito das variáveis no tempo de reação de síntese do COS e da $CO(NH_2)_2$ [(a)]

Condições Alteradas	**Tempo para ½ do S reagir formando COS**	**Tempo para ¼ do rendimento teórico da $CO(NH_2)_2$**
	---------- (min) ----------	
Nenhuma	14	19
70 ºC	21	60
50 ºC	60	60
1/5 teórico NH_3	--	58
1/5 teórico S	8	12
1/5 teórico CO	--	13
0,8 mols de H_2S	18	47
0,8 mols de $CO(NH_2)_2$	14	36

(a) Base de comparação será a reação em um reator de pressão com capacidade 2 L, temperatura 100 ºC, 0,1 mols de H_2S, 300 g de CH_3OH e relação estequiométrica de NH_3, CO e S (1,2; 0,6 e 0,6 mols, respectivamente), para produção de 0,6 mols de $CO(NH_2)_2$ (Fonte: BENDASSOLLI, 1988).

Ainda utilizando-se 10,9 g de NH_3, 8,7 g de CO, 9,8 g de S, 44, 8 g CH_3OH, 0,6 g de H_2S, os autores chegaram a obter em torno de 13,5 g de $CO(NH_2)_2$, equivalente a um rendimento de 73 %. Deve-se ainda salientar que a reação de síntese teve duração de aproximadamente 1 hora à temperatura de 100 ºC.

O processo industrial de síntese envolvendo a reação entre NH_3, S e H_2S, foi possível obter $CO(NH_2)_2$ cristalina com 99,6 % de pureza e H_2S como subproduto do processo

(MONSANTO CHEMICAL COMPANY, l961). A reação ocorria sob uma pressão de 1,36 à 2,04 MPa e temperatura de 100 ºC, sendo representada pela equação (6).

$$1\ CO + 2\ NH_3 + 1S \leftrightarrows 1\ NH_2CONH_2 + 1\ H_2S \qquad (6)$$

O processo foi desenvolvido em um reator de aço inoxidável, em fluxo contínuo, em sistema contra-corrente e com reciclo. A solução alimentadora que apresentou resultados mais satisfatórios foi constituída de 25 % de NH_3 anidra, 4 % de H_2S, 20 % de S e 51 % de CH_3OH. O rendimento do processo, em termos de NH_3 e S foi em torno de 99 % em condições ótimas de operação.

Entre os vários métodos, desenvolveram-se estudos no sentido de obter $CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida em ^{15}N, avaliando também a reação de síntese a partir da NH_3, CO e S, a baixa pressão e temperatura. O processo foi realizado em um reator de aço inoxidável com volume de 2 L, equipado com jaqueta aquecedora, termômetro e um recipiente de vidro usado como vaso de reação. Para evitar as perdas de gases reagentes (NH_3 e CO), utilizou um sistema de agitação magnética. A temperatura de reação foi de 100 ºC, sob pressão de 1,22 a 1,91 MPa e com tempo de reação de três horas. Dessa forma, estudaram-se os efeitos do aumento do tempo de reação e da adição de H_2O no rendimento final do processo. O rendimento do processo-base (1 mol de NH_3, 1 mol de CO e 0,75 mol de S, temperatura de 100 ºC e tempo de reação de três horas) foi de 83 %; o produto final apresentou 0,1 % de biureto e 0,45-0,5 % de S, o que, segundo o autor, provavelmente não apresentaria problema algum na sua utilização (STINSON, l975).

No mesmo sentido, em outro estudo, avaliaram a síntese de uréia-^{15}N, com baixo enriquecimento (5 % em átomos de ^{15}N), a partir da reação entre $^{15}NH_3$, CO e S. Nesse, foi utilizado um reator de aço inoxidável com uma manta aquecedora e um manômetro de aço inoxidável para determinar a pressão do sistema e regular a quantidade de CO a ser introduzida no reator. No processo avaliou-se apenas a temperatura de reação de 90 ^{o}C e um único tempo de reação de 90 minutos e a $CO(^{15}NH_2)_2$ obtida apresentou pequena contaminação de metais pesados, proveniente das paredes do reator de síntese (BENDASSOLLI et al., 1989a).

O aspecto termodinâmico no processo de síntese de $CO(NH_2)_2$ foi avaliado utilizando os reagentes CO, S e NH_3. Com a análise termodinâmica, obtiveram-se resultados teóricos de conversão (%) de NH_3 em $CO(NH_2)_2$, em função da temperatura de reação, bem como a constante de equilíbrio do sistema em estudo para várias temperaturas (BENDASSOLLI;

VICTORIA, 1995).

Embora a análise termodinâmica indique que a conversão de NH_3 a $CO(NH_2)_2$ foi inversamente proporcional à temperatura, ela não explica a cinética da reação. Assim, à temperatura ambiente (298 K), o equilíbrio (conversão de 92,5 %) da reação pode ser obtido em tempo extremamente prolongado.

2.2. Uréia como fonte nitrogenada

O nitrogênio é um elemento fundamental para a vida dos organismos vivos. Para as plantas, exerce um papel vital. O nitrogênio é encontrado de forma abundante na atmosfera, no estado gasoso, representando 78 % em volume. No entanto, apresenta-se inerte, necessitando transformá-lo em forma assimiláveis pelas plantas. Embora alguns microrganismos possam assimilar o nitrogênio da atmosfera, transformando-o em substâncias aproveitáveis pelas plantas, na agricultura moderna esse elemento é fornecido na forma de alguns compostos químicos, que são conhecidos como fertilizantes (SANT ANA FILHO et al., 2008).

Entre os compostos nitrogenados utilizados como fertilizantes, destaca-se a uréia ($CO(NH_2)_2$), em virtude do menor preço por unidade de N, alta concentração de N (45 a 46 %), alta solubilidade, menor corrosividade em equipamentos de aplicação, compatibilidade com um grande número de outros fertilizantes e defensivos (inseticidas e fungicidas) e alta taxa de absorção foliar (em taxas de 10 a 20 vezes superiores as do elemento nas formas iônicas) (CANTARELLA et al., 2007). Essas vantagens mencionadas, tendo em vista a descoberta do gás natural (fonte de hidrogênio, utilizado na síntese industrial da $CO(NH_2)_2$), contribuíram para que a $CO(NH_2)_2$ represente cerca de 60 % dos fertilizantes nitrogenados comercializados no Brasil. A segunda fonte de maior expressão é o sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) com 19 % e a terceira o nitrato de amônio (NH_4NO_3) contribuindo em 12 % (BARBOSA FILHO et al., 2004).

A produção mundial alcançou 134,7 milhões de toneladas do produto, em 2007, concentrando-se 49 % dessa produção na China e na Índia. Por outro lado, esses mesmos países detém 54 % do mercado, o que requer ainda, no caso da Índia, uma parcela crescente de importação (FRANCO et al., 2007).

Há, entretanto, algumas desvantagens no uso da $CO(NH_2)_2$ como fertilizante, que devem ser mencionadas, tais como: perdas de N por volatilização de NH_3, especialmente

quando o fertilizante é aplicado na superfície do solo; perdas por lixiviação do próprio fertilizante, antes e durante a hidrólise, fitotoxidade da NH_3 (produto da hidrólise) e também a possibilidade de formação de biureto no processo industrial (altas temperaturas), que acima de 1% pode-se tornar tóxico para as plantas. Os principais processos que resultam nas perdas de nitrogênio do sistema solo-planta-atmosfera podem ser observados na Figura 2.

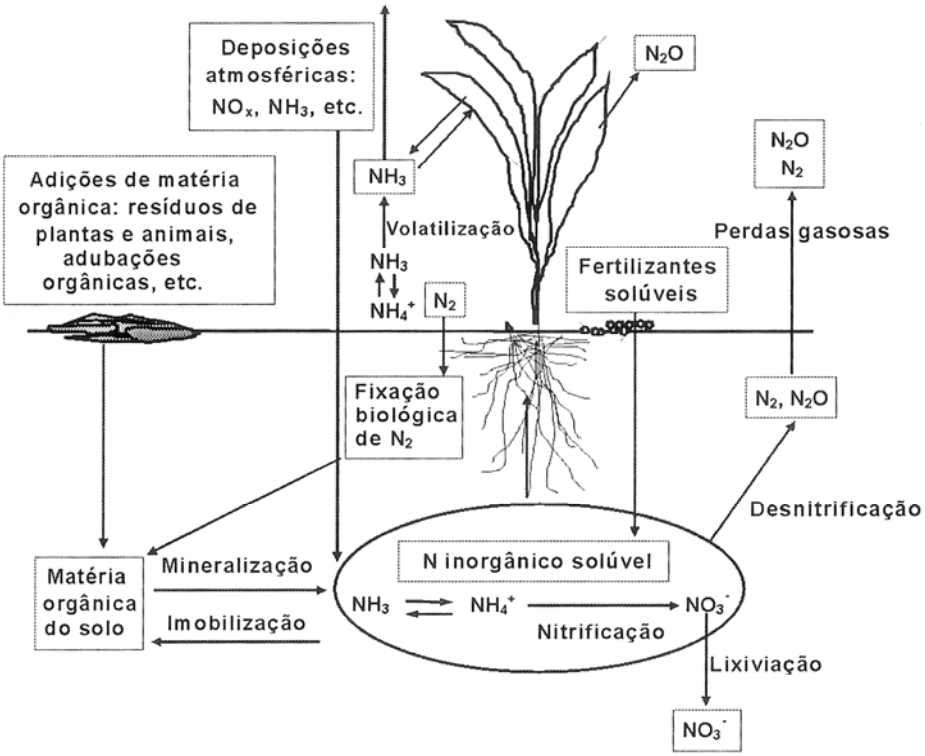


Figura 2 - Ciclo resumido do nitrogênio no solo (CANTARRELLA, 2007)

A $CO(NH_2)_2$ é um composto nitrogenado sólido, que se apresenta na forma de grânulos brancos, contêm 45 % de N na forma amídica e altamente higroscópico. Quando aplicada ao solo, a $CO(NH_2)_2$ é rapidamente hidrolisada pela ação da urease (2 a 3 dias), liberando $N\text{-}NH_4^+$, de acordo com as reações (7) e (8) (KOELLIKER; KISSEL, 1988). A urease é uma enzima extracelular produzida por bactérias, actinomicetos e fungos do solo ou, ainda, de origem em restos vegetais (COSTA et al., 2003). Devido as características da urease, fatores que influenciam a atividade do microorganismos também alteraram a hidrólise da $CO(NH_2)_2$, promovendo grande variação na taxa de hidrólise para diferentes solos (REYNOLDS; WOLF, 1987).

$$CO(NH_2)_2 + 2H^+ + 2H_2O \xrightarrow{\text{urease}} 2\,NH_4^+ + H_2CO_3 \qquad (pH < 6{,}3) \qquad (7)$$

$$CO(NH_2)_2 + H^+ + 2H_2O \xrightarrow{urease} 2\ NH_4^+ + H_2CO_3 \qquad (pH \geq 6{,}3) \qquad (8)$$

A hidrólise da $CO(NH_2)_2$ ocorre em solos com vários teores de umidade, porém, quanto mais rápida, maior o potencial de perda de N-NH_3 (VOLK, 1959). A adição de H_2O tem influência direta sobre a hidrólise, promovendo aumento da difusão da $CO(NH_2)_2$ e, consequentemente, maior contato com a urease no solo (SAVANT et al., 1987). Portanto a aplicação de $CO(NH_2)_2$ em solos secos é preferível à sua adição em solos úmidos (LARA CABEZAS et al., 1992).

A reação de hidrólise consome prótons (H^+) e provoca a elevação do pH, que pode atingir valores na região próxima aos grânulos do fertilizante aplicado (RODRIGUES; KIEHL, 1992) favorecendo a formação de NH_3. Desta forma mesmo em solos ácidos a $CO(NH_2)_2$ está sujeita a perdas de N-NH_3 por volatilização. Já outros fertilizantes nitrogenados como $(NH_4)_2SO_4$ e o NH_4NO_3, aplicados aos solos ácidos predominantes no Brasil, tendem a manter a maior parte do N na forma NH_4^+, que é estável.

Os fatores de solo mais importantes que influenciam as perdas de NH_3 por volatilização são o pH, a capacidade de troca iônica, o poder tampão, os teores de carbonato de cálcio e de matéria orgânica do solo (CORSI, 1994). O pH altera o equilíbrio entre os íon amônio (NH_4^+) e a forma gasosa , a amônia (NH_3) na solução do solo (reação 9). Desta forma, o aumento no pH, aumenta a concentração relativa de NH_3 e seu potencial de volatilização (TRIVELIN et al., 1994).

$$NH_4^+ \rightleftharpoons NH_3 + H^+ \qquad (9)$$

Quando se utiliza a $CO(NH_2)_2$, a quantidade e modo de aplicação ao solo são fatores que exercem acentuada influência em sua eficiência, devido ao comportamento desse fertilizante no solo, referente às transformações químicas, efeitos sobre pH e as perdas por volatilização. Barreto (1991) estudou as perdas por volatilização de NH_3 de duas fontes de N, em função da dose, profundidade de aplicação e umidade em três diferentes solos, concluindo que o aumento na dose de N acarretou no acréscimo nas perdas de NH_3. Em outro trabalho, Trivelin et al. (2002), estudando perdas do nitrogênio da $CO(NH_2)_2$ no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar, concluíram que as maiores perdas do N-$CO(NH_2)_2$ ocorreram quando o fertilizante foi aplicado na superfície. Essas perdas, que podem corresponder a até

50 % do N aplicado (TERMAN, 1979), diminuem o valor do fertilizante e contribuem para a poluição atmosférica.

Nesse contexto, com base na literatura, tem-se buscado solucionar as perdas de N por volatilização de NH_3, proveniente da $CO(NH_2)_2$, utilizando ferramentas como a incorporação do fertilizante no solo (LARA CABEZAS; YAMADA, 1999; CANTARELLA, et al., 1999), aplicação sob a palhada utilizando equipamento com pressurizador pneumático (NASCIMENTO, 2005), misturando-se com vinhaça (LARA CABEZAS et al., 1994; GAVA et al., 2001) e tratamento da $CO(NH_2)_2$ com inibidor de urease (TRENKEL, 1997; DOMINGUEZ et al., 2008; SANZ-COBERNA et al., 2008).

Em alguns casos, a eficiência da $CO(NH_2)_2$ pode ser afetada pela toxidez da NH_3. A rápida hidrólise do fertilizante no solo provoca uma acentuada elevação no pH e aumento na concentração de NH_3 em torno da região adubada. Nessas condições a pressão de vapor de NH_3, pode ser suficiente para causar efeitos tóxicos sobre a germinação de sementes e crescimento de plântulas. Esse problema geralmente ocorre quando a $CO(NH_2)_2$ é aplicado junto ou muito próximo da semente e pode ser contornado mantendo-se distancia adequada (GOULD et al., 1986; KARAMANOS et al., 2004).

A $CO(NH_2)_2$ também está sujeita a perdas por lixiviação por ser um composto de alta solubilidade em H_2O e não iônico, portanto, fracamente absorvidos aos colóides do solo que apresentam predominantemente cargas negativas. A retenção da $CO(NH_2)_2$ no solo decorre da formação de compostos com grupos carboxílicos da matéria orgânica e de complexos com minerais de argila; com valor baixo de pH, a $CO(NH_2)_2$ pode ser protonada e se comportar como cátion (GOULD et al., 1986). A taxa de lixiviação da $CO(NH_2)_2$, embora alta, é pouco inferior à do NO_3^-. Fatores como sistema de preparo, tipo de solo e formas de aplicação do fertilizante nitrogenado, podem influenciar tanto o fluxo de H_2O quanto a concentração de NO_3^- na solução do solo (WHITE, 1987).

Ao menos que chova intensamente nos dias subsequentes à adubação, a lixiviação de N na forma de $CO(NH_2)_2$ tem importância relativamente pequena, visto que este fertilizante é normalmente hidrolisado em poucos dias no solo, produzindo NH_4^+, o qual é retido pelas cargas negativas dos colóides (CANTARELLA, 2007). Por outro lado, vários autores observaram que o NH_4^+ proveniente da $CO(NH_2)_2$ tende a ser nitrificado mais rapidamente do que o $(NH_4)_2SO_4$, em virtude da elevação do pH do meio durante a hidrólise (SILVA; VALLE, 2000). Assim, o nitrogênio da $CO(NH_2)_2$ é inicialmente móvel, depois se torna pouco móvel (como NH_4^+) e finalmente, passa para uma forma bastante móvel (NO_3^-).

Outro aspecto negativo relacionado ao uso do fertilizante ($CO(NH_2)_2$) é a fitotoxidez do biureto ($NH_2CONHCONH_2$), formado pela decomposição termal da $CO(NH_2)_2$ durante fabricação, para as plantas. A $CO(NH_2)_2$ fertilizante comercial normalmente contém quantidades pequenas e variáveis de biureto como uma impureza, que é formada durante o processo de granulação do composto, quando aquecido próximo ao seu ponto de fusão de 132 ºC (MIKKELSEN, 1990). Muitos estudos foram feitos para determinar a máxima concentração de biureto tolerado pelas culturas, sendo observada maior sensibilidade para o café, citros, abacaxi, especialmente quando aplicados via foliar. A sensibilidade da cultura depende de muitos fatores como a espécie, propriedades de solo, o método e regulação de tempo da aplicação do fertilizante, e tanto concentração como soma total de biureto aplicado (MIKKELSEN, 2007).

O biureto não é conservado no solo e é facilmente lixiviado. Geralmente as plantas são menos sensíveis ao biureto quando ele é aplicado em solos contendo apreciável quantidade de argila ou matéria orgânica e ainda baixo valor de pH (MIKKELSEN, 2007). De uma maneira geral pesquisadores definiram um teor seguro de biureto na $CO(NH_2)_2$ em até 0,25 e 2,0 % quando o fertilizante for aplicado via foliar e diretamente no solo, respectivamente (MITHYANTHA et al., 1977). Já a legislação brasileira limita o teor de biureto na $CO(NH_2)_2$ em até 1,5% para recomendação de aplicação direta no solo e 0,3% para recomendação de aplicação foliar (BRASIL, 2007). Culturas menos sensíveis toleram concentrações de biureto até 3 % em $CO(NH_2)_2$ aplicada via foliar (KILMER; ENGLESTAD, 1973).

Nesse contexto, recomendações de adubações nitrogenadas devem ser bem planejadas, pois quando se utiliza N em quantidades excessivas ou situações desfavoráveis, ele pode ser perdido, ocasionando prejuízos econômicos e ambientais (CANTARELLA; MARCELINO, 2008).

Para o estudo do balanço de N existem dois métodos gerais de avaliação. Um deles é o método da diferença, ou indireto, que envolve o balanço de N total nos agrossistemas, monitorando as entradas e saídas. No entanto, estudos envolvendo a dinâmica do N no sistema solo-planta inviabilizam-se, muitas vezes, pela dificuldade em especificar a origem do nitrogênio de fontes distintas. Desta forma, a elucidação pode ser obtida com o uso do traçador isotópico, em que uma fonte nitrogenada marcada com ^{15}N (fertilizante, matéria orgânica) é adicionada ao sistema, efetuando-se seu balanço pelo princípio da diluição isotópica. Nesses experimentos com ^{15}N, é possível acompanhar o destino do N fertilizante, mesmo quando múltiplas transformações ocorrem simultaneamente no meio em estudo.

A técnica isotópica que emprega o ^{15}N como traçador consta, basicamente, em fornecer ao organismo em estudo um composto químico em que a razão isotópica ($^{15}N/^{14}N$) é diferente da natural e, em seguida, avaliar a distribuição do isótopo no sistema em estudo. Em muitos trabalhos de pesquisa envolvendo a técnica isotópica com ^{15}N, na área agronômica, existe necessidade de empregar compostos nitrogenados altamente enriquecidos no isótopo, em vista da diluição isotópica dos sistemas em estudo (KNOWLES; BLACKBURN, l993).

Na área agronômica grande parte dos trabalhos científicos envolve estudos onde se procuram avaliar o aproveitamento do uréia-^{15}N por diversas culturas de interesse agronômico, como milho, cana-de-açúcar, trigo, café, entre outras. Gava et al. (2006) estudaram as possíveis alterações na produção e partição da fitomassa vegetal, no acúmulo de nitrogênio total e do nitrogênio na planta proveniente do fertilizante, utilizando-se $CO(^{15}NH_2)_2$ aplicada em adubação de cobertura, na cultura do milho, na fase de implantação do manejo de semeadura direta. Os tratamentos estudados, sistema de plantio convencional e semeadura direta, foram adubados (100 kg ha^{-1} de N) com $CO(^{15}NH_2)_2$ em cobertura. A eficiência de utilização do fertilizante nitrogenado pelo milho e a recuperação do fertilizante nitrogenado no solo foram, respectivamente, em torno de 45 e 30 % para o N- $CO(NH_2)_2$, não havendo diferença entre os sistemas de cultivo. Ainda, o nitrogênio não recuperado do fertilizante, aplicado em cobertura, foi em média de 25 %.

Faroni et al. (2007) comparam três métodos de aplicação de solução de $CO(^{15}NH_2)_2$: pulverização foliar, injeção na base do colmo e imersão radicular, objetivando definir qual seria o mais eficiente na marcação de fitomassa de cana-de-açúcar. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Entre os métodos de aplicação de $CO(^{15}NH_2)_2$, a injeção na base de colmos é o de mais fácil execução, o mais efetivo na marcação da fitomassa e o que apresentou a maior recuperação do traçador (96 %). A aplicação foliar é comparável à injeção, somente na marcação e na recuperação do traçador no sistema radicular.

Lange et al. (2009) avaliaram o aproveitamento do N residual no solo do adubo verde (*Crotalaria Juncea* L.)-^{15}N e da $CO(^{15}NH_2)_2$, em fertilização conjugada e separada, no segundo ano de cultivo pelo trigo (*Triticum aestivum* L.). O experimento foi desenvolvido em vasos com 4 kg de solo (Latossolo Vermelho distrófico típico), em delineamento inteiramente casualizado com cinco tratamentos e quatro repetições. A recuperação do N- $CO(NH_2)_2$ residual aplicado isoladamente foi superior quando comparada à recuperação do N-crotalária ou crotalária mais $CO(NH_2)_2$ sem, contudo, influenciar o acúmulo de massa e a nutrição das plantas de trigo. No sistema solo-planta, a porcentagem de recuperação do N-crotalária foi

igual ao N-$CO(NH_2)_2$. Após dois anos de cultivo do solo, em vasos sem aparentes perdas por percolação e lixiviação, em torno de 26% do N- $CO(NH_2)_2$ e 75% do N-crotalária aplicados no primeiro cultivo ainda se encontram no solo, evidenciando o benefício da incorporação de adubo verde no fornecimento de N gradativamente ao sistema.

Martha Júnior et al. (2009) determinaram a recuperação do $CO(^{15}NH_2)_2$ pelo capim-tanzânia utilizando-se quatro tratamentos (0, 40, 80 e 120 kg ha^{-1} de N- $CO(NH_2)_2$) com três repetições. Os autores observaram que o teor de N total e a quantidade de N na planta não foram afetados pelas doses de $CO(^{15}NH_2)_2$, refletindo em elevadas perdas de N aplicado nas condições do experimento. No entanto, a baixa eficiência agronômica do uso da $CO(NH_2)_2$ pode ser explicada pelo decréscimo da recuperação do N do fertilizante no sistema solo-planta com o aumento da dose de $CO(^{15}NH_2)_2$ em situações climáticas bastante adversas, que contribuíram para aumentar as perdas de $CO(^{15}NH_2)_2$ no sistema.

2.3. Uréia enriquecida em ^{13}C para diagnóstico da *Helicobacter pylori* (HP)

O *Helicobacter pylori* (HP) foi isolado pela primeira vez, em 1983, por Warren e Marshall (prêmio Nobel de medicina e fisiologia em 2005), na Austrália, a partir de fragmentos de biópsia gástrica de pacientes com gastrite crônica e úlcera péptica. A Figura 3 ilustra a esquema da invasão das células epiteliais do estômago e do duodeno pelo HP, publicado pela Academia Australiana de Ciências em homenagem ao trabalho dos pesquisadores (DESIGNPOINT, 2007). Entretanto, data do século passado o encontro de bactérias espiraladas no estômago de animais. Krienitz em 1906 foi o primeiro a observar "espiroquetas" no estômago humano (TONELLI; FREIRE, 2000).

A infecção crônica proporcionada pelo HP tem alta prevalência em todo o mundo, sendo a principal causa de gastrites crônicas e úlceras pépticas, além de ser fator de risco para o câncer gástrico (GRAHAM, 1994), considerado o segundo mais frequente tipo de câncer e o maior causador de mortes por câncer no mundo (CORREIA, 1996; NEWNHAM et al., 2003). A prevalência dessa infecção varia entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo menor nos primeiros. Porém, independentemente da região, as diferenças parecem estar em função da condição socioeconômica da população (TAYLOR et al., 1995).

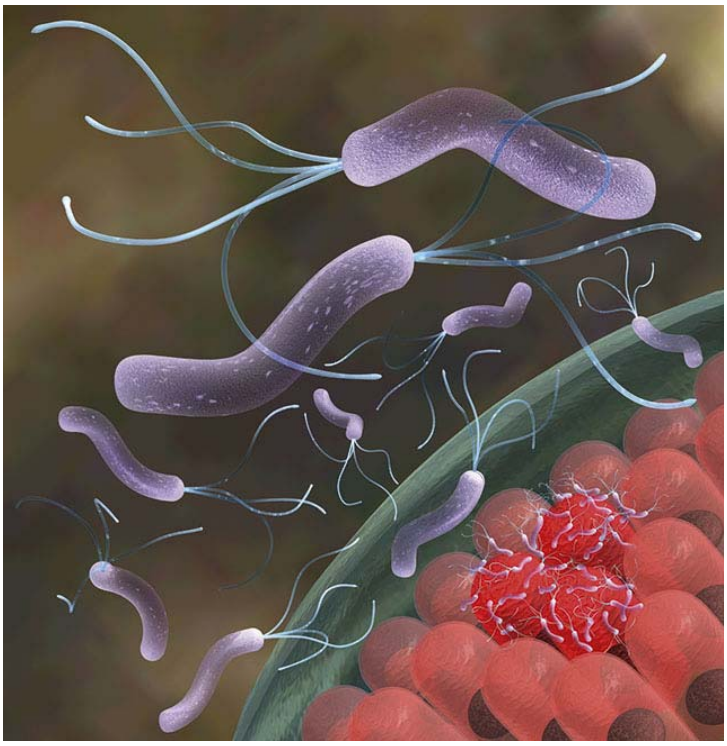


Figura 3 - Invasão das células epiteliais do estômago e do duodeno pelo *Helicobacter pylori* (HP), publicado pela Academia Australiana de Ciências (DESIGNPOINT, 2007)

O *Helicobacter pylori* é uma bactéria gram negativa, microaerófila e espiralada (LEVINSON; JAWETZ, 1994), em forma de S ou em bastonete curvo, que mede cerca de 3 a 5 µm de comprimento por 0,5 µm de largura, tem parede celular externa lisa e possui de quatro a seis flagelos unipolares embainhados e com bulbo terminal (TONELLI; FREIRE, 2000). É provavelmente o agente de infecção crônica mais comum em seres humanos, coloniza especificamente a mucosa gástrica e as microvilosidades gástricas das células epiteliais e acredita-se que contribua diretamente na destruição da célula gástrica por produção de uma citotoxina vacuolizante, bem como enzimas tóxicas, especialmente lipase, urease e proteases, desregulando os fatores defensivos do epitélio (OPLUSTIL et al., 2001).

Estudos soroepidemiológicos indicam que a infecção pelo HP ocorre frequentemente na infância (POUNDER, 1995), e que a taxa de prevalência aumenta progressivamente com a idade (OLIVEIRA et al., 1994; SOUTO et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1999; PELSER et al., 1997). Como essa infecção pode durar anos ou décadas, a curva de soroprevalência reflete efeito cumulativo na taxa de infecção (TAYLOR et al., 1995).

A transmissão do HP parece ocorrer, predominantemente, através do contato interpessoal, podendo ser por contaminação fecal-oral ou oral-oral (FELDMAN et al., 1998; VAIRA et al., 1998). Cepas bacterianas semelhantes do HP encontradas na mucosa oral de

uma mesma família indicam a ocorrência da via de transmissão oral (SAARELA et al., 1993; TAYLOR et al., 1995). Esse fato parece ser favorecido pela própria aglomeração domiciliar ou, ainda, por essas pessoas estarem expostas às mesmas fontes de infecção. Estudos apontam para a possibilidade de infecções causadas por exposição a uma fonte comum ambiental, como a H_2O de abastecimento municipal, como por exemplo, no Peru, onde pesquisadores demonstraram prevalência de infecção pelo HP em torno de 37 % nas crianças (KLEIN et al., 1991). Há referência, também, que procedimentos gastroduodenais invasivos (endoscopia, manometria e pH-metria de 24 horas) possam funcionar como via de contaminação (FELDMAN et al., 1998).

O diagnóstico da infecção pelo HP tem sido, com maior frequência, realizado a partir da análise de fragmentos de biópsia, obtidos por endoscopia. Os fragmentos são avaliados fazendo-se uso do teste da urease, cultivo em meios apropriados ou submetidos à análise histológica com coloração de Giemsa e o PCR (FERRAZ et al., 1998). Entretanto, todos os testes mencionados requerem obtenção do material de maneira invasiva (endoscopia), além de não permitirem uma avaliação global da mucosa. Paralelamente o diagnóstico da infecção pode ser obtido por testes não invasivos, que compreendem a sorologia e o teste respiratório empregando a $CO(NH_2)_2$ enriquecida no isótopo de C, podendo ser marcada no ^{13}C (isótopo estável) ou ^{14}C (isótopo radioativo) (CASTRO et al., 2004; MATTAR et al., 1999).

A $^{14}CO(NH_2)_2$ é uma técnica não autorizada pela maioria das autoridades de saúde para o diagnóstico do HP, porque está associada a uma dose de radiação, que embora bastante baixa (5 μCi), necessita de uma licença para realizar o exame, local adequado para armazenamento e sua utilização não é permitida para mulheres grávidas e crianças. Pelo contrário, o teste de respiração que utiliza o ^{13}C tornou-se cada vez mais popular, porque o isótopo estável é inócuo, de modo que o teste pode ser repetido quantas vezes que forem necessárias em um mesmo paciente, como também pode ser realizado com segurança em crianças, mulheres grávidas e mulheres em idade fértil (GISBERT; PAJARES, 2004).

A principal inconveniência do teste respiratório (UBT) utilizando $^{13}CO(NH_2)_2$ é a aquisição de um espectrômetro de massas para obter o resultado dos exames, tornado-se um investimento econômico elevado. No entanto, como o isótopo de ^{13}C usado no diagnóstico não é radioativo, permite que as amostras sejam enviadas para um centro de referência, compartilhando apenas um espectrômetro entre vários centros de diagnósticos, diminuindo consideravelmente o custo da técnica. É um teste com mais de 90 % de sensibilidade, altamente específico, permite a triagem de pacientes que não necessitam de exame direto da mucosa do estômago, em pacientes com dificuldade na obtenção de biópsia (por sangramento,

úlceras, terapia anticoagulante). Pode ser usado em estudos epidemiológicos e é o teste de preferência para o controle da erradicação da infecção, por não ser invasivo (SIQUEIRA et al., 2007).

No teste, utilizando o isótopo ^{13}C, o paciente ingere 75 mg de $^{13}CO(NH_2)_2$ enriquecida (99 % em átomos de ^{13}C) dissolvida em suco de laranja comercial ou H_2O. Para a realização do exame, algumas recomendações devem ser seguidas pelo paciente, como, estar em jejum por no mínimo 4 horas, não fumar, nem tomar refrigerantes gasosos, suspender inibidores de secreção ácida (Omeprazol, Ranitidina, etc.) por pelo menos cinco dias e antibióticos por um mês. Em diagnóstico de crianças a dose recomendada é de 50 mg de $^{13}CO(NH_2)_2$ (99 % em átomos de ^{13}C), devido à massa corpórea (crianças < 30 kg) (CANETE et al., 2003). Após a ingestão, a $^{13}CO(NH_2)_2$ atinge a mucosa gástrica e na presença do *H. pylori*, é metabolizada pela enzima urease da bactéria de acordo com a reação (10).

$$2\ H_2N(^{13}CO)NH_2 + 2\ H_2O \xrightarrow[\text{urease}]{\text{enzima}} 4\ NH_3 + 2\ ^{13}CO_2 \qquad (10)$$

O dióxido de carbono ($^{13}CO_2$) difunde-se dentro dos vasos sanguíneos, sendo transportado sob a forma de bicarbonato até aos pulmões, sendo depois liberado como $^{13}CO_2$ com o ar expelido (TONELLI; FREIRE, 2000). Na presença da urease bacteriana a razão dos isótopos de carbono $^{13}C/^{12}C$ é alterada significativamente. Raramente foram encontradas outras bactérias produtoras de urease na flora gástrica. A proporção de $^{13}CO_2$, nas amostras de ar expelido, é determinada por espectrometria de massas de relação dos isótopos (IRMS) e é expressa como a diferença absoluta (Δ) entre os valores no tempo zero (t = 0) e trinta minutos (t = 30). O ponto crítico para catalogar pacientes como *H. pylori* negativo ou positivo é determinado por um valor $\Delta\delta$ de 4 ‰, o que significa que um aumento no valor de $\Delta\delta$ em mais de 4 ‰ é indicador da infecção (ELLENRIEDER et al., 1997).

Na ausência de urease bacteriana, toda a $^{13}CO(NH_2)_2$ administrada pelo paciente, após reabsorção no trato gastrointestinal, será metabolizada como a $CO(NH_2)_2$ endógena. O amoníaco resultante da hidrólise bacteriana é incluído no metabolismo como NH_4^+.

O crescente interesse por teste não-invasivo, empregando a $^{13}CO(NH_2)_2$ com elevado enriquecimento (99 % em átomos de ^{13}C) isotópico, no diagnóstico da infecção causada pelo

Helicobacter pylori tem sido observado recentemente, refletindo um grande número de estudos publicados.

Graham et al. (2001) comparam o padrão (EUA) UBT com $^{13}CO(NH_2)_2$ para uma versão simplificada (UBT-Lite) com alterações da refeição de prova, tempo de jejum, quantidade do compostos marcado, coleta de ar expelido e duração de ensaio. De um total de 259 indivíduos incluídos no estudo, 249 completaram três testes respiratórios de $^{13}CO(NH_2)_2$. Houve excelente concordância entre as versões UBT avaliadas, com 98 % dos indivíduos com resultados concordantes. Nem alimentos sólidos e/ou líquidos ingeridos até 1 h antes da realização do UBT- Lite afetaram os resultados do exame.

Canete et al. (2003) avaliaram a eficiência e a precisão do teste UBT com $^{13}CO(NH_2)_2$ aplicado em uma única dose de 50 mg para diagnóstico da infecção em crianças. Nesse trabalho foram incluídas crianças com idade 4 a 14 anos submetidas à endoscopia superior intestinal para avaliar sintomas recorrentes a dor abdominal. Baseado nos critérios de referência, 45 % estavam infectados, 37 % não foram infectados e 18 % foram indeterminados. A sensibilidade e a especificidade foram, respectivamente, de 91% (95 % intervalo de confiança [IC] de 79- 96 %) e 97 % (IC 95 %, 86-99 %). Os autores concluíram que o teste respiratório (UBT) com 50 mg de $^{13}CO(NH_2)_2$ é suficiente e preciso para o diagnóstico da infecção pelo *H. pylori* em crianças.

Tseng et al. (2005) compararam resultados da $^{13}CO(NH_2)_2$ (UBT) em pacientes com câncer gástricos com os de pacientes com úlcera pépticas e gastrites. No experimento foram coletados consecutivamente 564 pacientes HP positivos, sendo 128 pacientes com gastrites, 72 pacientes com câncer gástricos, 64 pacientes com úlcera gástrica e 300 pacientes com úlcera duodenal. A dose de $^{13}CO(NH_2)_2$ foi de 50 mg e as amostras de ar foram analisadas com um espectrômetros de massas. Os dados foram avaliados pelo teste Mann-Whitney e o valor (Δ) de corte foi 3,5 ‰. Os valores médios UBT de câncer gástrico, úlcera gástrica, úlcera duodenal e gastrite foram 16,95 ± 12,2 ‰, 16,3 ± 9,3 ‰, 15,13 ± 9,9 ‰ e 20,07 ±13,5 ‰, respectivamente. Não houve diferença significativa nos valores UBT entre câncer gástrico e úlcera péptica ($p = 0,745$), úlcera duodenal ($p = 0,3831$), ou gastrite ($p = 0,2951$). Os autores concluíram que o valor UBT não é um bom método de prevenção do câncer gástrico. Além disso, esses valores podem explicar a relação entre o progresso natural da úlcera duodenal e infecção pelo *H. pylori*.

Ortiz-Olvera et al. (2007) validaram um método simplificado para diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori* (UBT-^{13}C) com admissão simultânea de 50 mg de $^{13}CO(NH_2)_2$ e 2 g de ácido cítrico em 200 mL de H_2O. Estudaram-se 88 pacientes (49

mulheres e 39 homens) com idade de 45 ± 15 anos, encaminhados para endoscopia gastrointestinal e biópsia. Todas as amostras de ar coletadas (10 mL em tubos de vidro) após período de 30 minutos foram analisadas em espectrômetro de massas. Do total de pacientes, cinquenta e um foram positivos (57,95 %), trinta foram negativos para *H. pylori* (34,10 %) e sete considerados indeterminados (7,95 %). A sensibilidade, especificidade e acurácia da UBT-^{13}C foram de 90,2, 93,3 e 91,4 %, respectivamente. A metodologia apresentada representa uma alternativa para diagnóstico não invasivo da infecção por *H. pylori*, pois preserva a precisão de UBT-^{13}C.

Atualmente vários kits (Diabact®, Tau-Kit, Heliforce, Rapid-13, entre outros) estão disponíveis comercialmente para diagnóstico da *H. pylori* (Figura 4). Estes kits para o teste de respiração (UBT-^{13}C) são geralmente validados em seus países de produção e a precisão declarada de suas análises podem não ser recomendada à população local. Chua et al. (2002) determinaram a precisão de um kit comercial, Hp-Plus Utandningstester (Sverige AB, Suécia), para uso no teste de respiração com $^{13}CO(NH_2)_2$ (UBT-^{13}C) na população de Cingapura. O UBT-^{13}C apresentou sensibilidade e especificidade de 94,2 e 100 % respectivamente, na detecção da infecção por *H. pylori*. Os autores concluíram que o UBT-^{13}C é simples, seguro, não invasivo e apresenta boa precisão, tornando-se uma ferramenta valida no local da prática clínica.

Figura 4 - Kit registrado (AUST R 146728) por distribuidor Australiano, como "Diabact® UBT 50 mg de $^{13}CO(NH_2)_2$", utilizado no diagnóstico da infecção por *H. pylori*

Gisbert et al. (2003) validou a UBT-^{13}C (TAU-KIT, Isomed SL, Madrid, Espanha) tanto para o diagnóstico inicial da infecção pelo *H. pylori*, como também para confirmar a erradicação. Foi realizado um estudo multicêntrico em 7 hospitais, sendo incluído um grupo de pacientes com dipepsia que não haviam recebido previamente tratamento de erradicação e outro grupo de pacientes com úlcera gástrica (erradicação do *H. pylori* foi confirmada 6-8 semanas após o término do tratamento com omeprazol, claritromicina e amoxicilina). Em ambos os grupos foram realizadas endoscopia com biópsia para histologia e teste da urease. Para o grupo pré-tratamento, a prevalência do HP foi de 72 %, com sensibilidade e especificidade de 96 e 100 % respectivamente. Já no grupo pós-tratamento a prevalência do HP foi de 16 %, com sensibilidade de 100 % e especificidade de 97 %. Os autores concluiram que o método UBT-^{13}C oferece excelente precisão, tanto para o diagnóstico da infecção por *H. pylori* como para confirmar a erradicação após tratamento.

No Brasil diversos estudos vêm sendo realizados para atestar a eficiência do método UBT ($^{13}CO(NH_2)_2$) no diagnóstico da infecção por *Helicobacter pylori*. Ainda, na maioria dos estudos utilizaram-se populações específicas (crianças e adolescentes ou adultos), mas que contribuíram para o entendimento do comportamento da prevalência da infecção.

Ferraz et al. (1998) realizaram análises comparativas (30 pacientes) entre o teste respiratório empregando $CO(NH_2)_2$ marcada com ^{13}C e os demais testes para pesquisa de *Helicobacter pylori* (testes da urease e cultura em meios específicos). Os autores obtiveram teste positivo em 18/30 casos para a urease e cultura e 21/30 casos no respiratório. Atribuíram, eventualmente, maior positividade encontrada com o teste respiratório a maior representatividade, que com esta metodologia (^{13}C) é avaliada de maneira global, diferentemente do que ocorre com os demais testes.

Kawakami et al. (2002) avaliaram o teste respiratório da $^{13}CO(NH_2)_2$ realizado com espectroscopia no infravermelho em crianças e adolescentes. Para os estudos foram incluídos 75 pacientes (6 meses a 18 anos de idade), sendo utilizado como padrão para o diagnóstico por cultura positiva ou histologia positiva e teste de uréase positivo. Nos testes foram utilizados 50 mg de $^{13}CO(NH_2)_2$ diluída em 100 mL de suco de laranja em indivíduos com peso de até 30 kg, ou com 75 mg de $^{13}CO(NH_2)_2$ diluída em 200 mL de suco de laranja em indivíduos com peso superior a 30 kg. As amostras de ar foram coletadas antes e aos 30 minutos após a ingestão do marcador. O teste respiratório da $^{13}CO(NH_2)_2$ foi considerada positivo quando o valor Δ for maior que 4 ‰. Os testes foram positivos para HP em 31 dos 75 pacientes, com sensibilidade e especificidade de 96 e 93,2 % respectivamente. Os autores concluiram que o testes respiratório empregando $^{13}CO(NH_2)_2$ realizado por espectroscopia no

infravermelho é uma ferramenta confíavel, precisa e não invasiva de diagnóstico para detecção da *H. pylori*.

Castro et al. (2004) realizaram testes respiratórios empregando $^{13}CO(NH_2)_2$ (UBT) como procedimento diagnóstico da presença da *H. pylori*, sendo os resultados comparados com os obtidos por meio da urease, histologia (considerado padrão-ouro) e UBT $^{14}CO(NH_2)_2$. No procedimento foram avaliados 54 pacientes com idades de 30 a 55 anos, sendo 25 mulheres. Os resultados obtidos com o UBT com $^{13}CO(NH_2)_2$ apresentaram sensibilidade e especificidade de 90 %. Os autores concluíram que o método foi prático, adequado, de fácil execução e inócuo, recomendando este procedimento para o diagnóstico na suspeita da presença do *H. pylori* em adultos e crianças, independente do sexo ou condição fisiopatológica.

Machado et al. (2004) avaliaram o teste UBT-^{13}C realizado com espectroscopia no infravermelho em crianças com idade até 6 anos. Para o experimento foram coletados consecutivamente amostras de ar em 68 pacientes. O UBT-^{13}C foi realizado com 50 mg de $^{13}CO(NH_2)_2$ diluído em 100 mL de suco de laranja comercial. O valor de corte foi de 4,0 por mil. Os autores observaram que do total, quinze pacientes estavam infectados (22,1 %), sendo obtidas sensibilidade e especificidade de 93,3 e 96,2 % respectivamente. Os valores negativos em pacientes não infectados variaram de - 1,5 a 2,6 ‰, e os valores positivos variaram de 10,8 a 105,5 ‰. O UBT-^{13}C realizado com espectroscopia no infravermelho mostrou ser uma ferramenta confiável e precisa no diagnóstico da infecção por *H. pylori* em crianças com idade até 6 anos.

Recentemente novos testes foram validados, e os antigos foram usados em diferentes situações clínicas ou para fins diferentes. Testes do antígeno fecal foram extensivamente avaliados no pós-tratamento em adultos e crianças, e o teste respiratório com $^{13}CO(NH_2)_2$ tem sido estudada a gravidade da inflamação gástrica e resposta ao tratamento de erradicação (ZAGARI et al., 2005; CREMONINI et al., 2005; SHAIKH et al., 2005; PERRI et al., 2005; WU et al., 2006; ZULLO et al., 2008, SILVA et al., 2010).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Materiais

3.1.1. Vidrarias e acessórios

- Funil Filtrante Magnético, 47 mm, capacidade de 500 mL e corpo do funil, haste e tampa: Polifenilsulfona;
- Filtros de membrana em ésteres de celulose (nitrato 75 e acetato 80 %), 0,45 μm e 47 mm, branca e lisa;
- Filtros em micro fibra de vidro de 47 mm e 1.6 μm;
- Frasco âmbar (30 mL);
- Tubos capilares (D = 1 mm);
- Vidro de relógio;
- Espátula de inox;
- Ampolas (vidro borosilicato);
- Placas de Petri;
- Tubo de polipropileno "Falcon" graduado de 50 mL;
- Tubo de digestão de Teflon (65 mL, 20 bar e 200 ºC);
- Rotor (Multiprep) com capacidade de 41 tubos de digestão;
- Coluna de vidro (30,5 x 1,8 cm).

3.1.2. Equipamentos

- Espectrômetro de massas ANCA-GSL/IRMS (Fluxo viscoso) – A ser empregado nas determinações do teor (%) de N, notadamente, em amostras de $CO(NH_2)_2$ com abundância isotópica natural (0,365 e 1,11 % em átomos de ^{15}N e ^{13}C, respectivamente);
- Espectrômetro de massas ATLAS MAT, modelo CH4 (raio de curvatura do tubo analisador de 120º; ionização por impacto eletrônico; sistema de admissão com fluxo molecular; coletor de íons simples, coletor tipo Faraday e sistema de análise por varredura de massa) – Utilizado nas determinações (% em átomos de ^{15}N e/ou ^{13}C) isotópicas dos compostos (($(^{15}NH_4)_2SO_4$, $CO(^{15}NH_2)_2$, $^{13}CO(NH_2)_2$, $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$)) enriquecidos;

- Sistema especial de destilação, composto por um balão de destilação com 3 vias e capacidade volumétrica de 5 litros; manta aquecedora; coluna Vigreux (80 cm x 45 mm), preenchida com anéis de Raschig; condensador tipo serpentina com torneira para escoamento e refluxo do líquido condensado; sistema digital de controle do aquecimento com sensor de temperatura acoplado à manta; termômetro digital; suporte com garra de aço inoxidável; mangueiras e conexões em silicone;
- Aparelho para determinação do ponto de fusão visual - Sistema a seco para até 3 amostras simultaneamente c/controle de aquecimento gradual, lupa c/aumento de 4 vezes, alto poder de iluminação e exclusivo sistema de resfriamento forçado por ventilação, suporte para termômetro, faixa de temperatura de ambiente a 310 °C, com chave selecionadora para aquecimento rápido (posição I) e aquecimento lento (posição II), marca FISATOM;
- Espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), marca Agilent, modelo 7500ce, com sistema de reação octopolo, nebulizador concêntrico, com vazão de 1 mL min^{-1}, instalado em câmara de nebulização refrigerada e sistema de injeção de amostras em fluxo;
- Forno microondas Milestone, modelo Ethos TC Plus Microwave Labstation- 2,45 GHz/1000W;
- Balança Analítica (AND);
- Bomba de vácuo;
- Termômetro de mercúrio (-10 a 310 °C);
- Maçarico com sistema misturador de gases (Oxigênio e Nitrogênio);
- Contador de colônias digital;
- Soprador térmico (1400 W; marca STEINEL);
- Chapa aquecedora de aço inoxidável (AISI 304) com controle de temperatura (50 a 300 ºC).

3.1.3. Reagentes

Todos os reagentes utilizados apresentam pureza superior a 99 % (grau analítico), são eles;
- Uréia ($CO(NH_2)_2$);
- Acetona (CH_3COCH_3);
- Metanol (CH_3OH);
- Etanol (CH_3CH_2OH);

- Enxofre (elementar) (S);
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4);
- Peróxido de hidrogênio (130 vol) (H_2O_2);
- Hidróxido de sódio (NaOH);
- Sulfeto de ferro (FeS);
- Ácido clorídrico (HCl);
- Óxido de cobre (CuO);
- Caldo Letheen + Tween 80;
- Ágar Tryptic Soy;
- Ágar Sabouraud-dextrose;
- H_2O tipo 1 (resistividade 18,2 MΩ cm) obtida em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA);
- HNO_3 65-69 % da marca merck (purificado);
- Resina catiônica (grupo funcional sulfônico, malha 100-200 com diâmetro das perolas de 74-149 µm, capacidade de troca de 1,7 mmol H^+ mL^{-1});
- Resina aniônica (grupo funcional sulfônico ($CH_2N^+(CH_3)_3$), malha 100-200 com diâmetro das pérolas de 74-149 µm, capacidade de troca de 1,4 mmol OH^- mL^{-1}).

3.1.4. Isótopos

- $^{13}CO(NH_2)_2$ com enriquecimento de 99,7% em átomo de ^{13}C, produzida no laboratório da Cambridge Isotope, foi utilizada como padrão isotópico, para obtenção das amostras (padrões de trabalho) de ^{13}CO $(NH_2)_2$ com 9,87; 29,69; 49,67 e 69,68 % em átomo de ^{13}C, fazendo-se uso da técnica de diluição isotópica;
- A $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ duplamente marcada foi obtida utilizando a técnica da diluição isotópica com duas fontes de $CO(NH_2)_2$ enriquecidas nos isótopos pesados de ^{13}C e ^{15}N, sendo uma com enriquecimento de 99,7 % em átomos de ^{13}C e a outra com 73,6 % em átomos de ^{15}N (obtida no laboratório de Isótopos Estáveis do CENA/USP).

3.1.5. Gases

- CO (g) 2.0 (quimicamente puro, pureza mínima de 99,0 %, e pressão interna de 95 Kgf/cm^2) contido em cilindro de 1 m^3;

- NH_3 (g) (pureza mínima de 99,8%, contido em cilindro de 1 m^3);
- N_2 (g) (pureza mínima de 99,5%, contido em cilindro de 10 m^3);
- O_2 (g) (pureza mínima de 99,5%, contido em cilindro de 10 m^3);
- ^{13}CO (g) com enriquecimento de 99,7 % em átomos de ^{13}C (pureza química de 99,8 %, contido em um cilindro de 420 mL capacidade interna), obtida da Spectra Gases Inc;
- $^{15}NH_3$ (g) enriquecida com 73,6 % em átomos de ^{15}N (obtida no laboratório de Isótopos Estáveis do CENA/USP).

3.1.6. Detalhamento do sistema utilizado para síntese de $CO(NH_2)_2$ enriquecida em ^{13}C e/ou ^{15}N.

Com o objetivo da síntese de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida no isótopo ^{15}N e/ou ^{13}C, foi procedido o projeto de dimensionamento e montagem de um sistema especial de pressão sob responsabilidade de Engenheiro Mecânico. O sistema para reação é composto pelos seguintes itens: **Reator de pressão** (câmara de aço inoxidável AISI 316 com capacidade de 1 L; revestida internamente de PTFE (Teflon) (detalhes nas Figuras 5 e 6); controlador micro processado, PID, sensor Pt100; Um manovacuômetro de aço inoxidável, na tampa do reator, com medidas de pressão na faixa de - 0,1 a 1,47 MPa; duas válvulas esfera de aço inoxidável de duas vias (marca Swagelok, modelo SS 43GS4, para pressão de até 20 MPa); uma sonda de temperatura tipo K e uma válvula de alívio ou de segurança de 1,2 MPa; **Sistema de aquecimento** (constituído de placas aquecedoras (1500 W – 200 W); controle de temperatura por termostato e provido de agitação mecânica) com a finalidade de manter a temperatura do processo constante (reação isotérmica) e homogeneização das várias proporções dos reagentes como CH_3OH, S e os gases ($^{15}NH_3$ e ^{13}CO). (Figura 7); **Linha de fornecimento do CO** (composta por um manômetro de duplo estágio e duas válvulas de segurança; tubulação em aço inoxidável AISI 316) que será utilizada no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$. O gás (CO) utilizado foi o 5.0 (pureza mínima de 99,0 %, com compressão interna de 95 Kgf/cm^2) contido em cilindro de 1 m^3. O sistema de distribuição, do painel de controle ao reator, é composto por tubo de ¼”de aço inoxidável AISI 316, sendo que a pressão final na tubulação deve atingir cerca de 1,0 MPa. A Figura 8 apresenta detalhes do painel de controle com as válvulas e acessórios. **Reservatórios de armazenamento e transferência de NH_3 e CO** (construído de aço inoxidável AISI 316, capacidade 250 mL, contendo duas válvulas tipo esfera de aço inoxidável de duas vias (marca Swagelok, modelo SS 43GS4, para pressão de

até 20 MPa) (Figura 9). **Recipiente de produção** (tubo de Rittenberg adaptado (Figura 10 (A)), contendo em cada extremidade inferior uma circunferência de volume aproximado de 40 cm^3, onde são adicionados os regentes (FeS e H_2SO_4) **e armazenamento do H_2S** (constituído de tubo Pyrex, volume interno de 170 cm^3 (Figura 10 (B)); **Proteção de acrílico para reator** (visor de acrílico anti-reflexo transparente (80 cm x 60 cm x 15 mm), estrutura de ferro com pintura eletrostática e base de granito (Figura 11). Tendo em vista a necessidade de procedimentos de segurança para as atividades realizadas durante a síntese (pressão de 0,3 a 1,09 MPa). **Linha de fornecimento do N_2** (composta por um painel de controle com dois manômetro de duplo estágio e uma válvula de segurança; tubulação de ¼" em aço inoxidável AISI 316). O gás utilizado será o 2.0 (pureza mínima de 99,0 %, com compressão interna de 95 Kgf/cm^2) contido em cilindro de 10 m^3. A Figura 12 apresenta detalhes do painel de controle com as válvulas e acessórios. **Linha de vidro para realização de vácuo** (constituída de tubo pyrex e quartzo; Torneiras KONTES; bomba mecânica de vácuo, modelo 2M8 EDWARDS; medidor de vácuo ativo AGD EDWARDS; filamento sensor de vácuo Pirani APG-M EDWARDS). A Figura 13 apresenta o esquema detalhado (bomba mecânica, medidores, válvulas e torneiras) da linha de vidro utilizada no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$.

Figura 5 - Reator de pressão com revestimento de PTFE (vaso de reação e tampa de aço inoxidável)

Figura 6 - Reator para síntese de $CO(NH_2)_2$ enriquecida no isótopo ^{13}C e/ou ^{15}N

Figura 7 - Sistema de aquecimento com controle de temperatura e agitação mecânica

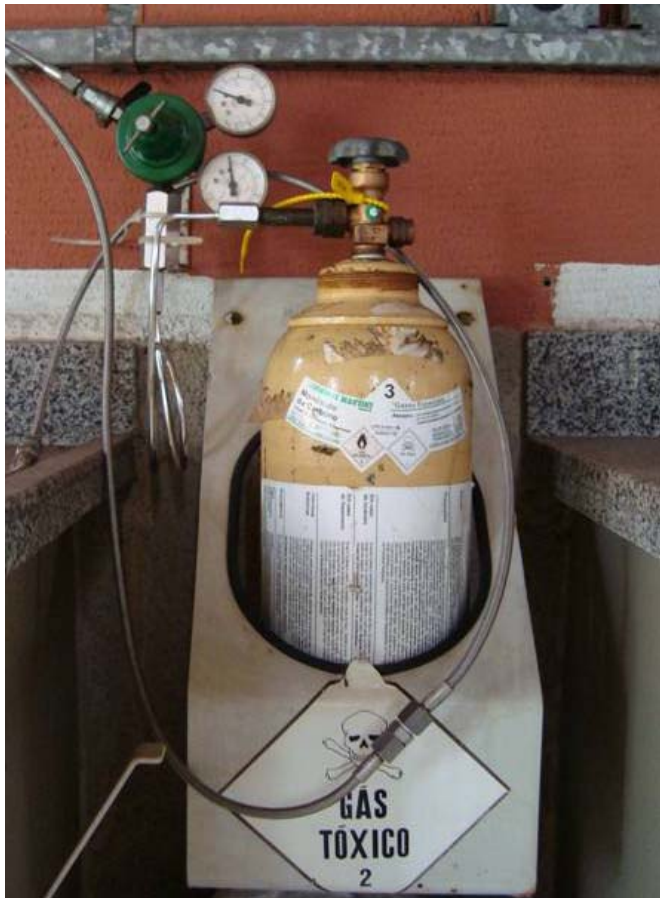


Figura 8 - Linha de fornecimento de CO para síntese de $CO(NH_2)_2$

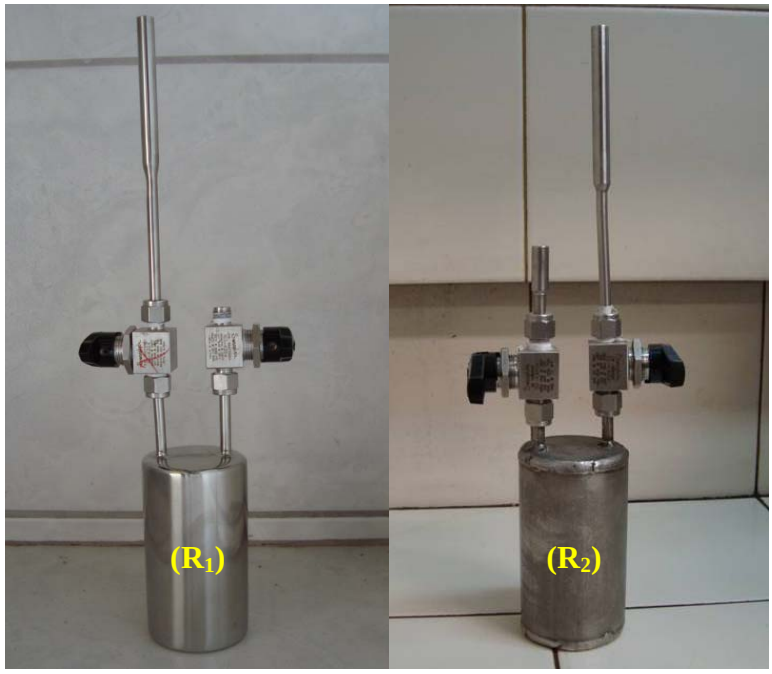


Figura 9 - Reservatórios de armazenamento e transferência da NH_3 (R_1) e do CO (R_2) para o reator

Figura 10 - Sistema de produção (A) e recipiente de armazenamento (R_V) do H_2S (B)

Figura 11 - Proteção de acrílico para reator de pressão

Figura 12 - Central de distribuição de N_2 (Comercial) com dois manômetros de duplo estágio e válvula de segurança

3.2. Métodos

3.2.1. Produção de sulfeto de hidrogênio (H_2S)

Com o sistema, mostrado na Figura 14, foi realizada a produção do sulfeto de hidrogênio (H_2S), para posteriormente ser utilizado na reação de síntese da $CO(NH_2)_2$.

Inicialmente, adicionaram-se os reagentes FeS e H_2SO_4 no interior do tubo de reação , como mostrado na Figura 10 (A), sendo de um lado adicionado 0,2 g de FeS e do outro lado, 2,5 mL de solução (50 % v/v) de H_2SO_4 (100 % em excesso), tendo o tubo de reação isolado com uma torneira (T_{13}).

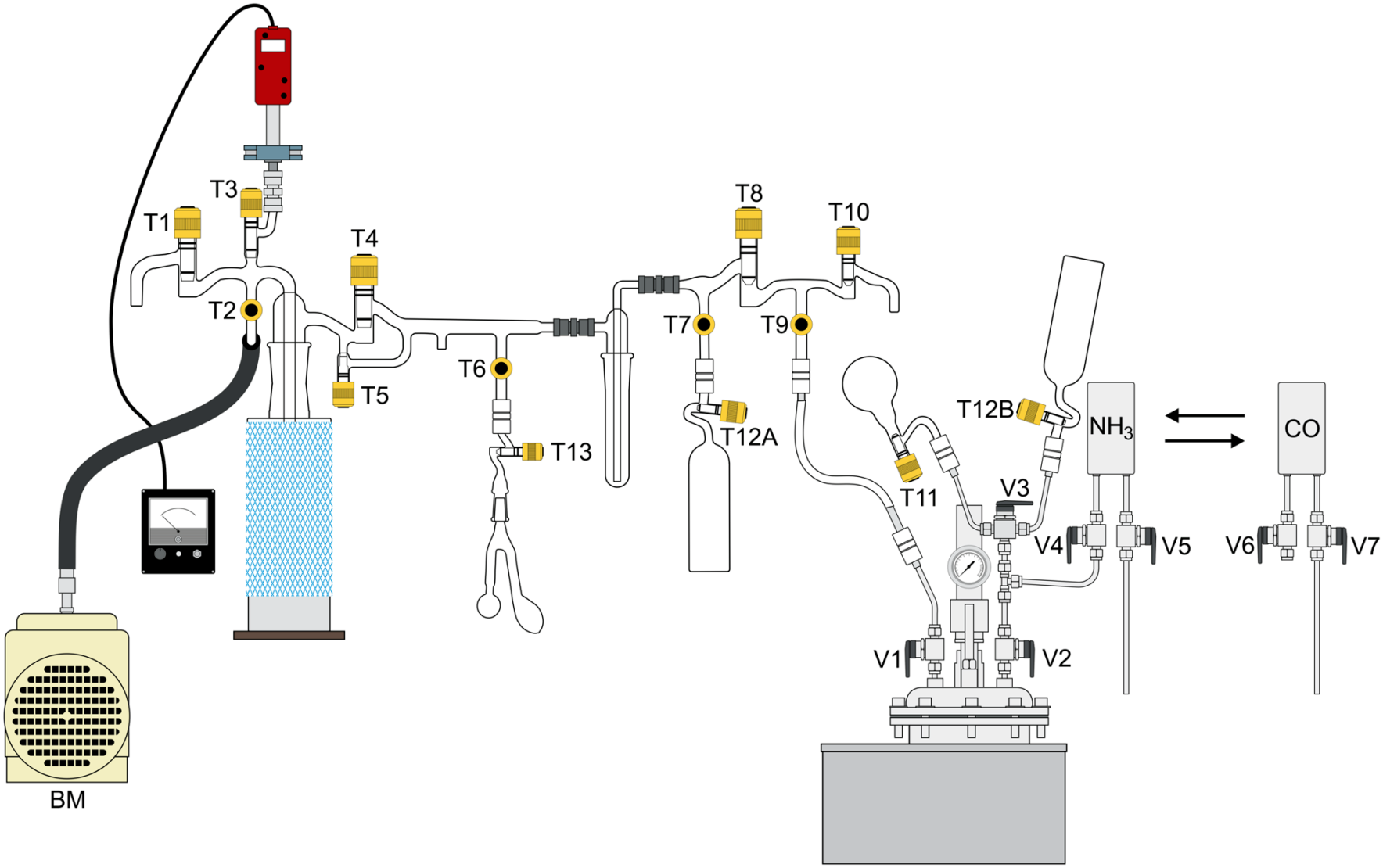


Figura 13 - Sistema completo (linha de vidro, reator de aço inoxidável, recipientes de vidro e aço inoxidáveis) utilizado no processo de síntese da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida em ^{13}C e/ou ^{15}N

O recipiente de armazenamento (R_V) (Figura 10 (B)), juntamente com o tubo de reação, foram acoplados a linha de vácuo, como mostra a Figura 13. Com auxílio de uma bomba mecânica, iniciou-se a limpeza da linha, com abertura lenta, em sequência, das torneiras T_2, T_3, T_4, T_6, T_{13}, T_7 e T_{12A}. Após atingir uma pressão em torno de 10^{-3} MPa (indicado pelo medidor de vácuo), fecharam-se T_6 e T_{13}. Em seguida, o tubo foi retirado e colocado em contato o FeS com o H_2SO_4, ocorrendo a liberação do H_2S de acordo com a reação 11.

$$FeS(s) + H_2SO_4(l) \rightarrow H_2S(g) + FeSO_4(s) \qquad (11)$$

Figura 14 - Sistema para a produção e armazenamento do H_2S

Após aproximadamente 10 minutos, o tubo de reação foi recolocado no sistema de vácuo, onde novamente realizou a limpeza entre as torneiras T_6 e T_{13}. Logo após, fecharam-se T_{13}, T_6, T_4 e o R_V, sob vácuo, foi mergulhado em um "trap" contendo nitrogênio líquido (-196 ºC). Esse procedimento foi realizado para facilitar a transferência do H_2S para o

recipiente de armazenamento. No sistema de vácuo também foi utilizado uma armadilha química contendo solução de gelo seco e etanol (- 32 ºC) para reter possíveis traços de H_2O provenientes da reação 11.

No final, abriram-se lentamente, na sequência, T_6 e T_{13} e, transferiu-se o H_2S para R_V. O processo de transferência teve duração de aproximadamente 5 minutos, quando então foram fechadas T_{12A}, T_7, T_6, T_{13}, T_4, T_3, T_2 e desligada a bomba mecânica. O recipiente Rv e o tubo de reação foram retirados, sendo que a solução residual da reação, contendo H_2SO_4, FeS e $FeSO_4$ (subproduto da reação), foi armazenada em recipiente apropriado para ser reciclada.

3.2.2. Síntese de $CO(NH_2)_2$

3.2.2.1. Processo de carga do reator

Inicialmente adicionou-se enxofre (S) no interior do reator de síntese. A quantidade (g) de S foi em função do reagente (NH_3 ou CO) limitante e tomando como base a estequiometria da reação (12). Assim, quando o reagente limitante foi o CO, fixou-se em 1,28 g (0,04 mols) de S, porém quando a NH_3 foi o limitante variou em 0, 25, 50, 100, 150, 200, 300 e 350 % em excesso na reação. O reator foi fechado, ajustando corretamente a tampa do cilindro de reação e, conectado em uma linha de vidro, como mostrado na Figura 15. Com auxílio de uma bomba mecânica realizou-se vácuo no sistema de produção (linha e reator), abrindo-se, na sequência, as torneiras T_2, T_3, T_5, T_8, T_9 e lentamente a válvula V_1. A torneira T_5, que possui sistema de estrangulamento de vazão, foi utilizada para evitar perda de S (elementar) durante a realização do procedimento de vácuo. Após aproximadamente 10 minutos, quando a pressão em seu interior foi reduzida, fechou-se T_5 e abriu-se lentamente T_4, até uma pressão interna da ordem de 10^{-3} MPa. Em seguida, fechou-se a válvula V_1 e o reator foi colocado em um banho (solução de etanol + CO_2(s)) à temperatura de -74 ^oC. Esse procedimento foi realizado para facilitar a transferência dos gases (NH_3, CO e H_2S) e CH_3OH (meio líquido) para o interior do reator.

$$2NH_3 + CO + S \rightarrow CO(NH_2)_2 + H_2S \qquad (12)$$

Figura 15 - Linha de vidro (borosilicato) para realização de vácuo no reator de síntese

Na sequência, o CH_3OH (solvente) foi transferido para um recipiente de vidro (R_S), com capacidade de aproximadamente 200 mL (Figura 16). O volume (mL) de CH_3OH empregado no processo de síntese foi calculado de acordo com a quantidade (g) de S (BENDASSOLLI, 1988). Deve-se ainda salientar que no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$ foi avaliado o uso de CH_3CH_2OH (etanol), como meio líquido da reação, em substituição do CH_3OH, que é um produto comprovadamente tóxico, exigindo maiores cuidados na sua manipulação. Para a transferência do CH_3OH, o R_S foi conectado na linha de vidro, e abriram-se as torneiras T_6 e T_{11}, realizando vácuo no recipiente. A finalidade dessa operação foi facilitar a transferência do solvente (CH_3OH ou CH_3CH_2OH) para R_S. Quando a pressão atingiu 10^{-3}MPa, fecharam-se T_{11} e T_6, R_S foi desconectado e conduzido para uma capela de exaustão. Nessa, a quantidade (mL) de CH_3OH foi aferida em proveta graduada, colocada em um béquer, e transferida, por diferença de pressão, para o interior de R_S. Logo em seguida, R_S foi recolocado no sistema de vácuo, onde novamente realizou-se limpeza entre T_6 e T_{11}. Quando a pressão atingiu 10^{-3} MPa fechou-se T_{11}, T_6 e desconectou-se R_S.

Figura 16 - Processo de transferência do CH_3OH (l) ou CH_3CH_2OH (l) para reservatório de vidro (R_S)

A quantidade de NH_3 a adicionar no reator foi função da massa de CO (reagente limitante) no processo. Adicionaram-se a NH_3 com 0, 25, 50, 100, 150, 200, 300 e 350 % em excesso, tomando como referência a estequiometria da reação 12. Para a relação estequiométrica (0 % em excesso) utilizou-se 1,36 g de NH_3, equivalente a 0,08 mols. Nesses testes, em triplicata, foi utilizada NH_3 com abundância (0,366 % em átomos ^{15}N) isotópica natural, contida em um cilindro (1 m^3) comercial (pureza química 99,8 %). Para a transferência da NH_3 para o reator foi utilizado um reservatório de aço inoxidável (R_1) de capacidade de 250 mL (Figura 5). O R_1 (vazio) foi conectado ao cilindro de NH_3 utilizando-se tubulações de aço inoxidável e válvula (V_4) tipo esferas também de aço inoxidável (¼´). Antes, porém, a massa (g) de R_1 (vazio) foi determinada por gravimetria. Em seguida, abriu-se o registro do cilindro e a válvula V_4, transferindo NH_3 para o interior do R_1, como pode ser observado na Figura 17. Para facilitar o processo de transferência o R_1 foi imerso em banho criogênico (etanol e CO_2 (s)) à - 30 ºC. Após, R_1 foi desconectado e a massa (g) determinada por gravimetria (R_1 + NH_3 anidra). Com esse procedimento a quantidade (g) de NH_3 pode ser transferida com boa precisão para o reator de síntese.

Figura 17 - Processo de transferência da NH_3(g) para reservatório de aço inoxidável (R_1)

E por fim, a quantidade de CO, a adicionar no reator, foi função da massa (g) de NH_3 (reagente limitante) no processo. Adicionaram-se o CO, fazendo-se uso de reagente de abundância isotópica natural (1,11 % em átomos de ^{13}C), com 0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 % em excesso, tomando como referência a estequiometria da reação 12. Nesse caso, na relação estequiométrica, utilizou-se 1,12 g de CO, equivalente a 0,04 mols. Para a transferência da CO para o reator foi utilizado um reservatório de aço inoxidável (R_2) com capacidade de 250 mL (Figura 9). A transferência do CO para R_2 foi controlada e monitorada por intermédio de um manômetro (0-280 Kgf/cm^2) do painel de distribuição de CO (Figura 8). Deve-se ainda salientar que devido à grande toxicidade do gás, todo procedimento foi realizado dentro de uma capela de exaustão e fazendo-se uso de equipamento de segurança individual (EPI's). Antes, porém, a massa (g) de R_2 (vazio) foi determinada gravimetricamente. Em seguida, R_2 foi conectado, com auxílio de tubo flexível (1,5 m) e interligado por válvulas (V_6) tipo esferas de aço inoxidável (¼´), ao registro da linha de

fornecimento de CO (Figura 8). Na sequência, abriram-se o registro do cilindro e a válvula V_6, transferindo-se o CO para o interior do R_2. Com objetivo de facilitar a transferência do gás para R_2, esse foi imerso em recipiente contendo N_2 líquido (-196 ºC). Após, R_2 foi desconectado e a massa (g) do reagente (R_2 + CO) determinada por gravimetria.

Em seguida foi adicionado o CH_3OH e os gases reagentes (H_2S, NH_3 e CO) no reator. Os esquemas de transferência de H_2S, CH_3OH ou CH_3CH_2OH, NH_3 e CO para o reator de síntese, podem ser observados nas Figuras 18 e 19. Antes, porém, os recipientes contendo CH_3OH (R_S), H_2S (R_V) e NH_3 (R_1) foram conectados ao reator de síntese, através de tubulações de aço inoxidável (Ø ¼) e válvulas tipo esfera, como pode ser observados na Figura 18. A pressão máxima de operação do sistema é da ordem de 1,2 MPa (limitada pela válvula de segurança). Essa condição, objetivando a segurança do processo, limitou o emprego de quantidades mais elevadas dos reagentes. Ainda, através de V_1 o reator foi ligado novamente ao sistema de vácuo (linha de vidro e bomba mecânica). Desse modo, abrindo-se as válvulas, pela ordem, V_2 e V_3 (para esquerda) realizou-se limpeza nas tubulações para transferência de NH_3 e CH_3OH, e assim que a pressão atingiu 10^{-3} MPa, abriu-se V_3 (sentido da direita), limpando a tubulação de transferência do H_2S (até aproximadamente 10^{-3}MPa), fechando-se, em seguida, a válvula V_1 e a torneira T_9.

Primeiramente adicionou-se o H_2S (produzido no item 3.2.1) no interior do reator, com abertura da torneira T_{12B}. Durante o processo R_V foi aquecido, com auxílio de um soprador térmico, facilitando a transferência do gás (H_2S). Após o procedimento, por diferença de pressão e aquecimento, T_{12B} e V_3 foram fechadas. Na sequência, adicionou-se o CH_3OH no reator, com abertura de V_3 (sentido da esquerda) e T_{11}. Esse procedimento é extremamente rápido (aproximadamente 10 s), sendo posteriormente fechadas T_{11} e V_3. Em seguida, com abertura da válvula V_4, admitiu-se a NH_3 de R_1 para o interior do reator. O reservatório R_1 também foi aquecido, com auxílio do soprador térmico, para facilitar a transferência da massa (g) de NH_3. Ao final, fecharam-se V_4 e V_2, desconectaram-se, pela ordem, R_V, R_S e R_1, sendo a massa (g) de NH_3 transferida (R_1) foi determinada por gravimetria. Desta forma, foi possível, no presente trabalho, avaliar a influência da quantidade de NH_3 na reação de síntese da $CO(NH_2)_2$.

Figura 18 - Procedimento para admissão de $NH_3(g)$ (R_1), CH_3OH ou CH_3CH_2OH (R_S) e H_2S (R_V) no reator

Por último, o CO, contido no reservatório de aço inoxidável (R_2), foi então carregado ao reator. No procedimento, conectou-se R_2, através da válvula V_6, ao sistema de tubulações de aço inoxidável do reator e interligou a válvula V_3 diretamente a linha de vácuo (Figura 19). Essa última operação teve como objetivo realizar vácuo somente nas tubulações utilizadas para transferência do CO. Em seguida, abriu-se V_3 (esquerda), realizando vácuo no sistema de tubulações até a pressão 10^{-3}MPa, quando então fecharam-se V_3 e T_9. Para facilitar a transferência do gás (CO) manteve-se a temperatura do reator em torno de -74 ºC (utilizando solução de etanol e $CO_2(s)$), diminuindo a pressão de vapor dos reagentes (NH_3, H_2S e CH_3OH) presentes no interior do reator. Logo após, transferiu-se o CO para o reator, abrindo-se pela ordem V_2 e V_6, como pode ser observado na Figura 19, e aquecendo R_2 com soprador térmico. Após, fecharam-se V_6 e V_2, desconectou-se R_2 e a massa (g) do reagente determinada por gravimetria.

Figura 19 - Procedimento para transferência de CO (g) (R_2) para o reator de síntese

No processo ainda foram realizados testes, em triplicata, nas melhores condições, avaliando a influência da pressão (0,59; 0,78 e 0,98 MPa) no rendimento da síntese. Para o procedimento, um gás inerte (N_2), contido em um cilindro padrão (pureza mínima de 99 % com pressão interna de 19,61 MPa), foi transferido para o reator, contendo os outros gases (NH_3, CO, H_2S) em equilíbrio, através de tubulações de aço inoxidável, interligadas entre V_2 e o manômetro regulador de pressão do cilindro comercial (Figura 20). Este processo de incremento de pressão, contudo, não alterará as concentrações das substâncias já presentes no processo de síntese. Pretende-se com esse procedimento reduzir o tempo para atingir o equilíbrio.

Figura 20 - Procedimento para adição de N_2 (g) no reator de síntese

A quantidade de N_2 introduzida no reator foi controlada pela reação pressão-volume-temperatura. Sendo conhecido o volume do reator (1 L), temperatura (-10 ºC) e o número de mols dos reagentes (NH_3, CO, H_2S), foi possível calcular, com auxílio das equações de Van der Waals, a pressão manométrica (PM), a ser mantida no interior do reator para obter a quantidade (mols) desejada deste reagente. Em seguida, esse valor da pressão foi ajustado no manômetro da central de distribuição de gases (Figura 12), e abriu-se a válvula V_2 transferindo a quantidade (mols) de N_2 para o reator. No final, quando as pressões nos manômetros (reator e registro da central de gases) se igualaram, a válvula V_2 foi fechada e o reator desconectado. Para a pressão de 0,59 MPa não foi necessária a transferência de N_2, devido esse valor ser proporcionado pela própria relação estequiométrica dos reagentes (NH_3, H_2S, CH_3OH e CO) na reação.

3.2.2.2. Reação de síntese da $CO(NH_2)_2$

As reações químicas que ocorrem no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$, com base na reação do CO, NH_3 e S, incluem algumas reações de interesse. A seguir é listada uma série de reações (intermediária e final) possíveis na produção do composto (FRANZ et al., 1961).

$$CO + S \rightarrow COS \tag{13}$$

$$COS + 2NH_3 \rightarrow H_2NCOSNH_4 \tag{14}$$

$$H_2NCOSNH_4 \rightarrow HNCO + NH_4HS \tag{15}$$

$$NH_4HS \rightarrow NH_3 + H_2S \tag{16}$$

$$HNCO + NH_3 \rightarrow CO(NH_2)_2 \tag{17}$$

Nessa etapa, retirou-se o reator da solução contendo etanol e CO_2(s) e, ao atingir a temperatura ambiente (± 25 ºC), colocou em um sistema de aquecimento (manta metálica) provido com agitação mecânica, como observado na Figura 21. Esse sistema de aquecimento é constituído de placas aquecedoras e com controle de temperatura (termostato) incluindo um termopar tipo k no interior do reator.

Levando-se em consideração que o revestimento de PTFE dificulta a troca térmica, considerou-se um tempo, variando de 25 a 40 minutos, para que a temperatura dos reagentes, no seu interior, atingirem os valores desejados de 80, 90, 100 e 110 ºC. Da mesma forma como foi mencionado anteriormente, objetivando a segurança do processo, não foi possível avaliar temperatura acima de 110 ºC, devido à pressão (limitada pela válvula de segurança do reator) exercida pelos gases reagentes no sistema de produção.

Figura 21 - Sistema de aquecimento com controle da temperatura e agitação mecânica

Ao final do período (60, 90, 120 e 150 minutos) de reação, o sistema de aquecimento foi desligado e, resfriou o reator até a temperatura ambiente (em torno de 25 ºC). Deve-se ainda salientar que as avaliações (temperatura e tempo de reação) foram realizadas em triplicata e fazendo-se uso de reagentes com abundância isotópica natural (0,365 e 1,11 % em átomos de ^{15}N e ^{13}C, respectivamente).

3.2.2.3. Reciclagem dos gases de exaustão e recuperação do CH_3OH

Os gases existentes no interior do reator, provenientes da reação de síntese, foram expurgados através da válvula V_2, com auxílio de N_2 (gás de arraste, conduzido por V_1), passando na sequência por uma solução contendo 1 mol L^{-1} de H_2SO_4 e finalmente por uma solução de H_2O_2 30 % (m/v) e 2 mol L^{-1} NaOH, na proporção de 1:2 (H_2O_2:NaOH) (Figura 22). A função da mistura H_2O_2 e NaOH foi reter o H_2S (subproduto da reação de síntese da $CO(NH_2)_2$) o qual é um gás extremamente tóxico e inflamável e portanto, não sendo correto libera-lo para a atmosfera. O H_2O_2 30 % (m/v) em meio básico oxida o sulfeto (H_2S) a sulfato

de acordo com a reação 18.

A solução 1 mol L^{-1} de H_2SO_4 tem a função de reter possíveis traços de NH_3, não convertida em $CO(NH_2)_2$, na forma de $(NH_4)_2SO_4$ (reação 19), que foi reutilizado no processo de síntese, principalmente quando se trabalha com ^{15}N ($CO(^{15}NH_2)_2$ ou $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$) que tem alto valor agregado (US$ 523.00/g de ^{15}N). Nessa solução, foi realizada a quantificação da massa (g) de NH_3, pelo método convencional de destilação/titulação (sistema adaptado de MULVANEY, 1993), para realização do balanço (%) de massa dos reagentes utilizado no processo de síntese.

$$H_2S + 4H_2O_2 \xrightarrow{2\,NaOH} Na_2SO_4 + 6H_2O \qquad (18)$$

$$2\,NH_3 + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4 \qquad (19)$$

Figura 22 - Reciclagem dos gases exauridos do reator em solução de H_2SO_4 e H_2O_2:NaOH, respectivamente

Após expurgar todos os gases do reator e atingir pressão atmosférica a 25 ºC, procedeu-se a separação do CH_3OH da mistura contendo $CO(NH_2)_2$ e S. No processo foi utilizado um sistema de vidro (Figura 23), sob vácuo, acoplado diretamente a válvula V_2 do reator. Toda a operação (reciclagem) foi realizada dentro de uma capela de exaustão, devido à toxicidade do CH_3OH.

No procedimento, com auxílio de uma bomba mecânica (BM), iniciou-se evacuação do sistema (linha de vidro e reator), com abertura lenta, pela ordem, de T_{14} e V_2. Em seguida, o reator foi aquecido a 70 ºC, liberando o CH_3OH (g), o qual foi retido em uma armadilha criogênica contendo nitrogênio líquido (-196 ºC). O processo de transferência teve duração de aproximadamente 30 minutos, quando então foram fechadas V_2 e T_{14}, e a bomba mecânica desligada. No final, a solução (CH_3OH e H_2S) obtida no "trap" (armadilha química) foi transferida para recipiente apropriado para ser reciclada e posteriormente ser reutilizada no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$.

Figura 23 - Sistema de separação do CH_3OH acoplado diretamente ao reator de produção

3.2.2.4. Processos de purificação da $CO(NH_2)_2$

Nessa etapa, procedeu à abertura do reator com a retirada da mistura de $CO(NH_2)_2$ e S, contida no seu interior. Em seguida, o reator teve sua parede interna lavada com H_2O desionizada, solubilizando a $CO(NH_2)_2$ e mantendo o S na fase sólida, em vista de sua baixa solubilidade. Por filtragem a vácuo (mecânica), em papel de filtro em microfibra de vidro (1,6 μm) e outro de membrana em ésteres de celulose (0,45 μm), o S foi separado da $CO(NH_2)_2$ (Figura 24). A solução final, contendo $CO(NH_2)_2$ solubilizada em H_2O, foi aquecida a 50 ^oC e obtendo-se o produto na forma sólida.

A $CO(NH_2)_2$ sintetizada foi submetida a um processo de purificação química para retirada de possíveis impurezas, principalmente de S, obtidas na reação de síntese. Esse procedimento baseia-se na solubilidade das impurezas com o solvente orgânico (CH_3COCH_3), sendo a $CO(NH_2)_2$, por sua vez, pouco solúvel em CH_3COCH_3. Para isso, a $CO(NH_2)_2$ foi colocada em um becker e adicionou-se 50 mL de CH_3COCH_3, sob agitação. Em seguida, essa solução foi transferida para o sistema de filtração a vácuo, com filtro de microfibra (1.6 μm), separando-se o solvente do composto sólido ($CO(NH_2)_2$). Após o procedimento, a $CO(NH_2)_2$ foi cristalizada com auxílio de em uma chapa aquecedora com temperatura em torno de 50 ºC. No final, determinou-se a massa (g) de $CO(NH_2)_2$ sintetizada e armazenou-se em frasco âmbar, devidamente limpo e identificado, para posteriormente serem realizadas as devidas análises (físico-química, microbiológica e isotópicas) no produto.

Figura 24 - Procedimento de filtração à vácuo para retirada de impurezas da $CO(NH_2)_2$

Em outra etapa de purificação, submetida às amostras de $CO(NH_2)_2$, foi utilizado processo de troca iônica constituído por duas colunas de vidro (com diâmetro interno de 1,6 cm e comprimento de 30,5 cm) preenchidas até 27 cm do topo, com resinas catiônicas DOWEX 50W-X8 (1ª coluna) e aniônica DOWEX 1X8 (2ª coluna), como pode ser observado na Figura 25 (A e B).

O volume de resina, na forma H^+ ou OH^- equilibrada em H_2O, totalizou 70 mL para cada coluna. Em seguida, as resinas foram lavadas com H_2O (Mili-Q), com objetivo de retirar as impurezas e traços de resíduos orgânicos. Posteriormente, os sítios ativos das resinas (catiônica e aniônica) foram saturados nas formas de $R\text{-}H^+$ e $R\text{-}OH^-$, pela admissão no topo da coluna de soluções 1 mol L^{-1} de HCl e 2 mol L^{-1} de NaOH, respectivamente. As soluções efluentes de cada uma das colunas foram recolhidas em alíquotas de 50 mL, determinando a concentração de H^+ e OH^- por titulometria, verificando o ponto final de carga das resinas. Depois de saturados os sítios ativos das resinas ($R\text{-}H^+$ e $R\text{-}OH^-$), eliminou-se o excesso de HCl e NaOH do volume intersticial das resinas pela lavagem com H_2O (Mili-Q).

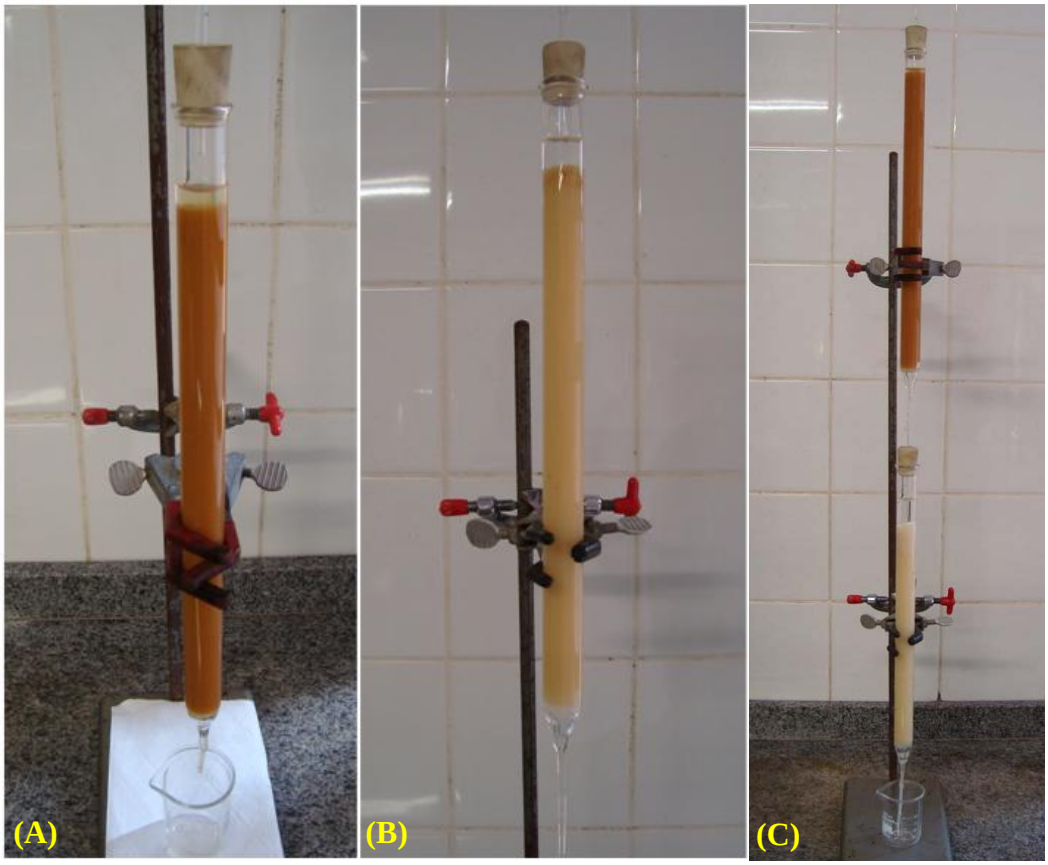


Figura 25 - Procedimento de purificação utilizando colunas com resina catiônica (A) e aniônica (B) para retirada de impurezas da $CO(NH_2)_2$. (C) Colunas de vidro acopladas em série para o procedimento

Na sequência as colunas de vidro contendo as resinas catiônicas e aniônicas, foram acopladas em série (Figura 25 (C) e conectadas ao reservatório de vidro (1 L). Em seguida a massa (g) de $CO(NH_2)_2$, equivalente a uma batelada, foi dissolvida em H_2O (Mili-Q). Esse procedimento foi realizado utilizando-se o mínimo de H_2O possível, obtendo uma solução concentrada do composto. A solução resultante foi admitida no topo da coluna de resina catiônica e eluída com H_2O (Mili-Q), contida no reservatório. Ao final do procedimento, a $CO(NH_2)_2$ foi cristalizada em uma chapa aquecedora com temperatura em torno de 50 ºC. Em seguida, determinou-se a massa (g) de $CO(NH_2)_2$ purificada e armazenou-se em frasco âmbar, devidamente esterilizado e identificado, para posteriormente serem realizadas às devidas análises físico-químicas do produto.

3.2.3. Reciclagem dos solventes orgânicos (CH_3OH e CH_3COCH_3) utilizados no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$

A síntese da $CO(NH_2)_2$ envolve a reação entre CO, NH_3, S e CH_3OH (meio líquido), sob baixa pressão e temperatura (BENDASSOLLI, 1988). No processo ocorre a formação de $CO(NH_2)_2$ e H_2S, como produtos da reação, além do CH_3OH e S em excesso na síntese. A solução contendo CH_3OH e possíveis traços de H_2S foi separada e armazenada em frasco especial para realizar a reciclagem (conforme descrito no item 3.2.2.3).

Para a reciclagem do CH_3OH foi utilizado um sistema especial de destilação (Figura 26), constituído de balão volumétrico, com capacidade 5 L, com duas entradas. No início admitiu-se, ao balão, a solução (CH_3OH e H_2S) residual obtida no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$. Em seguida, o balão foi colocado sobre uma manta de aquecimento e conectado a uma coluna de vidro (borosilicato) preenchida com anéis de Rashing. Esses anéis têm a função de diminuir a pressão de vapor do CH_3OH, gerado no balão, evitando arraste do gás para o ambiente (redução da etapa de condensação). Logo após, a solução do balão foi aquecida (temperatura da manta de 140 ºC), ocorrendo a liberação do CH_3OH. A temperatura (ºC) da coluna (base e topo) de fracionamento foi aferida com auxílio de termômetro digital.

Na sequência, o vapor de CH_3OH foi arrastado passando pela coluna de vidro, contendo os anéis de rashing, sendo posteriormente conduzidos para um condensador (tipo serpentina) refrigerado, onde condensou o CH_3OH (temperatura do topo da coluna de 43 ºC). A refrigeração do condensador foi mantida por um fluxo de H_2O (0 a 5 ºC) de 3 L min^{-1}, em sistema fechado, com auxílio de uma bomba peristáltica.

No final, abriu-se a torneira do sistema de destilação, eluindo lentamente o CH_3OH (l), para um frasco de vidro, como pode ser observado na Figura 26. O início do escoamento do CH_3OH (l), também chamado de "cabeça" da destilação, foi retirado e armazenado, sendo posteriormente somados com novas soluções, obtidas no processo de síntese, para novamente serem recicladas.

Figura 26 - Sistema de destilação de solventes orgânicos (Laboratório de Tratamento de Resíduos do CENA/USP)

O CH_3OH obtido foi submetido à análise de pureza química, testes em triplicata, utilizando o método da densidade, empregando densímetro e picnômetro de 25 mL. O resultado foi comparado com a densidade aferida do CH_3OH (grau analítico), cujo valor fornecido pelo fabricante é de 0,7918 $g.cm^{-3}$.

Na síntese da $CO(NH_2)_2$ também foi obtida a CH_3COCH_3 (50 mL/batelada), utilizada no procedimento de purificação química, contendo possíveis traços de S (principal impureza) da reação. Essa solução residual foi reciclada utilizando o sistema de destilação supracitado.

No entanto, no procedimento foram realizadas modificações quanto às temperaturas da manta aquecedora (120 ºC) e no topo da coluna de fracionamento (55 ºC). No final, a CH_3COCH_3 reciclada foi submetida à medida de densidade empregando densímetro e picnômetro (25 mL). O resultado foi comparado com a densidade aferida do CH_3COCH_3 (grau analítico), cujo valor fornecido pelo fabricante é de 0,79 $g.cm^{-3}$ á 20 ºC.

Os solventes (CH_3OH e CH_3COCH_3) obtidos no processo de reciclagem também foram reutilizados no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$, sendo o produto sintetizado submetido à análise do teor (%) de N. No procedimento analítico foi utilizado amostra de $CO(NH_2)_2$ com grau analítico (46,4 % N e 99,5 % pureza química) para efeito de comparação com o produto sintetizado utilizando reagentes reciclados.

3.2.4. Análise da qualidade físico-química da $CO(NH_2)_2$ sintetizada

3.2.4.1. Determinação do teor (%) de N

A determinação do teor (%) de N contido no produto final foi obtida utilizando, cerca de 2 mg de N, método convencional de digestão/destilação semimicro Kjeldahl (PARKINSON; ALLEN, l975). A mesma quantificação do teor de N (%) foi realizada em sistema com analisador automático ANCA-GSL (BARRIE; PROSSER, 1996). Esse modo mais simples de automação na análise do teor (%) de N e isotópica envolve um analisador automático de C e N interfaceado com um espectrômetro de massas CF-IRMS (ANCA/GSL - Automated Nitrogen and Carbon Analysis- Gas, Liquid and Solid Sample) (Figura 27). As amostras sólidas ($CO(NH_2)_2$) contendo na faixa de 150 a 200 μg de N foram seladas em cápsulas de estanho (Sn), sendo admitidas no auto-amostrador do aparelho. No procedimento analítico, em ambos os métodos, foi utilizado um padrão de $CO(NH_2)_2$ (grau analítico), com pureza química de 99,5 % (teor de N em torno de 46,4 %). Antes, porém, as amostras de $CO(NH_2)_2$ sintetizada e a comercial (P.A) foram secas em estufa ventilada a 65 ºC para eliminar totalmente a umidade.

Figura 27 - Espectrômetro de massas ANCA-GSL (sistema com analisador automatizado)

3.2.4.2. Determinação do ponto de fusão (ºC)

As análises do ponto de fusão (ºC) das amostras de $CO(NH_2)_2$ sintetizadas foram conduzidas tendo por base a metodologia estabelecida pela *Organization for Economic Cooperation and Development* - Guidelines for Testing of Chemicals (OECD, 1995). Analisaram-se um total de cinco (5) amostras de $CO(NH_2)_2$, sendo quatro (4) sintetizadas no reator e uma obtida comercialmente (grau analítico). Os testes foram realizados, em triplicata, utilizando amostra de $CO(NH_2)_2$ com abundância isotópica natural (0,365 e 1,11 % em átomos de ^{15}N e ^{13}C, respectivamente).

No procedimento foram utilizados tubos capilares de vidro borossilicato com diâmetro interno de 1 mm e espessura das paredes de 0,1 a 0,2 mm. Inicialmente as amostras de $CO(NH_2)_2$ foram secas em estufa ventilada a 65 ºC para eliminar totalmente a umidade. Em seguida, introduziu a amostra sólida de $CO(NH_2)_2$ no tubo capilar, previamente fechado em uma das extremidades (com auxílio de um bico Bunsen), e compactou, batendo com a extremidade fechada sobre uma superfície dura, de modo a formar uma coluna de 2,5 a 3,5 mm do material ($CO(NH_2)_2$). Na sequência, acomodou o capilar no local indicado do aparelho e ajustou a lente até a focagem da amostra. É recomendado, colocar sempre os três (capacidade máxima) tubos capilares no aparelho, mesmo que nem todos contenham amostra.

Logo após, colocou o termômetro no aparelho e aqueceu a uma temperatura inferior 5 a 10 ºC da faixa de fusão esperada para a amostra. Em seguida continuou, controlando gradativamente o aquecimento, até a completa fusão das amostras, observada através de lupa (com aumento de 4 vezes), sendo simultaneamente verificado o intervalo da temperatura (ºC). Esse valor foi anotado e comparado com o resultado do ponto de fusão da $CO(NH_2)_2$ referência (grau analítico). A temperatura (ºC) na qual a amostra tornou-se totalmente líquida e transparente foi considerada o ponto de fusão. A substância se torna totalmente transparente com a fusão, exceto se houver decomposição da mesma caracterizada por alteração da cor e /ou evolução de gás (temperatura de decomposição).

3.2.4.3. Análise do teor (%) de biureto

A determinação de biureto ($NH_2CONHCONH_2$) contido na $CO(NH_2)_2$ foi realizada no laboratório GEDEP/CAR da empresa Fosfertil, na cidade de Araucária-PR. Para análise empregou-se o método colorimétrico, envolvendo a reação do $NH_2CONHCONH_2$, em meio alcalino, com o sulfato de cobre II para formar um complexo de cor violeta (FERREIRA et al., 2007). Foram enviadas, para o procedimento analítico, um total de 5 (cinco) amostras de $CO(NH_2)_2$, sendo 4 (quatro) sintetizadas no reator e 1 (uma) obtida comercialmente com pureza química de 99,5 % (grau analítico), utilizada como referência de qualidade.

Inicialmente as amostras de $CO(NH_2)_2$ foram secas em estufa ventilada a 65 ºC para eliminar totalmente a umidade. Em seguida, pesou-se, aproximadamente, 1,5 g de $CO(NH_2)_2$, e transferiu-se adequadamente para frasco âmbar (capacidade de 50 mL). Antes, porém, as embalagens (frascos âmbares) foram submetidas a um processo de descontaminação, lavando com H_2O e sabão neutro, enxaguadas com H_2O desionizadas e solução (70 %) de CH_3CH_2OH, e finalmente secas em estufa ventilada a 80 ºC por 1h. No final, os frascos foram devidamente identificados e enviados para análise na empresa Fosfertil S/A.

3.2.4.4. Determinações multielementares por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), nas amostras de $CO(NH_2)_2$ sintetizadas

3.2.4.4.1. Amostras e padrões

As amostras de $CO(NH_2)_2$ sintetizadas foram previamente secadas em estufa ventilada a 65 ºC para eliminar totalmente a umidade. No procedimento foram utilizadas 7 (sete) amostras de $CO(NH_2)_2$, sendo 6 (seis) sintetizadas e 1 (uma) obtida comercialmente (P.A), com grau de pureza analítico (99,5 % pureza química).

Para o controle da qualidade das análises, durante a medição das amostras de $CO(NH_2)_2$, foram utilizados solução padrão multielementar de verificação da calibração (SVC), marca Agilent, obtida com base nas normas ISO 9001 em matriz de HNO_3 1 % (v/v), e solução de amostra certificada NIST (National Institute of Standard and Technology) 1515, folha de macieira, obtida mediante digestão de 0,25 g de amostra com 10 mL de HNO_3 de 50% (V/V), transferidas quantitativamente para tubos de polipropileno graduado e completado o volume de 25 mL com H_2O (Mili-Q). Os valores das concentrações (%) dos elementos contidos nas amostras certificadas SVC e NIST 1515 foram apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Concentração dos elementos na solução padrão multielementar de verificação da calibração (SVC) e da amostra certificada NIST 1515

Elemento	**SVC ($\mu g.L^{-1}$)**	**NIST 1515 ($mg.kg^{-1}$)**
B	-	27 ± 2
Na	1000	24,4 ± 1,2
Mg	1000	2710 ± 80
Al	10	286 ± 9
P	-	1590 ± 110
S	-	1800
K	1000	16,1 ± 0,2
Ca	1000	15260 ± 150
Cr	10	0,3
Mn	10	54 ± 3
Fe	1000	83 ± 5
Ni	10	0,91 ± 0,12
Cu	10	5,64 ± 0,24
Zn	10	12,5 ± 0,3
Ba	10	49 ± 2
Pb	10	0,47 ± 0,024

3.2.4.4.2. Preparo das amostras de $CO(NH_2)_2$ (digestão nítrica em sistema fechado)

As amostras de $CO(NH_2)_2$, para posterior análise por ICP-MS, foram previamente digeridas em sistema por radiação micro-ondas com emprego de tubos de teflon (PTFE) fechados (Figura 28 (A). Para o procedimento foi utilizado um forno micro-ondas Milestone, modelo ETHOS Touch-Control Plus Microwave Labstation- 2,45 GHz /1000W (Figura 29). A digestão das amostras, com base no manual SW-846 da USEPA, foi adaptada do método 3051A (USEPA, 2007).

Figura 28 - Tubo de Teflon (PTFE) de 65 mL, pressão até 20 bar e temperatura de 200 ºC (A) e rotor (Multiprep) com capacidade para 41 amostras simultâneas (B)

Inicialmente foi realizada a descontaminação do tubo de digestão, com lavagem em H_2O corrente e solução de HNO_3 10 %, sendo repassados com H_2O tipo 1 de resistividade 18,2 MΩ.cm e secos em câmara de fluxo laminar. Em seguida, pesaram-se 150 mg de $CO(NH_2)_2$ e transferiram-se para o tubo, adicionou-se 5 mL de HNO_3 purificado e 5 mL de H_2O (Mili-Q). Juntamente com as amostras de $CO(NH_2)_2$, foram dispostos 2 (dois) brancos que continham somente HNO_3 e H_2O. A digestão das amostras de $CO(NH_2)_2$ foi realizada em triplicata. Essa operação foi realizada dentro de uma capela de exaustão, por motivos de segurança e da liberação de vapores ácidos (HNO_3). Os tubos foram fechados com cuidado para que ficassem completamente vedados e colocados no rotor (Figura 28 (B)). Posteriormente, esse foi acoplado na cavidade do equipamento (Figura 29), adaptando-se os

sensores de pressão-temperatura, e aplicou-se o programa de aquecimento conforme mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Programa de aquecimento no forno de micro-ondas

Rampa	Tempo (min.)	Temperatura (ºC)	Potência (Watts)
1	1	100	1000
2	9	180	1000
3	5	180	1000
4	20	0	0

Figura 29 - Micro-ondas Milestone, modelo Ethos Plus Microwave Labstation e computador acoplado, rotor suporta até 41 tubos de digestão simultaneamente

Ao término do programa de digestão, com a redução da temperatura para 25 ºC, o rotor foi removido do equipamento e os tubos levados até uma capela de exaustão, para vapores ácidos, onde os frascos foram abertos. A solução digerida foi transferida para tubo de polipropileno "Falcon" graduado de 50 mL, sendo então o volume aferido para 25 mL com H_2O (Mili-Q).

3.2.4.4.3. Análise dos extratos por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

As análise do teor (mg/kg) dos elementos (B, Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Ba e Pb) nos extratos, foi realizada conforme o método 6020A do manual SW-846 (USEPA, 1998), em espectrômetro de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), marca Agilent, modelo 7500ce, com sistema de reação octopolo, nebulizador concêntrico, com vazão de 1 mL min^{-1}, instalado em câmara de nebulização refrigerada e sistema de injeção de amostras em fluxo (Figura 30).

Figura 30 - Espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) localizado no Laboratório de Nutrição de Plantas do CENA/USP

As condições operacionais do ICP-MS utilizadas durante as medições foram: 1500 W de potência no plasma; 1,73 V de potência RF matching; vazão do gás auxiliar de 0,9 L min^{-1}; vazão do gás nebulizador de 0,1 L min^{-1} e vazão do gás do plasma de 15 L min^{-1}.

3.2.5. Análise da qualidade microbiológica da $CO(NH_2)_2$

3.2.5.1. Acondicionamento da $CO(NH_2)_2$

As amostras de $CO(NH_2)_2$, contendo aproximadamente 1,5 g (equivalente a 1 batelada), foram previamente secas em estufa ventilada a 65 ºC para eliminar totalmente a umidade. No procedimento analítico foi utilizado um total de 9 (nove) amostras de $CO(NH_2)_2$, sendo 7 (sete) sintetizadas no reator e 2 (duas) obtidas comercialmente (P.A), com grau de pureza analítico (99,5 % pureza química). Essa última amostra (com grau analítico) foi utilizada para efeito comparativo de qualidade com o material sintetizado.

Para o acondicionamento do produto ($CO(NH_2)_2$) foram utilizados 6 (seis) frascos âmbares e 3 (três) ampolas de vidro borossilicato (sob vácuo), ambos com capacidade de 30 mL. As ampolas foram fechadas em uma das extremidades ficando com uma ponta fina, devidamente preparada para o procedimento (Figura 31). Em seguida as embalagens (frascos âmbares e ampolas) foram submetidas a um processo de desinfecção. Para isso, as embalagens foram lavadas com H_2O e sabão neutro, enxaguadas com H_2O desionizadas e por solução (70 %) de CH_3CH_2OH e, finalmente secas em estufa a 80 ºC por período de 2 h.

Após, as amostras de $CO(NH_2)_2$ foram transferidas, com auxílio de um funil, para os recipientes (frascos ou ampolas). Logo na sequência, os frascos foram fechados e as ampolas foram acopladas em uma linha de vácuo e, assim que atingiu a pressão 10^{-3} kPa, fecharam-se a extremidade mais fina com auxílio de maçarico (Figura 32).

Figura 31 - Procedimento para estrangulamento da parte superior da ampola de vidro (borossilicato)

Figura 32 - Realização de vácuo e fechamento das ampolas contendo $CO(NH_2)_2$

Ao final, os recipientes (ampolas e frascos âmbares) contendo as amostras de $CO(NH_2)_2$ foram devidamente identificados e armazenados para análise microbiológica (Figura 33).

Figura 33 - Frascos âmbares e ampolas (borossilicato) contendo $CO(NH_2)_2$

3.2.5.2. Análise microbiológica da $CO(NH_2)_2$

A determinação da carga microbiana, nas amostras de $CO(NH_2)_2$, foi efetuada de acordo com a Farmacopéia Brasileira (1988).

No procedimento pesou-se 1,5 g do composto e, transferiu-se para 13,5 mL de caldo (Letheen + tween 80), que correspondeu à diluição 1:10. A partir desta primeira diluição, transferiu-se 1,0 mL para um tubo contendo 9,0 mL de H_2O estéril, obtendo-se a diluição 1:100. Na sequência, foram inoculados 1 mL, em duplicata, em placas de Petri, devidamente esterilizadas, para contagem de microrganismos aeróbios viáveis e fungos, pelo método de "pour plate". Em seguida foram adicionados os meios específicos (Tryptic Soy Agar e Sabouraud). Após a solidificação do meio de cultura, as placas de TSA foram incubadas invertidas, numa temperatura de 30 a 35 ºC por 4 dias (contagem total de bactérias). Para a contagem de fungos e leveduras, seguiu o procedimento empregado na contagem de microrganismos com meio de cultura Ágar Sabouraud-Dextrose, incubando as placas entre 20 a 25 °C por 7 dias (PINTO et al., 2000). Após o tempo estabelecido foi realizada a contagem de bactérias e identificação dos fungos e leveduras.

3.2.6. Método para determinação isotópica de C (% em átomos de ^{13}C), em amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$, fazendo-se uso da espectrometria de massas (IRMS)

3.2.6.1. Obtenção de amostras de $CO(NH_2)_2$ enriquecidas em ^{13}C

As amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$ com abundância isotópica de 9,87; 29,69; 49,67 e 69,68 % em átomos de ^{13}C foram obtidas a partir do processo de diluição isotópica, fazendo-se uso de duas fontes isotópicas, como ilustrado na Figura 34.

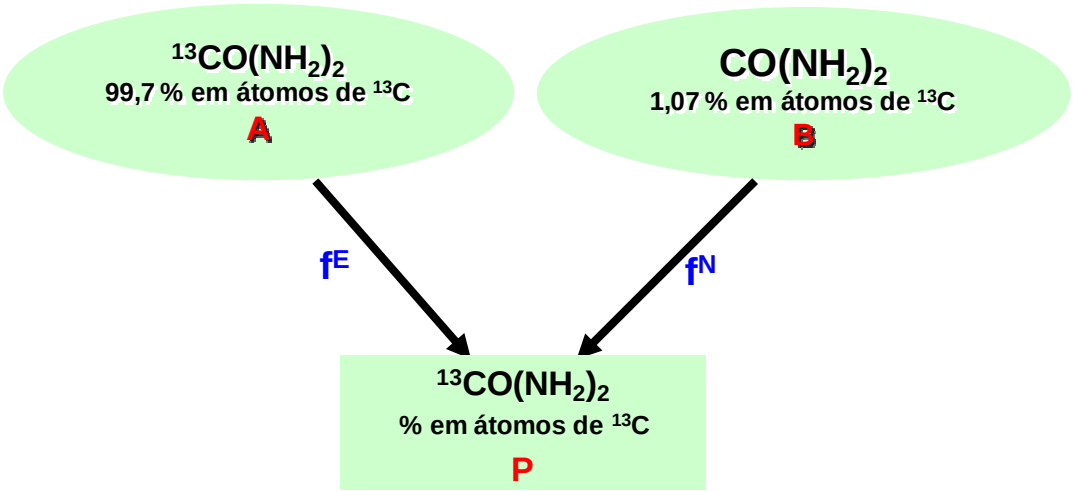


Figura 34 - Fluxograma do processo de diluição isotópica entre $CO(NH_2)_2$ com abundância isotópica natural (1,07 % em átomos de ^{13}C) e altamente enriquecida (99,7 % em átomos de ^{13}C)

Nestas condições podem-se definir as equações 20 e 21:

$$F^N + F^E = 1 \qquad (20)$$

Onde: F^N e F^E representam a fração de $CO(NH_2)_2$ com abundância isotópica natural e enriquecida (99,7 % em átomos de ^{13}C) respectivamente.

$$Ab(\%).\,U_N\,.\,F^N + Ab(\%).\,U_E\,.\,F^E = Ab(\%).\,P\,.\,(F^N+F^E) \qquad (21)$$

Sendo: $Ab(\%)U_N$, $Ab(\%)U_E$ e $Ab(\%)P$ - abundância isotópica da $CO(NH_2)_2$ natural, enriquecida e produto final, respectivamente.

A partir da equação (20), pode-se escrever:

$$F^N = 1 - F^E \qquad (22)$$

De (21) em (22), pode-se obter:

$$Ab(\%)\,U_N\,.\,(1 - F^E) + Ab(\%)\,U_E\,.\,F^E = Ab(\%).P \qquad (23)$$

$$Ab(\%)U_N - Ab(\%)\,U_N\,.\,F^E + Ab(\%)\,(U_E)\,.\,F^E = Ab(\%)\,P \qquad (24)$$

$$F^E\,(Ab(\%)\,U_E - Ab(\%)\,U_N) = Ab(\%)\,P - Ab(\%)U_N \qquad (25)$$

$$F^E = (Ab(\%)\,P - Ab(\%)U_N)/(Ab(\%)\,U_E - Ab(\%)U_N) \qquad (26)$$

As amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$ com 1,07 e 99,7 % em átomos de ^{13}C foram obtidas de forma direta, sem a necessidade de uso da técnica de diluição isotópica.

3.2.6.2. Método de oxidação da $^{13}CO(NH_2)_2$ por via seca

No procedimento a amostra de $^{13}CO(NH_2)_2$, contendo aproximadamente 0,25 e 0,65 mg de C (cerca de 1 e 3 mg de $^{13}CO(NH_2)_2$, respectivamente), foi colocada num tubo de vidro de borossilicato de aproximadamente 20 cm de comprimento e 0,9 mm de diâmetro interno. O tubo foi fechado numa das extremidades ficando com uma ponta fina, especialmente preparada para o procedimento. Juntamente com a amostra adicionaram-se em torno de 50 e 100 mg de CuO. O estrangulamento (Figura 35) na parte superior do tubo ocorreu para facilitar o fechamento do mesmo depois de realizado o vácuo no seu interior. Os tubos foram

então levados para uma linha de vácuo e, assim que atingiu a pressão de 10^{-3} MPa, fechados com auxílio de chama de maçarico (Figura 36). Em seguida, realizou-se a oxidação das amostras em forno mufla, para tempo de 3, 6 e 12 h, a temperatura de 550 ^{o}C (Figura 37) (BUCHANAN; CORCORAN, 1957; FRAZER; CRAWFORD, 1963). Os gases gerados no processo de oxidação, provavelmente, foram N_2, $^{13}CO_2$, NO_x e $H_2O_{(g)}$, Os NO_x ($NO + NO_2$) são reduzidos à N_2 pelo Cu^o (cobre metálico), produzindo o CuO com a liberação de oxigênio. O tubo contendo em seu interior o N_2, $^{13}CO_2$ e $H_2O_{(g)}$, foi levado para a linha (Figura 38), sob vácuo, acoplada "on line" com o sistema de admissão do espectrômetro de massas (IRMS). Nesse sistema o tubo foi quebrado e os gases foram liberados passando por duas armadilhas criogênicas (-70 e -196 ºC) para reter vapor de H_2O e o $^{13}CO_2$ respectivamente, sendo o N_2, não retido nas armadilhas, eliminado pelo próprio vácuo do equipamento. Após a retirada do banho de N_2 (l) (-196 ºC), o $^{13}CO_2$, devidamente purificado, foi admitido ao espectrômetro de massas para a determinação isotópica de C.

Figura 35 - Procedimento para estrangulamento da parte superior do tubo de vidro (borossilicato)

Figura 36 - Fechamento do tubo de vidro após realização de vácuo

Figura 37 - Forno mufla utilizado na combustão da $^{13}CO(NH_2)_2$

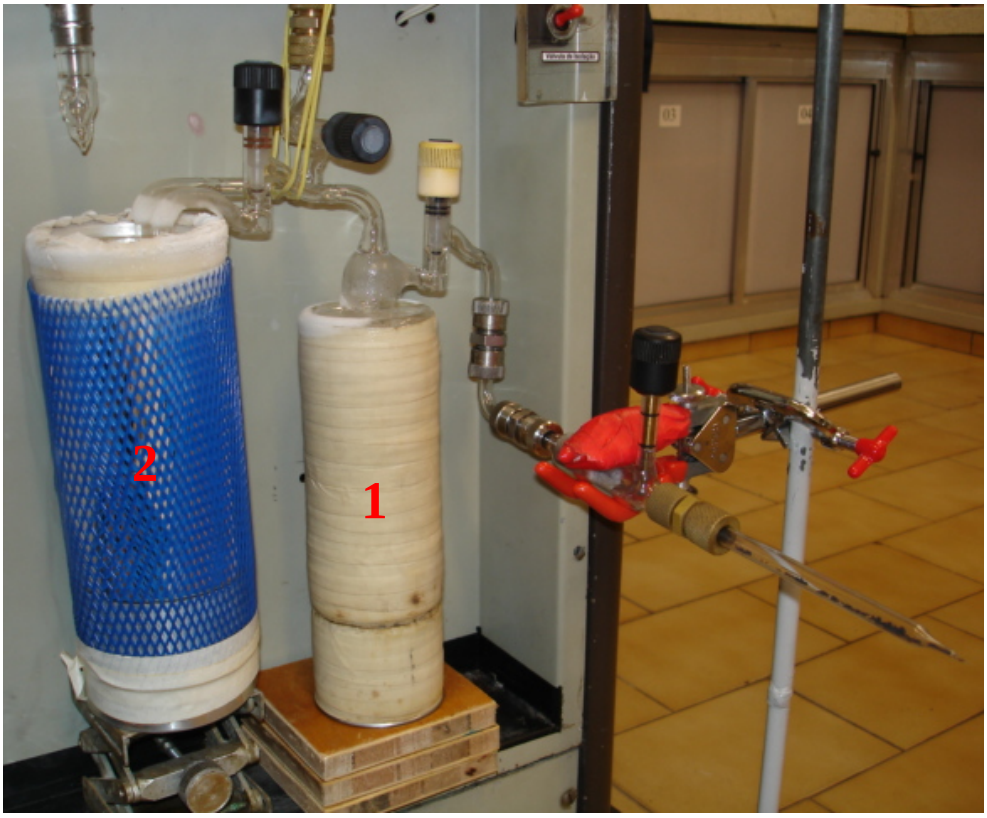


Figura 38 - Linha de admissão do $^{13}CO_{2(g)}$ diretamente ("on line") ao sistema de admissão do espectrômetro de massas Atlas Mat, CH4. (1) - Armadilha criogênica contendo $CO_2(s)$ e C_2H_5OH (1) (-70 ºC); (2) – Armadilha criogênica contendo N_2 (l) (- 196 ºC)

3.2.6.3. Determinação isotópica de C (% em átomos de ^{13}C)

Para a determinação isotópica de C, nas amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$ (1,07 até 99,7 % em átomos de ^{13}C), foi utilizado o espectrômetro de massas ATLAS MAT, modelo CH4 (Figura 39).

No espectrômetro de massas, o $^{13}CO_2$ foi introduzido no sistema de admissão e conduzido por um pequeno orifício ("Leak"), sob baixa pressão (± 10^{-4} kPa), para dentro de uma câmera de ionização. Nessa as moléculas do gás foram bombardeadas por um feixe de elétrons emitidos por um filamento (tungstênio) aquecido, produzindo íons gasosos positivos. Na sequência, os íons foram acelerados em placas negativas de 400 a 4000 V e aplicou um campo magnético perpendicular à trajetória dos íons. Como resultado dessa interação os íons foram desviados e separados de acordo com a relação massa/carga (m/q). Assim o íon $^{13}CO_2^+$ (m/q = 45) atingiu o coletor de íons em um local diferente do $^{12}CO_2^+$ (m/q = 44). Cada um destes íons foi recebido em um coletor tipo Faraday e várias massas referentes à região dos

íons CO_2^+ são coletadas: 44 ($^{12}C^{16}O^{16}O$), 45 ($^{12}C^{16}O^{17}O$; $^{13}C^{16}O^{16}O$), 46 ($^{12}C^{16}O^{18}O$, $^{12}C^{17}O^{17}O$ e $^{13}C^{16}O^{17}O$), 47 ($^{12}C^{17}O^{18}O$, $^{13}C^{17}O^{17}O$ e $^{13}C^{16}O^{18}O$), 48 ($^{12}C^{18}O^{18}O$ e $^{13}C^{17}O^{18}O$) e 49 ($^{13}C^{18}O^{18}O$).

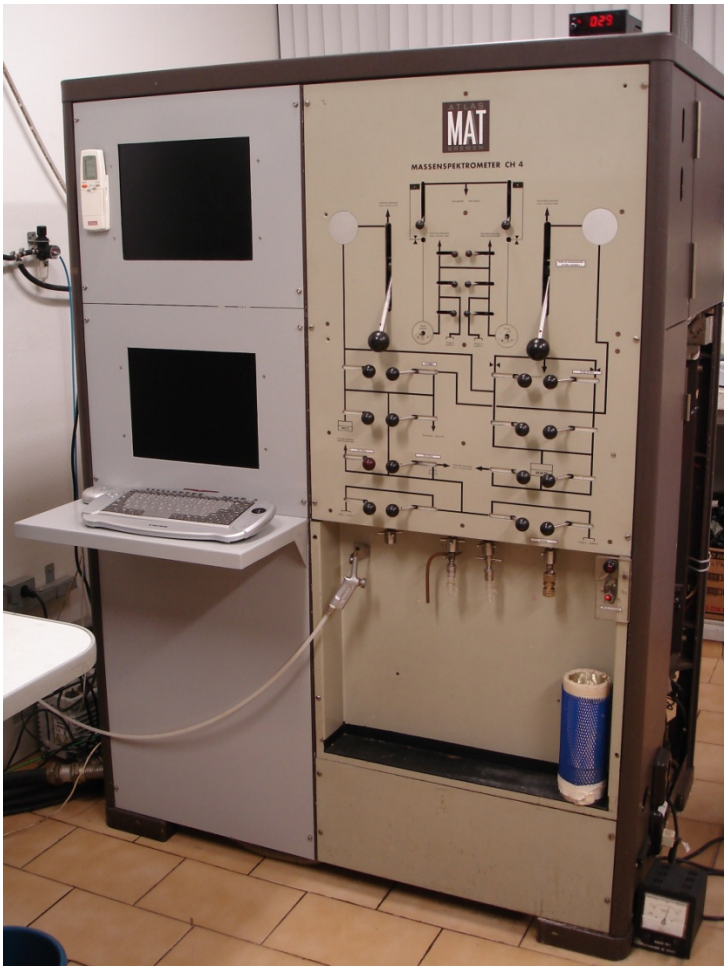


Figura 39 - Espectrômetro de massas ATLAS MAT, modelo CH4

Considerando que as combinações referentes às massas 47, 48, 49 são de baixa intensidade em relação às outras (SANTROCK et al., 1985), pode-se restringir o espectro aos números de massa: 44 ($^{12}C^{16}O^{16}O)^+$ e 45 ($^{12}C\ ^{16}O^{17}O$; $^{13}C^{16}O^{16}O)^+$. Sendo que a intensidade dos feixes de íons da massa 46 representa < 0,02 % da somatória de todas as intensidades. Assim foi calculada a abundância (% em átomos) de ^{13}C de uma determinada amostra pela equação (27):

$$\% \text{ em átomos de } ^{13}C = 100 - 100/[I_{45}/I_{44} - 0{,}00075] + 1 \qquad (27)$$

Onde:

I_{44} = intensidade do feixe de íons de massa 44 $(^{12}C^{16}O^{16}O)^+$;

I_{45} = intensidade do feixe de íons de massa 45 $(^{12}C\ ^{16}O^{17}O;\ ^{13}C^{16}O^{16}O)^+$;

0,00075 = valor do coeficiente angular da reta entre as razões I_{45}/I_{44} e $^{13}C/^{12}C$.

Os valores utilizados na equação (27) são obtidos a partir do espectro de massas 44 e 45, contendo 3 repetições, para cada amostras de CO_2^+. Um espectro de massas obtido no espectrômetro, em escala logarítmica, pode ser visualizado na Figura 40.

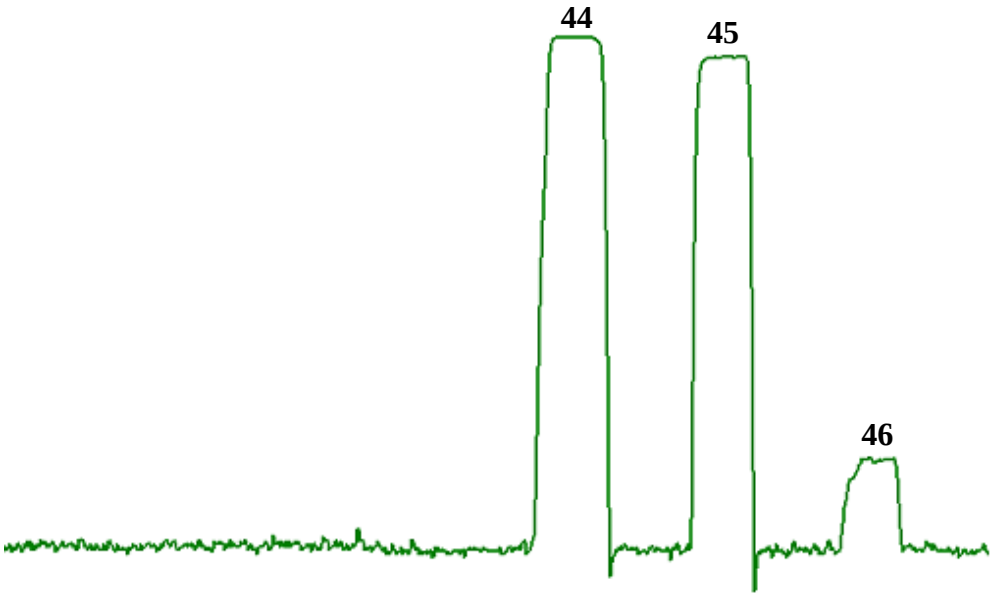


Figura 40 - Espectro de massas de $^{13}CO_2$, massa 44, 45 e 46, para amostra de $^{13}CO(NH_2)_2$ com 50 % em átomos de ^{13}C

3.2.7. Determinação isotópica simultânea C e N (% em átomos de ^{13}C e ^{15}N), em amostras de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, por espectrometria de massas

3.2.7.1. Obtenção de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ duplamente marcadas em ^{13}C e ^{15}N

As amostras de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ foram obtidas utilizando o processo de diluição isotópica (equação 28), conforme descrito no item 3.2.6.1. A Figura 41 ilustra esquematicamente a obtenção da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ duplamente marcada utilizando duas fontes isotópica enriquecidas. As diferentes concentrações isotópicas utilizadas no procedimento foram apresentadas na Tabela 6, sendo que para a amostra 1 foi empregado diretamente a

$^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ com abundância isotópica natural (0,366 e 1,07 % em átomos de ^{15}N e ^{13}C, respectivamente).

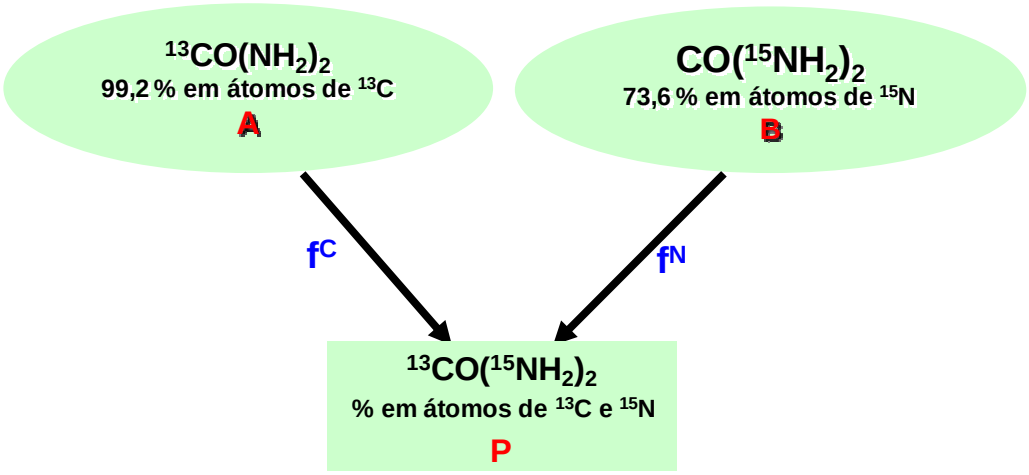


Figura 41 - Fluxograma para obtenção da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ duplamente marcada

$$\mathbf{A.f^C + B.f^N = P\ (f^C + f^N)} \qquad (28)$$

Onde:

A, B e P: Abundância isotópica (% em átomos) da $CO(NH_2)_2$ enriquecida em ^{13}C; ^{15}N; ^{15}N e ^{13}C (produto final), respectivamente.

f^C e f^N = fração de ^{13}C e ^{15}N, no produto final, proveniente, respectivamente, da $^{13}CO(NH_2)_2$ enriquecida a 99,2 % em ^{13}C e $CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida a 73,6 % em ^{15}N.

Tabela 6 - Abundância isotópica teórica de ^{15}N e ^{13}C (% em átomos), das amostras de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, utilizando o processo de diluição isotópica

Amostras	**Abundância isotópica teórica (% em átomos)**	
	^{15}N	**^{13}C**
1	0,36 ± 0,0	1,1 ± 0,0
2	4,9 ± 0,1	93,6 ± 0,1
3	14,7 ± 0,4	81,0 ± 0,2
4	29,9 ± 0,2	59,8 ± 0,2
5	50,3 ± 0,2	32,4 ± 0,3
6	72,5 ± 0,2	2,5 ± 0,3

3.2.7.2. Método de oxidação da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ por via seca

Para obtenção do $^{13}CO_2$ e $^{15}N_2$, em amostras de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, utilizou-se o procedimento conforme descrito no item 3.2.6.2. Porém, a massa (g) de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ foi obtida a partir do balanço isotópico de acordo com a equação (28), e pesada em cápsula de vidro, evitando perda do material ($^{13}CO(^{15}NH_2)_2$) enriquecido. Em seguida, as cápsulas foram colocadas no interior do tubo de borossilicato e adicionou-se 50 mg de CuO (quantidade de O_2 em excesso).

Na sequência, os tubos foram acoplados a uma linha de vácuo e, assim que atingiu a pressão de 10^{-3} MPa, fechados com auxílio de um maçarico (± 1200 ºC). Em seguida realizou-se a oxidação das amostras em forno mufla por 3 h a temperatura de 550 ºC. Os gases gerados na oxidação, provavelmente, foram $^{15}N_2$, $^{13}CO_2$, $^{15}NO_x$ e vapor de H_2O. Os $^{15}NO_x$ são reduzidos à $^{15}N_2$ pelo Cuº (cobre metálico), produzindo o CuO com a liberação do oxigênio. O tubo contendo em seu interior o $^{15}N_2$, $^{13}CO_2$ e $H_2O(g)$, foi levado para linha (Figura 38), sob vácuo, acoplada "on line" com o sistema de admissão do espectrômetro de massas. O tubo foi quebrado e os gases foram liberados passando por duas armadilhas criogênicas (-70 e -196 ºC) para reter H_2O e $^{13}CO_2$ respectivamente. O $^{15}N_2$, não retido nas armadilhas flui pelo sistema de admissão do equipamento, sendo possível a determinação (% em átomos de ^{15}N) isotópica de N. O processo de criogenia evita a formação de CO no interior do espectrômetro de massas e possível interferência no resultado final em relação à abundância isotópica de ^{15}N (% em átomos de ^{15}N). Esse procedimento é justificado, pois a combinação de massa $^{12}C^{16}O$ (massa atômica 27,9994 g) e $^{14}N^{14}N$ (massa atômica 28,0134 g) são muito próximas, sendo necessário o emprego de um espectrômetro de elevada resolução (≥ 2000). Na sequência, o $^{15}N_2$ foi eliminado pelo vácuo do equipamento, admitiu-se o $^{13}CO_2$ ao espectrômetro de massas para determinação (% em átomos de ^{13}C) isotópica de C.

3.2.7.3. Determinação isotópica simultânea de N e C (% em átomos de ^{15}N e ^{13}C)

No espectrômetro de massas os gases ($^{15}N_2$ e $^{13}CO_2$) foram introduzidos separadamente, sob baixa pressão (± 10^{-3} kPa), dentro da câmera de ionização. Os detalhes do mecanismo de interação de cada gás no aparelho foi o mesmo descrito no item 3.2.6.3. Como resultado os íons foram desviados e separados de acordo com a relação massa/carga (m/q). Assim, o íon $^{14}N_2^+$ (m/q = 28) atingiu lugar diferente do que os íons $^{14}N^{15}N^+$ (m/q

=29) e $^{15}N_2^+$ (m/q = 30). Cada um destes íons foi recebido, em sistema de varredura, em um único coletor tipo de Faraday, com variação do campo magnético, e as várias massas referentes á região dos íons N_2^+ são coletadas: 28 ($^{14}N^{14}N$), 29 ($^{14}N^{15}N$; $^{15}N^{14}N$) e 30 ($^{15}N^{15}N$). O cálculo da abundância isotópica de ^{15}N (% em átomos) foi realizado de acordo com o descrito por Trivelin (1973).

A abundância isotópica de N (% em átomos de ^{15}N ou % A ^{15}N) foi representada pela equação (29).

$$\%A\ ^{15}N = \frac{[^{14}N^{15}N] + 2 \,.\, [^{15}N^{15}N]}{2 \,.\, \{ [^{14}N^{14}N] + [^{14}N^{15}N] + [^{15}N^{15}N] \}} \,.\, 100 \quad \text{.....} \quad (29)$$

Onde:

$N_2 = [^{14}N^{14}N]$; $[^{14}N^{15}N]$ e $[^{15}N^{15}N]$ que correspondem a I_{28}, I_{29} e I_{30}, respectivamente.

I = intensidade de corrente gerada pelos íons de massa 28, 29 e 30.

A equação (29) pode ser escrita como:

$$\%A\ ^{15}N = \frac{I_{29} + 2 \,.\, I_{30}}{2 \,.\, (I_{28} + I_{29} + I_{30})} \,.\, 100 \quad \text{.....} \quad (30)$$

$$\%A\ ^{15}N = \frac{100}{2\,r + 1} = \frac{100}{(2/R) + 1} \quad \text{.....} \quad (31)$$

Significando: $r = I_{28}/I_{29}$;

$R = I_{29}/I_{28}$

Sendo a equação (31) empregada nas amostras com abundância isotópica inferior a 5 % em átomos de ^{15}N e a equação (30) para amostras gasosas (N_2) com abundância superior a 5 % em átomos de ^{15}N.

As interações do $^{13}CO_2$ e os devidos cálculos da abundância isotópica de ^{13}C foram os mesmos descritos no item 3.2.6.3.

3.2.8. Síntese de $CO(NH_2)_2$ enriquecida em ^{13}C e/ou ^{15}N

Para síntese da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, enriquecida no isótopo de ^{13}C e/ou ^{15}N, utilizou-se o mesmo procedimento descrito no item 3.2.2. e nas melhores condições (quantidade de reagentes, temperatura, tempo de reação e pressão no reator) obtidas com sistema de produção. Porém, no processo de carga do reator foram utilizadas, dependendo do elemento marcado, duas fontes isotópicas, sendo uma o ^{13}CO (g) com enriquecimento de 99,7 % em átomos de ^{13}C (obtida junto ao Laboratório da Spectra Gases Inc. e apresentada na Figura 42) e outra a $^{15}NH_3$ anidra com enriquecimento de 73,6 a 90,0 % em átomos de ^{15}N (produzida no Laboratório de Isótopos Estáveis do CENA/USP). Deve-se ainda salientar, que a quantidade (g) de ^{13}CO e/ou $^{15}NH_3$ anidra (reagentes limitantes), empregados na reação, foram estabelecidas com base nos resultados do rendimento de síntese e balanço de massa, obtidos durante a avaliação da influência (% em excesso NH_3 e/ou CO) dos reagentes no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$. Esses valores objetivam contribuir no processo de produção, evitando perdas de materiais enriquecidos em ^{13}C e/ou ^{15}N, devido ao alto valor (US$ 523.00/g de ^{15}N e US$ 593.00/g de ^{13}C, referente ao custo FOB) agregado no isótopo estável.

Na produção da $^{13}CO(NH_2)_2$ enriquecida no isótopo de ^{13}C foi utilizado o ^{13}CO previamente enriquecido (99,7 % em átomos de ^{13}C), contido em um cilindro com pressão interna de 12,81 MPa e pureza química de 99,5 %. Para transferência do ^{13}CO, para o interior do reator de síntese, utilizou-se R_2 (reservatório de aço inoxidável com capacidade de 250 mL), cuja massa (g), do reator vazio, foi determinada por gravimetria. Antes, porém, R_2 foi submetido a um procedimento de limpeza, para evitar diluição isotópica, utilizando-se fluxo de N_2 (gás inerte). Para isso, R_2 foi conectado, pela válvula V_6, ao manômetro do cilindro de N_2, localizado na central de distribuição de gases (Figura 12). Em seguida, abriram-se, pela ordem, V_6, V_7 e o manômetro do cilindro, admitindo-se fluxo de N_2 pelo interior de R_2. Após, fecharam-se, pela ordem, o manômetro, V_6, V_7 e desconectou-se R_2.

Figura 42 - Processo de transferência do $^{13}CO(g)$ para reservatório de aço inoxidável (R_2)

Logo após, R_2 foi conectado, por tubulação e válvula (V_6) tipo esfera de aço inoxidável (¼´), ao registro do cilindro de ^{13}CO (enriquecido a 99,7 % em átomos de ^{13}C), como pode ser observado na Figura 42. Abriram-se, pela ordem, a válvula V_6 e o registro, transferindo-se o ^{13}CO para o interior do R_2. A quantidade (g) de ^{13}CO (reagente limitante), empregada na reação, foi base para o cálculo da massa (g) de NH_3 anidra (0,366 % em átomos ^{15}N) e S, tomando como referência a estequiometria da reação 32. Com objetivo de facilitar a transferência do gás para R_2, esse foi refrigerado em recipiente contendo N_2 líquido (-196 ºC). No final, desconectou-se R_2 e a massa (g) do reagente transferida foi determinada por gravimetria (reator + ^{13}CO). Na sequência, o ^{13}CO, contido em R_2, foi então carregado ao reator, contendo os outros reagentes (S, NH_3, CH_3OH e H_2S) da síntese, como descrito no item 3.2.2.1. Em seguida, foi realizada a síntese da $^{13}CO(NH_2)_2$, com base nos procedimentos descritos nos itens 3.2.2.2, 3.2.2.3 e 3.2.2.4.

$$2NH_3 + {}^{13}CO + S \rightarrow {}^{13}CO(NH_2)_2 + H_2S \qquad (32)$$

A síntese da $CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida em ^{15}N foi realizada utilizando a $^{15}NH_3$ anidra com 90,0 % em átomos de ^{15}N, obtida em um sistema de produção adaptado de Bendassolli et al. (2002), como mostrado na Figura 43. Esse composto ($^{15}NH_3$) foi produzido a partir do $(^{15}NH_4)_2SO_4$ previamente enriquecido por cromatografia de troca iônica (MAXIMO et al., 2000).

A Figura 43 mostra o balão volumétrico (1 L) modificado, contendo duas entradas adicionais (E_1 e E_2). Por E1, admitiu-se o gás de arraste (N_2) e, pela entrada E_2, a solução 18 mol L^{-1} de NaOH. Inicialmente, admitiu-se ao balão de reação à solução de $(^{15}NH_4)_2SO_4$, cuja massa foi definida em função da quantidade (g) de $^{15}NH_3$ anidra a ser utilizada na síntese da $CO(^{15}NH_2)_2$. O balão foi colocado sobre uma chapa aquecedora do agitador magnético e conectado ao condensador Allinh. Em seguida, R_1 foi ligado diretamente ao sistema (serpentina de aço inoxidável) de liquefação da $^{15}NH_3$. Antes, porém, realizou-se o procedimento de limpeza (como mencionado anteriormente para R_2) em R_1, utilizando fluxo de N_2 (gás inerte), e determinou a massa (g), do reator vazio, por gravimetria.

Após a montagem da linha, foi admitido por E_2 20 mL de solução 18 mol L^{-1} de NaOH que representou 50 % em excesso na solução final. Em seguida, a solução do balão foi aquecida a 70 ºC, ocorrendo à liberação de $^{15}NH_3(g)$ de acordo com a reação (33).

$$(^{15}NH_4)_2SO_4 + 2\ NaOH \rightleftharpoons 2\ ^{15}NH_3 + Na_2SO_4 + 2\ H_2O \qquad (33)$$

A $^{15}NH_3(g)$, juntamente com o vapor de H_2O, foi arrastada do balão de reação por um fluxo de N_2 comercial e passando pelo condensador Allinh, de diâmetro de 40 mm e altura de 500 mm, onde a maior fração de vapor de H_2O se condensou. No condensador foi mantido, em circuito fechado, um fluxo de H_2O (0 a 5 ºC) de 3 L min^{-1}, com auxílio de uma bomba peristáltica. Após esse estágio, a $^{15}NH_3(g)$ contendo traços de vapor de H_2O passou por uma coluna preenchida por pastilhas de NaOH, como agente dessecante, onde ficou retido todo o vapor de H_2O presente junto à $^{15}NH_3(g)$. Assim sendo, no final desse estágio (saída da coluna dessecante), tem-se apenas $^{15}NH_3(g)$ e o gás de arraste (N_2).

Os dois estágios seguintes promoveram a liquefação da $^{15}NH_3(g)$ por resfriamento. No primeiro, constituído de uma serpentina de aço inoxidável 316 disposta à temperatura de -33 ºC (solução de CH_3CH_2OH e $CO_2(s)$) onde a $^{15}NH_3(g)$ passou ao estado de vapor saturado. No segundo, a $^{15}NH_3(g)$ foi liquefeita no interior do reator de aço inoxidável (R_1), imerso em banho criogênico de -73 ºC (CH_3CH_2OH e $CO_2(s)$).

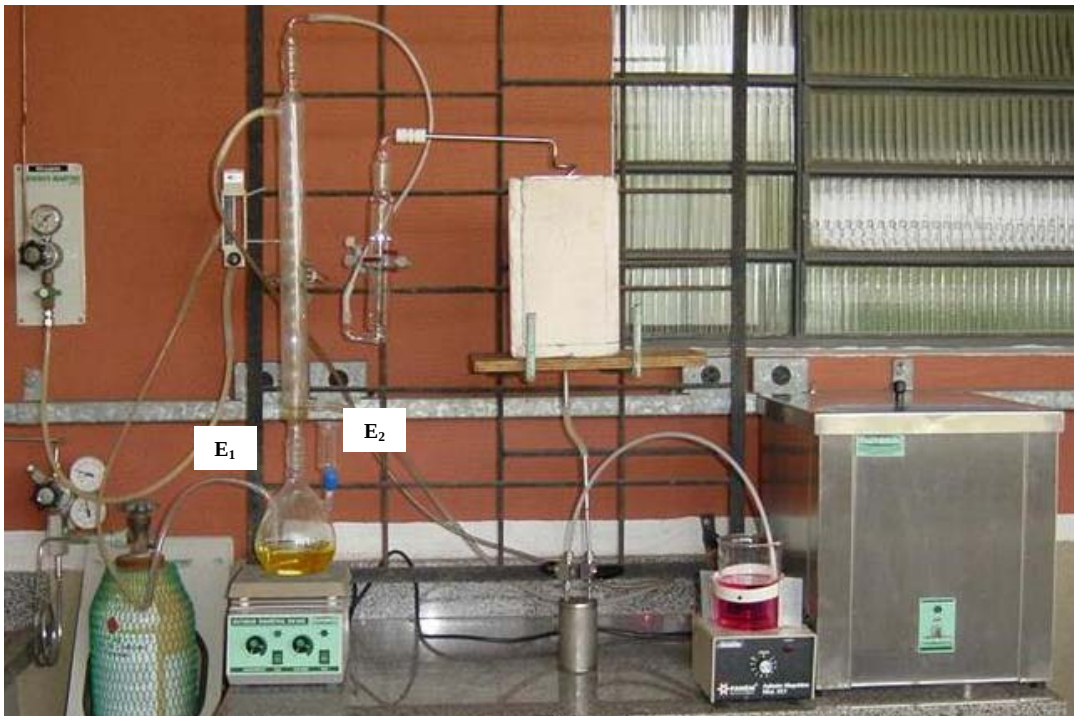


Figura 43 - Sistema completo de produção de $^{15}NH_3$ anidra (BEDASSOLLI et al., 2002)

Em vista da pressão de vapor de $^{15}NH_3(g)$ à temperatura de -73 ºC, o gás N_2, na saída do reator R_1, pode arrastar uma pequena massa de $^{15}NH_3$ anidra, sendo assim este gás efluente é borbulhado em uma solução 2,5 mol L^{-1} de H_2SO_4.

Na sequência, R_1, contendo $^{15}NH_3$ anidra, foi retirado do banho criogênico, e após atingir a temperatura ambiente, teve sua parede externa seca e determinou-se a massa (g) por gravimetria (reator + $^{15}NH_3$ anidra). Essa quantidade de $^{15}NH_3$ (reagente limitante) foi base de cálculo para determinar a massa (g) de CO e S, tomando como referência a relação estequiométrica da reação 34. Em seguida, R_1, foi admitido ao reator, juntamente com os outros reagentes (H_2S e CH_3OH), conforme descrito no item 3.2.2.1. Em seguida, foi realizada a síntese da $^{13}CO(NH_2)_2$, com base nos procedimentos descritos nos itens 3.2.2.2, 3.2.2.3 e 3.2.2.4.

$$2^{15}NH_3 + CO + S \rightarrow CO(^{15}NH_2)_2 + H_2S \qquad (34)$$

Por fim, na obtenção da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida nos isótopos de ^{13}C e ^{15}N foram utilizadas as duas fontes isotópicas (^{13}CO com 99,7 % em átomos de ^{13}C e a $^{15}NH_3$ anidra com 73,6 % em átomos de ^{15}N), de acordo com a reação 35. A quantidade (g) de ^{13}CO e $^{15}NH_3$ anidra (reagentes limitantes), empregados na reação, foi condicionada aos melhores

resultados, do rendimento da síntese e balanço de massa, obtidos durante a avaliação da influência da quantidade (% em excesso de NH_3 e CO) dos reagentes no processo de síntese. No procedimento os reservatórios R_2 e R_1, contendo ^{13}CO e $^{15}NH_3$ anidra respectivamente, foram carregados ao reator, juntamente com os outros reagentes (S, CH_3OH e H_2S) da síntese em equilíbrio, como descrito no item 3.2.2.1. Em seguida, foi realizada a síntese da $^{13}CO(NH_2)_2$, com base nos procedimentos descritos nos itens 3.2.2.2, 3.2.2.3 e 3.2.2.4.

$$2\,^{15}NH_3 + {}^{13}CO + S \rightarrow {}^{13}CO(^{15}NH_2)_2 + H_2S \qquad (35)$$

As amostras de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecidas em ^{13}C e/ou ^{15}N obtidas foram submetidas a análises do teor (%) de N pelo método convencional digestão/destilação semimicro Kjeldahl (PARKINSON; ALLEN, l975) e determinações isotópicas (% em átomos de ^{13}C e/ou ^{15}N) de C e N, empregando-se o espectrômetro de massas ATLAS MAT modelo CH4, conforme descritos nos itens 3.2.6 e 3.2.7.

3.3. Análises estatísticas dos resultados

Os dados obtidos foram analisados através da técnica de análise de variância e testes para comparação múltipla de médias de Tukey com nível de significância de 5 % de probabilidade. Para análise de variância foi usado o modelo apropriado para os experimentos inteiramente casualizados, com arranjo fatorial adequado para cada um dos experimentos envolvendo os parâmetros (quantidade dos reagentes, tempo de reação, admissão de H_2S, pressão do sistema, temperatura e meio líquido da reação) avaliados no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$. Esses testes foram realizados em triplicata, utilizando reagentes (NH_3 e CO) com abundância isotópica natural (0,365 e 1,11 % em átomos de ^{15}N e ^{13}C, respectivamente).

Foram efetuados os cálculos das análises estatísticas utilizando o sistema SAS (SAS, 2008a; 2008b).

Adicionalmente foi aplicada a técnica de regressão linear simples para modelar o comportamento dos resultados obtidos entre as determinações (% em átomos de ^{13}C e/ou ^{15}N) isotópicas teóricas (ABUTEO) e a experimentais (ABUEXP). Ainda deve salientar que os dados isotópicos de C e/ou N foram apresentados na forma de média ± desvio padrão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção do sulfeto de hidrogênio (H_2S)

De acordo com a reação (11) pode-se calcular a quantidade de H_2S a ser utilizada no processo de produção da $CO(NH_2)_2$. Conhecendo-se as massas atômicas do Fe (56), S (32), H(1) e O (16), verificou-se que, utilizando-se 0,104 g de FeS (0,001 mols) em uma solução 1:1 de H_2SO_4, a quantidade máxima teórica de H_2S possível de se obter seria de 0,04 g

Com a utilização do sistema, descrito no item 3.2.1, foi obtida a quantidade 0,02 g de H_2S, nas condições acima mencionadas, apresentando um rendimento de 50 %. Desta forma, foi necessário utilizar em torno de 0,22 g de FeS (equivalente a 0,002 mols) para obter a quantidade desejada de 0,04 g de H_2S. As condições de operação na linha de produção do H_2S foram satisfatórias, não apresentando nenhum problema de vazamento, podendo diminuir o rendimento do processo, e obteve-se um produto em condições ideais para uso na síntese da $CO(NH_2)_2$.

4.2. Síntese da $CO(NH_2)_2$

Utilizando o sistema de síntese proposto, envolvendo a reação entre NH_3, CO e S como reagentes, tendo, ainda, CH_3OH como líquido de reação, foi possível chegar ao produto final de interesse. De acordo com os procedimentos descritos no item 3.2.2, avaliou-se o rendimento de síntese em função da quantidade de NH_3 (0, 25, 50, 100, 150, 200, 300 e 350 % em excesso), CO e S (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 % em excesso) na reação de síntese. Nessa avaliação mencionada à quantidade de 0 % de NH_3 ou CO e S, foi simplesmente a relação estequiométrica dos reagentes na reação global (12) de síntese da $CO(NH_2)_2$. A quantidade (mL) de CH_3OH, empregada no processo de síntese, foi em função da massa (g) de S na reação (BENDASSOLLI, 1988). Essa avaliação da influência da quantidade (% excesso) de NH_3 e CO na reação de síntese é muito importante, devido aos custos dos isótopos estáveis, empregados no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$ enriquecida em ^{13}C e/ou ^{15}N.

No procedimento experimental, a temperatura de reação foi atingida após, aproximadamente, período de 30 minutos, quando, então, manteve-se constante com o

emprego de um sistema de aquecimento com controlador (termostato/termopar) de temperatura. A pressão interna do reator variou de 0,26 a 1,06 MPa, dependendo da quantidade (g) dos reagentes (NH_3, CO, CH_3OH ou CH_3CH_2OH e H_2S) utilizados na reação de síntese.

Ao final do período de reação e do resfriamento do reator (temperatura em torno de 25 ºC), efetuou-se a exaustão dos gases em, aproximadamente, 25 minutos. A eficiência de retenção dos gases, principalmente do H_2S, foi elevada, não havendo problema de emissão para a atmosfera. Além disso, todo o procedimento foi realizado dentro de capela de exaustão, para vapor ácido, acoplada a um lavador de gases. O processo completo de síntese, por batelada, da $CO(NH_2)_2$ enriquecida nos isótopos de ^{13}C e/ou ^{15}N demanda um tempo de oito a nove horas de trabalho, dependendo das fontes isotópicas enriquecidas de interesse.

Os resultados médios (três repetições) da síntese de $CO(NH_2)_2$, em função da quantidade (0, 25, 50, 100, 150, 200, 300 e 350 % em excesso) de NH_3, podem ser observados na Tabela 7. Nessas condições, com 1,12 g de CO (reagente limitante), a produção máxima teórica (rendimento de 100 %) é de 2,4 g de $CO(NH_2)_2$. Os valores de (A) e (B), respectivamente, correspondem às amostras obtidas no reator após processo de filtração a vácuo e purificação química. De acordo com os dados houve diferença significativa ($F = 42,20$), ao nível de 5 % de probabilidade, entre os tratamentos (A) e (B). No entanto, os resultados obtidos para 25, 150 e 200 %, em excesso de NH_3, não apresentaram diferença estatística ($P \geq 0,05$) entre os tratamentos, mas observou-se redução, em média, de 6,3 % no rendimento em (B). Essa redução (equivalente a 0,17 g do composto) em relação às condições sem a etapa de purificação química (A) deve-se a perda de massa de contaminantes (principalmente S) no processo de purificação, empregando-se CH_3COCH_3 (acetona), submetidas às amostras de $CO(NH_2)_2$. Desta forma, o procedimento (B) apresentou, na melhor condição (350 % em excesso de NH_3), rendimento médio de 75,3 %, sendo possível obter 1,81 g de $CO(NH_2)_2$ purificada quimicamente.

Ainda na Tabela 7, os resultados obtidos em (B), nas melhores condições experimentais (100 ºC, 150 minutos e 350 % em excesso de NH_3), foram altamente significativos (75,3 %) com relação ao valor da conversão teórica (75,7 %), possível de obter com o sistema proposto (BENDASSOLLI; VICTORIA, 1995). Esse fato indicou que a reação de síntese, nas condições mencionadas, praticamente atingiu o equilíbrio.

Tabela 7 - Rendimento da síntese de $CO(NH_2)_2$ em função da quantidade de NH_3 (0, 25, 50, 100, 150, 200, 300 e 350 % em excesso), CO (1,12 g) e S (1,28 g) na reação global. (n = 3)

Excesso de NH_3 (%)	**Rendimento ----------(%)----------**	
	(A)	**(B)**
0	36,38 cA	23,61dB
25	43,05 cA	36,66 cA
50	44,44 cA	37,08 cB
100	44,72 cA	37,91 cB
150	66,38 bA	60,41 bA
200	68,88 bA	62,36 bA
300	74,72 abA	67,08 abB
350	82,36 aA	75,27 aB
Média	57,62 A	50,05 B
$F_{(excesso)} = 117,66$	$F_{(tratamento)} = 42,20$	$F_{(exc.\ x\ trat.)} = 0,43^{ns}$ CV(%) = 7,49

Medidas seguidas de letras diferentes minúscula na coluna e maiúscula na linha diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. (A) $CO(NH_2)_2$ sintetizada no reator. (B) $CO(NH_2)_2$ obtida após processo de purificação química.

De acordo com a Tabela 7, os resultados médios de rendimento em função da quantidade (0 a 350 % em excesso) de NH_3 apresentaram diferença estatística (F = 117,66), ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey. Esse fato pode ser atribuído, principalmente, a presença do reagente (NH_3) em duas reações intermediária (14 e 17) do mecanismo de síntese proposto. Além disso, o aumento da concentração de NH_3, variação de 25 a 350 % em excesso, deslocou o equilíbrio das reações no sentido de consumo do reagente, ou seja, formação dos produtos (principalmente o $H_2NCOSNH_4$), com intuito de anular esse efeito (Princípio de Le Chatelier) (RUSSEL, 1994). Essas perturbações (alterações) no equilíbrio das reações resultaram em um aumento significativo de 105,32 % (1,00 g de $CO(NH_2)_2$) no rendimento do processo de síntese em (B). Desta forma, na melhor condição (350 % em excesso), foi possível obter, em média, 1,82 g de $CO(NH_2)_2$ (75,27 % de

conversão). Além disso, os resultados obtidos em (B) para 300 e 350 % não apresentaram diferença estatística, ao nível de 5 % de probabilidade, porém observou redução média de 8,2 % (equivalente a 0,21 g de $CO(NH_2)_2$) no rendimento do processo. Esse valor é significativo quando da utilização de $^{15}NH_3$ e/ou ^{13}CO enriquecidos (80 a 95 % em átomos de ^{13}C e ^{15}N) na reação de síntese, devido ao elevado valor agregado aos isótopos estáveis.

No procedimento de síntese da $CO(NH_2)_2$ foi realizada a recuperação e quantificação (%) do teor de N-NH_3 dos gases exauridos do reator. Esses resultados, juntamente com os valores do rendimento da síntese, foram utilizados para obter o balanço de massas (%) dos principais reagentes (NH_3 e CO), como pode ser observado na Figura 44. Os valores da síntese foram obtidos durante a avaliação do rendimento do processo em função da quantidade (0, 25, 50, 100, 150, 200, 300 e 350 % em excesso) de NH_3 na reação global (12).

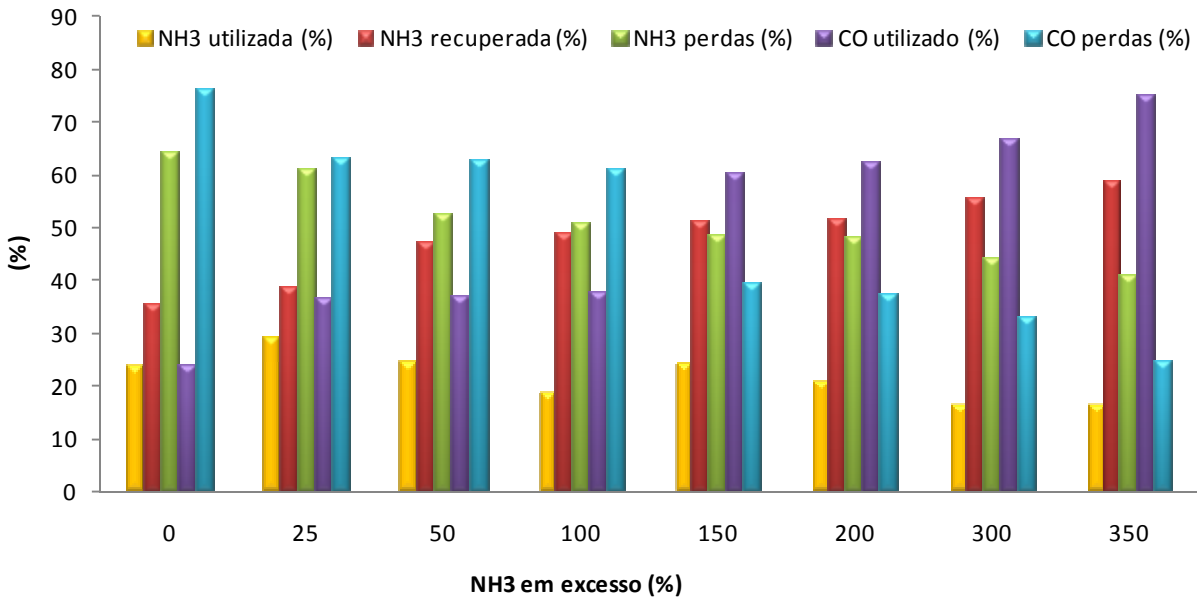


Figura 44 - Balanço de massa (%) dos principais reagentes (NH_3 e CO) durante a avaliação do rendimento de síntese da $CO(NH_2)_2$ em função da quantidade (0, 25, 50, 100, 150, 200, 300 e 350 % em excesso) de NH_3 na reação

De acordo com a Figura 44, na melhor condição (350 %) do processo de síntese foi possível obter, em média, recuperação de 59,0 % (16,8 % utilizada na reação de síntese e 42,0 % recuperada na forma de $(NH_4)_2SO_4$)) e perdas de 41,0 % de NH_3, e recuperação de 75,4 % (incorporada na molécula de $CO(NH_2)_2$) e perda de 25,0 % de CO. Essas perdas (NH_3 e CO) podem estar relacionadas, possivelmente, com vazamentos no reator (oring's de vedação da

flange, válvulas e manômetro de pressão) e formação de moléculas indesejáveis (CO_2, NO_x, entre outros) no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$. Deve-se ainda salientar, que esses resultados são extremamente importantes, principalmente, para síntese de $^{13}CO(NH_2)_2$ enriquecida com 99,2 % em átomos de ^{13}C, devido ao elevado valor agregado (US$ 593.00/g de ^{13}C, custo FOB) ao isótopo estável de C.

Os resultados médios (três repetições) da síntese de $CO(NH_2)_2$, em função da quantidade (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 % em excesso) de CO e S, podem ser observados na Tabela 8. Nessa, os valores de (A) e (B), respectivamente, correspondem às amostras de $CO(NH_2)_2$ obtidas no reator após processo de filtração à vácuo e purificação química. De acordo com os dados, houve diferença significativa (F = 74,92), ao nível de 5 % de probabilidade, para os tratamentos (A) e (B). Porém, observa-se que os resultados obtidos com 100 %, em excesso de CO, não apresentaram diferença estatística ($P \geq 0,05$) entre os tratamentos, mas observou redução média de 6,5 % do rendimento em (B). Essa redução (equivalente a 0,32 g do composto) em (B), deve-se ao processo de purificação química, empregando-se a CH_3COCH_3, submetidas às amostras de $CO(NH_2)_2$ sintetizadas. Desta forma, o procedimento (B) apresentou, na melhor condição (250 %), rendimento médio de 68,75 %, sendo possível obter 1,65 g de $CO(NH_2)_2$ purificada.

Para os dados de rendimento obtidos em função da quantidade (0 a 300 % em excesso) de CO e S, apresentados na Tabela 8, verificou-se diferença estatística significativa (F = 74,92), ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey. Esse fato pode ser atribuído, principalmente, ao aumento da concentração de CO e S, com as variações de 25 a 300 % em excesso, deslocando o equilíbrio da reação (13) no sentido para a formação do COS (sulfeto de carbonila). Deve-se ainda salientar que a reação de formação do COS é muito mais rápida, quando comparada com a reação (14), de obtenção do $H_2NCOSNH_4$ (FERM, 1957). Entretanto, diferente do mencionado anteriormente para NH_3, à resposta dada as alterações (excesso de 25 a 300 %) foi com menor intensidade, devido à presença dos reagentes (CO e S) somente uma das reações intermediárias que fazem parte do mecanismo de síntese proposto. Assim, com o procedimento, obteve-se um aumento significativo de 95,7 % (0,92 g de $CO(NH_2)_2$) no rendimento da síntese. Desta forma, na melhor condição (250 %), foi possível obter, em média, 1,64 g de $CO(NH_2)_2$ (equivalente a 68,75 % de rendimento).

Tabela 8 - Rendimento da síntese de $CO(NH_2)_2$ em função da quantidade de CO e S (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 % em excesso) e 1,36 g de NH_3 na reação global. (n = 3)

Excesso de CO e S (%)	Rendimento ----------(%)----------	
	(A)	**(B)**
0	36,38 cA	23,61 dB
25	42,50 bcA	35,13 cB
50	48,61 bA	39,72 bcB
100	53,47 bA	46,52 bA
150	73,47 aA	63,47 aB
200	73,89 aA	59,30 aB
250	82,22 aA	68,75 aB
300	77,08 aA	65,27 aB
Média	60,95 A	50,22 B
$F_{(excesso)} = 94, 06$	$F_{(tratamento)} = 74,92$	$F_{(amos\ x\ trat.)} = 0,66^{ns}$ CV(%) = 7,72

Medidas seguidas de letras diferentes minúscula na linha e maiúscula na coluna diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. (A) $CO(NH_2)_2$ sintetizada no reator. (B) $CO(NH_2)_2$ obtida após processo de purificação química.

Outro fato importante verificado, na Tabela 8, foi que os resultados obtidos de 150 a 300 % em excesso de CO não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$), pelo teste de Tukey. Isso ocorreu devido à massa (g) de NH_3, reagente limitante, ter sido praticamente consumida na reação (14), etapa de formação do $H_2NCOSNH_4$. Resultados obtidos na literatura indicam que a obtenção da molécula ($H_2NCOSNH_4$), é a mais lenta do mecanismo proposto para a síntese de $CO(NH_2)_2$, a partir do CO, NH_3 e S (FRANZ et al., 1961). Além disso, mesmo não se observando diferença (Tabela 8) no rendimento da síntese em (B), o aumento em média de 9,45 %, equivalente a 0,23 g de $CO(NH_2)_2$, foi significativo, pois trata-se de testes preliminares para utilização de reagente ($^{15}NH_3$) enriquecido, os quais possuem alto valor agregado no mercado nacional.

O balanço (%) dos reagentes principais (NH_3 e CO), como mostra a Figura 45, foi realizado com base nos dados de quantificação (%) do teor de N-NH_3 dos gases exauridos do

reator e de rendimento obtido durante a avaliação da influência da quantidade (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 % em excesso) de CO e S na reação de síntese.

De acordo com o gráfico, na melhor condição (250 % em excesso), foi possível obter em média recuperação de 71,07 % (65,67 % incorporada na molécula de $CO(NH_2)_2$ e 5,4 % recuperada na forma de $(NH_4)_2SO_4$) e perdas de 28,92 % de NH_3 e, ainda recuperação de 19,64 % (incorporada na molécula de $CO(NH_2)_2$) e perda de 80,35 % do CO. Os principais motivos das perdas do sistema podem estar relacionados com os seguintes fatores: vazamento no reator (oring's de vedação da flange, válvulas e manômetro) e formações de moléculas indesejáveis (NO_x, CO_2, entre outras) no processo proposto para a síntese de $CO(NH_2)_2$. Deve-se ainda ressaltar que esses resultados são muito importantes, visando estabelecer a melhor condição (% NH_3, CO e S) para a síntese da $CO(^{15}NH_2)_2$ com enriquecido de 90 % em átomos de ^{15}N, que tem alto valor agregado (US$ 523.00/g de ^{15}N, preço FOB).

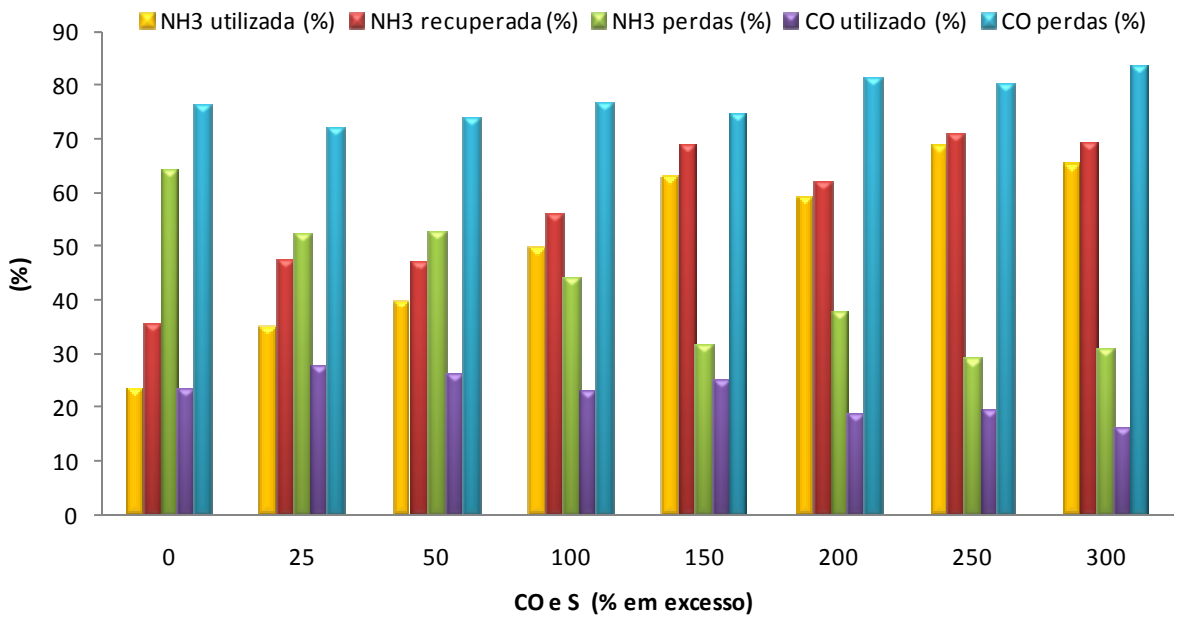


Figura 45 - Balanço (%) de massa dos reagentes principais (NH_3 e CO) durante a avaliação do rendimento de síntese da $CO(NH_2)_2$ em função da quantidade (0, 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 % em excesso) de CO e S na reação

Comparando os resultados obtidos nas Tabelas 7 e 8, variando-se a quantidade (% em excesso) dos principais reagentes (NH_3, CO e S), nota-se comportamento distinto desses no mecanismo de síntese proposto, resultando em um aumento no rendimento do processo. Essa variação, no entanto, foi consequência da influência da NH_3 no processo, devido que o mecanismo de reação utilizado para a síntese da $CO(NH_2)_2$ apresenta várias etapas intermediárias (reações 14, 16 e 17) envolvendo o reagente (NH_3). Esse fato pode ser

observado com o aumento da concentração (acima de 150 %) de CO e S, onde os valores de rendimento não apresentaram diferença estatística. Diferentemente, os resultados obtidos com o excesso de NH_3 apresentaram aumento significativo de 15,0 % (0,36 g de $CO(NH_2)_2$) no rendimento do processo. Esse comportamento indica como discutido anteriormente, que a adição (em excesso) de NH_3 contribuiu significativamente na reação (deslocando no sentido de obtenção dos produtos) de síntese, consequentemente houve um aumento no rendimento do processo.

Além disso, mesmo observando-se diferença estatística nos resultados, o emprego de concentrações superiores a 300 e 350 % para CO/S e NH_3 respectivamente, não foram possíveis, devido principalmente a dificuldade de operações do sistema com pressões elevadas, limitada pela válvula de segurança instalada no reator de 1,2 MPa. Desta forma, pressões superiores a 1,06 MPa não foram avaliadas no processo de síntese, dificultando a reprodução dos parâmetros utilizados nas plantas de produção industrial do composto.

Avaliando as Figuras 44 e 45, comparando os resultados obtidos, observou-se que a pior condição foi obtida com 0 % (relação estequiométrica) em excesso, apresentando recuperação de 35,6 % (23, 8 % incorporada na molécula de $CO(NH_2)_2$ e 11,8 % na forma de $(NH_4)_2SO_4$) e perdas de 64, 5 % de NH_3 e, ainda recuperação de 23, 8 % (incorporada na molécula de $CO(NH_2)_2$) e perda de 76,3 % de CO. Os principais motivos dessas perdas podem estar relacionados com vazamento no reator (oring's de vedação da flange, válvulas e manômetro) e formação de moléculas indesejáveis (NOx, CO_2, entre outros) no processo, devido a baixa concentração de NH_3 (reagente limitante).

Nas melhores condições (6,13; 1,12 e 1,28 g de NH_3, CO e S, respectivamente) obtidas no processo e, utilizando-se em média 40 mL de CH_3OH, foram realizados testes, em triplicatas, avaliando o rendimento (%) de síntese da $CO(NH_2)_2$ em função do tempo (60, 90, 120 e 150 minutos), admissão de H_2S, pressão (0,59; 0,78 e 0,98 MPa), meio líquido (CH_3OH e CH_3CH_2OH) e temperatura (80, 90, 100 e 110 ºC) de reação.

Os resultados médios (três repetições) da síntese de $CO(NH_2)_2$, em função do tempo (60, 90, 120 e 150 minutos), podem ser observados na Tabela 9. Nessa, os valores de C/H_2S e S/H_2S, respectivamente, correspondem às amostras de $CO(NH_2)_2$ obtidas com e sem admissão de H_2S.

De acordo com os dados, houve diferença estatística significativa (F = 36,20), ao nível de 5 % de probabilidade, para os tempos avaliados. Tais variações proporcionaram aumento de 21,9 e 22,3 % (equivalente, em média, a 0,53 g de $CO(NH_2)_2$, em ambas as condições) no rendimento de C/H_2S e S/H_2S respectivamente, devido à diferença nas velocidades das

reações que compõe o mecanismo proposto. Destacando-se principalmente as reações (13) e (14), formação do COS (extremamente rápida) e $H_2NCOSNH_4$ (muito lenta), respectivamente. Os resultados obtidos para tempo de 60 minutos, na temperatura de 100 ºC foram diferentes dos experimentais consultados na literatura, com rendimento de 73 % (FRANZ; APPLEGATH, 1961). Para o tempo de 150 minutos foi obtido rendimento médio de 80,63 %, valor esse muito próximo do teórico de 81,1 %, atestando que a reação está próxima do equilíbrio (BENDASSOLLI; VICTORIA, 1995).

Tabela 9 - Rendimento da síntese de $CO(NH_2)_2$, obtida após processo de purificação química, em função do tempo (60, 90, 120 e 150 min) de reação e da presença do H_2S (C/H_2S e S/H_2S). (n = 3)

Tempo (min)	**Rendimento ----------(%)----------**	
	C/H_2S	**S/H_2S**
60	58,75 cA	56,08 cA
90	70,69 bA	64,57 bB
120	79,75 aA	67,66 bB
150	80,63 aA	78,42 aA
Média	72,46 A	66,70 B
$F_{(tempo)} = 36,20$	$F_{(catalisador)} = 13,52$	$F_{(temp\ x\ cat.)} = 2,11^{ns}$ CV(%) = 5,52

Medidas seguidas de letras diferentes minúscula na linha e maiúscula na coluna diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. C/H_2S e S/H_2S significa com e sem injeção do H_2S, respectivamente.

Observou-se também, na Tabela 9, que os resultados médios obtidos para 120 e 150 minutos, na condição C/H_2S, não apresentaram diferença estatística ($P \geq 0,05$), sendo esses diferentes estatisticamente para os demais. Esse fato evidência que a reação com tempo de 120 minutos está muito próxima do equilíbrio, permitindo reduzir 30 minutos do tempo total (aproximadamente 8 horas), por batelada, do processo de síntese da $CO(NH_2)_2$. No entanto, o mesmo não foi observando para condição S/H_2S, cujo rendimento da síntese apresentou o aumento, em média, de 10,76 % (equivalente a 0,26 g de $CO(NH_2)_2$) para os tempos de 120 e 150 minutos. Esse resultado é significativo, pois se tratam de testes preliminares, para utilização de reagentes enriquecidos que possuem um alto valor agregado. Desta forma, na

melhor condição, com 120 minutos, foi possível obter por batelada, em torno de, 1,92 g de $CO(NH_2)_2$ (rendimento de 79,75 %).

Os resultados médios (três repetição) da síntese de $CO(NH_2)_2$ em função da presença do H_2S apresentaram diferença estatística (F = 13,52), ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey. Esse fato pode ser atribuído, principalmente, ao efeito da presença do H_2S (catalisador) desde o início das reações intermediárias (13 a 17) do processo. Nesse contexto, a presença do H_2S (C/H_2S) apresentou aumento médio no rendimento da síntese de 5,76 % (0,14 g de $CO(NH_2)_2$/batelada) em relação ao S/H_2S, sendo possível obter, na melhor condição (150 minutos) em torno de 1,92 g de $CO(NH_2)_2$ (rendimento de 80,63 %). Esse resultado, auxiliado pelos dados da síntese, foi utilizado para calcular o balanço de massa (%) dos principais reagentes (NH_3 e CO), sendo possível obter, em média, recuperação de 52,26 % (27,75 % incorporado na molécula de $CO(NH_2)_2$ e 24,51 % na forma de $(NH_4)_2SO_4$) e perdas de 47,74 % de NH_3, e recuperação de 82,59 % (incorporada na molécula de $CO(NH_2)_2$) e perda de 17,41 % de CO. Essas perdas (NH_3 e CO) podem estar relacionadas com vazamento no reator (oring's de vedação da flange e válvulas) e formação de moléculas indesejáveis (CO_2, NO_x, entre outros) na reação de síntese. Deve-se ainda salientar que esses resultados, principalmente pela recuperação de 82,59 % do CO, são importantes para a síntese da $^{13}CO(NH_2)_2$ altamente enriquecida em ^{13}C, devido ao valor agregado ao isótopo estável (US$ 593.00/g de ^{13}C, custo FOB).

No processo avaliaram a influência da pressão (0,59; 0,78 e 0,98 MPa), com admissão de N_2 (gás inerte), no reator de síntese, como descrito no item 3.2.2.1. Esses testes foram realizados em triplicatas, nas melhores condições (quantidade de reagentes, temperatura e tempo de reação) estabelecidas durante a avaliação do processo de síntese. A Tabela 10 contém os dados de rendimento (%) da síntese em (A) e (B), sendo amostras de $CO(NH_2)_2$ obtidas no reator após processo de filtração à vácuo e purificação química respectivamente, para as pressões avaliadas.

De acordo com os dados da Tabela 10, pode-se observar que houve diferença significativa, ao nível de 5 % de probabilidade, no rendimento do processo nas pressões avaliadas (F = 8,02). Esse resultado pode ser atribuído, principalmente, ao procedimento (B) de purificação química (CH_3COCH_3), submetidas às amostras de $CO(NH_2)_2$ sintetizadas, proporcionando variação média de 6,57 % (0,17 g de $CO(NH_2)_2$) por batelada. O aumento (0,4 MPa) na pressão do reator, com adição de N_2 (gás inerte), não apresentou efeito significativo quando comparado com os resultados das Tabelas 7 e 8 (variações na concentração de NH_3, CO e S). Esse fato ocorreu devido que o aumento da pressão no reator,

com a adição do N_2, não modifica as pressões parciais de cada uma das espécies presente no equilíbrio das reações (13 a 17) do mecanismo de síntese proposto (ATKINS; JONES, 2006). Desta forma, na melhor condição (0,98 MPa), foi possível obter rendimento médio de 52,57 % (1,24 g de $CO(NH_2)_2$), valor esse muito abaixo do experimental de 80,63 % (Tabela 9), próximo ao equilíbrio da reação de síntese.

Tabela 10 - Rendimento da síntese de $CO(NH_2)_2$ em função da pressão (0,59; 0,78 e 0,98 MPa), com admissão de N_2 (gás inerte), na reação de síntese. (n = 3)

Pressão (MPa)	**Rendimento ----------(%)----------**	
	(A)	**(B)**
0,59	53,70 aA	48,32 abB
0,78	53,34 aA	46,00 bB
0,98	58,03 aA	52,57 aB
Média	55,02 A	48,97 B
$F_{(Pressão)} = 8,02$	$F_{(tratamento)} = 25,53$	CV(%) = 4,89

Medidas seguidas de letras diferentes minúscula na coluna e maiúscula na linha diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. (A) $CO(NH_2)_2$ sintetizada no reator. (B) $CO(NH_2)_2$ obtida após processo de purificação química.

Ainda na Tabela 10, verifica-se diferença significativa (F = 25,53) ao nível de 5 % de probabilidade, entre (A) e (B), que respectivamente correspondem às amostras de $CO(NH_2)_2$ obtida no reator após processo de filtração a vácuo e purificação química. Observa-se ainda que os resultados obtidos no procedimento (B), $CO(NH_2)_2$ purificada, apresentaram diferença estatística ($P \leq 0,05$) para as demais pressão avaliadas, sendo possível obter, na melhor condição (0,98 MPa), rendimento médio de 52,57 % (1,27 g de $CO(NH_2)_2$)). Essa diminuição de 5,46 %, em relação ao (A), deve-se ao processo de purificação química (retiradas de impureza) submetida à amostra do composto sintetizada.

No processo avaliaram a influência da temperatura (80, 90, 100 e 110 ºC) no rendimento da síntese, como descrito no item 3.2.2.2. Esses testes foram realizados, em triplicata, nas melhores condições estabelecidas durante o processo. A Tabela 11 contém os dados de rendimento (%) da síntese em (A) e (B), sendo amostras de $CO(NH_2)_2$ obtidas no reator após processo de filtração à vácuo e purificação química respectivamente, para as temperatura avaliadas.

De acordo com os dados da Tabela 11, pode-se observar que houve diferença significativa (F = 14,00), ao nível de 5 % de probabilidade, no rendimento do processo para as temperaturas avaliadas. Os resultados proporcionaram variação de 7,21 % (equivalente a 0,18 g de $CO(NH_2)_2$) no rendimento da síntese, em (B), indicando que o aumento na temperatura (30 ºC) diminui o tempo para que a reação atinja o equilíbrio. Observou-se também que os resultados médios obtidos para 100 e 110 ºC não apresentaram diferença estatística ($P \geq 0,05$), sendo esses diferentes estatisticamente para os demais. Esse fato evidência que a reação a 100 ºC está muito próxima do equilíbrio, permitindo reduzir a temperatura da síntese evitando problema no reator e seus acessórios (manutenções ou substituições de materiais), bem como também diminui gastos energéticos na síntese. Desta forma, na melhor condição (temperatura de 100 ºC), foi possível obter rendimento em média de 80,63 % (equivalente a 2,0 g de $CO(NH_2)_2$) do processo de síntese.

Tabela 11 - Rendimento da síntese de $CO(NH_2)_2$ em função da temperatura (80, 90, 100 e 110 ºC) na reação de síntese. (n = 3)

Temperatura (ºC)	**Rendimento ----------(%)----------**	
	(A)	**(B)**
80	80,67 cA	74,12 bB
90	82,64 bcA	75,64 bB
100	88,11 aA	80,63 aB
110	86,15 abA	81,33 aB
Média	84,39 A	77,93 B
$F_{(temp)} = 14,00$	$F_{(tratamento)} = 49,80$	CV(%) = 2,76

Medidas seguidas de letras diferentes minúscula na coluna e maiúscula na linha diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. (A) $CO(NH_2)_2$ sintetizada no reator. (B) $CO(NH_2)_2$ obtida após processo de purificação química.

Ainda na Tabela 11, verificou-se diferença estatística (F = 49,80), ao nível de 5 % de probabilidade, entre (A) e (B), que, respectivamente, correspondem às amostras de $CO(NH_2)_2$ obtida no reator após processo de filtração a vácuo e purificação química. Desta forma, o procedimento (B) apresentou, na melhor condição (110 ºC), rendimento médio de 81,33 %, sendo possível obter 1,95 g de $CO(NH_2)_2$. Essa diminuição (4,82 %), em relação ao (A), deve-

se ao processo de purificação química (retirada de impurezas), empregando-se CH_3COCH_3, o qual proporcionou redução, em média, de 0,16 g por batelada.

E por fim, no processo de produção avaliou-se o rendimento da síntese em função do meio líquido (CH_3OH e CH_3CH_2OH) da reação. Os testes foram realizados, em triplicata, utilizando-se reagentes com grau analítico (com pureza química de 99,5 %). A Tabela 12 contém os resultados do rendimento (%) da síntese, em (A) e (B), que respectivamente correspondem às amostras de $CO(NH_2)_2$ obtidas no reator após processo de filtração a vácuo e purificação química.

Tabela 12. - Rendimento da síntese de $CO(NH_2)_2$ em função meio líquido (CH_3OH e CH_3CH_2OH) da reação de síntese. (n = 3)

Reagente	**Rendimento** ----------**(%)**----------	
	(A)	**(B)**
CH_3OH	88,11 aA	80,63 aB
CH_3CH_2OH	58,70 bA	51,81 bB
Média	73,41 A	66,22 B
$F_{(meio\ líquido)}$ = 303,03	$F_{(tratamento)}$ =18,47	CV(%) = 4,15

Medidas seguidas de letras diferentes minúscula na coluna e maiúscula na linha diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. (A) $CO(NH_2)_2$ sintetizada no reator. (B) $CO(NH_2)_2$ obtida após processo de purificação química.

Com base nos dados da Tabela 12, verificou-se que houve diferença significativa (F = 303,03), ao nível de 5 % de probabilidade (Tukey), para os solventes empregados. Esses resultados evidenciaram a maior eficiência do CH_3OH (metanol), como meio líquido, no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$, devido a algumas de suas características, tais como: álcool monoatômico, maior polaridade e solubilidade da $CO(NH_2)_2$, esta ultima pode ser observada na Figura 46 (BINGRONG et al., 1990). Desta forma, o processo de síntese, empregando o CH_3OH, apresentou aumento médio no rendimento de 55,6 % (0,70 g de $CO(NH_2)_2$) em relação ao resultado obtido, em (B), com CH_3CH_2OH, sendo possível obter 2,02 g de $CO(NH_2)_2$ (rendimento médio de 80,63 %) por batelada.

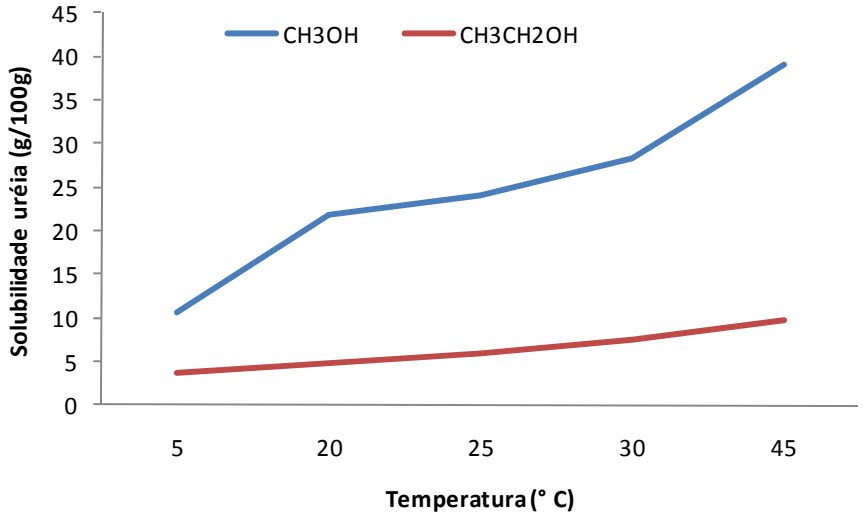


Figura 46 - Curva de solubilidade da $CO(NH_2)_2$ em CH_3OH e CH_3CH_2OH (Adaptada de BINGRONG et al., 1990)

Ainda na Tabela 12, verifica-se diferença estatística (F = 49,80), ao nível de 5 % de probabilidade, entre (A) e (B), que respectivamente correspondem às amostras de $CO(NH_2)_2$ obtida no reator após o processo de filtração e purificação química. Desta forma, o procedimento (B) apresentou, na melhor condição (CH_3OH), rendimento médio de 80,63 %, sendo possível obter 2,02 g de $CO(NH_2)_2$. A diminuição de 7,48 %, em relação ao (A), deve-se ao processo de purificação química (retirada de impurezas), empregando-se CH_3COCH_3, o qual proporcionou redução, em média, de 0,25 g por batelada.

No processo de síntese realizou-se a separação do CH_3OH da mistura contendo também $CO(NH_2)_2$ e S, utilizando sistema de vidro, sob vácuo, acoplado diretamente ao reator (por V_2) de produção. O procedimento, envolvendo todas as etapas descritas no item 3.2.2.3, foi realizado em capela de exaustão, devido à toxicidade do CH_3OH, por aproximadamente 50 minutos. Com o sistema foi possível recuperar em média 83,0 % do solvente orgânico (CH_3OH) utilizado na reação de síntese. As perdas de 17,1 % podem ter sido causadas, principalmente, por vazamentos no oring's do reator durante o aquecimento (100 °C) ou pelo processo de purga dos gases do reator, o qual pode arrastar traços de CH_3OH no fluxo de N_2 (gás de arraste). A solução de CH_3OH, contendo possíveis traços de H_2S, foi transferida para recipiente adequado para ser posteriormente reciclada e reutilizada no sistema de produção da $CO(NH_2)_2$.

4.3. Reciclagem dos solventes orgânicos (CH_3OH e CH_3COCH_3) utilizados no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$

As soluções residuais de CH_3OH e CH_3COCH_3 (contendo possíveis traços de S) foram recicladas por meio de um sistema especial de destilação, conforme descrito no item 3.2.3. Esses solventes (CH_3OH e CH_3COCH_3) reciclados foram reutilizados no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$, sendo posteriormente, o composto sintetizado submetido a análise do teor (%) de N, conforme descrito no item 3.2.4.1.

O CH_3OH (solução residual) obtido no processo de síntese, contendo um total de 4,25 L (0,867 g/cm^3), foi reciclado e, obteve-se 2,75 L de uma solução com densidade aferida de 0,799 g/cm^3. A solução residual (Figura 47 (A)), contendo principalmente S, obtida no processo de destilação foi armazenada para posteriormente ser recuperada. No início do escoamento foram retirados 250 mL da solução, o qual foi aferido à densidade de 0,79 g/cm^3. Entretanto, a recuperação deste volume de solvente mostrou-se morosa, sendo necessário em torno de 9 horas de trabalho. Durante a recuperação, manteve-se temperatura constante de 43 ºC no topo da coluna de fracionamento. A qualidade do CH_3OH recuperado, como mostra a Figura 47 (B), mostrou-se dentro da especificação fornecida pelo fabricante (líquido incolor; 0,79 g/cm^3 e ebulição de 64,5 ºC).

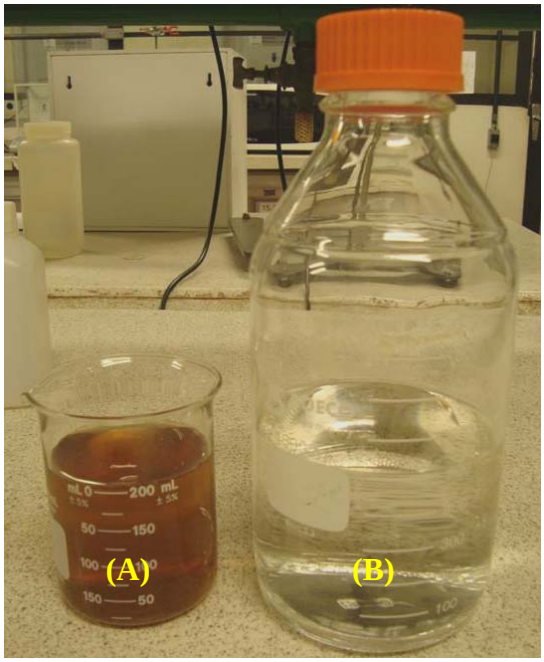


Figura 47 - Soluções obtidas no processo de reciclagem (A) solução residual e (B) CH_3OH recuperado

A solução residual de CH_3COCH_3, contendo 910 mL (0,817 g/cm^3), foi reciclada e, obteve-se 675 mL de uma solução com densidade aferida de 0,791 g/cm^3. A solução residual do processo de destilação (Figura 48 (A)), contendo principalmente S, foi armazenada para

posteriormente ser recuperada. No início do escoamento foram retirados 82 mL da solução, com densidade aferida de 0,794 g/cm^3. O procedimento de reciclagem, envolvendo todas as etapas previstas, teve duração de aproximadamente 6 horas de trabalho. Durante a recuperação, verificou-se temperatura constante de 55 ºC no topo da coluna de fracionamento. A qualidade do CH_3COCH_3 recuperado (Figura 48 (B)) apresentou resultados dentro das especificações fornecidas pelo fabricante (líquido incolor; 0,79 g/cm^3 e ebulição de 56,2 ºC).

Figura 48 - Soluções obtidas no processo reciclagem (A) Solução residual (B) CH_3COCH_3 recuperada

As soluções (CH_3OH e CH_3COCH_3), devidamente recuperadas, foram reutilizadas no processo de síntese da $CO(NH_2)_2$, sendo o produto sintetizado submetido a análise do teor (%) de N. Para o procedimento analítico foi utilizado um espectrômetro de massas com sistema analisador automatizado (PRESTON; OWENS, 1983).

Os resultados obtidos, em triplicata, do teor (%) de N das amostras de $CO(NH_2)_2$ podem ser observados na Tabela 13. Nessa encontram-se os valores de UP e UR, respectivamente, que correspondem à amostra sintetizada utilizando-se reagentes analíticos e reciclados no Laboratório de Tratamento de Resíduos do CENA/USP. Além disso, para efeito comparativo de qualidade (pureza química) dos produtos sintetizados foi utilizado amostra de $CO(NH_2)_2$, obtida comercialmente, com teor de N de 46,48 % (grau analítico).

Tabela 13 - Determinação do teor (%) N das amostras de $CO(NH_2)_2$ utilizando espectrômetro de massas (ANCA-GSL)

$CO(NH_2)_2$	Teor de N (%)
P.A	46,48 a
UP	46,09 a
UR	46,12 a
Média	46,23
$F_{(amostras)} = 2,59^{ns}$	CV(%) = 0,51

Medidas seguidas de letras distintas minúsculas na linha diferem estatisticamente, ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey. (UP) $CO(NH_2)_2$ sintetizada com reagentes de grau analítico e (UR) $CO(NH_2)_2$ sintetizada com reagentes reciclados no LTR.

De acordo com os dados (Tabela 13), as amostras de $CO(NH_2)_2$ não apresentaram diferença significativa (F = 2,59), ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey, atestando a pureza química dos solventes orgânicos reciclados, bem como também a adequação da metodologia (destilação fracionada) empregada. Deve-se ainda salientar que os resultados apresentaram excelente precisão analítica (CV= 0,51), com teor de N médio de 46,23 % (pureza química de 99,46 %). Entretanto, as amostras de UP e UR, apresentaram diferença de 0,8 % em relação ao padrão (P.A), obtendo-se um valor médio de 46,11 % (equivalente a 99,20 %). Esse resultado pode ser atribuído, principalmente, ao controle de qualidade empregado nos reagentes analíticos (P.A) comerciais, quanto a impurezas oriundas de matérias-primas e do processo de produção.

4.4. Análise da qualidade físico-química da $CO(NH_2)_2$

4.4.1. Determinação do teor (%) de N

A análise do teor (%) de N contido nas amostras de $CO(NH_2)_2$ foi realizada utilizando o método convencional de digestão-destilação Kjeldahl (PARKINSON; ALLEN, l975) e no sistema com analisador automático (PRESTON; OWENS, 1983), de acordo com o item 3.2.4.1. Para o procedimento foram utilizados seis amostras de $CO(NH_2)_2$, sendo cinco sintetizada no reator de produção e uma obtida comercialmente com grau de pureza analítico (teor de N de 46,6 %).

Os resultados do teor (%) de N das amostras de $CO(NH_2)_2$ utilizando o método convencional foram apresentados na Tabela 14. De acordo com os dados pode-se observar

que não houve diferença significativa (F = 2,3), ao nível de 5 % de probabilidade, entre (A) e (B), que respectivamente correspondem às amostras de $CO(NH_2)_2$ obtida no reator após processo de filtração a vácuo e purificação química. Observa-se ainda, que os resultados obtidos no procedimento (B), $CO(NH_2)_2$ purificada quimicamente, apresentaram teor de N médio de 45,74 % para amostras avaliadas, equivalente a pureza química de 98,15 %. As variações (0,7 %) nos teores de N, em relação ao (A), devem-se ao processo de purificação química (retiradas de impureza), submetida à amostra do composto sintetizada.

Tabela 14 - Determinação do teor (%) de N das amostras de $CO(NH_2)_2$ utilizando método convencional (digestão-destilação Kjeldahl)

$CO(NH_2)_2$	Teor de N ----------(%)----------	
	(A)	**(B)**
P.A	46,26 aA	46,37 aA
1	43,77 cA	44,62 bA
2	45,21 bA	45,58 abA
3	45,16 bA	45,54 abA
4	46,05 abA	46,24 aA
5	46,16 abA	46,09 aA
Média	45,43 A	45,74 A
$F_{(AMOSTRA)} = 10,49$	$F_{(preparo)} = 2,3^{ns}$	$F_{(amos\ x\ prep.)} = 0,42^{ns}$ CV(%) = 1,31

Medidas seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúscula na linha, diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. (A) $CO(NH_2)_2$ sintetizada no reator. (B) $CO(NH_2)_2$ obtida após processo de purificação química.

Ainda na Tabela 14, os resultados obtidos apresentaram diferença estatística significativa (F = 10,49), ao nível de 5 % de probabilidade (Tukey), para as amostras de $CO(NH_2)_2$ analisadas. O principal motivo dessa diferença foi a amostra 1, com teor de N médio de 44,20 %, devido a problemas durante a síntese, mais precisamente nas etapas de filtração a vácuo (43,77 % de N) e purificação química (44,62 % de N). No entanto, as demais amostras (2, 3, 4 e 5), sintetizadas e purificadas quimicamente (B), não apresentaram diferença estatística em relação à P.A (grau analítico), com teor de N médio de 45,86 % (pureza química de 98,4 %). Deve-se salientar que os dados apresentaram boa precisão analítica (CV = 1,31 %), com teor de N médio de 45,59 % (97,8 % de pureza).

Os resultados do teor (%) de N das amostras de $CO(NH_2)_2$ utilizando o método envolvendo um analisador automático de C/N, interfaceado com um espectrômetro de massas (CF-IRMS) foram apresentados na Tabela 15. De acordo com os dados pode-se observar que não houve diferença significativa (F = 2,9), ao nível de 5 % de probabilidade, entre (A) e (B). Entretanto, a amostra 1 apresentou diferença (2,46 %) significativa entre os tratamentos, proporcionada pela ineficiência da etapa de filtração a vácuo (A), com teor de N de 43,90 %. Observa-se ainda, que os resultados obtidos no procedimento (B), $CO(NH_2)_2$ purificada, apresentaram teor de N médio de 45,80 % para amostras avaliadas, equivalente a pureza química de 99,26 %. As variações (0,5 %) obtidas nos valores do teor de N, em relação ao (A), devem-se ao processo de purificação química (retiradas de impureza), submetida à amostra do composto sintetizada.

Tabela 15 - Determinação do teor (%) de N das amostras de $CO(NH_2)_2$ utilizando sistema com analisador automatizado

$CO(NH_2)_2$	**Teor de N** ----------**(%)**----------	
	(A)	**(B)**
P.a	46,21 aA	46,23 aA
1	43,90 cA	45,01 bB
2	45,38 bA	46,05 acA
3	46,04 abA	45,75 abA
4	45,92 abA	46,47 aA
5	45,64 abA	45,28 bcA
Média	45,51 A	45,80 A
$F_{(AMOSTRA)} = 10,6^{**}$	$F_{(preparo)} = 2,9^{ns}$	$F_{(amos\ x\ prep.)} = 2,1^{ns}$	CV(%) = 1,1

Medidas seguidas de letras diferentes, minúsculas na linha e maiúscula na coluna, diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade. (A) $CO(NH_2)_2$ sintetizada no reator. (B) $CO(NH_2)_2$ obtida após processo de purificação química.

Ainda na Tabela 15, os resultados apresentaram diferença estatística significativa (F = 10,6), ao nível de 5 % de probabilidade (Tukey), para as amostras de $CO(NH_2)_2$ analisadas. Esse fato pode ser atribuído, conforme mencionado para anteriormente Tabela 14, a problemas nas etapas de filtração (retirada do S em excesso) e purificação química durante a síntese da amostra 1. Entretanto, as demais amostras (2, 3, 4 e 5) não apresentaram diferença

estatística em relação à P.A (grau analítico), com teor médio de 45,88 % (equivalente a pureza química de 98,5 %). Deve-se salientar que os resultados, Tabela 15, apresentaram boa precisão analítica (CV= 1,1 %), com teor de N médio de 45,65 % (pureza química de 98,0 %).

Nesse contexto, os resultados do teor (%) de N das amostras de $CO(NH_2)_2$ obtidos em (B), após processo de purificação química, foram comparando com relação aos métodos analíticos (convencional e automatizado), sendo os resultados apresentados na Tabela 16. De acordo com os dados, os métodos utilizados não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$) para as amostras analisadas, sendo verificados valores médios do teor de N com 45,73 e 45,79 % para digestão e ANCA-GSL, respectivamente. Ainda, o teor médio de 46,23 % (99,20 %) obtido na amostra P.A (com grau analítico), está dentro das especificações (99,0 a 100,5 %) fornecidas pelo fabricante do produto. Desta forma, pode-se atestar a viabilidade e eficiência do método convencional para análise do teor (%) de N, devido que o sistema analisador automatizado (ANCA-GSL) é controlado por "software" que realiza o preparo de amostras (combustão e purificação) para posterior determinação da % de N no composto, obtendo o resultado em aproximadamente 5 minutos.

Tabela 16 - Teor (%) de N da amostra de $CO(NH_2)_2$ utilizando método convencional e sistema com analisador automatizado

$CO(NH_2)_2$	Teor de N (%)	
	DIGESTÃO	**ANCA-GSL**
P.a	46,26 aA	46,21 aA
1	44,62 bA	45,01 bA
2	45,58 aA	46,05 aA
3	45,55 aA	45,75 abA
4	46,27 aA	46,47 aA
5	46,09 aA	45,28 bA
Média	45,73 A	45,79 A
$F_{(amostras)} = 6,61$	$F_{(análise)} = 0,15^{ns}$	$F_{(amostra.x\ análise)} = 1,17^{ns}$ CV(%) = 1,14

Medidas seguidas de letras diferentes, minúsculas na linha e maiúscula na coluna, diferem estatisticamente, pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade.

Embora o emprego do método automatizado apresente vantagens, tais como: velocidade analítica, precisão e exatidão, esse somente pode ser utilizado para análise de

amostras de $CO(NH_2)_2$ com abundância natural (0,365 e 1,11 % em átomos de ^{15}N e ^{13}C) ou com baixo enriquecimento (até 5 % em átomos de ^{15}N e ^{13}C) isotópico, devido à necessidade de padrão (análise relativa). Assim, para análise do teor (%) de N e/ou C da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ com elevado (5 a 99 % em átomos de ^{15}N e ^{13}C) enriquecimento isotópico foi utilizado o método convencional (digestão/destilação) e, posteriormente análises isotópica no espectrômetro ATLAS MAT, modelo CH4 (análise absoluta).

No processo de síntese foram realizadas determinações do teor (%) de N, utilizando o método com sistema analisador automatizado CF-IRMS (ANCA-GSL-Automated Nitrogen and Carbon Analysis -Gas, Liquid and Solid Sample), nas amostras de $CO(NH_2)_2$ obtidas após etapa de purificação utilizando resinas catiônica e aniônica, conforme descrito no item 3.2.2.4. Para o procedimento analítico foram utilizados quatro amostras de $CO(NH_2)_2$, sendo três sintetizada no reator e uma obtida comercialmente com grau de pureza analítico 99,5 % (46,4 % de N) (Certificate of Analysis, 2010).

Os dados observados na Tabela 17, não apresentaram diferença estatística significativa (F = 1,59), ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey. Desta forma, as amostras (U1, U2 e U3) sintetizadas não apresentaram diferença estatística em relação a P.A (grau analítico), atestando a eficiência do procedimento de purificação submetidas as amostras de $CO(NH_2)_2$. Ainda, os resultados apresentaram excelente precisão analítica (CV = 0,54 %), com teor médio de 46,22 %, equivalente à pureza química de 99,20 %.

Tabela 17 - Determinação do teor (%) de N das amostras de $CO(NH_2)_2$ por CF-IRMS (ANCA-GSL)

$CO(NH_2)_2$	Teor de N (%)
P.A	46,32 a
U1	46,41 a
U2	46,16 a
U3	45,99 a
Média	46,22
$F_{(amostras)} = 1,59^{ns}$	CV(%) = 0,54

Medidas seguidas de letras distintas minúsculas na linha diferem estatisticamente, ao nível de 5 % de probabilidade, pelo teste de Tukey. P.A - $CO(NH_2)_2$ obtida comercialmente (grau analítico); U1, U2 e U3 - $CO(NH_2)_2$ obtida após processo de purificação com resinas (catiônica e aniônica).

Deve-se ainda ressaltar, na Tabela 17, que houve um aumento da ordem de 1 a 2 % no teor (%) de N das amostras de $CO(NH_2)_2$ sintetizadas, quando comparado com os dados apresentados na Tabela 15 em (B) e (A) respectivamente, devido à eficiência do procedimento de purificação com a utilização de resinas catiônica e aniônica (acopladas em série). Assim, nesse contexto, a remoção de compostos indesejáveis (principalmente os contendo S), torna a $CO(NH_2)_2$ mais pura quimicamente e ainda, indica a recuperação completa da mesma na solução eluída.

4.4.2. Determinação do ponto de fusão (ºC) e do teor (%) de biureto nas amostras de $CO(NH_2)_2$

Utilizando o método descrito no item 3.2.4.2, procedeu-se a determinação do ponto de fusão (ºC) de cinco amostras de $CO(NH_2)_2$, sendo quatro amostras sintetizadas no reator e uma obtida comercialmente, com grau de pureza analítico (P.A). Deve-se ainda salientar, que as amostras 3 e 4 foram sintetizadas com admissão de H_2S (catalisador) na reação.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 18, verificou-se que não houve diferença entre os valores do ponto de fusão das amostras sintetizada (1, 2 e 3) em relação à amostra de referência (P.A). Essa última apresentou ponto de fusão médio de 133,7 ºC, dentro da especificação (132 - 134 ºC) fornecida pelo fabricante, atestando a acuracidade do método analítico. Com isso, o valor médio obtido para as amostras de $CO(NH_2)_2$ sintetizada foi de 132,55 ºC. No entanto, a amostra 4 apresentou ponto de fusão de 131,3 ºC, isso deve-se principalmente a ineficiência das etapas de filtração a vácuo e purificação química objetivando a retirada de compostos indesejáveis (principalmente do S).

Tabela 18 - Determinação do ponto de fusão (ºC) e teor (%) de biureto nas amostras de $CO(NH_2)_2$. (n = 3)

$CO(NH_2)_2$	Ponto de fusão (ºC)	Biureto (%)	H_2S (mg)
P.A	133,7	0,06	-----
1	132,4	0,51	-----
2	132,9	0,58	-----
3	132,7	0,80	40
4	131,3	0,45	40

P.A - amostras referência de $CO(NH_2)_2$ (grau analítico);
1 a 4 - amostras sintetizadas no reator e purificadas quimicamente (CH_3COCH_3).

Os resultados das análises colorimétricas para determinação do teor (%) de biureto (impureza tóxica) nas amostras de $CO(NH_2)_2$, conforme descrito no item 3.2.4.3, foram apresentados na Tabela 18. Os dados obtidos apresentaram diferença das amostras (1 a 4) sintetizadas em relação à P.A (grau analítico). Isso se deve, principalmente, ao rígido controle de qualidade dos reagentes analíticos, atendendo na maioria das vezes as normas específicas internacionais, quanto à ausência de impurezas oriundas de suas matérias-primas e do processo de síntese (AFONSO; AGUIAR, 2004). Verifica-se também que o teor médio de 0,06 % de biureto contido na amostra P.A está de acordo com valor (≤ 0,05 %) certificado pelo fornecedor, atestando a eficiência do método analítico empregado. Desta forma, as amostras sintetizadas (1 a 4) apresentaram um valor médio de 0,55 % em peso do composto contido na $CO(NH_2)_2$. Um teor de biureto, na $CO(NH_2)_2$, superior a 1 % é danoso para a saúde da maioria dos vegetais, podendo causar queima na sua folhagem. No solo, teor acima de 1,5 % já compromete a germinação de sementes (MITHYANTHA et al., 1977; BRASIL, 2007). O problema do biureto, para vacas leiteiras, está no fato de deixar resíduo no leite (HUBER, 1984); isobutildiuréia (IBDU) é um composto formado por uma molécula de isobutilaldeido e duas moléculas de $CO(NH_2)_2$. No Brasil a $CO(NH_2)_2$ comercializada contém 46,4 % de N; 0,55 % de Biureto; 0,008 % de amina livre; 0,003 % de cinza e 0,003 % de ferro e chumbo (SANTOS et al., 2006). Dentro desse contexto, o biureto contido nas amostras de $CO(NH_2)_2$ sintetizadas, Tabela 18, não interferem em sua utilização em estudos na área agronômica e nutrição animal.

Na área médica, a $^{13}CO(NH_2)_2$, altamente enriquecida no isótopo estável de ^{13}C, é usada para o diagnóstico da *Helicobacter pylori* (HP), sendo necessário a admissão, via oral, de 75 mg (adultos) e 50 mg (crianças) do composto por exame. Desta forma, empregando-se a $^{13}CO(NH_2)_2$ sintetizada no reator, tem-se a ingestão, por exame, de 0,0051 mg/kg para adultos (70 kg) e 0,009 mg/kg para crianças (30 kg) de biureto, equivalente ao teor médio de 0,55 %. Essas quantidades (mg) administradas de biureto não oferecem risco a saúde da população, levando-se em consideração que outros compostos como 2,3,7,8-Tetraclorodibenzop-dioxina (2,3,7,8-TCDD) e Tetradotoxina que são altamente tóxicos, por ingestão, apresentam limite máximo (DL_{50}) de 0,022 e 0,01 mg/kg de massa corpórea, respectivamente (ASSUNÇÃO; PESQUERO, 1999; PIMENTEL et al., 2006). Pode-se ainda destacar que a $CO(NH_2)_2$ pode ser considerada uma molécula análoga ao biureto, apresentando um valor de DL_{50} oral, para ratos, de 14.300 mg/kg (inócuo) (EMBRAPA, 2010).

4.4.3. Determinação multielementar nas amostras de $CO(NH_2)_2$ por ICP-MS

De acordo com o procedimento descrito no item 3.2.4.4 foi possível realizar as análise do teor (mg/kg) de elementos contidos nas amostras de $CO(NH_2)_2$. Para isso, foi utilizado um total de 7 (sete) amostras de $CO(NH_2)_2$, sendo 6 (seis) sintetizadas no reator (3 obtidas após processo de purificação química com CH_3COCH_3 e 3 após purificação físico-química (CH_3COCH_3 e resinas catiônica/aniônica)) e uma obtida comercialmente de grau analítico (P.a).

A precisão e exatidão do método analítico empregado foram verificadas utilizado um material certificado de referência (NIST 1515) e uma solução padrão multielementar de calibração (SVC), da marca Agilent. Os resultados experimentais, em triplicata, dos teores ($mg.kg^{-1}$) dos elementos obtidos nas amostras estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19 - Teor dos elementos determinados nos materiais certificados (SVC e NIST 1515) por ICP-MS. (n = 3)

Elementos	SVC ($\mu g.L^{-1}$)		Rec.	NIST 1515 ($mg.kg^{-1}$)		Rec.
	Referência	Experimental (Média ± DP)	(%)	Certificado (Média ± DP)	Experimental (Média ± DP)	(%)
B	-	-	-	27 ± 2	25,7 ± 1,6	95
Na	1000	1017,0 ± 11,3	101,7	24,4 ± 1,2	25,5 ± 1,7	105
Mg	1000	1028,5 ± 10.6	102,9	2710 ± 80	2581 ± 108	95
Al	10	9,8 ± 0,1	97,8	286 ± 9	280 ± 17	98
P	-	-	-	1590 ± 110	1567 ± 80	99
S	-	-	-	1800	1881 ± 144	105
K	1000	982,4 ± 3,2	98,2	16,1 ± 0,2	15,3 ± 0,8	95
Ca	1000	1051,5 ± 4,9	105,2	15260 ± 150	14954 ± 305	98
Cr	10	9,9 ± 0,1	99,4	0,3	0,3 ± 0,01	98
Mn	10	9,9 ± 0,0	99,1	54 ± 3	50 ± 2	93
Fe	1000	1042,5 ± 46,0	104,3	83 ± 5	77 ± 4	93
Ni	10	10,3 ± 0,0	103,5	0,91 ± 0,12	0,87 ± 0,07	96
Cu	10	10,4 ± 0,2	103,7	5,64 ± 0,24	5,22 ± 0,33	93
Zn	10	10,4 ± 0,2	103,5	12,5 ± 0,3	11,9 ± 0,2	95
Ba	10	10,1 ± 0,1	101,2	49,2 ± 2	45 ± 1	93
Pb	10	9,8 ± 0,0	98,3	0,47 ± 0,024	0,46 ± 0,01	98

SVC - Solução padrão multielementar da marca Agilent; NIST 1515 - Folha de macieira; Rec.- Recuperação do analito e DP- Desvio padrão.

As determinações realizadas nos isótopos de B, Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Ba e Pb concordaram com os valores certificados no material de referência (NIST 1515) e de verificação da calibração (SVC) (Tabela 19), apresentando taxa de recuperação na faixa de 93 - 105 %, e os desvios padrão relativos foram, em geral, menores que 8 %. Segundo Jenniss et al. (1997) esta faixa de recuperação indica uma boa exatidão e, considerando-se a complexidade da amostra, o método também apresentou uma boa precisão.

Na Tabela 20 estão expressos os resultados dos teores ($mg.kg^{-1}$) dos analitos (B, Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Ba e Pb) para as diferentes amostras (UQ e UF) de $CO(NH_2)_2$ sintetizadas com o sistema proposto, bem como os valores referentes à amostra P.A (grau de pureza analítico) obtida comercialmente. Analisando os dados entre UQ e UF, correspondente a amostras de $CO(NH_2)_2$ obtidas após processos de purificação química (CH_3COCH_3) e físico-química (CH_3COCH_3/resinas) respectivamente, verificou-se uma variação bastante significativa nas concentrações ($mg.kg^{-1}$) dos elementos contaminantes analisados. Esse fato demonstra a eficiência no processo de purificação (UF) da $CO(NH_2)_2$, utilizando as duas colunas contendo resinas catiônica e aniônica, proporcionando redução média de 77,31 % nas concentrações dos elementos contidos nas amostras do composto.

Nesse contexto, destacam-se os resultados obtidos para B, Na, S, K, Cr, Zn, Ba e Pb que apresentaram excelente redução na faixa de 90 a 100 % dos elementos. Em particular, é importante mencionar os bons resultados obtidos para os micronutrientes como Cr (91,66 %) e Zn (88,34 %), que desempenham funções nutricionais ou bioquímicas essenciais a saúde dos seres vivos, porém sua presença em organismos vivos pode ser prejudicial em concentrações acima do limite máximo permitido pelas legislações pertinentes. E outros elementos, tais como Ba (98,21 %) e Pb (100 %), que não são essenciais aos seres vivos do ponto de vista biológico e são considerados muito tóxicos, mesmo em baixas concentrações, porque são acumulativos nos organismos dos animais e homens (TSALEV; ZAPRIANOV, 1985; XIE et al., 1998; WHO, 2001).

Nota-se também, que os resultados apresentaram, em UF, redução na faixa de 40 a 67 % para Al, Ca, Mn e Fe contidos nas amostras de $CO(NH_2)_2$ (Tabela 20). Acredita-se que possam ter havido contaminações desses elementos durante o procedimento de preparo das amostras de $CO(NH_2)_2$ para análise por ICP-MS, uma vez que essas foram secas em chapas de vidro borosilicato (SiO_2, B_2O_3, Na_2O e Al_2O_3) e transferidas para os recipientes (tubos limpos e esterilizados) utilizando material de aço inoxidável (combinação de Fe, Cr, Ni, Mg e Cu). Além disso, a contaminação mencionada (exceto para o Ca) não foi observada para a

amostras P.A (grau analítico), não submetidas ao procedimento de purificação, reforçando ainda mais o argumento supracitado.

Tabela 20 - Teor ($mg.kg^{-1}$) dos elementos inorgânicos, contido nas amostras de $CO(NH_2)_2$, obtidos após digestão em forno MW e determinação por ICP-MS. (média ± desvio padrão; n = 3)

Elementos	Teor (mg/kg)		
	P.A	**UQ**	**UF**
B	<LD	1,34 ± 0,0	<LD
Na	2,59 ± 0,0	279,93 ± 3,7	18,41 ± 0,4
Mg	<LD	28,72 ± 1,2	5,79 ± 0,0
Al	<LD	34,42 ± 2,3	20,24 ± 1,0
P	0,30 ± 0,2	1,08 ± 0,2	1,48 ± 0,5
S	<LD	1549,62 ± 20,6	<LD
K	<LD	68,89 ± 0,8	6,49 ± 0,6
Ca	106,15 ± 8,6	193,23 ± 3,6	70,04 ± 9,1
Cr	0,07 ± 0,0	7,49 ± 0,1	0,62 ± 0,1
Mn	0,09 ± 0,0	2,44±0,1	0,81 ± 0,2
Fe	2,77 ± 0,2	91,54 ± 6,9	40,56 ± 0,4
Ni	0,03 ± 0,0	4,82 ± 0,0	1,24 ± 0,1
Cu	<LD	0,13 ± 0,1	0,18 ± 0,1
Zn	2,80 ± 0,5	7,00 ± 0,1	0,81 ± 0,2
Ba	0,03 ± 0,0	12,02 ± 0,1	0,21 ± 0,0
Pb	<LD	0,09 ± 0,0	<LD

P.A – amostras referência de $CO(NH_2)_2$ (grau analítico);
UQ e UF - amostras de $CO(NH_2)_2$ obtida após purificação química (CH_3COCH_3) e físico-químico (CH_3COCH_3 e resinas catiônica/aniônica), respectivamente;

Já as concentrações de P e Cu, analisadas mediante os procedimentos de purificação (UQ e UF), não foram concordantes como a maioria dos elementos. Através dos resultados obtidos, na Tabela 20, verificou-se aumento médio de 27,4 % nas concentrações ($mg.kg^{-1}$),

entre UQ e UF, dos devidos elementos. Esse fato pode estar relacionado com o procedimento de purificação utilizado, uma vez que não foi observada a presença dos elementos nas provas em branco, indicando que não houve retenção nas resinas dos elementos em questão. Contudo, esses resultados não podem ser utilizados para representar todas as amostras de $CO(NH_2)_2$ sintetizadas e se, em algumas amostras, esses elementos (P e Cu) estiverem na forma de complexos iônicos de fato poderiam ser retidos pela resinas.

Ainda com base nos dados da Tabela 20, verificou-se que 50 % dos elementos analisados não apresentaram diferença significativa nas concentrações ($mg.kg^{-1}$) entre as amostras de UF e P.a, encontrando-se valores dentro dos Limites Máximos de Tolerância (LMT) estabelecidos pelas normas brasileiras (BRASIL, 1998) e, atendendo também as especificações de outros países (EUROPEAN, 2002). Em destaque para B, S e Pb que tiveram níveis de quantificação, em UF e P.a, abaixo do limite (0,16; 174,0; 0,028 $\mu g.L^{-1}$) de detecção no ICP-MS. Esses resultados atendem as exigências das Farmacopéias, principalmente para o Pb, que tem como limite máximo permitido em matérias primas para produção de medicamentos na faixa de 10 a 20 $mg.kg^{-1}$. Ainda nesse contexto, o limite máximo permitido de Pb na zidovudina (AZT), agente antiviral amplamente utilizado no tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), fornecido pela United States Pharmacopoeia (USP) é 10 $mg.kg^{-1}$ (MOREIRA et al., 2002).

Por outro lado, concentrações médias obtidas para Na, Al e Fe (respectivamente, 18,41; 20,24 e 40,56 $mg.kg^{-1}$) situam-se muito acima dos valores obtidos para os outros elementos, bem como também diferem significativamente do correspondente na amostra P.A (grau analítico). Outros elementos como Cr, Mn e Ni apresentam concentrações bastante reduzidas em UF (respectivamente, 0,62; 0,81 e 1,24 $mg.kg^{-1}$), porém superiores aos valores quantificados nas amostras P.A. Essas informações obtidas, na Tabela 20, são extremamente importantes, levando em consideração que elementos "potencialmente tóxicos" como Al, Cr e Ni são importantes em vista de alguns riscos a saúde (mutações, carcinogenicidade, lesões no DNA, disfunções neurológicas como Mal de Alzheimer e outros tipos de escleroses) atribuídos a elevada ingestão e acúmulo no organismo humano (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

No entanto, a presença desses "elementos tóxicos" nas amostras de $CO(NH_2)_2$ não é preocupante, uma vez que no diagnóstico da *Helicobacter pylori* serão admitidos, via oral, em torno de 75 mg (adulto) e 50 mg (crianças) do composto por exame (CANETE et al., 2003). Nessas quantidades administradas ao paciente às concentrações de Al, Fe, Cr, Mn e Ni (respectivamente, 2,54; 5,58; 0,42; 0,15 e 0,21μg/dose) são bem inferiores aos limites

máximos permitidos pela legislação pertinente (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007; GOLDHABER, 2003). Ainda deve-se salientar que a $CO(NH_2)_2$ não é medicamento de uso diário, descartando a preocupação de levar a acumulação desses elementos pela exposição contínua.

Todas as amostras (UQ, UF e P.A) de $CO(NH_2)_2$ apresentam, na Tabela 20, concentrações mais elevadas de Ca comparada aos outros elementos analisados, que variaram de 70,04 a 193,23 $mg.kg^{-1}$. A presença deste elemento pode estar relacionada a contaminações obtidas durante o procedimento de preparo das amostras para análise por ICP-MS. Destaca-se nesta análise a amostra P.A (grau analítico), adquirida comercialmente, a qual apresenta resultados (106,15 $mg.kg^{-1}$) fora das especificações fornecida pelo fabricante. Além disso, é importante salientar que esses valores (70,05 a 193,23 $mg.kg^{-1}$) quantificados, principalmente em UF, ficaram muito (0,005 mg/70 mg de $^{13}CO(NH_2)_2$) abaixo do limite recomendado de ingestão diária de 200 mg dia^{-1} (WHO, 1996; FÁVARO, et al., 1997).

Outro elemento que merece atenção é o Na, pois embora seja essencial, pode constituir um risco para pessoas hipertensas se estiver em concentrações relativamente elevadas. A concentração média de Na foi de 18,5 $mg.kg^{-1}$ em UF, diferindo do valor correspondente da amostra P.A (2,6 $mg.kg^{-1}$), porém encontra-se muito abaixo do limite recomendado de ingestão diária para adultos (RDA, 1989). Ainda, essa concentração média (18,5 $mg.kg^{-1}$), quantificada nas amostras de $CO(NH_2)_2$ sintetizadas (UF), correspondem a 0,001 % do total de Na que o hipertenso pode ingerir por dia, evitando qualquer complicações a saúde do paciente (SICHIERI et al., 2000)

4.5. Análise da qualidade microbiológica da $CO(NH_2)_2$ sintetizada

No Brasil, a Resolução RDC nº 67, de 09 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007), estabelece que a pesquisa de contaminantes microbiológicos em medicamentos de uso oral (uso interno) deve estar de acordo com os limites especificados pela Farmacopéia Brasileira (1988), nas seguintes especificações: 10^3 bactérias aeróbias/g, 10^2 fungos/g e ausência de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Conforme observado na Tabela 21, todas (100 %) as amostras de $CO(NH_2)_2$ sintetizadas apresentaram valores de contagem (<10 UFC/g) em placas para bactérias, fungos e leveduras, muito abaixo das especificações, fornecida pelo órgão fiscalizador. Não foi encontrada também a presença de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em nenhuma das amostras analisadas.

Tabela 21 - Contagem (UFC/g) de microrganismos viáveis, fungos e leveduras nas amostras de $CO(NH_2)_2$. (n = 3)

Amostra	Contagem		Recipiente (armazenagem)
	Bactérias[(a)]	**Fungos e leveduras[(b)]**	
P.A	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Frasco Âmbar
	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Ampolas
A	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Frasco Âmbar
B	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Frasco Âmbar
C	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Frasco Âmbar
D	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Frasco Âmbar
E	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Frasco Âmbar
F	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Ampolas
G	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Ampolas

Período de incubação - (a) 4 dias (30 a 35 ºC) e (b) 7 dias (20 a 25 ºC)

As embalagens destinadas ao acondicionamento do composto sintetizado não proporcionaram o crescimento bacteriano, fungos e leveduras após o período de incubação (Tabela 21), verificado nos valores (< 10 UFC/g em ambos) das amostras P.A (grau analítico). Estes resultados também conferem a adequação do procedimento de assepsia, descrito no item 3.2.5.1, realizado nas embalagens (frasco âmbar e ampolas), assegurando a integridade da $CO(NH_2)_2$.

Os resultados da qualidade microbiológica constituem-se de fundamental importância já que o composto sintetizado ($CO(NH_2)_2$) é merecedor de uma atenção especial, quanto ao tratamento das suas manifestações bacteriológica, para evitar os efeitos colaterais que estes podem causar no paciente quando for utilizado no diagnóstico da infecção crônica causada pelo *Helicobacter pylori* (HP).

4.6. Análise isotópica

4.6.1. Preparo das amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$ para determinação isotópica de C

No procedimento foi necessária a avaliação de parâmetros (quantidade de reagentes e tempo de oxidação) envolvidos no preparo de amostra e de um modelo proposto (estabelecido nos itens 3.2.6.1 e 3.2.6.2) para as referidas análises isotópicas de C. Nesses testes, em triplicata, foram utilizados amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$ com abundância isotópica natural (1,11 % em átomos de ^{13}C).

Na Tabela 22, verificou-se um desvio relativamente baixo nos resultados das determinações isotópicas, sendo assim, a melhor relação dos reagentes foi obtida na amostra I (1 mg de $^{13}CO(NH_2)_2$ e 50 mg CuO). Essa condição proporcionou redução na quantidade (mg) do material enriquecido necessário para a análise isotópica, tendo em vista a massa (em torno de 2,02 g) de $^{13}CO(NH_2)_2$ sintetizada no reator por batelada e o elevado custo (US$ 593.00/g de ^{13}C, preço FOB) do isótopo estável de ^{13}C.

Tabela 22 - Determinação isotópica de C (% em átomos de ^{13}C) em função da quantidade (mg) de CuO e $^{13}CO(NH_2)_2$

Amostra	CuO	$^{13}CO(NH_2)_2$*	Determinação isotópica**
	----------(mg)----------		(% em átomos ^{13}C)
I	50	1	1,11 ± 0,01
II	50	3	1,08 ± 0,02
III	100	1	1,08 ± 0,01
IV	100	3	1,08 ± 0,01

*$^{13}CO(NH_2)_2$ com abundância isotópica natural (1,108 % em átomos de ^{13}C) Fonte: BOUTTON, 1991);
**(média ± desvio padrão; n = 3).

Além disso, a diminuição da massa (mg) de CuO (Tabela 22) contribuiu para a redução do custo final, por amostra, da análise isotópica de C, visando seu emprego em rotina de laboratório. O CuO proveniente do processo de determinação isotópica foi armazenado, em recipiente apropriado, para que seja recuperado e reaproveitado no mesmo procedimento analítico, reduzindo seu impacto ambiental.

Com relação à avaliação do tempo de oxidação da $^{13}CO(NH_2)_2$ (Tabela 23) verificou-se que os resultados obtidos, em triplicata, não apresentaram diferença expressiva, atestada pelo desvio médio extremamente baixo. Desta forma, a melhor condição foi para o tempo de 3 horas, permitindo uma maior velocidade analítica no procedimento de preparo da amostra, já que o método convencional requer um tempo de 12 horas. Além disso, é importante mencionar a redução da ordem de 75 % do consumo energético em operação na mufla (3.720 W), com tempo de oxidação em 3 h, contribuindo no custo final da análise isotópica de C.

Tabela 23 - Determinação isotópica de C (% em átomos de ^{13}C) em função do tempo (3, 6 e 12 horas) de oxidação das amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$

Amostra	Tempo (horas)	Determinação Isotópica* (% em átomos de ^{13}C)
I	3	1,07 ± 0,01
II	6	1,06 ± 0,00
III	12	1,05 ± 0,01

*(média ± desvio padrão; n = 3)

Com base na Tabela 24, observou-se pequena diferença, nos valores isotópicos (% em átomos de ^{13}C) de C, utilizando $^{13}CO(NH_2)_2$ com abundância isotópica natural, para os dois espectrômetros de massas empregados. Porém essa diferença entre as médias de 1,3 % não é relevante, tomando-se como base que a precisão analítica nos equipamentos é de grandezas distintas. O espectrômetro de massas ATLAS MAT-CH4 (Figura 39) apresenta uma precisão da ordem de 1 %, enquanto que no ANCA-GSL (Figura 27) é de 0,1 %. Deve-se ainda considerar que as determinações isotópicas de C (% em átomos de ^{13}C), em amostras orgânicas enriquecidas em ^{13}C ($^{13}CO(NH_2)_2$ provenientes da linha de síntese), devem ser realizadas no espectrômetro de massas ATLAS MAT modelo CH4. As determinações isotópicas de C, por exemplo, em amostras de CO_2 em ensaios biomédicos (abundância isotópica próxima ao natural) para detecção da *Helicobacter pylori* (HP), que necessitam de elevada precisão, deverão ser realizadas em espectrômetro de massas de fluxo viscoso (ANCA-GSL).

Tabela 24 - Determinação isotópica de C (% em átomos de ^{13}C) em dois diferentes espectrômetros de massas

Espectrômetro	Determinação isotópica* (% em átomos de ^{13}C)
ANCA-GSL	1,0860 ± 0,0
CH4	1,0716 ± 0,1

*(média ± desvio padrão; n = 3)

Outro fato importante observado na Tabela 24 foi a viabilidade e eficiência do método analítico proposto, devido que espectrômetro de massas ANCA-GSL possui um sistema automatizado para análise isotópica, onde o instrumento é controlado por "software" que realiza o preparo de amostras (combustão e purificação) para posterior determinação isotópica.

4.6.2. Determinação isotópica de C (% em átomos de ^{13}C)

As determinações isotópicas de C (% em átomos de ^{13}C) foram realizadas em amostras gasosas ($^{13}CO_2$) obtidas da $^{13}CO(NH_2)_2$ de acordo com o descrito no item 3.2.6.2. Os resultados (% em átomos de ^{13}C) das determinações isotópicas de C, apresentados na Tabela 25, indicam a viabilidade do método, sendo verificado um desvio relativamente baixo, considerando que a precisão analítica do equipamento da ordem de 1 %. Deve-se ainda salientar, que esses dados obtidos evidenciaram ausência de interferências nos níveis isotópicos.

Ainda com relação à Tabela 25, os resultados isotópicos experimentais apresentam boa exatidão em relação aos valores isotópicos teóricos (1,07; 9,87; 29,69; 49,67; 69,68 e 99,7 % em átomos de ^{13}C) das amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$, obtidas utilizando o processo de diluição isotópica, erro analítico de aproximadamente 0,8 %, possivelmente devido à otimização do procedimento analítico.

Tabela 25 - Determinação isotópica de C (% em átomos de ^{13}C), em amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$, utilizando- se o método via seca

Amostra	Abundância Isotópica Experimental* (% átomos de ^{13}C)
A	1,07 ± 0,01
B	9,91 ± 0,01
C	29,57 ± 0,05
D	49,50 ± 0,07
E	69,42 ± 0,11
F	99,22 ± 0,02

A, B, C, D, E e F refere-se à abundância isotópica (1,07; 9,87; 29,69; 49,67; 69,68 e 99,7 % em átomos de ^{13}C) teórica da $^{13}CO(NH_2)_2$;
*média ± desvio padrão (n = 3).

O valor médio de 1,07 % em átomos de ^{13}C (Tabela 25) refere-se à amostra de $^{13}CO(NH_2)_2$ com abundância isotópica natural, provavelmente derivada do petróleo (fonte de CO_2 utilizada na síntese juntamente com NH_3), a qual tem valor isotópico da ordem de -30 ‰ (TANS, 1981).

Na projeção dos valores (% em átomos de ^{13}C) isotópicos teóricos (ABUTEO) em função dos valores isotópicos experimentais (ABUEXP) verifica-se a existência de uma relação linear ($r^2 = 1$), entre os dois parâmetros (Figura 49), obtendo-se o melhor ajuste para a equação (36).

$$\% \, ^{13}C_{EXP} = 0{,}9956.\% \, ^{13}C_{TEO} + 0{,}0544 \qquad (36)$$

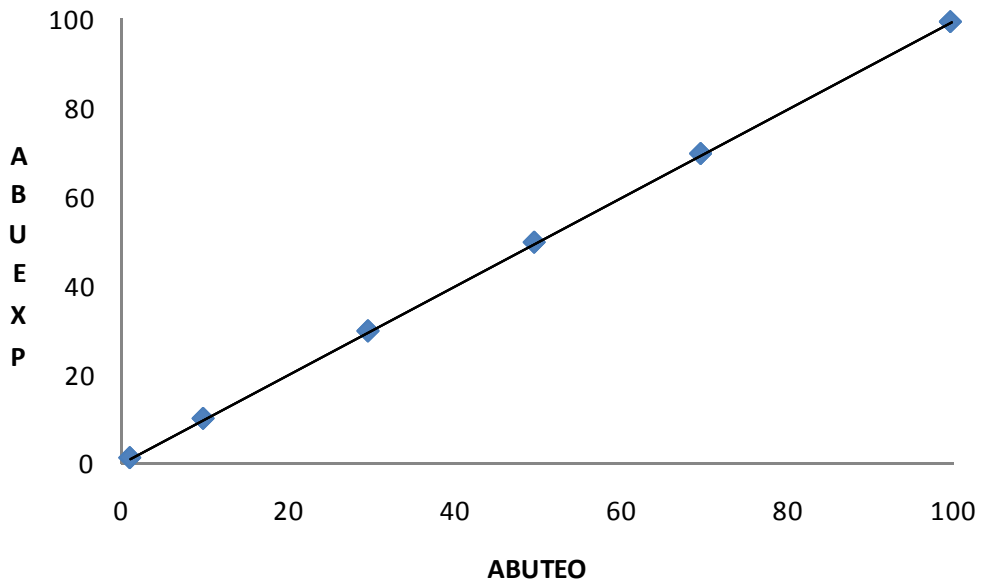


Figura 49 - Regressão Linear simples entre os valores da determinação (% em átomos de ^{13}C) isotópica teórica (ABUTEO) e experimental (ABUEXP), em amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$, por espectrometria de massas (IRMS)

Além das vantagens operacionais do método apresentado, sua viabilidade econômica foi evidenciada pelo não requerimento de um sistema de vácuo externo ao espectrômetro, cujo preço de aquisição em torno de US$ 15,000.00. Desta forma, foi utilizado o sistema de vácuo do próprio espectrômetro de massas (IRMS), com acoplamento direto ("on-line") ao sistema de admissão de amostra do equipamento.

4.6.3. Determinação isotópica simultânea de N e C (% em átomos de ^{15}N e ^{13}C)

Os resultados das determinações isotópicas simultâneas de N e C (% em átomos de ^{15}N e ^{13}C), obtidos na Tabela 26, em triplicata, indicam a viabilidade do método, sendo verificado desvio relativamente baixo em ambos os isótopos. Deve-se ainda salientar, que esses dados obtidos evidenciaram ausência de interferências nos níveis isotópicos.

O valor médio apresentado na Tabela 26, referente a amostras 1, com variação isotópica natural, foram de acordo com o esperado (0,366 % em átomos de ^{15}N e 1,07 % em átomos de ^{13}C), evidenciando a não ocorrência de uma diferença isotópica substancial no processo de oxidação da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ duplamente enriquecida.

Tabela 26 - Determinação isotópica de C e N (% em átomos de ^{15}N e ^{13}C), por espectrometria de massas, em amostras de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, utilizando-se o método via seca

Amostras	Abundância Isotópica Teórica		Abundância Isotópica Experimental	
	---------- (% em átomos) ----------			
	^{15}N	^{13}C	^{15}N	^{13}C
1*	0,36 ± 0,0	1,1 ± 0,0	0,38 ± 0,0	1,08 ± 0,1
2	4,9 ± 0,1	93,6 ± 0,1	5,1 ± 0,3	91,3 ± 0,3
3	14,7 ± 0,5	81,0 ± 0,2	14,1 ± 0,5	79,8 ± 0,3
4	29,9 ± 0,2	59,8 ± 0,2	30,4 ± 0,1	58,4 ± 0,4
5	50,3 ± 0,2	32,4 ± 0,3	49,8 ± 0,2	32,0 ± 0,2
6	72,5 ± 0,2	2,5 ± 0,3	72,7 ± 0,4	2,4 ± 0,3

* $CO(NH_2)_2$ com abundância isotópica natural (0,365 e 1,108 % em átomos de ^{15}N e ^{13}C, respectivamente); média ± desvio padrão (n = 3).

As observações extraídas dos valores isotópicos (% em átomos de ^{15}N e ^{13}C), obtidos na Tabela 26, revelam que o processo de preparo da amostra não influenciou de maneira significativa na precisão e exatidão dos resultados. No entanto, um dos principais motivos dos bons resultados analíticos foi o uso da capsula de vidro (borosilicato), a qual facilitou a etapa de pesagem e transferência da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ para o tubo de oxidação. Esse procedimento reduziu as possibilidades de erros operacionais, sendo minimizado o manuseio das amostras.

Salienta-se, no entanto, que em rotina normal de preparo e análise isotópica (% em átomos de ^{13}C e ^{15}N) de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, faz necessário um mínimo de três repetições, uma vez que o maior erro analítico observado é da ordem de 4 %.

Na projeção dos valores (% em átomos de ^{15}N e ^{13}C) isotópicos teóricos (ABUTEO) em função dos valores isotópicos experimentais (ABUEXP) verificam-se comportamentos semelhantes para ambos os isótopos, a existência de relação linear (r^2), com valores de 0,9995 e 0,9998 para ^{15}N e ^{13}C respectivamente (Figura 50), obtendo-se os melhores ajustes nas equações (37) e (38).

$$\% \, ^{15}N_{EXP} = 1{,}002 \, . \, \% \, ^{15}N_{TEO} - 0{,}1455 \qquad (37)$$

$$\% \ ^{13}C_{EXP} = 0{,}9743 \ . \ \% \ ^{13}C_{TEO} + 0{,}1421 \qquad (38)$$

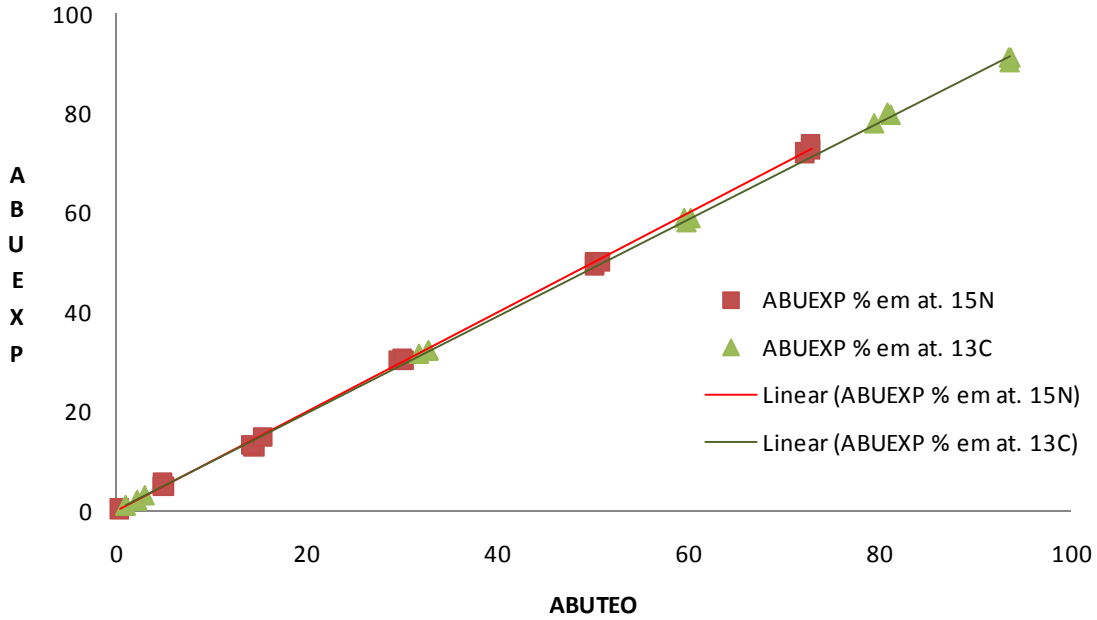


Figura 50 - Regressão Linear simples entre os valores da determinação (% em átomos de ^{15}N e ^{13}C) isotópica teórica (ABUTEO) e a experimental (ABUEXP), em amostras de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, por espectrometria de massas (IRMS)

No entanto, além das vantagens econômicas pelo não requerimento do sistema de vácuo externo ao espectrômetro de massa, como descrito no item 4.6.2, sua viabilidade operacional é evidenciada pelo método analítico apresentado poupar tempo de aproximadamente 30 minutos, requerido para separação de cada um dos isótopos (^{15}N e ^{13}C), na análise isotópica de N e C.

4.7. Síntese da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida nos isótopos de ^{15}N e/ou ^{13}C

Utilizando o sistema proposto no item 3.2.2., envolvendo a reação entre $^{15}NH_3$, ^{13}CO e S (condições descritas no item 3.2.8.), tendo ainda, 40 mL de CH_3OH, foi possível obter a $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida nos isótopos de ^{15}N e/ou ^{13}C. No procedimento de síntese utilizaram-se as melhores condições em função dos parâmetros avaliados, tais como, temperatura de 100 ºC, tempo de reação em 150 minutos, pressão de 0,98 MPa e 40 mg de H_2S.

A síntese da $^{13}CO(NH_2)_2$ enriquecida em ^{13}C, conforme descrito no item 3.2.8, foi realizada com 350 % em excesso de NH_3 (6,13 g) e massas iguais de ^{13}CO e S (1,28 g). Nessas condições foi possível obter, em triplicata, rendimento médio de 81,60 %, equivalente

a 2,35 g do composto purificado. O procedimento completo, por batelada, demanda um tempo de, aproximadamente, oito horas de trabalho.

Ainda, com os dados da síntese da $^{13}CO(NH_2)_2$, foram realizados o balanço de massa dos reagentes principais (NH_3 e ^{13}CO), obtendo, em média, recuperação de 65,3 % (21,4 % incorporado na molécula da $^{13}CO(NH_2)_2$ e 43,9 % recuperado na forma de $(NH_4)_2SO_4$) e perda de 34,7 % de NH_3 (provavelmente na forma de óxidos de nitrogênio, ente outros). Com relação ao ^{13}CO pode-se verificar recuperação de 84,0 % (incorporado na $^{13}CO(NH_2)_2$) e perdas da ordem de 16 %. Essa perda (16,0 % ou 0,2048 g do gás) de ^{13}CO, com enriquecimento isotópico de 99,2 % em átomos de ^{13}C, tem custo de R$ 44,06 por batelada (R$ 241,00 por grama de ^{13}CO).

As amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$, enriquecidas em ^{13}C, foram submetidas a análise do teor (%) de N conforme descrito no item 3.2.4.1. De acordo com os resultados obtidos, em triplicata, a $^{13}CO(NH_2)_2$ apresentou pureza química de 99,2 %. Nessas amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$ também foram realizadas, em triplicata, determinações isotópicas de C (% em átomos de ^{13}C) de acordo com o descrito no item 3.2.6. Os resultados isotópicos obtidos, em média, foram de 99,1 ± 0,3 % em átomos de ^{13}C, evidenciando ausência de fracionamento isotópico com o sistema de produção.

A Tabela 27 apresenta os dados referentes à avaliação dos custos de produção da $^{13}CO(NH_2)_2$ enriquecida em ^{13}C. Nesta podem-se verificar os custos fixos (equipamento e manutenção) e variáveis (reagentes, gases, isótopos, análise química e isotópica, entre outros) relativos a uma batelada de produção. De acordo com os dados, verificou-se que o custo de produção da $^{13}CO(NH_2)_2$, com enriquecimento de 99,2 % em átomos de ^{13}C, foi de R$ 187,74 por grama do composto, valor esse cerca 12,7 % inferior ao preço internacional (FOB) que é de R$ 215,05 (US$ 126.50), baseado na cotação do dólar em R$ 1,70. No entanto, deve-se salientar a ausência das elevadas taxas e impostos aplicados aos produtos importados.

Nesse contexto, dados de uma cotação obtida junto de uma empresa de distribuição de produtos químicos importados, mostraram que o custo de produção nacional da $^{13}CO(NH_2)_2$, nas condições melhores condições obtidas com o sistema, foi cinco vezes inferior ao preço de comercialização da referida empresa.

Deve-se ainda mencionar que a produção nacional, por batelada, de 2,35 g da $^{13}CO(NH_2)_2$ (Tabela 27), enriquecida a 99,2 % em átomos de ^{13}C, corresponde a realização de 32 diagnóstico (UBT) da infecção por *Helicobacter pylori* (HP) em adultos (75 mg), com custo de R$ 53,50 (referente ao valor de R$13,50 do composto e R$ 40,00 das análises isotópicas no t = 0 e t = 30 min.) por exame, ou pode-se também realizar, com a devida massa

(2,35 g), em torno de 53 diagnóstico do HP em crianças (45 mg), com custo unitário de R$ 48,00 (R$ 8,00 do composto e R$ 40,00 da análises isotópicas) por exame. Além disso, os métodos invasivos para diagnóstico do HP que dependem da realização de endoscopia para a coleta da biópsia gástrica, para exame bacteriológico, têm custo de aproximadamente R$ 320,00 (valor médio de hospitais e clínicas), permitindo uma economia com o uso da $^{13}CO(NH_2)_2$ enriquecida em ^{13}C de R$ 266,50 (83,3 %) e R$ 272,00 (85 %) para adultos e crianças, respectivamente.

Tabela 27 - Custos fixos e variáveis na produção, por batelada, da $^{13}CO(NH_2)_2$ enriquecida a 99,2 % em átomos de ^{13}C

Especificação	**Valor unitário (R$)**	**Quantidade**	**Investimentos (R$)**		**Custo [a] (R$)**
			Custo fixo	**Custo variável**	
^{13}CO 99,2 % át. ^{13}C	241,00*	1,28		308,50	308,50
Análise química	12,50	1		12,50	12,50
Análise isotópica	25,00	1		25,00	25,00
Energia elétrica	0,35	10 kw		3,50	3,50
NH_3 (g)	1,009	6,13		6,00	6,00
N_2 (g)	15,00	0,03 m^3		15,00	0,45
N_2 (l)	7,00	5 L		35,00	35,00
Reagentes	19,67	1		19,67	19.67
Mão de obra	1.210,90[c]	3 h	1.210,90		24,00
Equipamentos	19.000,00		19.000,00		3,29**
Manutenção do sistema			19.000,00		3,29**
			Total		441,20
			Custo (R$/g $^{13}CO(NH_2)_2$)		187,74
			Preço FOB (R$/g $^{13}CO(NH_2)_2$)		215,05
Produção do Laboratório: 2,35 g [b]					

[a] Base de cálculo: 1 batelada de produção do laboratório, nas melhores condições obtida com o sistema;
[b] 2,35 g de $^{13}CO(NH_2)_2$ enriquecido a 99,2 % em átomos de ^{13}C;
[c] Valor referente ao salário de um técnico de nível básico (Faixa II-A), com base na Tabela de vencimentos do DRH-USP (maio/2010);
* valor de custo do produto no Brasil (FOB + taxas de importações), com dólar no valor R$1,70;
** valor amortizado para 30 dias considerando o tempo estimado de 30 anos de durabilidade do sistema de produção.

Para obtenção da $CO(^{15}NH_2)_2$, enriquecida no isótopo de ^{15}N, conforme descrito no item 3.2.8, foi necessária a obtenção da $^{15}NH_3$ anidra (reagente limitante), previamente enriquecida. O processo completo de produção da $^{15}NH_3$ anidra, conforme descrito em 3.2.8, foi realizado em 50 minutos na temperatura de 75 ºC e com fluxo de 180 cm^3min^{-1} de N_2. Nessas condições, obtiveram-se no reservatório (R_1) cerca de 1,42 g de $^{15}NH_3$ anidra, partindo de 7,0 g de $(^{15}NH_4)_2SO_4$, enriquecido a 90 % em átomos de ^{15}N. O enriquecimento isotópico na $^{15}NH_3$ foi função da abundância isotópica de ^{15}N no $(^{15}NH_4)_2SO_4$, pois a conversão de N-$^{15}NH_4^+$ à N-$^{15}NH_3$ não apresenta fracionamento isotópico (BENDASSOLLI et al., 2002). Verificou-se também que o rendimento do processo foi de 79 %, com 19 % de recuperação na forma de $(^{15}NH_4)_2SO_4$ e perdas do sistema de 2 %. Esta última foi devida a vazamentos, manuseio do produto e a não recuperação de N-$^{15}NH_3$ do balão de reação.

Na sequência, utilizando-se das melhores condições (250 % em excesso de CO e S) da reação entre $^{15}NH_3$, CO e S (1,36 g, 4,01 g e 4,48 g, respectivamente), foi possível obter, em triplicata, em torno de 1,82 g de $CO(^{15}NH_2)_2$ purificada, equivalente a rendimento de 76,50 %. Esse procedimento, envolvendo todas as etapas descritas, demanda um tempo de nove horas de trabalho por batelada.

No processo de síntese da $CO(^{15}NH_2)_2$ foram realizados o balanço de massa dos reagentes principais ($^{15}NH_3$ e CO), sendo possível obter, em média, recuperação de 84,77 % de N (78,97 % incorporado na molécula de $CO(^{15}NH_2)_2$ e 5,8 % recuperado na forma de $(^{15}NH_4)_2SO_4$) e perda de 15,23 % de $^{15}NH_3$ (na forma de óxidos de nitrogênio, entre outros), e recuperação de 20,83 % de C (incorporada na $^{13}CO(NH_2)_2$) e perda de 79,30 % do carbono proveniente do CO. As perdas (15,23 %) de ^{15}N-NO_x, com enriquecimento isotópico de 90 % em átomos de ^{15}N, tem custo de R$ 26,80 por batelada (R$ 129,43/g de $(^{15}NH_4)_2SO_4$).

As amostras de $CO(^{15}NH_2)_2$ foram submetidas a análise do teor (%) de N conforme descrito no item 3.2.4.1. De acordo com os resultados obtidos, em triplicata, os compostos enriquecidos em ^{15}N apresentaram teor de N médio de 46,11 % (equivalente à pureza química de 98,94 %). Nas amostras de $CO(^{15}NH_2)_2$ também foram realizadas, em triplicata, determinações isotópicas de N (% em átomos de ^{15}N) de acordo com o descrito por Trivelin et al., 1973. Os valores isotópicos foram, em média, de 90,4 ± 0,2 % em átomos de ^{15}N, evidenciando ausência de fracionamento isotópico com o sistema de processo.

No processo de síntese da $CO(^{15}NH_2)_2$, enriquecida em ^{15}N, foi realizada avaliação do custo (fixos e variáveis) de produção, sendo os valores obtidos apresentados na Tabela 28. De acordo com os dados verifica-se que o custo de produção da $CO(^{15}NH_2)_2$, com enriquecimento de 90,0 % em átomos de ^{15}N, foi de R$ 573,20 por grama, valor esse acima

(25,00 %) do preço internacional (FOB) que é de R$ 430,01 (equivalente a US$ 253.00), baseado na cotação do dólar em R$ 1,70. Entretanto, deve-se salientar que esse valor do produto importado está isento das taxas e impostos aplicados na comercialização internacional.

Tabela 28 - Custos fixos e variáveis na produção da $CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida a 90,0 % em átomos de ^{15}N

Especificação	Valor unitário (R$)	Quantidade	Investimentos (R$)		Custo [a] (R$)
			Custo fixo	Custo variável	
$(^{15}NH_4)_2SO_4$ 90% át. ^{15}N	129,43*	7,0 g		906,00	906,00
Análise química	12,50	1		12,50	12,50
Análise isotópica	25,00	1		25,00	25,00
Energia elétrica	0,35	15 kw		5,25	5,25
CO (g)	0,43	4,01 g		1,74	1,74
N_2 (g)	15,00	0,5 m^3		7,50	7,50
Reagentes	19,67	1		19,67	19,67
Gelo seco	7,00	5 kg		35,00	35,00
Mão de obra	1.210,90[c]	3 h	1.210,90		24,00
Equipamentos	19.000,00		19.000,00		3,29**
Manutenção do sistema			19.000,00		3,29**
			Total		1.043,24
			Custo (R$/g $CO(^{15}NH_2)_2$)		573,20
			Preço FOB (R$/g $CO(^{15}NH_2)_2$)		430,01
		Produção do Laboratório: 1,82 g [b]			

[a] Base de cálculo: 1 batelada de produção do laboratório, nas melhores condições obtida com o sistema;
[b] 1,82 g de $CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecido a 90,0 % em átomos de ^{15}N;
[c] Valor referente ao salário de um técnico de nível básico (Faixa II-A), com base na Tabela de vencimentos do DRH-USP (maio/2010);
* valor de custo do produto no Brasil (LIE/CENA/USP);
** valor amortizado para 30 dias considerando o tempo estimado de 30 anos de durabilidade do sistema de produção

Ainda com relação à Tabela 28, o $(^{15}NH_4)_2SO_4$, com enriquecimento de 90 % em átomos de ^{15}N, que representa 88,45 % do custo de produção da $CO(^{15}NH_2)_2$ é obtido no

próprio laboratório de isótopos estáveis do CENA/USP, com custo cerca de 50 % inferior ao preço internacional (FOB).

Na produção da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida nos isótopos de ^{15}N e ^{13}C, como descrito no item 3.2.8, envolvendo a reação entre $^{15}NH_3$, ^{13}CO e S (6,13 g, 1,15 g e 1,28 g, respectivamente), foi possível verificar, em triplicata, rendimento médio de 79,45 %, equivalente a 2,05 g do composto devidamente purificado. A $^{15}NH_3$ enriquecida foi obtida conforme supracitado para a síntese da $CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida em ^{15}N. No entanto, algumas alterações foram realizadas para obter a quantidade (g) de $^{15}NH_3$ necessária na síntese da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$. Para isso, utilizou-se em torno de 30,5 g de $(^{15}NH_4)_2SO_4$, enriquecido a 73,6 % em átomos de ^{15}N, sendo possível obter 6,2 g de $^{15}NH_3$ anidra, recuperação de 1,5 g na forma de $(^{15}NH_4)_2SO_4$ e perdas de 0,2 g NH_3 (g) no sistema. O tempo para realização do processo completo de produção da $^{15}NH_3$ anidra foi de 100 minutos.

Ainda com os dados obtidos na síntese da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ foram realizados o balanço dos reagentes principais ($^{15}NH_3$ e ^{13}CO), sendo possível obter, em média, recuperação de 65,59 % de N (19,1 % incorporado na molécula de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ e 46,5 % recuperado na forma de $(^{15}NH_4)_2SO_4$) e perda de 34,4 % de $^{15}NH_3$ (na forma de ^{15}NO, $^{15}NO_2$, entre outros), e recuperação de 82,1 % de C (incorporada na $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$) e perda de 17,9 % de carbono na forma de ^{13}CO. Essas perdas (34,4 e 17,9 %) de $^{15}N\text{-}NO_x$ e ^{13}CO, com enriquecimento isotópico de 73,6 e 99,2 % em átomos de ^{15}N e ^{13}C, respectivamente, terão custos de R$ 221,50 e R$ 69,66 (R$ 104,98 e R$ 337,50 por grama de $(^{15}NH_4)_2SO_4$ e ^{13}CO), totalizando R$ 291,16 por batelada.

As amostras de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecidas em ^{13}C e ^{15}N foram submetidas a análise do teor (%) de N conforme descrito no item 3.2.4.2. De acordo com os resultados obtidos, em triplicata, os compostos enriquecidos apresentaram teor de N médio de 46,27 % (equivalente à pureza química de 99,30 %). Nessas amostras de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ foram realizadas, em triplicata, determinações isotópicas de C e N (% em átomos de ^{13}C e ^{15}N) de acordo com o descrito no item 3.2.7. Os resultados isotópicos obtidos, em média, foram de 99,2 ± 0,3 e 73,8 ± 0,4 % em átomos de ^{13}C e ^{15}N, respectivamente.

No processo de síntese da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, enriquecida em ^{15}N e ^{13}C, foi realizada avaliação do custo (fixos e variáveis) de produção, sendo os valores obtidos apresentados na Tabela 29. De acordo com os resultados verifica-se que o custo de produção da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, com enriquecimento de 73,6 e 99,2 % em átomos de ^{15}N e ^{13}C, foi de R$ 1.113,50 por grama, valor esse abaixo (10,0 %) do preço internacional (FOB) que é de R$ 1.237,24 (equivalente a US$ 693.00), baseado na cotação do dólar em R$ 1,70. Entretanto, deve-se salientar que esse

valor do produto internacional está com isenção de taxas e impostos aplicados durante a comercialização.

Tabela 29 - Custos fixos e variáveis na produção da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida a 73,6 e 99,2 % em átomos de ^{15}N e ^{13}C, respectivamente

Especificação	Valor unitário (R$)	Quantidade	Investimentos (R$)		Custo [(a)] (R$)
			Custo fixo	Custo variável	
$(^{15}NH_4)_2SO_4$ 73,6 % át. ^{15}N	104,98*	16,32g		1713,28	1.713,28
^{13}CO 99,2 % át. ^{13}C	337.50**	1,15 g		378,00	388,00
Análise química	12,50	1		12,50	12,50
Análise isotópica	25,00	1		25,00	25,00
Energia elétrica	0,35	25 kw		8,75	8,75
N_2 (g)	15,00	1 m^3		15,00	15,00
Reagentes	19,67	1		19,67	19,67
Gelo seco	7,00	5 kg			35,00
N_2 (l)	7,00	5 L		35,00	35,00
Mão de obra	1.210,90[(c)]	3 h	1.210,90		24,00
Equipamentos	19.000,00		19.000,00		3,29***
Manutenção do sistema			19.000,00		3,29***
				Total	2.282,78
				Custo (R$/g $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$)	1.113,55
				Preço FOB (R$/g $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$)	1.237,24
		Produção do Laboratório: 2,05 g [(b)]			

[(a)] Base de cálculo: 1 batelada de produção do laboratório, nas melhores condições obtida com o sistema;
[(b)] 2,05 g de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecido a 73,6 e 99,2 % em átomos de ^{15}N e ^{13}C;
[(c)] Valor referente ao salário de um técnico de nível básico (Faixa II-A), com base na Tabela de vencimentos do DRH-USP (maio/2010);
* valor de comercialização nacional (LIE/CENA/USP);
** valor de comercialização nacional (FOB + taxas de importações), com dólar no valor R$1,70
*** valor amortizado para 30 dias considerando o tempo estimado de 30 anos de durabilidade do sistema de produção

Em termos de custo, a obtenção da $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida em ^{13}C e/ou ^{15}N com o sistema proposto, tem se mostrado inferior em relação ao preço (FOB) comercial no mercado internacional, devendo ainda ressaltar, que a disponibilidade do composto marcado no país impulsionará significativamente as pesquisas com o emprego de traçadores não radioativos em diversas áreas da ciência, principalmente na área médica.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, no presente trabalho, podem-se apresentar as seguintes conclusões:

- O método utilizado para a síntese de $CO(NH_2)_2$, empregando o reator de aço inoxidável, mostrou-se adequado. Nesse, o rendimento do processo, utilizando as melhores condições de quantidade dos reagentes (6,13; 1,12 e 1,28 g de NH_3, CO e S respectivamente, tendo ainda 40 mL de CH_3OH e 40 mg de H_2S), temperatura (100 ºC), tempo (150 minutos) de reação e pressão (0,98 MPa) no reator, foi em média 81,97 %, sendo possível obter 1,96 g do composto por batelada;
- A $CO(NH_2)_2$ sintetizada apresentou pureza química de 99,2 % (46,20 % de N) e ponto de fusão médio de 132,55 ºC. Os resultados do teor (%) de biureto (impureza tóxica), contido nas amostras de $CO(NH_2)_2$, em 0,55 %, não interferem no uso do composto em estudos de diversas áreas da ciência, principalmente agronômica e médica. A determinação do teor ($mg.kg^{-1}$) de elementos contaminantes, presentes na amostra de $CO(NH_2)_2$ sintetizada, apresentaram resultados satisfatórios, sendo os valores encontrados ficaram abaixo da concentração permitida pelo órgão fiscalizador. E a qualidade microbiológica da $CO(NH_2)_2$ sintetizada está em conformidade com os limites especificados pela Farmacopéia Brasileira;
- Na determinação isotópica de C (% em átomos de ^{13}C), em amostras de $^{13}CO(NH_2)_2$, o procedimento de obtenção do $^{13}CO_2$ (g) mostrou-se adequado, não sendo verificada interferência nos níveis isotópicos. Os parâmetros (tempo de oxidação e quantidade de reagente) relacionados com o preparo de amostras e obtenção do $^{13}CO_2(g)$, não apresentaram variação no resultado (% em átomos de ^{13}C) analítico. Desta forma as melhores condições foram obtidas para o tempo de oxidação de 3 horas, 1 mg de $^{13}CO(NH_2)_2$ e 50 mg de CuO;
- O método de obtenção do $^{13}CO_2(g)$ e $^{15}N_2(g)$, proveniente das amostras de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$, mostrou-se adequado para a determinação isotópica (% em átomos de ^{13}C e ^{15}N) simultânea de N e C, não sendo verificada interferência nos níveis isotópicos. A utilização do sistema "on line" acoplado ao espectrômetro de massas proporcionou maior velocidade analítica e facilidade no preparo das amostras para determinação isotópica de ^{13}C e/ou ^{15}N;

- Com o sistema proposto, envolvendo a reação entre $^{15}NH_3$ e ^{13}CO (fontes isotópicas), foi possível obter a $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ enriquecida nos isótopos de ^{15}N e/ou ^{13}C, cujo procedimento não apresentou fracionamento isotópico. Esse processo sofreu ainda uma avaliação econômica (custos fixos e variáveis), atestando sua viabilidade, com custo de R$ 187,74 ($^{13}CO(NH_2)_2$), R$ 573,20 ($CO(^{15}NH_2)_2$) e R$ 1.113,55 ($^{13}CO(^{15}NH_2)_2$) por grama do composto, valores muito próximo do comercializado no mercado internacional (FOB). No entanto, deve-se salientar a ausência das elevadas taxas e impostos aplicados aos produtos importados.

REFERÊNCIAS

AFONSO, J. C.; AGUIAR, R. M. A evolução dos reagentes químicos comerciais através dos rótulos e frascos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 837-844, 2004.

ASSUNCÃO, J. V.; PESQUERO, C. R. Dioxinas e furanos: origens e riscos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 33, n. 5, p. 523-530, 1999.

ATKINS, P. W.; JONES, L. **Princípios de química:** questionando a vida moderna e o meio ambiente. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006. 965 p.

BARBOSA FILHO, M. P.; FAGERIA, N. K.; SILVA, O. F. Fontes e métodos de aplicação de nitrogênio em feijoeiro irrigado submetido a três níveis de acidez do solo. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 785-792, 2004.

BARRIE, A.; PROSSER, S. J. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: BOUTTON, T. W.; YAMSAHI, S. (Ed.). **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 1-46.

BASILE-FILHO, A.; BEAUMIER, L.; EL-KHNOURY, A. E.; YU, Y. M.; KENNEWAY, M.; GLEASON, R. E.; YOUNG, V. R. Twenty-four-hour L-[1-^{13}C]tyrosine and L-[3,3-$2H_2$]phenylalanine oral tracer studies at generous, intermediate, and low phenylalanine intakes to estimate aromatic amino acid requirements in adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 67, n. 4, p. 640-659, 1998.

BASILE FILHO, A.; MARCHINI J. S. O uso de isótopos estáveis no estudo da cinética protéica em medicina intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 192-197, 2004.

BATCHELOR, J. D.; CARPENTER, E. E.; HOLDER, G. N.; EAGLE, C. T.; FIELDER, J.; CUMMINGS, J. Recreation of Wholer´s synthesis of urea: An undergraduate organic laboratory exercise. **The Chemical Educator**, New York, v.3, n.6, p. 1-3, 1998.

BENDASSOLLI, J. A. **Síntese de uréia enriquecida em ^{15}N**. 1988. 155 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

BENDASSOLLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O.; MORTATTI, J.; VICTORIA, R. L. Síntese de fertilizantes nitrogenados enriquecidos em ^{15}N. Parte I: Síntese de NH_3 anidra enriquecida em ^{15}N. **Energia Nuclear e Agricultura**, Piracicaba, v. 9, n. 2, p. 66-93, 1988.

BENDASSOLLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O.; MORTATTI, J.; VICTORIA, R. L. Síntese de fertilizantes nitrogenados enriquecidos em ^{15}N. Parte II. Síntese de uréia enriquecida em ^{15}N. **Energia Nuclear e Agricultura**, Piracicaba, v. 9, n. 2, p. 94-116, l989a.

BENDASSOLLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O.; BOARETTO, A. E.; MORAES NETO, B. M. Preparo de URAN-^{15}N, com marcação isotópica independente nas fontes N-NO_3, N-NH_4 e N-NH_2, a partir de KNO_3-^{15}N e $(NH_4)_2SO_4$-^{15}N. **Energia Nuclear e Agricultura**, Piracicaba, v. 10, n. 1, p. 55-69, 1989b.

BENDASSOLLI, J. A. Produção de grânulos de uréia, uréia-sulfato de amônio e uréia-cloreto de potássio enriquecido com ^{15}N. **Química Nova,** São Paulo, v. 14, n. 3, p. 154-156, 1991.

BENDASSOLLI, J. A.; VICTORIA, R. L. Aspectos termodinâmicos no processo de síntese de uréia, a partir de amônia (NH_3), monóxido de carbono (CO) e Enxofre (S). **Química Nova**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 21-25, 1995.

BENDASSOLLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O.; JUNIOR, F. C. Sulphur stable isotopes separation by anionic exchange chromatography production of compounds enriched in ^{34}S. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 1, p. 13-17, 1997.

BENDASSOLLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O.; IGNOTO, R. F. Produção de amônia anidra de aquamônia enriquecida em ^{15}N a partir de $(^{15}NH_4)_2SO_4$. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 3, p. 595-603, 2002.

BARRETO, M. C. V. **Perdas por volatilização de amônia de duas fontes de N em função da dose, profundidade de aplicação e umidade inicial de três diferentes solos**. 1991 164 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas)- Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1991.

BINGRONG, H.; GENBO, S. U.; YOUPING, H. E. Growth of large size urea crystals. **Journal of Crystal Growth**, Amsterdam, v. 102, n. 4, p. 762-764, 1990.

BOARETTO, R. M.; MATTOS JUNIOR, D.; TRIVELIN, P. C. O.; MURAOKA, T.; BOARETTO, A. E. Acúmulo de nutrientes e destino do nitrogênio (^{15}N) aplicado em pomar jovem de laranjeira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 29, p. 600-605, 2007.

BOUTTON, T. W. Stable carbon isotopic ratios of natural materials: I. Sample preparation and mass spectrometric analysis. In: COLEMAN, D. C.; FRY, B. (Ed.). **Carbon isotope techniques**. San Diego: Academic Press, 1991. p. 155–171.

BOUTTON, T. W. Stable carbon isotopes ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S. (Ed.). **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Decker, 1996. p. 47-82.

BOZZANO, G.; DENTE, M.; ZARDI, F. New internals for urea production reactors. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Oxford, v. 78, p. 128–133, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa nº 05, 23 de fevereiro de 2007. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 mar. 2007. Disponível em: http://www.cfmg.org.br/ portal/legislacao.php. Acesso: 20 nov. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 685, de 27 de agosto de 1998. Regulamenta "Princípios Gerais para o Estabelecimento de Níveis Máximos de Contaminantes Químicos em Alimentos" e seu Anexo: "Limites máximos de tolerância para contaminantes inorgânicos". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 29 ago. 1998. Seção 1, p. 28.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC n. 67. Dispõe sobre boas práticas de manipulação de medicamentos para uso humano em farmácias. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 out. 2007.

BUCHANAN, D. L.; CORCORAN, B. J. Sealed tube combustions for the determination of carbon-14 and total carbon. **Analytical Chemistry,** Washington, v. 31, n. 10, p. 1635-1638, 1957.

CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES, INC. - CIL. Search products:Urea. Disponível em: <http://www.isotope.com/cil/products/searchproducts.cfm>. Acesso em: 20 nov. 2010.

CANETE, A.; ABUNAJI, Y.; ALVAREZ-CALATAYUD, G.; DEVICENTE, M.; GONZÁLEZ-HOLGUERA, J.; LERALTA, M.; PAJARES, J. M.; GISBERT, J. P. Breath test using a single 50-mg dose of ^{13}C-urea to detect *Helicobacter pylori* infection in children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.** New York, v. 36, n. 1, p. 105–111, 2003.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 375-470.

CANTARELLA, H.; MARCELINO, R. Fontes alternativas de nitrogênio para a cultura do milho. In: FANCELLI, A. L. (Ed.). **Milho** - Nutrição e adubação. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 36-55.

CANTARELLA, H.; ROSSETO, R.; BARBOSA, W. PENNA, M. J.; RESENDE, L. C. L. Perdas de N por volatilização da amônia e resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada em sistema de colheita de cana sem queima prévia. In: CONGRESSO NACIONAL DA STAB, 7., 1999, Londrina. **Anais...** Piracicaba: STAB - Açúcar, Álcool e Subprodutos, 1999. p. 82-87.

CARRIJO A. S.; PEZZATO, A. C.; DUCATTI, C. Avaliação do metabolismo nutricional em poedeiras pela técnica dos isótopos estáveis do carbono (^{13}C/^{12}C). **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. Campinas, v. 2, n. 3, p. 209-218, 2000.

CASTRO, A. P. W.; GOMES, A. T. B.; PADOVAN, G. J.; OLIVEIRA, R. B.; MARCHINI, J. S. Urea breath test for the detection of *Helicobacter pylori* using stable isotope (^{13}C). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 2, p. 63-67, 2004.

CHAO, G. T. **Urea, its properties and manufacture.** Taipei, Taiwan: Chao's Institute, 1967.

CHAUVEL, A.; LEFEBVRE, G. **Petrochemical processes, technical and economic characteristics**. Part 1: Synthesis-gas derivatives and major hydrocarbons. Paris: Editions Technip, 1989.

CHUA, T. S.; FOCK, K. M.; TEO, E. K.; NG, T. M. Validation of ^{13}C-urea breath test for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in the Singapore population. **Singapore Medical Journal**, Singapore, v. 43, p. 408–411, 2002.

COLEMAN, D. C.; FRY, B. **Carbon and isotopes techniques**. San Diego: Academic Press, 1991.

CORREIA, P. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: state of the art. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, Philadelphia, v. 5, p. 477–481, 1996.

CORSI, M. Uréia como fertilizante na produção de forragem. In: PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C.; FARIA, V. P. **Uréia fertilizante**. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1994. p. 239-267.

COSTA, M. C. G.; VITTI, G. C.; CANTARELLA, H. Volatilização de N-NH_3 de fontes nitrogenadas em cana-de-açúcar colhida sem despalha a fogo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo,** Viçosa, v. 27, n. 4, p. 631-637, 2003.

CRAIG, H. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction factors for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, New York, v. 12, p. 133-149, 1957.

CREMONINI, F.; BARTOLOZZI, F.; ARMUZZI, A.; ZOCCO, M. A.; SANTARELLI, L.; GABRIELLI, M.; CANDELLI, M.; NISTA, E. C.; SANTOLIQUIDO, A.; GASBARRINI, A. Can ^{13}C-urea breath test predict resistance to therapy in *Helicobacter pylori* infection? **Acta Hepato-Gastroenterology,** Stuttgart, v. 52, p. 1119–1121, 2005.

DAMIN, V.; TRIVELIN, P. C. O.; FRANCO, H. C. J.; BARBOSA, T. G. Nitrogen (^{15}N) loss in the soil plant system after herbicide application on *Pennisetum glaucum*. **Plant and Soil,** Dordecht, v. 328, p. 245-252, 2010.

DAMIN, V.; TRIVELIN, P. C. O.; CARVALHO, S. J. P.; MORAES, M. F.; BARBOSA, T. G. Herbicide application increases nitrogen (^{15}N) exudation and root detachment of *Brachiaria decumbens* Stapf. **Plant and Soil**, Dordecht, v. 334, p. 511-519, 2010.

DAVID, R. L. (Ed.). **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 85. ed. Boca Raton: CRC Press, 2005.

DENADAI, J. C.; DUCATTI, C.; PEZZATO, A. C.; CARRIJO, A. S.; CALDARA, F. R.; OLIVEIRA, R. P. Studies on carbon-13 turnover in eggs and blood of commercial layers. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 8, p. 251-256, 2006.

DENTE, M.; PIERUCCI, S.; SOGARO, A.; CARLONI, G.; RIGOLLI, E. Simulation program for urea plants. **Computers & Chemical Engineering**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 389–400, 1988.

DENTE, M.; BOZZANO, G.; ZARDI, E.; SILVA, P. High efficiency design of urea reactors. **AIDIC Conference Series**, ERIS CT, Milano, Italy, v. 1, p. 191–196, 1995.

DESIGNPOINT Pty Ltd/Paragraph. More scientific illustration: *Helicobacter pylori*. [S.l.], 1996-2007. Disponível em: <http://www.paragraph.com.au/scienceill2.html>. Acesso em: 14 nov. 2010.

DICHI, I.; DICHI, J. B.; BURINI, R. C. Metabolismo proteico global em humanos mediante técnicas com isótopos estáveis. **Cadernos de Nutrição**, São Paulo, v. 14, p. 13‑22, 1997.

DOMÍNGUEZ, M. J.; SANMARTIN, C.; FONT, M.; PALOP, J. A.; FRANCISCO, S. S.; URRUTIA, O.; HOUDUSSE, F.; GARCÍA-MINA, J. M. Design, synthesis, and biological evaluation of phosphoramide as urease inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 3721-3731, 2008.

DUCATTI, C.; SALATI, E.; MATSUI, E. Método de análise da razão $^{13}C/^{12}C$ e $^{18}O/^{16}O$ em carbonatos. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 2, p. 275-286, 1979.

DUETE, R. R. C.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C.; TRIVELIN, P. C. O.; AMBROSANO, E. J. Manejo de adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (^{15}N) pelo milho em latossolo vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 161-171, 2008.

EHLERINGER, J. R.; HALL, A.; FARQUHAR, G. **Stable isotopes and plant carbon-water relations**. New York: Academic, 1993. 555 p.

ELLENRIEDER, V.; GLASBRENNER, B.; STOFFELS, C.; WEILLER, S.; BODE, G.; MÖLLER, P.; ADLER, G. Qualitative and semi-quantitative value of a modified ^{13}C-urea breath test for identification of *Helicobacter pylori* infection. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, Hagerstown, v. 9, p. 1085–1089, 1997.

EMBRAPA. **Ficha de informações sobre produtos químicos** – Ureia. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/fispq/pdf/Ureia.pdf> Acesso em: 20 dez. 2010.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. 4. ed. Strasbourg: Council of Europe, 2002. 2416 p.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Editora O Atheneu, 1988.

FARONI, C. E.; TRIVELIN, P. C. O.; SILVA, P. H.; BOLOGNA, I. R.; VITTI, A. C.; FRANCO, H. C. J. Marcação de fitomassa de cana-de-açúcar com aplicação de solução de uréia marcada com ^{15}N. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 6, p. 851-857, 2007.

FÁVARO, D. I. T.; HUI, M. L. T.; COZZOLINO, S. M. F.; MAIHARA, V. A.; ARMELIN, M. J. A.; VASCONCELLOS, M. B. A.; YUYAMA, L. K.; BOAVENTURA, G. T.; TRAMONTE, V. L. Determination of some nutrients and toxic elements in different brazilian regional diets by neutron activation analysis. **Journal of Trace Elements in Medicine & Biology**, München, v. 11, p. 129-136, 1997.

FELDMAN, R. A.; ECCERSLEY, A. J. P.; HARDIE, J. M. Epidemiology of *Helicobacter pylori*: acquisitions, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio. **British Medical Bulletin**, Oxford, v. 54, p. 39-53, 1998.

FENILLI, T. A. B.; REICHARDT, K.; BACCI, O. O. S.; TRIVELIN, P. C. O.; DOURADO-NETO, D. The ^{15}N isotope to evaluate fertilizer nitrogen absorption efficiency by the coffee plant. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 79, p. 767-776, 2007.

FERM, R. J. The chemistry of carbonyl sulfide. **Chemical Reviews**, Washington, v. 57, p. 621-640, 1957.

FERRAZ, M. L.; LIMA, M. F.; REBER, M.; LAMONICA, R.; TOMISHIGUE, T. Teste respiratório com ^{13}C-Uréia na detecção do *Helicobacter Pylori*. **NewsLab**, Chevy Chase, MD, Ano VI, 1998.

FERREIRA, R. B.; FRANZINI, V. P.; GOMES NETO, J. A.. Determinação de biureto em uréia agroindustrial por espectrofotometria. **Eclética Química**, Marília, v. 32, n. 1, p. 43-48, 2007.

FRANCO, J. A. M.; SARAIVA NETO, A. Produção de fertilizante nitrogenado e suprimento de matéria prima. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S.; VITTI, G. C. (Ed.). **Nitrogênio e enxofre na agricultura brasileira**. Piracicaba: IPNI, 2007. p. 73-108.

FRANZ, A. A.; APPLEGATH, F. A. New synthesis. I – The reaction of ammonia, carbon monoxide and sulphur. **Journal of Organic Chemistry**. Washington, v. 26, p. 3306-3308, 1961.

FRAZER, J. W.; CRAWFORD, R. Modifications in the simultaneous determination of carbon, hydrogen, and nitrogen. **Mikrochimica Acta**, Wien, v. 3, p. 561-566, 1963.

FRITZ, P.; FONTES, J. C. **Handbook of environmental isotope geochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 1989. v. 1, 545 p.

GAVA, G. J. C.; TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; VITTI, A. C.; PENATTI, C. P. Perdas de amônia proveniente da mistura de vinhaça e uréia aplicada ao solo com e sem cobertura de palha de cana-de-açúcar. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 19, n. 3, p. 40-42, 2001.

GAVA, G. J. C.; TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; HEINRICHS, R.; SILVA, M. A. Balanço do nitrogênio da uréia (^{15}N) no sistema solo-planta na implantação da semeadura direta na cultura do milho. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 3, p. 477-486, 2006.

GEHRING, C.; VLEK, P. L. G. Limitations of the ^{15}N natural abundance method for estimating biological nitrogen fixation in Amazonian forest legumes. **Basic and Applied Ecology**, Jena, v. 5, p. 567-580, 2004.

GISBERT, J. P.; PAJARES, J. M. Review article: ^{13}C-Urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection-a critical review. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 20, p. 1001–1017, 2004.

GISBERT, J. P.; DUCONS, J.; GOMOLLÓN, F.; DOMÍNGUEZ-MUÑOZ, J. E.; BORDA, F.; MIÑO, G.; JIMÉNEZ, I.; VÁZQUEZ, M. A.; SANTOLARIA, S.; GALLEGO, S.; IGLESIAS, J.; PASTOR, G.; HERVÁS, A.; PAJARES, J. M. Validation of the ^{13}C-urea breath test for the initial diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and to confirm eradication after treatment. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, Madrid, v. 95, p. 115–120, 2003.

GOLDHABER, S. B. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 38, p. 232–242, 2003.

GOULD, W. D.; HAGEDORN, C.; MCCREADY, R. G. L. Urea Transformation and fertilizer efficiency in soil. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 40, p. 209-238, 1986.

GRAHAM, D. Y. Evolution of concepts regarding *Helicobacter pylori*: from a cause of gastritis to a public health problem. **American Journal of Gastroenterology,** New York, v. 89, p. 469-72, 1994.

GRAHAM, D. Y.; MALATY, H. M.; COLE, R. A.; MARTIN, R. F.; KLEIN, P. D. Simplified ^{13}C-urea breath test for detection of Helicobacter pylori infection. **American Journal of Gastroenterology,** New York, v. 96, p. 1741–1745, 2001.

HAMIDIPOUR, M.; MOSTOUFI, N.; SOTUDEH-GHAREBAGH, R. Modeling the synthesis section of an industrial urea plant. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 106, n. 3, p. 249-260, 2005.

HUBER, J. T. Uréia ao nível do rúmen. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 2., 1984, Piracicaba. **Anais…** Piracicaba: FEALQ, 1984. p. 25-79.

IRAZOQUI, H. A.; ISLA, M. A.; GENOUD, C. M. Simulation of an urea synthesis reactor. 2. Reactor model. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 32, n. 11, p. 2671–2680, 1993.

ISLA, M. A.; IRAZOQUI, H. A.; GENOUD, C. M. Simulation of a urea synthesis reactor. Part 1. Thermodynamic framework. **Industrial & Engineering Chemistry Research,** Washington, v. 32, n. 11, p. 2662-2670. 1993.

JENNISS, S. W.; KATZ, A. S.; LYNCH, R. W. **Applications of atomic spectrometry to regulatory compliance monitoring**. 2. ed. New York: Willey-VHC, 1997.

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A. B. **Trace elements from soil to human**. New York: Springer-Verlag, 2007. 550 p.

KARAMANOS, R. E.; HARAPIAK, J. T.; FLORE, N. A.; STONEHOUSE, T. B. Use of N-(*n-butyl*) thiophosphoric triamide (NBPT) to increase safety of seed-placed urea. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 84, n. 1, p. 105-116, 2004.

KARMAZINOV, N. P.; KROSHKIN, V. A.; IVANOV, G. A.; DUROV, V. S.; RYVKOV, L. G.; PISHCHALOV, N. I.; KULIKOVA, L. I. Corrosion resistance of welded equipment used in synthesis of urea. **Chemical and Petroleum Engineering**, New York, v. 7, n. 4, p. 313-316, 1971.

KAROUI, R.; BAERDEMAEKER, J. De. A review of the analytical methods coupled with chemometric tools. **Food Chemistry,** Barking, v. 102, n. 3, p. 621-640, 2007.

KAWAKAMI, E.; MACHADO, R. S.; REBER, M.; PATRICIO, F. R. ^{13}C-urea breath test with infrared spectroscopy for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition,** New York, v. 35, n. 1, p. 39-43, 2002.

KILMER, V. J.; ENGELSTAD, O. P. Crop response to biuret in urea. Muscle Shoals, AL: Tennessee Valley Authority, 1973. (National Fertilizer Development Center Bulletin, Y-57.

KOELLIKER, J. K.; KISSEL, D. E. Chemical equilibrium affecting ammonia volatilization. In: BOCK, B. R.; KISSEL, D. E. (Ed.). **Ammonia volatilization from urea fertilizers**. Muscle Shoals, AL: Tennessee Valley Authority, National Fertilizer Development Center, 1988. p. 37-52.

KLEIN, P. D.; GRAHAM, D. Y.; GAILLOUR, A.; OPEKUM, A. R.; SMITH, E. O. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Gastrointestinal Physiology Working Group. **Lancet**, London, v. 337, p. 1503-1506, 1991.

KNOWLES, R.; BLACKBURN, T. H. **Nitrogen isotope techniques**. San Diego: Academic Press**,** 1993. 311 p.

KUCHERYAVYI, V. I.; GORLOVSKII, D. M.; ZINOV'EV, G. N.; GORBUSHENKOV, V. A. Equilibrium of the reaction of urea and hydrogen synthesis from carbon monoxide and ammonia. **International Journal of Applied Chemistry,** London, v. 49, p. 2561-2563, 1976.

LANGE, A.; BOLOGNA, I. R.; FARONI, C. E.; TRIVELIN, P. C. O. Aproveitamento pelo trigo do nitrogênio residual da crotalária (Crotalaria juncea) e da uréia aplicado ao solo em cultivo precedente. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, p. 1715-1720, 2009.

LARA CABEZAS, W. A. R.; YAMADA, T. Uréia aplicada na superfície do solo: um péssimo negócio. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, v. 86, p. 9-10, 1999.

LARA CABEZAS, W. A. R.; TRIVELIN, P. C. O.; BOARETTO, A. E. Efeito do tamanho do granulo e relação N/S da uréia aplicada em superfície na volatilização de amônia sob diferentes umidades iniciais do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 16, p. 409-413, 1992.

LARA CABEZAS, W. A. R.; TRIVELIN, P. C. O.; SCHIAVINATTO NETO, P.; BOARETTO, A. E. Perdas gasosas de nitrogênio da vinhaça e uréia em solos cultivados com cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 18, n. 3, p. 463-469, 1994.

LEMKOWITZ, S. M.; COOKER, M. G. R.; VAN DEN BERG, P. J. An Empirical Thermodynamic Model for the Ammonia-Water-Carbon Dioxide System at Urea Synthesis Conditions. **Journal of Applied Chemistry and Biotechnology**, Oxford, v. 23, p. 63-76, 1973.

LEVINSON, W. E.; JAWETZ, E. Pathogenesis. In: LEVINSON, W. E.; JAWETZ, E. (Ed.). **Medical microbiology and immunology**. 3. ed. East Norwalk: Appleton & Lange, 1994. p. 23-33.

MACHADO, R. S.; PATRÍCIO, F. R. S.; KAWAKAMI, E. ^{13}C-Urea Breath Test to Diagnose *Helicobacter pylori* Infection in Children Aged up to 6 Years. **Helicobacter**, Oxford, v. 9, n. 1, p. 39-45, 2004.

MAESTA, N.; CYRINO, E. S.; ANGELELI, A. Y. O.; BURINI, R. C. Efeito da oferta dietética de proteína sobre o ganho muscular, balanço nitrogenado e cinética da ^{15}N-glicina de atletas em treinamento de musculação. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, São Paulo, v. 14, n. 3, p. 215-220, 2008.

MATTAR, R.; SILVA, F. M.; ALEXANDRINO, A. M.; LAUDANNA, A. A. Validation of ^{14}C-urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 3-8, 1999.

MARTHA JUNIOR, G. B.; CORSI, M.; TRIVELIN, P. C. O.; VILELA, L. Recuperação de ^{15}N-uréia no sistema solo-planta de pastagem de capim-tanzânia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.33, n.1, p. 95-101, 2009.

MARTINELLI, L. A.; OMETTO, J. P. H. B.; FERRAZ, E. S.; VICTORIA, R. L.; CAMARGO, P. B.; MOREIRA, M. Z. **Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis**. São Paulo: Editora Oficina de Textos, 2009. v. 1, 144 p.

MATTHEWS, D. E.; BIER, D. M. Stable isotope methods for nutritional investigation. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 3, p. 309-339, 1983.

MAXIMO, E. **Obtenção de $^{15}NH_4$ com alto enriquecimento no isótopo ^{15}N, por cromatografia de troca iônica em sistema cascata**. 1998. 82 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

MAXIMO, E.; BENDASSOLLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O. Enrichment of ^{15}N by coupling three systems of ion-exchange chromatography columns. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ISOTOPE, 3., 2000, Vancouver. **Isotope production and applications in the 21st century**. Singapore: World Scientific Printers, 2000. p. 137-139.

MAXIMO, E.; BENDASSOLLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O.; ROSSETE, A. L. R. M.; OLIVEIRA, C. R.; PRESTES, C. V. Produção de sulfato de amônio duplamente marcado com os isótopos estáveis ^{15}N e ^{34}S. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 211-216, 2005.

MCDOWELL JUNIOR, D. W. Corrosion in urea-synthesis reactors. **Chemical Engineering**, New York, v. 81, n. 10, p. 118-124, 1974.

MIKKELSEN, R. L. Biuret in urea fertilizer. **Fertilizer Research**, Dordrecht, v. 26, n. 1-3, p. 311–318, 1990.

MIKKELSEN, R. L. Biuret in urea fertilizers. **Better Crops with Plant Food**, Atlanta, v. 151, n. 3, p. 3-91, 2007.

MITHYANTHA, M. S.; KULAKARNI, D. S.; TRIPATHI, S. C.; AGNIHOTHRUDU, V. Biuret and crop production. **Fertilizer News**, New York, v. 20, n. 3, p.13-18, 1977.

MONSANTO CHEMICAL COMPANY. A new synthesis of urea under mild conditions of pressure e temperature. **Hidrocarbon Processing and Petroleum Refiner**, Houston, v. 40, p. 302-307, 1961.

MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C.; PIVETTA, F.; COUTADA, L. Influência da geometria da plataforma na determinação de chumbo em zidovudina (AZT) por ET AAS. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 379-383, 2002.

MULVANEY, R. L. Mass spectrometry. In: KNOWLES, R.; BLACKBURN, T.H. (Ed.). **Nitrogen isotope techniques**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 11-57.

NASCIMENTO, D. Trocando nitrato de amônio por uréia. **Idea News**, Riberão Preto, v. 59, p. 130-132, 2005.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recommended Dietary Allowances (RDA)**. 10. ed. Washington, DC: National Academy of Sciences, 1989.

NEILL, C.; MELILLO, J. M.; STEUDLER, P. A.; CERRI, C.; MORAES, F. L.; PICCOLO, F. C.; BRITO, M. Soil carbon and nitrogen stocks following forest clearing for pasture in the southwestern Brazilian Amazon. **Ecological Applications**, Washington, v. 7, p. 1216-1225, 1997.

NORRIS, S. R.; BRINK, J. **Indústria de processos químicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1977. 257 p.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. **Guidelines for the testing of chemicals**. Test No. 102: Melting Point / Melting Range. Paris, 1995.

OLIVEIRA, A. C.; REBER, M.; LANZONI, V.; FERRAZ, M. L.; PARISE, E. R. Teste respiratório da ^{13}C-metacetina na doença hepática crônica pelo vírus C. **Arquivos de Gastroenterologia,** São Paulo, v. 43, n. 1, p. 41-44, 2006.

OLIVEIRA, A. C. B.; SALIMON, C. I.; CALHEIROS, D. F.; FERNANDES, F. A.; VIEIRA, I.; CHARBEL, L. F.; PIRES, L. F.; SALOMÃO, M. S. M. B.; NOGUEIRA, S. F.; VIEIRA, S.; MOREIRA, M. Z.; MARTINELLI, L. A.; CAMARGO, P. B. Isótopos estáveis e produção de bebidas: de onde vem o carbono que consumimos? **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 285-288, 2002.

OLIVEIRA, A. M. R.; QUEIROZ, D. M. M.; ROCHA, G. A.; MENDES, E. N. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in children of low socioeconomic level in Belo Horizonte, Brazil. **American Journal of Gastroenterology,** New York, v. 89, p. 2201-2204, 1994.

OLIVEIRA, C. R. **Síntese de alanina e glicina com elevado enriquecimento no isótopo ^{15}N**. 2001. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R.; SINTO, S. I. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. São Paulo: Sarvier, 2001. 136 p.

ORTIZ-OLVERA, N. X.; MORÁN, V. S.; GALLARDO, W. I.; BLANCAS, V. J. M.; CABRERA, M. L. Validation of a simplified ^{13}C-urea breath test method for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, Madrid, v. 99, p. 392–397, 2007.

PARKINSON, J. A.; ALLEN, S. E. A wet oxidation procedure suitable for the determination of nitrogen and mineral nutrients in biological material. **Communications in Soil Science and Plant Analysis,** New York, v. 6, p. 1-11, 1975.

PELSER, H. H.; HOUSEMAN, K. C.; JOUBERT, G. V.; KRAAIJ, P.; MEINARDI, M.; MCLEOD, A.; ANTHONY, M. Prevalence of *Helicobacter pylori* antibodies in children in Bloenfontain, South Africa. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition,** Philadelphia, v. 24, n. 2, p. 135-139, 1997.

PERRI, F.; QUITADAMO, M.; RICCIARDI, R.; PIEPOLI, A.; COTUGNO, R.; GENTILE, A.; PILOTTO, A.; ANDRIULLI, A. Comparison of a monoclonal antigen stool test (Hp StAR) with the ^{13}C-urea breath test in monitoring *Helicobacter pylori* eradication therapy. **World Journal of Gastroenterology,** Beijing, v. 11, p. 5878–5881, 2005.

PESSENDA, L. C. R. ; SAIA, S. E. M. G.; GOUVEIA, S. E. M.; LEDRU, M. P.; SIFEDDINE, A.; BENDASSOLI, J. A. Last millenium environmental changes and climate inferences in the southeasternAtlantic forest, Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 717-729, 2010.

PRESTON, T.; OWENS, N. J. P. Interfacing an automatic elemental analyser with an isotope ratio mass spectrometer: the potential for fully automated total nitrogen and ^{15}N analysis. **Analyst,** London, v. 108, p. 971-977, 1983.

PIMENTEL, L. C. F.; CHAVES, C. R.; FREIRE, L. A. A.; AFONSO, J. C. O inacreditável emprego de produtos químicos perigosos no passado. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 1138-1149, 2006.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico da qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 53-95.

POUNDER, R. E. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 2, p. 33-39, 1995.

QUEIROZ, E. C.; DUCATTI, C.; VENTURINI FILHO, W. G.; SILVA, E. T.; NOJIMOTO, T. Determinação da razão isotópica δ^{13}C em bebidas comerciais a base de laranja. **Ciência e Agrotecnologia,** Lavras, v. 33, n. 4, p. 1085-1094, 2009.

REYNOLDS C. M.; WOLF, D. C. Effect of soil moisture and air relative humidity on ammonia volatilization from surface-applied urea. **Soil Science**, New Brunswick, v. 143, p. 144-152, 1987.

RODRIGUES, M. B.; KIEHL, J. C. Distribuição e nitrificação da amônia proveniente da uréia aplicada ao solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 16, p. 403-408, 1992.

RUSSEL, J. B. **Química geral**. Tradução e revisão técnica de Márcia Guekezian. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1994. v. 1, 662 p.

SAARELA, M.; VON TROIL-LINDEN, B.; TORKKO, H.; ALALUUSUA, S.; JOUSIMIES-SOMER, H.; ASIKAINER, S. Transmission of oral bacterial species between spouses. **Oral Microbiology and Immunology,** Copenhagen, v. 8, p. 349-354, 1993.

SANT ANA FILHO, C. R.; BENDASSOLLI, J. A.; ROSSETE, A. L. R. M.; PIEDADE, S. M. S.; PRESTES, C. V. Production of ^{15}N-enriched nitric acid ($H^{15}NO_3$). **Brazilian Journal of Chemical Engineering,** São Paulo, v. 25, n. 4, p. 743-749, 2008.

SATYRO, M. A.; LI, Y.; AGARWAL, R. K.; SANTOLLANI, O. J. **Modeling urea processes, a new thermodynamic model and software integration paradigm**. Calgary, Alberta, Canada: Virtual Materials Group, 2003.

SAVANT, N. K.; JAMES, A. F.; McCLEAN, G. H. Effect of amounts and sequence of additions of urea and water on hydrolysis of surface-applied granular urea in unsaturated soils. **Fertilizer Research**, Netherlands, v. 11, p. 231-234, 1987.

SANZ-COBENA, A.; MISSELBROOK, T. H.; ARCE, A.; MINGOT, J. I.; DIEZ, J. A.; VALLEJO, A. An inhibitor of urease activity effectively reduces ammonia emissions from soil treated with urea under Mediterranean conditions. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 126, p. 243–249, 2008.

SANTOS, F. A. P. Metabolismo das proteínas. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jabuticabal: FUNEP, 2006. p. 255-284.

SANTROCK, J.; STEPHEN, A. S.; HAYES, J. M. Isotopic analysis based on the mass spectrum of carbon dioxide. **Analytical Chemistry**, New York, v. 57, p. 1444-1448, 1985.

SAS INSTITUTE. **The SAS system** [programa de computador]. version 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2008a.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT User's Guide**, release 9.2. Cary, NC: SAS Institute Inc., 2008b.

SCHELSINGER, W. H. **Biogeochemistry**: an analysis of global change. San Diego: Academic Press, 1991. 443 p.

SICHIERI, R.; COITINHO, D. C.; MONTEIRO, J. B.; COUTINHO, W. F. Recomendações de alimentação e nutrição saudável para a população brasileira. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 3, p. 227-232, 2000.

SILVA, E. C.; VALE, F. R. Disponibilidade de nitrato em solos brasileiros sob efeito da calagem e de fontes e doses de nitrogênio.**Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 2461-2471, 2000.

SILVA, J. M. K.; VILLARES, C. A.; MONTEIRO, M. S.; COLAÚTO, C.; SANTOS, A. F.; MATTAR R. Validation of a rapid stool antigen test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 52, n. 3, p. 125-128, 2010.

SIQUEIRA, J. S.; LIMA, P. S. S.; BARRETO, A. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Artigo de revisão: Aspectos gerais na infecções por *Helicobacter pylori*. **Revista Brasileira de Análises clínicas**, Rio de Janeiro, v.39, p.9-13, 2007.

SHAIKH, S.; KHALED, M. A.; ISLAM, A.; KURPAD, A. V.; MAHALANABIS, D. Evaluation of stool antigen test for *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic children from a developing country using ^{13}C-urea breath test as a standard. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition,** New York, v. 40, p. 552–554, 2005.

SOUTO, F. J. D.; FONTES, C. J. F.; ROCHA, G. A.; OLIVEIRA, A. M. R.; MENDES, E. N.; QUEIROZ, D. M. M. Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in a rural area of the State of Mato Grosso do Sul. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 171-74, 1998.

SOUZA-KRULISKI, C. R.; DUCATTI, C.; VENTURINI FILHO, W. G.; ORSI, R. O.; SILVA, E. T. Estudo de adulteração em méis brasileiros através de razão isotópica do carbono. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 434-439, 2010.

STACK, T.; REEDS, P. J.; PRESTON, T.; HAY, S. M.; LLOYD, D. J.; AGGETT, P. J. ^{15}N-Tracer studies of protein metabolism in low birth weight preterm infants: a comparison of ^{15}N-glycine and ^{15}N-yeast protein hydorlysate and of human milk-and formula-fed babies. **Pediatric Research**, Baltimore, v. 25, p. 167-172, 1989.

STAMICARBON STAFF. Stamicarbon Carbon Dioxide Stripping Urea Process. In: MEYERS, R. A. (Ed.). **Handbook of Chemicals Production Processes**. New York: McGraw-Hill, 1986. Section 3.11.

STINSON, J. M. Meeting of February 25 on production of ^{15}N-enriched and ^{15}N-Depleted fertilizers, 1975, 9p. (memorandum).

TANS, P. ^{13}C/^{12}C of industrial CO_2. In: BOLIN, B. (Ed.). **Carbon cycle modelling**. New York: John Wiley and Sons, 1981. p. 127-129.

TAVARES, C. R. O.; BENDASSOLLI, J. A.; COELHO, F.; SANT'ANA FILHO, C. R.; PRESTES, C. V. ^{15}N- labed glycine synthesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 1-9, 2006.

TAVARES, C. R. O.; BENDASSOLLI, J. A.; RIBEIRO, D. N.; ROSSETE, A. L. R. M. ^{15}N-labeled glyphosate synthesis and its practical effectiveness. **Scientia Agricola,** Piracicaba, v. 67, n. 1, p. 96-101, 2010.

TAYLOR, D. N.; PARSONNET, J. Epidemiology and natural history of *Helicobacter pylori* infection. In: BLASER, M. J.; SMITH, P. D. ; RAVDIN, J. L.; GREENBERG, H. B.; GUERRANT, R. L. Infections of the gastrointestinal tract. New York: Raven Press, 1995. p. 551-563.

TERMAN, G. L. Volatilization of nitrogen as ammonia from surface applied fertilizers, organic amendments, and crop residues. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 31, p. 189-223, 1979.

TONELLI, E.; FREIRE, L. M. S. **Doenças infecciosas na infância e adolescência**. São Paulo: Medsi, 2000. 657 p.

TRENKEL, M. E. **Improving fertilizer use efficiency**: Controlled-release and stabilized fertilizers in agriculture. Paris: International Fertilizer Industry Association, 1997. 151 p.

TRIVELIN, P. C. O. **Enriquecimento isotópico de ^{15}N por cromatografia de troca iônica.** 1976. 95 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1976.

TRIVELIN, P. C. O.; SALATI, E.; MATSUI, E. **Preparo de amostras para análise de ^{15}N por espectrometria de massas**. Piracicaba: CENA, 1973. 41 p. (Boletim Técnico).

TRIVELIN, P. C. O.; SALATI, E.; MATSUI, E. Enriquecimento isotópico de ^{15}N por cromatografia de troca iônica. II. Produção de sulfato de amônio enriquecido em ^{15}N. **Energia Nuclear e Agricultura**, Piracicaba, v. 1, n. 2, p. 59-75, 1979.

TRIVELIN, P. C. O.; LARA CABEZAS, W. A. R.; BOARETO, A. E. Dinâmica do nitrogênio de fertilizantes fluidos no sistema solo-planta. In: VITTI, G. C.; BOARETO, A E. (Ed.). **Fertilizantes fluidos**. Piracicaba Potafos, 1994. p. 253-268.

TRIVELIN, P. C. O.; VITTI, A. C.; OLIVEIRA, M. W.; GAVA, G. J. C.; SARRIÉS, G. A. Utilização de nitrogênio e produtividade da cana-de-açúcar (cana-planta) em solo arenoso com incorporação de resíduos da cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, n. 3, p. 636-646, 2002.

TSALEV, D. L.; ZAPRIANOV, Z. K. **Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1985. v. 1.

TSENG, C. A.; WU, J. Y.; PAN, Y. S.; YU, F. J.; KUO, C. H.; LU, C. Y.; SU, Y. C.; WU, D. C.; PERNG, D. S.; JAN, C. M.; WANG, W. M. Comparison of ^{13}C-urea breath test values in gastric cancer, peptic ulcer, and gastritis. **Acta Hepato-Gastroenterology**, Stuttgart, v. 52, p. 1636–1640, 2005.

UCHINO, H. Toyo Urea Process-Advanced Process for Cost and Energy Savings. In: MEYERS, R. A. (Ed.). **Handbook of Chemicals Production Processes**. New York: McGraw-Hill, 1986. Section 3.12.

USEPA. **Method 6020A**: Inductively coupled plasma – mass spectroscopy. Washington, DC, 1998. (SW-846 Manual).

USEPA. **Method 3051A**. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludge, soils, and oils. Revisão 1. Washington, DC, 2007. 30 p. Disponível em: http://www.epa.gov/epawaste/hazard/testmethods/sw846/online/index.htm. Acesso em: 22 ago. 2010.

VAIRA, D.; HOTLON, J.; MENEGATTI, M.; GATTA, L.; RICCI, C.; ALI, A.; LANDI, F.; MORETTI, C.; MIGLIOLI, M. Routes of transmission of *Helicobacter pylori* infection. **Italian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, Pisa, v. 30, p. 279-285, 1998.

VITORELLO, V. C.; CERRI, C. C.; ANDREUX, F.; FELLER, C.; VICTORIA, R. L. Organic matter and natural carbon-13 distribution in forest and cultivated oxisols. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 53, p. 773-778, 1989.

VOLK, G. M. Volatile loss of ammonia following surface application of urea to turf or bare soils. **Agronomy Journal,** Madison, v. 51, p. 746-749, 1959.

WATERLOW, J. C. ^{15}N end-product methods for the study of whole body protein turnover. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 40, p. 317‑20, 1981.

WHITE, R. E. Leaching. In: WILSON, J. R. (Ed.). **Advance in nitrogen cycling in agricultural ecosystems**. Wallingford, UK: CAB International, 1987. v. 1, p. 193-211.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Trace elements in human nutrition and health**. Geneva, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. International Programme on Chemical Safety (ICPS). **Barium and barium compounds**. Geneva, 2001. (Concise International Chemical Assessment Document, 33).

WU, I. C.; WANG, S. W.; YANG, Y. C.; YU, F. J.; KUO, C. H.; CHUANG, C. H.; LEE, Y. C.; KE, H. L.; KUO, F. C.; CHANG, L. L.; WANG, W. M.; JAN, C. M.; WU, D. C. Comparison of a new officebased stool immunoassay and ^{13}C-UBT in the diagnosis of current *Helicobacter pylori* infection. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York, v. 147, p. 145–149, 2006.

XIE, Y.; CHIBA, M.; SHINOHARA, A.; WATANABE, H.; INABA, Y. Studies on lead-binding protein and interaction between lead and selenium in the human erythrocytes**.** **Industrial Health**, Kawasaki, v. 36, p. 234-239, 1998.

YOUNG, V. R.; EL-KHOURY, A. E. Can amino acid requirements for nutritional maintenance in adult humans be approximated from the amino acid composition of body mixed proteins? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 92, p. 300-304, 1995.

ZAGARI, R. M.; POZZATO, P.; MARTUZZI, C.; FUCCIO, L.; MARTINELLI, G.; RODA, E.; BAZZOLLI, F. ^{13}C-urea breath test to assess *Helicobacter pylori* bacterial load. **Helicobacter**, Cambridge, v. 10, p. 615–619, 2005.

ZANASI, R.; ALFANO, D.; SCARABINO, C.; MOTTA, O.; VIGLIONE, R. G.; PROTO, A. Determination of ^{13}C/^{12}C carbon isotope ratio **Analytical Chemistry**, Washington, v. 78, n. 9, p. 3080-3083, 2006.

ZHAO, F. J.; VERKAMPEN, K. C. J.; BIRDSEY, M.; BLAKE-KALFF, M. M. A.; MaCRATH, S. P. Use of the enriched stable isotope ^{34}S to study sulphur uptake and distribution in wheat. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 24, n. 10, p. 1551-1560, 2001.

ZUANON, J. A. S.; PEZZATO, A. C.; PEZATTO, L. E.; PASSOS, J. R. S.; BARROS, M. M.; DUCATTI, C. Muscle $\delta^{13}C$ change in Nile Tilapia (Oreochromis niloticus): Effects of growth and carbon turnover. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 145, p. 1001-1007, 2006.

ZULLO, A.; PERNA, F.; RICCI, C.; HASSAN, C.; TAMPIERI, A.; DE FRANCESCO, V.; MORINI, S.; VAIRA, D. ^{13}C-urea breath test values and Helicobacter pylori eradication. **Digestive Diseases and Sciences**, New York, v. 53, n. 2, p. 370-374, 2008.