

SÍNTESE DE GLICINA ENRIQUECIDA EM N-15 EM REATOR DE AÇO INOXIDÁVEL REVESTIDO INTERNAMENTE COM PTFE

SYNTHESIS OF ¹⁵N-ENRICHED GLYCINE IN A TEFLON-LINED STAINLESS STEEL REACTOR

RESUMO

É apresentado neste trabalho um processo de síntese de glicina enriquecida em ¹⁵N, baseado na reação de aminação de alfa-haloácidos, utilizando como reagente ¹⁵N-amônia. De forma a atender a demanda pelo produto no Brasil e garantir a segurança operacional da síntese proposta, construiu-se uma linha especial de pressão (reator de aço inox 304), revestida internamente com Teflon (PTFE). Nesse sistema, foi possível produzir, em cada batelada, aproximadamente $2,32 \pm 0,26$ g de glicina enriquecida em ¹⁵N, utilizando como reagente amônia anidra, e recuperar 97% do nitrogênio enriquecido em excesso, o que é de grande importância face ao elevado valor comercial do isótopo (US\$ 300.00 por grama). Tal desenvolvimento poderá representar uma considerável colaboração para o avanço das pesquisas nas áreas biológicas, biomédicas e agrônômicas.

Palavras-chave: glicina-¹⁵N. Isótopos Estáveis.

ABSTRACT

In this paper, a process for synthesis of ¹⁵N-enriched glycine, based on the method of amination of α -halocids, using as reagent ¹⁵N-ammonia, was proposed. Aiming to supply the demand in Brazil and maintain the operational safety, a special line of pressure, comprising a steel reactor internally coated with Teflon, was developed. About $2,32 \pm 0,26$ g of high purity ¹⁵N-enriched glycine was produced using anhydrous ammonium. This procedure allowed the recovery of the 97% of enriched nitrogen (excess ¹⁵N- ammonia), which is of fundamental importance due to the high value of the isotope (US\$ 300.00 per gram). This development represents a significant collaboration for advancements of research in biological, biomedical and agronomical areas.

Keywords: ¹⁵N-glycine. Stable Isotopes.

INTRODUÇÃO

A utilização de traçadores contendo isótopos do nitrogênio radioativos (¹³N) ou estáveis (¹⁴N/¹⁵N) se constitui em importante ferramenta para auxiliar na elucidação do ciclo deste elemento. Em relação ao uso da técnica radioisotópica, principalmente em pesquisas biológicas, a principal inconveniência reside no fator tempo, já que o radioisótopo de meia-vida mais longa é o ¹³N, com apenas 9,97 min (1). Ainda assim, na literatura podem ser verificados interessantes trabalhos de pesquisas envolvendo

aplicações do ¹³N em biologia (2,3). Vale ressaltar, também, que o custo de aquisição dos produtos enriquecidos no radioisótopo costuma ser inferior aos estáveis (4), mas a condução dos experimentos é mais laboriosa, podendo resultar em conclusões equivocadas (5).

Com relação ao emprego do ¹⁵N, torna-se possível desenvolver estudos sem a limitação de tempo, e o material em experimentação não fica exposto à radiação, tornando desne-

*Claudinéia Raquel de Oliveira Tavares**,
Carlos Roberto Sant'Ana Filho,
José Albertino Bendassolli,
Glauco Arnold Tavares e
Clélber Vieira Prestes

Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo

*Correspondência:
crolivei@cena.usp.br

cessária a adoção de qualquer medida de segurança em função da radioatividade (6-9). Bendassolli *et al.* (11), em estudos desenvolvidos para separação isotópica do ^{34}S , mencionaram que o uso de isótopos estáveis é uma atual tendência internacional, sendo estimulada especialmente em pesquisa de campo. Essa tendência, aliada à possibilidade de obtenção de informações refinadas sobre o ciclo do nitrogênio, reforça as razões para o contínuo crescimento da utilização da técnica isotópica em pesquisas aplicadas.

Embora o ^{15}N seja considerado importante como traçador em estudos bioquímicos e agrônômicos, sendo já utilizado há quase SETE décadas (11,12), é correto afirmar que a utilização de compostos enriquecidos em ^{15}N (principalmente aqueles com elevado enriquecimento) em pesquisas aplicadas é ainda limitada, principalmente em função do alto preço.

Até recentemente, alguns compostos nitrogenados não eram produzidos na América do Sul, devido a dificuldades de ordem metodológica, sendo necessária a importação dos Estados Unidos da América, da Europa ou Ásia. Para a obtenção de uma série de compostos nitrogenados é de fundamental importância a produção de amônia ($^{15}\text{NH}_3$). No Brasil já dispomos de método de obtenção do íon amônio ($^{15}\text{NH}_4^+$) com enriquecimento na faixa de até 0,5 a 90% em átomos de ^{15}N (8). A partir do amônio enriquecido, podem ser produzidos vários compostos nitrogenados, entre os quais se destacam: amônia anidra (13,14); ácido nítrico (15), a partir da combustão da amônia- ^{15}N ; ureia (16) e uran (17).

Considerando-se as rotas de síntese supracitadas, verificou-se a potencialidade da realização de estudo visando à produção de mais um composto nitrogenado de grande importância, a glicina, também conhecida como ácido aminoacético, que se destaca por ser um aminoácido simples e um dos mais solúveis em água.

Devido à alta solubilidade, nos organismos vivos, a glicina é frequentemente adicionada junto a outras moléculas para torná-las mais solúveis, de modo que possam ser excretadas pela urina (18). Considerando-se que essa característica permite elucidar o ciclo do nitrogênio no meio metabólico, Stack *et al.* (19) utilizaram aminoácidos- ^{15}N para avaliação do estado nutricional humano. Dichi & Papini-Berto (20), Marchini *et al.* (21) e Schelp *et al.* (22) realizaram estudos de metabolismo de proteínas marcadas no ^{15}N . Para os referidos estudos, estes compostos têm proporcionado um método seguro, eliminando procedimentos invasivos e exposição do paciente à radioatividade, o que torna a aplicação extremamente favorável na área (23).

Na área agrônômica, a glicina pode ser empregada como matéria prima na síntese do glifosato. O glifosato obtido, enriquecido no isótopo ^{15}N , é utilizado em estudos relacionados ao comportamento do herbicida no ambiente, principalmente em estudos de campo (24). Neste sentido, a síntese do herbicida glifosato enriquecido no isótopo ^{15}N é de potencial interesse em pesquisas agrônômicas, uma vez que poucos estudos são citados na literatura brasileira envolvendo o uso deste traçador, em virtude das dificuldades de obtenção desse composto no mercado, bem como o custo do produto enriquecido em ^{15}N . Deve-se ressaltar que a tecnologia de enriquecimento e síntese de compostos

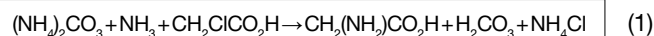
químicos marcados nos isótopos estáveis ^{15}N e ^{13}C não são repassadas pelos países que as detêm, em razão de interesses de ordem econômica e, muitas vezes, estratégicos, o que torna extremamente importante o desenvolvimento de novas tecnologias para o enriquecimento e síntese de compostos enriquecidos em isótopos estáveis de interesse no Brasil.

A glicina pode ser sintetizada utilizando-se as sínteses de Strecker, Hoffmann ou ainda através de uma modificação da síntese de Gabriel para amina, empregando-se ftalimida potássica. Esta última apresenta rendimento elevado (85%) e possibilita fácil purificação (25). Embora com rendimentos inferiores (da ordem de 40 a 60%) a aminação α -haloácidos, também pode ser utilizada. Nessa reação, submete-se um ácido carboxílico clorado ou bromado em posição α a amonólise direta, com um grande excesso de solução concentrada de amoníaco. O deslocamento do halogênio pelo amoníaco da origem ao sal de amina (aminoácido).

Dentro deste contexto, no presente trabalho foi avaliada a síntese da glicina enriquecida em ^{15}N fazendo uso do método de aminação de α -haloácidos. A opção por esse método está condicionada à utilização de amônia- ^{15}N , principal matéria prima da reação de síntese e disponível no país (14). Assim sendo, o presente trabalho apresenta como inovação a utilização amônia anidra- ^{15}N em substituição a amônia aquosa- ^{15}N e reação em reator de aço inox, revestido internamente com Teflon (PTFE), para a síntese proposta. Outro aspecto relevante, no trabalho, refere-se ao sistema de recuperação do reagente amoniacal, previamente enriquecido, sendo de fundamental importância devido ao alto valor agregado do composto (US\$ 300.00 por grama do isótopo). Tal desenvolvimento se configura numa considerável colaboração para os avanços das pesquisas nas áreas biológica, biomédica e agrônômica oferecendo uma importante ferramenta que poderá ser utilizada em estudos nessas áreas.

PARTE EXPERIMENTAL

No desenvolvimento da síntese proposta, estudou-se uma adaptação na metodologia de síntese da glicina descrita por Vogel (26) e apresentada na Equação 1.



Nesta, inicialmente dissolvem-se em um balão de capacidade volumétrica de 700 mL, 180 g de carbonato de amônio em 150 mL de água morna (40-50°C). Após atingir a temperatura ambiente, adicionam-se 200 mL de solução concentrada de amônia e, na sequência, introduz-se lentamente uma solução composta de 50 g de ácido cloroacético em 50 mL de água. Em seguida, o balão é fechado e permanece em repouso por 24 – 48 h, à temperatura ambiente. Após esse período de repouso, a solução é concentrada até volume final de 100 mL e, em seguida, inicia-se o processo de purificação, com adição de 400 mL de álcool metílico. O aminoácido é então levado para um refrigerador e mantido à temperatura de 4°C. Após a filtração do aminoácido,

os cristais são suspensos com 150 mL de álcool metílico, filtra-se novamente o aminoácido e em seguida dissolve-se os cristais em 50 mL de água aquecida. Finalmente, a última etapa consiste em precipitar novamente o aminoácido com 200 mL de álcool metílico. A massa de glicina obtida deve ser em torno de 25 g correspondendo a um rendimento da ordem de 60%.

A utilização do carbonato de amônio, no processo de síntese da glicina enriquecida em ^{15}N ocasionou uma diluição isotópica de aproximadamente 50% no aminoácido sintetizado, quando da utilização de amônia aquosa como única fonte enriquecida em ^{15}N (27). Considerando que a diluição era indesejável, estudou-se a possibilidade de produzir o carbonato de amônio marcado com ^{15}N . No entanto, observou-se que o procedimento é moroso e as perdas de N no ambiente durante o processo são altas tornando o método inviável, principalmente ao se trabalhar com o isótopo ^{15}N .

Oliveira *et al.* (27) avaliaram a síntese da glicina a partir do ácido cloroacético e amônia anidra em excesso, excluindo o carbonato de amônio proposto no método descrito por Vogel (26). Nas condições avaliadas foi possível obter rendimento da ordem de 10%, mas, no entanto, as perdas de nitrogênio foram reduzidas em cerca de 11%, bem inferiores quando comparados aquelas obtidas com o emprego de carbonato de amônio, que totalizaram 35%.

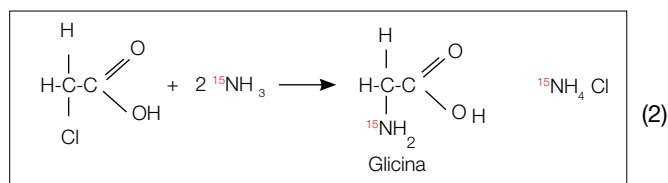
No presente trabalho, procederam-se algumas modificações na metodologia de síntese da glicina sugerida por Oliveira *et al.* (27), objetivando tornar mais seguro o processo de manipulação dos reagentes. Para atender as necessidades do laboratório, foi dimensionada e construída uma linha especial de pressão, composta por um reator de aço inox revestido internamente com teflon, que pode ser visualizado na Figura 1.



Figura 1. Reator de aço inox revestido com teflon utilizado na síntese da glicina

Com o desenvolvimento do sistema, torna-se possível utilização de amônia anidra em substituição à amônia aquosa, em sistema fechado, minimizando possíveis perdas por manipulação no decorrer do processo e, conseqüentemente, uma maior recuperação de ^{15}N , viabilizando o processo do ponto de vista econômico.

A reação entre amônia anidra e ácido cloroacético está representada de acordo com Equação 2.



Inicialmente, foi adicionada, no interior do reator, solução 50% (m/m) de ácido cloroacético, sendo ao final procedido o fechamento do mesmo. Na sequência, a amônia anidra foi introduzida no reator, via válvula inox, iniciando-se o processo de síntese da glicina. O reator foi deixado em repouso por um período de 24h, à temperatura ambiente. Ao final do tempo estabelecido, iniciou-se a purga da amônia em excesso contida na reação por aproximadamente 5h, através de um gás de arraste (N_2). Na sequência, o aminoácido sintetizado, contido na solução, foi cristalizado com adição de metanol, sendo posteriormente resfriado à temperatura de 4°C por 4-6 h, para permitir a completa cristalização. O $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, que constitui a principal impureza no processo de síntese, foi removido repetindo-se por mais duas vezes a cristalização com metanol.

A recuperação do $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ se torna necessária por conter o isótopo ^{15}N , e a do metanol devido a sua toxidez. A recuperação do metanol foi realizada no evaporador rotativo, a baixa pressão, o mesmo utilizado na concentração do aminoácido. A $^{15}\text{NH}_3$ em excesso foi recuperada em um Becker de 1 L contendo uma solução de ácido sulfúrico $2,5 \text{ mol L}^{-1}$, recuperado o N-NH_3 na forma de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Os testes foram realizados em triplicatas, em escala reduzida em relação às condições inicialmente previstas.

As determinações do teor de N (%) e isotópica (% em átomos de ^{15}N), tanto nas amostras com abundância isotópica natural e enriquecida foram realizadas por espectrometria de massas (28). Na avaliação do processo proposto utilizou-se de duas amostras de glicina com abundância isotópica de 6,7 e 0,9% átomos de ^{15}N . As determinações da concentração de amônia presente no início da reação, no final (excesso) e a pureza do aminoácido obtido foram realizados fazendo-se uso da destilação por arraste a vapor. A estrutura da molécula foi determinada por espectrofotômetro infravermelho com transformada de Forrier (FTIR).

Além do emprego da glicina- ^{15}N na síntese do herbicida glifosato- ^{15}N , pode-se, ainda, destacar a possibilidade da utilização, da mesma, na avaliação do metabolismo aminoácido e proteico em organismos biológicos (29-31). Para tanto, foi realizada a quantificação da carga microbiana nas amostras sintetizadas no presente trabalho a partir do método proposto.

A VIDA É REPLETA DE EXPERIÊNCIAS INIGUALÁVEIS E A TEDIA BRAZIL FAZ QUESTÃO DE SER UMA DELAS

Imagine uma empresa que não se contenta em fornecer milhares de produtos para todo tipo de análise. Que acha pouco ser a única empresa de distribuição comercial do país a ter quatro Certificações internacionais, além de uma Logística top de linha. Que quer, acima de tudo, tornar o cotidiano do seu cliente emocionante como o nascimento de um filho.

Imaginou? A **Tedia Brazil** também, e se reinventou para virar esta empresa. Mudamos nossos serviços, nossos processos, nosso modo de trabalhar. Focamos em entender as necessidades do cliente, entregando uma qualidade de relacionamento única.

Agora, temos a Missão de **completar nossos parceiros** e a Visão de **oferecer uma experiência de atendimento inigualável**. E personificamos estas diretrizes em uma nova logo, que representa toda a nossa evolução.

Venha conhecer a nova Tedia Brazil.



CROMATOGRAFIA



PADRÕES ANALÍTICOS



VIALS & CAPS



FILTRAÇÃO & SEPARAÇÃO



RMN



REAGENTES & SOLVENTES



LIQUID HANDLING



EQUIPAMENTOS



VIDRARIAS



TediaBrasil

Viva essa experiência

0800 70 200 20 • www.tediabrazil.com.br • tediabrazil@tediabrazil.com.br

A determinação da carga microbiana, nas amostras de glicina, foi efetuada seguindo o protocolo analítico recomendado na Farmacopeia Brasileira (32). Foram utilizadas para análises seis amostras de glicina, sintetizada, contendo, em cada uma delas, 1 g do aminoácido, divididas em 2 grupos, classificados de acordo com o armazenamento (3 amostras armazenadas em frascos âmbar de 60 ml irradiados e 3 amostras armazenadas em frascos âmbar sem uso da irradiação), além de duas amostras controle (padrões).

A irradiação dos frascos foi realizada por um período de 24 h com dose de 10 KGy/h utilizando-se fonte de ^{60}Co em irradiador tipo Gammacell-220 fabricado por MDS Nordion 1999, 97,61 TBq (2638 ci) e taxa de dose 0,477 KGy/h. O irradiador tipo Gamma Cell possibilita irradiações de amostras com volume máximo de 1L e é utilizado para estudos de coloração de gemas, mutações genéticas, esterilização de materiais, entre outros. Os frascos foram nomeados como G1, G2 e G3 (sem irradiação) e G4, G5 e G6 irradiados.

Para as análises microbiológicas foram utilizados três meios de cultura (Tabela 1). As amostras de glicina foram diluídas em 9 ml de solução NaCl 0,85%. Na sequência 100 μL de cada diluição foram distribuídos, em triplicata, uniformemente em placas de petri contendo os respectivos meio de cultura, conforme demonstrado na Tabela 1, um controle negativo também foi realizado no qual 100 μL da solução salina foi plaqueada nos respectivos meios. Após o plaqueamento, as placas foram incubadas durante 72 h em estufa tipo BOD, a 28°C sem iluminação. Finalmente, após 72 h foi feita a contagem de unidades formadoras de colônias.

Tabela 1. Condições experimentais observadas no plaqueamento das amostras de glicina

Micro-organismo	Temperatura / Período de incubação	Meio de cultura
Bactérias	28° C – 72 h	Ágar -peptona 5 %, extrato de carne 3 % e Agar 15%
Fungos	28° C – 72 h	BDA- batata, dextrose e Agar - Oxoid Brasil Ltda
actinomicetos	28° C – 72 h	Difco

A determinação de metais na glicina sintetizada foi realizada com o objetivo de avaliar possíveis contaminações (Cr, Fe, Ni, Zn, Cu e Fe) na etapa de síntese, proveniente do contato dos reagentes com partes metálicas do reator de síntese, ou do próprio reagente. O reator, no presente trabalho, foi uma alternativa em relação ao procedimento desenvolvido anteriormente (27), objetivando aumentar o rendimento e principalmente reduzir perdas de ^{15}N . Essa avaliação torna-se importante notadamente no emprego do aminoácido em ciências médicas, bem como na produção do herbicida glifosato isento dos elementos supracitados.

A utilização de técnicas para determinação multielementar tem se desenvolvido muito nos últimos anos devido ao aumento do número de análises químicas para uma grande variedade

de matrizes. Em função disto, a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) mostra-se uma técnica versátil e que permite a quantificação, em níveis de traço e ultra- traço, da maioria dos elementos da Tabela periódica³³. As referidas análises de teor (mg/kg) dos elementos (B, Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, BA, Pb), nas amostras sintetizadas de glicina, foram realizadas conforme o método 6002 A (manual SWC – 846 da USEPA) em ICP-MS, marca Agilent, modelo 750 Ce, com sistema de reação octopolo nebulizador concêntrico, com vazão de 1 mL min⁻¹. As condições operacionais do ICP-MS foram: 1500 Watts de potência de plasma; 1,73 V de potência de RF; vazão de 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese da glicina utilizando amônia aquosa 25% (m/v) permitiu obter uma massa de 2,7±0,3 g do aminoácido, representando um acréscimo de 42% quando comparado ao rendimento obtido por Tavares (27). No entanto, o rendimento continua sendo inferior ao citado pela literatura em virtude da modificação da metodologia, que se fez necessária com a retirada do carbonato de amônio da reação.

Os resultados do balanço nitrogenado (recuperação do N-NH₃ no processo), obtidos a partir da destilação por arraste a vapor e a produção do aminoácido glicina (gravimetria) em função do volume de NH_{3(aq)} concentrada, estão apresentados na Tabela 2. Os valores do nitrogênio (g) em excesso foram obtidos após o período de reação, em sistema por arraste a vapor, e corresponde ao nitrogênio que permaneceu no sistema (solução) ao final do processo na forma de NH_{3(aq)}. As perdas verificadas foram principalmente na forma gasosa (NH₃) devido à manipulação.

Com as adaptações realizadas na linha, para viabilizar a utilização de amônia anidra no sistema ao invés de amônia aquosa, foi possível obter uma recuperação de ^{15}N ($^{15}\text{NH}_3$ em excesso e ^{15}N -glicina) superior a 97%, quando utilizou-se para síntese 12,5 g de ácido cloroacético e aproximadamente 10 g de amônia anidra. Os testes foram realizados variando-se a quantidade em massa dos reagentes (ácido cloroacético e amônia anidra) visando obter as melhores condições de síntese. Os dados estão apresentados na Tabela 2.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que a porcentagem de amônia, em excesso, recuperada no sistema com emprego do reator, foi superior quando comparado ao processo anteriormente utilizado (27). Ainda levando-se em consideração os dados apresentados na Tabela 2 pode-se observar que as melhores condições na síntese de glicina foi obtida com a redução na massa inicial de ácido cloroacético (T2), obtendo-se neste ensaio uma massa da ordem de 2,32 g do aminoácido, correspondendo a um rendimento da ordem de 23,4%. Nas mesmas condições pode-se observar a recuperação de 97,6% (8,0 g) do nitrogênio ($^{15}\text{NH}_3$) inicialmente utilizado. Desse total, 7,6 g e 0,4 g foram recuperados do N não incorporado à glicina (excesso) e N-glicina, respectivamente.

Tabela 2. Recuperação do nitrogênio em excesso na reação e produção de glicina (n=3)

Teste	Massa (g) Ác. cloroacético	N-amônia anidra (1)	N-Amônia anidra (2)	N – recuperado % (3)	Produção de glicina (g) (4)	Pureza %
T1	25	20,6	16,9	82,0	2,66 ± 0,33	98
T2	5	9,3	9,1	97,8	1,17 ± 0,07	96
T3	8	8,2	7,5	91,4	1,58 ± 0,03	99
T4	10	4,8	4,5	93,7	0,93 ± 0,02	99
T5	12,5	8,2	8,0	97,6	2,32 ± 0,26	99

T1, T2,T3,T4,T5: reação nas condições proposta no presente trabalho; (1) Massa (g) inicial de N na forma de amônia anidra (N-NH₃); (2) Massa (g) recuperada de N-NH₃ no final do processo e N-Glicina; (3) Nitrogênio Total recuperado no processo; (4) Massa (g) de glicina obtida no final do processo; (5) Rendimento conversão N-NH₃ à N-glicina de acordo com a estequiometria da reação (2)

A determinação do teor de N (%) nas amostras com abundância isotópica natural foi realizada por espectrometria de massas ANCA-SL (*Autometic Nitrogen Carbon Analyser Solid and Liquid*) da PDZ Europa. Os resultados médios (mg L⁻¹ de N) para todas as amostras de glicina sintetizadas (soluções preparadas a partir do aminoácido produzido) bem como o padrão Sigma foram de 0,96 ± 0,02%. Estes dados evidenciam que o teor de N nas amostras foi compatível ao do padrão p.a Sigma (0,98%) e a pureza do aminoácido é da mesma ordem de grandeza do padrão empregado.

A estrutura molecular do aminoácido foi confirmada utilizando-se da espectroscopia infravermelho com transformada de Forrier (FTIR) e pode ser observado na Figura 2. Os resultados são semelhantes entre a amostra sintetizada e o padrão sigma. Ainda que seja desnecessária a identificação de cada um dos picos observados na figura, nota-se que os espectros praticamente se sobrepõem.

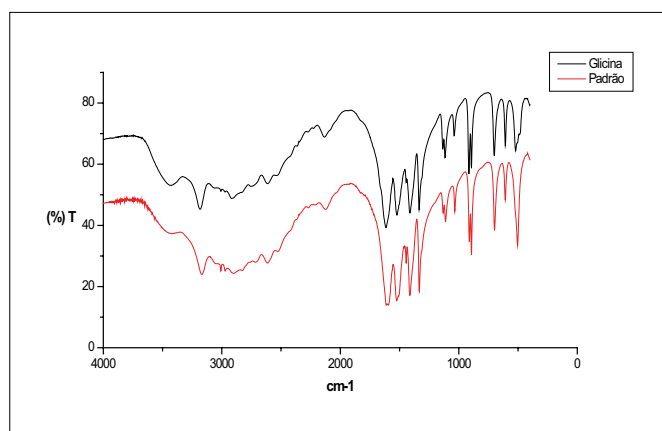


Figura 2. Amostra de glicina sintetizada sobreposta ao padrão sigma

As análises microbiológicas (placas de petri) demonstraram que as amostras sintetizadas não sofreram contaminação por micro-organismos durante o processo de síntese e armazenamento, sendo indiferente para os frascos irradiados e para os que não foram irradiados. Os resultados podem ser visualizados na Tabela 3.

Tabela 3. Contagem de microrganismos viáveis, fungos, leveduras e bactérias nas amostras de glicina sintetizadas

Amostra	Análise		Tipo de recipiente (armazenagem)
	Bactérias	Fungos e leveduras	
G1	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Frasco Âmbar
G2	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Frasco Âmbar
G3	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Frasco Âmbar
G4	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Frasco Âmbar irradiado
G5	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Frasco Âmbar Irrradiado
G6	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Frasco Âmbar Irrradiado
Padrão	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Frascos Âmbar
Padrão	< 10 UFC/g	< 10 UFC/g	Frascos Âmbar Irrradiados

G1, G2 e G3 referem-se a amostras armazenadas em frascos âmbar não irradiado; G4, G5 e G6 referem-se a amostras armazenadas em frascos âmbar irradiados.

De acordo com a farmacopeia (32), o limite para fungos e leveduras é ≤ 100 UFC/ml e ≤ 10³ UFC/ml para bactérias. De acordo com a Tabela 3 verifica-se que não houve contaminação, corroborando assim o uso da glicina na forma oral para estudos relacionados ao metabolismo proteico em seres humanos.

Outro aspecto importante investigado foi a determinação de metais empregando a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICPMS), que permitiu avaliar a presença dos elementos Cr, B, Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Ba e Pb nas amostras sintetizadas. A precisão e a exatidão do método analítico empregado foram verificadas utilizando um material de referência (NIST 1515). Os resultados obtidos referentes aos elementos analisados concordam com os valores de referência apresentando taxa de recuperação na faixa de 93 a 105% e desvio padrão relativo, em geral, menores que 8%. Embora os dados referente a concentrações (mg kg⁻¹), apresentados na Tabela 4, de metais, sejam superiores quando comparadas ao padrão de glicina (comercial), esses não são preocupantes, uma vez que para estudos na área biomédica são admitidos, via oral,

em torno de 250 mg de aminoácido. Ainda, deve-se salientar que o aminoácido não é utilizado diariamente, descartando a preocupação de levar a acumulação desses elementos no organismo em estudo. Nessas condições a quantidade dos elementos (mg kg^{-1} massa corpórea) são muito inferiores ao limite máximo permitido pela legislação pertinente (34). A presença desses elementos nas amostras sintetizadas podem ser explicados por vários fatores, entre os quais pode-se mencionar: contaminação durante o procedimento analítico; corrosão proporcionada pela amônia anidra no reator de aço inox (liga de Fe, Cr, Ni, Mn, Cu); processo de secagem do aminoácido em recipiente de vidro borossilicato, que contém SiO_2 , B_2O_3 , Na_2O , Al_2O_3 ; e provenientes dos reagentes. Como prevenção, visando garantir a qualidade do produto final, deverá ser realizada uma impermeabilização no revestimento interno do reator (tubulação, parafusos e demais acessórios em aço inox – Figura 1) e maiores cuidados na manipulação do aminoácido sintetizado.

Tabela 4. Determinação do teor (mg kg^{-1}) de metais por ICP-MS nas amostras de glicina sintetizadas.

Elementos	Glicina (p.a)	Glicina (sintetizada)
	(mg/kg)	
B	0,0	$2,60 \pm 0,09$
Na	$1,33 \pm 0,45$	$13,7 \pm 1,73$
Mg	$1,39 \pm 0,12$	$4,72 \pm 0,30$
Al	$0,35 \pm 0,50$	$14,03 \pm 0,86$
P	0	0
S	0	0
K	0	0
Ca	$4,31 \pm 1,17$	$34,9 \pm 10,45$
Cr	0	$25,1 \pm 0,20$
Mn	$0,006 \pm 0,01$	$0,64 \pm 0,06$
Fe	0	$25,50 \pm 1,10$
Ni	0	$0,57 \pm 0,04$
Cu	0	$1,82 \pm 2,82$
Zn	$0,07 \pm 0,04$	$2,76 \pm 0,46$
Ba	$0,01 \pm 0$	$4,17 \pm 0,10$
Pb	0	$0,05 \pm 0,01$

CONCLUSÕES

A linha de síntese da glicina proposta foi totalmente concluída. O sistema é de fácil operacionalidade e será empregado em rotina devido aos excelentes resultados alcançado, principalmente em relação a massa obtida de aminoácido, recuperação do ^{15}N e pureza final do produto. Esse resultado vem ao encontro à limitação na capacidade de produção de compostos marcados no Brasil, incluindo a glicina, também porque há uma série de outras moléculas de interesse sendo produzida em rotina no país.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Ampara à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelos auxílios financeiro.

REFERÊNCIAS

LIDE, D. R. *Handbook of Chemistry and Physics*, CRC Press: Boca Raton, 1997.

KROHN, K. A.; MATHIS, C. A.; In: ROOT, J. W.; KROHN, K. A. (eds). *Short-lived isotopes in chemistry and biology*, ACS: Washington, 1981.

COOPER, A. J. L.; GELBARRD, A. S.; REED, B. R.; *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 1985, 57, 251.

HAUCK, R. D.; BREMNER, J. M.; *Adv. Agron.* 1976, 28, 219.

KNOWLES, R.; BLACKBURN, T. H.; *Nitrogen Isotope Techniques*. Academic Press: São Diego, 1993.

TRIVELIN, P. C. O.; SALATI, E.; MATSUI, E; *Energia Nuclear e Agricultura*, 1979, 2, 59.

ERIKSEN, J.; *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 1996, 27, 1251.

MÁXIMO, E.; BENDASSOLLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O.; Enrichment of ^{15}N by coupling three systems of ion-exchange chromatography columns, 3th. *International conference on isotope: Vancouver*, 2000.

TRIVELIN, P. C. O.; BENDASSOLLI, J. A.; MURAOKA, T.; CARNEIRO Jr., F.; *Sci. Agr.* 2002, 59, 205.

BENDASSOLLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O.; CARNEIRO Jr., F. C.; *J. Braz. Chem. Soc.* 1997, 8, 13.

SHOENHEIMER, R.; RITTEMBERG, D.; KESTON, A. S. *J. Am. Chem. Soc.* 1937, 59, 1768.

VICKERY, H. B.; PUCHER, G. W.; SHOENHEIMER, R.; RITTEMBERG, D. *J. Biol. Chem.* 1940, 135, 531.

BENDASSOLLI, J. A.; MORTATTI, J.; TRIVELIN, P. C. O.; VICTORIA, R. L. *Energ. Nucl. Agric.* 1988, 9, 66.

BENDASSOLLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O.; IGNOTO, R. F. *Scientia Agricola*, 2002, 59, 595.

SANT ANA FILHO, C. R.; BENDASSOLLI, J. A.; ROSSETE, A. L. R. M.; PIEDADE, S. M. S.; PRESTES, C. V.; *Braz. J. Chem. e Engineer.* 2008, 25, 743.

BENDASSOLLI, J. A. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 1988.

BENDASSOLLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O.; MORTATTI, J. *Energ. Nucl. Agric.* 1989, 10, 55.

CAMPBELL, M. K.; *Bioquímica. Parte 2: Aminoácidos e Peptídeos*. Artes Médicas Sul: Porto Alegre, 2000.

STACK, T.; REEDES, P. J.; PRESTON, T.; HAY, S.; LOYD, D. J.; AGETT, P. J.; *Pediatr. Res* 1989, 25, 167.

DICHI, I.; PAPINI-BERTO, S. J. P.; ANGELILI, A. Y. D.; BICUDO, M. H.; REZENDE, T. A.; BURINI, R. C.; *Nutrition* 1996, 12, 519.

REFERÊNCIAS

MARCHINI, S. J.; CORTIELLA, T.; HIRAMATSU, T.; CHAPMAN, E.; YOUNG, V. R. *Am. J. Clin. Nutr.* 1993, 58, 670.

SCHELP, A. O.; TEIXEIRA, U. A.; TSUJI, H. *The FASEB J.* 1995, 9, 2757.

KLEIN, P. S.; KLEIN, E. R. *IAEA Bulletin.* 1987, 29, 41.

TAVARES, C. R. O.; BENDASSOLLI, J. A.; RIBEIRO, D. N.; ROSSETE, A. L. R. M.; PRESTES, C. V.; TAVARES, G. A. *Sci. Agric.* 2010, 67, 96.

MORRINSON, R. T.; BOYD, R. N. *Química orgânica*, Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 1973.

VOGEL, A. I.; *Química orgânica*, Ao livro técnico: Rio de Janeiro, 1980.

TAVARES, C. R. O.; BENDASSOLLI, J. A.; COELHO, F.; SANT'ANA FILHO, C. R.; PRESTES, C. V. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 2006, 78, 441.

BARRIE, A.; PROSSER, S. J.; In: BOUTTON, T. W.; Yamasaki, S. (Eds.); *Mass Spectrometry of Soils*, 1996.

WATERLOW, J. C.; GOLDEN, M. H. N.; GARLICK, P. J.; *Amer. J. Physiol.* 1978, 235, E165.

MARCHINI, J. S.; LAMBERTINI, C. R.; FERRIOLHI, E.; DUTRA-OLIVEIRA, J. E.; *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2001, 34, 1277.

JACKSON A. A.; DUGGLEBY, S. L.; GROVE, G.; *J. Clin. Nutr.* 2000, 54, 329.

Farmacopéia Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1998.

JARVIS, K. M.; GRAY, A. L.; HOUCK, R. S. *Handbook of inductively coupled plasma mass spectrometry*, Blakie: Glasgow, 1992.

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

Borosilicato 3.3

Vidraria para laboratório com a qualidade que você precisava e com o melhor custo benefício do mercado.

Itens confeccionados em vidro borosilicato 3.3, conferindo em alto grau de transparência e resistência aos materiais, que, ainda são selecionados pelo controle de qualidade EasyPath, garantindo a melhor qualidade e maior confiabilidade para você.



*Condições especiais para revendedores. Consulte-nos!

(Erviégas)

Erviégas Ltda | T (11) 5034.2227 | F (11) 5034.2228 | comercial@erviégas.com.br | São Paulo | Brasil
Copyright - Direitos reservados. Proibida a reprodução do conteúdo deste encarte em qualquer meio de comunicação, sem autorização prévia e por escrito. Fotos ilustrativas. Verifique informações de cada produto. Erviégas e EasyPath são marcas registradas.

EasyPath

Vidraria Boro 3.3