**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
**CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

**AMANDA VIDAL SOARES**

# Separação de $^{13}C$ por cromatografia de troca iônica em sistema cascata e produção de $^{13}CO$

**Piracicaba**
**2019**

**AMANDA VIDAL SOARES**

# Separação de $^{13}C$ por cromatografia de troca iônica em sistema cascata e produção de $^{13}CO$

**Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011**

**Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Química na Agricultura e Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. José Albertino Bendassolli**

**Piracicaba**
**2019**

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**

Soares, Amanda Vidal
Separação de $^{13}C$ por cromatografia de troca iônica em sistema cascata e produção de $^{13}CO$ / Amanda Vidal Soares; orientador José Albertino Bendassolli. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2019.
92 p. : il.

Dissertação (Mestrado – 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. Aminoácidos 2. Dióxido de carbono 3. Enriquecimento isotópico 4. Gastroparesia 5. *Helicobacter pylori* 6. Isótopos estáveis 7. Marcadores isotópicos 8. Método de separação 9. Resinas 10. Ureia I. Título

CDU 544.582.2 : 546.26

**Elaborada por:**
Marilia Ribeiro Garcia Henyei
CRB-8/3631
Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Albertino Bendassolli pela orientação, apoio e confiança ao longo desses anos.

A toda equipe de funcionários do Laboratório de Isótopos Estáveis, em especial ao Clelber Vieira Prestes (VP) por todo auxílio e amizade desde a época da iniciação científica até o Mestrado.

Aos estagiários do Laboratório de Isótopos Estáveis, em especial a Mayara que esteve sempre à disposição.

A toda equipe da Secretaria da Seção de Pós-Graduação.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, pela infraestrutura oferecida para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo (Processo nº 132097/2017-6).

Aos meus pais e irmã por sempre me apoiarem nos momentos de dificuldade.

À Letícia, amiga e colega de pós-graduação que está comigo desde a graduação, por todo auxílio, apoio e pela grande amizade.

Ao meu namorado por sempre me incentivar e estar sempre ao meu lado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente com a realização desse trabalho.

## RESUMO

SOARES, A. V. **Separação de $^{13}C$ por cromatografia de troca iônica em sistema cascata e produção de $^{13}CO$**. 2019. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

Atualmente as técnicas empregando traçadores isotópicos tem se mostrado ferramentas muito úteis. O isótopo $^{13}C$ possui aplicações em diferentes áreas, com destaque para área agronômica, nutrição animal, ambiental e área médica. Os avanços metodológicos das análises isotópicas e otimização dos espectrômetros de massas, possibilitaram a expansão do emprego do $^{13}C$, todavia para a obtenção dos compostos enriquecidos isotopicamente, é necessária importação, tornando sua aquisição dispendiosa. Visando a produção de compostos marcados em $^{13}C$ no país, o objetivo principal do trabalho é promover a separação dos isótopos estáveis de C ($^{12}C$ e $^{13}C$), empregando o método cromatográfico de troca iônica em sistema cascata e produzir o $^{13}CO$. Dois sistemas individuais de colunas denominados S1 e S2 foram utilizados, sendo o sistema S1 composto por seis colunas de acrílico com 180 cm de comprimento e 7 cm de diâmetro interno e o sistema S2 composto por seis colunas de acrílico com 180 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro interno, ambos sistemas preenchidos com resina aniônica Dowex 1X8 (100-200 “mesh”). Inicialmente com a resina a forma $R\text{-}OH^-$, formou-se uma banda de $HCO_3^-$, que foi eluída com solução de HCl. Após a banda percorrer determinadas distâncias, eram feitas análises para avaliar a abundância isotópica de $^{13}C$. Os sistemas de enriquecimento foram avaliados individualmente e também após o acoplamento, com a transferência de massa de $^{13}C$ de S1 para S2. Além do enriquecimento de $^{13}C$, os seguintes parâmetros foram estudados: regeneração da resina aniônica (forma $R\text{-}Cl^-$ para $R\text{-}OH^-$); determinação da altura equivalente de placas teóricas; fator de fracionamento; obtenção de $^{13}CO_2$ e $^{13}CO$. No sistema individual S1, o enriquecimento máximo foi de 7,69% em átomos de $^{13}C$, enquanto que no sistema S2 o enriquecimento foi de 7,20% em átomos de $^{13}C$. Após o processo de interação entre os sistemas, obteve-se massa acumulada de 0,79g de $^{13}C$ e 167,47g de $H_2{}^{13}CO_3$ no sistema S2. O volume necessário de regenerante foi de 90 e 40 litros para S1 e S2 respectivamente. A altura de placa teórica foi de 0,25 cm e o fator de fracionamento foi 1,0048. A conversão de $NaH^{13}CO_3$ para $^{13}CO_2$ teve um rendimento de 98,70%. A metodologia proposta para a obtenção de $^{13}CO$ não apresentou resultados satisfatórios, sendo sugerido o estudo de novas metodologias de obtenção de $^{13}CO$ em trabalhos futuros.



Palavras-chave: Carbono 13. Isótopos estáveis. Separação isotópica. Cromatografia iônica. Traçador isotópico.

## ABSTRACT

SOARES, A. V. **Separation of $^{13}C$ by ion exchange chromatography in a cascade system and production of $^{13}CO$.** 2019. 92 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

Currently techniques employing isotopic tracers have proved to be very useful tools. The isotope $^{13}C$ has applications in different areas, with emphasis on agronomic area, animal nutrition, environmental and medical area. The methodological advances of the isotopic analysis and optimization of the mass spectrometers, made possible the expansion of the use of $^{13}C$. Nevertheless, to obtain isotopically enriched compounds, import is necessary, making its acquisition costly. Aiming at the production of $^{13}C$-labeled compounds in the country, the main objective of the work is to promote the separation of the stable isotopes of C ($^{12}C$ and $^{13}C$), using the ion exchange chromatographic method in a cascade system and produce $^{13}CO$. Two individual column systems named S1 and S2 were used, the S1 system consisting of six acrylic columns 180 cm length and 7 cm internal diameter, and the S2 system consisting of six acrylic columns 180 cm length and 5 cm internal diameter, both systems filled with Dowex 1X8 anionic resin (100-200 mesh). Initially with the resin the R-OH- form, an $HCO_3^-$ band was formed, which was eluted with HCl solution. After the band traveled over certain distances, analyzes were performed to evaluate the isotopic abundance of $^{13}C$. The enrichment systems were evaluated individually and also after the coupling, with the mass transfer of $^{13}C$ from the S1 to S2 system. In addition to the enrichment of $^{13}C$, the following parameters were studied: regeneration of the anionic resin ($R\text{-}Cl^-$ form to $R\text{-}OH^-$); determination of the height equivalent of theoretical plates; fractionation factor; obtaining $^{13}CO_2$ and $^{13}CO$. In the individual system S1 the maximum enrichment was 7.69% in $^{13}C$ atoms, while in S2 the enrichment was 7.20% in $^{13}C$ atoms. After the interaction between the systems, an accumulated mass of 0.79 g of $^{13}C$ and 167,47g of $H_2{}^{13}CO_3$ was obtained in the S2 system. The required volume of regenerant was 90 and 40 liters for S1 and S2 respectively. The height equivalent of theoretical plate was 0.25 cm and the fractionation factor was 1.0048. Conversion of $NaH_3{}^{13}CO_3$ to $^{13}CO_2$ had a yield of 98.70%. The proposed methodology to obtain $^{13}CO$ did not present satisfactory results, and it was suggested the study of new methodologies to obtain $^{13}CO$ in future works.



Keywords: Carbon 13. Stable isotopes. Isotopic separation. Ion chromatography. Isotopic tracer.

**SUMÁRIO**

1. INTRODUÇÃO ..... 11
2. REVISÃO DE LITERATURA ..... 15
2.1 O carbono na natureza ..... 15
2.2 Área médica ..... 16
2.3 Área animal ..... 20
2.4 Métodos de separação dos isótopos de C ..... 22
3. MATERIAL E MÉTODOS ..... 26
3.1 Material ..... 26
3.1.1 Sistemas de colunas de resina ..... 26
3.1.2 Resinas ..... 27
3.1.3 Reagentes ..... 27
3.1.4 Vidrarias e outros materiais de laboratório ..... 27
3.1.5 Equipamentos ..... 27
3.2 Métodos ..... 28
3.2.1 Separação dos isótopos estáveis de C ($^{13}C$ e $^{12}C$) por cromatografia de troca iônica ..... 28
3.2.1.1 Detalhamento e montagem do sistema de troca iônica ..... 28
3.2.1.2 Preparo da resina aniônica Dowex 1X8 ..... 35
3.2.1.3 Formação e deslocamento da banda cromatográfica (DBC) de $H^{13}CO_3^-$ ..... 35
3.2.2 Interação entre os Sistemas S1 e S2 ..... 39
3.2.3 Determinação da Massa Acumulada de $^{13}C$ ..... 41
3.2.4 Preparo das amostras para determinação da abundância isotópica de $^{13}C$ no ANCA-GSL ..... 42
3.2.5 Fator de Fracionamento da separação dos isótopos de C ..... 45
3.2.6 Determinação da altura equivalente de uma placa teórica ..... 47
3.2.7 Regeneração dos sítios ativos da resina ..... 48
3.2.7.1 Eliminação do HCl do volume intersticial ..... 49
3.2.7.2 Descompactação da resina ..... 49
3.2.7.3 Regeneração da resina com NaOH ..... 50
3.2.7.4 Eliminação do NaOH do volume intersticial da resina ..... 50
3.2.8 Obtenção do $^{13}CO_2$ ..... 51
3.2.9 Obtenção do $^{13}CO$ a partir do $^{13}CO_2$ ..... 52

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 53
4.1 Regeneração das colunas de resina aniônica Dowex 1X8 ..... 53
4.1.1 Eliminação do HCl do volume intersticial da resina ..... 53
4.1.2 Descompactação das resinas ..... 54
4.1.3 Regeneração dos sítios ativos da resina ..... 55
4.1.4 Eliminação do NaOH do volume intersticial da resina ..... 58
4.2 Formação da banda cromatográfica de $H^{13}CO_3^-$ ..... 60
4.3 Enriquecimento isotópico de $^{13}C$ nos sistemas individuais de colunas ..... 62
4.4 Acoplamento dos sistemas S1 e S2 ..... 73
4.5 Fator de fracionamento isotópico (α) ..... 79
4.6 Altura equivalente de uma placa teórica ..... 80
4.7 Obtenção do $^{13}CO_2$ ..... 81
4.8 Obtenção do $^{13}CO$ a partir do $^{13}CO_2$ ..... 82
5. CONCLUSÃO ..... 83
REFERÊNCIAS ..... 84

## 1. INTRODUÇÃO

O carbono é representado pelo símbolo C, suas formas alotrópicas encontradas na natureza são o grafite, diamante e buckminsterfulereno, ambos compostos exclusivamente por C, todavia apresentam diferentes arranjos estruturais e consequentemente propriedades físico-químicas distintas. O C é tetravalente, por esta razão participa de uma infinidade de reações químicas, sendo encontrado em compostos inorgânicos como minerais e em compostos orgânicos como os hidrocarbonetos por exemplo. Muito importante para a indústria, o petróleo é uma mistura constituída basicamente por hidrocarbonetos e outros elementos em menor quantidade, atuando como fonte de matéria prima da produção de combustíveis e plásticos, mas muito, além disso, o C participa como precursor de componentes fundamentais para a vida (CAREY, 2011; SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

A matéria é composta de átomos dos elementos químicos, e estes podem estar arranjados de diferentes maneiras e proporções, constituindo os compostos. No centro do átomo localiza-se o núcleo contendo carga positiva e na eletrosfera giram os elétrons ($e^-$). O próton ($p^+$) é a partícula constituinte do núcleo de todos os átomos, com carga positiva e massa cerca de 1850 vezes à do elétron, sendo o número de elétrons igual de prótons, proporcionando o equilíbrio de carga. O núcleo é constituído ainda de partículas denominadas de nêutrons (n) e com massa de 1,001 vezes maior que a do $p^+$. A massa atômica é definida, praticamente, pelo número de $p^+$ e nêutrons (n). As propriedades químicas do átomo são definidas pelo número e distribuição dos elétrons nos orbitais atômicos, e o número de $p^+$ é característico de cada elemento químico, embora átomos do mesmo elemento não obrigatoriamente devam ter o mesmo número de nêutrons no núcleo. Assim átomos que possuem o mesmo número de $p^+$ e diferentes nêutrons são chamados de isótopos do elemento.

Os isótopos podem ser estáveis (exemplo para o elemento carbono que possui 6 $p^+$ no núcleo: $^{12}C$ e $^{13}C$) e como tais não emitem partículas ($\alpha$ e $\beta^-$) e nem ondas eletromagnéticas ($\gamma$). Estes isótopos de carbono ocorrem na natureza em proporções quase constantes, $^{12}C$ com 98,98% em átomos e 1,11% em átomos de $^{13}C$ (KENNEDY; KROUSE, 1990) que é variável de acordo com o ciclo fotossintético das plantas C3 e ciclo C4, onde a primeira molécula orgânica formada é o ácido carboxílico com três e quatro carbonos, respectivamente.

Os isótopos estáveis dos bioelementos como hidrogênio, oxigênio, enxofre, nitrogênio e carbono que ocorrem naturalmente, cada um destes elementos apresenta um isótopo leve, mais abundante ($^{1}H$, $^{16}O$, $^{14}N$, $^{32}S$ e $^{13}C$), e um ou mais isótopos pesados, e menos abundantes ($^{2}H$, $^{17}O$, $^{18}O$, $^{15}N$, $^{33}S$, $^{34}S$, $^{36}S$, $^{13}C$) (KELLY, 2003).

Na natureza também podem ocorrer os radioisótopos, em quantidades muito pequenas, como é o caso do $^{40}K$ (0,01% de ocorrência), que existem por possuir meia vida muito longa (T½ = $1{,}3.10^{9}$ anos) ou por serem produtos de cadeia radioativas naturais, com meia vida de média a curta duração. Especificamente com relação ao carbono, pode-se destacar o radioisótopo $^{14}C$, produzidos na atmosfera por ação dos raios cósmicos ($^{14}_{7}N + ^{1}_{0}n = ^{14}_{6}C + ^{1}_{1}p$), com meia vida de 5730 anos.

Na Tabela 1 pode-se observar algumas características de dez isótopos do elemento carbono, dos quais oito radioativos e dois estáveis ($^{12}C$ e $^{13}C$). Os isótopos de carbono ocorrem na natureza em frações quase constantes, mas por processos físicos, químicos e biológicos apresenta pequenas variações isotópicas e o isótopo $^{13}C$ (mais raro), com menor % de ocorrência é chamado de isótopo pesado do elemento.

O isótopo $^{13}C$ pode ser usado em pesquisas, tanto com o uso de compostos contendo o elemento $^{13}C$ com proporção diferente da ocorrência natural (moléculas enriquecidas em $^{13}C$), como por meio de medias das variações na abundância isotópica natural. Estudos envolvendo a variação natural do $^{13}C$ são empregados no campo de reconstituição paleoambiental com a finalidade de avaliar o clima e vegetação, em conjunto com analises de $^{14}C$ (BUSO JUNIOR et al., 2019). Além da variação natural é possível empregar os compostos enriquecidos isotopicamente que se baseiam na variação da razão $^{13}C/^{12}C$, a principal vantagem que justifica seu uso é a estabilidade do isótopo.

Há uma grande preocupação com o uso dos radioisótopos devido aos seus possíveis problemas causados a saúde e a crescente conscientização ambiental, relacionada com a geração de resíduos radioativos. A princípio tinha-se o domínio das técnicas de aplicação e métodos analíticos para detecção de radioisótopos, o melhoramento das análises de espectrometria e tecnologias de produção de compostos enriquecidos proporcionou o maior emprego de isótopos estáveis, resultando em uma redução na aplicação de radioisótopos.

O aprimoramento da tecnologia isotópica possibilitou o crescimento da aplicação do $^{13}C$, sendo amplamente utilizado em diferentes áreas da ciência, com destaque para a área animal como, por exemplo, na avaliação do metabolismo de aminoácidos (STRADIOTTI et al., 2016) ou mesmo no diagnóstico de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) em gatos e cachorros (NEIGER; SIMPSON, 2000), já na área biomédica também se aplica no diagnóstico de *H. pylori* (COELHO et al., 2018), testes de função hepática (AFOLABI et al., 2012) e outras doenças, bem como em testes de fármacos.

Tabela 1 - Isótopos estáveis e radioativos do carbono

| **Isótopos** | **Abundância isotópica natural** | **Tipo de desintegração** | **Tempo de meia vida** |
|---|---|---|---|
| **$^{9}C$** | - | β+ | 0,1265 s |
| **$^{10}C$** | - | β+ | 19,290 s |
| **$^{11}C$** | - | β+ | 20,364 min |
| **$^{12}C$** | 98,93% | | Infinita |
| **$^{13}C$** | 1,07% | | Infinita |
| **$^{14}C$** | | β- | 5700 anos |
| **$^{15}C$** | - | β- | 2.449 s |
| **$^{16}C$** | - | β- | 0,747 s |
| **$^{17}C$** | - | β- | 0,193 s |
| **$^{18}C$** | - | β- | 0,092 s |

Fonte: Adaptado de Live Chart of Nuclides (IAEA, 2019)

A substituição do emprego dos radioisótopos de C ($^{14}C$) é realizada, com sucesso, com o uso de moléculas enriquecidas (marcadas) no isótopo estável $^{13}C$. Desta forma é possível o uso dos isótopos estáveis como traçadores ou marcadores a semelhança dos isótopos estáveis.

Apesar da eficiência comprovada da ferramenta do traçador e sua ampla gama de aplicações, ainda existe certa dificuldade de adquirir os compostos enriquecidos no isótopo pesado do carbono ($^{13}C$). Grande parte desses compostos, utilizados no país, são importados à preços elevados, como destacado na Tabela 2, além das dificuldades inerentes ao processo de importação. O aumento da disponibilidade no Brasil de moléculas enriquecidas em isótopos estáveis de

elementos leves (C, N, H, B, S), seria um importante passo objetivando a ampliação dos trabalhos com o uso de traçadores estáveis.

Tabela 2 - Preço (FOB) de produtos enriquecidos em $^{13}C$

| Composto | Nome | Abundância Isotópica | Quantidade | Preço |
|---|---|---|---|---|
| **$^{13}CO(NH_2)_2$** | Ureia | 99% em $^{13}C$ | 1 g | $ 132,00 |
| **$NaH^{13}CO_3$** | Bicarbonato de sódio | 99% em $^{13}C$ | 1 g | $ 89,00 |
| **$^{13}CO_2$** | Dióxido de carbono | 99% em $^{13}C$ | 1 L | $ 183,50 |
| **$^{13}CO$** | Monóxido de carbono | 99% em $^{13}C$ | 1 L | $ 220,50 |

Fonte: Adaptado de Cambridge Isotope Laboratories (2019)

O desenvolvimento do método de separação é importante, pois os países que detém a tecnologia não a repassam por questões econômicas, e muitas vezes estratégicas, e, nesse sentido o CENA/USP se destaca pela separação de isótopos leves como $^{15}N$ (TRIVELIN, 1976; MAXIMO, 2013), $^{34}S$ (BENDASSOLI, 1994) e $^{10}B$ (CARNEIRO, 1989; GRANJA, 2013). Deve-se ainda destacar a produção e síntese de compostos marcados como $^{15}NH_3$(aq) e $^{15}NH_3$ anidra (BENDASSOLLI et al., 2002), $H^{15}NO_3$ (SANT'ANA FILHO et al., 2008), $C_2H_5{}^{15}NO_2$ (TAVARES et al., 2006); $C_3H_8{}^{15}NO_5P$ (TAVARES et al., 2010); $^{34}SO_2$ (BENDASSOLLI et al., 1997); $Ca^{34}SO_4.2H_2O$ (ROSSETE et al., 2006); superfosfato simples enriquecido em $^{34}S$ (ROSSETE et al., 2008) e até mesmo compostos duplamente marcados como $(^{15}NH_4)_2.^{34}SO_4$ (MAXIMO et al., 2005) e $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ (SANT'ANA FILHO et al., 2013).

Desta forma, o presente trabalho tem como objetivo geral: a) separação dos isótopos estáveis de C ($^{12}C$ e $^{13}C$) e obtenção de $NaH^{13}CO_3$, $^{13}CO_2$ e $^{13}CO$, enriquecidos no isótopo de $^{13}C$.

Os objetivos específicos: 1) montagem do sistema de enriquecimento por cromatografia de troca iônica; 2) avaliação da etapa de regeneração das resinas; 3) avaliação do enriquecimento de $^{13}C$ em dois sistemas individuais de colunas de acrílico com resina aniônica Dowex 1X8; 4) avaliação do enriquecimento em sistema cascata ou interação entre sistemas cromatográficos; 5) avaliação de: altura equivalente de placas teóricas; fator de fracionamento e preparo de amostras para determinação isotópica de $^{13}C$ (% em átomos de $^{13}C$).

# 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 O carbono na natureza

O carbono (C) é o quarto elemento mais abundante no universo, toda matéria orgânica e parte dos compostos inorgânicos possuem C em sua formação, sendo um elemento essencial à vida. O C participa de inúmeras reações nos organismos vivos, compondo lipídios, carboidratos, aminoácidos, vitaminas, nucleotídeos que são as bases dos ácidos nucleicos e proteínas. Essa última classe desempenha diversas funções biológicas como enzimas, componentes estruturais, armazenamento de nutrientes, regulação hormonal entre outras (LEHNINGER, 1976).

A matéria orgânica do solo (MOS) é rica em C, sendo este um importante indicador da qualidade e produtividade do solo. O C é uma fonte essencial de energia e alimento para microrganismos, além de compor uma ampla classe de grupos funcionais na MOS, influenciando nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (MAIA; PARRON, 2015), já que participa de reações fundamentais, como a capacidade de troca catiônica, reações com superfícies de minerais, formação de complexos metálicos, reage com moléculas orgânicas de origem antropogênica como pesticidas, fertilizantes e adubos (DICK et al., 2009).

O ciclo do C é um dos maiores ciclos biogeoquímicos do planeta, atuando entre a atmosfera, hidrosfera (oceanos) e a litosfera. Na atmosfera o C encontra-se em sua maioria na forma de $CO_2$, sendo absorvido pelos ecossistemas terrestres e aquáticos através da fotossíntese, respiração e outros processos oxidativos, contribuindo por regular a temperatura na terra através do efeito estufa natural e assim manter a vida existente no planeta (PRENTICE et al., 2001). Apesar de ser uma condição natural, inferências antropogênicas, como desmatamentos e queima de combustíveis fosseis vem influenciando no ciclo do C (FIELD; RAUPACH, 2004).

O carbono apresenta dois isótopos estáveis, o carbono 12 (98,93%) e o carbono 13 (1,07%), com seis e sete nêutrons, respectivamente, e ambos possuem seis prótons (EMSLEY, 1989). A composição isotópica de um produto, obtido a partir da mistura homogenia de duas fontes de carbono, que diferem isotopicamente entre si, reflete a quantidade relativa de cada uma delas, sendo o princípio do método da diluição isotópica, modelo valido para mistura isotópica de duas fontes e um produto

(DUCATTI, 2004). As análises isotópicas ($^{13}C$) de uma determinada matriz fornecem informações importantes em estudos paleoclimáticos e paleoecológicos, adulterações de alimentos e bebidas, rastreabilidade e autenticidade, entre outros (CERLING, 1984; RUNDEL; EHLERINGER; NAGY, 1989; FRANÇA et al., 2018; MARTIN et al., 1988; WHITE et al., 1998, KELLY, 2003; MARTINELLI et al., 2003; REID; O'DONNELL; DOWNEY, 2006).

Algumas plantas possuem ciclos fotossintéticos distintos, portanto a taxa de discriminação do C proveniente da fixação do $CO_2$ difere de acordo com as vias fotossintéticas correspondentes, as plantas denominadas C3 normalmente são mais empobrecidas em $^{13}C$ em relação às plantas C4 (RUNDEL; EHLERINGER; NAGY, 1989). Avaliações da razão isotópica natural desses isótopos ($^{13}C/^{12}C$) na MOS fornece informações importantes sobre a dinâmica do C no solo e assim pode-se apontar as espécies de plantas que estiveram presentes em determinado local e possíveis interferências antrópicas (BERNOUX et al., 1997; CERRI et al., 1985). Além dessa análise pode-se avaliar de forma conjunta a datação com o radioisótopo $^{14}C$ para determinação cronológica da mudança de vegetação (BOUTTON; ARCHER; MIDWOOD, 1999; BUSO JUNIOR et al., 2019).

Além das análises de variação natural dos isótopos, pode se empregar compostos artificialmente enriquecidos em $^{13}C$ para seu uso como traçador em variados campos da ciência, ainda que possuam diferentes massas atômicas, possuem as mesmas propriedades químicas.

A técnica que utiliza o isótopo raro do carbono ou outros isótopos de elementos leves (N, S, B), como traçador, consiste em fornecer ao meio ou organismo em estudo, um composto marcado ou dieta na qual a razão isotópica ($^{13}C/^{12}C$) seja considerada diferente do enriquecimento natural e, na sequência, avaliar a distribuição do isótopo raro ($^{13}C$) no sistema em função do tempo e das condições do experimento.

## 2.2 Área médica

Diversas metodologias vêm sendo propostas para aplicação do $^{13}C$ na área médica, como o diagnóstico de doenças gástricas e avaliação de metabolismo de diferentes substratos. O aumento na aplicação dessa ferramenta deve-se a sua

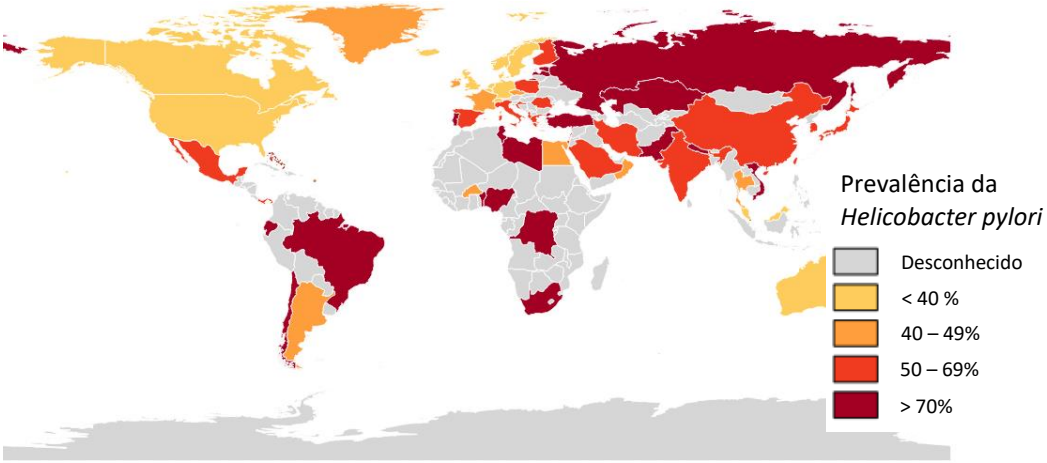
simplicidade, segurança, eficácia e principalmente por não ser invasivo e não emitir radiação (MODAK, 2007; COELHO et al., 2018).

A *H. pylori* é uma bactéria espiralada, gram-negativa e com forma de bastonete curvo, possui 0,5 µm de diâmetro e 3 a 5 µm de comprimento (WINDSOR; O'ROURKE, 2000). Possui também flagelos unipolares a fim de auxiliar na sua motilidade (HERRERA; PARSONNET, 2009). A *H. pylori* pode habitar a região do estômago e duodeno, contribuindo com gastrites crônicas, úlceras gástricas e duodenais, atrofia da mucosa do estomago (ZHU et al., 2014), além de favorecer a manifestação do câncer gástrico (UEMURA et al., 2001).

A *H. pylori* foi identificada por Marshal e Warren (1984) em seus estudos realizados a fim de associar a presença da bactéria com doenças como, ulceras gástrica e duodenal e gastrites. Sua pesquisa foi tão importante para os estudos relacionados a doenças gástricas, que em 2005 receberam o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina.

As taxas de prevalência da *H. pylori* ao redor do mundo são altas (Figura 1) com destaque para o Brasil, que mais de 70% da população é portadora da bactéria. As elevadas taxas se devem as diferentes formas de transmissão, casas onde um membro da família está infectado favorece a propagação da *H. pylori* (PERRY et al., 2006), uma vez que o contágio pode ocorrer de forma oral-oral, fecal-oral e até de forma iatrogênica, ou seja, pacientes saudáveis contraem a bactéria por endoscopia. Outros fatores que estão relacionados são baixas condições socioeconômicas e situações onde o saneamento básico é precário, visto que o tratamento inadequado da água e falta de higiene podem acarretar no consumo de água e alimentos contaminados (BROWN, 2000).

Figura 1 - Prevalência global de *H. pylori*




Fonte: Adaptado de Hooi et al. (2017).

O diagnóstico da *H. pylori* pode ser realizado por endoscopia e biópsia gástrica, porém se trata de um teste invasivo e caro, outros exames não invasivos são a sorologia e o teste respiratório utilizando ureia (UBT) (GISBERT; PAJARES, 2004). O UBT pode ser realizado utilizando $^{14}C$, todavia possui a desvantagem de ser um radioisótopo de longa meia vida (5.700 anos) uma alternativa, ainda segundo Gisbert e Pajares (2004), é o diagnóstico não invasivo utilizando ureia enriquecida em $^{13}C$ ($^{13}CO[NH_2]_2$), pois se trata de um exame simples, seguro, além de ser adequado para avaliar a erradicação da bactéria, não necessitando exclusivamente da endoscopia (COELHO et al., 2018).

A síntese de $^{13}CO(^{15}NH_2)_2$ foi desenvolvida por Sant'Ana Filho et al. (2013), a partir do $^{13}CO$, possibilitando a produção desse composto no país. Comercialmente a ureia é sintetizada a partir dos gases $NH_3$ e $CO_2$ (CHAO, 1967; UCHINO, 1986; STAFF, 1986) sendo uma possibilidade de síntese de $^{13}CO(NH_2)_2$ a partir do gás $^{13}CO_2$, visando seu emprego no diagnóstico da *H. pylori*.

Segundo Karamanolis et al. (2007), a gastroparesia é uma doença crônica que se caracteriza pelo retardamento no tempo de esvaziamento gástrico (TEG) e possui como sintomas dor abdominal, inchaço, perda de peso não intencional, náuseas e vômitos. O padrão ouro utilizado como diagnóstico da doença é a cintilografia de esvaziamento gástrico utilizando Tc-99m (WASEEM; MOSHIRE; DRAGANOV, 2009) ingerido juntamente com refeições sólidas, contudo tem como desvantagens o custo elevado do radioisótopo, necessidade de pessoal qualificado, é contraindicado para crianças, mulheres férteis e requer maior tempo de espera

entre os diagnósticos caso necessite ser repetido (PERRI; PASTORE; ANNESE, 2005).

Uma alternativa para o diagnóstico da gastroparesia é o uso do $^{13}C$, por se tratar de um isótopo estável, tem como vantagens a não emissão de radiação e pode ser repetido quantas vezes for necessário (PERRI; PASTORE; ANNESE, 2005). Bruno et al. (2013) também afirmam que o teste respiratório empregando $^{13}C$ é simples e seguro podendo ser realizado em mulheres grávidas e crianças.

O teste respiratório utilizando $^{13}C$ – acetato foi validado por Braden et al. (1995) utilizando refeições líquidas e semissólidas, comparando simultaneamente com a cintilografia, no total foram 35 pacientes com sintomas dispépticos e 20 pacientes saudáveis, as refeições foram marcadas com 150 mg de $^{13}C_2H_3NaO_2$ e 45 MBq de $^{99}Tc$ albumina coloidal, os resultados dos dois métodos correlacionaram-se demonstrando a confiabilidade e eficiência do teste respiratório. O uso do $^{13}C$ também foi validado por Ghoos et al. (1993). Inicialmente os estudos foram realizados comparando o teste respiratório empregando o $^{14}C$-ácido octanóico e a cintilografia com albumina coloidal marcada com $^{99}Tc$, e posteriormente comparou-se com o $^{13}C$-ácido octanóico.

Uma alga denominada *Spirulina platensis* tem sido utilizada também como um substrato para o teste respiratório com $^{13}C$. Viramontes et al. (2001) validaram o teste respiratório de $^{13}C$-*Spirulina platensis* com o objetivo de medir o TEG lento e acelerado, o estudo foi realizado com 57 voluntários saudáveis e a refeição de teste consistiu em 200 mg de $^{13}C$-*Spirulina platensis* e 0,5 mCi de coloide de enxofre marcado com $^{99}Tc$ incorporados à claras de ovos. Os resultados do TEG foram semelhantes à cintilografia demonstrando alta sensibilidade e especificidade, com destaque para o grupo de pessoas com TEG lento, onde a sensibilidade foi de 100%.

No Brasil destaca-se o grupo do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), que obtém a síntese e controle de qualidade da ureia enriquecida em $^{13}C$ para o diagnóstico da *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), empregando a reação entre $^{13}CO$, $NH_3$ e S (SANT'ANA FILHO et al., 2013). A ureia-$^{13}C$ sintetizada no país, foi utilizada para comparar a sua performance com o produto importado ($^{13}C$-urea breath test), no diagnóstico da *H. pylori*, com excelentes resultados (COELHO et al., 2018). Estudos realizados na UNESP de Botucatu avaliaram a utilidade do $^{13}C$-UBT (99 % em átomos de $^{13}C$), analisado por IRMS,

para a detecção da infecção por H. pylori, em comparação com o teste histopatológico, em pacientes submetidos à endoscopia digestiva alta no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, com excelentes resultados no diagnóstico da H. pylori, utilizando um método seguro e não invasivo (COSTA et al., 2013).

O emprego de ureia-$^{13}C$, com baixo enriquecimento isotópico (25 % em átomos de $^{13}C$), objetivando a detecção da *H. pylori*, foi avaliado com excelentes resultados, quando comparado com o teste histopatológico, em 55 testes (LEE et al., 2001). O referido trabalho com uso de 300 mg de uréia-$^{13}C$, evidencia a possibilidade de estudos futuros, com redução da massa e da abundância do traçador isotópico $^{13}C$.

## 2.3 Área animal

O teste respiratório em animais com $^{13}C$ fornece variadas possibilidades de estudos, é possível avaliar como os animais de adaptam em diferentes condições climáticas e como esse fator influencia no seu organismo, avaliar o balanço energético em animais que não ingerem alimentos regularmente e seus estados de anabolismo e catabolismo, analisar as formas de oxidação de uma ampla gama de substratos específicos no organismo, possibilitando o rastreamento de como e onde os nutrientes são oxidados. Esses estudos são fundamentais para o desenvolvimento do campo da fisiologia comparativa (MCCUE; WELCH JUNIOR, 2016).

Em alguns testes respiratórios é necessário ingerir o composto marcado em $^{13}C$ juntamente com determinado alimento, uma alternativa é a produção do alimento intrinsecamente enriquecido no isótopo ao invés de utilizar o composto puro inserido na alimentação, o estudo é fundamental para investigar se o substrato se comporta de maneira diferente no organismo. Um estudo realizado por Burd et al. (2013) teve como objetivo produzir leite e carne bovina enriquecidos em $^{13}C$ para pesquisas em humanos. Uma vaca leiteira recebeu infusões de 1-$^{13}C$ – fenilanina em concentrações de 450 µmol $min^{-1}$ durante 96 horas. Cerca de 24% da 1-$^{13}C$ - fenilanina foi recuperada no leite coletado durante o experimento. O abate foi realizado 24h após o término da infusão, por análises isotópicas verificou-se que o

enriquecimento médio foi de 1,8 ± 0,1% mol por cento em excesso, equivalente a 210 kg de carne marcada.

McCue et al. (2013) forneceram às galinhas $^{13}C$-leucina ou uma mistura de aminoácidos enriquecidos em $^{13}C$, misturados aos alimentos ou dissolvidas na água, com dosagens de 86 a 432 mg dia $^{-1}$. Desse modo obtiveram-se ovos com proteínas enriquecidas em $^{13}C$ de maneira intrínseca, a recuperação de $^{13}C$ na clara de ovo variou entre 14 e 21%.

Outro estudo teve como foco a produção de ovos enriquecidos em $^{13}C$, incorporando L- leucina-$^{13}C_1$ na alimentação de galinhas poedeiras. A galinha teve acesso livre à alimentação suplementada com 0,2% de L- leucina-$^{13}C_1$ a 99% em $^{13}C$, sendo a média de consumo de 100g de ração por dia. O teor de $^{13}C$ na clara de ovo foi 206‰ (delta per mil em relação ao padrão PDB) e a recuperação total da L- leucina-$^{13}C_1$ foi 40,2% (EVENEPOEL et al., 1997).

Além da produção intrínseca de ovos, carne e leite enriquecidos, Grusak (1997) também destaca a necessidade de produzir plantas com marcação isotópica intrínseca, sendo possível estudar mais afundo a absorção de nutrientes pelo organismo ou mesmo se a forma de preparação do alimento interfere na sua composição nutricional.

Crompton et al. (2014) estudaram o metabolismo de dois aminoácidos, [1- $^{13}C$] fenilanina e [2,3,5,6-$^{2}H$] tirosina, nas glândulas mamárias de vaca leiteira, o objetivo foi avaliar a taxa de incorporação desses aminoácidos entre a síntese proteica do leite e a síntese de outros componentes. A partir da compreensão de como o organismo metaboliza esses aminoácidos, é possível fazer modificações no manejo e na composição da dieta alimentar do animal a fim de aumentar a produção leiteira.

No estudo conduzido por Buyse et al. (2004) foi avaliado o metabolismo de oxidação da glicose variando peso e idade de frangos de corte, verificou-se que frangos mais velhos oxidam mais a glicose em relação as vias não oxidativas, enquanto que frangos mais jovens utilizam a glicose para síntese de glicogênio ou produção de aminoácidos não essenciais. A $U^{13}C_6$-glicose foi administrada por via oral, variando as doses em 2, 4 e 8 mg de $U^{13}C_6$-glicose por kg do animal. Os frangos foram acondicionados em sistemas de medição de $CO_2$ e as amostras coletadas via respiração a cada 15 min.

A metionina é um aminoácido que vem sendo incorporado a alimentação de frangos de corte a fim de melhorar o ganho de peso da ave, pensando em melhorar a pratica de incorporação desse aminoácido Stradiotti et al. (2016) estudaram a incorporação da metionina nos tecidos de frangos de corte utilizando a $^{13}C$ metionina destacando a importância de mais estudos com este e outros aminoácidos. O estudo foi conduzido com 51 frangos de corte que receberam oralmente uma solução de $^{13}C$-metionina a 92% em $^{13}C$, a dose foi de 29 µmol $kg^{-1}$ $h^{-1}$ por 6 horas, a taxa de incorporação de $^{13}C$ nos tecidos varia, aproximadamente 23, 64% da metionina incorporada na ave, foi direcionada para síntese do músculo do peito.

Outros trabalhos envolvendo os processos metabólicos em aves, utilizando-se aminoácidos enriquecidos e com infusões intravenosas, com resultados promissores, foram realizados (BARNES et al., 2002; MURAMATSU et al., 1987).

## 2.4 Métodos de separação dos isótopos de C

Ao longo dos anos vários métodos foram propostos para a separação dos isótopos de carbono ($^{12}C$ e $^{13}C$), visando sempre aumentar o nível e velocidade de enriquecimento, como exemplo pode-se citar destilação, laser, difusão, troca química e cromatografia de troca iônica.

O método cromatográfico de troca iônica em colunas de resina pode ser utilizado na separação de vários isótopos estáveis, entre os quais: nitrogênio, enxofre, boro, litio, oxigênio, carbono, sódio, urânio, entre outros (LONDON, 1961; ROSSET et al., 1964; MIERA et al., 1985), devido as suas características econômicas, de eficiência e simplicidade, quando comparados com outros métodos, que mostram maior custo de instalação e complexidade do processo em si.

Adotando a técnica de difusão gasosa, Wooldridge e Jenkins (1936) enriqueceram $^{13}C$ em gás $CH_4$ alcançando 6,6% em átomos de $^{13}C$. O sistema era formado por 35 estágios de separação compostos por membranas porosas, a separação ocorre pelas diferentes taxas de efusão dos gases em virtude das diferenças de massa dos isótopos.

Taylor e Urey (1938) foram os primeiros a separar isótopos por cromatografia de troca iônica com colunas de aço inoxidável empacotadas com zeólitas como material trocador, desde então inúmeros estudos utilizando a cromatografia para separar isótopos foram conduzidos, por exemplo na separação de boro

(CARNEIRO JUNIOR et al., 1994; OI et al., 1997), enxofre (BENDASSOLLI et al., 1997) e nitrogênio (SPEDDING; POWELL; SVEC, 1955; MAXIMO et al., 2013).

O processo de troca química com sistema cascata de duas unidades foi utilizado de modo a propiciar o enriquecimento de $^{13}C$. Hutchinson, Stewart e Urey (1940) promoveram a reação entre o gás HCN e solução de NaCN, enriquecendo NaCN a 25% em $^{13}C$ com uma taxa de produção de 2,5g por dia com uma massa total de 80g utilizando. O valor de alfa (fator de fracionamento) foi 1,0126, porém o método teve como desvantagens a polimerização do HCN além da sua toxicidade.

Nier (1940) avaliou o desempenho de uma coluna de difusão térmica de 730 cm de comprimento e espaçamento anular de 0,712 cm, em diferentes condições de trabalho. A temperatura média foi de 300ºC e o consumo de calor foi 2,75 kW. Acoplando um reservatório no topo da coluna é possível alcançar um enriquecimento de $^{13}CH_4$ em mais de quatro vezes o valor natural. Cálculos preliminares indicam que ao operar em uma pressão de 46 cm poderia produzir 148 mg de $CH_4$ contendo 4,5% de $^{13}CH_4$ ou produziria 376 mg de $CH_4$ contendo 3,4% de $^{13}CH_4$ se operado em uma pressão de 61 cm.

Piez e Eagle (1956) enriqueceram aminoácidos aleatoriamente com $^{14}C$ e investigaram a cromatografia de troca iônica desses compostos marcados. Utilizando resina DOWEX 50-x12 de menos de 400 mesh e eluente que forneceu um gradiente de pH durante a eluição, observaram que as moléculas marcadas apresentaram um movimento mais lento em relação as não marcadas, também constataram que a posição do $^{14}C$ interfere na separação. Além da marcação, outras diferenças no comportamento de troca dos aminoácidos podem influenciar na velocidade de deslocamento.

Um sistema de 9 estágios e 11 colunas de três tipos diferentes de difusão térmica foi empregado por Rutherford e Keller (1966) e obtiveram $CH_4$ enriquecido a 93% em $^{13}C$. O sistema cascata com a disposição das colunas em série paralelas é importante para reduzir o tempo de enriquecimento isotópico e maximizar a retirada de isótopos enriquecidos por unidade de comprimento da coluna.

Armstrong et al. (1970) enriqueceram $^{13}C$ a partir da técnica de destilação fracionada. A coluna de destilação possuía cerca de 40 metros de comprimento e altura de placas teóricas de 2 cm, o consumo energético era quase 1 kW de energia além de 1000 litros de nitrogênio líquido por dia, onde cerca de metade era consumido na condensação do CO. Obtiveram uma produção de 18,2 litros por dia

de CO com concentração de 92,8 a 95% em átomos de $^{13}C$ que corresponde a 3,6 kg de $^{13}C$ por ano.

Bittenson e Houston (1977) relataram a dissociação multifotônica de $CF_3I$ utilizando laser de $CO_2$. Demonstraram ser um processo isotopicamente seletivo uma vez que obtiveram fatores de separação de $^{13}C$ de aproximadamente 600 a -80ºC. Os parâmetros necessários para alcançar esse resultado foram 0,1 Torr de pressão, irradiação de 2000 pulsos na linha R(14) da transição do laser de $CO_2$ de 9,6 µ. Obtiveram seletividade de mais de 40 para $^{12}CF_3I$.

McInteer (1980) determinou o número ideal de placas teóricas para separação de $^{13}C$ por destilação criogênica, para que a coluna tenha um bom desempenho de separação, são necessárias aproximadamente 3000 placas teóricas para um enriquecimento de 99% de $^{13}C$, com colunas de no mínimo 100 m de comprimento.

Um sistema de enriquecimento composto por dois estágios foi proposto por Gauthier et al. (1984), fazendo o uso de laser de $CO_2$, partindo de misturas equimolares de $^{12}CHClF_2$ e $^{13}CHClF_2$ (50% de $^{13}C$). O sistema foi eficiente resultando em $C_2F_4$ com 95% a 99% em átomos de $^{13}C$, absorvendo apenas 6 e 16 eV respectivamente. Também avaliaram parâmetros como pressão, frequência, linha do laser e fluência.

Outhouse et al. (1985) descreveram um esquema de dois estágios para separação de $^{13}C$, utilizando um laser 100 W TEA de $CO_2$ de baixo custo, demonstraram uma produção de 220 mg $h^{-1}$ de $^{13}C$ equivalente a 2 kg por ano a 50% em $^{13}C$. Foi constatada a eficiência do método já que o $^{13}CHClF_2$ é preferencialmente dissociado em relação ao $^{12}CHClF_2$ e tem como vantagem o baixo custo da molécula de trabalho.

Takeda, Obanawa e Morita (1987) investigaram a separação dos isótopos de carbono ($^{12}C$ e $^{13}C$) por cromatografia ácido-base usando resina de troca iônica. O delineamento do sistema cromatográfico ácido-base se procedeu por comparação com a cromatografia redox do urânio, devido às análises da força potencial de redução das espécies envolvidas. Foram realizadas simulações a fim de determinar as melhores condições experimentais variando concentrações da base, ácido e dióxido de carbono em solução; basicidade da resina de troca iônica; temperatura, pressão e comprimento da coluna. Observaram também que os fatores de separação entre $CO_2$ e $HCO_3^-$ dos experimentos foram muito próximos aos valores das soluções correspondentes. Os experimentos em 25 ou 90 ºC apresentaram

valores da razão molar de $^{13}C$ de 1,25 e 1,26 x $10^{-2}$ no limite da parte posterior da banda de carbono.

Li et al. (2010) projetaram a primeira usina em escala piloto aplicando empacotamento estruturado e desenvolveram uma embalagem estruturada especial de alto desempenho, denominada PACK-$^{13}C$, com a finalidade de separar os isótopos estáveis de carbono por destilação criogênica do CO de alta pureza. O comprimento da coluna era 20 metros de altura com 18 metros de empacotamento e 45 mm de diâmetro. A taxa de alimentação do CO foi de 100 L $h^{-1}$ e pressão de 60 kPa. O enriquecimento chegou a 15% em $^{13}C$ na parte inferior da coluna com uma massa de 2,1 g.

É possível notar que o $^{13}C$ tem um grande potencial de aplicação na área médica e área animal, sendo necessário desenvolver formas de enriquecimento desse isótopo. Na literatura consultada, raros foram os trabalhos científicos envolvendo o método de enriquecimento de $^{13}C$ por cromatografia de troca iônica.

Assim posto, e levando em consideração o uso no CENA/USP da técnica de cromatografia de troca iônica, na separação dos isótopos estáveis de bioelementos (N, S, B), o presente trabalho tem como propósito avaliar o potencial da troca iônica na separação dos isótopos estáveis de carbono ($^{12}C$ e $^{13}C$).

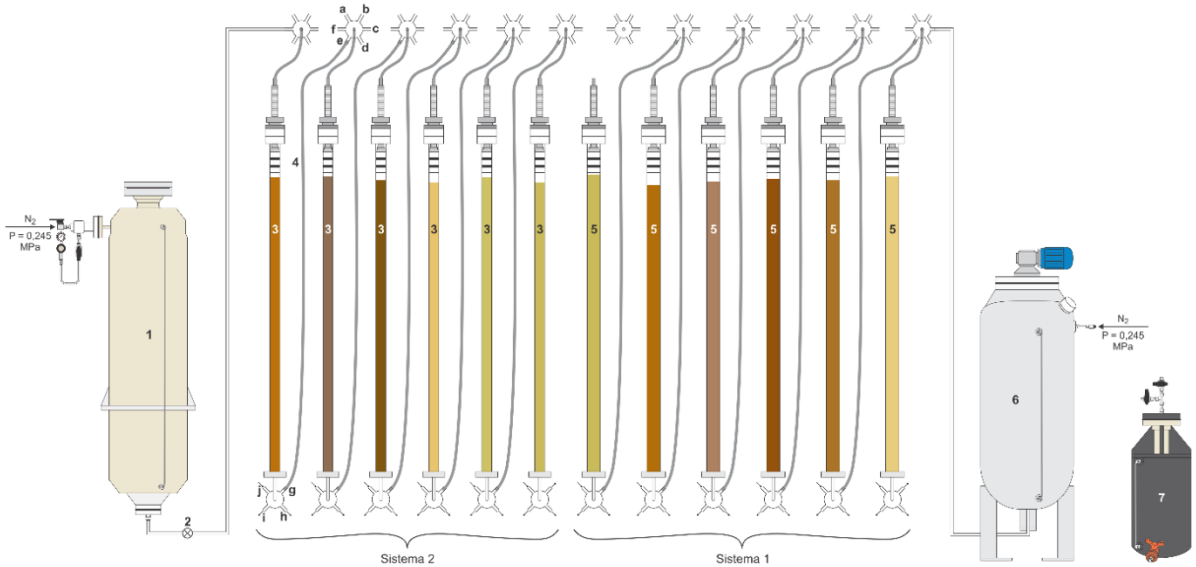
# 3. MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1 Material

### 3.1.1 Sistemas de colunas de resina

O sistema completo de cromatografia de troca iônica em processo cascata (Figura 2) foi composto de dois conjuntos de colunas de acrílico, denominados de S1 e S2. O sistema S1 era composto por 6 colunas com 180 cm de comprimento, 7 cm de diâmetro interno e 5 mm de espessura de parede, e o sistema S2 constou de 6 colunas com 180 cm de comprimento, 5 cm de diâmetro interno com 5 mm de espessura de parede. Ambos os sistemas foram preenchidos com resina aniônica Dowex 1X8, sendo cerca de 6 e 3 litros de resina respectivamente em S1 e S2. A montagem e os detalhes do sistema de enriquecimento são descritos no item 3.2.1.1.

Figura 2 – Sistema completo de cromatografia de troca iônica em processo cascata para separação dos isótopos estáveis de C




**1** - Reservatório de PE para solução de HCl, sob pressão de 0,245 MPa;
**2** - Registro da conexão entre reservatório de HCl e coluna;
**3** - Coluna de acrílico ∅ = 60mm, contendo Resina DOWEX 1X8.
**4** - Tubulação flexível de poliéster 2mm;
**5** - Coluna de acrílico ∅ = 80mm, contendo Resina DOWEX 1X8;
**6** - Reservatório de fibra de vidro para solução de NaOH, sob pressão de 0,245 MPa;
**7** - Reservatório fibra de vidro para solução de $NaHCO_3$.
**a**, **b**, **c** - registro da conexão de entrada de HCl, NaOH e $H_2O$, respectivamente;
**d**, **g** - registro da conexão entre colunas;
**e**, **f** - registro para descompactação;
**h**, **j** - registro para esgoto;
**i** - registro para conexão de água em contra corrente.

### 3.1.2 Resinas

Resina aniônica de base forte do tipo poliestireno divinilbenzeno, Dowex 1X8 com tamanho de partícula entre 74 e 149 µm (200-100 “mesh”). As propriedades das resinas são: 8% de teor de polimerização com divinilbenzeno, grupo funcional amônio quaternário- $CH_2N^+(CH_3)_3$ e capacidade de troca aniônica ($Cl^-$) de 1,2 meq $ml^{-1}$ com resina úmida equilibrada em água.

### 3.1.3 Reagentes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico ou grau técnico.

- Hidróxido de sódio (NaOH);
- Ácido Clorídrico (HCl);
- Bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$);
- Ácido fosfórico ($H_3PO_4$);
- Ácido sulfúrico ($H_2SO_4$).

Outros reagentes e compostos empregados foram Cu metálico, liga de Pt e Rh, dióxido de carbono ($CO_2$), gases especiais como nitrogênio e gás hélio e água desionizada.

### 3.1.4 Vidrarias e outros materiais de laboratório

As vidrarias e demais materiais utilizados fazem parte da rotina de laboratório como: Béqueres; balões volumétricos; barra magnética; espátula de inox; funil; micropipetas; pipetas de Pasteur; placas de petri; provetas, entre outros.

### 3.1.5 Equipamentos

Para as análises de abundância isotópica de $^{13}C$ (% em átomos de $^{13}C$) e delta per mil $^{13}C$ ($\delta$‰$^{13}C$), foram utilizados os espectrômetros de massas ANCA GSL 20/20 da SERCON (% em átomos de $^{13}C$) e o espectrômetro de massas Delta V Advantage – isotope Ratio MS da Thermo Scientific ($\delta$‰$^{13}C$ PDB).

Cromatógrafo iônico DIONEX ICS-90 para análise da solução efluente do sistema proveniente da lavagem do HCl do volume intersticial da resina.

A linha de vácuo construída em vidro pyrex e quartzo contendo Bomba mecânica de vácuo modelo 2M8 Edward, medidor de vácuo ativo AGD Edwards e filamento sensor de vácuo Pirani APG-M Edwards, foi utilizada no preparo das amostras gasosas para análise isotópica de $^{13}C$ e para a obtenção de $^{13}CO_2$ proveniente do $NaH^{13}CO_3$ obtido no sistema de enriquecimento.

Para as atividades de rotina do laboratório foram utilizados balança analítica (AND); termômetro de mercúrio (-10 a 310ºC); chapa aquecedora de aço inoxidável (AISI 304) com controle de temperatura (50 a 300ºC); agitador magnético; bureta digital.

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Separação dos isótopos estáveis de C ($^{13}C$ e $^{12}C$) por cromatografia de troca iônica

#### 3.2.1.1 Detalhamento e montagem do sistema de troca iônica

Foram projetados: a) dois sistemas individuais de colunas de acrílico transparente, conforme descrito em 3.1.1, objetivando a separação dos isótopos de C (Figura 3), as colunas foram fixadas em suporte de aço inoxidável e placas de acrílico para a sustentação das colunas e válvulas; b) placa de acrílico transparente para fixação das válvulas e base para as colunas em acrílico (Figura 4); c) sistemas de distribuição de fluxos de soluções na base e no topo das colunas (Figura 5); d) resina aniônica Dowex 1X8, respectivamente, com malha 100-200 mesh e com capacidade de troca aniônica ($Cl^-$) de 1,2 meq $mL^{-1}$ para resina úmida, equilibrada em água (Figura 6); e) válvulas de PTFE com 7 vias para distribuição de fluxos das soluções (HCl, NaOH, $NaHCO_3$ e $H_2O$) na base e topo das colunas (Figura 7); f) sistema de pistões com corpo de PVC e anéis em neoprene no topo das colunas para controle do nível das soluções acima da resina e vedação eficiente (Figura 8); g) sistema de pressão com gás nitrogênio, para fluxo de soluções de HCl (0,05 mol $L^{-1}$) no topo das colunas para possibilitar o deslocamento

da banda enriquecida; h) tanques de fibra de vidro utilizados para preparo e admissão das soluções HCl, NaOH e $NaHCO_3$ (Figuras 9 e 10). O tanque de preparo do NaOH possui um sistema de agitação mecânica com haste de aço inoxidável. Deve-se ainda salientar que os tanques de HCl e NaOH possuem sistema para a filtragem das soluções, empregando colunas de acrílico contendo resinas de 100-200 “mesh” (Figura 9), visto que os reagentes (com abundância natural) utilizados no processo de separação isotópica de carbono ($^{13}C$ e $^{12}C$) são de qualidade química comercial podendo promover a deposição de impurezas, do seu processo de produção, nas resinas aniônica utilizadas para separação.

Figura 3 - Sistemas (S1 e S2) de colunas em acrílico transparente fixadas em suporte de aço inoxidável

Figura 4 - Placa de acrílico transparente para fixação das válvulas e base para as colunas em acrílico

Figura 5 - Sistema de tubulações em PVC para admissão das soluções ($H_2O$, NaOH, HCl e $NaHCO_3$) com conectores para as válvulas e pistões em teflon

Figura 6 - Resinas aniônicas (DOWEX 1X8) utilizadas para o procedimento de separação dos isótopos estáveis de C

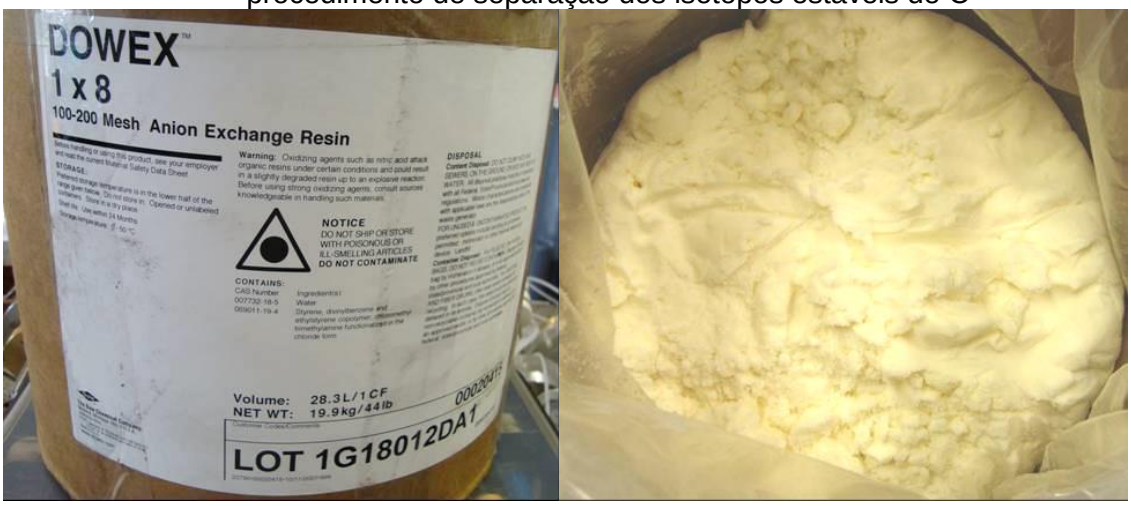
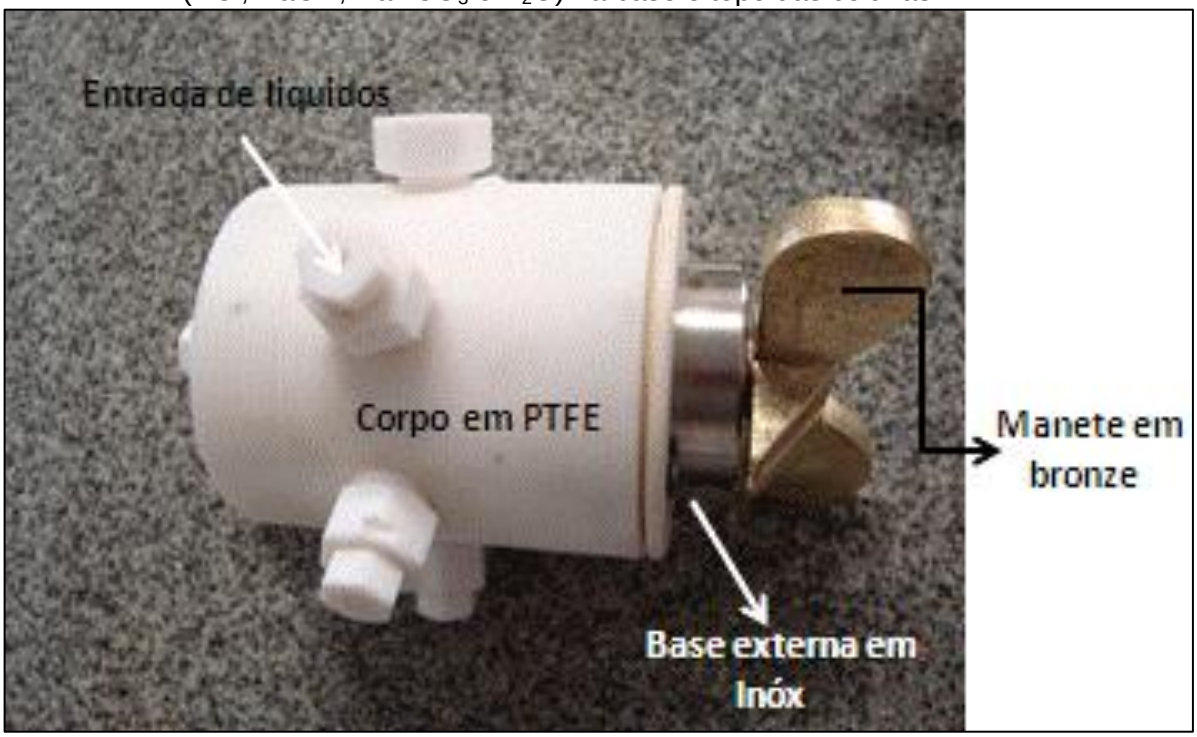
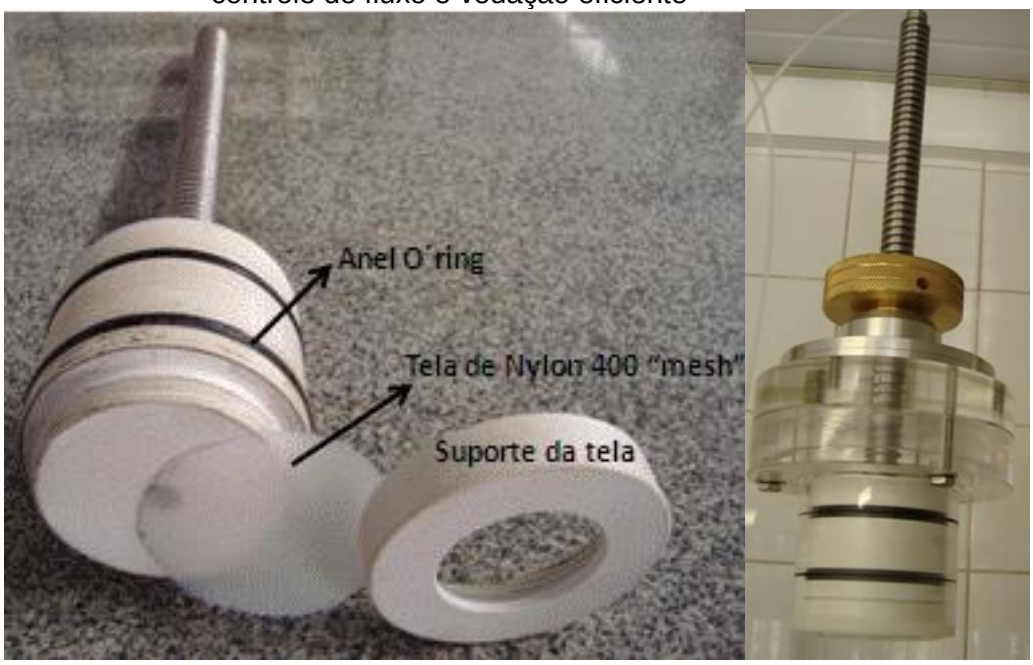



Figura 7 - Válvulas de PTFE com 7 vias para distribuição de fluxos das soluções (HCl, NaOH, $NaHCO_3$ e $H_2O$) na base e topo das colunas




Fonte: GRANJA (2013).

Figura 8 - Pistões dimensionados para as colunas do sistema para controle de fluxo e vedação eficiente




Fonte: GRANJA (2013).

Figura 9 - Tanque de fibra vidro de, com capacidade de 100 L, utilizado para depósito da solução de HCl interligado a coluna contendo resinas para filtragem de impurezas

Figura 10 - Tanques de fibra vidro utilizado para depósito das soluções de NaOH (300 L) e $NaHCO_3$ (30 L), respectivamente

As colunas do sistema S1 e S2 foram preenchidas respectivamente com aproximadamente 6 e 3 L de resina aniônica Dowex 1X8 (Figura 11). O recheio das colunas acrílicas foi feito com resina aniônica úmida na forma $R\text{-}OH^-$ até a altura de aproximadamente 150 cm. Na Figura 12 é possível verificar uma variação no grau de inchamento e a tonalidade da resina que ocorre em função da forma iônica adsorvida aos sítios ativos da resina. Ainda as colunas foram interligadas em série com tubulação de poliéster de 2 mm para transferência da banda de uma coluna de resina para outra, de forma a garantir a continuidade da fase estacionária para deslocamento da banda cromatográfica (DBC) (MAXIMO et al., 2000). Para o depósito de $H_2O$ foi utilizado um tanque de polietileno (1750 L) disposto a 10 metros da base da coluna, possibilitando seu fluxo por ação da gravidade.

Figura 11 - Preenchimento das colunas de acrílico, nos dois sistemas (S1 e S2), com resinas aniônicas Dowex 1X8

Figura 12 - Sistemas de colunas (S1 e S2) com resinas aniônicas (DOWEX 1X8) para separação dos isótopos estáveis de C ladeado por tanques de solução eluente de HCl (esquerda) e regenerante NaOH (direita)

### 3.2.1.2 Preparo da resina aniônica Dowex 1X8

Previamente ao preenchimento das colunas com a resina aniônica, procedeu a lavagem das resinas com água desionizada, a fim de remover possíveis impurezas do processo de fabricação. Na sequência as resinas foram acomodadas nas colunas e carregadas à forma de hidroxila ($R\text{-}OH^-$) e cloreto ($Cl^-$), alternadamente em três ciclos para ativar os sítios ativos do trocador iônico. Logo após a resina foi lavada com água desionizada para remover o excesso de NaOH no volume intersticial do trocador. Dessa forma a resina encontra-se com os sítios ativos carregados na forma $OH^-$ ($R\text{-}OH^-$) e pronta para receber a banda de $HCO_3^-$ a partir da solução 0,5 mol $L^{-1}$ de $NaHCO_3$.

### 3.2.1.3 Formação e deslocamento da banda cromatográfica (DBC) de $H^{13}CO_3^-$

Um tanque de fibra de 30 L, apropriado para condições de trabalho sob pressão de até 0,245 MPa foi projetado e construído (Figura 10) para depósito de solução 0,5 mol $L^{-1}$ de $NaHCO_3$. A etapa de formação da banda consistiu na admissão de solução 0,5 mol $L^{-1}$ de $NaHCO_3$ com abundância isotópica natural de $^{13}C$, a uma coluna de resina previamente regenerada à forma de $R\text{-}OH^-$, objetivando o condicionamento da resina à forma $R\text{-}HCO_3^-$. A solução fluiu do tanque, pressurizado a 0,245 MPa, para coluna de resina por intermédio de tubulação de poliéster de 2 mm de diâmetro, sendo mantida uma vazão de 1,0 a 3,0 ml $cm^{-2}$ $min^{-1}$, para os sistemas S1 e S2. Após a resina ter sido carregada com o $HCO_3^-$ foi realizada a despressurização do sistema, e na sequência foi admitida $H_2O$ desionizada para a lavagem da resina objetivando a eliminação da solução de $NaHCO_3$ remanescente no volume intersticial da mesma. Para a formação da banda foi admitida solução eluente de HCl 0,05 mol $L^{-1}$, proveniente de tanque pressurizado com $N_2$ (contido em cilindro comercial), no topo da coluna. A banda de $HCO_3^-$ começa a ser deslocada pela solução de HCl que se dissocia originando os íons $H^+$ e $Cl^-$, ocorrendo a troca entre os íons $HCO_3^-$ e $Cl^-$, ficando os sítios ativos da resina aniônica carregados com íons cloreto ($R\text{-}Cl^-$). O $HCO_3^-$ em solução interage com $H^+$, formando $CO_{2(aq)}$ (dióxido de carbono aquoso), conforme equações 1 e 2.

Com o deslocamento da banda cromatográfica (DBC) no sentido descendente, um fluxo em contracorrente de íons $HCO_3^-$ e $CO_{2(aq)}$ (eq. 3) é estabelecido nas fases resina e solução, sendo uma pequena quantidade de $H_2CO_3$ (banda) continuamente deslocada pela solução eluente de HCl, conforme a eq. (3) (PARK; MICHAELS, 1994; BENDASSOLLI et al., 1997). Como observado na Figura 13, exatamente na região do equilíbrio dado pela eq. (4) o limite da traseira da banda (TB) é definida, ou seja, no ponto dado entre a fase resina na forma $R\text{-}Cl^-$ e $R\text{-}HCO_3$. Nesta região, parte acima do limite da TB, a resina apresenta coloração amarelo claro, característico da resina aniônica na forma $R\text{-}Cl^-$.

O comprimento da banda de ácido carbônico foi de 140 cm para o sistema S1 e 130 cm para o sistema S2.

As Figuras 12 e 13 ilustram as diferentes tonalidades da resina, a porção abaixo do limite da TB, apresenta coloração amarelo mais intenso que é a cor característica da resina na forma $R\text{-}HCO_3^-$. A coloração define a banda e permitiu sua visualização durante o deslocamento. A TB pode ser definida como a fração (cm) da banda que apresenta abundância isotópica de $^{13}C$ acima da natural.

O limite da frente de deslocamento (FB) de uma banda de $H^{13}CO_3^-$, representada pela eq. (2), é identificado pelo ponto dado entre a fase resina na forma $R\text{-}HCO_3^-$ (parte acima do limite da FB) e $R\text{-}OH^-$ (parte abaixo do limite da FB). A FB pode ser definida como a fração (cm) da banda que apresenta abundância isotópica de $^{13}C$ inferior a 1,108 % em átomos de $^{13}C$ (natural). A Figura 13 ilustra em detalhes os limites da TB e FB, que definem a banda de $HCO_3^-$.

$$R\text{-}HCO_3^-{}_{(R)} + H^+_{(S)} + Cl^-_{(S)} \rightleftharpoons R\text{-}Cl^-_{(R)} + CO_{2(S)} \quad (1)$$

$$R\text{-}OH^-_{(R)} + HCO_3^-{}_{(S)} \rightleftharpoons R\text{-}HCO_3^-{}_{(R)} + H_2O_{(S)} \quad (2)$$

Onde (R) e (S) representam fase resina e fase solução, respectivamente.

As duas principais reações de troca isotópica podem ser representadas pelas eq. (3) e (4), as quais ocorrem com o deslocamento da banda promovendo a separação e concentração dos isótopos de $^{13}C$ e consequentemente o enriquecimento isotópico na TB (condição em que a abundância isotópica de $^{13}C$ está acima da natural).

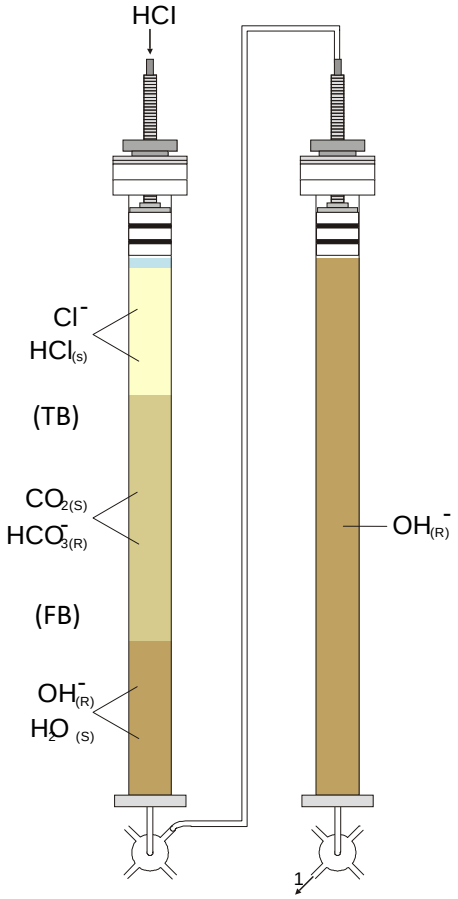
$$^{13}CO_{2(S)} + H^{12}CO_3^-{}_{(R)} \rightleftharpoons {}^{12}CO_{2(S)} + H^{13}CO_3^-{}_{(R)} \quad (3)$$

$$H^{13}CO_3^-{}_{(S)} + R\text{-}H^{12}CO_3^-{}_{(S)} \rightleftharpoons H^{12}CO_3^-{}_{(S)} + R\text{-}H^{13}CO_3^-{}_{(S)} \quad (4)$$

Onde (R) e (S) representam fase resina e fase solução, respectivamente.

A banda foi deslocada pelo HCl até a parte inferior da coluna, que se mantinha ligada em série com uma segunda coluna, dessa forma a banda entrava na segunda coluna e a primeira ficava na forma de $Cl^-$. A primeira coluna era desconectada e a segunda contendo a banda, foi ligada a uma terceira coluna já regenerada com íons $OH^-$, para evitar perdas da banda, sempre eram mantidas, no mínimo, duas colunas conectadas em série, dessa forma o $^{13}C$ foi se acumulando na região traseira da banda cromatográfica.

Figura 13 - Esquema do deslocamento da banda cromatográfica de $H^{13}CO_3^-$



Testes realizados permitiram avaliar os níveis de enriquecimento dos perfis da TB em função do deslocamento da banda cromatográfica (DBC). Assim sendo, os perfis isotópicos (% em átomos de $^{13}C$) atingidos no sistema S1 e S2, individualmente, foram avaliados.

Cada coluna cromatográfica deslocada pela banda compreendia 1,5 m de DBC, o que permitia um relativo controle das distâncias deslocadas pela banda. Deve-se salientar que para realização das retiradas dos perfis para o monitoramento, e avaliação dos níveis de enriquecimento alcançados, era necessário ter controle da TB ou FB, sendo os pontos de referência no momento da retirada dos perfis da banda de $H^{13}CO_3^-$.

Após determinado número de deslocamentos da banda retiravam-se alíquotas de aproximadamente 1 ml em diferentes pontos da banda para determinação isotópica de carbono (% em átomos de $^{13}C$) ao longo da banda de $HCO_3^-$. Para tal fim era conectada na base da coluna, em uma das saídas da válvula de 7 vias, um tubo de PTFE acoplado com uma agulha (Figura 14), durante a coleta abria-se a válvula e a amostra era recolhida no frasco de coleta (FC). Antes da coleta, os frascos foram submetidos a um processo de purga (remoção de $N_2$ e $CO_2$) com auxílio de um sistema de vácuo (linha de vidro, bomba mecânica e difusora), para evitar diluição isotópica da amostra com o $CO_2$ presente no ar atmosférico. A extração do $^{13}CO_2$ da amostra foi realizada conforme procedimento 3.2.4. Os pontos coletados ao longo da banda de $H^{13}CO_3^-$ no sistema S1 foram: 0; 1; 5; 10; 15; 20; 30; 40; 50; 60; 70, 80; 90; 100; 110, 120, 130 e 140 cm do limite da TB e do sistema S2 de: 0; 1; 5; 10; 15; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90, 100, 110, 120 e 130 cm do limite da TB.

As determinações da abundância (% em átomos) isotópica de $^{13}C$ nas amostras de $H^{13}CO_3^-$, obtidas no sistema de cromatografia, foram realizadas em espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS) de fluxo viscoso (ANCA-GSL, 20/20 da Sercon).

Ao verificar um aumento da região empobrecida, uma porção com abundância de $^{13}C$ abaixo do natural, procedia-se a retirada desta fração do sistema, e solução de $NaHCO_3$ com abundância natural em $^{13}C$ era adicionada a banda, mantendo sempre um patamar com abundância natural em $^{13}C$.

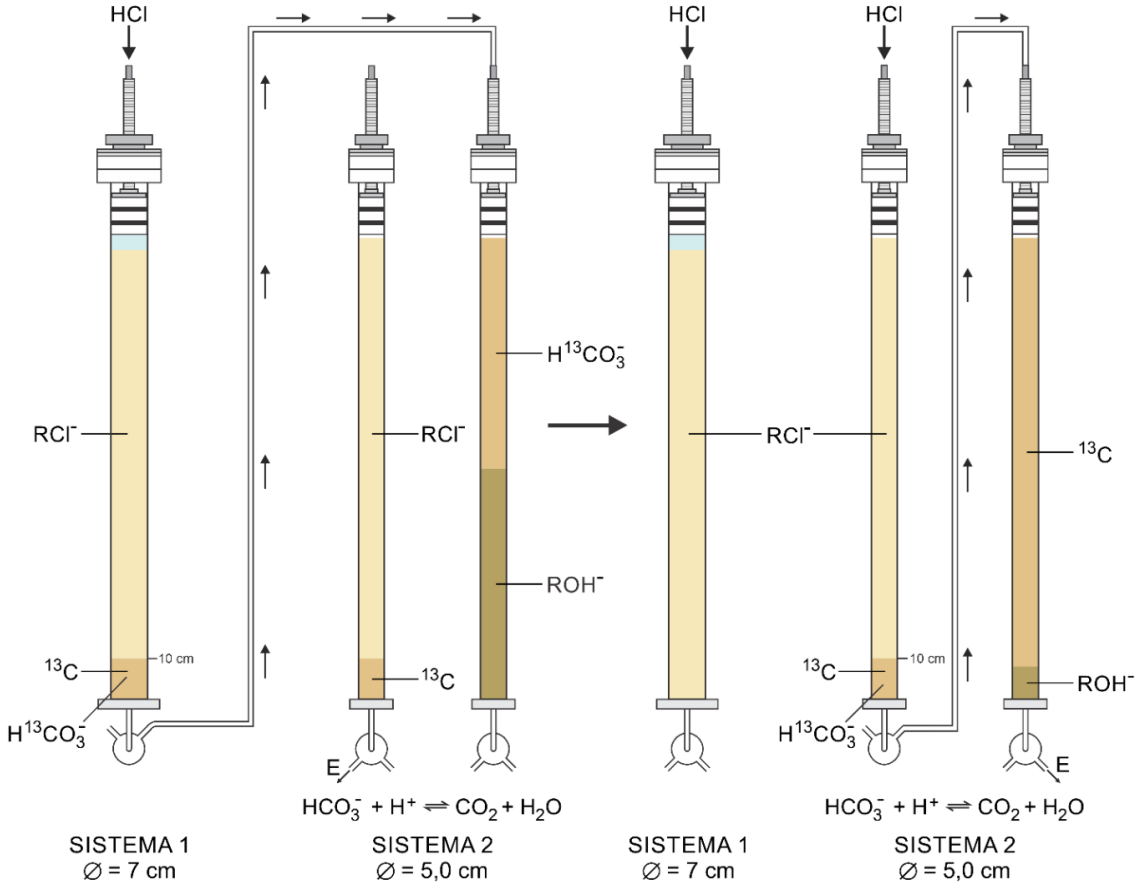
Figura 14 - Procedimento para a coleta de um ponto da banda cromatográfica em frasco (sob vácuo)

### 3.2.2 Interação entre os Sistemas S1 e S2

A interação entre os sistemas individuais teve como finalidade a produção de $NaH^{13}CO_3$ com maior enriquecimento isotópico. O procedimento consistiu em obter o $NaH^{13}CO_3$ em maior quantidade (massa) no sistema S1 de colunas, com a posterior transferência dessa região mais enriquecida para o sistema S2, possibilitando um acréscimo no número de placas teóricas e consequentemente um aumento na fração da banda enriquecida, e com isso um incremento na abundância isotópica de $^{13}C$ nos últimos centímetros (0 – 5 cm) da referida fração da banda (TB).

Após o S1 chegar a um enriquecimento na faixa de 4 a 5% em átomos de $^{13}C$ nos últimos 10 cm da TB, foi realizado o acoplamento entre os sistemas S1 e S2, que consistiu em transferir os 10 cm finais da banda cromatográfica (região mais enriquecida) do sistema S1 para a região traseira (enriquecida) de S2. Considerando que o diâmetro da coluna do sistema S1 é maior que aquele do S2, e que a altura equivalente de uma placa teórica nos dois sistemas são iguais, consequentemente maior o volume de solução de $^{13}CO_{2(aq)}$ obtido nos últimos 10 cm da TB, maior o comprimento da TB no sistema S2 e assim a fração enriquecida apresenta um aumento no número de placas teóricas. A Figura 15 ilustra a transferência da fração enriquecida (10 cm) do sistema S1 para o sistema S2.

Figura 15 - Esquema do processo de interação entre os sistemas S1 e S2 de colunas




O primeiro acoplamento da banda foi realizado quando o sistema S1 estava com 78 DBC e o sistema 2 com 92 DBC. Após o acoplamento, os sistemas individuais (S1 e S2) continuaram a ser deslocados mantendo os mesmos parâmetros já citados. As análises de perfil do sistema S1, após o primeiro acoplamento, foram realizadas após 21 e 30 m de deslocamento da banda e no sistema S2 a banda foi deslocada até análise isotópica com 24 e 34,5 m, sendo realizado então um segundo acoplamento. Após o segundo acoplamento, S1 foi analisado com deslocamento de 24 e 36 m e S2 com deslocamento de 27 e 39 m. Por fim, foi realizado o terceiro acoplamento e os perfis foram analisados com deslocamentos de 9 e 10,5 m nos sistemas S1 e S2 respectivamente.

Após os três acoplamentos, o sistema S1 foi carregado com mais solução de $NaHCO_3$ com abundância natural em $^{13}C$ a fim de manter o mesmo comprimento da banda, além de fornecer mais $^{13}C$ para a continuidade do processo de separação isotópica. Os dois sistemas continuaram a ser deslocados individualmente.

O produto enriquecido (Np), no sistema cromatográfico em contra corrente, é função da alimentação (No) e exponencialmente dependente do fator de fracionamento (α) e número de placas teóricas (s), como demonstra a equação (5).

$$Np = No.e^{S(\alpha-1)} \quad (5)$$

Onde:

No = fração molar de $^{13}C$ na alimentação;

Np = fração molar de $^{13}C$ no produto final (TB);

S = número de placas teóricas (S = L/HETP, onde L – comprimento da banda cromatográfica e HETP – altura equivalente de um prato teórico);

α = fator de fracionamento isotópico e, α -1 = ε – fator de enriquecimento isotópico.

### 3.2.3 Determinação da Massa Acumulada de $^{13}C$

Nos dois sistemas S1 e S2 foram calculadas as massas acumuladas de $^{13}C$ e $H_2{}^{13}CO_3$, bem como a concentração média do isótopo na região traseira da banda, a partir dos perfis de enriquecimento isotópico (% em átomos de $^{13}C$). Para a determinação da massa acumulada de $^{13}C$, propôs-se à equação 6, baseando-se no estudo realizado por Bendassolli et al. (1997). A referida equação considera as variáveis envolvidas no balanço de massa isotópico e às relacionadas com a determinação da massa de $^{13}C$.

O cálculo considera a abundância isotópica de $^{13}C$ obtida no perfil em função do comprimento da banda, além do volume do efluente (L) e concentração de C (mol $L^{-1}$).

$$M = \sum_{i=1}^{m} Vi \text{ Ci PMi } \frac{Ai}{100} \quad (6)$$

Onde:

M: massa de $^{13}C$ (g) acumulada no perfil da banda enriquecida;

Vi: volume (L) da solução de $CO_{2(aq)}$ efluente da fração i (20 cm,10 cm, 5 cm);

Ci: concentração de C (mol $L^{-1}$);

PMi: peso atômico do C na fração i (g $mmol^{-1}$ de C);

Ai: abundância média de $^{13}C$ na fração i (% em átomos de $^{13}C$), onde Ai/100: g de $^{13}C$/100 g de C.

Ai é determinado a partir de uma fração da banda de acordo com os pontos (cm) do perfil de enriquecimento, sendo X20 e X10 as abundâncias isotópicas de $^{13}C$ nos pontos 20 e 10 cm, pode-se obter Ai a partir da equação (7).

$$Ai = \frac{X20+X10}{2} \quad (7)$$

Obteve-se o PMi pelo balanço de massa isotópico entre os isótopos $^{12}C$ e $^{13}C$. Para se calcular o PMi de uma solução de $CO_{2(aq)}$ com concentração isotópica Ai, utilizou-se a equação 8 e 9, obtida a partir da equação 7.

$$PMi = \frac{Ai}{100}13 + (1 - \frac{Ai}{100})12 \quad (8)$$

$$PMi = \frac{Ai}{100} + 12 \quad (9)$$

A partir da equação 10, pode-se obter a massa de $CO_{2(aq)}$ (A) contida região enriquecida dos dois sistemas de colunas, onde:

$$A = \left[\left(\left(\frac{Ai}{100}\right) + 12\right) + 50\right].Vi.Ci \quad (10)$$

Onde:

$Ai^{13}C$: abundância média de $^{13}C$ (% em átomos);

Vi = volume (L) da solução de $CO_{2(aq)}$ efluente da fração i (20 cm,10 cm, 5 cm);

Ci: concentração de C (mol $L^{-1}$).

### 3.2.4 Preparo das amostras para determinação da abundância isotópica de $^{13}C$ no ANCA-GSL

Para obtenção do $^{13}CO_2$, proveniente do efluente ($H^{13}CO_3^-$) do sistema cromatográfico, foi utilizado o sistema de vácuo apresentado na Figura 16.

Inicialmente, realizou-se vácuo (pressão de aproximadamente $10^{-8}$ MPa) em parte da linha, pela abertura das torneiras T1, T12, T10, T9 e T8, T7 e T6.

Em seguida, fechou-se T6, T12 e T1, e deve ser aberta T2, T3, T4, T5 e T11 realizando vácuo, com auxílio da bomba difusora, até a pressão de $10^{-12}$ MPa. Após, fechou-se T11, T5, T4 T3 e T2, e abriu-se T13, admitindo gás He na linha de vidro. Durante a admissão do $He_{(g)}$, um septo de silicone estava acoplado na agulha (A1), após a admissão do He fechou-se a torneira T7, realizando a limpeza do He em partes linha, principalmente em FA, onde o $^{13}CO_2$ foi armazenado, abrindo T1 e T12, até a pressão de $10^{-8}$ MPa, fechou-se T12 e T1, abrindo em seguida T2, T3, T4 e T11 (pressão $10^{-12}$ MPa), fechou-se T10, T11, T4, T3 e T2, retirou-se o septo de silicone de A1 e acoplou-se rapidamente o frasco (FC) contendo a amostra de $H^{13}CO_3^-$ para a extração do $CO_2$.

Figura 16 - Sistema de vácuo para obtenção do $^{13}CO_{2(g)}$, constituído de bomba mecânica (BM), bomba difusora (BD), armadilhas criogênica contendo $CO_2(s)/C_2H_5OH$ (-32ºC) e $N_2$ (l) (-196ºC), medidor de vácuo Pyrani (PI), torneiras Kontes (T1 a T13), reservatório de gás Hélio (He), frasco coleta (FC) e frasco de armazenamento (FA)

Concluída a limpeza da linha de vidro abriu-se T7, liberando os gases que passam por duas armadilhas criogênicas (-32 e -196 ºC) para reter vapor de $H_2O$ e o $^{13}CO_2$ respectivamente. A transferência é imediata, sendo observada pelo medidor de vácuo. O $N_{2(g)}$, não sendo retido nas armadilhas, fluiu pela linha de vidro com abertura de T1, T12 e T10, após fechar essas torneiras, abriu-se T2, T3, T4 e T11.

No final, fecharam- se T11, T8, T4, T3 e T2, e a armadilha criogênica contendo $N_2$ (l) (-196 ºC) foi retirada e inserida em FA. O gás resultante ($^{13}CO_2$) foi transferido pela linha de vidro, sob vácuo, e retido em FA a -196 ºC (Figura 17). Em seguida, abriu-se a torneira T13 e admitiu-se gás He na linha de vidro e no frasco de armazenamento (FA), igualando a pressão atmosférica. O gás He foi admitido em FA para evitar contaminação de gases contidos na atmosfera (principalmente $CO_2$), proporcionado diluição isotópica do sistema. No final, FA (contendo $^{13}CO_2$ devidamente purificado) foi retirado (Figura 17) e conduzido para análise isotópica de $^{13}C$ em espectrômetro de massas com sistema automatizado (ANCA-GSL) (Figura 18).

Figura 17 - Procedimento para obtenção do $^{13}CO_{2(g)}$, proveniente do efluente ($H^{13}CO_3^-$) do sistema cromatográfico, utilizando sistema de vácuo

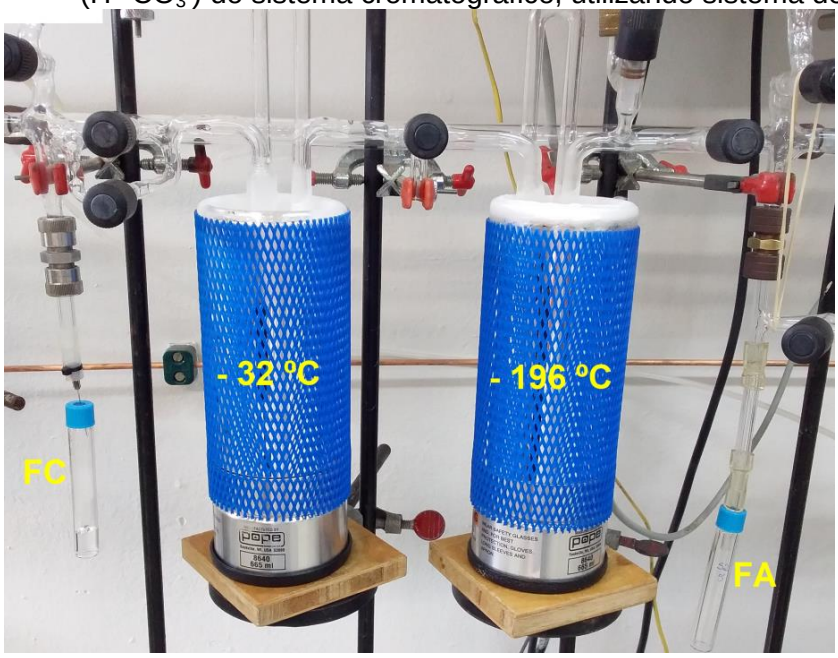


Figura 18 - Espectrômetro de massas com sistema automatizado (ANCA-GSL)

### 3.2.5 Fator de Fracionamento da separação dos isótopos de C

O fator de fracionamento dos isótopos $^{13}C$ e $^{12}C$ (α) foi determinado empregando uma coluna de acrílico de 3 cm de diâmetro interno e 180 cm de comprimento contendo resina aniônica DOWEX 1X8 com tamanho de partícula entre 74 e 149 µm até altura de 160 cm. O método foi adaptado de Ishimori (1960), utilizado por Trivelin (1976) para os isótopos de nitrogênio e por Bendassolli (1994) para os isótopos de enxofre.

Inicialmente a resina foi regenerada com solução de NaOH, e após lavagem com $H_2O$ desionizada, foi feito o carregamento dos sítios ativos da resina com $HCO_3^-$ proveniente da solução de $NaHCO_3$ (0,5 mol $L^{-1}$) com abundância natural em $^{13}C$ (fase solução). A velocidade linear de fluxo foi de 1,0 a 3,0 mL $cm^{-2}$ $min^{-1}$. O efluente foi recolhido de 10 em 10 mL e analisado isotopicamente a fim de verificar o total carregamento dos sítios ativos da resina. Após o carregamento do $HCO_3^-$ a resina foi lavada com água desionizada.

Os íons $HCO_3^-$ foram eluidos com solução de HCl (0,05 mol $L^{-1}$), o volume total do $H_2CO_3$ foi coletado e neutralizado em solução de NaOH, obtendo assim o $NaHCO_3$, o qual foi analisado por espectrometrias de massas e determinada a razão isotópica $^{13}C/^{12}C$, representando a fase resina (Rr). A solução de $NaHCO_3$ utilizada no carregamento dos íons $HCO_3^-$ também foi analisada no espectrômetro de massas, Delta V Advantage (Figura 19), o resultado obtido representou a razão $^{13}C/^{12}C$ da fase solução (Rs).

A partir dos valores do $\delta^{13}C$ (‰) determinou-se o fator de fracionamento isotópico (equação 11):

$$\alpha = \frac{Rr}{Rs} = \frac{(\delta‰^{13}C(r,s))}{10^3} + 1 \quad (11)$$

Onde:

Rr: Razão isotópica na fase resina ($^{13}C/^{12}C$);

Rs: Razão isotópica na fase solução ($^{13}C/^{12}C$).

A expressão $\frac{(\delta‰^{13}C(r,s))}{10^3}$ pode ser chamada de fator de enriquecimento isotópico ($\varepsilon$), e assim de equação (11) obtém-se a equação 12:

$$\alpha = \varepsilon + 1 \quad (12)$$

Figura 19 - Espectrômetro de massas Delta V Advantage – isotope Ratio MS da Thermo Scientific

### 3.2.6 Determinação da altura equivalente de uma placa teórica

A metodologia empregada na determinação da altura equivalente de uma placa teórica (HETP) baseou-se nos estudos de Spedding, Powell e Svec (1955) no qual foi constatado que com o deslocamento da banda cromatográfica de 50 a 60 vezes o seu comprimento, alcançava-se o um estado de equilíbrio isotópico, esse procedimento foi realizado por Trivelin (1976) também com os isótopos de nitrogênio.

Na determinação de HETP foi empregado um sistema composto por 4 colunas de acrílico de 180 cm de altura e 3 cm de diâmetro interno preenchidas até uma altura de 160 cm com resina aniônica DOEWX 1X8. Com a resina na forma de $OH^-$, eluiu-se pela resina solução de $NaHCO_3$ com fluxo de 1,0 a 3,0 mL cm $^{-2}$ min$^{-1}$ até formar uma banda de 40 cm, que após a lavagem com água desionizada foi eluida com HCl 0,05 mol L$^{-1}$.

Após o deslocamento da banda por cerca de 80 vezes o seu comprimento (32 m), foi realizada a coleta do perfil para análise isotópica de $^{13}C$.

A equação 13 relaciona o número de placas teóricas com o fator de fracionamento isotópico (α) e as razões isotópicas ($^{13}C/^{12}C$) em dois pontos delimitados por uma distância L.

$$Rn = \alpha^n . R \qquad (13)$$

Onde:

R e Rn: razões isotópicas $^{13}C/^{12}C$ de dois pontos da banda distantes de um comprimento L;

α: fator de fracionamento;

n: número de placas teóricas ou estágios teóricos.

Aplicando log nos dois termos da equação 13, obtêm-se as equações 14 e 15:

$$\text{Log } Rn = \log \alpha^n . R \qquad (14)$$

$$\text{Log } Rn = n \log \alpha + \log R \qquad (15)$$

Segundo Spedding, Powell e Svec (1955) na determinação da altura de uma placa teórica deve-se supor que no equilíbrio, ela seja constante (equação 16):

$$n = \frac{L}{HETP} \tag{16}$$

Substituindo (15) na equação (14), tem-se a equação (17):

$$\text{Log Rn} = \frac{L}{HETP} \log \alpha + \log R \tag{17}$$

Onde: HETP corresponde a altura equivalente de uma placa teórica.

A equação (16) representa uma reta do tipo Y = ax+b, quando relaciona log Rn em função de L (comprimento da banda de $HCO_3^-$). Deste modo o valor de HETP pode ser obtido a partir do coeficiente angular da reta (a), onde a=log α/HETP.

### 3.2.7 Regeneração dos sítios ativos da resina

No processo de enriquecimento, uma banda de $HCO_3^-$ é admitida à coluna regenerada à forma $R\text{-}OH^-$. Desta forma a etapa de regeneração da resina à forma $R\text{-}OH^-$ é realizada previamente à admissão da banda cromatográfica, sendo de fundamental importância para o processo de separação do $^{13}C$ (MAXIMO et al., 2013).

Durante o procedimento, a banda é deslocada pelo HCl, quando a banda entra em uma nova coluna, a anterior fica com a resina na forma $R\text{-}Cl^-$, e, para que a resina esteja apta para receber a banda novamente, ela deve ser regenerada a forma $R\text{-}OH^-$. O processo regenerativo compreende a substituição dos íons cloreto (R-Cl), dos sítios ativo da resina, pelos íons hidroxilas ($R\text{-}OH^-$).

A fase de regeneração compreende quatro etapas: lavagem do HCl do volume intersticial da resina, descompactação da resina (forma cloreto equilibrada em $H_2O$), admissão de solução regenerante NaOH e lavagem da resina com $H_2O$ desionizada para eliminar o excesso da base do volume intersticial. O ponto final do processo de regeneração foi obtido por titulometria.

Após a conclusão da última etapa do processo regenerativo da resina, a mesma esta em condições ideais para receber a banda de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) no sistema de enriquecimento de $^{13}C$.

### 3.2.7.1 Eliminação do HCl do volume intersticial

Após o deslocamento da banda cromatográfica com o HCl, permanece entre a resina, solução de HCl, sendo necessária sua remoção, dessa forma a coluna contendo a resina foi lavada com água desionizada. Durante a lavagem realizou-se a coleta do efluente de 1 em 1L no sistema S1 e de 100 em 100ml no sistema S2, as soluções foram homogeneizadas e por análise em cromatógrafo iônico DIONEX ICS-90 (Figura 20) obteve-se a concentração de $Cl^-$ nas alíquotas, determinando assim o volume necessário de água desionizada para eliminar todo $HCl^-$.

Figura 20 - Cromatógrafo iônico DIONEX ICS-90

### 3.2.7.2 Descompactação da resina

Com a resina devidamente lavada para remoção do excesso de HCl, é necessário descompactar o leito de resina, já que o fluxo das demais soluções acaba por compactar o polímero. A descompactação é feita com água desionizada

em um fluxo ascendente da base para o topo da coluna, a partir do momento em que resina alcança cerca de 5 cm de distância do pistão, no topo da coluna, o fluxo de água é interrompido. Com o auxílio do pistão retira-se o excesso de água e a resina está pronta para receber a solução regenerante.

### 3.2.7.3 Regeneração da resina com NaOH

Com a resina a forma $R\text{-}Cl^-$, procedeu-se a eluição da solução 2 mol $L^{-1}$ de NaOH regenerando a resina à forma $R\text{-}OH^-$, durante essa etapa os íons $OH^-$ deslocam os íons $Cl^-$ dos sítios ativos da resina. A equação (17) representa a etapa regenerativa da resina aniônica da forma $R\text{-}Cl^-$ para $R\text{-}OH^-$.

$$R\text{-}Cl^- + Na^+_{(s)} + OH^-_{(s)} \rightarrow R\text{-}OH^- + Na^+_{(s)} + Cl^-_{(s)} \qquad (18)$$

Onde: R = resina e S = solução.

A velocidade de fluxo foi mantida na faixa de 1 a 3 ml $cm^{-2}$ $min^{-1}$, com vazão de 80 a 100 ml $min^{-1}$ no sistema S1 e vazão de 50 a 66 ml $min^{-1}$ no sistema S2. Para avaliar o momento da completa regeneração da resina, foram coletadas alíquotas de 2 em 2 L para o sistema S1 e alíquotas de 1 em 1L para o sistema S2. A concentração de NaOH foi determinada por titulometria com $H_2SO_4$ 0,0485 mol $L^{-1}$.

### 3.2.7.4 Eliminação do NaOH do volume intersticial da resina

Após a completa regeneração dos sítios ativos da resina, foi necessário lavar os interstícios do polímero com água desionizada para remoção do excesso de NaOH. A lavagem foi realizada com água desionizada com coleta do efluente de 0,5 em 0,5L para o sistema S1 e 1 em 1L para o sistema S2. As amostras foram homogeneizadas e a concentração do NaOH no efluente foi titulada com solução de $H_2SO_4$ 0,0485 mol $L^{-1}$ e assim verificou-se o momento da completa remoção do NaOH no volume intersticial.

### 3.2.8 Obtenção do $^{13}CO_2$

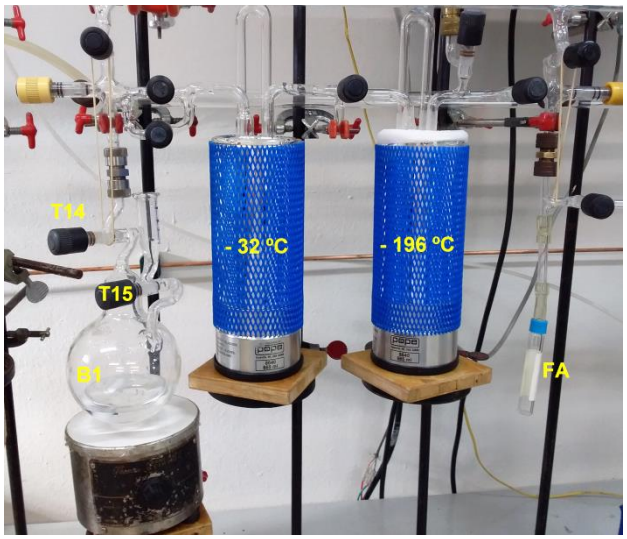
Após a obtenção do $NaH^{13}CO_3$ efluente do sistema cromatográfico, a solução é levada a linha de vácuo, e por reação com $H_3PO_4$ obtém-se o $^{13}CO_2$. O sistema utilizado nesse procedimento encontra-se na Figura 16, porém no lugar de A1 e FC, é acoplado um balão de reação B1 (Figura 21).

Inicialmente adiciona-se $H_3PO_4$ (50%) no balão B1, sendo este acoplado a linha de vácuo, com o auxílio da bomba mecânica realiza-se vácuo ($10^{-8}$ Mpa) em parte da linha e em FA, abrindo as torneiras na sequência T1, T12, T10, T9, T8, T7, T6 e T14. Em seguida fecha-se T14, T12, T6 e T1. O $NaH^{13}CO_3$ é adicionado ao copo acoplado ao balão B1 que é transferido para o interior do balão com a abertura da torneira do balão T15, lavando o copo com água desionizada até a total transferência do $NaH^{13}CO_3$. O processo é feito vagarosamente para evitar a entrada de ar atmosférico em B1.

A reação de formação do $^{13}CO_2$ é relativamente rápida de acordo com o apresentado na equação 19:

$$3\ NaH^{13}CO_3 + H_3PO_4 \rightarrow 3\ ^{13}CO_2 + Na_3PO_4 + 3\ H_2O \qquad (19)$$

Figura 21 - Procedimento para obtenção do $^{13}CO_{2(g)}$, proveniente do efluente ($NaH^{13}CO_3$) do sistema cromatográfico, utilizando sistema de vácuo



O tempo total do processo de obtenção do $^{13}CO_2$ é de 10 minutos, e, durante esse período é realizado vácuo em parte da linha até pressão de $10^{-8}$ Mpa, abrindo as torneiras T1, T12, T10 e T8, após fechar T12 e T1, abre-se T2, T3, T4 e T11 (pressão $10^{-12}$ Mpa).

Após o tempo de reação, fecham-se as torneiras T10, T11, T4, T3 e T2. Com a abertura da torneira 714 e T7, o $^{13}CO_2$ é liberado lentamente, passando pela primeira armadilha criogênica (-32°C) para reter $H_2O$ e a segunda armadilha criogênica (-196ºC) onde o $^{13}CO_2$ ficará retido, fecha-se T8. Em seguida abre-se T10, retira-se o trap de $N_2$(l) e coloca-o em FA para que o gás seja transferido e fecha-se T10. Para a limpeza de possíveis impurezas é feito vácuo em FA ($10^{-8}$ MPa) com a abertura de T1, e T12, fecha-se T12 e T1, abrindo em seguida T2, T3, T4 e T11 (pressão de $10^{-12}$ Mpa) fecha-se T11, T4, T3 e T2. Abre-se em seguida T13 admitindo gás He em FA para evitar contaminações do ar atmosférico. Retira-se FA que segue para análise no espectrômetro de massas ANCA-GSL.

### 3.2.9 Obtenção do $^{13}CO$ a partir do $^{13}CO_2$

O processo de obtenção do $^{13}CO$ foi realizado com base na redução do $^{13}CO_2$ a $^{13}CO$. Inicialmente o $^{13}CO_2$ foi armazenado em um cilindro de aço inoxidável, em seguida o gás passou por um leito catalítico contendo uma liga de Pt e Rh, a temperatura do leito foi de 900ºC. O cilindro contendo o $^{13}CO_{2(g)}$ foi aquecido com o auxílio de um soprador térmico (70º C) para facilitar a transferência do gás, a massa do $^{13}CO_2$ transferida foi determinada por gravimetria.

Devido à dificuldade de fazer a análise do $^{13}CO$, foi realizado o método proposto por Sant'Ana Filho et al. (2012) para síntese de ureia. O gás, teoricamente convertido a $^{13}CO$, foi recebido em um reator com capacidade de 1 L, revestido internamente com PTFE (politetrafluoretileno), contendo S, em seguida adicionou-se ao reator $NH_3$, metanol e $H_2S$. O reator foi para um sistema de aquecimento com agitação magnética e após o tempo de reação o reator foi aberto e determinada a massa obtida de $^{13}CO(NH_2)_2$, a partir dessa massa calculou-se o rendimento da conversão de $^{13}CO_2$ a $^{13}CO$.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando o $Cu^0$ como catalisador no lugar da liga de Pt e Rh.

# 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1 Regeneração das colunas de resina aniônica Dowex 1X8

O processo de regeneração das resinas da forma R-$Cl^-$ à forma R-$OH^-$ foi avaliado nos dois sistemas individuais de coluna (S1 e S2) conforme metodologia descrita no item 3.2.7, subdividindo-se em quatro etapas específicas: lavagem do HCl do volume intersticial da resina; descompactação da resina; eluição da solução regenerante (NaOH); eliminação da solução de NaOH do volume intersticial da resina.

### 4.1.1 Eliminação do HCl do volume intersticial da resina

Após o deslocamento da banda de $HCO_3^-$, a resina fica com solução de HCl no volume intersticial. A resina é submetida à lavagem com água desionizada a fim de eliminar o HCl, de acordo com o procedimento descrito em 3.2.7.1. A partir dos resultados obtidos com a análise de $Cl^-$ dos efluentes dos sistemas de enriquecimento, determinou-se que o volume necessário de água desionizada foi de 25 L para remover o excesso de HCl no sistema S1 (Figura 22), enquanto que no sistema S2 (Figura 23) o volume necessário de água desionizada foi de 10 L. Os volumes foram determinados a partir do limite de detecção do equipamento. As Figuras 22 e 23 relacionam a concentração de $Cl^-$ com o volume de $H_2O$ utilizado na lavagem, observa-se que mesmo com um volume em excesso de $H_2O$ a remoção de $Cl^-$ não foi completa, porém a etapa de regeneração dos sítios ativos da resina da forma R-$Cl^-$ para R-$OH^-$, promove a eliminação completa do HCl do volume intersticial da resina.

Figura 22 - Eliminação da solução de HCl do volume intersticial da resina do sistema S1

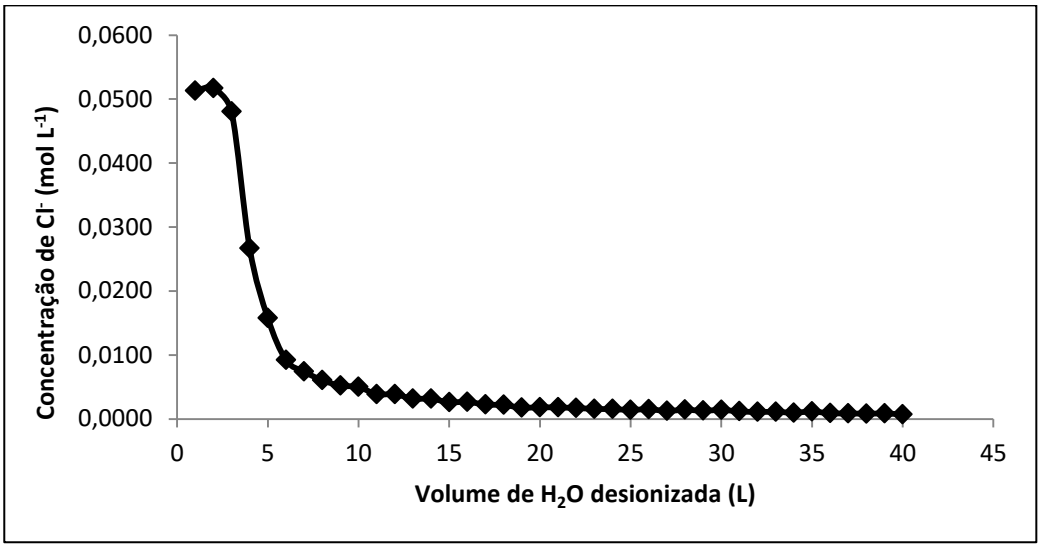
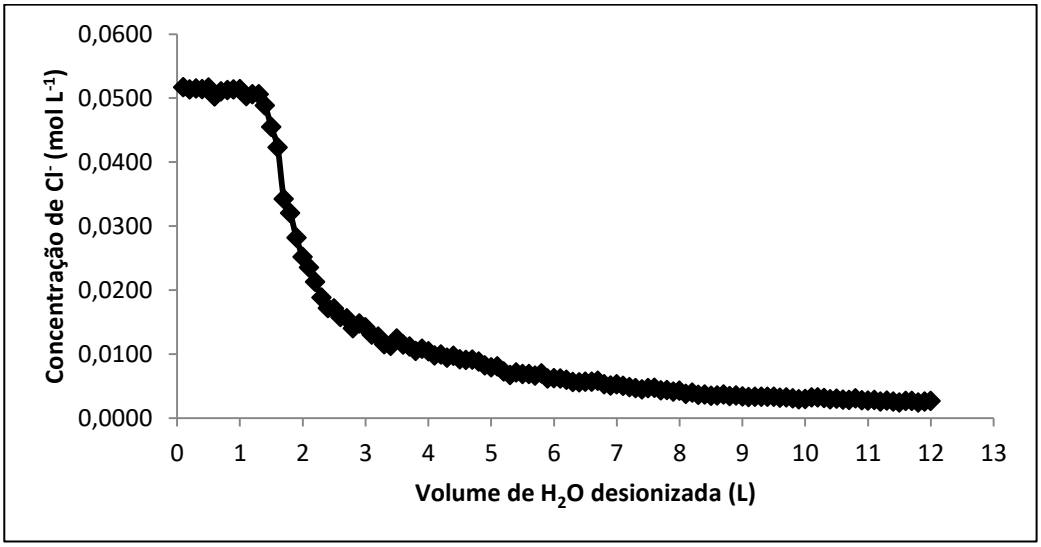



Figura 23 - Eliminação da solução de HCl do volume intersticial da resina do sistema S2




### 4.1.2 Descompactação das resinas

A etapa de descompactação das resinas ocorreu de acordo com o procedimento 3.2.7.2. A resina, estando à forma R-$Cl^-$, foi submetida a um fluxo ascendente de $H_2O$ desionizada até chegar a aproximadamente 5 cm do topo da coluna. Após interromper o fluxo de $H_2O$, foi observado um tempo médio de 30 minutos para a altura do leito cromatográfico permanecer constante.

### 4.1.3 Regeneração dos sítios ativos da resina

O procedimento de substituição dos íons $Cl^-$ por $OH^-$ dos sítios ativos da resina Dowex 1X8 encontra-se descrito no item 3.2.7.3. Nesta etapa foi avaliado o volume necessário de solução de 2 mol $L^{-1}$ de NaOH para a regeneração dos sítios ativos da resina, no sistema S1 contendo cerca de 6 litros de resina e o sistema S2 com aproximadamente 3 litros de resina.

No sistema S1 (Figura 24) foi necessária a utilização de 90 litros de NaOH 2 mol $L^{-1}$ o que equivale a 30 mmol de $OH^-$ por mL de resina. Na Figura 25 verifica-se que para o sistema S2 o volume empregado de NaOH para regeneração foi de 40 litros, equivalente a 26 mmol de $OH^-$ por mL de resina.

Para o sistema S1 o fluxo na etapa de regeneração foi mantido em 107,8 ml $min^{-1}$ (2,8 mL $cm^{-2}$ $min^{-1}$) e 73,2 mL $min^{-1}$ (1,9 mL $cm^{-2}$ $min^{-1}$) para a etapa entre 1 e 15 L e 16 a 90 L respectivamente. No sistema S2 o fluxo foi mantido, em média, em 51,0 mL $min^{-1}$ (2,6 mL $cm^{-2}$ $min^{-1}$) e 37 mL $min^{-1}$ (1,9 mL $cm^{-2}$ $min^{-1}$) para etapa de 1 a 12 L e 13 a 40 L, respectivamente.

A partir do volume da resina aniônica e o volume total de solução de NaOH necessário a regeneração dos sítios ativos da resina, foi calculado o volume leito (VL) que representa a razão entre o volume do regenerante e o volume da resina aniônica. No sistema S1 com volume de resina de 6 L e consumo de 90 L de solução 2 mol $L^{-1}$ de NaOH, o VL foi 15, o que pode ser considerado uma eluição pobre. Para o sistema S2 o volume de resina foi de 3 L utilizando 40 L de NaOH para sua regeneração, o VL calculado foi de 13,3, também uma eluição pobre.

Figura 24 - Regeneração dos sítios ativos da resina aniônica Dowex 1X8 (sistema S1) da forma cloreto ($R\text{-}Cl^-$) a hidroxila ($R\text{-}OH^-$), com solução 2 mol $L^{-1}$ de NaOH

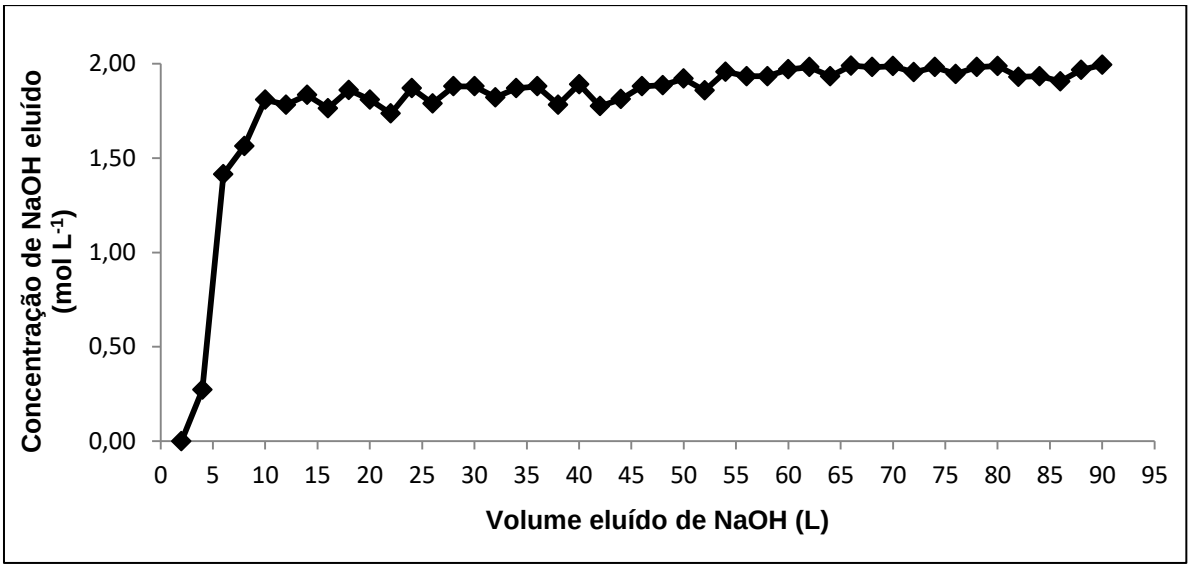
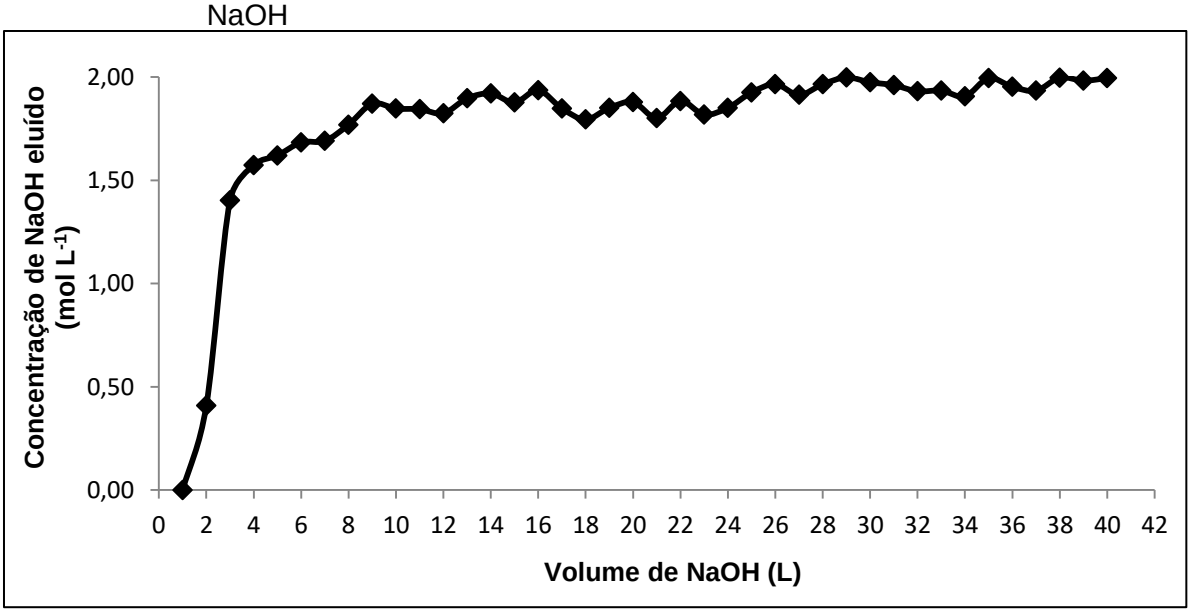



Figura 25 - Regeneração dos sítios ativos da resina aniônica Dowex 1X8 (sistema S2) da forma cloreto ($R\text{-}Cl^-$) a hidroxila ($R\text{-}OH^-$), com solução 2 mol $L^{-1}$ de NaOH




A Tabela 3 apresenta os resultados relacionando a eficiência do processo de regeneração dos sítios ativos em função do volume de NaOH e o tempo necessário para regeneração da resina do sistema S1. Pode ser observado que no início do processo regenerativo a eficiência é maior em relação a um menor volume de regenerante, ao longo do tempo a eficiência decresce requerendo um volume elevado de NaOH para garantir a regeneração total dos sítios ativos da resina.

Considerando que a capacidade da resina aniônica Dowex 1X8, para cloreto ($R\text{-}Cl^-$) é da ordem de 1,2 mol $L^{-1}$ de $Cl^-$ e, que o volume da resina, na forma $Cl^-$, equilibrada em água para o sistema S1 foi de 6 L, pode-se calcular que a razão $OH^-/Cl^-$, para a resina considerada foi, em média, de 25, exatamente o valor teórico do coeficiente de seletividade para a resina Dowex 1X8 ($EOH^-/Cl^- = 25$).

O tempo de regeneração para o sistema S1 é de aproximadamente 17 horas com eficiência de regeneração de 99,70%. Apesar de apresentar um tempo elevado para regeneração, o deslocamento da banda cromatográfica não é comprometido, pois o sistema apresenta número suficiente de colunas para garantir um intervalo de tempo até que a coluna regenerada receba novamente a banda de $HCO_3^-$.

Os dados referentes à eficiência de regeneração do sistema S2 encontram-se na Tabela 4. Assim como acontece no sistema S1, o início do processo regenerativo apresenta maior eficiência e demanda um volume excessivo de regenerante para 100% de regeneração, dessa forma determinou-se que o volume necessário de NaOH foi de 40 L para obter regeneração com 99,73% de eficiência em cerca de 11 horas de trabalho. Neste sistema de colunas a razão $OH^-/Cl^-$ foi de 22,2, e, portanto, muito próximo do coeficiente de seletividade ($EOH^-/Cl^- = 25$) para a resina.

A eficiência de regeneração obtida foi adequada para o andamento do trabalho. Para garantir a regeneração de 100% dos sítios ativos seria necessário um tempo e volume de solução elevado. Porém, destaca-se que no final do processo de regeneração, o efluente contendo NaOH, foi recuperado em reservatório de fibra de vidro, possibilitando o reuso da referida solução.

Tabela 3 - Eficiência do processo regenerativo do Sistema S1

| Volume de NaOH (L) | Regeneração (%) | Tempo de regeneração (horas) |
|---|---|---|
| 10 | 90,46 | 1,9 |
| 20 | 90,49 | 3,7 |
| 30 | 94,02 | 5,6 |
| 40 | 94,58 | 7,4 |
| 50 | 96,05 | 9,3 |
| 60 | 98,52 | 11,1 |
| 70 | 99,36 | 13,0 |
| 80 | 99,41 | 14,8 |
| 90 | 99,70 | 16,7 |

Tabela 4 - Eficiência do processo regenerativo do Sistema S2

| Volume de NaOH (L) | Regeneração (%) | Tempo de regeneração (horas) |
|---|---|---|
| 5 | 81,00 | 1,4 |
| 10 | 92,37 | 2,8 |
| 15 | 93,84 | 4,2 |
| 20 | 93,90 | 5,6 |
| 25 | 96,27 | 6,9 |
| 30 | 98,74 | 8,3 |
| 35 | 99,71 | 9,7 |
| 40 | 99,73 | 11,1 |

A utilização de concentrações maiores de NaOH não foram avaliadas, pois pode causar problemas na estrutura física do polímero, e concentrações inferiores, o tempo de regeneração pode ser muito elevado e inviabilizar o processo de separação isotópica.

### 4.1.4 Eliminação do NaOH do volume intersticial da resina

Após a regeneração foi feita a remoção do NaOH do volume intersticial da resina com utilização de $H_2O$ desionizada conforme descrito em 3.2.7.4. Para a completa remoção da solução regenerante (NaOH) foi necessário um volume de 5 e 2 L de $H_2O$ desionizada para os sistemas S1 e S2, respectivamente. As Figuras 26 e 27 apresentam as curvas para retirada do excesso de solução de NaOH em função do volume de $H_2O$ desionizada.

Figura 26 - Retirada do NaOH do volume intersticial de resina do sistema S1

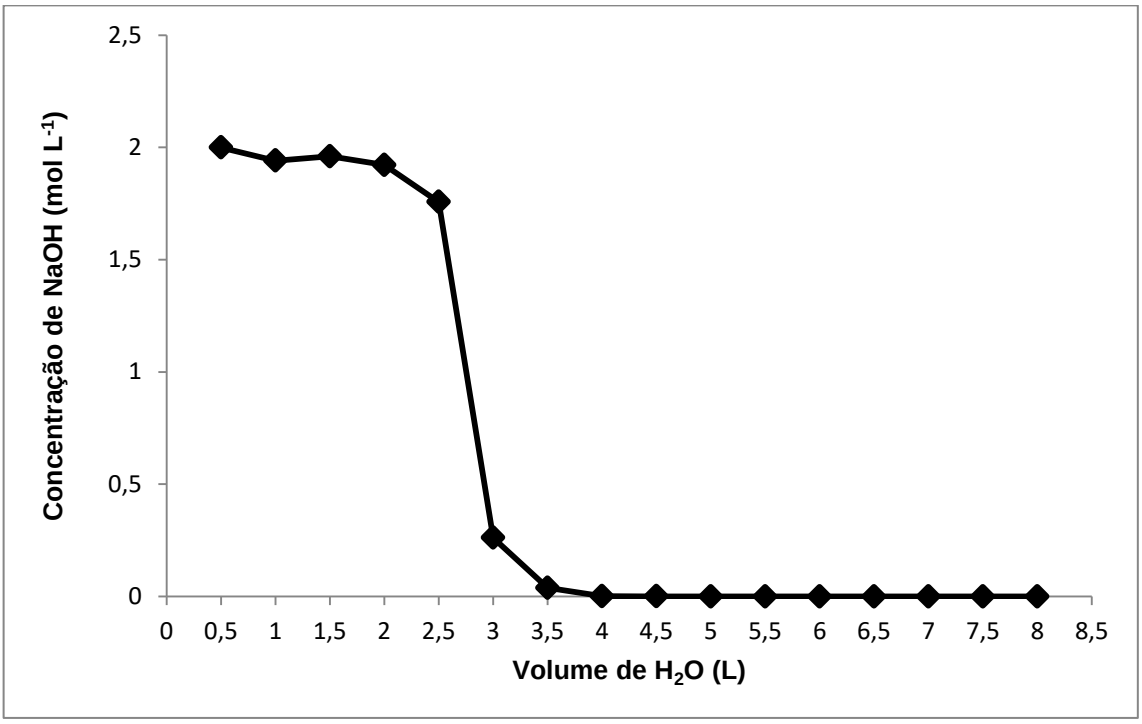
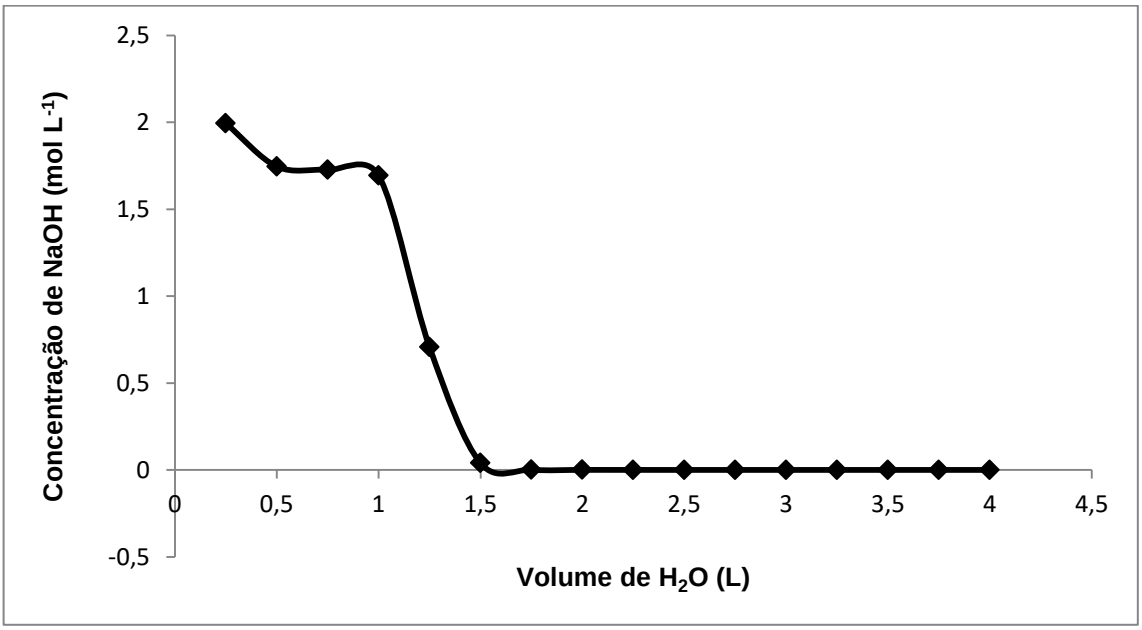



Figura 27 - Retirada do NaOH do volume intersticial de resina do sistema S2



## 4.2 Formação da banda cromatográfica de $H^{13}CO_3^-$

Para formação da banda de $H^{13}CO_3^-$ no sistema S2 de enriquecimento foram admitidos cerca de 6 litros de solução 0,05 mol $L^{-1}$ de $NaHCO_3$, saturando os sítios ativos da resina Dowex 1X8 na forma R-$HCO_3^-$. Na lavagem da resina aniônica, com o objetivo de eliminar o $NaHCO_3$ em excesso no volume intersticial, foi utilizado cerca de 6 L de $H_2O$ desionizada.

No sistema S1, a banda de $HCO_3^-$ de 1,40 m (1 coluna) foi formada com utilização de 12 L de solução 0,05 mol $L^{-1}$ de $NaHCO_3$, e para a eliminação do excesso do sistema foi empregado cerca de 12 L de $H_2O$ desionizada.

O deslocamento da banda de $HCO_3^-$ foi realizada com o emprego de solução 0,05 mol $L^{-1}$ de HCl (eluente). Verificou-se que para cada coluna deslocada nos sistemas S1 e S2, operando a uma velocidade média de deslocamento da ordem de 3,0 cm $h^{-1}$ para os respectivos sistemas S1 e S2, o consumo de ácido foi da ordem de 14 e 4 L. Com o deslocamento da banda observou-se dois limites definidos da banda cromatográfica, conforme pode ser observado na Figura 28. Durante a operação do sistema, a FB apresentou-se muito bem definida e de fácil visualização em razão da diferença de tonalidade, sendo uma parte amarela (R-$HCO_3^-$) para outra marrom (R-$OH^-$).

A vazão do volume efluído no processo de deslocamento da banda foi mantida na faixa entre 1 a 3 mL $cm^{-2}$ $min^{-1}$, considerando ser esta a vazão recomendada e utilizada em diversos trabalhos (ABRÃO, 1972; HARLAND, 1994). Observou-se que a faixa de vazão mais apropriada foi de 1,5 a 2 mL $cm^{-2}$ $min^{-1}$ correspondendo de 29-39 mL $min^{-1}$ para o sistema S2 e de 58-77 mL $min^{-1}$ para o sistema S1. Park e Michaels (1994) verificaram que vazões muito baixas influenciavam num decréscimo do poder de separação da resina pela diminuição do número de placas teóricas.

A pressão de trabalho que se mostrou mais adequada ao sistema foi de 0,245 MPa. Pressões inferiores promovia formação gasosa na frente de deslocamento pela não solubilização do $^{13}CO_{2(g)}$ e devido a pequenas quantidades de $^{13}CO_2$ proveniente da solução de NaOH comercial com o $H^{13}CO_3^-$ liberando $^{13}CO_2$.

Figura 28 - Visualização da TB (traseira da banda) e FB (frente da banda) durante o DBC (deslocamento de uma banda cromatográfica) de $HCO_3^-$ no sistema S2

Os testes realizados permitiram verificar que a concentração mais apropriada para o trabalho é a concentração de 0,05 mol $L^{-1}$ de HCl, principalmente com relação a formação de gases. Esta concentração proporcionou melhores condições para visualização da banda de $HCO_3^-$, embora com a perspectiva de obtenção de uma massa mais reduzida de $NaH^{13}CO_3$. Segundo Park e Michaels (1994) este aumento da eficiência está diretamente relacionado ao aumento do poder de separação da resina. Por outro lado, Bendassolli (1997) observou um aumento da eficiência de separação isotópica em experimentos que se utilizou de concentrações mais baixas de HCl, obtendo maior enriquecimento isotópico de $^{34}S$, quando trabalhou com resina aniônica Dowex 1X8. A influência da concentração da banda sobre a eficiência de separação isotópica merece ser mais bem estudada em trabalhos futuros.

Os pistões apresentaram eficiência no controle da pressão pela perfeita vedação e controle de fluxos durante a passagem da banda da base de uma coluna para o topo da coluna seguinte, não permitindo perdas de gás $^{13}CO_2$, nesta etapa do processo de separação dos isótopos estáveis de carbono.

### 4.3 Enriquecimento isotópico de $^{13}C$ nos sistemas individuais de colunas

As abundâncias isotópicas de $^{13}C$, no sistema S1, após 14 (21 m), 30 (45 m), 40 (60 m), 51 (76,5 m), 60 (90 m) e 78 (117 m) DBC encontram-se na Tabela 5, sendo representada de acordo com o deslocamento da banda cromatográfica (DBC), no sistema de colunas.

Pode-se observar na Tabela 5 o aumento da região enriquecida em $^{13}C$ (% em átomos de $^{13}C$) nos perfis analisados, com 14 DBC a fração enriquecida (abundância isotópica em $^{13}C$ acima da natural) da banda era de 20 cm, com 30, 40, 51 e 60 DBC a fração média foi de 40 cm, chegando a 80 cm com 78 DBC. Além de aumentar a região enriquecida do isótopo verifica-se um aumento progressivo da abundância isotópica em $^{13}C$, passando de 2,38 (14 DBC) para 7,69% (60 DBC) em átomos de $^{13}C$.

Comparando os perfis isotópicos em $^{13}C$ após 14 DBC e 60 DBC, observa-se o empobrecimento da frente da banda cromatográfica, com 14 DBC a fração mais empobrecida estava com 0,50% em átomos de $^{13}C$ e com 60 DBC chegou a 0,39% em átomos de $^{13}C$.

A cada análise de perfil retirava-se uma parte da fração empobrecida em $^{13}C$ para manter um patamar com abundância natural em $^{13}C$, sendo retirados entre 30 e 40 cm da frente da banda. A reposição foi feita com o $NaHCO_3$ de abundância isotópica natural correspondente a fração empobrecida retirada. O único caso em que foi retirada uma fração maior da faixa empobrecida foi com 60 DBC, retirando 50 cm dessa fração.

Os dados da Tabela 5 indicam que entre 60 e 78 DBC ocorreu uma redução no enriquecimento em $^{13}C$, na traseira da banda (últimos 20 cm), e no último centímetro da banda, a abundância passou de 7,69 para 5,35% em átomos de $^{13}C$. Os perfis (60 e 78 DBC) indicam ainda uma diluição isotópica nos últimos 20 cm da TB e incremento na faixa de 80 a 30 cm da banda com 78 DBC. Essa alteração no perfil de enriquecimento isotópico provavelmente foi causada pela alteração no

processo de deslocamento da banda de $HCO_3^-$. A partir de 60 DBC o deslocamento da banda de $HCO_3^-$ não mais foi contínuo (24 horas/dia), por motivos de segurança, com perda de duas colunas de acrílico e problemas com as tubulações de poliéster que interligam as colunas cromatográficas. Desta forma, o deslocamento da banda passou a ser realizado no período diurno (8 a 10 horas/dia) e permanecendo parada nos períodos noturnos e fins de semana.

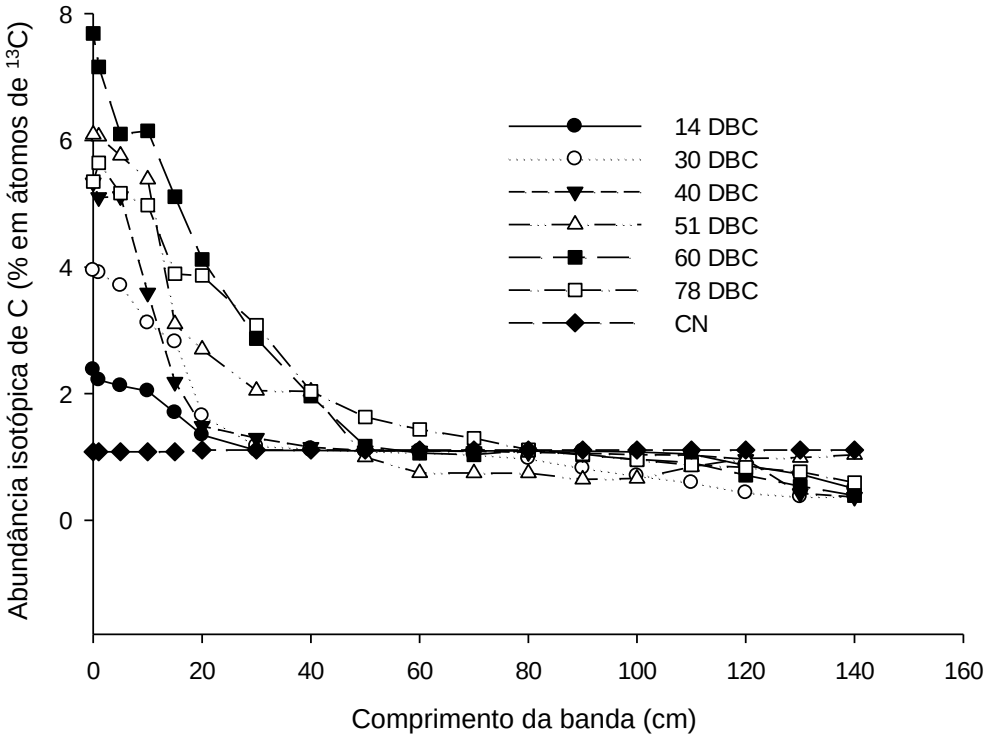
Tabela 5 - Abundância isotópica de C (% em átomos de $^{13}C$) em perfis no sistema S1

| **Ponto de coleta (cm)** | **Deslocamento da banda de $HCO_3^-$ (DBC)** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **14** | **30** | **40** | **51** | **60** | **78** |
| | **% em átomos de $^{13}C$** | | | | | |
| **140** | 0,50 | 0,38 | 0,37 | 1,04 | 0,39 | 0,59 |
| **130** | 0,73 | 0,37 | 0,42 | 0,99 | 0,54 | 0,77 |
| **120** | 0,86 | 0,43 | 0,96 | 0,97 | 0,71 | 0,84 |
| **110** | 1,04 | 0,59 | 1,03 | 0,84 | 0,91 | 0,87 |
| **100** | 1,08 | 0,70 | 1,06 | 0,66 | 0,96 | 0,95 |
| **90** | 1,09 | 0,82 | 1,07 | 0,64 | 1,03 | 1,04 |
| **80** | 1,09 | 0,98 | 1,09 | 0,74 | 1,10 | 1,11 |
| **70** | 1,09 | 1,04 | 1,09 | 0,74 | 1,03 | 1,30 |
| **60** | 1,10 | 1,07 | 1,10 | 0,77 | 1,06 | 1,43 |
| **50** | 1,10 | 1,09 | 1,15 | 1,00 | 1,07 | 1,63 |
| **40** | 1,10 | 1,13 | 1,15 | 2,03 | 1,96 | 2,04 |
| **30** | 1,10 | 1,17 | 1,30 | 2,04 | 2,87 | 3,08 |
| **20** | 1,35 | 1,65 | 1,48 | 2,70 | 4,12 | 3,87 |
| **15** | 1,70 | 2,82 | 2,18 | 3,10 | 5,11 | 3,89 |
| **10** | 2,04 | 3,12 | 3,59 | 5,39 | 6,15 | 4,97 |
| **5** | 2,12 | 3,71 | 5,12 | 5,76 | 6,10 | 5,16 |
| **1** | 2,21 | 3,91 | 5,10 | 6,06 | 7,16 | 5,64 |
| **0** | 2,38 | 3,95 | 5,33 | 6,09 | 7,69 | 5,35 |

Com a paralização do deslocamento da banda de $HCO_3^-$ deve ocorrer a difusão de massa de $^{13}CO_2$, no perfil da banda, com a alteração da pressão do sistema, e, consequentemente o processo de diluição. A redução da pressão no sistema cromatográfico, no deslocamento da banda, objetivando o deslocamento continuo, não foi viável, devido ao incremento na formação de gases ($CO_2$), dificultando o deslocamento bem como o processo de troca isotópica.

Na Figura 29, estão representadas as curvas de enriquecimento de $^{13}C$ em função do DBC construídas a partir dos dados da Tabela 5. Comparando os perfis de enriquecimento com a abundância natural do isótopo $^{13}C$, observa-se que ocorreu um acúmulo do isótopo na região traseira da banda sendo o valor máximo de enriquecimento de 7,69% em átomos de $^{13}C$ no último centímetro da traseira da banda com 60 DBC. No mesmo perfil destaca-se um aumento no patamar da fração empobrecida no isótopo, demonstrando a importância da reposição da banda e manter um patamar com abundância natural em $^{13}C$ (1,08% em átomos de $^{13}C$).

Figura 29 - Perfis de enriquecimento sistema S1




Nas Tabelas 6 e 7 estão apresentados os dados de abundância isotópica de C (% em átomos de $^{13}C$), massa acumulada de $^{13}C$ e massa acumulada de $H_2{}^{13}CO_3$ na fração enriquecida da banda de $H^{13}CO_3^-$ do sistema S1. A massa acumulada de $^{13}C$ e $H_2{}^{13}CO_3$ foi calculada, respectivamente, de acordo com as equações (6) e (10), a partir dos perfis apresentados na Tabela 5.

Pode-se observar nas Tabelas 6 e 7 um aumento na massa acumulada de $^{13}C$ com o deslocamento da banda cromatográfica (DBC), passando de 0,25 para 1,33g, com 14 e 78 DBC, respectivamente. Destaca-se que mesmo com o decréscimo, da abundância isotópica entre 60 e 78 DBC, nos últimos 20 cm da traseira da banda, a massa acumulada de $^{13}C$ apresentou um aumento, embora de apenas 0,07g. Na Tabela 7 pode-se observar que a massa total acumulada de $H_2{}^{13}CO_3$ foi de 238,81g e, nos últimos 10 cm, da traseira da banda (TB), 34,12 g, com abundância isotópica média de 5,25 % em átomos de $^{13}C$. Com a massa de $H_2{}^{13}CO_3$, contida nos 10 cm da TB, é possível, a partir de processos químicos ($H_2{}^{13}CO_3 \leftrightarrow {}^{13}CO_2 + H_2O$; ${}^{13}CO_2 + 2\ NaOH \leftrightarrow Na_2{}^{13}CO_3 + H_2O$ e ${}^{13}CO_2 + 2\ NH_3 \leftrightarrow {}^{13}CO(NH_2)_2 + H_2O$), obter: 58,32 g de $Na_2{}^{13}CO_3$; 24,23 g de $^{13}CO_2$ e 26,4 g de $^{13}CO(NH_2)_2$. Na conversão do $^{13}CO_2$ ou $^{13}CO$, em ureia-$^{13}C$, considera-se rendimento da ordem de 80 %.

Os dados das Tabelas 6 e 7 mostram que o acúmulo de massa (g) de $H_2CO_3$ ($^{13}CO_{2(aq)}$) permaneceu praticamente constante até 51 DBC, apresentando um incremento significativo a partir de 60 DBC, com a expansão da fração enriquecida da banda. O acúmulo de massa de $H_2CO_3$, na fração enriquecida da banda, após 78 DBC quando comparado com 51 DBC apresentou aumento de 75%, mesmo percentual de fração enriquecida da banda (TB), passando de 40 para 70 cm, respectivamente, para 51 e 78 DBC.

A partir do enriquecimento obtido com 78 DBC, no sistema S1, foi possível fazer a interação entre os sistemas individuais de colunas, transferindo os últimos 10 cm da traseira da banda do sistema S1 para o sistema S2, conforme descrito no item 3.2.2.

Tabela 6 - Abundância isotópica de $^{13}C$ (átomos %), massa acumulada de $^{13}C$ e de $H_2{}^{13}CO_3$ após 14, 30 e 40 DBC no sistema S1

| Perfil (cm) | Abundância na fração* (% em átomos de $^{13}C$) | Massa acumulada de $^{13}C$ (g) | Massa acumulada de $H_2{}^{13}CO_3$ (g) |
|---|---|---|---|
| | | **14 DBC** | |
| **40 – 30** | 1,10 | 0,07 | 34,11 |
| **30 – 20** | 1,22 | 0,08 | 34,11 |
| **20 – 15** | 1,52 | 0,05 | 17,05 |
| **15 – 10** | 1,87 | 0,06 | 17,06 |
| **10 – 5** | 2,08 | 0,07 | 17,06 |
| **5 – 1** | 2,17 | 0,06 | 13,64 |
| **1 – 0** | 2,30 | 0,02 | 3,41 |
| **Total** | | **0,41** | **136,43** |
| | | **30 DBC** | |
| **40 – 30** | 1,15 | 0,08 | 34,11 |
| **30 – 20** | 1,41 | 0,09 | 34,11 |
| **20 – 15** | 2,23 | 0,07 | 17,06 |
| **15 – 10** | 2,97 | 0,10 | 17,06 |
| **10 – 5** | 3,41 | 0,11 | 17,06 |
| **5 – 1** | 3,81 | 0,10 | 13,65 |
| **1 – 0** | 3,93 | 0,03 | 3,41 |
| **Total** | | **0,58** | **136,45** |
| | | **40 DBC** | |
| **40 – 30** | 1,22 | 0,09 | 34,11 |
| **30 – 20** | 1,39 | 0,10 | 34,11 |
| **20 – 15** | 1,83 | 0,07 | 17,06 |
| **15 – 10** | 2,89 | 0,10 | 17,06 |
| **10 – 5** | 4,35 | 0,16 | 17,06 |
| **5 – 1** | 5,11 | 0,15 | 13,65 |
| **1 – 0** | 5,22 | 0,04 | 3,41 |
| **Total** | | **0,69** | **136,46** |

*dados entre dois pontos de amostragem na traseira da banda enriquecida de $H^{13}CO_3^-$.

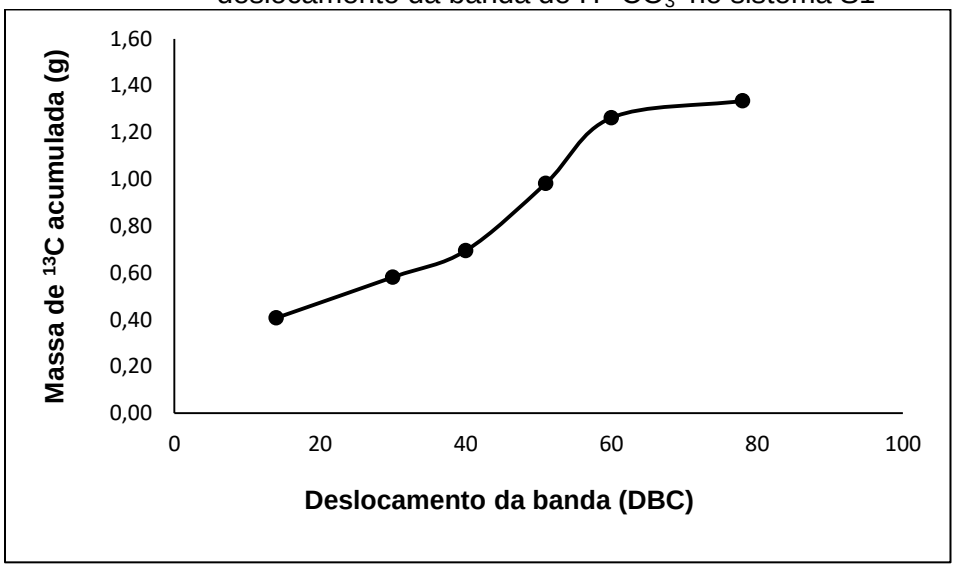
Tabela 7 - Abundância isotópica de $^{13}C$ (átomos %), massa acumulada de $^{13}C$ e de $H_2{}^{13}CO_3$ após 51, 60 e 78 DBC no sistema S1

| Perfil (cm) | Abundância na fração* (% em átomos de $^{13}C$) | Massa Acumulada de $^{13}C$ (g) | Massa acumulada de $H_2{}^{13}CO_3$ (g) |
|---|---|---|---|
| | | **51 DBC** | |
| **40 – 30** | 2,04 | 0,15 | 34,11 |
| **30 – 20** | 2,37 | 0,17 | 34,11 |
| **20 – 15** | 2,90 | 0,10 | 17,06 |
| **15 – 10** | 4,24 | 0,15 | 17,06 |
| **10 – 5** | 5,57 | 0,20 | 17,07 |
| **5 – 1** | 5,91 | 0,17 | 13,65 |
| **1 – 0** | 6,09 | 0,04 | 3,41 |
| **Total** | | **0,98** | **136,48** |
| | | **60 DBC** | |
| **50 – 40** | 1,56 | 0,10 | 34,11 |
| **40 – 30** | 2,42 | 0,16 | 34,11 |
| **30 – 20** | 3,50 | 0,23 | 34,11 |
| **20 – 15** | 4,62 | 0,15 | 17,06 |
| **15 – 10** | 5,63 | 0,19 | 17,06 |
| **10 – 5** | 6,13 | 0,20 | 17,07 |
| **5 – 1** | 6,63 | 0,18 | 13,65 |
| **1 – 0** | 7,43 | 0,05 | 3,41 |
| **Total** | | **1,26** | **170,60** |
| | | **78 DBC** | |
| **70 – 60** | 1,36 | 0,09 | 34,11 |
| **60 – 50** | 1,53 | 0,10 | 34,11 |
| **50 – 40** | 1,83 | 0,12 | 34,11 |
| **40 – 30** | 2,56 | 0,17 | 34,11 |
| **30 – 20** | 3,47 | 0,23 | 34,12 |
| **20 – 15** | 3,88 | 0,13 | 17,06 |
| **15 – 10** | 4,43 | 0,15 | 17,06 |
| **10 – 5** | 5,07 | 0,17 | 17,06 |
| **5 – 1** | 5,40 | 0,14 | 13,65 |
| **1 – 0** | 5,50 | 0,04 | 3,41 |
| **Total** | | **1,33** | **238,81** |

*dados entre dois pontos de amostragem na traseira da banda enriquecida de $H^{13}CO_3^-$.

A partir dos dados das Tabelas 6 e 7 construiu-se a Figura 30, relacionando a massa acumulada de $^{13}C$, na fração enriquecida da banda, em função do deslocamento da banda cromatográfica (DBC). Os dados da Figura 30 indicam o crescente acúmulo de $^{13}C$ ao longo dos deslocamentos da banda cromatográfica.

Figura 30 - Massa acumulada de $^{13}C$ (g) em função do deslocamento da banda de $H^{13}CO_3^-$ no sistema S1




Os dados de enriquecimento isotópico de $^{13}C$ no sistema S2 encontram-se na Tabela 8, na qual estão os perfis de 15 (22,5 m), 30 (45 m), 45 (67,5 m), 60 (90 m), 70 (105 m) e 92 (138m) DBC. Observa-se que a abundância isotópica de $^{13}C$ cresce com o aumento do DBC, inicialmente com 15 DBC o valor máximo foi de 2,34% em $^{13}C$ chegando a 7,20% em $^{13}C$ com 70 DBC. No último perfil (92 DBC) a abundância decresceu em relação ao perfil anterior (70 DBC), isso se deve aos procedimentos adotados com relação ao deslocamento descontínuo da banda, e completa paralização, por cerca de 90 dias, em função de problemas de perda de duas colunas de acrílico (quebra), onde se procederam a aquisição e montagem de novas colunas, com qualidade muito superior.

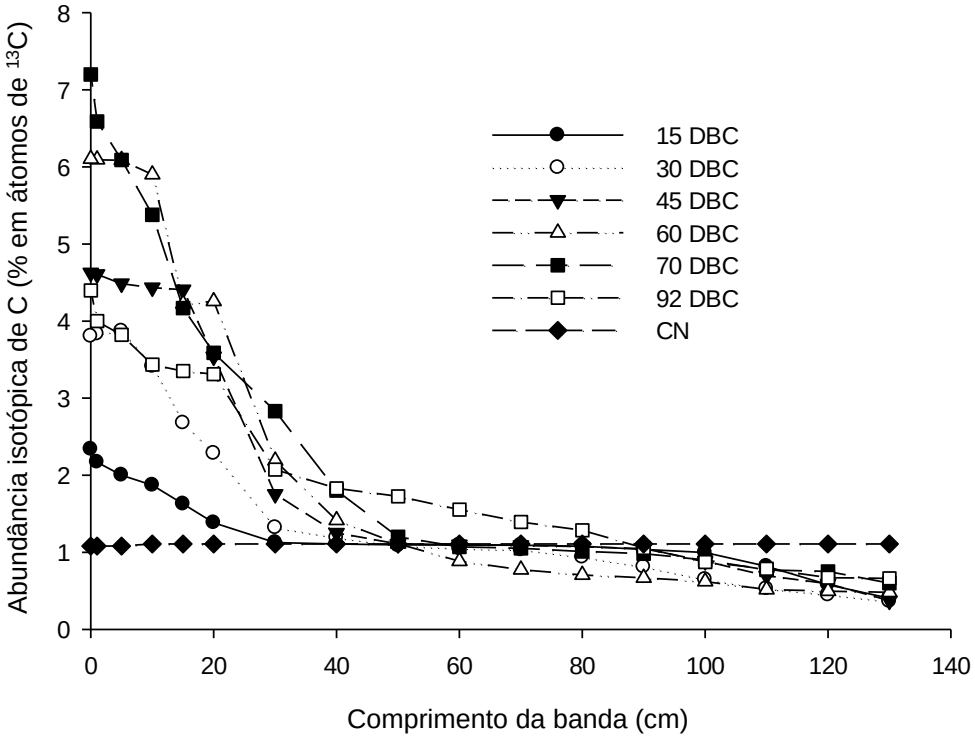
Apesar da redução da abundância isotópica de $^{13}C$, no perfil com 92 DBC, observa-se um aumento gradativo, na fração enriquecida da banda, sendo esta de 40 cm com 15 DBC e 80 cm com 92 DBC. Com relação à fração da banda com abundância natural em $^{13}C$ nota-se uma redução de 40 para 10 cm, para 15 e 92 DBC respectivamente.

A Figura 31 apresenta a curva de enriquecimento do sistema S2 elaborada a partir dos dados da Tabela 8. Pode-se observar o aumento da fração enriquecida no isótopo $^{13}C$, em relação à abundância natural (1,08% em átomos de $^{13}C$), a fração empobrecida também aumenta com o DBC, e com isso procede-se à inserção, na banda cromatográfica, de solução de $NaHCO_3$ com abundância natural de $^{13}C$ e, consequentemente o descarte da fração empobrecida.

Tabela 8 - Abundância isotópica de C (% em átomos de $^{13}C$) em perfis no sistema S2

| **Ponto de coleta (cm)** | **Deslocamento da banda de $H^{13}CO_3^-$ (DBC)** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **15** | **30** | **45** | **60** | **70** | **92** |
| | **% em átomos de $^{13}C$** | | | | | |
| **130** | 0,40 | 0,36 | 0,37 | 0,48 | 0,60 | 0,66 |
| **120** | 0,58 | 0,45 | 0,59 | 0,50 | 0,75 | 0,67 |
| **110** | 0,82 | 0,53 | 0,69 | 0,52 | 0,77 | 0,79 |
| **100** | 1,00 | 0,64 | 0,88 | 0,62 | 0,90 | 0,87 |
| **90** | 1,04 | 0,81 | 1,05 | 0,67 | 0,98 | 1,05 |
| **80** | 1,08 | 0,94 | 1,07 | 0,70 | 1,01 | 1,28 |
| **70** | 1,09 | 1,03 | 1,09 | 0,77 | 1,05 | 1,39 |
| **60** | 1,09 | 1,05 | 1,10 | 0,88 | 1,07 | 1,55 |
| **50** | 1,10 | 1,09 | 1,11 | 1,11 | 1,20 | 1,72 |
| **40** | 1,11 | 1,19 | 1,25 | 1,42 | 1,80 | 1,83 |
| **30** | 1,13 | 1,32 | 1,75 | 2,19 | 2,83 | 2,07 |
| **20** | 1,38 | 2,28 | 3,54 | 4,26 | 3,59 | 3,31 |
| **15** | 1,63 | 2,68 | 4,41 | 4,22 | 4,17 | 3,35 |
| **10** | 1,87 | 3,41 | 4,43 | 5,90 | 5,38 | 3,43 |
| **5** | 2,00 | 3,87 | 4,49 | 6,09 | 6,09 | 3,82 |
| **1** | 2,17 | 3,83 | 4,61 | 6,10 | 6,59 | 4,00 |
| **0** | 2,34 | 3,80 | 4,63 | 6,10 | 7,20 | 4,40 |

Figura 31 - Perfis de enriquecimento sistema S2




Nas Tabelas 8 e 9 observam-se os dados de abundância isotópica de $^{13}C$, massa acumulada de $^{13}C$ e massa acumulada de $H_2{}^{13}CO_3$ na fração enriquecida da banda de $H^{13}CO_3^-$ do sistema S2. Assim como no sistema S1, a massa acumulada de $^{13}C$ cresce com o aumento do número de DBC (Figura 32). Inicialmente a massa de $^{13}C$ foi de 0,16 g com 15 DBC chegando a 0,49 g de $^{13}C$ com 92 DBC, a diluição isotópica no perfil de 92 DBC não acarretou no decréscimo de massa acumulada de $^{13}C$.

A massa acumulada de $H_2{}^{13}CO_3$ também teve um incremento quando comparados os perfis, com 15 DBC a massa totalizou na TB, 55,81 g e com 92 DBC a massa foi de 111,64 g, correspondendo a um aumento da ordem de 100% entre os dois perfis. Nos últimos 10 cm da banda a massa acumulada de $H_2{}^{13}CO_3$ de 13,96 g com abundância média de 3,75 % em átomos de $^{13}C$.

O acoplamento foi realizado quando o sistema S2 estava com 92 DBC, os resultados referentes à interação entre os sistemas S1 e S2 estão descritos no item 4.3.

Tabela 9 - Abundância isotópica de C (% em átomos de $^{13}C$), massa acumulada de $^{13}C$ e de $H_2{}^{13}CO_3$ após 15, 30 e 45 DBC no sistema S2

| Perfil (cm) | Abundância na fração* (% em átomos de $^{13}C$) | Massa Acumulada de $^{13}C$ (g) | Massa acumulada de $H_2{}^{13}CO_3$ (g) |
|---|---|---|---|
| | **15 DBC** | | |
| **40 – 30** | 1,12 | 0,03 | 13,95 |
| **30 – 20** | 1,25 | 0,03 | 13,95 |
| **20 – 15** | 1,50 | 0,02 | 6,98 |
| **15 – 10** | 1,75 | 0,02 | 6,98 |
| **10 – 5** | 1,94 | 0,03 | 6,98 |
| **5 – 1** | 2,08 | 0,02 | 5,58 |
| **1 – 0** | 2,25 | 0,01 | 1,40 |
| **Total** | | **0,16** | **55,81** |
| | **30 DBC** | | |
| **40 – 30** | 1,25 | 0,03 | 13,95 |
| **30 – 20** | 1,80 | 0,05 | 13,95 |
| **20 – 15** | 2,48 | 0,03 | 6,98 |
| **15 – 10** | 3,04 | 0,04 | 6,98 |
| **10 – 5** | 3,64 | 0,05 | 6,98 |
| **5 – 1** | 3,85 | 0,04 | 5,58 |
| **1 – 0** | 3,82 | 0,01 | 1,40 |
| **Total** | | **0,26** | **55,82** |
| | **45 DBC** | | |
| **40 – 30** | 1,50 | 0,04 | 13,95 |
| **30 – 20** | 2,65 | 0,07 | 13,96 |
| **20 – 15** | 3,97 | 0,05 | 6,98 |
| **15 – 10** | 4,42 | 0,06 | 6,98 |
| **10 – 5** | 4,46 | 0,06 | 6,98 |
| **5 – 1** | 4,55 | 0,05 | 5,58 |
| **1 – 0** | 4,61 | 0,01 | 1,40 |
| **Total** | | **0,35** | **55,81** |

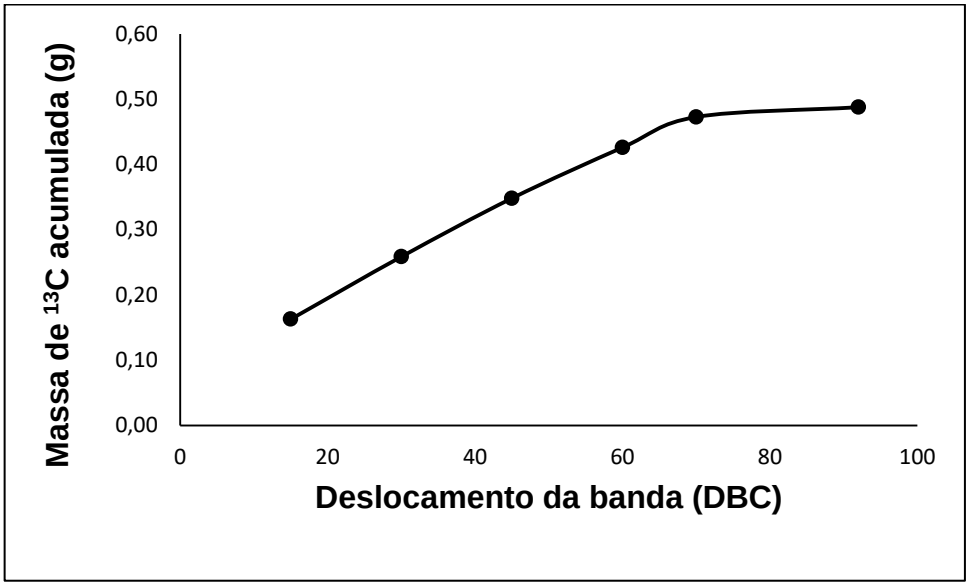
*dados entre dois pontos de amostragem na traseira da banda enriquecida de $H^{13}CO_3^-$.

Tabela 10 - Abundância isotópica de $^{13}C$ (% em átomos de $^{13}C$) massa acumulada de $^{13}C$ e de $H_2{}^{13}CO_3$ após 60, 70 e 92 DBC no sistema S2

| Perfil (cm) | Abundância na fração* (% em átomos de $^{13}C$) | Massa Acumulada de $^{13}C$ (g) | Massa acumulada de $H_2{}^{13}CO_3$ (g) |
|---|---|---|---|
| | **60 DBC** | | |
| **40 – 30** | 1,80 | 0,05 | 13,95 |
| **30 – 20** | 3,22 | 0,09 | 13,96 |
| **20 – 15** | 4,24 | 0,06 | 6,98 |
| **15 – 10** | 5,06 | 0,07 | 6,98 |
| **10 – 5** | 6,00 | 0,08 | 6,98 |
| **5 – 1** | 6,09 | 0,07 | 5,59 |
| **1 – 0** | 6,10 | 0,02 | 1,40 |
| **Total** | | **0,43** | **55,84** |
| | **70 DBC** | | |
| **50 – 40** | 1,50 | 0,04 | 13,95 |
| **40 – 30** | 2,32 | 0,06 | 13,96 |
| **30 – 20** | 3,21 | 0,09 | 13,96 |
| **20 – 15** | 3,88 | 0,05 | 6,98 |
| **15 – 10** | 4,78 | 0,06 | 6,98 |
| **10 – 5** | 5,74 | 0,08 | 6,98 |
| **5 – 1** | 6,34 | 0,07 | 5,59 |
| **1 – 0** | 6,90 | 0,02 | 1,40 |
| **Total** | | **0,47** | **69,79** |
| | **92 DBC** | | |
| **80 – 70** | 1,34 | 0,04 | 13,95 |
| **70 – 60** | 1,47 | 0,04 | 13,95 |
| **60 – 50** | 1,64 | 0,04 | 13,95 |
| **50 – 40** | 1,78 | 0,05 | 13,95 |
| **40 – 30** | 1,95 | 0,05 | 13,95 |
| **30 – 20** | 2,69 | 0,07 | 13,96 |
| **20 – 15** | 3,33 | 0,05 | 6,98 |
| **15 – 10** | 3,39 | 0,05 | 6,98 |
| **10 – 5** | 3,63 | 0,05 | 6,98 |
| **5 – 1** | 3,91 | 0,04 | 5,58 |
| **1 – 0** | 4,20 | 0,01 | 1,40 |
| **Total** | | **0,49** | **111,64** |

*dados entre dois pontos de amostragem na traseira da banda enriquecida de $H^{13}CO_3^-$.

Figura 32 - Massa acumulada em função do DBC do sistema S2




## 4.4 Acoplamento dos sistemas S1 e S2

O processo de interação dos sistemas individuais de colunas (S1 e S2) está descrito no item 3.2.2. Com o sistema S1 em 78 DBC procedeu à transferência dos últimos 10 cm da traseira da banda (S1) para o sistema S2 nas condições isotópicas referente a 98 DBC. Nessas condições pode-se estimar que foram transferidos de S1 para S2 34,13 g de $H_2{}^{13}CO_3$ com enriquecimento médio de 5,25% em átomos de $^{13}C$. Após essa etapa, a banda remanescente, do sistema S1 percorreu 21 e 30 m e o sistema S2 foi deslocado por 24 e 34,5 m, sendo procedidas duas análises dos perfis após o primeiro acoplamento.

Os dados referentes ao primeiro acoplamento estão na Tabela 11. Pode-se observar que a abundância isotópica (% em átomos de $^{13}C$) no sistema S1 após o acoplamento, sofreu redução devido à retirada da fração mais enriquecida da banda. No sistema S2 observa-se que com o deslocamento de 24 m, após o acoplamento, a abundância isotópica de $^{13}C$ aumentou de 4,40% para 6,61% em átomos de $^{13}C$. No perfil do S2 após o deslocamento de 34,5 m, a abundância máxima (ponto 0) de $^{13}C$ decresceu para 5,85% indicando uma diluição isotópica que pode ser justificada com a irregularidade da banda descrita no item 4.2.

Com relação ao sistema S1 os dados da Tabela 12 indicam que após o 1º acoplamento, e deslocamento da banda por 30 m (20 DBC), o perfil isotópico (% átomos de $^{13}C$) ficou muito próximo ao apresentado antes do 1º acoplamento. A partir do novo perfil isotópico em S1, pode-se determinar a partir da Tabela 12 e equação 10, que a massa de $H_2{}^{13}CO_3$, nos últimos 10 cm da banda, foi de 34,12 g com enriquecimento estimado em 4,93 % em átomos de $^{13}C$ (5,25 % em átomos de $^{13}C$ antes do 1º acoplamento).

Tabela 11 - Concentração de C (% em átomos de $^{13}C$) da banda de $H^{13}CO_3^-$ nos sistemas S1 e S2 antes e após o 1º acoplamento

| **Ponto de coleta (cm)[1]** | **S1 antes do 1º ac*** | **S1 após o 1º ac[2]** | **S2 antes do 1º ac** | **S2 após o 1º ac[3]** | **S2 após o 1º ac B[4]** |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | **% em átomos de $^{13}C$** | | |
| **140** | 0,59 | 0,67 | – | – | – |
| **130** | 0,77 | 0,73 | 0,66 | 0,80 | 0,90 |
| **120** | 0,84 | 0,87 | 0,67 | 0,97 | 1,10 |
| **110** | 0,87 | 0,99 | 0,79 | 1,10 | 1,08 |
| **100** | 0,95 | 1,00 | 0,87 | 1,17 | 1,17 |
| **90** | 1,04 | 1,04 | 1,05 | 1,29 | 1,22 |
| **80** | 1,11 | 1,12 | 1,28 | 1,32 | 1,20 |
| **70** | 1,30 | 1,18 | 1,39 | 1,37 | 1,18 |
| **60** | 1,43 | 1,28 | 1,55 | 1,49 | 1,35 |
| **50** | 1,63 | 1,28 | 1,72 | 1,50 | 1,54 |
| **40** | 2,04 | 1,48 | 1,83 | 1,98 | 1,98 |
| **30** | 3,08 | 1,99 | 2,07 | 2,21 | 2,50 |
| **20** | 3,87 | 2,78 | 3,31 | 2,53 | 2,84 |
| **15** | 3,89 | 2,61 | 3,35 | 2,99 | 3,28 |
| **10** | 4,97 | 3,61 | 3,43 | 3,18 | 4,23 |
| **5** | 5,16 | 3,65 | 3,82 | 4,32 | 5,22 |
| **1** | 5,64 | 4,48 | 4,00 | 5,03 | 5,67 |
| **0** | 5,35 | 4,79 | 4,40 | 6,61 | 5,85 |

* ac: acoplamento; [1] distância (cm) entre o ponto de coleta e o limite traseiro da banda; [2] após transferência dos últimos 10 cm; [3] deslocamento de 24 m após acoplamento; [4] deslocamento de 34,5 m após acoplamento.

Após deslocamento da banda remanescente de $H^{13}CO_3^-$, no sistema S1, por 30 m (20 DBC), foi realizado um segundo acoplamento, o qual os dados foram apresentados na Tabela 12. Após o sistema S1 ser deslocado por 30 m foi possível

retirar mais 10 cm da traseira da banda (34,12 g de $H_2{}^{13}CO_3$) com abundância média de 4,93% em átomos de $^{13}C$, e inserir novamente na banda do sistema S2. Os valores de massa de $H_2{}^{13}CO_3$ e abundância isotópica de $^{13}C$ envolvidos no segundo acoplamento entre os sistemas foram próximos àqueles apresentados no primeiro acoplamento entre S1 e S2. O mesmo problema de diluição isotópica ocorreu no segundo acoplamento, após o deslocamento de 27 m da banda do sistema S2, sua abundância máxima de $^{13}C$ diminuiu de 5,85% para 5,58% em átomos de $^{13}C$, apesar da diluição isotópica nos últimos 5 cm, observa-se um enriquecimento isotópico de $^{13}C$ na fração da banda correspondente aos pontos 10 e 100 cm da traseira da referida banda cromatográfica.

Tabela 12 - Abundância de C (% em átomos de $^{13}C$) da banda de $H^{13}CO_3^-$ nos sistemas S1 e S2 antes e após o 2º acoplamento

| **Ponto de coleta (cm)[1]** | **S1 antes do 2º ac*** | **S1 após o 2º ac[2]** | **S2 antes do 2º ac** | **S2 após o 2º ac[3]** | **S2 após o 2º ac[4]** |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | **% em átomos de $^{13}C$** | | |
| **140** | 0,69 | 0,63 | – | – | – |
| **130** | 0,73 | 0,69 | 0,90 | 0,89 | 0,96 |
| **120** | 0,85 | 0,64 | 1,10 | 0,95 | 1,02 |
| **110** | 0,92 | 0,79 | 1,08 | 1,04 | 1,32 |
| **100** | 1,01 | 0,97 | 1,17 | 1,31 | 1,44 |
| **90** | 1,05 | 1,04 | 1,22 | 1,55 | 1,55 |
| **80** | 1,13 | 1,14 | 1,20 | 1,63 | 1,86 |
| **70** | 1,15 | 1,17 | 1,18 | 1,94 | 1,94 |
| **60** | 1,90 | 1,20 | 1,35 | 2,33 | 2,25 |
| **50** | 1,20 | 1,21 | 1,54 | 2,40 | 2,71 |
| **40** | 1,41 | 1,49 | 1,98 | 3,32 | 3,14 |
| **30** | 1,88 | 2,25 | 2,50 | 3,63 | 3,31 |
| **20** | 2,06 | 2,24 | 2,84 | 3,88 | 3,48 |
| **15** | 2,66 | 2,61 | 3,28 | 3,91 | 3,88 |
| **10** | 4,38 | 4,06 | 4,23 | 4,41 | 4,38 |
| **5** | 5,01 | 4,20 | 5,22 | 4,58 | 4,64 |
| **1** | 5,39 | 4,21 | 5,67 | 4,99 | 5,03 |
| **0** | 5,53 | 4,15 | 5,85 | 5,58 | 5,04 |

* ac: acoplamento; [1] distância (cm) entre o ponto de coleta e o limite traseiro da banda; [2] após transferência dos últimos 10 cm da TB; [3] deslocamento de 27 m, após acoplamento; [4] deslocamento de 39 m, após acoplamento.

No total foram realizados três acoplamentos entre os sistemas S1 e S2, sendo o 3º acoplamento realizado após o sistema S1 ser deslocado por 12 m. Nessa etapa também foram transferidos os últimos 10 cm da banda de S1 para S2, equivalente a 34,12 g de $H_2{}^{13}CO_3$ com abundância média de 3,61% em átomos de $^{13}C$. Nessa etapa a região traseira da banda do sistema S1 mostrou-se um pouco tortuosa, dificultando a retirada das alíquotas com maior precisão nos pontos de coleta.

Os dados dos perfis dos sistemas S1 e S2 relacionados com o 3º acoplamento encontram-se na Tabela 13. Assim como verificado nos demais acoplamentos, a abundância isotópica de $^{13}C$ teve redução no sistema S1, sendo explicada pela retirada de massa com elevado enriquecimento isotópico. Da mesma maneira que descrito anteriormente, a banda cromatográfica remanescente em S1 (após 2º acoplamento) foi deslocada por apenas 9 m, obtendo-se o perfil apresentado na Tabela 13. Esta nova condição isotópica, em S1, acumula uma massa de 34,12 g de $H_2{}^{13}CO_3$, com enriquecimento estimado em 2,05 % em átomos de $^{13}C$, inferior aos dois perfis anteriores do sistema S1 após os acoplamentos, principalmente devido ao reduzido deslocamento (9 m). No sistema S2 a abundância média de $^{13}C$ também teve um decréscimo uma vez que a massa de $H_2{}^{13}CO_3$ inserida nesse sistema, em acoplamento com S1, estava com abundância isotópica de $^{13}C$ abaixo (3,61 %) de 4,68% em átomos de $^{13}C$, que era a abundância isotópica do sistema S2 antes do acoplamento. Outro fator, e o mais relevante, que impediu um maior acréscimo da abundância isotópica foi a curta distância percorrida pelas bandas, apenas 9 e 10,5 m nos sistemas S1 e S2, respectivamente, sendo o ideal um deslocamento da ordem de 24 m, em S1, e após realizar o último acoplamento, e posterior deslocamento da banda, em S2, por outros 24 m.

Tabela 13 - Abundância de C (% em átomos de $^{13}C$) da banda de $H^{13}CO_3^-$ nos sistemas S1 e S2 antes e após o 3º acoplamento

| Ponto de coleta (cm)[1] | S1 antes do 3º ac* | S1 depois do 3º ac[2] | S2 antes do 3º ac | S2 depois do 3º ac[3] |
|---|---|---|---|---|
| | % em átomos de $^{13}C$ | | | |
| **140** | 0,57 | 0,64 | – | 1,10 |
| **130** | 0,59 | 0,73 | 0,96 | 1,10 |
| **120** | 0,63 | 0,85 | 1,02 | 1,23 |
| **110** | 0,74 | 0,85 | 1,32 | 1,33 |
| **100** | 0,89 | 0,96 | 1,44 | 1,55 |
| **90** | 1,02 | 1,08 | 1,55 | 1,86 |
| **80** | 1,21 | 1,15 | 1,86 | 2,06 |
| **70** | 1,50 | 1,17 | 1,94 | 2,28 |
| **60** | 1,77 | 1,21 | 2,25 | 2,62 |
| **50** | 1,93 | 1,33 | 2,71 | 2,83 |
| **40** | 2,09 | 1,39 | 3,31 | 3,30 |
| **30** | 2,29 | 1,57 | 3,48 | 3,42 |
| **20** | 2,56 | 1,69 | 3,88 | 3,69 |
| **15** | 2,96 | 1,79 | 3,94 | 3,96 |
| **10** | 3,15 | 1,80 | 4,38 | 4,26 |
| **5** | 3,46 | 2,06 | 4,64 | 4,29 |
| **1** | 4,21 | 2,28 | 5,03 | 4,93 |
| **0** | 5,05 | 2,85 | 5,04 | 4,94 |

* ac: acoplamento; [1] distância (cm) entre o ponto de coleta e o limite traseiro da banda; [2] após transferência dos últimos 10 cm; [3] deslocamento de 10,5 m, após acoplamento.

A Tabela 14 apresenta os resultados de massas acumuladas de $^{13}C$ e $H_2{}^{13}CO_3$ relacionados com os acoplamentos entre os sistemas de colunas S1 e S2. Mesmo com o processo de diluição isotópica, houve um incremento das massas acumuladas no sistema S2. Os dados da Tabela 14 demonstram que a massa acumulada passou de 0,49 g (S2 antes do 1º acoplamento) para 0,58 g após o 1º acoplamento com deslocamento da banda por 34,5 m. Após o segundo acoplamento o sistema S2 foi deslocado por 39 m apresentando uma massa final de 0,79 g de $^{13}C$, a massa de $H_2{}^{13}CO_3$ teve um acréscimo, passando de 111,64 g (antes do primeiro acoplamento) para 153,52 g ao final do segundo acoplamento. No terceiro acoplamento, apesar do decréscimo na abundância isotópica de $^{13}C$, a massa acumulada de $^{13}C$ aumentou de 0,79 para 0,87 g, enquanto que a massa final de $H_2{}^{13}CO_3$ foi de 167,47g, com um acréscimo de 13,95 g.

O aumento da massa acumulada demonstra que o acoplamento entre os sistemas promove o acúmulo de $^{13}C$ na região traseira da banda cromatográfica, mesmo com a retirada de frações enriquecida do sistema S1, a banda desse sistema se recompõe, após deslocamento da ordem de 24 m, possibilitando novos acoplamentos entre os sistemas. Os dados da Tabela 14 indicam a recomposição da fração enriquecida, no sistema S1, nos três acoplamentos realizados, sendo: ($^{13}C$) 1,33; 1,13 e 1,19 g e ($H_2{}^{13}CO_3$) 233,81; 272,89 e 272,90, respectivamente, antes do 1º, 2º e 3º acoplamento.

A massa contida nos últimos 10 cm do sistema S2, após 3º acoplamento e deslocamento por 10,5 m (Tabela 13), foi de 13,96 g de $H_2{}^{13}CO_3$ com abundância média de 4,49 % em átomos de $^{13}C$, essa massa a partir de processos químicos pode ser convertida em: 23,8 g de $Na_2{}^{13}CO_3$, 9,9 g de $^{13}CO_2$, e 10,8 g de $^{13}CO(NH_2)_2$, sendo todas as moléculas com abundância isotópica de 4,49 % em átomos de $^{13}C$.

Considerando ainda a massa de $H_2{}^{13}CO_3$ nos últimos 10 cm do sistema S1 (34,12 g) com abundância média de 2,05% em átomos de $^{13}C$ (após 2º acoplamento), é possível produzir: 58,3 g de $Na_2{}^{13}CO_3$, 24,2 g de $^{13}CO_2$, e 33 g de $^{13}CO(NH_2)_2$, apesar da baixa abundância isotópica, o sistema tende a se recompor com novos deslocamentos da banda cromatográfica.

O sistema de cromatografia de troca iônica, em processo cascata, objetivando obter elevados enriquecimentos de $^{13}C$, mostrou que nas condições avaliadas (resina, regenerante, concentração do eluente, deslocamento da banda, entre outros), não apresentou um poder de separação eficiente, a exemplo do trabalho envolvendo a separação dos isótopos estáveis de N ($^{15}N$) (MÁXIMO et al., 2013). Com relação ao processo de separação dos isótopos de enxofre ($^{34}S$), os resultados obtidos (BENDASSOLLI, 1994) foram bem semelhantes ao isótopo $^{13}C$. O sistema cascata, no enriquecimento isotópico de $^{15}N$, apresentava como diferenciais ao sistema de separação dos isótopos de C e S, as resinas (maior poder de separação) e diferenças significativas entre os diâmetros das colunas dos sistemas cromatográficos, e, portanto, um potencial superior de transferência de massa entre os mesmos, aumento consideravelmente o número de placas teóricas no sistema menor. A separação dos isótopos estáveis de carbono, e obtenção de elevados enriquecimentos no isótopo (30 a 50% em átomos de $^{13}C$), pode ser obtido com outras tecnologias de separação (centrifugação, deflexão

magnética, destilação fracionada, entre outros), ou com otimização do sistema de troca iônica.

Tabela 14 - Massa acumulada de $^{13}C$ e $H_2{}^{13}CO_3$ na fração enriquecida antes e após acoplamento

| Condições experimentais | Massa acumulada de $^{13}C$ (g) | Massa acumulada de $H_2{}^{13}CO_3$ (g) |
|---|---|---|
| S1 antes do 1º acoplamento | 1,33 | 238,81 |
| S2 antes do 1º acoplamento | 0,49 | 111,64 |
| S2 após o 1º acoplamento(1) | 0,55 | 139,55 |
| S2 após o 1º acoplamento(2) | 0,58 | 139,55 |
| S1 antes do 2º acoplamento | 1,13 | 272,89 |
| S2 após o 2º acoplamento(3) | 0,76 | 139,56 |
| S2 após o 2º acoplamento(4) | 0,79 | 153,52 |
| S1 antes do 3º acoplamento | 1,19 | 272,90 |
| S2 após o 3º acoplamento(5) | 0,87 | 167,47 |

(1) deslocamento de 24 m; (2) deslocamento de 34,5 m; (3) deslocamento de 27 m; (4) deslocamento de 39 m; (5) deslocamento de 10,5 m.

## 4.5 Fator de fracionamento isotópico (α)

Na Tabela 15 são apresentados os resultados obtidos de δ‰ $^{13}C$ dos três experimentos realizados, conforme descrito no item 3.2.5. O valor experimental foi de 1,0048 utilizando resina aniônica Dowex 1X8. Como não foram encontrados outros trabalhos de enriquecimento de $^{13}C$ empregando essa metodologia com os mesmos parâmetros, comparou-se o fator de fracionamento do presente trabalho com o calculado por Urey e Reid (1943), no qual obtiveram o valor de 1,012, utilizando o método de troca química entre $HCO_3^-{}_{(aq)}$ e $CO_{2(g)}$.

Tabela 15 - Fator de fracionamento (α) dos isótopos $^{13}C$ e $^{12}C$ por troca iônica em resina DOWEX 1X8, 100-200 mesh

| Determinação experimental | δ‰ $^{13}C$ (1) | δ‰ $^{13}C$ (2) |
|---|---|---|
| 1ª | -0,95 | -5,47 |
| 2ª | -0,70 | -5,47 |
| 3ª | -0,19 | -5,37 |
| **Média** | **-0,61** | **-5,44** |
| **α = K** | | **1,00484** |

(1) δ‰ $^{13}C$ na solução de $NaHCO_3$ da alimentação (fase solução); (2) δ‰ $^{13}C$ na solução de $NaHCO_3$ na fase resina.

## 4.6 Altura equivalente de uma placa teórica

Na determinação da altura equivalente de uma placa teórica, conforme descrito em 3.2.6, uma banda de $HCO_3^-$ de 40 cm de comprimento foi deslocada por 32 m, representando 80 vezes o seu comprimento, quando pode-se atingir o equilíbrio isotópico, procede-se a retirada das alíquotas do perfil da banda nas condições de equilíbrio. Os valores isotópicos obtidos no perfil encontram-se na Tabela 16.

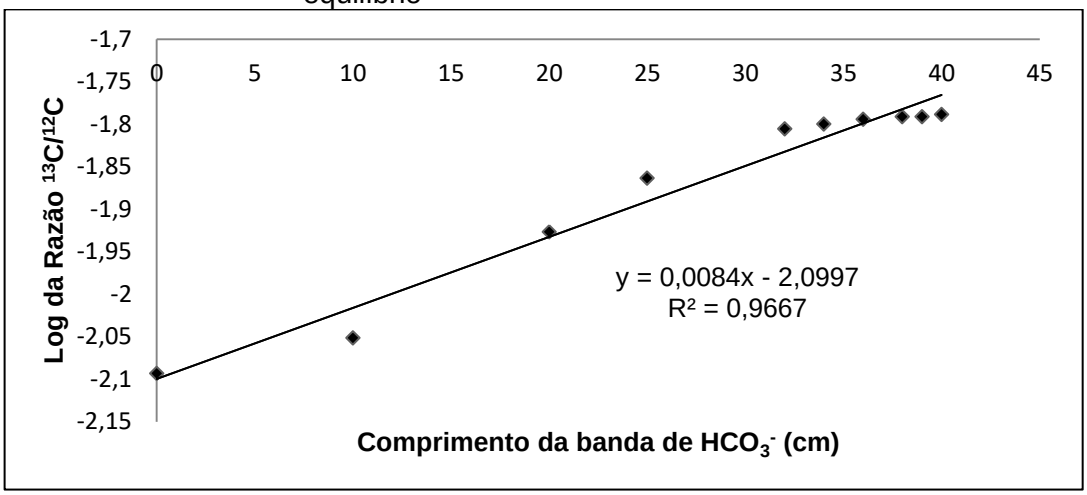
A partir dos valores isotópicos da Tabela 16 foi elaborada a Figura 33, onde estão representados os valores da relação entre o logaritmo da razão isotópica ($\log(^{13}C/^{12}C)$) em função do ponto de coleta (cm). A situação de equilíbrio apresentou uma reta, permitindo deste modo a utilização da equação (17). A partir do valor do fracionamento isotópico, obtido em 4.5 ($\alpha$=1,0048) e do coeficiente angular da reta, o valor calculado para a altura de pratos teóricos foi de 0,25 cm.

O número de placas teóricas foi calculado de acordo com a equação (16), relacionando o comprimento L da banda (40cm) com a altura N das placas teóricas (0,25 cm), obtendo assim 160 unidades.

Tabela 16 - Perfil de uma banda de $HCO_3^-$ em situação de equilíbrio isotópico

| **Ponto de coleta (cm)** | **% em átomos de $^{13}C$** |
|---|---|
| 0 | 0,80 |
| 10 | 0,88 |
| 20 | 1,17 |
| 25 | 1,35 |
| 32 | 1,54 |
| 34 | 1,56 |
| 36 | 1,58 |
| 38 | 1,59 |
| 39 | 1,59 |
| 40 | 1,60 |

Figura 33 - Perfil de uma banda de $HCO_3^-$ em situação de equilíbrio




## 4.7 Obtenção do $^{13}CO_2$

O método de conversão do $NaH^{13}CO_3$ para o $^{13}CO_2$ encontra-se no item 3.2.8. Analisando os resultados de rendimento da obtenção do $^{13}CO_2$ da Tabela 17 observa-se que o método proposto foi eficiente para conversão do gás com um rendimento médio de 98,70%. %. Não foram feitos testes de conversão com massas maiores, pois a análise do teor de carbono ($CO_2$) foi realizada no espectrômetro de massas ANCA-GSL, onde utiliza-se massas reduzidas do gás, objetivando elevada precisão e exatidão. O processo envolvendo massa da ordem de 10 a 20 g de $CO_2$ podem ser realizadas, com o mesmo rendimento, em linhas de vácuo, com reservatório final de estocagem do gás em aço inoxidável, a exemplo do sistema de obtenção de amônia (BENDASSLLI et al., 2002).

Tabela 17 - Rendimento da conversão de $NaH^{13}CO_3$ para $^{13}CO_2$

| Experimento | Massa inicial de $NaH^{13}CO_3$ (mg) | Massa obtida de $^{13}CO_2$ (mg) | Rendimento (%) |
|---|---|---|---|
| 1º | 4,96 | 2,57 | 98,79 |
| 2º | 4,22 | 2,20 | 99,48 |
| 3º | 4,22 | 2,16 | 97,82 |
| **Média** | | **2,31** | **98,70** |

## 4.8 Obtenção do $^{13}CO$ a partir do $^{13}CO_2$

O procedimento realizado para conversão do $^{13}CO_2$ em $^{13}CO$ encontra-se descrito no item 3.2.9. A metodologia foi proposta com a finalidade de empregar o sistema catalítico e catalisadores disponíveis no laboratório.

Após o período de reação, o reator foi aberto, lavado, a solução foi filtrada e seca em chapa aquecedora à temperatura de 50°C para determinação da massa de $^{13}CO(NH_2)_2$ e assim calcular o rendimento da conversão de $^{13}CO_2$ a $^{13}CO$.

Utilizando tanto Rh e Pt ou $Cu^0$ como catalisadores da reação de redução do $^{13}CO_2$, verificou-se que não foi produzida $^{13}CO(NH_2)_2$ no reator. Portanto conclui-se que o método de redução do $^{13}CO_2$, segundo as condições experimentais avaliadas, é inadequado para obtenção do $^{13}CO$.

A redução do $^{13}CO_2$ à $^{13}CO$ seria importante para aplicação da metodologia de síntese de $^{13}CO(NH_2)_2$, mas pode-se empregar o dióxido de carbono enriquecido ($^{13}CO_2$) para a síntese de ureia. A ureia é sintetizada industrialmente a partir da reação entre amônia ($NH_3$) e dióxido de carbono ($CO_2$), em diferentes condições (T, P, catalisadores) que dependeu da tecnologia empregada na planta industrial. Os sistemas tecnológicos de produção foram publicados por Chao (1967) e mais recentemente por Uchino (1986) e Staff (1986).

Como sugestão para trabalhos futuros, estudo de novas metodologias para redução do $^{13}CO_2$ e quantificação do $^{13}CO$. O desenvolvimento de uma metodologia de obtenção da $^{13}CO(NH_2)_2$ empregando diretamente o $^{13}CO_2$ também seria de vital importância para simplificar o processo de síntese e reduzir possíveis perdas de material enriquecido no processo de redução do $^{13}CO_2$ à $^{13}CO$, uma vez que foi possível produzir $^{13}CO_2$, com reduzidas perdas, utilizando a metodologia descrita no item 3.2.8.

## 5. CONCLUSÃO

O processo de regeneração das resinas aniônicas Dowex 1X8 com solução de NaOH 2 mol $L^{-1}$, apresentou eficiência superior a 99%, com capacidade de recuperação de todas as soluções empregadas no processo.

Os sistemas de colunas de resina, S1 e S2, avaliados individualmente apresentaram viabilidade na separação dos isótopos de C ($^{12}C$ e $^{13}C$), obtendo no último centímetro da banda de $HCO_3^-$, antes dos acoplamentos, enriquecimento de 7,69 e 7,20% em átomos de $^{13}C$ em S1 e S2 respectivamente.

Utilizando o processo de interação entre os sistemas individuais de colunas foi possível obter, massa acumulada de $^{13}C$ de 0,87 g e 167,47g de $H_2{}^{13}CO_3$ no sistema S2. No sistema S1 individual, após deslocamento de 72 DBC (90 m), a massa total acumulada de $H_2{}^{13}CO_3$ foi de 238,81g e, nos últimos 10 cm, da traseira da banda (TB), 34,12 g, com abundância isotópica média de 5,25 % em átomos de $^{13}C$. Com a massa de $H_2{}^{13}CO_3$, contida nos 10 cm da TB, é possível, a partir de processos químicos obter: 58,32 g de $Na_2{}^{13}CO_3$; 24,23 g de $^{13}CO_2$ e 26,4 g de $^{13}CO(NH_2)_2$. Estima-se que o sistema S1 reestabeleça a sua massa com a continuidade do deslocamento da banda por cerca de 24m.

O sistema de cromatografia de troca iônica em processo cascata, nas condições avaliadas, não apresentou elevado poder de separação dos isótopos estáveis de C, e, portanto, não foi possível a obtenção de $^{13}CO_2$ com elevado enriquecimento em $^{13}C$. O maior enriquecimento isotópico, com 7,69 % em átomos de $^{13}C$, foi obtido no sistema 1, em processo individual, após deslocamento da banda de $H^{13}CO_3^-$ por 90 m (60 DBC).

O valor do fator de fracionamento isotópico (α) obtido foi de 1,0048, com altura equivalente de placa teórica de 0,25 cm e 160 placas teóricas na banda de 40 cm.

O método de obtenção do $^{13}CO_2$, a partir do $NaH^{13}CO_3$, mostrou-se viável com rendimento de 98,70% de conversão.

A metodologia de conversão do $^{13}CO_2$ a $^{13}CO$ utilizada no presente trabalho, dentro das condições experimentais avaliadas, não foi efetiva para o objetivo ao qual foi proposta, sendo que o desenvolvimento de outras metodologias de conversão do $^{13}CO_2$ a $^{13}CO$ ou mesmo a utilização do $^{13}CO_2$ para a síntese de $^{13}CO(NH_2)_2$, pode ser uma alternativa.

## REFERÊNCIAS


ABRÃO, A. **Operações de troca iônica**. São Paulo: IEA, 1972.

AFOLABI, P.; WRIGHT, M.; WOOTTON, S. A.; JACKSON, A. A. Clinical Utility of $^{13}$C-Liver Function Breath Tests for Assessment of Hepatic Function. **Digestive Diseases and Sciences**, Southampton, v. 58, p. 33-41, 2013.

ARMSTRONG, D. E.; BRIESMEITER, A. C.; MCINTEER, B. B.; POTTER, R. M. **A Carbon-13 production plant using carbon monoxide distillation**. Los Alamos: University of California, 1970. 29 p. (LA-4391).

BARNES, D. M.; SONG, Z.; KLASING, K. C.; BOTTJE, W. Protein metabolism during an acute phase response in chickens. **Amino Acids**, Wien, v. 22, p. 15-26, 2002.

BENDASSOLLI, J. A. **Separação dos isótopos de enxofre em colunas de resina de troca aniônica. Enriquecimento isotópico de 34 S**. 1994. 105 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

BENDASSOLLI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O.; CARNEIRO JUNIOR, F. Stable sulfur isotope fractionation by anion exchange chromatography. Production of compounds enriched in $^{34}$S. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 8, p. 13-17, 1997.

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

BERNOUX, M.; CERRI, C. C.; NEIL, C.; MORAES, J. F. L. The use of stable carbon isotopes for estimating soil organic matter turnover rates. **Geoderma**, Amsterdam, v. 82, p. 43-58, 1998.

BITTENSON, S.; HOUSTON, P. L. Carbon isotope separation by multiphoton dissociation of $CF_3I$. **The Journal of Chemical Physics**, New York, v. 67, p. 4819-4824, 1977.

BOUTTON, T. W.; ARCHER, S. R.; MIDWOOD, A. J. Stable isotopes in ecosystem science: structure, function and dynamics of a Subtropical Savanna. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, London, v. 13, p. 1263-1277, 1999.

BRADEN, B.; ADAMS, S.; DUAN, L. P.; ORTH, K. H.; MAUL, F. D.; LEMBCKE, B.; HOR, G.; CASPARY, W. F. The [$^{13}$C]acetate breath test accurately reflects gastric emptying of liquids in both liquid and semisolid test meals. **Gastroenterology,** Baltimore, v. 108, p. 1048-1055, 1995.

BROWN, L. M. *Helicobacter pylori*: Epidemiology and routes of transmission. **Epidemiologic Reviews**, Baltimore, v. 22, p. 283-297, 2000.

BRUNO, G.; LOPETUSO, L. R.; IANIRO, G.; LATERZA, L.; GERARDI, V.; PETITO, V.; POSCIA, A.; GASBARRINI, A.; OJETTI, V.; SCALDAFERRI, F. $^{13}$C- octanoic acid breath test to study gastric emptying time. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Rome, v. 17, p. 59-64, 2013.

BURD, N. A.; HAMER, H. M.; PENNINGS, B.; PELLIKAAN, W. F.; SENDEN, J. M. G.; GIJSEN, A. P.; VAN LOON, L. J. C. Substantial differences between organ and muscle specific tracer incorporation rates in a lactanting dairy cow. **PloS One**, San Francisco, v. 8, p. 1-9, 2013.

BUSO JUNIOR, A. A.; PESSENDA, L. C. R.; MAYLE, F. E.; LORENTE, F. L.; VOLKMER-RIBEIRO, C.; SCHIAVO, J. A.; PEREIRA, M. G.; BENSASSOLLI, J. A.; MACARIO, K. C. D.; SIQUEIRA, G. S. Paleovegetation and paleoclimate dynamics during the last 7000 years in the Atlantic forest of Southeastern Brazil based on palynology of a waterlogged sandy soil. **Review of Paleobotany and Palylology**, Amsterdam, v. 264, p. 1-10, 2019.

BUYSE, J.; GEYPENS, B.; MALHEIROS, R. D.; MORAES, V. M.; SWENNEN, Q.; DECUYPERE, E. Assessment of age-related glucose oxidation rates of broiler chickens by using stable isotopes. **Life Sciences**, Oxford, v. 75, p. 2245-2255, 2004.

CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES, INC. – CIL. **Products**. Price. Tewksbury, MA, 2019. Disponível em: <https://shop.isotope.com/advancedSearch.aspx>. Acesso em: 18 fev. 2019.

CAREY, F. A. **Química orgânica**. 7. ed. Porto Alegre: AMGH, 2011.

CARNEIRO JUNIOR, F. **Enriquecimento de $^{10}$B por cromatografia de troca iônica**. 1989. 73 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

CARNEIRO JUNIOR, F.; BENDASSOLLI, J. A.; MORTATTI, J. A.; TRIVELIN, P. C. O.; VICTORIA, R. L. Separação dos isótopos de boro em colunas de resina de troca iônica. Enriquecimento de $^{10}$B. **Química Nova**, São Paulo, v. 17, p. 446-450, 1994.

CERLING, T. E. The stable isotopic composition of modern soil carbonate and its relationship to climate. **Earth and Planetary Science Letters**, Amsterdam, v. 71, p. 229–240, 1984.

CERRI, C. C.; FELLER, C.; BALESDENT, J.; VICTORIA, R. L.; PLENECASSAGNE, A. Application du traçage isotopique naturel en $^{13}$C à l'étude de la dynamique de matière organique dans les sols. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 300, n. 1, p. 423-428, 1985.

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

COELHO, L. G.; SANT'ANA, C. R.; OLIVEIRA, R. B.; CEZAR, R. C.; ARAUJO, A. C. C.; SILVA, R. C. T.; TRINDADE, O. R.; COELHO, M. C.; FERRIOLI, E.; BENDASSOLLI, J. A. Performance of the $^{13}$C-urea breath test for the diagnosis of *H. pylori* infection using a substrate synthetized in Brazil: A preliminary study. **Clinics**, São Paulo, v. 73, e16-553, 2018.

COSTA, V. E.; SILVA, E. T.; BRUDER, E. M.; DUCATTI, C.; RODRIGUES, M. A. M. Uso de isótopos estáveis para detecção de infecção por *Helicobacter pylori* em humanos no Brasil. **Revista Brasileira de Física Médica**, São Paulo, v. 7, p. 191-194, 2013.

CROMPTON, L. A.; FRANCE, J.; REYNOLDS, C. K.; MILLS, J. A. N.; HANIGAN, M. D.; ELLIS, J. L.; BANNINK, A.; BEQUETTE, B. J.; DIJKSTRA, J. An isotope dilution model for partitioning phenylanine and tyrosine uptake by the mammary gland of lactating dairy cows. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 359, p. 54-60, 2014.

DICK, D. P.; NOVOTNY, E. H.; DIECKOW J.; BAYER, C. Química da matéria orgânica do solo. In: MELO, V. F.; ALLEONI, L. R. (Ed.). **Química e mineralogia do solo:** Parte II – Aplicações. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009.

DUCATTI, C. **Isótopos estáveis ambientais**. [apostila]. Botucatu: Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2004.

EMSLEY, J. **The elements**. 1. ed. New York: Oxford University Press, 1989.

EVENEPOEL, P.; HIELE, M.; LUYPAERTS, A.; GEYPENS, B.; BUYSE, J.; DECUYPERE, E.; RUTGEERTS, P.; GHOOS, Y. Production of egg proteins, enriched with L-Leucine-$^{13}C_1$, for the study of protein assimilation in humans using the breath test technique. **The Journal of Nutrition**, Springfield, v. 127, p. 327-331, 1997.

FRANÇA, M. C.; PESSENDA, L. C. R.; COHEN, M. C. L.; AZEVEDO, A. Q.; FONTES, N. A.; SILVA, F. B.; MELO JUNIOR, J. C. F.; PICCOLO, M. C.; BENDASSOLLI, J. A.; MACARIO, K. Late-Holocene subtropical mangrove dynamics in response to climate change during the last millennium. **The Holocene**, Kent, v. 29, p. 445-456, 2018.

GAUTHIER, M.; OUTHOUSE, A.; ISHIKAWA, Y.; KUTSCHKE, K. O.; HACKETT, P. A. Second-stage enrichment in the laser separation of carbon isotopes. **Journal of Applied Physics**, New York, v. 35, p. 173-177, 1984.

GHOOS, Y. F.; MAES, B. D.; GEYPENS, B. J.; MYS, G.; HIELE, M. I.; RUTGEERTS, P. J.; VANTRAPPEN, G. Measurement of gastric emptying rate of solids by means of a carbon-labeled octanoic acid breath test. **Gastroenterology,** Baltimore, v. 104, p. 1640-1647, 1993.

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.

GRANJA, A. C. R. **Separação dos isótopos estáveis de boro, por troca iônica em sistema cascata, e obtenção de $H_3{}^{10}BO_3$ enriquecido em $^{10}B$**. 2013. 115 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

GRUBER, N.; FRIEDLINGSTEIN, P.; FIELD, C. B.; VALENTINI, R.; HEIMANN, M.; RICHEY, J. E.; ROMERO-LANKAO, P.; SCHULZE, E. D.; CHEN, C. T. A. The vulnerability of the carbon cycle in the 21st century: an assessment of carbon-climate human interactions. In: FIELD, C.B.; RAUPACH, M. R. (Ed.). **The global carbon cycle**: Integrating humans, climate, and the natural world. Washington, DC: Island Press, 2004.

GRUSAK, M. A. Intrinsic stable isotope labeling of plants for nutritional investigations in humans. **The Journal of Nutrition Biochemistry**, Stoneham, v. 8, p. 164-171, 1997.

HARLAND, C. E. **Ion exchange** – theory and practice. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1994.

HERRERA, V.; PARSONNET, J. *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 15, p. 971-976, 2009.

HOOI, J. K. Y.; LAI, W. Y.; NG, W. K.; SUEN, M. M. Y. Global prevalence of helicobacter pylori infection: systematic review and meta-analysis. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 153, p. 420-429, 2017.

HUTCHISON, C. A.; STEWART D. W.; UREY, H. C. The concentration of $C^{13}$. **The Journal of Chemical Physics**, New York, v. 8, p. 532-537, 1940.

ISHIMORI, T. The nitrogen isotopic equilibrium between ammonia and ammonium ion. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, Tokyo, v. 33, p. 516-519, 1960.

KARAMANOLIS, G.; CAENEPEEL, P.; ARTS, J.; TACK, J. Determinants of symptom pattern in idiopathic severely delayed gastric emptying: gastric emptying rate or proximal stomach dysfunction? **Gut**, London, v. 56, p. 29-36, 2007.

KELLY, S. D. Using stable isotope ratio mass spectrometry (IRMS) in food authentication and traceability. In: LEES, M. **Food Authenticity and Traceability.** London: Woodhead Publishing, 2003. p. 156-183.

KENNEDY, B. V.; KROUSE, H. R. Isotope fractionation by plants and animals: implications for nutrition research. **Canadian Journal Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 68, p. 960-972, 1990.

LEE, M.-H.; KANG, S.-H.; YOO, J.-H.; LEE, T.-G. **Low-Enriched 13C-Labelled urea composition for urea breath test**. Pat. WO 01/92889 A1, 31 maio 2001. 20 p.

LEHNINGER, A. L. **Bioquímica**: componentes moleculares das células. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1976.

LI, H. L.; JU, Y. L.; LI, L. J.; XU, D. G. Separation of isotope $^{13}C$ using high-performance structured packing. **Chemical Engineering and Processing**, Lausanne, v. 49, p. 255-261, 2010.

IAEA. **Live Chart of Nuclides.** Vienna: IAEA - Nuclear Data Section, 2009-2019. Disponível em: <https://www-nds.iaea.org/relnsd/vcharthtml/VChartHTML.html>. Acesso em: 18 fev. 2019.

LONDON, H. **Separation of isotopes**. London: George Newnes, 1961. p. 209-248: Isotope separation by chromatographic methods

MIERA, R. S.; COMAS, U.; LOPEZ, I. J. **Separacion de los isotopos estables del boro por cromatografia de intercambio ionico**. Madrid: Junta de Energia Nuclear, 1985. 45 p. (Bulletin, 580).

MAIA, C. M. B. F.; PARRON, L. M. Matéria orgânica como indicador da qualidade do solo e da prestação de serviços ambientais. In: PARRON, L. M.; GARCIA, J. R.; OLIVEIRA, E. B.; BROWN, G. G.; PRADO, R. B. **Serviços ambientais em sistemas agrícolas e florestais do Bioma Mata Atlântica**. Brasília, DF: Embrapa, 2015. cap. 8, p. 101-108.

MARSHALL, B. J.; WARREN, J. R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. **The Lancet**, London, v. 323, p. 1311-1315, 1984.

MARTIN, G. J.; GUILLOU, C.; MARTIN, M. L.; CABANIS, M. T.; TEP, Y.; AERNY, J. Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 36, p. 316-322, 1988.

MARTINELLI, L. A.; MOREIRA, M. Z.; OMETTO, J. P. H. B.; ALCARDE, A. R.; RIZZON, L. A.; STANGE, E.; EHLERINGHER, J. R. Stable carbon isotopic composition of the wine and $CO_2$ bubbles of sparkling wines: Detecting C4 sugar additions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 51, p. 2625-2631, 2003.

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. **Anais…** Vancouver: 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, p. 211-216, 2005.

MAXIMO, E.; SANT´ANA FILHO, C. R.; TRIVELIN, P. C. O.; BENDASSOLLI, J. A. Isotope separation of nitrogen by ion exchange chromatography in a cascade system. **Solvent Extraction and Ion Exchange**, London, v. 31, p. 743-762, 2013.

MCCUE, M. D.; ARQUISOLA, B.; ALBACH, E.; POLLOCK, E. D. Hens produce artificially enriched $^{13}C$ egg proteins for metabolic tracer studies. **International Journal of Biology**, Ottawa, v. 5, p. 69-84, 2013.

MCCUE, M. D.; WELCH JUNIOR, K. C. $^{13}C$-Breath testing in animals: theory, applications, and future directions. **Journal of Comparative Physiology B**, Berlin, v. 186, p. 265-285, 2016.

McINTEER, B. B. Isotope separation by distillation: Design of a Carbon-13 plant. **Separation Science and Technology**, New York, v. 15, p. 491-508, 1980.

MODAK, A. S. Stable isotope breath tests in clinical medicine: a review. **Journal of Breath Research**, Bristol, v. 1, p. 1-13, 2007.

MURAMATSU, T.; HIRAMOTO, K.; TASAKI, I.; OKUMURA, J. I. Effect of protein starvation on protein turnover in liver , oviduct and whole body of laying hens. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, Oxford, v. 87, p. 227-232, 1987.

NEIGER, R.; SIMPSON, K. W. *Helicobacter* infection in dogs and cats: facts and fiction. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 14, p. 125-133, 2000.

NIER, A. O. The concentration of Carbon 13 by thermal diffusion. **Physical Review**, College Park, v. 57, p. 30-34, 1940.

OI, T.; SHIMAZAKI, H.; ISHII, R.; HOSOE, M. Boron isotope fractionation in liquid chromatography with boron-specific resins as column packing material. **Separation Science and Technology**, New York, v. 32, p. 1821-1834, 1997.

OUTHOUSE, A.; LAWRENCE, P. L.; GAUTHIER, M.; HACKETT, P. A. Laboratory Scale-up of Two-Stage Laser Chemistry Separation of $^{13}C$ from $CF_2HCl$. **Applied Physics B**, Berlin, v. 36, p. 63-75, 1985.

PARK, W. K.; MICHAELS, W. D. Separation of sulfur isotopes by displacement band chromatography. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ISOTOPE SEPARATION AND CHEMICAL EXCHANGE, 1994, Miamisburg. **Resumos...** Miamisburg, 1994. p. 351-356.

PERRI, F.; PASTORE, M. R.; ANNESE, V. $^{13}C$-octanoic acid breath test for measuring gastric emptying of solids. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, Rome, v. 9, p. 3-8, 2005.

PERRY, S.; DE LA LUZ SANCHEZ, M.; YANG, S.; HAGGERTY, T. D.; HURST, P.; PEREZ-PEREZ, G.; PARSONNET, J. Gastroenteritis and transmission of *Helicobacter pylori* infection in households. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, p. 1701-1708, 2006.

PIEZ, K. A.; EAGLE, H. $C^{14}$ Isotope effect on the ion-exchange chromatography of amino acids. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 78, p. 5284-5287, 1956.

PRENTICE, I. C.; FARQUHAR, G. D.; FASHAM, M. J. R.; GOULDEN, M. L.; HEIMANN, M.; JARAMILLO, V. J.; KHESHGI, H. S.; LE QUÉRÉ, C.; SCHOLES, R. J.; WALLACE, D. W. R. The carbon cycle and the atmospheric carbon dioxide. In: HOUGHTON, J. T.; DING, Y.; GRIGGS, D. J.; NOGUER, M.; VAN DER LINDEN, P. J.; DAI, X.; MASKELL, K.; JOHNSON, C. A. **Climate Change 2001**: The Scientific Basis. Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge: Cambridge University Press, 2001. p. 183-237.

REID, L. M.; O'DONNELL, C. P.; DOWNEY, G. Recent technological advances for the determination of food authenticity. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, p. 344-353, 2006.

ROSSET, R.; TREMILLON, B.; FOULD, H. La separation des isotopes au moyen des résines echangeuses dions. **Bulletin D' Informations Scientifiques et Tecniques du Commissariat à LEnergie Atomique**. Paris, v. 85. p. 1-13, 1964.

ROSSETE, A. L. R. M.; BENDASSOLLI, J. A.; MAXIMO, E.; SANT´ANA FILHO, C. R.; IGNOTO, R. F. Production of $^{34}S$ labeled gypsum ($Ca^{34}SO_4.2H_2O$). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, p. 399-404, 2006.

ROSSETE, A. L. R. M.; CARNEIRO, J. M. T.; BENDASSOLLI, J. A.; TAVARES, C. R. O.; SANT´ANA FILHO, C. R. Production of single superphosphate labeled with $^{34}S$. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 65, p. 91-94, 2008.

RUNDEL, P. W.; EHLERINGER, J. R.; NAGY, K. A. (Ed.). **Stable isotopes in ecological research**. New York: Springer-Verlag, 1989.

RUTHERFORD, W. M.; KELLER, J. M. Preparation of highly enriched Carbon-13 by thermal diffusion of methane. **The Journal of Chemical Physics**, New York, v. 44, p. 723-729, 1966.

SANT'ANA, 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, p. 743-749, 2008.

SANT'ANA, C. R.; TAVARES, C. R. O; FERREIRA, A. V; PRESTES, C. V.; BENDASSOLLI, J. A. Síntese e controle de qualidade da ureia enriquecida em $^{13}C$ para diagnóstico da *Helicobacter pylori* (HP). **Química Nova**, São Paulo, v. 36, p. 107-113, 2013.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

SPEDDING, F. H.; POWELL, J. E.; SVEC, H. J. A laboratory method for separating nitrogen isotopes by ion exchange. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 77, p. 6125-6132, 1995.

STAFF, S. Stamicarbon carbon dioxide stripping urea process. In: MEYERS, R. A. (Ed.). **Handbook of chemicals production process.** New York: McGraw-Hill, 1986. Section 3.11.

STRADIOTTI, A. C.; BENDASSOLLI, J. A.; DUCATTI, C.; SARTORI, J. R.; PELÍCIA, V. C.; ARAUJO, P. C.; MARUNO, M. K.; PEZZATO, A. C. Incorporation of Labeled Methionine as a Tissue Tracer in Broiler Chickens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, Campinas, v. 18, p. 719-724, 2016.

TAKEDA, K.; OBANAWA, H.; MORITA, N. Equilibrium behavior in acid-base chromatography for carbon isotope separation. **Separation Science and Technology**, New York, v. 22, p.103-119, 1987.

TAVARES, C. R. O.; BENDASSOLLI, J. A.; COELHO, F.; SANT´ANA, C. R.; PRESTES, C. V. $^{15}$N-labeled glycine synthesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 441-449, 2006.

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

TAYLOR, T. I.; UREY, H. C. Fractionation of the lithium and potassium isotopes by chemical exchange with zeolites. **The Journal of Chemical Physics**, New York, v. 6, p. 429-438, 1938.

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.

UCHINO, H. Toyo urea process-advanced process for cost and energy savings. In: MEYERS, R. A. (Ed.). **Handbook of chemicals production process.** New York: McGraw-Hill, 1986. section 3.12.

UEMURA, N.; OKAMOTO, S.; YAMAMOTO, S.; MATSUMURA, N.; YAMAGUCHI, S.; YAMAKIDO, M.; TANIYAMA, K.; SASAKI, N.; SCHLEMPER, R. J. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 345, p. 784-789, 2013.

VIRAMONTES, B. E.; KIM, D. Y.; CAMILLERI, M.; LEE, J. S.; STEPHENS, D.; BURTON, D. D.; THOMFORDE, G. M.; KLEIN, P. D.; ZINSMEISTER, A. R. Validation of a stable isotope gastric emptying test for normal, accelerated or delayed gastric emptying. **Neurogastroenterology & Motility**, Oxford, v. 13, p. 567-574, 2001.

WASEEM, S.; MOSHIREE, B.; DRAGANOV, P. V. Gastroparesis: Current diagnostic challenges and management considerations. **World Journal of Gastroenterology**, Pleasanton, CA, v. 15, p. 25-37, 2009.

WHITE, J. W.; WINTERS, K.; MARTIN, P.; ROSSMANN, A. Stable carbon isotope ratio analysis of honey: validation of internal standard procedure for worldwide application. **Journal of the AOAC International**, Arlington, v. 81, p. 610-619, 1998.

WINDSOR, H. M.; O'ROURKE, J. Bacteriology and taxonomy of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 29, n. 3, p. 633-648, 2000.

WOOLDRIDGE, D. E.; JENKINS, F. A. Evidence for the enrichment of carbon in the heavier isotope by diffusion. **Physical Review**, College Park, v. 49, p. 404, 1936.

ZHU, Y.; ZHOU, X.; WU, J.; SU, J.; ZHANG, G. Risk factors and prevalence of *Helicobacter pylori* infection in persistent high incidence area of gastric carcinoma in Yangzhong City. **Gastroenterology Research and Practice**, Cairo, v. 2014, p. 1-10, 2014.