

SÍNTESE E CONTROLE DE QUALIDADE DA UREIA ENRIQUECIDA EM ^{13}C PARA DIAGNÓSTICO DA *Helicobacter pylori* (HP)

Carlos R. Sant Ana Filho, Claudinéia R. O. Tavares, André V. Ferreira, Cleber V. Prestes e José A. Bendassoli*

Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, CP 96, 13400-970 Piracicaba – SP, Brasil

Recebido em 19/6/12; aceito em 14/8/12; publicado na web em 28/11/12

SYNTHESIS AND QUALITY CONTROL OF ^{13}C -ENRICHED UREA FOR *Helicobacter pylori* (HP) DIAGNOSIS. The aim of the study was to synthesize the urea ($^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$), with 99% ^{13}C atoms, and to perform a quality analysis for the diagnosis (breath test) of *Helicobacter pylori*. Furthermore, the process was submitted to economic analysis. The reaction was performed in a stainless steel reactor, lined with polytetrafluoroethylene, under low pressure and temperature. The synthesis method was shown to be appropriate (2.35 g; 81.9% yield), evidenced by physico-chemical and microbiological results, according to Brazilian legislation. The production and diagnosis costs were competitive compared with national and international market values, rendering this a valuable tool in clinical medicine.

Keywords: stable isotope; reactor; enriched compounds.

INTRODUÇÃO

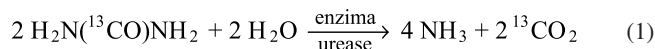
A infecção crônica proporcionada pelo *Helicobacter pylori* (HP) tem alta prevalência em todo o mundo, sendo a principal causa de gastrites crônicas e úlceras pépticas, além de ser fator de risco para o câncer gástrico, considerado o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo.¹ A prevalência dessa infecção varia entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, sendo menor nos primeiros. Porém, independentemente da região, as diferenças parecem estar em função da condição socioeconômica da população.²

O diagnóstico da infecção pelo HP tem sido, com maior frequência, realizado a partir da análise de fragmentos de biópsia, obtidos por endoscopia (método invasivo), fazendo-se uso do teste da urease, cultivo em meios apropriados ou submetidos à análise histológica com coloração de Giemsa e o PCR. Paralelamente, o diagnóstico pode ser obtido por procedimentos não invasivos, que compreendem a sorologia e o teste respiratório empregando a $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ enriquecida no isótopo de ^{13}C (isótopo estável) ou ^{14}C (isótopo radioativo).^{3,4}

A $^{14}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ é uma técnica não autorizada pela maioria das autoridades de saúde para o diagnóstico do HP, porque está associada a uma dose de radiação que, embora bastante baixa (5 μCi), necessita de uma licença (do órgão fiscalizador) para se realizar o exame, com local adequado para armazenamento e sua utilização não é permitida para mulheres grávidas e crianças. Por outro lado, o teste de respiração empregando o ^{13}C tornou-se cada vez mais atrativo, porque o isótopo estável é inócuo, de modo que pode ser repetido quantas vezes que forem necessárias em um mesmo paciente, como também pode ser realizado com segurança em crianças, mulheres grávidas ou com idade fértil.⁵ É um teste com mais de 90% de sensibilidade, altamente específico e permite a triagem de pacientes que não necessitam de exame direto da mucosa do estômago ou com dificuldade (sangramento, úlceras, terapia anticoagulante) na realização de biópsia. Pode ser usado em estudos epidemiológicos, sendo o teste de preferência para o controle da erradicação da infecção.⁶

No exame o paciente ingere 75 mg de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ enriquecida (99% em átomos de ^{13}C) dissolvida em suco de laranja ou H_2O . Em crianças recomenda-se 50 mg, devido à menor massa corpórea

(< 30 kg).⁷ Após a ingestão, a $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ atinge a mucosa gástrica e, na presença do HP, é metabolizada pela enzima urease da bactéria (reação 1).



O dióxido de carbono ($^{13}\text{CO}_2$) difunde-se dentro dos vasos sanguíneos, sendo transportado sob a forma de bicarbonato até os pulmões e liberado na forma de $^{13}\text{CO}_2$ com o ar expelido.⁸ Na presença da urease bacteriana a razão ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) isotópica é alterada significativamente. A proporção de $^{13}\text{CO}_2$, na amostra de ar expelido, é determinada por espectrometria de massas (IRMS) e expressa como diferença absoluta (Δ) entre os valores no tempo zero ($t = 0$) e 30 min ($t = 30$). O ponto crítico para catalogar os pacientes com HP negativo ou positivo é determinado por um valor $\Delta\delta$ de 4‰ (variação de delta per mil), o que significa que um aumento no valor de $\Delta\delta$ maior que 4‰ é indicativo da infecção.⁹

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

O crescente interesse pelo teste não invasivo, empregando a $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, no diagnóstico da infecção causada pelo *Helicobacter pylori* tem sido observado recentemente, refletindo um grande número de estudos publicados.¹⁰⁻¹⁵

As principais inconveniências do teste respiratório são a disponibilidade da $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ enriquecida ($\geq 99\%$ em átomos de ^{13}C) e a aquisição do espectrômetro de massas (IRMS), tornado-se um investimento economicamente inviável. No entanto, como no diagnóstico se utiliza o isótopo de ^{13}C , não radioativo, as amostras coletadas (ar expelido) podem ser enviadas para um centro de referência (localizado em regiões estratégicas), compartilhando apenas um espectrômetro entre vários centros especializados.

Com relação à disponibilidade do composto ($^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) enriquecido no isótopo estável, sabe-se que a tecnologia de produção não é repassada pelos países que a detém, em razão de interesses econômicos e, muitas vezes, estratégicos, o que torna extremamente importante o desenvolvimento de novas tecnologias (separação isotópica e produção de compostos enriquecidos) no Brasil.

A síntese da $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, em sistema descontínuo, envolvendo a reação química entre o CO (monóxido de carbono), NH_3 (amônia) e S

*e-mail: jab@cena.usp.br

(enxofre), à temperatura de 100 °C, na presença do CH₃OH (metanol), é um método alternativo ao processo convencional (pressão de 13 a 25 MPa e temperatura de 170 a 200 °C). Inicialmente o procedimento foi realizado, em escala laboratorial (ou piloto), em reator tipo A-4, spec. 94-40376 com volume de 1,8 L. De acordo com os resultados, utilizando-se 10,9 g de NH₃, 9,8 g de S, 8,7 g de CO, 0,6 g de H₂S e 35 mL de CH₃OH, obteve-se em torno de 13,5 g de CO(NH₂)₂, equivalente a rendimento de 73%.¹⁶

Utilizando-se o método alternativo, desenvolveram-se estudos para obter CO(NH₂)₂ enriquecida em ¹⁵N e/ou ¹³C, avaliando-se também a reação de síntese entre ¹⁵NH₃, ¹³CO e S, sob baixa pressão e temperatura. O rendimento do processo base (1 mol de ¹⁵NH₃, 1 mol de CO e 0,75 mol de S, temperatura de 100 °C e tempo de reação de 3 h), para obtenção CO(¹⁵NH₂)₂, foi de 83%; o produto final apresentou 0,1% de biureto e 0,45-0,5% de S.¹⁷ A síntese da ¹³CO(NH₂)₂, utilizando-se 45 g (2,6 mols) de NH₃, 21 g (0,71 mol) de ¹³CO, 32 g (1 mol) de S, 150 g de metanol (previamente saturado com H₂S), na temperatura de 100 °C e tempo de 3 h, apresentou rendimento de 87% (37,5 g). O rendimento do processo (envolvendo 20 g de mistura metanol-¹⁵NH₃, 10,1 g (0,34 mol) de ¹³CO, 50 mL de metanol (saturado com H₂S) e 10,6 g (0,33 mol) de S, a 100 °C e tempo de 8 h) para a síntese da ¹³CO(¹⁵NH₂)₂ foi em torno de 35% (5 g).¹⁸

No Brasil, avaliou-se a síntese da CO(¹⁵NH₂)₂, com baixo enriquecimento (5% em átomos de ¹⁵N), a partir da reação entre ¹⁵NH₃, CO e S. Nesse, foi utilizado um reator de aço inoxidável com uma manta aquecedora e um manômetro de aço inoxidável para controle de pressão e da quantidade dos reagentes (principalmente do CO) a ser introduzidos no reator. O sistema de produção apresentou rendimento, em média, de 78%, sendo verificada baixa contaminação de metais pesados, proveniente das paredes do reator de síntese. Foi avaliado o aspecto termodinâmico desse processo de síntese da CO(NH₂)₂, envolvendo a reação entre CO, S e NH₃. Os resultados indicaram que a conversão de NH₃ a CO(NH₂)₂ foi inversamente proporcional à temperatura, no entanto, ela não explica a cinética da reação. Assim, à temperatura ambiente (25 °C), o equilíbrio (conversão de 92,5%) da reação pode ser obtido em tempo extremamente prolongado.¹⁹

A disponibilidade de compostos enriquecidos nos isótopos estáveis (¹⁵N, ³⁴S, entre outros), no país, impulsionou significativamente as pesquisas com o emprego de traçador não radioativo.²⁰⁻²³ Ressalta-se, ainda, que os custos desses compostos têm se mostrado inferiores ao preço de comercialização internacional (FOB).

Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo a síntese da ¹³CO(NH₂)₂ enriquecida (99% em átomos de ¹³C), bem como o controle de qualidade (físico-química e microbiológica), visando seu emprego no diagnóstico da *Helicobacter pylori* (HP). Além disso, o processo de síntese foi submetido a uma avaliação (custos fixos e variáveis) econômica específica, relacionando os valores (composto e diagnóstico) com os obtidos no mercado nacional e do exterior.

PARTE EXPERIMENTAL

Síntese da ¹³CO(NH₂)₂

A reação de síntese da ¹³CO(NH₂)₂ ocorreu dentro de um reator de aço inoxidável (1 L) revestido internamente com politetrafluoretileno (PTFE). O procedimento de produção envolve a reação entre ¹³CO, NH₃, S, tendo o CH₃OH (metanol) como solvente, sob baixa pressão e temperatura.¹⁹

Inicialmente adicionou-se o enxofre (S) no interior do reator de síntese. A quantidade (g) de S foi em função do ¹³CO (reagente limitante) e tomando como base a estequiometria da reação (2).²⁴ O reator foi fechado, ajustando-se corretamente a tampa do cilindro de reação e, com auxílio de um sistema (linha de vidro e bomba

mecânica) de vácuo, a pressão em seu interior foi reduzida a 10⁻³ MPa. Após, o reator foi colocado em uma solução (etanol e CO₂(s)) à temperatura de -74 °C, com objetivo de facilitar a transferência dos reagentes (NH₃, ¹³CO, H₂S e CH₃OH) para o reator.



Em seguida, os recipientes contendo CH₃OH, H₂S e NH₃ foram conectados ao reator de síntese, através de tubulações de aço inoxidável (Ø ¼) e válvulas tipo esfera. Desse modo, abrindo-se as válvulas realizou-se a limpeza, com o sistema de vácuo, nas tubulações para a transferência dos reagentes. Ao final, pressão em torno de 10⁻³ MPa, fechou-se a válvula de interligação com o sistema de vácuo e adicionaram-se, pela ordem, H₂S, CH₃OH e NH₃ para o reator. O volume (mL) de CH₃OH empregado no processo foi calculado de acordo com a quantidade (g) de S.¹⁷ Ao final, desconectaram-se os recipientes (NH₃, CH₃OH e H₂S), sendo que a massa (g) de NH₃ transferida foi determinada por gravimetria.

Por último, o ¹³CO enriquecido (99,7% em átomos de ¹³C), contido no reservatório de aço inoxidável, foi então admitido ao reator. Para facilitar a transferência do gás (¹³CO) manteve-se a temperatura do reator em torno de -74 °C (solução de etanol e CO₂(s)), diminuindo a pressão de vapor dos reagentes (NH₃, H₂S e CH₃OH) presentes no reator. Na sequência, transferiu-se o ¹³CO para o reator. Após o procedimento, fecharam-se as válvulas, desconectou-se o reservatório e a massa (g) do ¹³CO foi determinada por gravimetria.

O reator foi retirado da solução (CH₃CH₂OH e CO₂(s)) e, ao atingir a temperatura ambiente (± 25 °C), colocado em um sistema de aquecimento provido com agitação mecânica (Figura 1). Esse sistema de aquecimento é constituído de placas aquecedoras com controle de temperatura (termostato) incluindo um termopar tipo k no interior do reator. Ao final do período de reação, o sistema de aquecimento foi desligado e resfriou-se o reator até a temperatura ± 25 °C.

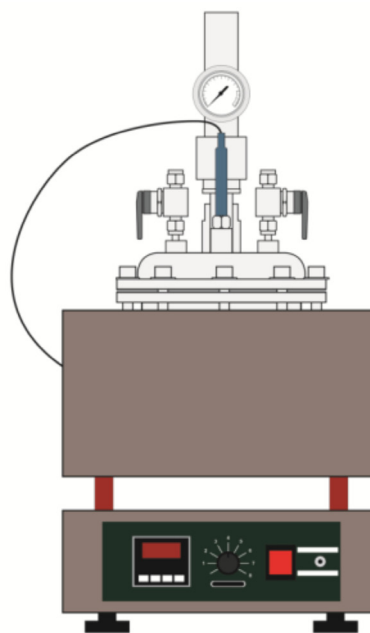


Figura 1. Reator (1 L) de aço inoxidável, utilizado para a síntese da ¹³CO(NH₂)₂, acoplado ao sistema de aquecimento com controle da temperatura e agitação mecânica

Os gases existentes no interior do reator, provenientes da reação, foram expurgados, com auxílio de N₂ (gás de arraste), passando na sequência por uma solução contendo 1 mol L⁻¹ de H₂SO₄ (para reter

possíveis traços de NH_3) e finalmente por uma solução de H_2O_2 30% (m/v) e 2 mol L^{-1} NaOH, na proporção de 1:2 (H_2O_2 :NaOH), para reter o H_2S (subproduto da reação), sendo esse um gás extremamente tóxico e inflamável.

Em seguida, procedeu-se à abertura do reator com a retirada da mistura de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ e S, contida no seu interior. O reator teve sua parede interna lavada com H_2O desionizada, solubilizando a $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ e mantendo o S na fase sólida, em vista de sua baixa solubilidade. Por filtragem a vácuo (mecânica), em papel de filtro em microfibras de vidro (1,6 μm) e outro de membrana em ésteres de celulose (0,45 μm), o S foi separado da $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$. A solução final, contendo $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ solubilizada em H_2O , foi aquecida a 50 °C, obtendo-se o produto na forma cristalina.

A $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ sintetizada foi submetida a processos de purificação para retirada de possíveis impurezas obtidas durante a reação de síntese. O primeiro procedimento (UQ) baseia-se na solubilidade das impurezas em um solvente orgânico, sendo empregada a acetona (CH_3COCH_3). Para isso, a $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ foi colocada em um béquer e adicionaram-se 50 mL de CH_3COCH_3 , sob agitação. Em seguida, a solução foi transferida para o sistema de filtração a vácuo, com filtro de microfibras de vidro (1,6 μm), separando-se o composto sólido. Após o procedimento, a $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ foi novamente cristalizada.

No segundo procedimento foi utilizado, após UQ, o processo de troca iônica (UF), constituído por duas colunas de vidro (com diâmetro interno de 1,6 cm e comprimento de 30,5 cm) preenchidas até 27 cm do topo, com resinas catiônicas (Dowex 50W-X8) e aniônica (Dowex 1X8). Essas resinas foram utilizadas com o objetivo de se reter as impurezas (elementos na forma iônica) e permitir que a $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ percolasse pelas colunas. O volume de resina acondicionada, na forma H^+ ou OH^- equilibrada em H_2O , totalizou 70 mL para cada coluna.

As resinas foram preliminarmente lavadas com H_2O (Mili-Q) com objetivo de retirar as impurezas e traços de resíduos orgânicos. Posteriormente, os sítios ativos das resinas (catiônica e aniônica) foram saturados nas formas de R-H^+ e R-OH^- , pela admissão de soluções de HCl (1 mol L^{-1}) e NaOH (2 mol L^{-1}), respectivamente. O fluxo das soluções procedeu por gravidade, com os reservatórios localizados a 1 m de altura em relação à base do sistema de coluna. Para eliminar o excesso de HCl e NaOH, volume intersticial das resinas, foi realizada a lavagem com admissão de H_2O (Mili-Q).

Em seguida, as colunas foram acopladas em série ($\text{R-H}^+/\text{R-OH}^-$) e interligadas ao reservatório de armazenamento (1 L). A massa (g) de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, equivalente a uma batelada, foi dissolvida em H_2O (Mili-Q) e admitida no sistema de colunas. Essa solução resultante foi eluída com H_2O (Mili-Q), contida no reservatório. Ao final do procedimento, a $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ foi cristalizada (50 °C).

Controle de qualidade da $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$

As amostras de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ foram submetidas, em triplicata, a vários procedimentos analíticos, tais como: determinação da concentração (%) de N utilizando espectrômetro de massas com analisador automático - *Continuous Flow - Isotope ratio mass spectrometry* (CF-IRMS), fazendo uso do padrão NIST 1577b (*National Institute Standards of Technology*), contendo 10,18% de Ntotal; análise do ponto de fusão (°C) e concentração (%) de biureto; determinações (mg kg^{-1}) multielementares por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).²⁵⁻²⁸

Para a determinação isotópica (% em átomos de ^{13}C) da $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ sintetizada foram utilizados os métodos para obtenção do $^{13}\text{CO}_2$ (g) e análise no espectrômetro de massa Atlas Mat modelo CH4 (fluxo molecular).²⁴

A carga microbiana (bactérias, fungos e leveduras), nas

amostras de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ enriquecida, foi determinada de acordo com a Farmacopeia Brasileira.²⁹ As placas foram incubadas na temperatura de 30 a 35 °C por 4 dias (bactérias) e entre 20 e 25 °C por 7 dias (fungos e leveduras).³⁰

Aspectos econômicos

O processo de síntese foi submetido a uma análise econômica específica, objetivando atestar sua viabilidade (custo benefício) em relação aos métodos (invasivos ou não) utilizados para o diagnóstico da *Helicobacter pylori* (HP). Para tanto, foi considerado o custo (R\$), por batelada, do processo (equipamentos; infraestrutura física; manutenções; mão de obra; reagentes; energia elétrica e análises) de síntese da $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, comparando com o valor de comercialização do produto no mercado internacional (FOB).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Síntese da $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$

Com o sistema proposto, envolvendo todas as etapas descritas, foi possível obter em média $2,35 \pm 0,1$ g de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ enriquecida no isótopo de ^{13}C , equivalente a rendimento médio de $81,9 \pm 1,5\%$. No procedimento utilizaram-se 6,13 g de NH_3 , 1,28 g de ^{13}CO e S, 40 mL de CH_3OH , 40 mg de H_2S , temperatura de 100 °C, tempo de reação em 120 min e pressão de 0,98 MPa.²⁴ A síntese completa demanda um tempo de, aproximadamente, 8 h de trabalho.

A temperatura de reação foi atingida após, aproximadamente, 30 min, quando, então, se manteve constante com o emprego de um sistema de aquecimento com controle (termostato/Termopar) de temperatura. Ao final do período de reação e do resfriamento do reator (± 25 °C), efetuou-se a exaustão dos gases em, aproximadamente, 25 min.

No processo, com base nos dados da síntese, também foram realizados o balanço de massa dos reagentes principais (NH_3 e ^{13}CO), obtendo-se, em média, recuperação de 65,3% (21,4% incorporado na molécula da $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ e 43,9% recuperado na forma de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e perda de 34,7% de NH_3 (provavelmente na forma de óxidos de nitrogênio). Com relação ao ^{13}CO pôde-se verificar recuperação de 84,0% (incorporado na $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) e perda de 16% (0,2048 g do ^{13}CO). Esse último fato proporcionou redução econômica do processo de síntese em torno de R\$ 44,06 por batelada (R\$ 241,0/g de ^{13}CO), devido ao uso de composto com elevado (99,7% em átomos de ^{13}C) enriquecimento isotópico.

Os resultados isotópicos (% em átomos de ^{13}C), obtidos nas amostras de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ sintetizadas, foram, em média, $99,1 \pm 0,3\%$ em átomos de ^{13}C , evidenciando ausência de fracionamento isotópico no sistema de produção.

Análise da $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$

Concentração (%) de nitrogênio (N)

As determinações da concentração (%) de N contido nas amostras de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ foram realizadas em espectrômetro de massas com sistema analisador automatizado (Anca-GSL), utilizando-se do padrão NIST 1577b. Os dados contidos na Tabela 1 não apresentaram diferença estatística significativa ($F = 1,59$), ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. Desta forma, as amostras de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ sintetizadas não apresentaram diferença estatística em relação a P.A (grau analítico), atestando a eficiência do procedimento de produção. Além disso, os resultados apresentaram excelente precisão analítica ($\text{CV} = 0,54\%$), com concentração média de 46,2% de N, equivalente à pureza química de 99,2%.

Tabela 1. Determinação da concentração (%) de N, nas amostras de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, por CF-IRMS (ANCA-GSL) (média \pm desvio padrão; n = 3)

$^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	Concentração de N (%) [*]
P.A	46,3 \pm 0,2 a
U1	46,4 \pm 0,1 a
U2	46,2 \pm 0,2 a
U3	45,9 \pm 0,4 a
Média	46,2
$F_{(\text{amostras})} = 1,59^{\text{ns}}$	$\text{CV}(\%) = 0,54$

Medidas seguidas de letras distintas minúsculas na coluna diferem estatisticamente, ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey. P.A - $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (grau analítico); U1, U2 e U3 - $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ purificada. * resultados obtidos a partir de padrão NIST1577b.

Ponto de fusão ($^{\circ}\text{C}$) e teor (%) de biureto

A análise do ponto de fusão mostrou que a $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ sintetizada funde à temperatura média de 132,9 $^{\circ}\text{C}$, valor muito próximo da amostra P.A (grau analítico). Essa última apresentou ponto de fusão médio de 133,7 $^{\circ}\text{C}$, dentro da especificação fornecida pelo fabricante. Fato que comprova a adequação do método analítico, bem como demonstra a eficiência do procedimento de purificação submetido às amostras de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ sintetizadas.

Os resultados das análises colorimétricas para determinação da concentração (%) de biureto (impureza tóxica), presente nas amostras de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, apresentaram valor médio de 0,55% em peso do composto. Verificou-se também que as amostras sintetizadas apresentaram diferença em relação à amostra P.A (grau analítico), cuja concentração média de biureto foi 0,06%. Além disso, a concentração de biureto (0,06%) contido na amostra P.A está de acordo com o valor certificado pelo fornecedor, atestando a eficiência do método analítico empregado.

A $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ enriquecida (99% em átomos de ^{13}C) é usada, em

clínica médica, para o diagnóstico da *Helicobacter pylori* (HP), sendo necessário a admissão via oral de 75 mg (adultos) e 50 mg (crianças) do composto por exame. Desta forma, empregando-se a $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ sintetizada tem-se a ingestão, por exame, de 0,0059 e 0,009 mg de biureto por kg^{-1} de massa corpórea para adultos e crianças, respectivamente. Essas quantidades (mg) administradas de biureto não oferecem risco à saúde da população, levando-se em consideração que outros compostos, tais como, 2,3,7,8-Tetraclorodibenzop-dioxina (2,3,7,8-TCDD) e Tetradoxina, que são extremamente tóxicos, por ingestão, apresentam limite máximo (DL_{50}) de 0,022 e 0,01 mg kg^{-1} de massa corpórea, respectivamente.³¹ Pode-se ainda destacar que a $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ pode ser considerada uma molécula análoga ao biureto, apresentando um valor de DL_{50} oral, para ratos, de 14.300 mg kg^{-1} (inócuo).

Análise multielementar por ICP- MS

A precisão e exatidão do método analítico empregado foram verificadas utilizando-se um material certificado de referência (NIST 1515) e uma solução padrão multielementar de calibração (SVC), da marca Agilent. Os resultados experimentais, em triplicata, das concentrações (mg kg^{-1}) dos elementos obtidos nas amostras estão apresentados na Tabela 2.

As determinações realizadas dos elementos B, Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Ba e Pb concordaram com os valores certificados no material de referência (NIST 1515) e de verificação da calibração (SVC) (Tabela 2), apresentando taxa de recuperação na faixa de 93-105% e os desvios padrão relativos foram, em geral, menores que 8%.

Na Tabela 3 estão expressos os resultados das concentrações (mg kg^{-1}) dos analitos (B, Na, Mg, Al, P, S, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Ba e Pb) para as diferentes amostras (UQ e UF) de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ sintetizadas, bem como os valores referentes à amostra P.A (grau de pureza analítico). Analisando os dados correspondentes às amostras de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ obtidas após processos de purificação com CH_3COCH_3 (UQ) e $\text{CH}_3\text{COCH}_3/\text{resinas}$ (UF), respectivamente, verificou-se uma

Tabela 2. Concentrações dos elementos determinados nos materiais certificados (SVC e NIST 1515) por ICP-MS (n = 3)

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

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

variação bastante significativa nas concentrações (mg kg^{-1}) desses elementos. Esse fato demonstra a eficiência no processo de purificação de UF, nas amostras de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, proporcionando redução média de 77% nas concentrações dos elementos analisados.

Tabela 3. Concentração (mg kg^{-1}) dos elementos, contido nas amostras de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, por ICP-MS

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

P.A – amostras referência de $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (grau analítico); UQ e UF – amostras de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ obtida após purificação com acetona (CH_3COCH_3) e CH_2COCH_3 /resinas (catiônicas e aniônicas), respectivamente; *(média ± desvio padrão; n = 3); L.D = Limite de detecção.

Nesse contexto, destacam-se os resultados obtidos para B, Na, S, K, Cr, Zn, Ba e Pb que apresentaram excelente redução na faixa de 90 a 100% dos elementos. Em particular, é importante mencionar os bons resultados obtidos para os micronutrientes como Cr (91,66%) e Zn (88,34%), que desempenham funções nutricionais ou bioquímicas essenciais à saúde dos seres vivos, porém sua presença em organismos vivos pode ser prejudicial em concentrações acima do limite máximo permitido pelas legislações pertinentes. Outros elementos, tais como Ba (98,21%) e Pb (100%), que não são essenciais aos seres vivos do ponto de vista biológico e são considerados tóxicos, mesmo em baixas concentrações (mg kg^{-1}), porque são acumulativos nos organismos dos animais e homens.³²

Ainda com base nos dados da Tabela 3, verificou-se que 50% dos elementos analisados não apresentaram variações expressivas nas concentrações (mg kg^{-1}) entre as amostras de UF e P.A. Os valores encontrados estão dentro dos limites máximos de tolerância (LMT) estabelecidos pelas normas brasileiras e atendem também às especificações de outros países.^{33,34} Em destaque para B, S e Pb que tiveram níveis de quantificação, em UF e P.A, abaixo do limite (0,16; 174,0; 0,028 $\mu\text{g L}^{-1}$) de detecção no ICP-MS. Esses resultados atendem às exigências das Farmacopeias, principalmente para o Pb, que tem como limite máximo permitido em matérias-primas para produção de medicamentos a faixa de 10 a 20 mg kg^{-1} . O limite máximo permitido de Pb na zidovudina (AZT), agente antiviral amplamente utilizado no tratamento da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), fornecido pela *United States Pharmacopeia* (USP) é 10 mg kg^{-1} .³⁵

Por outro lado, concentrações médias obtidas para Na, Al e Fe (18,41; 20,24 e 40,56 mg kg^{-1} , respectivamente) situam-se muito acima dos valores obtidos para os outros elementos, bem como também diferem significativamente do correspondente na amostra P.A (grau analítico). Outros elementos como Cr, Mn e Ni apresentam concentrações bastante reduzidas em UF (0,62; 0,81 e 1,24 mg kg^{-1} , respectivamente), porém superiores aos valores quantificados nas amostras P.A. Essas informações obtidas, na Tabela 3, são extremamente importantes, levando-se em consideração que os elementos “potencialmente tóxicos” como Al, Cr e Ni são importantes em vista de alguns riscos à saúde (mutações, carcinogenicidade, lesões no DNA, disfunções neurológicas como Mal de Alzheimer e outros tipos de escleroses) atribuídos à ingestão e acúmulo no organismo humano.³⁶

No entanto, a presença desses elementos (principalmente Al e Cr) nas amostras de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ não é preocupante, uma vez que no diagnóstico da *Helicobacter pylori* serão admitidos, via oral, 75 mg (adulto) e 50 mg (crianças) do composto por exame.⁷ Nessas quantidades administradas aos pacientes, as concentrações de Al, Fe, Cr, Mn e Ni (2,54; 5,58; 0,42; 0,15 e 0,21 $\mu\text{g/dose}$, respectivamente) são bem inferiores aos limites máximos permitidos pela legislação pertinente.³³ Ainda deve-se salientar que a $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ não é medicamento de uso diário, descartando a preocupação da acumulação do elemento pela exposição contínua.

Análise microbiológica

As amostras de $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ sintetizadas apresentaram valores de contagem (< 10 UFC g^{-1}) em placas para bactérias, fungos e leveduras muito abaixo das especificações fornecida pelo órgão fiscalizador, bem como os limites especificados pela Farmacopeia Brasileira.^{29,33} Também não foi encontrada a presença de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em nenhuma das amostras do composto analisadas.

Avaliação econômica

O custo de produção da $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, com enriquecimento de 99,1% em átomos de ^{13}C , foi de R\$ 192,21 por grama do composto (Tabela 4), valor esse cerca 20,5% inferior ao preço internacional (FOB) que é de R\$ 242,00 (US\$ 134,40), baseado na cotação do dólar em R\$ 1,80. No entanto, deve-se salientar a ausência das elevadas taxas e impostos aplicados aos produtos importados.

Deve-se ainda mencionar que a produção nacional (em escala piloto), por batelada, de 2,35 g da $^{13}\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, enriquecida a 99,1% em átomos de ^{13}C , corresponde à realização de 32 diagnósticos da infecção por *Helicobacter pylori* (HP) em adultos (75 mg), com custo de R\$ 54,40 (referente ao valor de R\$ 14,40 do composto e R\$ 40,00 das análises isotópicas no t = 0 e t = 30 min) por exame, ou pode-se também realizar, com a devida massa (2,35 g), em torno de 53 diagnósticos do HP em crianças (45 mg), com custo unitário de R\$ 48,64 (R\$ 8,64 do composto e R\$ 40,00 das análises isotópicas) por exame. Além disso, os custos (nacional e no exterior) estimados dos métodos para diagnóstico do HP que dependem da realização de endoscopia para a coleta da biópsia gástrica (invasivos), bem como os testes empregando compostos marcados nos isótopos de C (não invasivos) estão apresentados na Tabela 5.

Os custos nacionais dos métodos invasivos foram em média 136% mais elevados que os procedimentos não invasivos (sorologia, ^{14}C e ^{13}C). Destacando-se que a ^{13}C -ureia utilizada para o diagnóstico, no Brasil, foi importada (custo FOB + taxas de tributação) de outros países, principalmente dos Estados Unidos, Inglaterra e França. Observou-se também que os custos dos procedimentos (invasivos ou não) realizados no exterior apresentaram comportamento semelhante

Tabela 4. Custos fixos e variáveis na produção, por batelada, da $^{13}\text{C}(\text{NH}_2)_2$ enriquecida a 99,2% em átomos de ^{13}C

Especificação	Valor unitário (R\$)	Quantidade	Investimentos		
			Fixo	Variável	Total ^(a)
			------(R\$)-----		
^{13}C (99,2% atom. ^{13}C) ^(d)	249,22*	1,28		319,00	319,00
Análise química	12,50	1		12,50	12,50
Análise isotópica	25,00	1		25,00	25,00
Energia elétrica	0,35	10 kw		3,50	3,50
NH_3 (g)	1,009	6,13		6,00	6,00
N_2 (g)	15,00	0,03 m ³		15,00	0,45
N_2 (l)	7,00	5 L		35,00	35,00
Reagentes	19,67	1		19,67	19,67
Mão de obra	1.210,90 ^(c)	3 h	1.210,90		24,00
Equipamentos	19.000,00		19.000,00		3,29**
Manutenção do sistema			19.000,00		3,29**
Total					451,70
Custo (R\$/g $^{13}\text{C}(\text{NH}_2)_2$)					192,21
Preço FOB (R\$/g $^{13}\text{C}(\text{NH}_2)_2$)					242,00
Produção do Laboratório: 2,35 g ^(b)					

^(a) Base de cálculo: 1 batelada de produção do laboratório, nas melhores condições obtida com o sistema; ^(b) 2,35 g de $^{13}\text{C}(\text{NH}_2)_2$ enriquecido a 99,2% em átomos de ^{13}C ; ^(c) valor referente ao salário de um técnico de nível básico (Faixa II-A), com base na Tabela de vencimentos do DRH-USP (maio/2010); ^(d) obtido da Spectra Gases Inc. (pureza química de 99,8%, contido em um cilindro de 420 mL capacidade interna); * valor de custo do produto no Brasil (FOB + taxas de tributação), com dólar no valor R\$ 1,80; ** valor amortizado para 30 dias considerando o tempo estimado de 30 anos de durabilidade do sistema de produção.

Tabela 5. Custos estimados dos testes utilizados no diagnóstico da *Helicobacter pylori* (HP)

Teste	Nacional ^(a)	Exterior ^(b)
	------(R\$)-----	
Endoscopia*	319,70	246,70
+ Histopatologia*	436,00	394,40
+ Cultura*	394,72	308,40
+ Teste Urease*	357,06	252,30
Sorologia (IgG)**	143,86	227,10
^{14}C -Ureia**	170,00	152,00
^{13}C -Ureia** ^(c)	189,60	148,00
^{13}C -Ureia** ^(d)	54,40	-----

(a) Valores médios obtidos junto a clínicas e hospitais no Brasil; (b) valores dos testes baseado na cotação do dólar em R\$1,80;³⁷⁻³⁹ (c) composto importado por clínicas e hospitais do país; (d) produto obtido junto ao Laboratório de Isótopos Estáveis CENA/USP; (e) diagnóstico da HP em adultos (75 mg de ureia- ^{13}C). Métodos *invasivos e **não invasivos.

aos nacionais, no entanto, somente o teste sorológico (IgG) apresentou custo 57,9% superior (R\$ 83,3). Outro fato verificado, na Tabela 5, foi que os valores dos diagnósticos empregando os isótopos de ^{13}C e ^{14}C foram muito próximos, mas é importante salientar que o teste respiratório empregando ^{14}C -ureia não é recomendado em algumas

situações (pediatria, estudos epidemiológico e mulheres grávidas) por ser radioativo.⁴

O emprego da ^{13}C -ureia ($^{13}\text{C}(\text{NH}_2)_2$) enriquecida (Tabela 5), obtida no país, permite uma economia em torno de R\$ 341,5 e 113,4 para os procedimentos invasivos ou não, respectivamente, empregados no diagnóstico da HP. Além disso, o valor (R\$ 54,40) do diagnóstico empregando ^{13}C -ureia mostrou-se inferior, cerca de 3 vezes, ao custo do exame realizado no exterior.

CONCLUSÃO

O método utilizado para síntese da $^{13}\text{C}(\text{NH}_2)_2$ mostrou-se adequado, atestado pela qualidade físico-química e microbiológica, segundo padrões estabelecidos pelos órgãos fiscalizadores, indicando boas condições para emprego no diagnóstico da *Helicobacter pylori* (HP).

A $^{13}\text{C}(\text{NH}_2)_2$ sintetizada apresentou custo muito próximo ao comercializado no mercado internacional (FOB), ausentes das taxas e impostos aplicados aos produtos importados. O diagnóstico da HP, empregando a ^{13}C -ureia sintetizada, apresentou elevada redução no custo em relação aos procedimentos (invasivos ou não) aplicados atualmente em clínicas e hospitais do país e do exterior. É importante mencionar que com o avanço tecnológico (métodos para a separação isotópica de C ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e obtenção do ^{13}C), no país, o custo de R\$ 54,40 do diagnóstico da HP tende a sofrer mais reduções.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Isótopos Estáveis pelo apoio técnico na execução do trabalho, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do projeto de pesquisa e bolsa de estudos.

REFERÊNCIAS

- Newnham, A.; Quinn, M. J.; Babb, P.; Kang, J. Y.; Majeed, A.; *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2003**, *17*, 665.
- Go, M. F.; *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2002**, *16*, 3.
- Castro, A. P. W.; Gomes, A. T. B.; Padovan, G. J.; Oliveira, R. B.; Marchini, J. S.; *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **2004**, *40*, 63.
- Mattar, R.; Silva, F. M.; Alexandrino, A. M.; Laudanna, A. A.; *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **1999**, *41*, 3.
- Gisbert, J. P.; Pajares, J. M.; *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2004**, *20*, 1001.
- Siqueira, J. S.; Lima, P. S. S.; Barreto, A. S.; Quintans-Junior, L. J.; *Rev. Bras. Anal. Clin.* **2007**, *39*, 9.
- Canete, A.; Abunaji, Y.; Alvarez-Calatayud, G.; Devicente, M.; González-Holguera, J.; Leralta, M.; Pajares, J. M.; Gisbert, J. P.; *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2003**, *36*, 105.
- Tonelli, E.; Freire, L. M. S.; *Doenças Infecciosas na Infância e Adolescência*, 2ª ed., MEDSI: Rio de Janeiro, 2000.
- Ellenrieder, V.; Glasbrenner, B.; Stoffels, C.; Weiller, S.; Bode, G.; Möller, P.; Adler, G.; *Eur. J. Gastroenterol. Hepat.* **1997**, *9*, 1085.
- Tseng, C. A.; Wu, J. Y.; Pan, Y. S.; Yu, F. J.; Kuo, C. H.; Lu, C. Y.; Su, Y. C.; Wu, D. C.; Perng, D. S.; Jan, C. M.; Wang, W. M.; *Hepato-Gastroenterology* **2005**, *52*, 1636.
- Ortiz-Olvera, N. X.; Morán, V. S.; Gallardo, W. I.; Blancas, V. J. M.; Cabrera, M. L.; *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **2007**, *99*, 392.
- Zullo, A.; Perna, F.; Ricci, C.; Hassan, C.; Tampieri, A.; De Francesco, V.; Morini, S.; Vaira, D.; *Dig. Dis. Sci.* **2008**, *53*, 370.
- Silva, J. M. K.; Villares, C. A.; Monteiro, M. S.; Colaúto, C.; Santos, A. F.; Mattar, R.; *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* **2010**, *52*, 125.
- Coelho, L. G. V.; Silva Jr, A. E.; Coelho, M. C. F.; Penna, F. G. C.; Ferreira, R. O. A.; Santa-Cecilia, E. V.; *Arq. Gastroenterol.* **2011**, *48*, 104.

15. Escobar-Pardo, M. L.; Godoy, A. P. O.; Machado, R. S.; Rodrigues, D.; Fagundes Neto, U.; Kawakami, E.; *J. Pediatr.* **2011**, *87*, 393.
16. Franz, A. A.; Applegath, F. A.; *J. Org. Chem.* **1961**, *26*, 3306.
17. Kucheryavii, V. I.; Gorlovskii, D. M.; Zinov'ev, G. N.; Gorbushenkov, V. A.; *J. Appl. Chem. USSR (Engl. Transl.)*, **1976**, *49*, 2561.
18. Whaley, T. W.; Ott, D. G.; *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1975**, *11*, 167.
19. Bendassolli, J. A.; Victoria, R. L.; *Quim. Nova* **1995**, *18*, 21.
20. Bendassolli, J. A.; Trivelin, P. C. O.; Ignoto, R.F.; *Sci. Agric.* **2002**, *59*, 595.
21. Sant Ana Filho, C. R.; Bendassolli, J. A.; Rossete, A. L. R. M.; Piedade, S. M. S.; Prestes, C. V.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2008**, *25*, 743.
22. Maximo, E.; Bendassolli, J. A.; Trivelin, P. C. O.; Rossete, A. L. R. M.; Oliveira, C. R.; Prestes, C. V.; *Quim. Nova* **2005**, *28*, 211.
23. Tavares, C. R. O.; Bendassolli, J. A.; Coelho, F.; Sant Ana Filho, C. R.; Prestes, C. V.; *An. Acad. Bras. Cienc.* **2006**, *78*, 1.
24. Sant Ana Filho, C. R.; *Tese de Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2011.
25. Barrie, A.; Prosser, S. J. Em *Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry*; Boutton, T. W.; Yamsahi, S., eds.; Marcel Dekker: New York, 1996, chap.1.
26. OECD-Guidelines for the Testing of Chemicals; *Test N° 102: Melting Point/Melting Range*, OECD Publishing: France, 1995.
27. Ferreira, R. B.; Franzini, V. P.; Gomes Neto, J. A.; *Eclética Quím.* **2007**, *32*, 43.
28. <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf>, acessada em Agosto 2012.
29. *Farmacopeia Brasileira*; 5ª ed., Editora Instituto Oswaldo Cruz: Rio de Janeiro, 2010.
30. Pinto, T. J. A.; Kaneko, T. M.; Ohara, M. T.; *Controle biológico da qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos*, 1ª ed., Editora Atheneu: São Paulo, 2000.
31. Assunção, J. V.; Pesquero, C. R.; *Rev. Saúde Pública* **1999**, *33*, 523.
32. WHO-World Health Organization; *Barium and Barium Compounds*, Concise International Chemical Assessment Document 33, WHO Press: Geneva, 2001.
33. http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/67_081007rdc.htm, acessada em Agosto 2012.
34. *European Pharmacopoeia*; 7ª ed., European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care, Council of Europe: Strasbourg, 2011.
35. Moreira, F. R.; Moreira, J. C.; Pivetta, F.; Coutada, L.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 379.
36. Kabata-Pendias, A.; Mukherjee, A.B.; *Trace elements from soil to human*, Springer-Verlag: New York, 2007.
37. http://www.rah.sa.gov.au/nucmed/urea/urea_docguide.htm, acessada em Março 2012.
38. <http://www.trimed.com.au>, acessada em Abril 2012.
39. Holmes, K. P.; Fang, J. C.; Jackson, B. R.; *BMC Health Serv. Res.* **2010**, *10*, 344.