



LUIZ CONSTANTINO ABRANTES CRONEMBERGER

**CULTIVO DA MICROALGA *Spirulina platensis* MARCADA COM ISÓTOPO
ESTÁVEL ^{13}C USANDO $^{13}\text{CO}_2$**

Botucatu

2020

LUIZ CONSTANTINO ABRANTES CRONEMBERGER

**CULTIVO DA MICROALGA *Spirulina platensis* MARCADA COM ISÓTOPO
ESTÁVEL ^{13}C USANDO $^{13}\text{CO}_2$**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Unesp Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Assoc. Vladimir Eliodoro
Costa

Botucatu

2020

C947c

Cronemberger, Luiz Constantino Abrantes

Cultivo da microalga *Spirulina platensis* marcada com isótopo estável ^{13}C usando $^{13}\text{CO}_2$ / Luiz Constantino Abrantes Cronemberger. -- Botucatu, 2020

54 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Vladimir Eliodoro Costa

1. Física nuclear. 2. Isótopos Separação. 3. Alga.
I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca do Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de LUIZ CONSTANTINO ABRANTES CRONEMBERGER, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 20 dias do mês de fevereiro do ano de 2020, às 08:30 horas, no(a) Centro de Isótopos Estáveis - IBB, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Assoc. VLADIMIR ELIODORO COSTA - Orientador(a) do(a) Departamento de Física e Biofísica / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, Prof. Dr. JOSE ALBERTINO BENDASSOLLI do(a) Laboratório de Isótopos Estáveis - CENA / ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA, Prof. Dr. LUIS FERNANDO BARBISAN do(a) Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de LUIZ CONSTANTINO ABRANTES CRONEMBERGER, intitulada **CULTIVO DA MICROALGA SPIRULINA PLATENSIS MARCADA COM ISÓTOPO ESTÁVEL ^{13}C USANDO $^{13}CO_2$** . Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: Aprovado. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Prof. Assoc. VLADIMIR ELIODORO COSTA

Prof. Dr. JOSE ALBERTINO BENDASSOLLI

Prof. Dr. LUIS FERNANDO BARBISAN

Às meus amados pais,

Maria e Antônio,

dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa pela confiança, apoio e orientação, que foi muito além de simples conselhos científicos e acadêmicos.

A colaboração da equipe do Centro de Isótopos Estáveis “Prof. Dr. Carlos Ducatti”, sobretudo ao Evandro e à Cibele, que me ajudaram nas análises.

À Mariana, peça chave que mantém todas as engrenagens do laboratório girando, sempre solícita para ajudar a todos.

A atenção da equipe da Seção Técnica de Pós-Graduação, principalmente do Davi, que me socorreu diversas vezes.

Ao Prof. Dr. Carlos Ducatti (in memoriam) por todo esforço e dedicação para construir toda a infraestrutura do Centro de Isótopos Estáveis, que hoje carrega o seu nome.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus pais e à minha irmã por todo o suporte, sendo sempre meus pilares.

À minha namorada por estar ao meu lado e acreditar no meu potencial.

Aos demais alunos, professores e funcionários que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

RESUMO

Anormalidades no tempo de esvaziamento gástrico causam complicações que afetam a qualidade de vida em humanos e a cintilografia é o padrão ouro para este diagnóstico. Contudo sua aplicação é restrita devido ao uso do radioisótopo ^{99m}Tc . Uma alternativa a este método é o teste respiratório com isótopo estável do carbono. Este teste é um exame que não utiliza radioisótopos, não é invasivo e não possui contraindicação. Sua aplicação varia de acordo com o substrato utilizado, podendo ser empregado a microalga *Spirulina platensis* marcada com ^{13}C ($[^{13}\text{C}]$ -*Spirulina platensis*). No Brasil, não há a produção desse substrato marcado e o seu alto custo dificulta a aplicabilidade do teste. Assim, neste trabalho foi produzida a $[^{13}\text{C}]$ -*Spirulina platensis* buscando melhor custo-benefício com a utilização do $^{13}\text{CO}_2$ como fonte de ^{13}C . Foram realizados no total quatro cultivos, sendo dois sem marcação, que visavam avaliar a produção sem desperdiçar compostos marcados, e dois com marcação. No processo de produção, a microalga foi cultivada em biorreator com água deionizada, micronutrientes, macronutrientes e $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$, obtido através do $^{13}\text{CO}_2$. O fotoperíodo, o pH, a temperatura e a agitação foram monitoradas, e após o cultivo, a microalga foi colhida, filtrada, lavada e seca. A produção média da biomassa nos cultivos foi de 2,17 g de *S. platensis*. A média das produtividades desses cultivos ficou em $0,056 \text{ g(L.dia)}^{-1}$. A $[^{13}\text{C}]$ -*Spirulina platensis* foi analisada por espectrometria de massa de razão isotópica para determinação do enriquecimento isotópico no ^{13}C que foi, em média, de 21,10%. O custo de produção da *S. platensis* marcada foi 40% menor do valor de compra por importação. Contudo, como o enriquecimento isotópico médio adquirido foi 21,10%, comparado a 97% da importada, o custo de produção da $[^{13}\text{C}]$ -*S. platensis* neste trabalho ficou 84% maior que uma mistura de mesmo enriquecimento isotópico utilizando-se $[^{13}\text{C}]$ -*S. platensis* importada e *S. platensis* natural.

Palavras-chave: *Spirulina platensis*. Enriquecimento isotópico. ^{13}C . Teste respiratório. Esvaziamento gástrico. Isótopos estáveis.

ABSTRACT

Abnormalities in the time of gastric emptying cause complications that affect the quality of life in humans and scintigraphy is the gold standard for this diagnosis. However, its application is restricted due to the use of the radioisotope ^{99m}Tc . An alternative to this method is the breath test with a stable carbon isotope. This test is an exam that does not use radioisotopes, is not invasive and has no contraindication. Its application varies according to the substrate used, and the microalgae *Spirulina platensis* labeled with ^{13}C ($[^{13}\text{C}]\text{-Spirulina platensis}$) can be used. In Brazil, there is no production of this labeled substrate and its high cost hampers the applicability of the test. Thus, in this work, $[^{13}\text{C}]\text{-Spirulina platensis}$ was produced, seeking better cost-benefit with the use of $^{13}\text{CO}_2$ as a source of ^{13}C . A total of four crops were carried out, two without labeling, which aimed to evaluate production without wasting labeled compounds, and two with labeling. In the production process, the microalga was grown in a bioreactor, with deionized water, micronutrients, macronutrients and $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$, obtained through $^{13}\text{CO}_2$. The photoperiod, pH, temperature and agitation were monitored, and after cultivation, the microalgae were harvested, filtered, washed and dried. The average biomass production in the crops was 2.17 g of *S. platensis*. The average yield of these crops was $0.056 \text{ g(L.day)}^{-1}$. *S. platensis* labeled with ^{13}C was analyzed by isotopic ratio mass spectrometry to determine isotopic enrichment in ^{13}C , which was, on average, 21.10% of abundance. The production cost of the labeled *S. platensis* was less than 40% of the purchase price per import (97% of abundance). However, as the average isotopic enrichment acquired was 21.10%, compared to 97% of the imported one, the production cost of $[^{13}\text{C}]\text{-Spirulina platensis}$ in this work was 84% more expensive than a mixture, with the same isotopic enrichment, using imported $[^{13}\text{C}]\text{-Spirulina platensis}$ and natural *Spirulina platensis*.

Keywords: *Spirulina platensis*. Isotopic enrichment. ^{13}C . Breath test. Gastric emptying.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVOS	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Bicarbonato de sódio marcado	20
4.2. Meio de cultivo.....	22
4.3. Estuda com fotoperíodo e termoperíodo	25
4.4. Microrganismo.....	26
4.5. Produção da <i>S. platensis</i> (1ª etapa).....	26
4.6. Purga de nitrogênio gasoso	28
4.7. Monitoramento de densidade e pH.....	30
4.8. <i>S. platensis</i> marcada (2ª etapa).....	30
4.9. Análise da <i>S. platensis</i> (3ª etapa).....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1. Bicarbonato de sódio marcado	34
5.2. Produção da <i>S. platensis</i> (1ª e 2ª etapas).....	34
5.3. Análise da <i>S. platensis</i> (3ª etapa).....	40
6. CONCLUSÃO	47
7. REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

O esvaziamento gástrico (*Gastric Emptying* ou GE) é uma etapa importante para a digestão dos nutrientes ingeridos diariamente nas refeições. Desse modo, anormalidades no tempo de GE, retardado ou acelerado, podem causar problemas clínicos (HAUSER et al., 2016). Para diagnosticar essas anormalidades no tempo de GE, tanto na fase sólida quanto na fase líquida, o exame padrão-ouro é a cintilografia. Este teste faz a medição quantitativa do GE pelo rastreamento de uma refeição, marcada com o radioisótopo Tecnécio-99m (^{99m}Tc), que é servida ao paciente (BRUNO et al., 2013). O ^{99m}Tc é utilizado devido a sua meia-vida de aproximadamente 6 horas com decaimento radioativo gama (MARQUES; OKAMOTO; BUCHPIGUEL, 2001). Portanto, é um procedimento que ocorre com a ingestão de fonte radioativa não selada, acarretando em exposição radioativa (BRUNO et al., 2013).

Diferentemente dos radioisótopos, os isótopos estáveis são mais seguros, porque não emitem radiações, e vem sendo utilizados em diversos procedimentos de diagnóstico clínico, principalmente em doenças gastrointestinais. A utilização de isótopos estáveis como biomarcadores, além de não restringir gestantes, lactantes e crianças, apresenta grandes vantagens na avaliação de vários processos metabólicos e fisiológicos em seres vivos (BRADEN, 2009). Para avaliação do GE com isótopos estáveis de Carbono utiliza-se o teste respiratório (^{13}C -*Breath Test*) com um dos seguintes substratos marcados: [^{13}C]-*Spirulina platensis* (^{13}C -SpBT) ou o [^{13}C]-Ácido octanóico (^{13}C -OBT), ambos sendo adicionados a refeições nutricionalmente balanceadas (BRUNO et al., 2013; NGUYEN et al., 2013). Comparados ao exame cintilográfico, o ^{13}C -SpBT e o ^{13}C -OBT apresentam boa eficiência, porém o ^{13}C -OBT só fornece os dados de GE de fase sólida enquanto que o ^{13}C -SpBT fornece tanto os

dados de GE de fase sólida quanto os de fase líquida (BHARUCHA et al., 2013; BONFRATE et al., 2015; CHAPMAN et al., 2011; SZARKA et al., 2008).

Para o ^{13}C -SpBT, pode-se utilizar 50, 100 ou 200 mg de ^{13}C -*S. platensis*, enriquecida à 97% de ^{13}C nos átomos de Carbono, adicionadas a uma refeição, servida junto de um copo com 180 mL de água (BHARUCHA et al., 2013; BONFRATE et al., 2015; CHAPMAN et al., 2011; SZARKA et al., 2008). Contudo, no Brasil, não há a produção da ^{13}C -*S. platensis* e ela somente é adquirida por importação, onerando, assim, a aplicabilidade do teste.

O enriquecimento isotópico convencional da *S. platensis* com o ^{13}C ocorre por meio da fotossíntese utilizando o bicarbonato de sódio marcado com ^{13}C ($\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$) em meio aquoso como fonte, onde a microalga assimila o ^{13}C à sua biomassa durante o seu crescimento a partir do $^{13}\text{CO}_2$ dissolvido no meio de cultivo (EVANS et al., 2009). Entretanto, o $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ também possui custo elevado de importação, porém 34% menor e são necessários 3,51 g para produzir 1 g de ^{13}C -*S. platensis* (EVANS et al., 2009).

Por outro lado, o enriquecimento isotópico também pode ser realizado a partir do $^{13}\text{CO}_2$, sintetizando o $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ e produzindo a ^{13}C -*S. platensis*. Assim, usando o $^{13}\text{CO}_2$, pode-se minimizar o custo do processo em 61%, sendo necessários 2 g de $^{13}\text{CO}_2$ para produção de 3,51 g de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$, quantidade usada para produzir 1 g de ^{13}C -*S. platensis* (EVANS et al., 2009).

Sendo assim o objetivo desse projeto é cultivar e enriquecer isotopicamente a *S. platensis* com o isótopo estável ^{13}C a partir do $^{13}\text{CO}_2$, avaliar sua qualidade para o ^{13}C -SpBT e o custo-benefício da sua produção. Este propósito pode facilitar o acesso a este substrato no Brasil. Além disso, caso a produção da ^{13}C -*S. platensis* seja

efetiva e com um baixo custo, a viabilidade deste produto será maior, possibilitando mais exames clínicos de GE menos invasivos, ou ainda para fins de pesquisa no diagnóstico de doenças, ou na eficácia de tratamentos, ou no metabolismo proteico (DEVI et al., 2018).

2. OBJETIVOS

Cultivar e enriquecer isotopicamente a *S. platensis* com o isótopo estável ^{13}C a partir do $^{13}\text{CO}_2$. Avaliar o custo-benefício e o enriquecimento isotópico da $[^{13}\text{C}]$ -*S. platensis* cultivada a partir do $^{13}\text{CO}_2$.

3. REVISÃO DE LITERATURA

O GE é um processo fisiológico complexo, envolvendo a digestão, a absorção e, por fim, o transporte do conteúdo estomacal para o duodeno. Esse processo é mediado concomitantemente pelo sistema nervoso central, pelo sistema nervoso entérico e por peptídeos (hormônios ou neurotransmissores). Seu início se dá com a chegada do quimo vindo do esôfago para o estômago, gerando diversas distensões e contrações neste último. Em seguida, dependendo das interações neuronais ou hormonais recebidas nos quimiorreceptores do duodeno, o intestino delgado passa a controlar a taxa com que o estômago é esvaziado. Estas interações vão depender dos componentes alimentares ingeridos, dando continuidade aos processos de digestão, absorção e transporte no intestino delgado (HIRATA et al., 2007).

Existem algumas anormalidades que atrasam o tempo de GE gerando diversos problemas clínicos. Dentre tais anormalidades pode-se citar a gastroparesia (GP), uma doença crônica, sintomática, gastrointestinal, caracterizada por GE retardado de sólidos alimentares com ou sem líquidos. Entre seus sintomas pode-se mencionar: dores abdominais, anorexia, saciedade precoce, deficiências de crescimento, perda de peso, náuseas, plenitude pós-prandial, inchaço, refluxo e vômitos (HAUSER et al., 2016; KARAMANOLIS et al., 2007). Diabetes mellitus e vagotomia são os principais fatores orgânicos da GP. Quando não há causa orgânica aparente, GP é classificada como idiopática (KARAMANOLIS et al., 2007).

Além das anormalidades que atrasam o tempo de GE, existem outras que aceleram o tempo de GE. Dentre essas pode-se citar a hipotensão pós-prandial (HPP), doença pouco compreendida que resulta de uma queda pós-prandial, ou seja,

pós-refeição, da pressão arterial que, por sua vez, pode levar o paciente a ter síncores. Esta queda de pressão indica uma compensação inadequada do *pool* sanguíneo esplâncnico induzido pela alimentação (TRAHAIR; HOROWITZ; JONES, 2015). Estudos indicam que a prevalência da HPP é de 25% a 40% entre pessoas que precisam de cuidados especiais em casa, isto é, de cuidadores e/ou enfermeiros; e pode chegar a 91% entre pacientes geriátricos hospitalizados (TRAHAIR; HOROWITZ; JONES, 2014).

Outra doença relacionada ao esvaziamento gástrico acelerado é a síndrome de Dumping (DS). A DS pode ser descrita como o rápido trânsito do quimo pelo estômago. Sua ocorrência está mais ligada à ingestão de líquidos do que a ingestão de sólidos somente. Entre seus sintomas podem estar: fraqueza, fadiga, dispneia e, se for grave, hipotensão e desmaios (BERG; MCCALLUM, 2016). Além disso, a DS atinge metade dos casos pós-gastrectomias parciais, sendo a mais comum das síndromes pós-gastrectomias (LOSS et al., 2009).

Para detectar tanto o esvaziamento gástrico acelerado como o esvaziamento gástrico retardado, o exame padrão-ouro, ou seja, o exame referência, é a cintilografia utilizando câmara gama. Este exame pode verificar: o tempo de esvaziamento gástrico de uma refeição líquida e sólida, a distribuição intragástrica de alimento, e a quantidade de alimento que deixa o estômago em um determinado período de tempo (FRIED, 1994). Estes dados são coletados através de imagens geradas, durante 4 horas, por sinais recebidos da câmara gama que, por sua vez, recebe radiação da refeição marcada com o radioisótopo ^{99m}Tc , em doses que variam entre 0,5 mCi, 1 mCi, 2 mCi ou 5 mCi (18,5 MBq, 37 MBq, 74 MBq ou 185 MBq), previamente servida ao paciente (BHARUCHA et al., 2013; FACCIN, 2018; NGUYEN et al., 2008; URBAIN et al., 1993).

Nos últimos 50 anos, o ^{99m}Tc vem sendo amplamente utilizado em clínicas de medicina nuclear para diagnósticos de várias doenças ou disfunções de órgãos e sistemas humanos. Esta vasta utilização se deve às características do radioisótopo como: meia-vida de 6,01 horas; decaimento por emissão de radiação gama pura, com fótons de 140 keV; e praticidade na obtenção do radioisótopo a partir de um sistema gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$) (MARQUES; OKAMOTO; BUCHPIGUEL, 2001). O ^{99m}Tc combinado às refeições pode vir conjugado de diferentes formas conhecidas como radiofármacos: ^{99m}Tc -albumina coloidal, ^{99m}Tc -enxofre coloidal e ^{99m}Tc -estanho coloidal. As refeições mais utilizadas são: duas fatias de pão de forma torradas e claras de ovos com geleia de morango, para exames de esvaziamento gástrico de sólidos; ou 1 L de leite ou água, para exames de esvaziamento gástrico de líquidos. É um procedimento não invasivo, porém, devido ao uso de material radioativo, o número de repetibilidade de exames por pessoa é limitado, sendo que, para que seja feita a repetição do exame, é necessário um intervalo. Também devido ao uso de material radioativo, o procedimento é contraindicado no caso de mulheres em idade fértil, gestantes, lactantes e crianças. Além disso, a cintilografia só pode ser oferecida em departamentos de medicina nuclear, pois requer o uso de equipamentos de alto custo e pessoal de alta qualificação; o que pode restringir ainda mais sua utilização (BRUNO et al., 2013).

Homologamente aos radioisótopos, ou seja, desempenhando as mesmas funções, só que, ainda, com a vantagem da segurança, devido ao fato de não apresentarem decaimento radioativo, os isótopos estáveis vêm sendo empregados em múltiplos procedimentos de diagnóstico clínico, majoritariamente em doenças gastrointestinais (BRADEN, 2009). A vantagem de sua utilização como biomarcadores é a segurança que não restringe gestantes, lactantes e crianças. Logo, os isótopos

estáveis apresentam grande importância na avaliação de vários processos metabólicos e fisiológicos (BRADEN, 2009), importância esta que também se estende ao campo da pesquisa, onde exames antigamente feitos com radioisótopos dificultavam a repetibilidade de experimentos; então, os isótopos estáveis também servem de ferramentas para fins de pesquisa (DIBAISE, 2001; EVENEPOEL et al., 1998).

Uma das aplicações dos isótopos estáveis na avaliação de processos metabólicos e fisiológicos é o teste respiratório com o isótopo estável de Carbono, o ^{13}C -BT. Este teste respiratório pode ser realizado em diversos locais e é um teste não invasivo, coletando apenas o sopro da respiração do paciente. Este sopro, analisado posteriormente em laboratório com o espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS) ou a espectroscopia de infravermelho (BHARUCHA et al., 2013; SZARKA et al., 2008), infere a razão isotópica do Carbono no dióxido do Carbono ($^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$) da respiração (BRUNO et al., 2013). Por fim, pode-se demonstrar de forma qualitativa e semiquantitativa os processos metabólicos e fisiológicos do organismo (BRADEN et al., 2007). O ^{13}C -BT pode ser aplicado para: a determinação do tempo de GE de fase sólida ou líquida; o diagnóstico da infecção pelo *Helicobacter pylori*; a determinação do tempo de trânsito orocecal; o diagnóstico da função do fígado ou do pâncreas; capacidade de assimilação de carboidratos; e verificação de proliferação bacteriana. Para o mesmo diagnóstico pode ser utilizado um ou mais substratos marcados com ^{13}C (BRADEN, 2009).

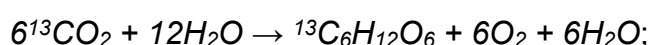
Para determinação do tempo de GE (^{13}C -GEBT) usa-se ou [^{13}C]-*Spirulina platensis* (^{13}C -SpBT) ou o [^{13}C]-Ácido octanóico (^{13}C -OBT), ambos sendo adicionados a refeições nutricionalmente balanceadas (BRUNO et al., 2013; NGUYEN et al., 2013). No procedimento, o paciente deve estar em jejum de oito horas (sólidos e

líquidos) e deve ter seu sopro basal colhido no início do exame. Depois, é oferecida a refeição com [^{13}C]-*S. platensis* (50, 100 ou 200mg) ou [^{13}C]-Ácido octanóico (100mg). Após a refeição, dez sopros serão colhidos nos tempos: 0 minuto, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 1 hora e meia, 2 horas, 2 horas e meia, 3 horas e 4 horas; totalizando 11 amostras que serão posteriormente analisadas em laboratório (SZARKA et al., 2008; WETZEL; FISCHER, 2005). Tanto o ^{13}C -SpBT e o ^{13}C -OBT já tiveram sua eficácia comprovada, sendo correlacionados ao exame cintilográfico. Uma diferença é que o ^{13}C -OBT só fornece os dados de GE de fase sólida enquanto que o ^{13}C -SpBT fornece dados de GE de fase sólida e de fase líquida (BHARUCHA et al., 2013; BONFRATE et al., 2015; CHAPMAN et al., 2011; SZARKA et al., 2008).

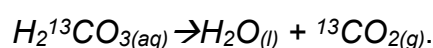
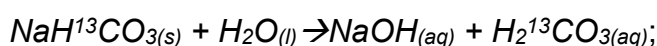
A. S. platensis (Domínio: *Bacteria*; Filo: *Cyanobacteria*; Classe: *Cyanophyceae*; Ordem: *Oscillatoriales*; Família: *Microcoleaceae*; Gênero: *Arthrospira*; Espécie: *Arthrospira platensis*) é uma cianobactéria, uma cianofícea, uma microalga azul-esverdeada que é considerada apropriada para o consumo humano, sendo classificada como *GRAS* (*Generally Recognized as Safe*) pelo *FDA* (*Food and Drug Administration*). Ela também é considerada uma alga funcional, pois apresenta altos teores de proteínas (64-74%), ácidos graxos poli-insaturados, vitaminas, sais minerais, atividades hipolipidêmicas, anti-inflamatórias e antioxidantes; garantindo seu uso sem riscos à saúde (CIFERRI, 1983; COLLA et al., 2007; DENG; CHOW, 2010a, 2010b; TOKUŞOĞLU; ÜNAL, 2003). Atualmente, sua produção é feita com muitas finalidades: alimento para humanos, alimento para animais, produção industrial em larga escala para suprir ambas as finalidades anteriores, produção de energia por sua biomassa, controle da qualidade da água, entre outras (BARROS, 2010; HABIB et al., 2008; JIMÉNEZ et al., 2003). Ademais, estes cultivos já são feitos em todo o globo, como em países da Europa, Ásia, África, América do Norte e América do Sul

(JIMÉNEZ et al., 2003; KEBEDE; AHLGREN, 1996), mostrando que este cultivo é relativamente fácil; podendo até ser feito utilizando ureia (FENG; WU, 2006).

Apesar destas facilidades e de todas as utilidades mencionadas acima, há um cultivo suscetível para a utilidade como substrato do ^{13}C -SpBT. Para tal é necessário um cultivo que enriqueça isotopicamente a *S. platensis* com o ^{13}C . Este enriquecimento pode ocorrer por meio da fotossíntese com $^{13}\text{CO}_2$ segundo a reação:



na qual a microalga assimila o ^{13}C a partir do $^{13}\text{CO}_2$ na sua biomassa (EVANS et al., 2009). Entretanto, a assimilação direta do $^{13}\text{CO}_2$ exigiria um sistema de vedação e inserção do gás muito sofisticado para evitar vazamentos e quantificar o volume de $^{13}\text{CO}_2$ inserido. Um método para assegurar que o $^{13}\text{CO}_2$ não venha a ser desperdiçado, utiliza $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ que é introduzido no meio de cultivo (EVANS et al., 2009). Desta forma, o $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ libera $^{13}\text{CO}_2$ como se pode observar nas reações:



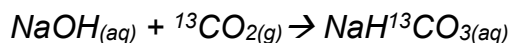
No entanto, o custo do $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ também é alto (US\$92,00 por grama, sem impostos de importação; disponível em: <<https://shop.isotope.com/productdetails.aspx?itemno=CLM-441-PK>>, acessado em: 04/11/2019). Outra alternativa seria produzir o $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ a partir do $^{13}\text{CO}_2$ diminuindo o custo da produção de *S. platensis* enriquecida isotopicamente com o ^{13}C .

4. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi dividido em três etapas. Na primeira etapa, foi estabelecido um sistema para produção da *S. platensis*. Para avaliar este sistema, a produção de *S. platensis* foi testada, em duplicata, sem compostos marcados com meio de cultivo específico dentro de uma estufa com variáveis controladas. Dessa forma, essa etapa visou avaliar a produtividade da *S. platensis* neste sistema, evitando o desperdício dos compostos marcados. Na segunda etapa, foi produzida, também em duplicata, a *S. platensis* nas mesmas condições de meio de cultivo e estufa fixados pela metodologia, mas dessa vez utilizando $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ obtido a partir do $^{13}\text{CO}_2$. Na terceira e última etapa foram avaliados o enriquecimento isotópico da *S. platensis* marcada produzida a partir do $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ e o custo desta produção.

4.1. Bicarbonato de sódio marcado

O $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ foi produzido em parceria com o Laboratório de Isótopos Estáveis (LIE) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba. A produção foi baseada na reação mostrada a seguir, em reator de aço inoxidável sobre um agitador magnético (modelo MA085, marca MARCONI, São Paulo, Brasil) e com manômetro (Figura 1).



O procedimento consistiu em colocar o hidróxido de sódio solubilizado em água deionizada dentro do reator (Figura 1). Depois de fechado o reator, foi realizado um vácuo para inserção posterior do dióxido de Carbono marcado, que foi inserido pelo

cilindro de $^{13}\text{CO}_2$, carregado a 2,42 atm (0,245 MPa), 300 K, com volume interno de 0,453 L, segundo dados fornecidos pelo fabricante, o que possibilitou, pela aplicação da equação de Clapeyron, (onde $P \times V = r \times n \times T$) estimarmos 2 g de massa de $^{13}\text{CO}_2$. O conjunto foi deixado para reagir por 48 horas, monitorando-se a pressão interna de acordo com o manômetro. A reação produziu o $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ dissolvido em água. Dadas as 48 horas de reação, o produto foi colocado em uma bandeja de vidro e secado em estufa. Já seco, o $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ foi raspado e pesado para avaliação dos resultados.



Figura 1. Reator de aço inoxidável com manômetro, já conectado a um cilindro de $^{13}\text{CO}_2$; todos sobre um agitador magnético.

4.2. Meio de Cultivo

O meio de cultivo foi fundamentado no meio Zarrouk (ZARROUK, 1966), que é o meio mais favorável para o crescimento do gênero *Spirulina sp* (J.P. PANDEY, AMIT TIWARI, 2010). Sua composição está descrita na Tabela 1 e foi obtida a partir da mistura dos componentes, deixando o $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ por último (EVANS et al., 2009). Caso fosse realizado o enriquecimento isotópico a partir do $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$, este tem que ser utilizado na mistura.

Tabela 1 Componentes para produção de 877,5 mL de meio de cultivo.

Componentes	Quantidade
Água Deionizada	754,650 mL
Mix de Metais	1,755 mL
Fosfato Mono-Potássio	315,90 mg
Nitrato de Sódio	2.158,60 mg
Cloreto de Potássio	368,50 mg
Cloreto de Sódio	877,50 mg
Sulfato de Magnésio	175,50 mg
Cloreto de Cálcio	35,10 mg
Bicarbonato de Sódio	7.020 mg

(Adaptado de EVANS et al., 2009)

O Mix de Metais da Tabela 1 consiste na mistura de todos os componentes descritos na Tabela 2. Desta quantidade (17,55 mL) foi retirada a alíquota necessária ao meio de cultivo da Tabela 1 (1,755 mL).

Tabela 2 Componentes para produção de 17,55mL de Mix de Metais.

Componentes	Quantidade
Água Deionizada	8,875 mL
Sulfato de Zinco	1,97 mg
Nitrato de Cobalto	0,39 mg
Molibdato de Sódio	0,22 mg
Sulfato de Cobre	0,71 mg
Ácido Bórico	26,00 mg
Sulfato de Manganês	14,00 mg
Sulfato Ferroso	89,00 mg
EDTA Dissódico	905,00 mg

(Adaptado de EVANS et al., 2009).

Os componentes sólidos, com exceção do NaHCO_3 , foram pesados em balança de alta precisão (menor divisão 0,001 mg; máximo de 5,1 g) modelo XP6, marca METTLER TOLEDO, Suíça (Figura 2). O NaHCO_3 foi pesado na balança de alta precisão (menor divisão 0,1 mg; máximo de 210,0 g) modelo SA210, marca SCIENTECH, Estados Unidos (Figura 3). Ambas as balanças estão disponíveis no Centro de Isótopos Estáveis “Prof. Dr. Carlos Ducatti”. Já os componentes líquidos foram mensurados utilizando-se de pipetas e, quando necessário, micropipetas. O Mix de Metais foi feito na quantidade de 17,55 mL como demonstra a Tabela 2, usando água deionizada para completar até o volume desejado.



Figura 2. Balança de alta precisão XP6 com menor divisão 0,001 mg e máximo de 5,1 g.



Figura 3. Balança de alta precisão SA210 com menor divisão 0,1 mg e máximo de 210,0 g.

4.3. Estufa com fotoperíodo e termoperíodo

Foi utilizada estufa com fotoperíodo e termoperíodo modelo 122FC, marca ELETROlab, São Paulo, Brasil (Figura 4) disponibilizada no Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBB/UNESP, Botucatu. Os valores de temperatura foram mantidos em 30 °C enquanto o fotoperíodo foi mantido em 12 h de claro e 12 h de escuro, durante todo experimento. Para iluminância no fotoperíodo foram utilizadas lâmpadas fluorescentes de 20 W de potência no interior da estufa (Figura 4).



Figura 4. Identificação da estufa utilizada nos experimentos (à esquerda) e demonstração das lâmpadas dentro da estufa (à direita).

A estimativa da iluminância é obtido a partir da fórmula $L = P \times F / A$, onde L é a iluminância em Lux, P é a potência da fonte luminosa em W, F é a eficiência do tipo de fonte luminosa em lm/W (luz fluorescente $F = 60$ lm/W), e A é a área da superfície em m² (a área calculada dentro da estufa é 0,4947 m²). Dessa maneira, para cada lâmpada fluorescente de 20 W temos aproximadamente 2400 Lux de iluminância.

4.4. Microrganismo

As cepas de *S. platensis* foram fornecidas pelo Banco de Microrganismo Aidar & Kutner (BMA&K) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IOUSP) e mantidas fechadas em tubo *falcon* ao abrigo de luz, a 25° C, até o momento do cultivo. O cuidado em relação a estes fatores era para que o microrganismo ficasse em regime estacionário, ou seja, não viesse a morrer ou se reproduzir (indicação do próprio BMA&K). Também foi evitado que o microrganismo ficasse muito tempo em espera para iniciar a produção, desse modo o pedido foi realizado as vésperas dos experimentos.

4.5. Produção da *S. platensis* (1ª etapa)

O processo de produção da *S. platensis*, em cada parte da duplicata, aconteceu em torno de 42 dias, em duas fases, a primeira com 12 dias e a segunda em torno de 30 dias. A divisão em duas fases é para garantir a multiplicação do microrganismo, sendo que na primeira fase ele se adaptará ao meio e na segunda ele se multiplicará. Durante todo o processo haverá purga com gás N₂ e serão monitorados a densidade e o pH que tem que ser corrigido caso saia do intervalo 9,5 ~ 10,5 (intervalo de pH ótimo para a cianofíceia) (EVANS et al., 2009). Já a temperatura (30 °C), a agitação (80 rpm) e a iluminância (exceto na mudança para a 2ª fase quando ela irá de 2400 Lux para 9600 Lux) durante as fases serão mantidas constantes pela estufa.

4.5.1. 1ª fase de produção

Primeiro foi colocado 150 mL do meio de cultivo em um kitassato autoclavado de 1,0 L. Em seguida foram adicionados 50 mL das cepas de *S. platensis*, e imediatamente, foi ajustado o pH para aproximadamente 9,5 e purgado N₂ para garantir o ambiente inerte. O kitassato foi então colocado na estufa (Figura 5), onde permaneceu por 12 dias sob temperatura de 30 °C, iluminância de 2400 Lux (usando apenas 1 lâmpada fluorescente de 20 W) e sobre uma mesa agitadora a 80 rpm dentro da estufa.

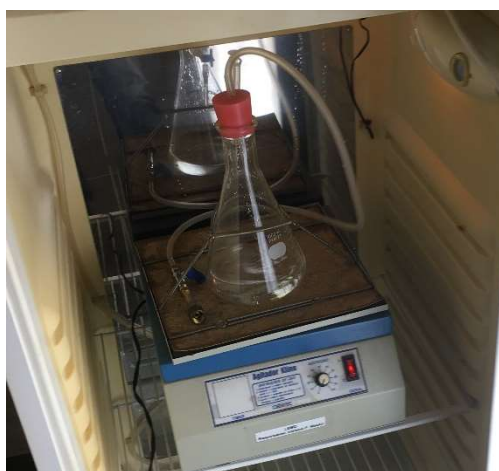


Figura 5. Biorreator dentro da estufa e sobre a mesa agitadora.

4.5.2. 2ª fase de produção

Inicialmente foram adicionados mais 727,5 mL de meio de cultivo no sistema. A temperatura continuou a 30 °C, a agitação a 80 rpm e o pH em 9,5 ~ 10,5, porém, a iluminância mudou para 9600 Lux (usando 4 lâmpadas fluorescentes de 20 W) (EVANS et al., 2009).

O momento ideal para encerrar a produção nesta fase é quando a densidade do cultivo fica maior que 2,2 g/L, o que pode variar de 25-35 dias (EVANS et al., 2009).

Com a densidade acima de 2,2 g/L (Figura 6), a colheita foi feita por meio de filtração com papel de filtro e houve lavagem com água deionizada para escoamento de resíduos que poderiam ainda estar no meio ou adsorvidos à *S. platensis*. Depois, a biomassa foi secada para que permanecesse na consistência de um pó. Esse pó foi pesado e os resultados avaliados.



Figura 6. Estado do biorreator em data próxima à de colheita.

4.6. Purga de nitrogênio gasoso

A cada dois dias, houve purga de N₂ para eliminação do excesso de oxigênio (O₂) produzido pela fotossíntese da microalga (EVANS et al., 2009). Isto porque a *RuBisCO*, *ribulose biscofosfato carboxilase/oxigenase* (Figura 7), enzima central da fotossíntese, tem tanto a função *carboxilase* como a *oxigenase*, ou seja, o CO₂ e o O₂

moleculares competem pelo sítio ativo enzimático, sendo que com o primeiro há fixação do CO₂ à biomassa, enquanto que com o segundo não há, limitando assim o crescimento em biomassa. Essa purga então teve como propósito evitar o amontoamento de O₂ gasoso no cultivo e se deu conectando o cilindro de N₂(g) na entrada superior do kitassato e abrindo a saída lateral para que houvesse o escoamento do excesso daquele gás.

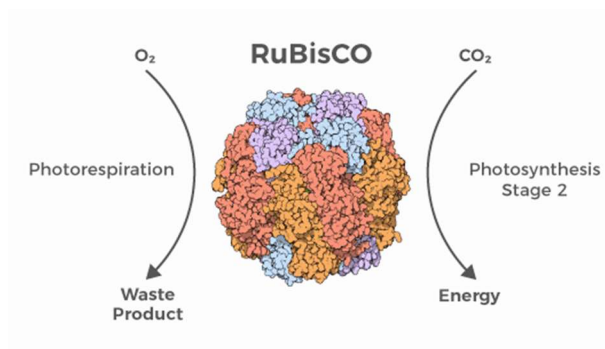


Figura 7. Ilustração da estrutura da *rubisco* e dos usos de CO₂ e O₂

(disponível em: <<http://www.futureagriculture.eu/synthetic-biology/can-we-improve-nature/>>, acessado em 04/11/2019)

A figura 7 demonstra que com a utilização do O₂ pela *RuBisCO* ocorre a fotorrespiração com produção de energia e consumo de biomassa (Carbono). Já com a utilização do CO₂ por esta mesma enzima, ocorre a fotossíntese com produção de energia e assimilação de Carbono à biomassa. Contudo a fotossíntese também gera como produto o O₂, liberado no ambiente. Desta forma, para que a concentração de O₂ advinda da fotossíntese não aumentasse de forma a concorrer pelo sítio ativo da

RuBisCO, favorecendo a fotorrespiração e não a fotossíntese (de interesse para o cultivo), este gás era substituído por N₂, inerte ao meio de cultivo,

4.7. Monitoramento da densidade e pH

O monitoramento da densidade e do pH do cultivo, durante todo o processo, ocorreu pela retirada de alíquotas de 10mL a cada 6 dias previamente à purga de N₂, para medição do pH com pHmetro (modelo MA522, marca MARCONI, São Paulo, Brasil) e cálculo da densidade utilizando-se a equação $d = m/v$, onde m é massa da alíquota (subtraída a massa do recipiente) e v é o volume da alíquota (10 mL). Caso necessário a correção do pH abaixo de 9,5 foi usado 2.0 N de NaOH. Cabe ressaltar que entre as fases foram realizados dois monitoramentos (tanto de pH como de densidade), um no final da 1ª fase, e outro no início da 2ª fase.

4.8. *S. platensis* marcada (2ª etapa)

Para a 2ª etapa foi feito o cultivo, em duplicata, da *S. platensis* de maneira similar a 1ª etapa, com a diferença de que se utilizou o NaH¹³CO₃ no meio de cultivo. A biomassa da microalga produzida foi colhida por filtração, lavada, depois secada para que ficasse na consistência de um pó; esse pó foi pesado e os resultados avaliados.

4.9. Análise da *Spirulina platensis* (3ª etapa)

Foram realizadas estimativas sobre os custos do cultivo marcado, levando-se em conta os gastos com os cilindros de $^{13}\text{CO}_2$. Os custos com uso de vidraria, reagentes, utilização e manutenção de equipamentos, mão de obra, estrutura física e energia elétrica, não foram contabilizados.

A [^{13}C]-*S. platensis* colhida nos dois cultivos da segunda etapa e a adquirida por importação (com abundância isotópica de 97%) junto ao *Cambridge Isotope Laboratories*, foram analisadas em um sistema de espectrometria de massa de razão isotópica por fluxo contínuo (CF-IRMS). O CF-IRMS constitui um analisador elementar (Flash 2000, Thermo Scientific, Alemanha) acoplado a um IRMS (Delta V Advantage, Thermo Scientific, Alemanha) por meio de uma interface de gases (ConFlo IV, Thermo Scientific, Alemanha). O CF-IRMS transforma o Carbono da amostra em gás CO_2 por combustão com injeção de O_2 e determina: a razão isotópica $r(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$, a partir da espectrometria das massas das moléculas $^{13}\text{CO}_2$ e $^{12}\text{CO}_2$, e a quantidade de Carbono presente na amostra, em percentual de massa no detector de condutividade térmica (TCD) do Flash 2000. Com os valores da $r(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$ foi calculada a abundância isotópica $x(^{13}\text{C})$ em % conforme equação (COPLIN, 2011):

$$x(^{13}\text{C}) = \left[\frac{r(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})}{1 + r(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})} \right]$$

Para análise isotópica da [^{13}C]-*S. platensis* por CF-IRMS, considerando 97% de abundância isotópica, foi necessária diluição isotópica para que o sinal gerado não fosse superior a 50 V, devido a saturação do amplificador do sistema coletor MEMCO (copos de Faraday) do IRMS conforme manual de operação do Delta V Advantage.

4.9.1 Cálculo da diluição isotópica

Para obter uma diluição com maior precisão foi utilizada *S. platensis* natural por possuir a mesma composição química (MANNERHEIM; WERNER; BUCHMANN, 2019) e os valores foram convertidos em diferença relativa da abundância isotópica $\varphi(^{13}\text{C})$ em mUr em relação ao padrão $x(^{13}\text{C})_{\text{padrão}} = 0,011179(60)$ (<https://www.ciaaw.org/natural-variations.htm>) conforme equação (BRENNAN et al., 1997) à seguir:

$$\varphi(^{13}\text{C}) = \left[\frac{x(^{13}\text{C})_{\text{amostra}}}{x(^{13}\text{C})_{\text{padrão}}} - 1 \right]$$

O balanço isotópico da mistura foi realizado de forma que $\varphi(^{13}\text{C}) \leq 3500$ mUr, ou seja, $x(^{13}\text{C}) \leq 5,0\%$ (MANNERHEIM; WERNER; BUCHMANN, 2019), assim as diluições foram de aproximadamente 20 vezes, ou seja, 25 μg de $[^{13}\text{C}]\text{-S. platensis}$ e 475 μg de *S. platensis* natural. Foram utilizadas as frações das massas (M) de cada componente da mistura na equação do balanço isotópico utilizando o percentual de Carbono conforme as equações (BRAND; COPLEN, 2012) à seguir:

$$\varphi(^{13}\text{C})_{\text{mistura}} = \varphi(^{13}\text{C})_{\text{amostra}} \cdot M_{\text{amostra}} + \varphi(^{13}\text{C})_{\text{natural}} \cdot M_{\text{natural}} \quad [1]$$

$$M_{\text{mistura}} = M_{\text{amostra}} + M_{\text{natural}} = 1 \quad [2]$$

$$\varphi(^{13}\text{C})_{\text{amostra}} = \frac{\varphi(^{13}\text{C})_{\text{mistura}} - (\varphi(^{13}\text{C})_{\text{natural}} \cdot M_{\text{natural}})}{M_{\text{amostra}}} \quad [3]$$

4.9.2 Preparação das amostras para análise isotópica

Para evitar erros no cálculo da diluição e certificar que o procedimento está correto foi utilizado o “princípio do tratamento idêntico” (Werner e Brand, 2001). Desse modo, foi analisada a [^{13}C]-*S. platensis* importada com as mesmas massas para [^{13}C]-*S. platensis* produzida esperando encontrar os 97% de abundância. Também devido ao “princípio do tratamento idêntico”, foi determinado o $\phi(^{13}\text{C})_{\text{natural}}$ e o percentual de Carbono utilizando uma massa de 500 μg (equivalente a massa total da mistura). Esta amostra natural foi moída em moinho criogênico afim de homogeneizar e deixar a granulometria similar as outras amostras.

O CF-IRMS necessita de pelo menos 40 μg de Carbono total em cada amostra para um sinal ideal em torno de 3 V, considerando 42% de Carbono total na *S. platensis*, o ideal seria uma amostra por volta de 100 μg . Devido à grande quantidade de Carbono em cada amostra, aproximadamente 200 μg , foi utilizado a opção “Dynamic Dilution” software “Isodat 3.0” a partir do kit “smartEA” (P/N 1227210) instalado no Flash 2000 que dilui o CO_2 em até 99% com gás hélio no ConFlo IV. Antes da análise foi calibrada a diluição da amostra para CO_2 no ConFlo IV a partir da massa e área total do espectro (pico 44 e 45) da amostra sem diluição. Os valores da abundância isotópica foram calibrados com padrão NBS 22 da AIEA.

Para cada uma das 4 amostras (natural, mistura no primeiro cultivo, mistura no segundo cultivo e importada) foram pesadas 5 repetições em capsulas de estranho utilizando balança de alta precisão (menor divisão 0,001 mg; máximo de 5,1 g) modelo XP6, marca METTLER TOLEDO, Suíça (Figura 2).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bicarbonato de sódio marcado

A massa e o rendimento teóricos, de acordo com testes utilizando gás carbônico não marcado, era entre 7,02 g (78% de rendimento) e 7,42 g (85% de rendimento) de $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$. Na primeira produção com marcação, que seria usada posteriormente no primeiro cultivo marcado foram produzidos exatamente 7,02 g, sendo o rendimento da reação 78%. Já na segunda produção marcada, que seria usada posteriormente no segundo cultivo marcado, foi obtido 7,42 g, sendo o rendimento da reação 85%.

5.2 Produção da *S. platensis* (1ª e 2ª etapas)

Os resultados referentes às biomassas coletadas seguem na tabela 3. O primeiro e o segundo cultivo sem marcação são C12.1 e C12.2, respectivamente, enquanto o primeiro e o segundo cultivo com marcação são C13.1 e C13.2, também nesta ordem.

Tabela 3 Produção de *S. platensis* em biomassa.

Produção	Massa
Esperado	1,85-2,04 g
Produção C12.1	2,17 g
Produção C12.2	2,02 g
Produção C13.1	2,22 g
Produção C13.2	2,27 g

Seguem abaixo as figuras (de 8 a 12) ilustrando os monitoramentos referentes às densidades dos cultivos C12.1 (Figura 8), C12.2 (Figura 9), C13.1 (Figura 10) e C13.2 (Figura 11) separadamente e conjunto (Figura 12). Nota-se uma queda drástica no dia 12 devido à adição de mais meio de cultivo (727,5 mL). A curva pontilhada representa a linha de corte, isto é, o momento ideal para colheita (2,2 g/L) (EVANS et al., 2009).

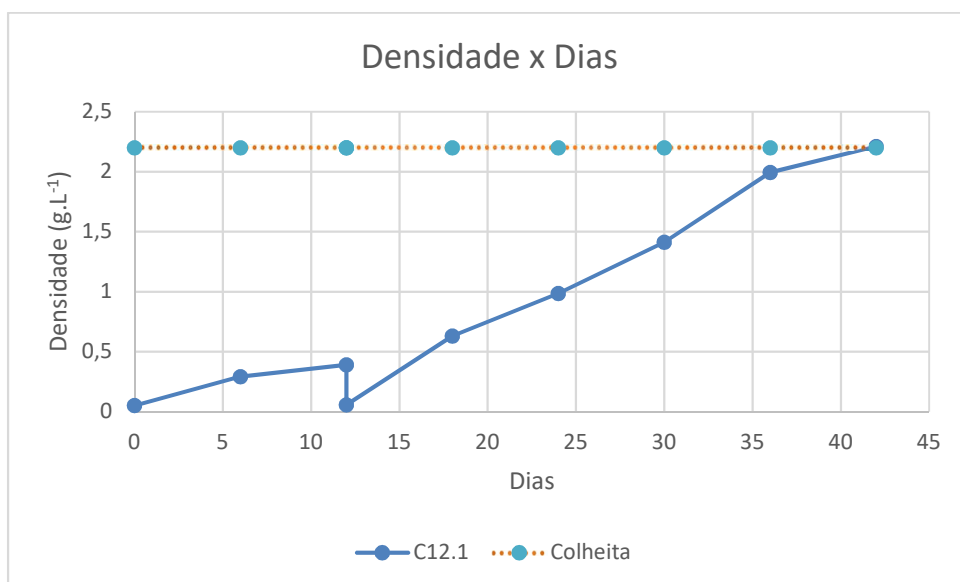


Figura 8. Crescimento celular da *S. platensis* no cultivo C12.1.

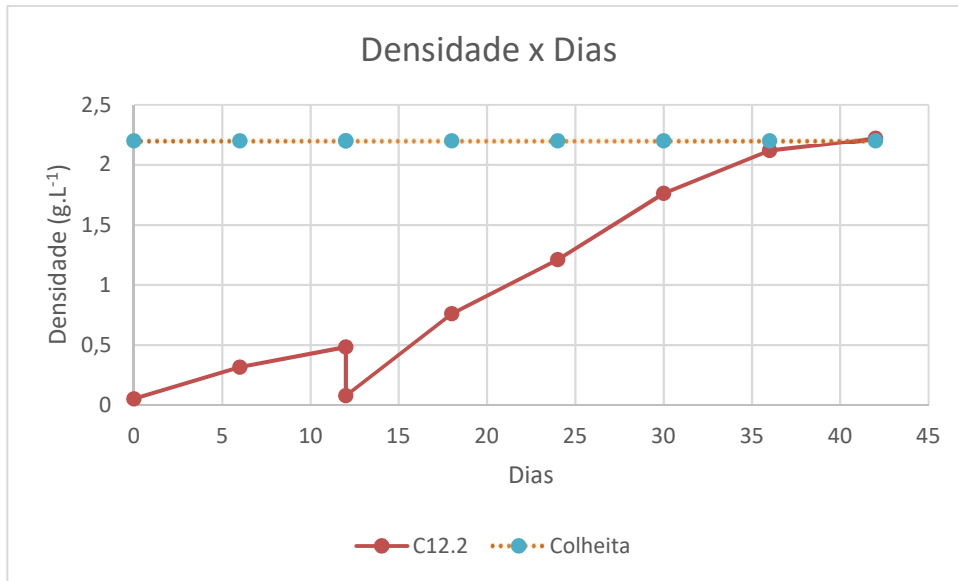


Figura 9. Crescimento celular da *S. platensis* no cultivo C12.2.

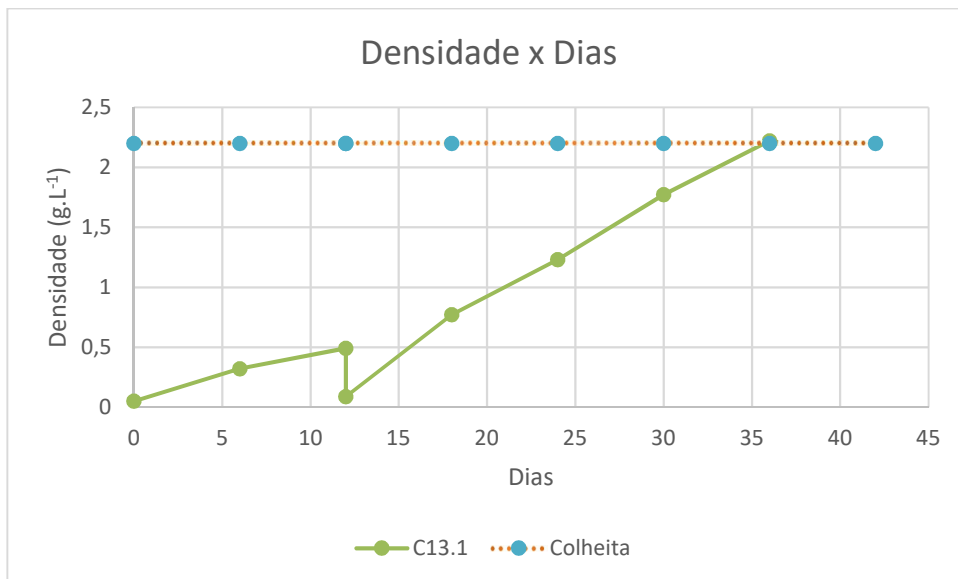


Figura 10. Crescimento celular da *S. platensis* no cultivo C13.1.

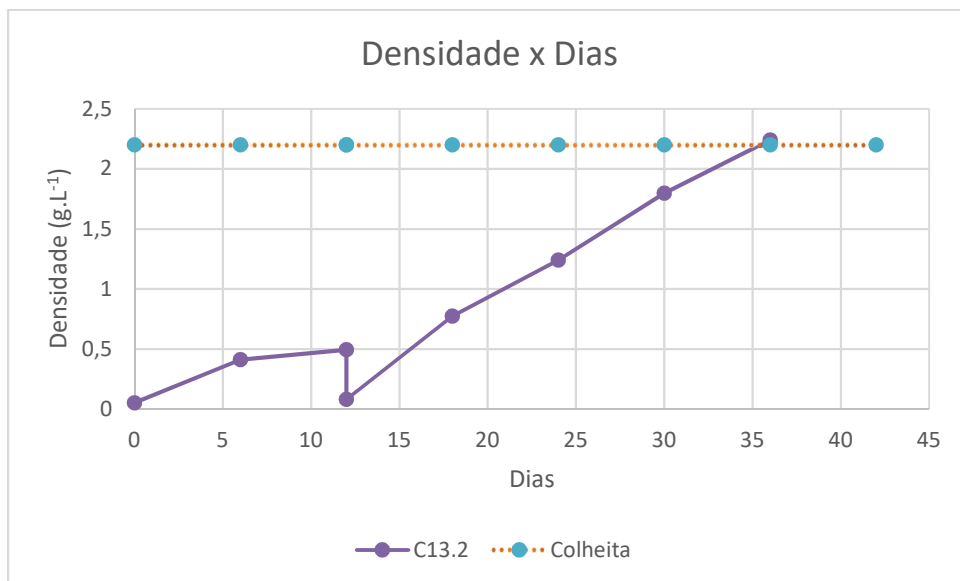


Figura 11. Crescimento celular da *S. platensis* no cultivo C13.2.

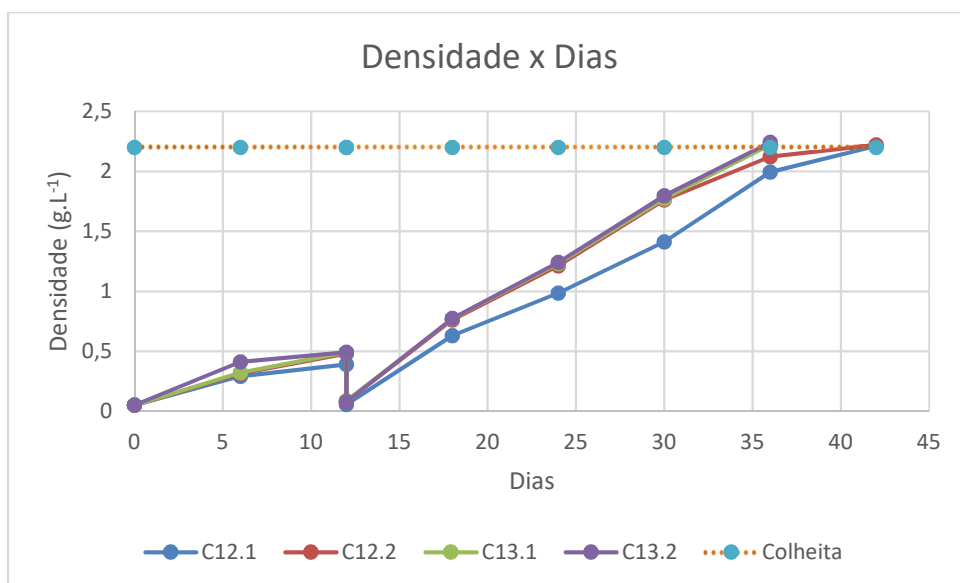


Figura 12. Crescimento celular da *S. platensis* em todos os cultivos.

A produtividade média (em g/L.dia), dada pela equação $P_m = (X_f - X_0) \cdot (T_f - T_0)^{-1}$, onde X_f é a concentração final de biomassa, X_0 é a concentração inicial de biomassa,

T_f é o tempo final de cultivo em dias e T_0 é o tempo inicial de cultivo em dias. O valor médio de cada cultivo foi de 0,0513g/L.dia para C12.1; 0,0516g/L.dia para C12.2; 0,0603g/L.dia para C13.1; e 0,0608g/L.dia para C13.2. A média destas produtividades ficou em 0,056g/L.dia.

É importante destacar que dependendo da dose almejada para o ^{13}C -SpBT (Tabela 5), pode-se executar diferentes quantidades de exames. Dessa forma, com as biomassas produzidas na 2ª etapa é possível fazer de 22 (200 mg) a 89 (50 mg) exames de esvaziamento gástrico.

Tabela 4. Quantidade de [^{13}C]-*S. platensis* para realizar ^{13}C -SpBT em diferentes doses.

Dose de ^{13}C	% de ^{13}C na <i>S. platensis</i>	% de C na <i>S. platensis</i>	[^{13}C]- <i>S. platensis</i>
80 mg			200 mg
40 mg	95%	42%	100 mg
20 mg			50 mg

(Adaptado de EVANS et al., 2009).

Os valores de pH tanto para o Mix de Metais (Tabela 2) como para o Meio de Cultivo (Tabela 1) foram todos ajustados nos valores recomendados por Evans et al., 2009, sendo eles, nesta ordem, 6,5 e 9,5. Caso o pH estivesse abaixo destes valores seria utilizado 2.0 N de hidróxido de sódio.

Os valores de pH mostrados abaixo (Figuras 18 e 19) ficaram dentro do esperado (entre 9,5 e 10,5) (EVANS et al., 2009), com exceção do cultivo C13.1 no décimo segundo dia, no qual se encontrava em 10,6, mas como neste dia haveria a mudança para a segunda fase da produção, a correção foi feita pela própria adição de mais 727,5 mL de meio, que caracteriza esta mudança de fase.

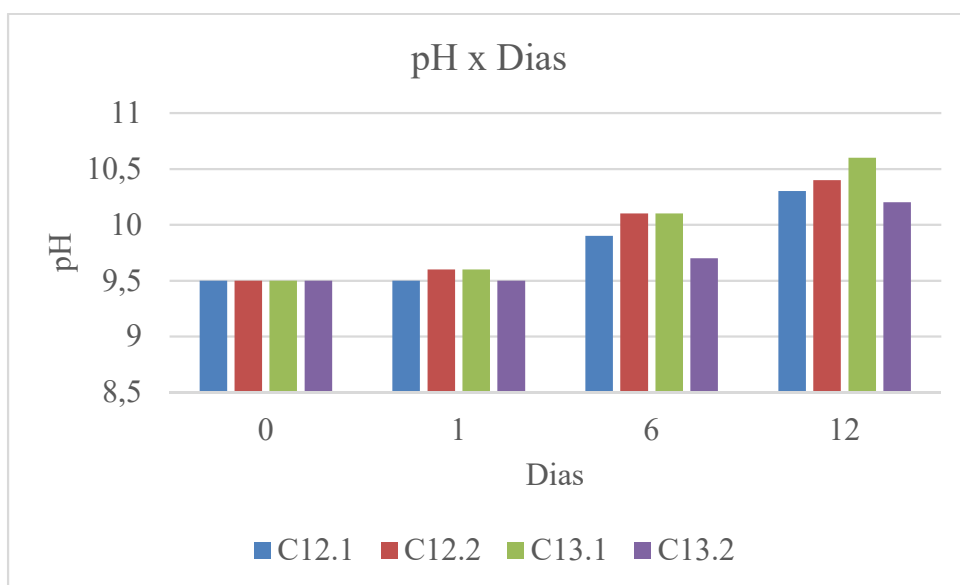


Figura 18. Valores de pH dos cultivos na 1ª fase de produção.

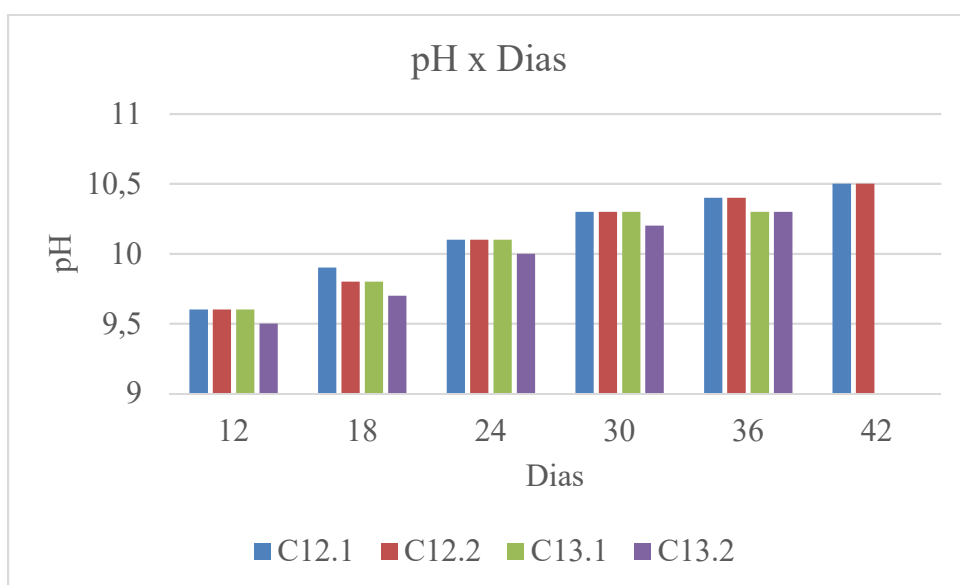
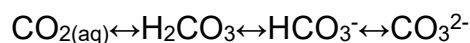
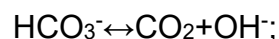


Figura 19. Valores de pH dos cultivos na 2ª fase de produção.

É importante destacar que os valores de pH vão crescendo, pois, devido à natureza apolar da membrana plasmática, a resistência à difusão da molécula de CO₂ é menor que a do íon HCO₃⁻, tornando o CO₂ o Carbono inorgânico mais consumido pela *S. platensis*. Quando ele é bem consumido, o sistema em equilíbrio



reage no sentido de formação de CO₂, consumindo H⁺ do meio. Por outro lado, quando a concentração de HCO₃⁻ é alta, a utilização desta molécula pode ocorrer pelo seu transporte ativo através da membrana plasmática ou por sua conversão em CO₂ pela enzima anidrase carbônica (DE MORAIS; COSTA, 2007; SHIRAIWA; GOYAL; TOLBERT, 1993), segundo a reação:



dessa forma, seja o CO₂ ou o HCO₃⁻ a molécula utilizada pela *S. platensis*, o crescimento celular resulta em aumento do pH do meio de cultivo (ANDRADE; CAMERINI; COSTA, 2008).

5.3. Análise da *S. platensis* (3ª etapa)

A produção da [¹³C]-*S. platensis* foi realizada em laboratórios de pesquisa, dentro da Universidade, equipados com todos os itens necessários aos processos. Dessa forma, o único gasto efetuado para a produção da [¹³C]-*S. platensis* foi a compra dos cilindros de ¹³CO₂ com o custo de US\$190,00 por grama de [¹³C]-*S. platensis* produzida. A avaliação do custo-benefício não levou em conta os gastos

com: uso de vidraria; reagentes; utilização e manutenção de equipamentos; mão de obra; estrutura física e energia elétrica. Dessa forma, o custo da produção da [^{13}C]-*S. platensis* neste trabalho foi US\$190,00, menos de 40% do custo da microalga já enriquecida, que é de US\$490,00 por grama.

Contudo, levando em conta que o enriquecimento isotópico médio adquirido neste trabalho foi de 21,10% e a [^{13}C]-*S. platensis* importada possui 97%, a mistura de [^{13}C]-*S. platensis* importada e *S. platensis* natural para 1 g e para enriquecimento isotópico equivalente a 21,10% possui 0,21 g de [^{13}C]-*S. platensis* importada e 0,79 g de *S. platensis* natural, o que custa US\$102,90 por grama de mistura equivalente. Assim, o custo da produção da [^{13}C]-*S. platensis* neste trabalho (US\$190,00) foi 84% maior que uma mistura de equivalente de 1 g com [^{13}C]-*S. platensis* importada e *S. platensis* natural e enriquecimento isotópico equivalente a 21,10%.

A figura 20 mostra os resultados das análises isotópicas em percentual de abundância das amostras com a *S. platensis* natural e enriquecidas, estas últimas com diluição.

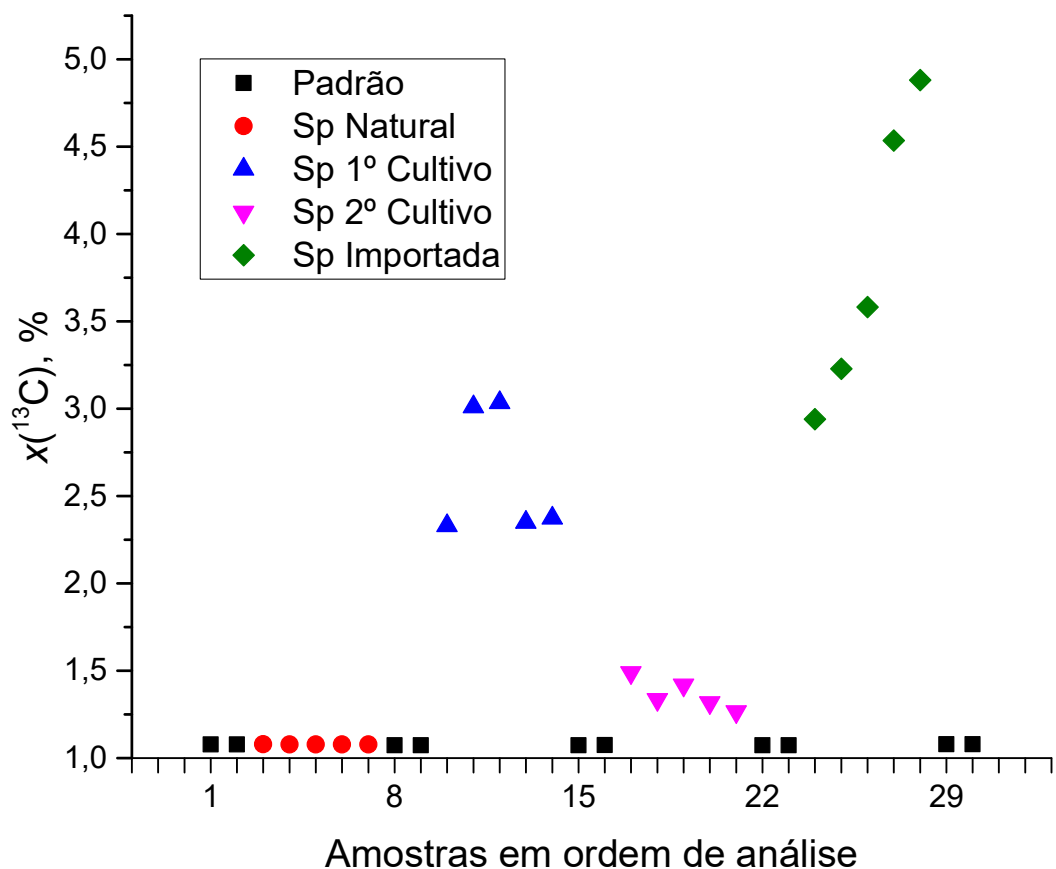


Figura 20. Ordem de análise isotópica das amostras para determinação do enriquecimento isotópico em ^{13}C da *Spirulina platensis*. Os percentuais de abundância da *S. platensis* enriquecidas estão diluídos.

O comportamento das amostras de padrão (Figura 20) mostram que não houve efeito memória, já que não tiveram variação ao longo dos intervalos entre as 30 análises. Na tabela 5 também é possível observar que o desvio padrão das amostras de padrão também foi baixo, confirmando a ausência de efeito memória. As amostras de *S. platensis* natural (Figura 20) apresentaram pouca variação entre as amostras, com desvio padrão também baixo (Tabela 5). A estabilidade desses valores pode ser

justificada pela grande quantidade de massa de amostra (em torno de 0,5 mg), onde é necessário apenas 0,1 mg de biomassa com 42% de Carbono total para um sinal ideal para análise de Carbono no CF-IRMS. Essa grande quantidade fornece uma homogeneidade para amostra.

Já o 1º e 2º cultivos (Figura 20) mostraram variações que pode ser explicada pela não homogeneização da biomassa enriquecida. Esta não homogeneização se deve à pouca biomassa adquirida nos cultivos. Com relação a amostra importada (Figura 20), não há relato de homogeneização, contudo pela sua textura pode-se atestar que sim. O seu aumento em ordem de análise nos valores, na figura 20, pode ser justificada gradativa saturação do copo de Faraday 45, que atingiu valores próximos ao limite de 50 V como demonstra a Figura 21. Nesta figura são comparados os espectros de detecção das moléculas de CO₂ com variação natural e enriquecida.

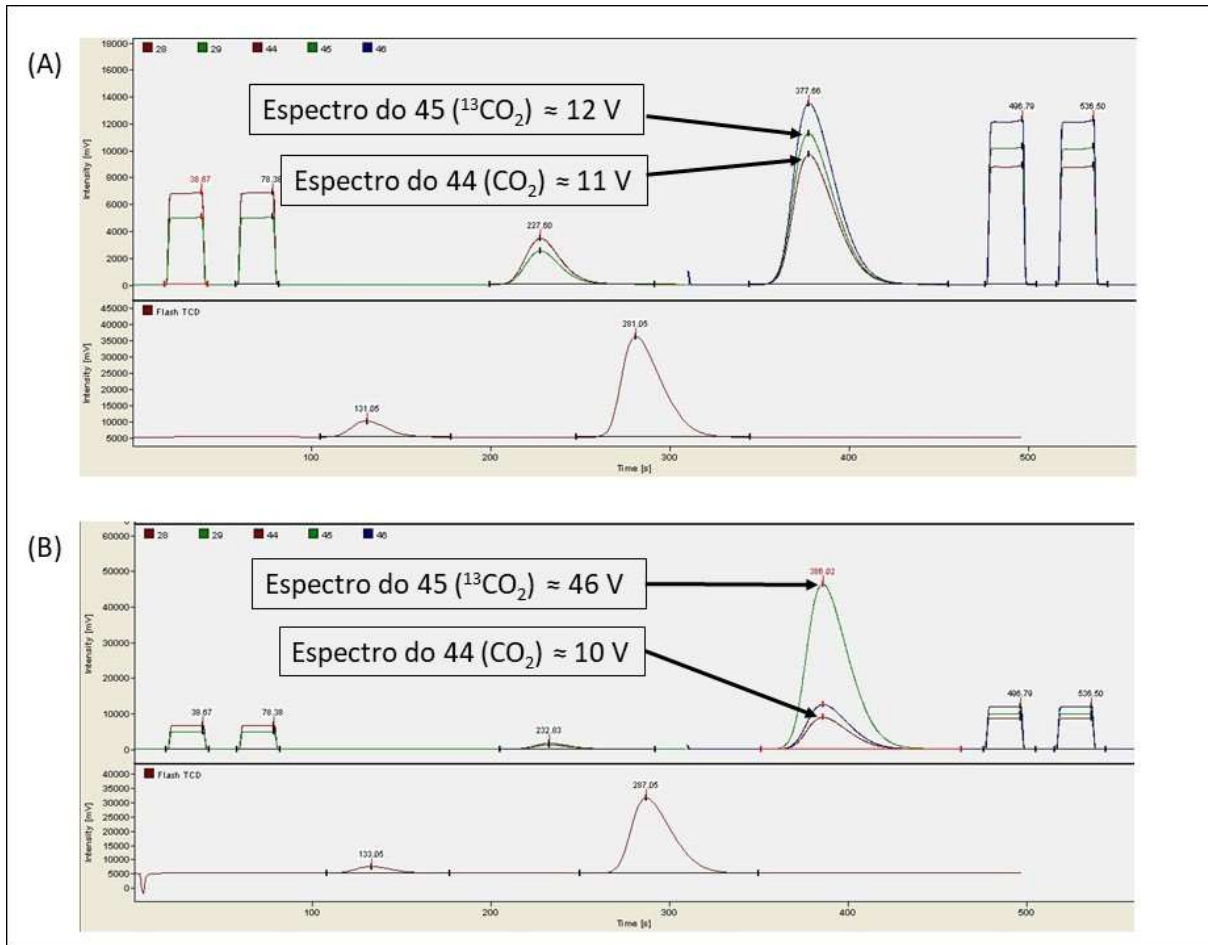


Figura 21. Espectro de detecção das moléculas de CO₂ da análise isotópica em (A) uma amostra padrão com variação natural e (B) uma amostra enriquecida em torno de 5% de abundância.

Considerando que a razão isotópica natural do Carbono é em torno de 0,01 (aproximadamente 1% de abundância), isso mostra que o 44 (CO₂) é cem vezes maior que o 45 (¹³CO₂) na razão 45/44 ou ¹³C/¹²C. O sistema de detecção do IRMS amplifica em cem vezes o sinal do 45 em relação ao 44 para que a amplitude dos espectros fique próximos (Figura 21 A). Nesta situação, espera-se que em uma razão isotópica de 0,05 (≈ 5%) o espectro apresente um sinal do 45 aproximadamente cinco vezes maior que o 44 (46V:10V), conforme Figura 21 B. Assim, buscou-se diluir a amostra para que a abundância fosse $x(^{13}\text{C}) \leq 5,0\%$ (MANNERHEIM; WERNER; BUCHMANN,

2019). No entanto, a Figura 20 mostra que os resultados das análises das amostras enriquecidas próximas à 5% de abundância isotópica não tiveram comportamento estável. Desse modo, o ideal seria diluir mais amostras enriquecidas.

Por fim, são apresentados, na tabela 5, os valores obtidos para o enriquecimento isotópico em ^{13}C da *Spirulina platensis*. Estes valores reforçam a ausência de efeito memória, já que as amostras de padrão não variaram ao longo das análises. Os percentuais de Carbono das amostras mostraram valores de acordo com os esperados (53% para a amostra de padrão e 42% para amostra de *S. platensis*). Valores estes de importância para o cálculo da diluição, mostrando que esses percentuais não são fontes de erros.

Tabela 5. Valores médios obtidos para o enriquecimento isotópico em ^{13}C da *Spirulina platensis*.

Amostra	N	$\Phi^{13}\text{C}$ (mUr)	$x^{13}\text{C}$ (%)	% de C
Padrão Laboratório	10	-28,85	1,07	53,32
		$\pm 0,32$	$\pm 0,00$	$\pm 0,50$
<i>S. platensis</i> (natural)	5	-24,38	1,08	42,37
		$\pm 0,09$	$\pm 0,00$	$\pm 1,01$
^{13}C - <i>S. platensis</i> (1º cultivo)	5	+30.528,22	34,86	42,44
		$\pm 2894,50$	$\pm 3,20$	$\pm 0,54$
^{13}C - <i>S. platensis</i> (2º cultivo)	5	+5.627,29	7,33	41,28
		$\pm 1734,85$	$\pm 1,92$	$\pm 1,65$
^{13}C - <i>S. platensis</i> (importada)	5	+71.953,64	80,66	42,59
		$\pm 6853,06$	$\pm 7,58$	$\pm 0,84$

O enriquecimento isotópico do 1º e 2º cultivos ficaram, em média, 34,86% e 7,33%, respectivamente, sendo a média entre eles 21,10%. O baixo enriquecimento pode ser explicado pelo nitrogênio gasoso utilizado na purga, que não tinha alto grau

de pureza. Este nitrogênio gasoso era obtido por adsorção de balanço de pressão, tecnologia componente de uma usina de liquefação de nitrogênio que separa este gás para liquefação em um percentual de 99% de pureza. Contudo, durante a manutenção deste sistema constatou-se uma contaminação por oxigênio gasoso, o que diminuía a pureza do nitrogênio produzido para 95%.

6. CONCLUSÃO

Assim, concluímos que é possível cultivar e enriquecer isotopicamente com ^{13}C a *S. platensis* a partir do $^{13}\text{CO}_2$ com um custo de US\$190,00 por grama de [^{13}C]-*Spirulina platensis* produzido. Entretanto, este enriquecimento não foi tão eficiente (21,10%). A utilização de nitrogênio gasoso com teor elevado de pureza poderia aumentar o enriquecimento da microalga e uma diluição isotópica maior para as análises poderia fornecer dados exatos, pois diminuiria a saturação dos copos de Faraday 45.

Com exceção do C12.2 que ficou dentro da margem esperada de biomassa colhida, todos os outros (C12.1, C13.1 e C13.2) ficaram acima da margem, mostrando que o cultivo tem potencial para alta produtividade. Tendo como prerrogativa esta alta produtividade, mais cultivos poderiam ser executados afim de se conseguir uma maior quantidade de biomassa, tornando possível sua homogeneização para uma análise isotópica com menos variações. Por fim, o cultivo da *S. platensis* marcada pode oferecer mais exames para fins clínicos ou de pesquisa.

Um ponto interessante a se adicionar ao projeto seria um novo cultivo marcado com um estudo paralelo, analisando-se em IRMS as amostras colhidas nos monitoramentos de densidade e por meio destas análises, montar uma curva da porcentagem de ^{13}C assimilada para se saber a velocidade com que isso acontece e criar mais uma ferramenta para determinar o momento de colheita. Outro ponto a se adicionar seria analisar isotopicamente também o líquido proveniente das filtrações das alíquotas retiradas para avaliação da densidade, afim de demonstrar a presença de ^{13}C no meio de cultivo e como ela vai diminuindo ao longo do cultivo, construindo

uma curva que prediria o momento em que todo o ^{13}C fosse assimilado pela microalga, sendo este um preditor mais confiável que os 2,2 g/L utilizados por Evans et al., 2009.

Estudos futuros também poderiam ser desenvolvidos com a análise microbiológica da *S. platensis* marcada afim de checar se ela pode ser administrada em humanos e, se caso positivo, performar o ^{13}C -SpBT tanto com a amostra produzida como com a importada para compará-las. Assim também poderá se avaliar se a [^{13}C]-*Spirulina platensis* com menor enriquecimento isotópico é efetiva no teste respiratório.

7. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. D. R.; CAMERINI, F. V.; COSTA, J. A. V. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de Spirulina. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2031–2034, 2008.
- BARROS, K. K. D. S. Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (Spirulina platensis) para alimentação humana. **Bdtd.Biblioteca.Ufpb.Br**, p. 112, 2010.
- BERG, P.; MCCALLUM, R. Dumping Syndrome: A Review of the Current Concepts of Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 61, n. 1, p. 11–18, 22 jan. 2016.
- BHARUCHA, A. E. et al. Comprehensive assessment of gastric emptying with a stable isotope breath test. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 25, n. 1, p. e60–e69, jan. 2013.
- BONFRATE, L. et al. Dynamic carbon 13 breath tests for the study of liver function and gastric emptying. **Gastroenterology Report**, v. 3, n. 1, p. 12–21, 1 fev. 2015.
- BRADEN, B. et al. 13C-breath tests: Current state of the art and future directions. **Digestive and Liver Disease**, v. 39, n. 9, p. 795–805, set. 2007.
- BRADEN, B. Methods and functions: Breath tests. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 23, n. 3, p. 337–352, jun. 2009.
- BRAND, W. A.; COPLEN, T. B. **Stable isotope deltas: Tiny, yet robust signatures in nature isotopes in Environmental and Health Studies**, 2012.
- BRENNAN, J. T. et al. High-precision continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 16, n. 5, p. 227–258, 1997.

BRUNO, G. et al. ^{13}C -octanoic acid breath test to study gastric emptying time.

European review for medical and pharmacological sciences, v. 17 Suppl 2, p. 59–64, 2013.

CHAPMAN, M. J. et al. Gastric emptying of a liquid nutrient meal in the critically ill: relationship between scintigraphic and carbon breath test measurement. **Gut**, v. 60, n. 10, p. 1336–1343, 1 out. 2011.

CIFERRI, O. Spirulina, the edible microorganism. **Microbiological reviews**, v. 47, n. 4, p. 551–78, dez. 1983.

COLLA, L. M. et al. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 7, p. 1489–1493, maio 2007.

COPLEN, T. B. Guidelines and recommended terms for expression of stable-isotope-ratio and gas-ratio measurement results. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 25, n. 17, p. 2538–2560, 15 set. 2011.

DE MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 129, n. 3, p. 439–445, 1 maio 2007.

DENG, R.; CHOW, T.-J. Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 28, n. 4, p. e33–e45, 5 jul. 2010a.

DENG, R.; CHOW, T.-J. Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae *Spirulina*. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 28, n. 4, p. e33–e45, 5 jul. 2010b.

DENG, R.; CHOW, T.-J. Hypolipidemic, Antioxidant, and Antiinflammatory Activities of Microalgae Spirulina. **Cardiovascular Therapeutics**, v. 28, n. 4, p. e33–e45, 5 jul. 2010c.

DEVI, S. et al. Measurement of protein digestibility in humans by a dual-tracer method. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 107, n. 6, p. 984–991, 1 jun. 2018.

DIBAISE, J. Effects of low doses of erythromycin on the ¹³C Spirulina platensis gastric emptying breath test and electrogastrogram: a controlled study in healthy volunteers. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 96, n. 7, p. 2041–2050, jul. 2001.

EVANS, K. et al. **Methods of producing Carbon-13 labeled biomass**, 2009.

EVENEPOEL, P. et al. Digestibility of Cooked and Raw Egg Protein in Humans as Assessed by Stable Isotope Techniques. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n. 10, p. 1716–1722, 1 out. 1998.

FACCIN, P. C. **Avaliação do esvaziamento gástrico na fase sólida pelo teste**
Avaliação do esvaziamento gástrico na fase sólida pelo teste respiratório com
¹³C. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2018.

FENG, D.; WU, Z. Culture of Spirulina platensis in human urine for biomass production and O₂ evolution. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B**, v. 7, n. 1, p. 34–37, jan. 2006.

FRIED, M. Methods to Study Gastric Emptying Moderator ' s Comments. v. 39, n. 12, p. 7–8, 1994.

HABIB, M. A. B. et al. A review of culture, production and use of Spirulina as food for humans and feeds for domestic animals and fish. **FAO Fisheries and Aquaculture Circular**, n. 1034, p. 33pp, 2008.

HAUSER, B. et al. Gastric emptying of liquids in children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 62, n. 3, p. 403–408, 2016.

HIRATA, E. S. et al. O esvaziamento gástrico e a insuficiência renal crônica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 4, p. 421–430, ago. 2007.

J.P. PANDEY, AMIT TIWARI, R. M. M. © Phyco Spectrum Inc. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 1, n. 3, p. 70–81, 2010.

JIMÉNEZ, C. et al. The feasibility of industrial production of Spirulina (Arthrospira) in Southern Spain. **Aquaculture**, v. 217, n. 1–4, p. 179–190, 2003.

KARAMANOLIS, G. et al. Determinants of symptom pattern in idiopathic severely delayed gastric emptying: Gastric emptying rate or proximal stomach dysfunction? **Gut**, v. 56, n. 1, p. 29–36, jan. 2007.

KEBEDE, E.; AHLGREN, G. Optimum growth conditions and light utilization efficiency of Spirulina platensis (= Arthrospira fusiformis) (Cyanophyta) from Lake Chitu, Ethiopia. **Hydrobiologia**, v. 332, n. 2, p. 99–109, out. 1996.

LOSS, A. B. et al. Avaliação da síndrome de dumping em pacientes obesos mórbidos submetidos à operação de bypass gástrico com reconstrução em Y de Roux. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 36, n. 5, p. 413–419, out. 2009.

MANNERHEIM, N.; WERNER, R. A.; BUCHMANN, N. Measurement precision and

accuracy of high artificial enrichment ^{15}N and ^{13}C tracer samples. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 33, n. 13, p. 1153–1163, 15 jul. 2019.

MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. **Radiologia Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 233–239, ago. 2001.

NGUYEN, N. Q. et al. The effects of sedation on gastric emptying and intra-gastric meal distribution in critical illness. **Intensive Care Medicine**, v. 34, n. 3, p. 454–460, 4 mar. 2008.

NGUYEN, N. Q. et al. Gastric emptying measurement of liquid nutrients using the ^{13}C -octanoate breath test in critically ill patients: a comparison with scintigraphy. **Intensive Care Medicine**, v. 39, n. 7, p. 1238–1246, 8 jul. 2013.

SHIRAIWA, Y.; GOYAL, A.; TOLBERT, N. E. Alkalization of the Medium by Unicellular Green Algae during Uptake Dissolved Inorganic Carbon. **Plant and Cell Physiology**, v. 34, n. 5, p. 649–657, jul. 1993.

SZARKA, L. A. et al. A Stable Isotope Breath Test With a Standard Meal for Abnormal Gastric Emptying of Solids in the Clinic and in Research. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 6, n. 6, p. 635- 643.e1, jun. 2008.

TOKUŞOĞLU, O.; UUNAL, M. K. Biomass Nutrient Profiles of Three Microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 4, p. 1144–1148, maio 2003.

TRAHAIR, L. G.; HOROWITZ, M.; JONES, K. L. Postprandial Hypotension: A Systematic Review. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 15, n. 6, p. 394–409, jun. 2014.

TRAHAIR, L. G.; HOROWITZ, M.; JONES, K. L. Postprandial Hypotension Is Associated With More Rapid Gastric Emptying in Healthy Older Individuals. **Journal of the American Medical Directors Association**, v. 16, n. 6, p. 521–523, 1 jun. 2015.

URBAIN, J. L. et al. Characterization of gastric antral motility disturbances in diabetes using a scintigraphic technique. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 34, n. 4, p. 576–81, abr. 1993.

WETZEL, K.; FISCHER, H. **¹³C-Breath Tests in Medical Research and Clinical Diagnosis**. 4th. ed. Leipzig: [s.n.].