

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta Dissertação será disponibilizado somente a partir de 20/02/2021.



**LUIZ CONSTANTINO ABRANTES CRONEMBERGER**

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

**Botucatu  
2020**

**LUIZ CONSTANTINO ABRANTES CRONEMBERGER**

**CULTIVO DA MICROALGA *Spirulina platensis* MARCADA COM ISÓTOPO  
ESTÁVEL  $^{13}\text{C}$  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  $^{13}\text{C}$  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  $^{99m}\text{Tc}$ . 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  $^{13}\text{C}$  ( $[^{13}\text{C}]$ -*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  $^{13}\text{C}$ . 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  $^{13}\text{C}$  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.  $^{13}\text{C}$ . 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  $^{99m}\text{Tc}$ . 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  $^{13}\text{C}$  ( $[^{13}\text{C}]\text{-Spirulina platensis}$ ) 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  $^{13}\text{C}$ . 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  $^{13}\text{C}$  was analyzed by isotopic ratio mass spectrometry to determine isotopic enrichment in  $^{13}\text{C}$ , 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.  $^{13}\text{C}$ . 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 ( $^{99m}\text{Tc}$ ), que é servida ao paciente (BRUNO et al., 2013). O  $^{99m}\text{Tc}$  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 ( $^{13}\text{C}$ -*Breath Test*) com um dos seguintes substratos marcados: [ $^{13}\text{C}$ ]-*Spirulina platensis* ( $^{13}\text{C}$ -SpBT) ou o [ $^{13}\text{C}$ ]-Ácido octanóico ( $^{13}\text{C}$ -OBT), ambos sendo adicionados a refeições nutricionalmente balanceadas (BRUNO et al., 2013; NGUYEN et al., 2013). Comparados ao exame cintilográfico, o  $^{13}\text{C}$ -SpBT e o  $^{13}\text{C}$ -OBT apresentam boa eficiência, porém o  $^{13}\text{C}$ -OBT só fornece os dados de GE de fase sólida enquanto que o  $^{13}\text{C}$ -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  $^{13}\text{C}$ -SpBT, pode-se utilizar 50, 100 ou 200 mg de  $[^{13}\text{C}]$ -*S. platensis*, enriquecida à 97% de  $^{13}\text{C}$  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  $[^{13}\text{C}]$ -*S. platensis* e ela somente é adquirida por importação, onerando, assim, a aplicabilidade do teste.

O enriquecimento isotópico convencional da *S. platensis* com o  $^{13}\text{C}$  ocorre por meio da fotossíntese utilizando o bicarbonato de sódio marcado com  $^{13}\text{C}$  ( $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ ) em meio aquoso como fonte, onde a microalga assimila o  $^{13}\text{C}$  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  $[^{13}\text{C}]$ -*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  $[^{13}\text{C}]$ -*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  $[^{13}\text{C}]$ -*S. platensis* (EVANS et al., 2009).

Sendo assim o objetivo desse projeto é cultivar e enriquecer isotopicamente a *S. platensis* com o isótopo estável  $^{13}\text{C}$  a partir do  $^{13}\text{CO}_2$ , avaliar sua qualidade para o  $^{13}\text{C}$ -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  $[^{13}\text{C}]$ -*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).

## 6. CONCLUSÃO

Assim, concluímos que é possível cultivar e enriquecer isotopicamente com  $^{13}\text{C}$  a *S. platensis* a partir do  $^{13}\text{CO}_2$  com um custo de US\$190,00 por grama de [ $^{13}\text{C}$ ]-*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  $^{13}\text{C}$  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  $^{13}\text{C}$  no meio de cultivo e como ela vai diminuindo ao longo do cultivo, construindo

uma curva que prediria o momento em que todo o  $^{13}\text{C}$  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  $^{13}\text{C}$ -SpBT tanto com a amostra produzida como com a importada para compará-las. Assim também poderá se avaliar se a [ $^{13}\text{C}$ ]-*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.
- BRENNA, 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.  $^{13}\text{C}$ -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 <sup>13</sup>C 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**  
**<sup>13</sup>C**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2018.

FENG, D.; WU, Z. Culture of Spirulina platensis in human urine for biomass production and O<sub>2</sub> 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  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  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  $^{13}\text{C}$ -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. **<sup>13</sup>C-Breath Tests in Medical Research and Clinical Diagnosis**. 4th. ed. Leipzig: [s.n.].