

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CURSO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

KASSANDRA FONTOURA DA SILVA

**A UTILIZAÇÃO DE FATOR DE CONVERSÃO DE NITROGÊNIO PARA PROTEÍNAS
EM MICROALGAS: UMA REVISÃO**

**Itaqui
2022**

KASSANDRA FONTOURA DA SILVA

**A UTILIZAÇÃO DE FATOR DE CONVERSÃO DE NITROGÊNIO PARA
PROTEÍNAS EM MICROALGAS: UMA REVISÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Valcenir Júnior Mendes Furlan.

**Itaqui
2022**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

S581u Silva, Kassandra Fontoura da

A utilização de fator de conversão de nitrogênio para proteínas em microalgas: uma revisão / Kassandra Fontoura da Silva.

35 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Pampa, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 2022.

"Orientação: Valcenir Júnior Mendes Furlan".

1. Fator de conversão. 2. microalgas. 3. teor proteico. I. Título.

KASSANDRA FONTOURA DA SILVA

**A UTILIZAÇÃO DE FATOR DE CONVERSÃO DE NITROGÊNIO PARA
PROTEÍNAS EM MICROALGAS: UMA REVISÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Ciência de Tecnologia de Alimentos.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em 10 de agosto de 2022.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Valcenir Júnior Mendes Furlan
Orientador
(UNIPAMPA – Campus Itaqui)



Profa. Dra. Magali Kemmerich
(UNIPAMPA – Campus Itaqui)



Prof. Dr. Nelson Mario Victoria Bariani
(UNIPAMPA – Campus Itaqui)

APRESENTAÇÃO

Este trabalho de conclusão de curso (TCC) está apresentado na forma de um artigo científico de acordo com o “MANUAL DE NORMATIZAÇÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS: CONFORME NORMAS DA ABNT” do Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA.

RESUMO

Atualmente, com o avanço da tecnologia, os consumidores tornaram-se mais atentos e exigentes por produtos saudáveis, nutritivos e com apelo sustentável. Diante disso, as microalgas atraem a atenção da indústria alimentícia, pois são uma fonte proteica valiosa, sustentável e não convencional, tornando a inclusão de biomassa microalgal na formulação de alimentos uma estratégia para inovar e melhorar os valores nutricionais de diversos produtos. As proteínas derivadas de microalgas possuem perfis satisfatórios de aminoácidos essenciais e seu teor proteico eventualmente consegue ser maior que as fontes convencionais, como de laticínios. A determinação do teor de proteínas nesta matéria-prima pode fornecer informações importantes sobre as características químicas de sua biomassa, sendo geralmente utilizado o método onde a quantidade proteica é calculada a partir do nitrogênio total utilizando o fator de conversão de nitrogênio em proteína de 6,25. Entretanto, esse fator superestima seu valor real, devido à presença de nitrogênio não proteico em microalgas, apesar disso, o mesmo continua sendo utilizado frequentemente para essa matéria-prima. Diante do exposto, esta revisão enfatiza a importância das microalgas, os métodos mais utilizados para a quantificação do teor proteico e salienta a utilização do fator de conversão de nitrogênio em proteína nesta matéria-prima.

Palavras-chave: fator de conversão; microalgas; teor proteico.

ABSTRACT

Currently, with the advancement of technology, consumers have become more attentive and demanding for healthy, nutritious products with sustainable appeal. Therefore, microalgae attract the attention of the food industry, as they are a valuable, sustainable and unconventional protein source, making the inclusion of microalgal biomass in food formulation a strategy to innovate and improve the nutritional values of several products. Proteins derived from microalgae have satisfactory profiles of essential amino acids and their protein content eventually manages to be higher than conventional sources, such as dairy. The determination of the protein content in this raw material can provide important information about the chemical characteristics of its biomass, being generally used the method where the protein amount is calculated from the total nitrogen using the nitrogen to protein conversion factor of 6, 25. However, this factor overestimates its real value, due to the presence of non-protein nitrogen in microalgae, despite this, it continues to be used frequently for this raw material. Given the above, this review emphasizes the importance of microalgae, the most used methods for the quantification of protein content, and emphasizes the use of the nitrogen-to-protein conversion factor in this raw material.

Keywords: conversion factor; microalgae; protein content.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	METODOLOGIA	9
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
3.1	Microalgas: classificação, características, importância e aplicabilidade.....	10
3.2	Determinação de proteínas: importância e métodos mais utilizados.....	13
3.3	Fator de conversão de nitrogênio em proteína: histórico e fatores utilizados atualmente em microalgas	18
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	24
5	REFERÊNCIAS.....	24

1 INTRODUÇÃO

A população mundial está em constante crescimento. Estima-se que até o ano de 2050 ultrapasse os 9 bilhões de habitantes no planeta (UNITED NATIONS, 2015). Devido a esse aumento, há uma crescente preocupação com a capacidade de atender de forma sustentável às demandas nutricionais dos indivíduos (SALTER; LOPEZ-VISO, 2021).

Diante desse cenário, a demanda mundial por proteína animal aumentou nos últimos anos, e a perspectiva é que continue evoluindo, ultrapassando o índice de 50% até o ano 2050, impulsionada, principalmente, pelo crescimento populacional. No entanto, futuramente, as necessidades de terra para a produção de forragem animal poderão exceder as áreas disponíveis no planeta. Assim, fontes alternativas de proteínas tornam-se necessárias para atender à exigência prevista (BOULOS; TÄNNLER; NYSTRÖM, 2020).

Nessa circunstância, as microalgas surgem como uma alternativa promissora, visto que são encontradas nos mais diversos ambientes ao longo de todo o planeta, mais comumente em espaços aquáticos. Elas aparecem tanto em ambientes continentais quanto marinhos, mas também podem habitar superfícies inóspitas, vivendo na neve, em solos desérticos e até mesmo em fontes termais (LUBIANA, 2014). Além disso, a fração proteica das microalgas consegue ser destacada como fonte promissora para ração animal e suplementos alimentares. Uma vez que ela apresenta alta qualidade nutricional, podendo ser comparada com a de outras proteínas alimentares, devido ao seu perfil e proporção de aminoácidos (BECKER, 2007).

Além disso, é interessante ressaltar que a determinação do teor proteico de microalgas possui o potencial de fornecer informações importantes sobre as características químicas da biomassa microalgal (BARBARINO; LOURENÇO, 2005).

O teor de proteína nos alimentos é frequentemente determinado com base na proporção de nitrogênio total. Nesse contexto, o método de Kjeldahl é universalmente aplicado para a determinação desse elemento químico. A quantidade de proteína é então calculada, multiplicando o conteúdo nitrogenado pelo fator de conversão de nitrogênio em proteína para uma determinada matéria-prima (BOULOS; TÄNNLER; NYSTRÖM, 2020).

Os fatores de conversão de nitrogênio em proteína (FCPNs) permitem que o

teor de proteína em amostras de alimentos seja observado a partir da quantidade de nitrogênio na amostra. Essa estimativa pode ser feita com base em duas suposições: a primeira quando a maioria do nitrogênio está correlacionada com aminoácidos, e a segunda quando a maioria desses compostos nos alimentos estão associados à proteína. Entretanto, a exatidão da estimativa depende do valor do fator de conversão. Como exemplo, um valor de 6,25 é aplicado para quantificar o teor proteico na maioria dos alimentos e ingredientes alimentares. Novamente isso é feito com base em duas suposições: a primeira quando a massa total de proteína contém aproximadamente 16% de nitrogênio, e a segunda quando todo o nitrogênio da dieta é derivado de proteína, assim surgiu o fator tradicionalmente utilizado de 6,25, sendo calculado através da média do teor de nitrogênio em proteína de 16% ($100/16 = 6,25$) (WHO, 2019).

No entanto, usar o mesmo fator de conversão para todas as fontes de proteína pode introduzir a erros, que resultam em superestimação ou subestimação significativa do conteúdo real da maioria dos alimentos. Assim sendo, um valor padrão de 6,25 pode não ser um fator de conversão apropriado para todas as fontes de proteína, devendo, ser em considerados os valores específicos para diferentes alimentos e ingredientes alimentares (WHO, 2019).

Portanto, dado o contexto abordado, o presente estudo teve como objetivo realizar uma revisão bibliográfica sobre a utilização de fatores de conversão de nitrogênio em proteínas em microalgas.

2 METODOLOGIA

A proposta do trabalho foi procurar compreender a importância e o uso das microalgas, assim como as vantagens e desvantagens de métodos mais usuais na determinação de proteínas e o panorama de utilização de fatores de conversão de nitrogênio em proteínas em diferentes trabalhos dessa matéria-prima. Para tanto, a metodologia utilizada consistiu em uma revisão bibliográfica através de pesquisa nas seguintes bases de dados: Google Acadêmico, Scielo (Scientific Electronic Library Online), Portal de Periódicos Capes, Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações (BDTD) e sites de órgãos governamentais e não governamentais. Também foi feita uma pesquisa documental em comitês nacionais e internacionais de saúde que abordam o tema e que tenham importância científica.

Para a pesquisa, foram empregados os seguintes descritores (palavras-chave e delimitadores): microalgas, fator de conversão, aplicações, vantagens e desvantagens dos métodos de determinação de proteínas. Primeiramente, realizou-se o *download* dos materiais e, em seguida, foram organizados e arquivados em pastas para posterior leitura e análise das informações.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

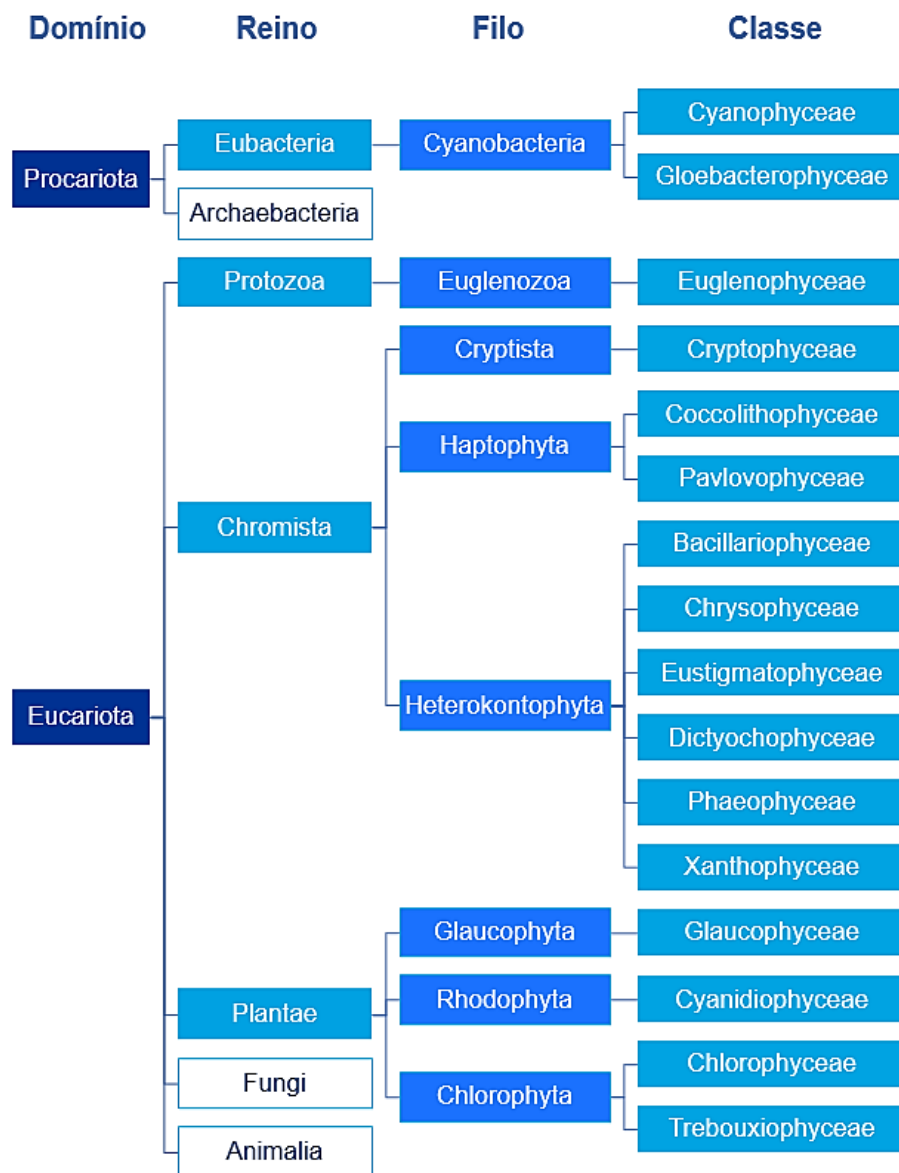
3.1 Microalgas: classificação, características, importância e aplicabilidade

O termo microalgas abrange microrganismos algais com clorofila e com outros pigmentos fotossintéticos (RAVEN *et al.*, 1999). Engloba organismos procarióticos (cianobactérias) e eucarióticos (demais microalgas), que podem crescer em diversos ambientes aquáticos, tolerando condições extremas de temperatura, salinidade, pH e intensidade de luz (KHAN; SHIN; KIM, 2018). Além disso, envolve seres unicelulares e multicelulares, com hábitos planctônicos e bentônicos (LOURENÇO, 2006). Estima-se que existam cerca de 100 mil espécies de microalgas, numa diversidade de *habitats* que incluem água doce, salgada, salobra e solos (BARSANTI; GUALTIERI, 2005).

Suas fontes de nutrientes para crescimento são as emissões antrópicas. Além disso, elas podem converter pequenas moléculas, como dióxido de carbono e amônia, em valor agregado, transformando-as em macromoléculas. As microalgas apresentam alta eficiência fotossintética e elevada taxa de crescimento, resultando em altos rendimentos de carboidratos, proteínas ou lipídios (SU *et al.*, 2017; CHEN *et al.*, 2018).

Na taxonomia atual (Figura 1), os padrões incluem 16 classes desses organismos. Dentre essas categorias, as mais abundantes são as diatomáceas (*Bacillariophyceae*), as algas verdes (*Chlorophyceae*) e as algas douradas (*Chrysophyceae*). No entanto, as diatomáceas (*Ochrophyta*), as algas verdes (*Chlorophyta*) e as cianobactérias (*Cyanophyceae*) são as mais significativas em termos de exploração e aproveitamento biotecnológico (BOROWITZKA, 2018).

Figura 1 - Distribuição dos filos de microalgas de acordo com o esquema de classificação de sete reinos, com classes utilizadas para várias aplicações biotecnológicas.



Fonte: Adaptado de RUGGIERRO *et al.*, 2015; LEVASSEUR ; PERRÉ ; POZZOBON, 2020.

Essa matéria-prima pode ser classificada quanto ao fornecimento de carbono, em ser autotróficas ou heterotrófico. Os primeiros requerem apenas compostos inorgânicos como CO₂, sais e um fonte de energia luminosa para o crescimento, enquanto os últimos requerem uma fonte externa de compostos orgânicos. Algumas algas fotossintéticas são mixotróficas, ou seja, têm a capacidade de realizar a fotossíntese e adquirir nutrientes orgânicos exógenos (LEE, 1980 *apud* BRENNAN; OWENDE, 2010).

Alguns desses microrganismos desenvolvem-se através da utilização de fotossíntese, capturando luz solar, H₂O, CO₂ e nutrientes inorgânicos, convertendo-os em biomassa, energia química e O₂ (SHEEHAN *et al.*, 1998). Eles utilizam a luz solar

em maior proporção do que as plantas terrestres (10x), consomem poluentes nocivos e minimizam a necessidade de recursos. Também não competem com a agricultura por recursos valiosos e muitas outras vantagens tecnológicas adicionais (MOSTAFA, 2012).

Entre as características que as tornam organismos de grande importância, estão a variedade de metabólitos que produzem, bem como a sua capacidade de alterar rapidamente seu metabolismo em resposta às mudanças nas condições ambientais. Quando expostas a condições físicas e químicas específicas, produzem moléculas bioativas de alto valor agregado, como antioxidantes, carotenoides, polissacarídeos, ácidos graxos, proteínas, lipídios e carboidratos (SOARES, 2021).

Porém, nem todas apresentam benefícios para o consumo. Algumas espécies de microalgas são capazes de produzir toxinas, como por as cianobactérias. Estas toxinas são um mecanismo de defesa desse organismo contra predadores. Quando submetidas a altas concentrações de nitratos e fosfatos, temperaturas elevadas e uma ampla disponibilidade de luz, as cianobactérias reproduzem-se descontroladamente, causando as florações das cianotoxinas (PAERL; PAUL, 2012). Os sintomas da ingestão destas toxinas podem variar muito e vão desde simples irritações na pele e gastrointestinais até, eventualmente, doenças neurodegenerativas, por exemplo, esclerose lateral amiotrófica derivada das neurotoxinas β -metilamina-L-alanina, BMAA) ou mesmo resultar na morte do indivíduo (BERGER et al., 2008; PAERL; PAUL, 2012)

Atualmente, existem diversos processos de produção de microalgas que operam sob condições diferentes, usando diversas espécies desses organismos, desde sistemas abertos (raceways) a sistemas fechados (fotobiorreactores, PBR). Cada um destes sistemas apresentam vantagens e desvantagens. No caso dos raceways, são sistemas de cultivo menos dispendiosos. No entanto, a probabilidade de contaminação é mais alta do que em sistemas fechados PBR (tecnologia mais cara) que é utilizado para produção industrial; este tipo de reatores, é essencialmente empregado para microalgas extremófilas (Spirulina, Dunaliella entre outras). Na produção desta matéria-prima, é possível controlar as contaminações para garantir a viabilidade do inóculo e a qualidade do produto (DUARTE, 2015)

Existe uma grande variedade de microalgas e extratos, que contém elementos altamente nutritivos, tais como: proteínas, ácidos graxos essenciais, vitaminas (A, B1, B2, B6, B12, C, E) e minerais, constituídos de potássio, ferro, magnésio, cálcio e iodo

(BECKER, 2013). São elementos que representam fontes viáveis de compostos bioativos, que podem ser úteis em aplicações farmacêuticas ou de suplementos alimentares. Sendo criadas substâncias com princípios ativos antibacterianos, anti-inflamatórios, antialérgicos, antioxidantes, hipocolesterolemia, hipoglicemia, imunossupressores, antiagregantes e vasoconstritores (RAPOSO *et al.*, 2013).

As pesquisas laboratoriais do conteúdo intracelular de microalgas começaram na década de 1890, quando Beijerinck conseguiu cultivar culturas puras de *Chorella vulgaris* (SANCHÉZ *et al.*, 2019). No entanto, o uso comercial em larga escala deste conteúdo, iniciou-se na década de 1950, motivado pelo elevado teor de proteína da biomassa para utilização como fonte alternativa de alimento (SPOLAORE; JOANNIS-CASSAN; DURAN, 2006).

O cultivo global de microalgas para aplicações alimentícias, não alimentícias e produtos é favorecido pela sua adaptabilidade a terras não cultiváveis. Além do mais, a sua eficiência na utilização da luz solar, assim como de nutrientes residuais e da água do mar também colabora para que sua produção seja considerada (DRAAISMA *et al.*, 2013). Atualmente, as microalgas utilizadas para consumo humano são comercializadas em diferentes formas, como em comprimidos, pós, cápsulas ou líquidos (WELLS *et al.*, 2017). Devido à grande variedade de nutrientes que estão sendo cada vez mais explorados e às inovações nas formas de sua aplicação, as microalgas tornaram-se objetos de estudo importantes (CARNEVALLI, 2021).

3.2 Determinação de proteínas: importância e métodos mais utilizados

As proteínas representam um grupo de substâncias fundamentais, estando presentes em alimentos e participando de diversas reações metabólicas, indispensáveis em processos biológicos vegetais ou animais. Elas são formadas, principalmente, por nitrogênio, constituindo-as na forma de aminoácidos e compostos nitrogenados. Todas as proteínas contêm carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, sendo que muitas possuem enxofre. Existem variações na composição das proteínas, porém, a quantidade de nitrogênio representa, em média, 16% da massa total da molécula. Desse modo, pode-se calcular o valor aproximado de proteína em uma amostra, medindo-se a teor de nitrogênio da mesma (VIEIRA, 2016).

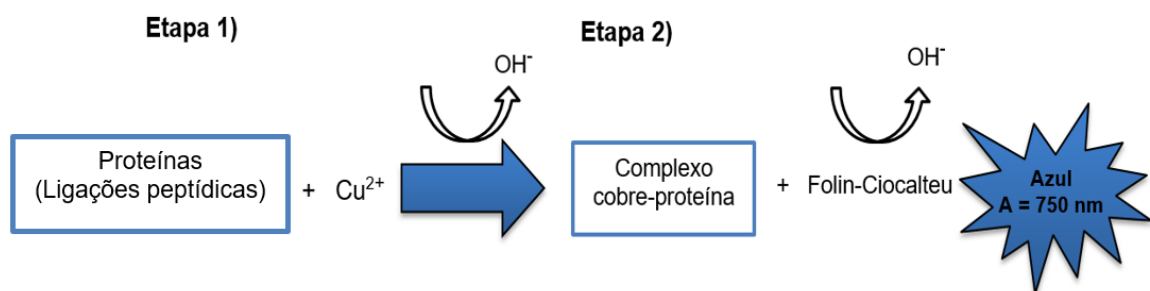
A determinação do teor de proteína é importante para avaliar a biomassa dessa matéria-prima em alimentos e rações. Métodos confiáveis e precisos de quantificação

são baseados na hidrólise de proteínas em aminoácidos, e sua quantificação é realizada por cromatografia. No entanto, esses procedimentos são de custo elevado e demorados, sendo que uma análise detalhada de proteínas no nível de aminoácidos é redundante para avaliações de rotina, devendo ser adotado outros métodos mais adequados para unidades comerciais (WALKER; WILSON, 2010).

Os métodos comumente empregados na quantificação de proteínas em microalgas são o Kjeldahl e os espectrofotométricos. Esses procedimentos quantificam sua concentração, através de comprimentos de onda na região do ultravioleta ou do visível, como nos ensaios Lowry e Bradford (MOTA *et al.*, 2018).

O uso de métodos espectrofotométricos pode ser útil para gerar dados relativos de proteínas. Entretanto, pode ser menos útil para determinar valores absolutos, já que eles dependem da extração completa de todas as proteínas da matriz da biomassa. Contudo, é difícil solubilizar completamente todos os tipos de proteínas ligadas à membrana de microalgas para expô-las ao reagente colorimétrico (TEMPLETON; LAURENS, 2015). No caso do procedimento espectrofotométrico de Lowry (Figura 2), o desenvolvimento da cor é alicerçado na redução do reagente Folin por resíduos aromáticos e ligações peptídicas na proteína, para formar a cor detectada (LÓPEZ *et al.*, 2010; SLOCOMBE *et al.*, 2013). Como o reagente Folin reagirá com outras substâncias redutoras em solução, esse ensaio é suscetível a interferências específicas de espécies de algas e a condições de crescimento, que muitas vezes causam uma alta distorção (LAURENS *et al.*, 2014).

Figura 2 - Mecanismo da reação do método de Lowry.

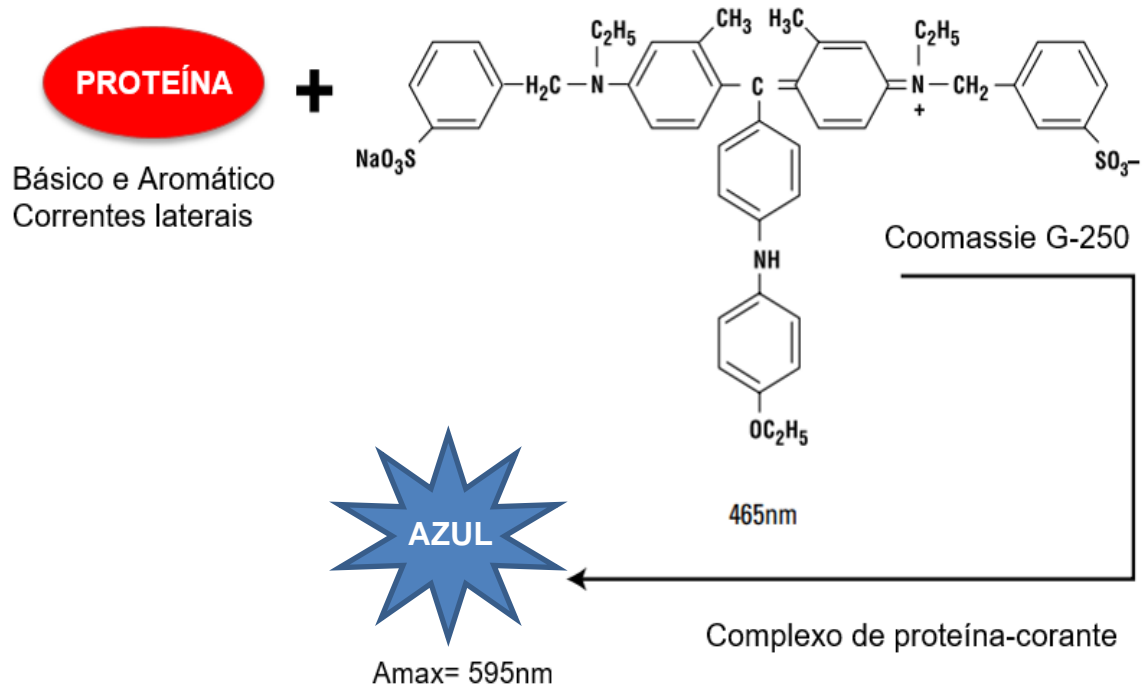


Fonte: THERMO SCIENTIFIC, 2010.

O método de Bradford (Figura 3) é baseado na ligação do corante à proteína, em que as moléculas do corante reagem principalmente com os resíduos de arginina, que possuem uma cadeia lateral positiva (MIKKELSEN; CORTÓN, 2004). Esse

sistema tem como vantagens a rapidez, o baixo custo, a estabilidade e a compatibilidade com agentes redutores, mas apresenta resposta anômala a peptídeos de baixa massa molecular (OLSON; MARKWELL, 2007).

Figura 3 - Representação esquemática do método de Bradford.



Fonte: Adaptado de THERMO SCIENTIFIC, 2010.

A determinação de proteínas através do nitrogênio total foi proposta por Johann Kjeldahl, um químico dinamarquês, que descobriu um método relativamente simples e rápido para transformar nitrogênio em matéria orgânica. Esse método virou referência para a definição do teor proteico, além de ser utilizado para calibração e validação de procedimentos alternativos de geração de proteínas (GREENFIELD; SOUTHGATE, 2003; LOPES; SANTANA, 2005). O método de Kjeldahl foi estabelecido como oficial pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC), tendo sido adotado no Brasil pela Instrução Normativa n. 68, de 12 de dezembro de 2006, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2006). Atualmente, esse procedimento é o mais utilizado para a determinação de nitrogênio e proteína em alimentos e rações. Essa ampla aplicabilidade se deve ao alto nível de precisão, reprodutibilidade, aparelhagem simples, baixo custo e fácil manuseio (VELP SCIENTIFICA, 2014; SOARES *et al.*, 2013).

O referido método (Figura 4) é dividido em três etapas principais, sendo elas: a digestão, a destilação e a titulação. Esse procedimento baseia-se na digestão com ácido sulfúrico, onde ocorre a transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio, e posterior destilação com liberação da amônia, que, é fixada em solução ácida e, então titulada com ácido clorídrico (MAPA, 2013).

Figura 4 - Esquema do método de Kjeldahl para determinação de nitrogênio, por etapas.



Fonte: Adaptado de ARAÚJO, 2019.

As principais limitações desse método para a determinação do teor de nitrogênio total são as seguintes: geração de grandes volumes de resíduos que necessitam de neutralização antes do descarte; possibilidade de perdas no sistema de destilação, que pode resultar em erros e subestimação dos teores de nitrogênio, e demora na digestão das amostras que necessitam de aquecimento em bloco digestor (SOARES *et al.*, 2013). Conforme ilustrado na Tabela 1, cada método possui suas vantagens e desvantagens. A escolha geralmente é sustentada na compatibilidade com as amostras. Além disso, deve-se considerar as possíveis substâncias interferentes incluídas, que podem afetar determinadas metodologias, bem como a precisão e a reprodutibilidade.

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens dos métodos mais usuais para determinação de proteínas em microalgas.

Método	Vantagens	Desvantagens
Lowry	Alta sensibilidade, menor quantidade de amostra, praticidade e baixo custo.	Interferência dos íons magnésio (Mg^{2+}) e cálcio (Ca^{2+}), longo tempo de análise, absorvidade específica altamente variável para diferentes proteínas.
Bradford	Rápido, sensível, baixo custo, menor suscetibilidade à interferência de reagentes.	Absorvidade específica variável para diferentes proteínas, fornecimento de resultados nem sempre reprodutíveis devido ao grau de pureza do corante BG-250 que varia conforme a procedência.
Kjeldahl	Alto nível de precisão, reprodutibilidade, aparelhagem simples, baixo custo, fácil manuseio, compatibilidade com quase todas as matrizes alimentares e ampla aplicação nas comunidades analíticas e regulatórias de alimentos.	Falta de seletividade para determinados grupos de proteínas e problemas com precisão atribuídos a fatores de conversão de nitrogênio em proteína.

Fonte: Adaptado de TEMPLETON; LAURENS, 2015; LAURENS *et al.*, 2014; VELP SCIENTIFICA, 2014; SOARES *et al.*, 2013; OLSON; MARKWELL, 2007; ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998.

Para análises de rotina rápidas, os métodos respaldados em Bradford e Lowry têm a vantagem de serem mais ágeis e baratas. No entanto, devido à variedade de compostos interferentes, os resultados obtidos podem não ser precisos. Segundo Moore *et al.* (2010), apesar de sua falta de seletividade para determinados grupos de proteínas, as técnicas de quantificação desse composto através do nitrogênio total têm mínimos efeitos de matriz. Decorre que, ao analisar o nitrogênio, a amostra alimentar é quase completamente oxidada durante a análise. Isso permite que métodos de análises de proteína à base de nitrogênio sejam aplicados à qualquer matriz alimentar, com adaptação mínima, específica de cada matriz. O uso de técnicas mais seletivos para medições de proteínas introduz a mais interferências da matriz. Para obter resultados confiáveis, a metodologia de Kjeldahl é utilizada para uma microalga, em que o fator de conversão é determinado previamente.

3.3 Fator de conversão de nitrogênio em proteína: histórico e fatores utilizados atualmente em microalgas

A determinação de um FCNP específico é importante para agregar valor comercial a um ingrediente alimentar. Decorre que o teor de proteína configura-se em um elemento determinante para aumentar a sua cotação de mercado (MOORE *et al.*, 2010). Para alimentos em que esse fator é desconhecido, o FCNP médio de 6,25 é frequentemente adotado, uma vez que considera 16% de nitrogênio. Entretanto, o teor de nitrogênio não proteico acaba não sendo significativo (LOURENÇO *et al.*, 2004). No entanto, plantas e microalgas apresentam uma grande quantidade de compostos nitrogenados não proteicos, que dependem da espécie, da variedade, do estágio de crescimento e do cultivo ou condições de produção (MOTA *et al.*, 2018). Embora o fator de 6,25 tenha se mostrado errôneo principalmente por negligenciar a fração de nitrogênio não proteico, ele ainda é utilizado em tabelas de composição de alimentos (VAN DER SPIEGEL; NOORDAM; VAN DER FELS-KLERX, 2013, MARIOTTI; TOMÉ; MIRAND, 2008).

A conversão de nitrogênio em proteína é um método reconhecido e amplamente utilizado, mas depende do desenvolvimento de um fator de conversão de nitrogênio em proteína que seja aplicável (TEMPLETON; LAURENS, 2015). O cuidado essencial na utilização do nitrogênio percentual como método de determinação do teor de proteína está em utilizar um fator de conversão de nitrogênio em proteína que seja específico para as amostras analisadas no trabalho.

Nesse contexto, Mossé (1990) propõe um método para determinar um fator de conversão de nitrogênio em proteína. Também descreve como determinar os limites superior (kA) e inferior (kP) para esse fator, sugerindo a combinação desses limites em um único fator médio (k). Importante ressaltar que a abordagem de usar medidas de aminoácidos para calcular o FCNP não era nova, mas o estudo de Mossé avançou em relação ao trabalho anterior e, essencialmente, “codificou” a abordagem para calcular o fator k (KRUL, 2019).

Esses fatores podem ser facilmente definidos matematicamente, conforme as Equações 1, 2 e 3, descritas na sequência, embora existam muitas particularidades práticas, analíticas e computacionais a serem observadas ao calcular esses fatores (TEMPLETON; LAURENS, 2015).

$$k_A = (\sum E_i)/(\sum D_i) \quad (1)$$

$$k_P = (\sum E_i)/N \quad (2)$$

$$k = (k_A + k_P)/2 \quad (3)$$

O termo $\sum E_i$ é a soma dos aminoácidos anidros (resíduo de aminoácido), contabilizando a perda de massa durante polimerização em proteínas. O termo $\sum D_i$ consiste na soma do teor de nitrogênio dos resíduos de aminoácidos, incluindo qualquer amônia liberada durante a hidrólise. O termo N refere-se à % nitrogênio encontrado nas amostras por métodos que incluam o nitrogênio proteico e não proteico (NPN).

Dessa perspectiva, Mossé (1990) argumenta que a melhor escolha para o fator de conversão de nitrogênio em proteína em amostras reais é a média (k) dos limites superior e inferior. De sua parte, Templeton e Laurens (2015) concordaram que determinar k possivelmente é a escolha mais precisa. Os referidos autores também observaram que o fator k_A é uma escolha inadequada para ser utilizada como FCNP. Isso porque assume que todo o nitrogênio é derivado de proteína, ou seja, que o nitrogênio não proteico (NNP) é igual a zero. Assim sendo, esse fator superestima o verdadeiro teor de proteína de uma amostra, como a biomassa de algas, e pode ser altamente tendencioso devido à presença de NNP. Além do mais, os autores relatam que o fator k_P é a opção mais conservadora e mais adequada em relação ao NNP da amostra, atribuindo todos os aminoácidos à proteína (TEMPLETON; LAURENS, 2015).

Nesse contexto, Angell *et al.* (2016) defenderam que um FCNP específico deve ser realizado para todos os produtos de algas marinhas, argumentando ser importante que a indústria conheça seu teor proteico para evitar possíveis perdas econômicas. Lourenço *et al.* (1998) realizaram um estudo para determinar as concentrações dos principais compostos nitrogenados e estabelecer fatores de conversão de nitrogênio em proteína específicos para as microalgas marinhas, propondo FCNP para cada fase de crescimento nas espécies avaliadas. O fator de conversão de nitrogênio em proteína médio para todas as espécies/fases de crescimento foi de $4,58 \pm 0,11$. Essa pesquisa mostrou que o uso do fator tradicional (6,25) não é adequado para essa matéria-prima e, possivelmente, para outras espécies, pois superestima seu verdadeiro teor.

Observaram, ainda, que, nesses casos, o uso desses agentes específicos para

cada fase de crescimento ou fatores médios para cada espécie, está associado a maior variação nos cálculos de proteínas totais. No entanto, é muito menor do que o fator conversão de nitrogênio em proteína tradicionalmente utilizado (6,25). A explicação para isso é que, na ausência de estudos específicos para outras espécies marinhas, o FCNP de 4,58 (a média de todos os fatores no presente estudo) deve ser utilizado, em vez de 6,25 para calcular a proteína total a partir do teor de nitrogênio (LOURENÇO *et al.*, 1998).

Posteriormente, Lourenço *et al.* (2004) afirmaram que os balanços de nitrogênio em microalgas são fortemente influenciados pelas condições de crescimento e pelo estado fisiológico das culturas. Como a proporção de proteína nitrogenada para nitrogênio pode ser variável em microalgas cultivadas em processos em batelada, isso pode limitar a utilidade dos fatores de conversão de nitrogênio para proteína, mesmo sendo o método mais comum para determinar o teor de proteína. Além do mais, ressaltam que precisão da determinação dessa macromolécula por métodos utilizando um FCNP depende do estabelecimento de um fator mais específico para a amostra em estudo, sendo necessários dados experimentais para preencher essa lacuna (LOURENÇO *et al.*, 2004).

Dessa forma, para complementar o estudo anterior, os pesquisadores acompanharam o crescimento de espécies de microalgas marinhas e determinaram seus fatores. Com base nos resultados atuais e no estudo anterior, foi estabelecido um FCNP médio geral em todas as espécies, com tratamentos e fases de crescimento de $4,78 \pm 0,62$. Este trabalho reafirma que a utilização do fator tradicional (6,25) para essa matéria-prima é inadequada, recomendando-se a utilização dos fatores propostos neste estudo (LOURENÇO *et al.*, 2004).

Safi *et al.* (2013) publicaram um estudo sobre a influência das características da parede celular de microalgas na extração de proteínas e na determinação de fatores de conversão de nitrogênio em proteína. Obtiveram para *Chlorella vulgaris* de parede celular rígida, para *Nannochloropsis oculata* e para *Haematococcus pluvialis* os valores de 6,35, 6,28 e 6,25, respectivamente, mas, para seus extratos proteicos, os valores foram menores, sendo de 5,96, 5,86 e 5,63. Por sua vez, o FCNP obtido para microalgas com paredes celulares frágeis *Porphyridium cruentum* e *Athrospira platensis* foi de 6,35 e de 6,27, sem diferença significativa para seu extrato proteico, com 6,34 e 6,21. Neste estudo, o kA foi calculado para todas as espécies, sendo esse tipo de fator de conversão maior que kP e k. Por isso, há uma diferença entre os

fatores calculados para *N. oculata* neste estudo (6,28) e aquele encontrado para a mesma microalga (4,87) na publicação de Lourenço *et al.* (1998), que utilizou o fator k.

Os autores destacam que a extração de proteínas, juntamente com a avaliação do fator de conversão, trouxe evidências adicionais de que a parede celular de todas as microalgas desempenha um papel importante na quantificação de proteínas, ou seja, ignorá-la pode resultar em uma quantificação errônea do teor proteico. Ressaltam, também, que não existe um fator de conversão universal que possa ser recomendado para todas as microalgas, como demonstrada pela comparação deste estudo com outros que foram realizados em dezenas de microalgas. Conclui-se, então, que sempre quando a quantificação precisa de proteínas for essencial, o FCNP deve ser avaliado (SAFI *et al.*, 2013).

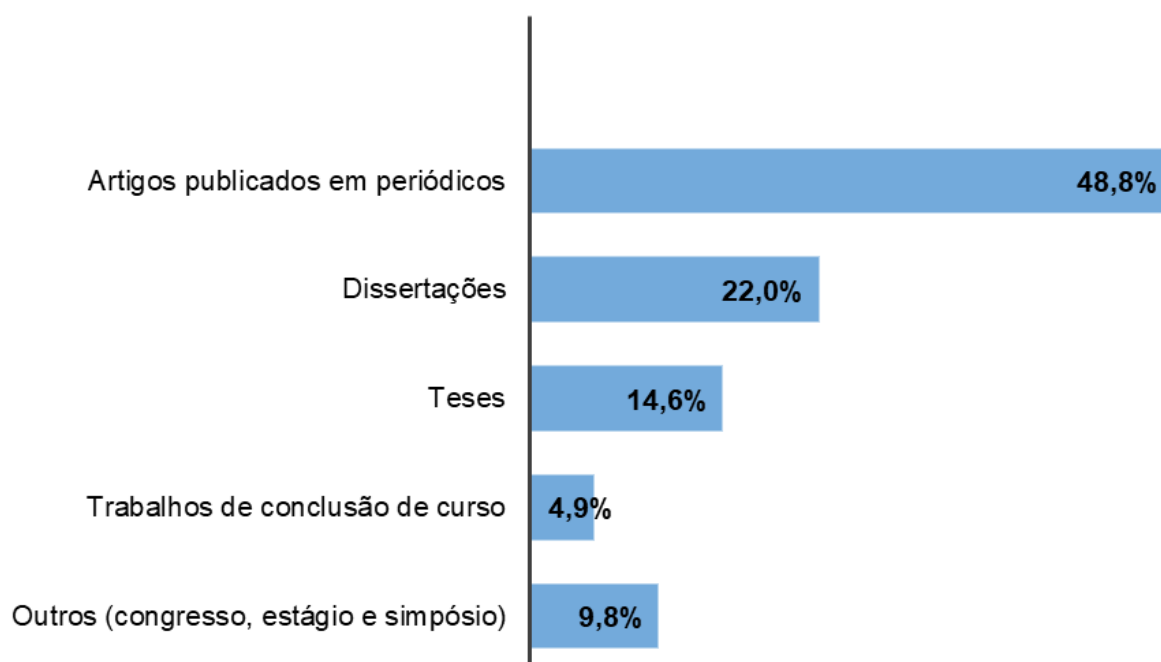
Templeton e Laurens (2015) publicaram uma revisão de estudos sobre a composição de microalgas e FCNP derivados de 21 amostras analisadas, determinando fatores de kA (6,24), kP (3,71) e k (4,97). O valor médio de k aplicado nesse estudo não difere significativamente do que foi proposto por Lourenço *et al.* (2004), de 4,78.

Nessa perspectiva, Angell *et al.* (2016) explicam que, ultimamente, há interesse em caracterizar os componentes de algas marinhas e microalgas, à medida em que se tornam organismos de maior importância como fonte de alimento. Diante disso, realizaram um levantamento de 236 artigos, analisando o teor de proteína definido em algas e microalgas, os quais mostraram que 6% dos estudos utilizaram o método de quantificação de aminoácidos proteômicos totais (TAA), 42% estipularam o teor de proteína por métodos de extração direta e a subsequente determinação de proteína solúvel (principalmente através de ensaios de Bradford e Lowry). Enquanto isso, 52% utilizaram o método indireto com o fator de conversão de nitrogênio em proteína genérico (6,25), traduzido da literatura sobre animais e plantas terrestres. Tal procedimento serviu para enfatizar que esse fator é amplamente utilizado, mesmo que estudos demonstrem que seu uso nessa matéria-prima é inadequado.

Diante do exposto, foi desenvolvida uma pesquisa para complementar esta revisão, onde foram selecionadas 41 publicações, no período entre 2003 e 2021. Todas utilizavam um fator de conversão de nitrogênio em proteína em microalgas para determinar o seu teor de proteínas, com o intuito de averiguar qual o fator que está sendo mais utilizado atualmente para essa matéria-prima.

Conforme é possível observar na Figura 4, 48,8% dos estudos utilizados nesta pesquisa são artigos publicados em periódicos nacionais e internacionais; dissertações, teses e trabalhos de conclusão de cursos somam 41,5% e, posteriormente, com 9,8%, encontra-se a classe outros, incluindo publicações em anais de congresso, simpósios e relatórios de estágios.

Figura 4 - Distribuição da frequência relativa das classes de estudos utilizados na pesquisa (n= 41).



Fonte: Autora, 2022.

Conforme é descrito na Tabela 2, verifica-se que 75,6% das publicações utilizaram o fator 6,25 em seus estudos. Enquanto isso, apenas 22,0% recorreram ao valor proposto por Lourenço *et al.* (2004), para microalgas de 4,78, e 01 publicação, 2,4%, utilizou o fator de 5,75, em que o autor justifica a escolha do mesmo como sendo para a determinação de proteínas vegetais. Esses resultados ressaltam que, apesar dos estudos direcionados na obtenção de um FCNP para microalgas, o fator genérico (6,25) continua sendo amplamente utilizado, embora existam publicações que o consideram inadequado para essa matéria-prima. Esse fator é utilizado há décadas para várias amostras, tornando claramente difícil sair de sua posição atual. No entanto, há a necessidade de estender a questão à comunidade científica, para que seja adotado um maior cuidado na seleção de um fator de conversão de nitrogênio em proteína para microalgas. Dessa forma, evitar a superestimação ou a

subestimação do teor de proteína dessa matéria-prima.

Tabela 2 – Fatores de conversão de nitrogênio em proteínas utilizados em estudos sobre microalgas.

FCNP*	N°	%	Referências
6,25	31	75,6	ARAYA <i>et al.</i> , 2021; BARRETO; CHEPE, 2021; BARROS, 2010; BISPO, 2019; CARVAJAL, 2009; COCA <i>et al.</i> , 2015; DE ALVA; LUNA-PABELLO, 2017; FURTADO, 2013; GORGÔNIO, 2013; GRAZIANI <i>et al.</i> , 2013; JAESCHKE, 2019; LIMA, 2016; LISBOA <i>et al.</i> , 2014; LUPATINI, 2016; MANRICH <i>et al.</i> , 2014; MATOS <i>et al.</i> , 2015; MINGOTTI, 2019; MOLINO <i>et al.</i> , 2018; MOREIRA, 2010; NICCOLAI <i>et al.</i> , 2019; OGBONDA; AMINIGO; ABU, 2007; OHSE <i>et al.</i> , 2009; PALMA, 2015; PEREIRA <i>et al.</i> , 2018; PERON, 2018; SILVA, 2020; SIMÃO, 2017; SPÍNOLA, 2021; TOKUŞOĞLU; ÜUNAL, 2003; WAGHMARE <i>et al.</i> , 2016; YEH, CHANG; CHEN, 2010.
4,78	9	22,0	ALMEIDA <i>et al.</i> , 2020; JULICH <i>et al.</i> , 2019; MACHADO <i>et al.</i> , 2017; MATOS <i>et al.</i> , 2016; MOTA <i>et al.</i> , 2018; PEREIRA, 2017; SANTANA <i>et al.</i> , 2017; TELES, 2016; TORRES, CASSINI; GONÇALVES, 2014.
5,75	1	2,4	RICO, 2014.

*Fator de conversão de nitrogênio em proteínas.

Fonte: Autora, 2022.

Atualmente um dos maiores interesses nas microalgas é como fonte de proteínas e neste contexto esta matéria-prima está sendo vista como um elemento de grande valor com uma vasta gama de aplicações (COBOS *et al.*, 2020). O FCNP de 6,25 foi adotado com base em medições iniciais que mostraram que as proteínas continham 16% de nitrogênio em peso e a suposição de que todo esse elemento era derivado de proteína (MOORE *et al.*, 2010). Existem preocupações sobre a distribuição de nitrogênio em algas marinhas. Sendo que substâncias nitrogenadas não proteicas como pigmentos (clorofila e ficoeritrina) e nitrogênio inorgânico (nitrato, nitrito e amônia) estão presentes em altas concentrações. Portanto, a utilização do fator tradicional (6,25) superestima o teor real de proteína e tal atribuição consegue ser crucial no valor agregado de produtos que utilizam essa matéria-prima (LOURENÇO *et al.* 1998; MAEHRE, *et al.* 2018). Assim, o cálculo do teor proteico com o uso de um FCNP requer alguns cuidados, o que nem sempre é considerado pelos autores que utilizam essa metodologia (LOURENÇO *et al.*, 2002).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As microalgas são uma alternativa promissora em virtude de seus componentes, principalmente as proteínas, sendo um dos elementos de maior interesse para aplicações.

Nesse sentido, determinar o teor de proteína se torna importante na valorização da biomassa microalgal. Logo, a análise de determinação desse composto com a utilização de um fator de conversão de nitrogênio em proteína é muito utilizada.

Estudos enfatizam que a determinação do fator k é possivelmente a escolha mais precisa e que o fator tradicional (6,25) superestima os teores de proteína em microalgas, o que acarreta em resultados inadequados.

Para essa matéria-prima, não existe um fator de conversão universal que possa ser recomendado para todas as espécies. Entretanto, já existem fatores definidos para microalgas específicas que devem ser adotados, em substituição ao fator tradicionalmente empregado. Conseqüentemente, deve haver um maior cuidado ao aplicar um fator de conversão de nitrogênio em proteína nessa matéria-prima. Decorre que, sempre quando uma quantificação precisa dessa macromolécula for indispensável, torna-se necessário avaliar ou considerar um FCNP mais específico, considerando sua espécie e fase de crescimento, caso não haja um fator pré-definido para a microalga em questão, o fator médio que utilizou maior quantidade de amostra (4,97) deve ser considerado.

Em vista disso, numa perspectiva futura, recomendam-se novos estudos sobre essa temática, de forma à disseminar esse assunto para a comunidade científica.

5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. M. R. *et al.* Utilização de Biomassa de *Spirulina Platensis* para desenvolvimento de molho com alto teor proteico: um estudo piloto. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 4, p. 21172-21185, 2020. Disponível em: <<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BRJD/article/view/9203/7782>>. Acesso em: 10 jun. 2022.

ANGELL, A. R. *et al.* The protein content of seaweeds: a universal nitrogen-to-protein conversion factor of five. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 1, p. 511-524, 2016. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10811-015-0650-1>>. Acesso em: 10 jun. 2022.

ARAÚJO, M. A. **Revisão bibliográfica: avaliação do método de Kjeldahl na determinação de nitrogênio e sua aplicação na análise foliar**. 38 f. Trabalho de

Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/25454>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

ARAYA, M. *et al.* Determination of free and protein amino acid content in microalgae by HPLC-DAD with pre-column derivatization and pressure hydrolysis. **Marine Chemistry**, v. 234, p. 103999, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304420321000840>>. Acesso em: 22 mai. 2022.

BARBARINO, E., LOURENÇO, S. O. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro-and microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 5, p. 447-460, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-005-1641-4>. Acesso em: 18 mai. 2022.

BARRETO GONZÁLEZ, M. C., CHEPE DELGADO, V. M. **Cultivo de *Spirulina platensis* en diferentes niveles de pH y rendimiento de proteínas**. f. 95. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque-Perú, 2021. Disponível em: <<https://hdl.handle.net/20.500.12893/9884>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

BARROS, K. K. S. **Produção de biomassa de *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*) para alimentação humana**. 112 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010. Disponível em: <<https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/tede/4089/1/arquivototal.pdf>>. Acesso em: 02 jun. 2022.

BARSANTI, L., GUALTIERI, P. Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology. Boca Raton: **CRC**, p. 270- 320, 2005.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 2, p. 207-210, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>. Acesso em: 14 mai. 2022.

BECKER, E. W. Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology. In: Richmond A (ed) Bioactive and novel chemicals from microalgae, p. 26. **Blackwell Science**, Oxford, 2013.

PEROVICH, G. *et al.* Causes, prevention, and mitigation workgroup report. In: **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**. Springer, New York, NY, 2008. p. 185-215. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-0-387-75865-7_9.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2022.

BISPO, L. O. **Efeito do pH, NaCl e tratamento ultrassônico na solubilidade da proteína da microalga *Spirulina platensis***. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2019. Disponível em: <<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/12630>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

BOROWITZKA, M. A. Biology of Microalgae. In: Microalgae in Health and Disease Prevention. Edited by Levine IA, Fleurence J. **Academic Press**; p. 23-72, 2018.

BOULOS, S., TÄNNLER, A., NYSTRÖM, L. Nitrogen-to-Protein Conversion Factors for Edible Insects on the Swiss Market: *T. molitor*, *A. domesticus*, and *L. migratoria*. **Frontiers in nutrition**, p. 89, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00089>. Acesso em: 14 mai. 2022.

BRASIL. Instrução Normativa nº 68, de 12 de dezembro de 2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília. **Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para controle de leite e produtos lácteos**. Disponível em: <https://wp.ufpel.edu.br/inspleite/files/2016/03/Instru%C3%A7%C3%A3o-normativa-n%C2%B0-68-de-12-dezembro-de-2006.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2022.

BRENNAN, L., OWENDE, P. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>. Acesso em: 21 jul. 2022.

CARNEVALLI, F. R. **Uso de Biomassa de Microalgas e seus Derivados em Alimentos**. f. 41. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/directbitstream/ba03cb6e-9a66-47f9-ba2b-ff5ca8c7b8d4/3066161.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2022.

CARVAJAL, J. C. L. **Caracterização e modificações químicas da proteína da microalga Spirulina (*Spirulina maxima*)**. 138 f. Tese (Doutorado em Química e Bioquímica de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009. Disponível em: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/4006>. Acesso em: 03 jun. 2022.

CHEN X. *et al.* Nitrogen and phosphorus removal from anaerobically digested wastewater by microalgae cultured in a novel membrane photobioreactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1190-0>. Acesso em: 19 jun. 2022.

COBOS, M. *et al.* Nutritional evaluation and human health-promoting potential of compounds biosynthesized by native microalgae from the Peruvian Amazon. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 8, 1 ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02896-1>. Acesso em: 23 jul. 2022.

COCA, M. *et al.* Protein production in *Spirulina platensis* biomass using beet vinasse-supplemented culture media. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 306-312, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2014.03.012>. Acesso em: 11 ago. 2022.

COSTA, E. A. Nutrição e Fitoterapia: tratamento alternativo através das plantas. Petrópolis, RJ, **Editores Vozes**, 2012.

DE ALVA, M., LUNA-PABELLO, V. M. Determinación del contenido de proteína y nutraceuticos en la biomasa de *Paramecium aurelia*. **Ecosistemas y Recursos Agropecuarios**, v. 4, n. 10, p. 89-96, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.19136/era.a4n10.678>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

DRAAISMA, R. B. *et al.* Food commodities from microalgae. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 169-177, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.012>>. Acesso em: 05 jun. 2022.

DUARTE, M. M S. **Identificação, deteção e caracterização de contaminantes em produção de microalgas através das técnicas de biologia molecular**. f. 61. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10451/23065>>. Acesso em: 12 ago. 2022.

FURTADO, A. S. **Produção, avaliação e aplicação de filmes nanocompósitos obtidos a partir de extrato proteico da microalga *Spirulina platensis***. f. 146. Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande/FURG, Rio Grande, 2013. Disponível em: <<http://repositorio.furg.br/handle/1/6082>>. Acesso em: 20 jun. 2022.

GORGÔNIO, C. M. D. S. **Aplicação de tecnologia enzimática para a obtenção de hidrolisados proteicos de microalgas**. Tese (Doutorado do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://epqb.eq.ufrj.br/download/tecnologia-enzimatica-para-obtencao-de-hidrolisados-proteicos-de-microalgas.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2022.

GRAZIANI, G. *et al.* Microalgae as human food: chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga *Galdieria sulphuraria*. **Food & Function**, v. 4, n. 1, p. 144-152, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C2FO30198A>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

GREENFIELD, H., SOUTHGATE, D. A. T. **Datos de composición de alimentos: obtención, gestión, utilización**. 2. ed. Roma: FAO, 2003. 321p. Disponível em: <<https://www.fao.org/3/y4705s/y4705s.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2022.

JAESCHKE, D. P. **Aplicação de tecnologias emergentes na extração de compostos de interesse a partir de microalgas**. Tese (Doutorado do Programa de Pós Graduação em Engenharia Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10183/203761>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

JULICH, J. *et al.* Estudo da hidrólise enzimática de biomassa de microalga empregando uma sequência de enzimas. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 9, n. 2, p. 77-84, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.17058/rjp.v9i2.13519>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

KHAN, M. I., SHIN, J. H., KIM, J. D. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, v. 17, n. 1, p. 1-21, 2018. Disponível

em: <<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-018-0879-x>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

KRUL, E. S. Calculation of nitrogen-to-protein conversion factors: A review with a focus on soy protein. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 96, n. 4, p. 339-364, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/aocs.12196>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

LAURENS, L. M. L. *et al.* Strain, biochemistry, and cultivation-dependent measurement variability of algal biomass composition. **Analytical Biochemistry**, v. 452, p. 86-95, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.02.009>>. Acesso em: 01 jul. 2022.

LEE, R. E. Phycology. Cambridge University Press, **Cambridge**, 1980.

LEVASSEUR, W., PERRÉ, P., POZZOBON, V. A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. **Biotechnology Advances**, v. 41, p. 107545, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107545>> Acesso em: 10 jul. 2022.

LIMA, J. F. **Cultivo e secagem da microalga *Chlorella sp.* em diferentes concentrações de nutrientes**. F. 135. Tese (Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos), da Universidade Federal de Campina Grande/UFCG, Campina Grande, 2016. Disponível em: <<http://dspace.sti.ufcg.edu.br:8080/xmlui/handle/riufcg/932>>. Acesso em: 05 jun. 2022.

LISBOA, C. R. *et al.* Utilisation of *Spirulina sp.* and *Chlorellapyrenoidosa* biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. **Journal of Engineering Research and Applications**. V. 4, n. 5, p. 29-38, 2014. Disponível em: <https://www.academia.edu/7675735/Utilisation_Of_Spirulinasp._And_Chlorellapyrenoidosa_Biomass_For_The_Production_of_Enzymatic_Protein_Hydrolysates>. Acesso em: 06 jun. 2022.

LOPES, D. C., SANTANA, M. C. A. Determinação de proteína em alimentos para animais: métodos químicos e físicos. Viçosa, **Editora UFV**, 98p, 2005.

LÓPEZ, C. V. G. *et al.* Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7587-7591, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.04.077>>. Acesso em: 05 jun. 2022.

LOURENÇO, S. O. *et al.* Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: basis for the calculation of specific nitrogen-to-protein conversion factors. **Journal of Phycology**, v. 34, n. 5, p. 798-811, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1998.340798.x>>. Acesso em: 26 jun. 2022.

LOURENÇO, S. O. *et al.* Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. **Phycological Research**, v. 50, n. 3, p. 233-241, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1046/j.1440-1835.2002.00278.x>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

LOURENÇO, S. O. *et al.* Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, v. 39, n. 1, p. 17-32, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/0967026032000157156>>. Acesso em: 20 jun. 2022.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. São Carlos: **RIMA**, p. 606, 2006.

LUBIANA, K. M. F. **Microalgas: ecologia, biodiversidade e importância**. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo, IV Botânica no Inverno, p.35-47, 2014. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/KarolineMagalhaes/publication/313302649_Microalgas_ecologia_biodiversidade_e_importancia/links/5894ec1d92851c8bb672d0a1/Microalgas-ecologia-biodiversidadee-importancia.pdf. Acesso em: 14 mai. 2022.

LUPATINI, A. L. **Extração de proteínas e carboidratos da biomassa de *Spirulina platensis* e caracterização da fração proteica**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná/UTFPR, Medianeira, 2016. Disponível em: <<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/2180>>. Acesso em: 18 jun. 2022.

MACHADO, A. R. *et al.* Uma abordagem sobre caracterização e avaliação do potencial antioxidante de extratos fenólicos de microalgas *Spirulina sp.* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 264-278, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.19084/RCA16011>>. Acesso em: 22 mai. 2022.

MAEHRE, H. K. *et al.* Protein determination—method matters. **Foods**, v. 7, n. 1, p. 5, 2018. Disponível em: < <https://doi.org/10.3390/foods7010005>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Determinação de Nitrogênio Total em Leite e derivados Lácteos pelo método de Micro-Kjedahl**. Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS, MET POA/11/02/01, p. 1-8, 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/arquivosmetodos-da-area-poa-iaq/met-poa-11-02-proteinas.pdf>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

MANRICH, A. *et al.* Determinação da composição química da *spirulina platensis*. In: **Embrapa Instrumentação** - Artigo em anais de congresso. p. 116-120, 2014. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/1004397/1/arq19.pdf>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

MARIOTTI, F., TOMÉ, D., MIRAND, P. P. Converting nitrogen into protein—beyond 6.25 and Jones' factors. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, n. 2, p. 177-184, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10408390701279749>>. Acesso em: 15 jun. 2022.

MATOS, A. P. *et al.* Protein and lipid contents from *Chlorella sp.* cultivated in residual concentrated desalination/Teores de proteínas e lipídeos de *Chlorella sp.* cultivada em

concentrado de dessalinização residual. **Ciência Rural**, v. 45, n. 2, p. 364-371, 2015. Disponível em: <<https://go.gale.com/ps/i.do?id=GALE%7CA442115742&sid=google Scholar&v=2.1&it=r&linkaccess=abs&issn=01038478&p=IFME&sw=w&userGroupName=lasera>>. Acesso em: 11 jun. 2022.

MATOS, A. P. *et al.* Chemical characterization of six microalgae with potential utility for food application. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 7, p. 963-972, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11746-016-2849-y>>. Acesso em: 14 jun. 2022.

MIKKELSEN, S. R., CORTÓN, E. *Bioanalytical Chemistry*. Nova Jersey, **John Wiley & Sons Inc**, p. 322-345, 2004.

MINGOTTI, R. **Aumento do teor proteico da biomassa seca da cianobactéria *Spirulina platensis* por extração de carboidratos utilizando solvente**. 69 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná/UTFPR, Ponta Grossa, 2019. Disponível em: <<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/16505>>. Acesso em: 15 jun. 2022.

MOLINO, A. *et al.* Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 11, p. 2436, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/ijerph15112436>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

MOORE, J. C. *et al.* Total protein methods and their potential utility to reduce the risk of food protein adulteration. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 4, p. 330-357, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00114.x>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

MOREIRA, L. M. **Efeitos de diferentes concentrações de *Spirulina* nos perfis bioquímico, hematológico e nutricional de ratos wistar nutridos e desnutridos**. 119f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande/UFRG, Rio Grande, 2010. Disponível em: <<http://repositorio.furg.br/handle/1/2486>>. Acesso em: 07 jun. 2022.

MOSSÉ, J. Nitrogen-to-protein conversion factor for ten cereals and six legumes or oilseeds. A reappraisal of its definition and determination. Variation according to species and to seed protein content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, n. 1, p. 18-24, 1990. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Nitrogen-to-protein-conversion-factor-for-ten-and-AMoss%C3%A9/174fef1ae0f3fbc8c358345745c5173d3ec>>. Acesso em: 19 jun. 2022.

MOSTAFA, S. S. M. *Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications*. **Intech Open**, London, UK, 2012.

MOTA, M. F. S. *et al.* Colorimetric protein determination in microalgae (*Chlorophyta*): association of milling and SDS treatment for total protein extraction. **Journal of Phycology**, v. 54, n. 4, p. 577-580, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jpy.12754>>. Acesso em: 21 jun. 2022.

NICCOLAI, A. *et al.* Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. **Algal Research**, v. 42, p. 101617, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101617>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

OGBONDA, K. H., AMINIGO, R. E., ABU, G. O. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina sp.* **Bioresource Technology**, v. 98, n. 11, p. 2207-2211, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.028>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

OHSE, S. *et al.* Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas/Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1760-1767, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0103-84782009000600019>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

OLSON, B., MARKWELL, J. Assays for determination of protein concentration. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 38, n. 1, p. A. 3A. 1-A. 3A. 29, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/0471141755.pha03as38>>. Acesso em: 20 jun. 2022.

PAERL, H. W., PAUL, V, J. Climate change: links to global expansion of harmful cyanobacteria. **Water Research**, v. 46, n. 5, p. 1349-1363, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.002>>. Acesso em: 12 ago. 2022.

PALMA, M. **Evaluación de la capacidad antioxidante in vitro de hidrolizados proteicos de *Spirulina (Arthrospira maxima)* y su efecto quimiopreventivo en cáncer de colon inducido con azoximetano.** 113 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Escola Nacional de Ciências Biológicas, México, 2015. Disponível em: <<http://rdcb.cbq.ipn.mx/handle/20.500.12273/713>>. Acesso em: 02 jun. 2022.

PEREIRA, M. I. B. **Avaliação do cultivo mixotrófico da *Spirulina platensis (Arthrospira platensis)* utilizando soro de queijo mozzarella de búfala como fonte de carbono orgânico.** 75f. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/26325>>. Acesso em: 02 jun. 2022.

PEREIRA, L. T. *et al.* Extração de Proteínas da Microalga *Spirulina* e Análise da Atividade Antimicrobiana da Fração Proteica. In: **2º Fórum Integrado da Pós-Graduação.** 2018. Disponível em: <<https://proxy.furb.br/soac/index.php/fip/2fip/paper/view/3251>>. Acesso em: 08 jun. 2022.

PERON, B. C. **Frações residuais do processo de extração de proteínas da biomassa de *Spirulina platensis* como matéria-prima para produção de bioetanol.** 67 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2018. Disponível em: <<http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/3950>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

RAPOSO, M. F. J., MORAIS, R. M. S. C., MORAIS, A. M. M. B. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. **Life Sciences**, v. 93, n. 15, p. 479-486, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2013.08.002>>. Acesso em: 02 jun. 2022.

RAVEN, J. A. *et al.* The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. **Photosynthesis Research**, v. 60, n. 2, p. 111-150, 1999. Disponível em: <<https://doi.org/10.1023/A:1006282714942>> Acesso em: 04 jul. 2022.

RICO, A. O. **Otimização da produção de biomassa de microalgas em sistema biológico de tratamento de gases de uma churrascaria**. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/1209>> Acesso em: 11 ago. 2022.

RUGGIERO, M. A. *et al.* A higher-level classification of all living organisms. **Plos One**, v. 10, n. 4, p. e0119248, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>> Acesso em: 10 jul. 2022.

SAFI, C. *et al.* Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 2, p. 523-529, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10811-012-9886-1>>. Acesso em: 15 jun. 2022.

SALTER, A. M., LOPEZ-VISO, C. Role of novel protein sources in sustainably meeting future global requirements. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 80, n. 2, p. 186-194, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S0029665121000513>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

SANCHÉZ, J. *et al.* Biomass resources. In: The Role of Bioenergy in the Bioeconomy. Cambridge: **Academic Press**, p. 25-111, 2019.

SANTANA, H. *et al.* Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 133-140, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.075>>. Acesso em: 07 jun. 2022.

SHEEHAN, J. *et al.* A look back at the US Department of Energy's aquatic species program: biodiesel from algae. **National Renewable Energy Laboratory**, v. 328, p. 1-294, 1998. Disponível em: <<https://doi.org/10.2172/15003040>>. Acesso em: 01 jun. 2022.

SILVA, D. L. B. **Produção de proteína da microalga *Haematococcus pluvialis* cultivada em diferentes meios de cultura**. f. 51. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2020. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/vtt-218126>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

SIMÃO, B. L. **Pirólise de *Spirulina maxima*: valores de energia de ativação e catálise in-situ aumentando a seletividade para hidrocarbonetos aromáticos**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia/UFU, Uberlândia, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/28333>>. Acesso em: 25 jun. 2022.

SLOCOMBE, S. P. *et al.* A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 51-57, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.163>>. Acesso em: 15 jun. 2022.

SOARES, H. *et al.* **Comparação de metodologias para determinação de n-total em tecido vegetal**. In: XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX, 2013. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/2013/cd/resumos/R0393-1.pdf>>. Acesso em: 13 jun. 2022.

SOARES, L. S. **Revisão teórica: cultivo de microalgas para a produção de carotenoides**. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2021. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/216523>>. Acesso em: 21 mai. 2022.

SPÍNOLA, M. P. F. **Novos Ingredientes na Alimentação de Cães-O Potencial das Microalgas**. 42 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Porto, 2021. Disponível em: <<https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/133050/2/448906.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2022.

SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1263/jbb.101.87>>. Acesso em: 16 jun. 2022.

SU, Y. *et al.* Progress of microalgae biofuel's commercialization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, p. 402-411, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.078>>. Acesso em: 19 jun. 2022.

TELES, V. C. **Caracterização da biomassa das microalgas *Micractinium sp.* e *Chlamydomonas biconvexa* cultivadas em vinhaça e CO₂ para aplicações biotecnológicas**. 64f. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 2016. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/142849/1/Dissertacao-Orientador-Bruno-Brasil-Valerya-Teles-2016.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2022.

TEMPLETON, D. W., LAURENS, L. M. Nitrogen-to-protein conversion factors revisited for applications of microalgal biomass conversion to food, feed and fuel. **Algal Research**, v. 11, p. 359-367, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.07.013>>. Acesso em: 02 jul. 2022.

THERMO SCIENTIFIC. **Pierce protein Assay technical handboook**. Version 2, 2010. Disponível em: <<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602063-Protein-Assay-Handbook.pdf>>. Acesso em: 18 jul. 2022.

TOKUŞOĞLU, Ö., ÜUNAL, 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, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09615.x>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

TORRES, H. S., CASSINI, S. T. A., GONÇALVES, R. F. **Isolamento, sobrevivência e caracterização da biomassa de microalgas cultivadas em efluente de tratamento de esgoto sanitário visando a produção de biocombustíveis**. IX Simpósio Internacional de Qualidade Ambiental, Porto Alegre: ABES, 2014. Disponível em: <<https://silo.tips/download/isolation-survival-and-characterization-of-biomass-microalgae-cultured-in-wastew>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

UNITED NATIONS. Revision of World Population Prospects, **United Nations**. v. 1, n. 6042, p. 587-92, 2015. Disponível em: <<https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/keyfindingswpp2015.pdf>>. Acesso em: 22 jul. 2022.

VAN DER SPIEGEL, M., NOORDAM, M., VAN DER FELLS-KLERX, H. J. Safety of novel protein sources (insects, microalgae, seaweed, duckweed, and rapeseed) and legislative aspects for their application in food and feed production. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 6, p. 662-678, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12032>>. Acesso em: 05 jun. 2022.

VELP SCIENTIFICA. Nota de aplicação: **Determinação de Nitrogênio/Proteína em Queijos de acordo com o método de Kjeldahl**, 2014. Disponível em: <https://lobov.com.br/paginas/noticias_pdf/Determinacao_de_Nitrogenio.pdf> Acesso em: 05 jun. 2022.

VIEIRA, A. F. **Metodologias para determinação de nitrogênio**. Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, v. 8, n. 2. 2016. Disponível em: <<http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/view/18314>>. Acesso em: 19 mai. 2022.

WAGHMARE, A. G. *et al.* Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 3, n. 1, p. 1-11, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40643-016-0094-8>>. Acesso em: 19 jun. 2022.

WALKER, J., WILSON, K. Protein Structure, Purification, Characterisation and Function Analysis. In **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**, edited by Keith Wilson and John Walker, 7th ed., 300–351, 2010. Cambridge: Cambridge University Press.

WELLS, M. L. *et al.* Algae as Nutritional and Functional Food Sources: Revisiting Our Understanding. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 2, p. 949-982, 2017. Disponível em: <[doi:10.1007/s10811-016-0974-5](https://doi.org/10.1007/s10811-016-0974-5)>. Acesso em: 07 jun. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Nitrogen and protein content measurement and nitrogen to protein conversion factors for dairy and soy protein-based foods: a systematic review and modelling analysis. p. 83, Geneva, **World Health Organization**, 2019. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/331206>>. Acesso em: 18 mai. 2022.

YEH, K. L., CHANG, J. S., CHEN, W. M. Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, n. 3, p. 201-208, 2010. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1002/elsc.200900116>>. Acesso em: 11 ago. 2022.

ZAIA, D. A. M., ZAIA, C. T. B. V., LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, 21(6), 787–793, 1998. Disponível em: <[doi:10.1590/s0100-40421998000600020](https://doi.org/10.1590/s0100-40421998000600020)>. Acesso em: 14 jun. 2022.