

Producción de pigmentos naturales (clorofila-*a*) en biorrefinerías agroindustriales

Producing natural pigments (chlorophyll-*a*) in agroindustrial bio-refineries

Nivia Streit¹, ^oLuis Guillermo Ramírez Mérida², Leila Queiroz Zepka³, Eduardo Jacob-Lopes³, María Queiroz¹

¹Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química y Alimentos Programa de Pós-graduação em Engenharia y Ciencia de Alimentos. Laboratorio de Biotecnología. Rio Grande, RS, Brasil. nivias@mail.ufsm.br; queirozmariaisabel@gmail.com

²Universidade de Carabobo. Centro de Biotecnología Aplicada, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Avenida Universidad, Naganagua, Estado Carabobo. Código postal 2002. Valencia, Venezuela.

^oluisguillermolgrm@hotmail.com; lgramire@uc.edu.ve

³Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Santa Maria, RS, Brasil. zepkaleila@yahoo.com.br; jacoblopes@pq.cnpq.br

Resumen

El objetivo del trabajo fue evaluar la producción de clorofila-*a* por *Aphanothece microscópica Nägeli* a partir de efluentes de procesamiento de productos lácteos dentro del ámbito de una biorrefinería. Los experimentos se realizaron en biorreactores mediante cultivo heterotrófico en condiciones de pH 7.60, temperatura de 20° C y aireación continua de 1 VVM. A partir de un diseño experimental 2³ se evaluó las variables concentración de inóculo (100, 200 e 300 mg L⁻¹), relación carbono/nitrógeno (C/N) (20, 40 y 60) y relación nitrógeno/fósforo (N/P) (5, 10 y 15). Los resultados obtenidos demostraron el efecto de las variables en estudio para la producción de clorofila-*a*, indicando la posibilidad de producir hasta 4765.5 µg_{clorofila-a} L⁻¹d⁻¹. Esta producción se basó en la conversión de los contaminantes presentes en las aguas residuales, donde se evidenció la conversión de 96.90% de materia orgánica, 73.5% de nitrógeno total y 89.80% de fósforo total del efluente.

Palabras claves: biorrefinería, clorofila, materia orgánica, efluentes, microalga, pigmentos naturales.

Abstract

The aim of this work was to evaluate chlorophyll-*a* production by *Aphanothece microscópica Nägeli* from dairy processing wastewater in the context of a bio-refinery. The experiments were conducted in bioreactors through heterotrophic culture, in conditions of 7.60 pH, 20°C temperature, and 1 VVM continuous aeration. Variables initial inoculum (100, 200 and 300 mg L⁻¹), C/N ratio (20, 40 e 60) and N/P ratio (5, 10 e 15) were evaluated through a 2³ experimental design. The results demonstrated the effect of the variables in study on chlorophyll-*a* production, as well as the possibility of producing up to 4746.50 µg_{clorofila-a} L⁻¹ d⁻¹. This productivity was supported by the conversion of the pollutants present in the wastewater, where the conversion of 96.90% of organic matter, 73.50% of total nitrogen and 89.80% of total phosphorus was evidenced.

Key words: bio-refinery, chlorophyll, microalgae, natural pigments, organic matter, wastewater.

Introducción

En los últimos años se ha generado gran interés en desarrollar tecnologías para la producción de compuestos naturales que presenten un efecto bioactivo. Una cantidad considerable de información sobre diversidad de estructuras con propiedades biológicas es generada por grupos académicos e industriales en todo el mundo. Sin embargo, la producción industrial de estas moléculas es un proceso lento y costoso, lo que refleja el hecho de que sólo un porcentaje muy bajo de los compuestos investigados se pueda aprovechar para explotar en un proceso industrial (Orchad *et al.*, 2011).

El uso de procesos para la producción de sistemas basados en el empleo de recursos renovables, es una alternativa viable para la producción de compuestos bioactivos en la fabricación a escala industrial; de esta forma cuando los insumos y/o productos finales se obtienen a partir de fuentes renovables, se establece el concepto de biorrefinerías (Rodsrud *et al.*, 2012). La biorrefinería es un concepto de producción basado en el desarrollo sostenible. En este sentido, las biorrefinerías son sistemas que combinan las tecnologías necesarias desde la concepción, la explotación del material biológico (biomasa) y la producción de insumos industriales intermedios y finales, esto se consigue utilizando una combinación sinérgica de conversiones biológicas, físicas y químicas (Kamm y Kamm, 2004; Jacob-Lopes *et al.*, 2015). Una vez purificado, nuevos productos y coproductos se pueden comercializar o utilizar en la propia industria. Este nuevo enfoque de producción se puede resumir en un solo propósito, donde la materia prima junto con un proceso tecnológico resulta en diversos productos (Lyndt, 1999).

Por esta razón, la biomasa microbiana representa una fuente interesante de recursos renovables para la producción de compuestos con valor añadido por parte de fabricantes industriales. La biomasa de microalgas es una fuente de compuestos biológicamente activos, tales como clorofilas, carotenoides, ficobilinas, ácidos grasos poliinsaturados y compuestos fenólicos los cuales han sido estudiados con el objetivo de ser utilizados como productos intermedios y finales en procesos relacionados con la producción de compuestos bioactivos (Jacob-Lopes *et al.*, 2007; Zepka *et al.*, 2010; Queiroz *et al.*, 2011; Queiroz *et al.*, 2013).

Los pigmentos naturales son biomoléculas presentes en la biomasa de microalgas. Además del carotenoide y ficobilinas, las clorofilas son moléculas que se producen de forma integral en estos microorganismos. Según Becker (1994), la clorofila corresponde con el 0.50 a 1.50% en peso seco de la biomasa microalgal. Químicamente, la molécula de clorofila no es aislada,

pero comprende una familia de sustancias similares el uno al otro, designado como clorofila *a*, *b*, *c*, *d* y *e*. Desde un punto de vista estructural, son moléculas complejas que pertenecen a la clase de las porfirinas, formado por cuatro anillos de pirrol y un quinto anillo isocíclico situado al lado del tercer anillo pirrol. Los anillos están interconectados por puentes metilénicos y la molécula contiene un átomo de magnesio en su interior. En el cuarto anillo de pirrol, el ácido propiónico allí presente, se esterifica por un alcohol acíclico de cadena larga, generalmente un fitol que le confiere un carácter hidrófobo a la clorofila (Gross, 1991).

La clorofila-*a* (C₅₅H₇₂MgN₄O₅) es la estructura más abundante e importante de la familia, corresponde aproximadamente al 75% de los pigmentos verdes encontrados en la naturaleza. Esta molécula se utiliza actualmente como colorante natural en las industrias farmacéuticas y de alimentos, además de estar relacionado con las propiedades nutracéuticas y actividades aplicadas a la promoción de la salud tales como anti-inflamatorio, antioxidantes, profilácticos, integridad de tejidos, retraso del envejecimiento, antiagregante y vasoconstrictor plaquetario (Ramírez-Mérida *et al.*, 2014). Algunos estudios muestran la reducción en el riesgo de cáncer asociado con el consumo de dietas con clorofila-*a* (Balder *et al.*, 2006), lo que hace de esta molécula un aditivo importante para su uso como un ingrediente en las formulaciones comerciales de alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos. El sistema internacional de numeración para los aditivos alimentarios clasifica a la clorofila por el INS 140 (E-140), con índice de color CI 75810 (Codex Alimentarius, 2013).

La alta carga de material orgánico presente en los efluentes de la industria láctica, sugiere el empleo de procesos fisicoquímicos que resultan altamente costosos para la empresa. El tratamiento biológico con microalgas, se presenta como una alternativa para el tratamiento de estos residuos debido a la remoción de nutrientes y metales pesados, como una solución a los problemas de contaminación y eutroficación ocasionados por las descargas. Esto proporciona ventajas como el mejoramiento de la calidad del efluente, mediante un mecanismo de bajo costo energético, así como el aprovechamiento de nutrientes, que están siendo desechados, al ser incorporados a la biomasa, con la consecuente producción y generación de oxígeno, y elaboración de compuestos con valor añadido, como los pigmentos. En vista de esto, el objetivo del estudio fue evaluar la producción de clorofila-*a* mediante *Aphanothece microscópica Nāgeli* a partir de un efluente de procesamiento de productos lácteos dentro del ámbito de una biorrefinería.

Materiales y métodos

Microorganismo y condiciones de cultivo

Se utilizó la cepa de *Aphanothece microscópica Nágeli* (RSMAN92), originalmente aislada de la Laguna de los Patos en el estado de Rio Grande do Sul, Brasil (32° 01'S - 52° 05'W). Los cultivos se propagaron y se mantuvieron en medio BGN sintético (Ripka *et al.*, 1979). Las condiciones de mantenimiento utilizados fueron 25 °C, 15 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa y fotoperíodo de 12 h.

Medio de cultivo

Se utilizó como medio de cultivo, el efluente de procesamiento de productos lácteos procedente del tanque de equalización de sistema de una industria ubicada en Pelotas, RS, Brasil. Las muestras fueron recolectadas por un período de 12 meses, y se caracterizaron en cuanto a pH, demanda química de oxígeno (DQO), nitrógeno total (NTK), fósforo total (PO_4^{-3}), sólidos totales (ST), sólidos fijos (SF), sólidos volátiles (VS), relación carbono/nitrógeno (C/N) y la relación nitrógeno/fósforo (N/P) (Cuadro 1), de acuerdo con la metodología propuesta por APHA (2005). Las razones C/N y N/P se determinaron a partir de las concentraciones de DQO, NTK y PO_4^{-3} .

Cuadro 1. Caracterización del agua residual procedente del procesamiento de productos lácteos

Parámetros	Media \pm Desviación Estándar
Potencial Hidrogeniónico	9.40 \pm 0.13
Demanda Química de Oxígeno	1478.30 \pm 810.10
Nitrógeno Total Kjeldahl	32.01 \pm 14.60
Fósforo Total	23.01 \pm 0.84
Sólidos Totales	2608.30 \pm 602.50
Sólidos Fijos	1290.40 \pm 731.60
Sólidos Volátiles	1317.90 \pm 618.10

Biorreactor

El dispositivo experimental consistió en un biorreactor de columna de burbujas trabajando bajo sistema heterotrófico, construida en PVC 4 mm de espesor, 100 mm de diámetro interno, 1000 mm de altura y 5 L de volumen de trabajo. El sistema de dispersión de gas en el biorreactor consistía en un difusor de aire de 15 mm situado en la parte inferior de la columna. El tiempo de mezcla del biorreactor fue 5s y un KLa de 0.002 s^{-1} .

Condiciones de operación

Los cultivos se realizaron en un biorreactor que operaba por lotes, con un volumen de trabajo de 5 L de efluente, el pH inicial se ajustó a 7.60, temperatura de 20 °C, ausencia de luz y aireación continua de 1 VVM. La optimización de la producción de clorofila-a se llevó a cabo por medio de un diseño factorial 2^3 , con tres repeticiones en el punto central, teniendo en cuenta la influencia de las variables: concentración inicial de inóculo (100, 200 y 300 mg L^{-1}), relación C/N (20, 40 y 60) y la relación de N/P (5, 10 y 15). La concentración celular y las concentraciones de DQO, TKN y PO_4^{-3} fueron monitoreadas cada 4 h evidenciando así la fase de crecimiento exponencial del microorganismo. Una vez entrada en fase estacionaria del crecimiento celular, se midieron las concentraciones de clorofila-a en la biomasa.

Métodos analíticos

Concentración celular. La concentración de células se determinó mediante gravimetría, para lo cual se filtró un volumen conocido de medio de cultivo a través de un filtro Whatman de 0.45 μm (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y llevado a 60 °C hasta alcanzar peso constante.

Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO). La concentración de DQO fue determinada mediante el método colorimétrico de reflujo cerrado 5520 D empleando un espectrofotómetro Modelos Q798U (Spectrum Instrumens CO., LTD, China), recomendado por el “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (APHA, 2005).

Determinación de nitrógeno total (NTK). Se realizó por el método semi micro Kjeldahl 4500-NorgC recomendado por el “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (APHA, 2005).

Determinación de fósforo total (PO_4^{-3}). La concentración de fósforo total fue determinada mediante método colorimétrico empleando un espectrofotómetro Modelos Q798U (Spectrum Instrumens CO., LTD, Shanghai, China), recomendado por el “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (APHA, 2005).

Determinación de la clorofila-a. La clorofila-a fue extraída con acetona en un mortero, seguido de centrifugación (Hitachi, Tokio, Japón) durante 10 min a 20000 rpm. El procedimiento de extracción se repitió hasta que el sobrenadante quedó incoloro. El extracto

se fraccionó en una mezcla de éter de petróleo/éter dietílico [1:1 (v/v)], y la acetona se eliminó por lavado con agua destilada. El extracto se concentró en rotoevaporador modelo R-220 SE (BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Suiza) a una temperatura de menos 30 °C, luego fue lavado abundantemente con N₂ y se mantuvo a -37 °C en la oscuridad. La determinación de la concentración total de clorofila-*a* en el extracto se determinó espectrofotométricamente (Spectrum Instrumens CO., LTD, Shanghái, China) y fue calculada de acuerdo a lo estipulado por Porra, Thompson y Kriedemann (1989).

Todos los reactivos utilizados en las determinaciones descritas, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Resultados y discusión

La producción de pigmentos a partir de biomasa de microalgas depende de varios factores físicoquímicos que dirigen la síntesis de estas biomoléculas. Sin embargo, se debe considerar que independientemente de esos factores, la clorofila-*a* es un bioproducto de naturaleza intracelular y por lo tanto, la productividad global del pigmento viene hacer el producto entre el contenido de clorofila-*a* de la célula y la productividad en biomasa. De esta forma, el rendimiento de biomasa es un criterio principal para la obtención de pigmentos microbianos. El Cuadro 2 muestra los valores de la producción y el rendimiento de la clorofila-*a* a partir de cultivos bajo diferentes condiciones de concentración

de inóculo, relación C/N y relación N/P de acuerdo con el diseño experimental. Se observa a partir del análisis de datos una variabilidad pronunciada en el contenido de clorofila-*a* en biomasa de acuerdo con los factores evaluados. Se obtuvo un rendimiento máximo de 653.20 $\mu\text{g}_{\text{clorofila-}a} \text{g}_{\text{biomasa}}^{-1}$, con productividades de 4746.50 $\mu\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$ en concentraciones de inóculo inicial de 200 mg L^{-1} y con relaciones C/N de 20 y N/P de 10.

La Figura 1 muestra el resultado de los efectos y las interacciones entre los factores de concentración inicial del inóculo, relación C/N y relación N/P, y los coeficientes del modelo de predicción. El análisis de los resultados indica que todos los factores evaluados influyen de manera aislada ($p < 0.05$) en la producción y la productividad de la clorofila-*a*, además del efecto combinado entre las interacciones de los factores.

La figura 2, muestra las curvas de contorno de la variación de producción y productividad del pigmento en función de los factores estudiados. La relación N/P fue la variable con el efecto más pronunciado en la producción de clorofila-*a*, mientras que el rendimiento de la clorofila-*a* fue fuertemente influenciado por la relación C/N y la relación N/P. Según Jacob-Lopes *et al.* (2013), la disponibilidad de nutrientes (carbono orgánico, nitrógeno y fósforo) en el cultivo heterotrófico de microalgas es el factor principal para el control del bioproceso. Aunque existen condiciones específicas en que estas relaciones favorecen el máximo rendimiento, existen rangos relativamente amplios donde el rendimiento de biorreactores de cultivos heterotróficos de microalgas, se mantiene cerca al rango óptimo.

En este sentido, la ecuación 1-2 muestran los

Cuadro 2. Producción y productividad de clorofila-*a* en función de la concentración inicial de inóculo (X), relación C/N y relación N/P

X (mg L ⁻¹)	C/N	N/P	Producción ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Productividad ($\mu\text{g L}^{-1}\cdot\text{d}$)
100	40	5	349.31±1.90	342.03±3.01
300	40	5	404.73±2.26	431.24±7.76
100	60	5	242.52±2.97	27.94±0.55
300	60	5	487.90±1.84	1944.27±27.21
100	40	15	202.34±2.97	138.08±2.20
300	40	15	398.21±1.55	145.26±2.61
100	60	15	178.92±2.83	58.60±0.93
300	60	15	256.71±2.05	308.04±7.70
200	20	10	653.20±2.12	4746.30±90.17
200	20	10	653.42±0.64	4747.76±91.03
200	20	10	653.10±0.78	4745.58±91.20

X: concentración celular; C/N: relación carbono y nitrógeno; N/P: relación nitrógeno y fósforo

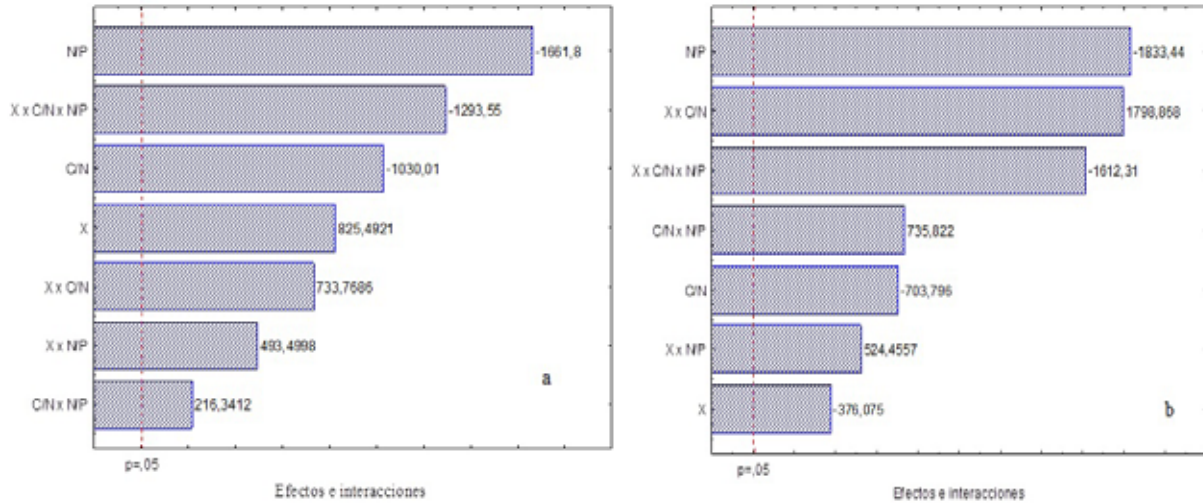


Figura 1. Análisis del efecto de los factores de concentración de inóculo (X_1), relación C/N (X_2) e relación N/P (X_3) en la producción (a) y productividad de clorofila-a (b)

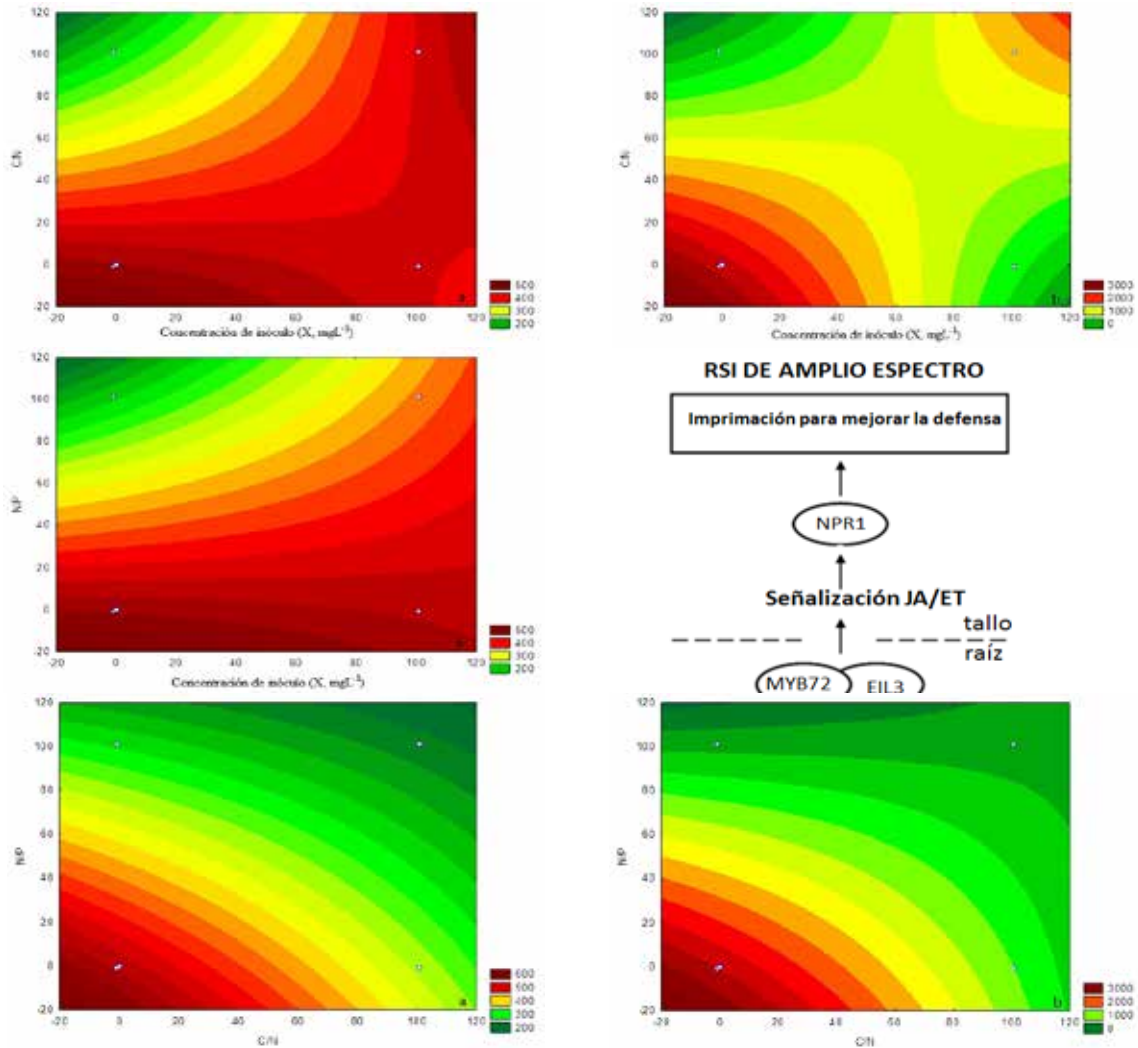


Figura 2. Diagramas de contorno para producción (a) y productividad (b) de clorofila-a

modelos estadísticos para la predicción de la producción donde $R^2 = 0.9814$ y la productividad con $R^2 = 0.9502$ de clorofila-*a* a partir de *Aphanothece microscópica Nægeli* en los efluentes de procesamiento lácteos.

$$Y_{Producción} = 345.00 + 42.40X_1 - 53.90X_2 - 85.40X_3 + 37.70X_1X_2 + 25.40X_1X_3 + 11.10X_2X_3 - 66.90X_1X_2X_3 \quad (1)$$

$$Y_{Productividad} = 856.20 - 140.50X_1 - 263.00X_2 + 685.20X_3 + 673.70X_1X_2 + 196.40X_1X_3 + 275.50X_2X_3 - 605.00X_1X_2X_3 \quad (2)$$

La validez de los modelos se estimó mediante distribuciones F, que sugiere una relación lineal entre las variables y muestra el ajuste del modelo a los datos experimentales. En este sentido, a partir de condiciones optimizadas es posible estimar mediante el análisis de sensibilidad la producción anual de clorofila-*a* en industrias de diferentes capacidades productivas. El análisis de los datos del Cuadro 3 muestra la posibilidad de producción de 4.92, 49.15 y 491.52_{clorofila-a} año⁻¹; si consideramos como base una industria de pequeño (100 m³d⁻¹), mediano (1000 m³d⁻¹) y gran porte (10000 m³d⁻¹), respectivamente. Daneshkhah y Bedford (2013), señalan que los análisis de sensibilidad son herramientas de gran importancia en la predicción de la incertidumbre que las variables de entrada de un proceso pueden causar en el resultado final. Según estos autores, este tipo de enfoque puede ayudar a definir la mejor estrategia a tomar en cuenta para viabilizar desde el punto de vista técnico/económico un proceso o producto.

La clorofila-*a* es una biomolécula con propiedades bioactivas de amplio uso en la industria farmacéutica y de alimentos. Se considera un compuesto de alto valor agregado, que dependiendo del grado de pureza de la molécula, puede alcanzar valores en el mercado de hasta USD\$ 250.00 mg⁻¹, teniendo en cuenta el pigmento obtenido por la microalga *Anacystis nidulans* con pureza cromatográfica (Sigma-Aldrich, 2013). Además, la clorofila-*a*, de calidad alimentaria (98% de pureza) obtenida de la espinaca se vende internacionalmente por valores que van desde USD\$ 100.00 kg⁻¹.

Estas cifras muestran que independientemente de la capacidad instalada en la industria, existe la posibilidad

Cuadro 3. Análisis sensitivo de producción de clorofila-*a* para diferentes capacidades industriales

Dimensión Industrial	Velocidad de flujo (m ³ d ⁻¹)	Producción anual (t año ⁻¹)
Pequeño	100	4.92
Medio	1000	49.15
Grande	10000	491.52

de generar valor agregado en la cadena productiva global de la leche, pudiendo bajo ciertas circunstancias convertirse en una actividad económicamente atractiva para la industria mediante la generación de co-productos asociados al proceso principal.

Este proceso se puede considerar una ruta tecnológica con alta potencialidad para la producción de pigmentos naturales. Sin embargo, la viabilidad como aditivo alimentario requiere exhaustivos procesos de desinfección y purificación antes de la liberación del producto final para consumo (Zepka *et al.*, 2010). La Food and Drug Administration (FDA) establece directrices específicas para el uso de microorganismos y sus subproductos en la alimentación humana y animal, haciendo énfasis en la necesidad de un control de calidad riguroso a fin de evitar contaminación o deterioro durante el proceso (FDA, 2013).

La aplicación de biorreactores con cultivos heterotróficos de microalgas para el tratamiento de efluentes de procesamiento de productos lácteos mostró una eficiencia de remoción de 96.90, 73.50 y 89.80% de materia orgánica, nitrógeno total y fósforo total respectivamente Cuadro 4. La alta eficiencia en la remoción de DQO se puede explicar debido a que algunas especies de microalgas que crecen con metabolismo heterotrófico, asimilan los compuestos orgánicos inmediatamente que pasan a la oscuridad (Queiroz *et al.*, 2013).

Varios autores han mostrado que existe una gran reducción en la DQO con baja conversión de biomasa cuando el consumo de moléculas simples, tales como acetato, glucosa y ácidos orgánicos ocurre en ausencia de luz (Francisco *et al.*, 2015; Vieira *et al.*, 2012). Esto sugiere la existencia de un metabolismo microalgal capaz de proporcionar un crecimiento lento en la oscuridad, lo que explica la gran remoción de DQO, aunque con baja conversión de biomasa

La eliminación sustancial de nutrientes evidenciados en el proceso, es una característica del metabolismo de las microalgas heterótrofas que convierte simultáneamente estos contaminantes en un único biorreactor, provocando alivio en el tratamiento terciario de aguas residuales. Además, la capacidad de producir bioproductos

Cuadro 4. Parámetros cinéticos de remoción de contaminantes del efluente

Parámetro	C ₀ (mg L ⁻¹)	C (mg L ⁻¹)	ER (%)
DQO	1478.30	45.82	96.90
NTK	32.01	8.48	73.50
PO ₄ ⁻³	23.03	2.34	89.80

C₀: concentración inicial, C: concentración final, ER: eficiencia de remoción

fundamentados en residuos resultantes del procesamiento industrial.

La eliminación de nitrógeno en el biorreactor de microalgas heterótrofa, sin embargo, no se puede atribuir exclusivamente a la bioconversión de nitrógeno. Existen otros mecanismos no biológicos que son capaces de eliminar nitrógeno en sistemas de microalgas, tales como arrastre con aire, volatilización de amoníaco, absorción, y sedimentación (Queiroz *et al.*, 2007). Por otra parte, la eliminación de fósforo en estos sistemas está relacionado con la absorción por microalgas, precipitación química y biosorción por biomasa de microalgas (Vieira *et al.*, 2012).

Conclusiones

La producción de clorofila-a por *A. microscópica Nägeli* a partir del efluente de procesamiento de lácteos está controlada por factores de concentración inicial de inóculo, relación C/N y relación N/P. En condiciones óptimas (concentraciones de inóculo inicial de 200 mg L⁻¹, relaciones C/N de 20 y P/N de 10) es posible producir hasta 653.20 μg_{clorofila-a} g_{biomasa}⁻¹ en paralelo a 4746.50 μg_{clorofila-a} L⁻¹ d⁻¹. El análisis de sensibilidad demostró que la producción sustancial de esta biomolécula se puede obtener a partir de residuos de industrias de procesamiento de lácteos, con valores que pueden alcanzar 491.52 μg_{clorofila-a} año⁻¹ en industria de gran escala (10000 m³ d⁻¹). Además de la producción de pigmentos, se observó conversiones de 96.90% (materia orgánica), 73.50% (nitrógeno total) y 89.80% (fósforo total) del efluente enmarcándolo dentro de los estándares requeridos por la ley. Por lo tanto, la aplicación del concepto de biorrefinería en este tipo de agroindustria, podría significar importantes oportunidades para el uso sostenible de los recursos. Siempre habrá conversión de contaminantes disueltos en las aguas residuales, contribuyendo a mejorar el medio ambiente durante el proceso productivo una vez que se dé la estabilización de los compuestos para la descarga en cuerpos de agua

Bibliografía

- APHA. 1998. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (20th Ed.). American Public Health Association, Washington, D.C.
- Balder, H.F., Vogel, J., Jansen, M.C., Weijenberg, M.P., Van Den Brandt, P.A., Westenbrink, S., Van Der Meer, R., and Goldbohm, R.A. 2006. Heme and chlorophyll intake and risk of colorectal cancer in the Netherlands cohort study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 15: 717-725.
- Becker, E.W. 1988. Micro-algae for human and animal consumption. In: Borowitzka, M.M., and L.J. Borowitzka (Ed.). *Micro-algal biotechnology*. Cambridge University Press, England p. 222-256.
- Daneshkhah, A., and Bedford, T. 2013. Probabilistic sensitivity analysis of system availability using Gaussian processes. *Reliability Engineering and System Safety* 112: 82-93.
- Ferruzi, M.G., and Blakeslee, J. 2007. Digestion, absorption, and cancer preventive activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*. 27: 1-12.
- Francisco E.C., Franco T.T., Zepka L.Q., Jacob-Lopes E. 2015. From waste-to-energy: the process integration and intensification for bulk oil and biodiesel production by microalgae. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 3: 482-487.
- Gross, J. 1991. *Pigments in vegetables, chlorophylls and carotenoids*. New York: Van Nostrand Reinhold.
- Jacob-Lopes, E., Queiroz, M.I., Ramírez-Mérida, L.G., and Zepka, L.Q. 2015. *Microalgal Biorefineries*. In: Jacob-Lopes and Queiroz (ed.) *Biomass Production and Uses*. Rijeka: InTech, pp 81-106.
- Jacob-Lopes, E., Santos, A.M. Rodrigues, D.B., Prudente, D., Souza, C., Lui, M.C.Y., and Zepka, L.Q. 2013. Bioprocesso de conversão simultânea de efluentes híbridos, bioprodutos, seus usos e biorreator heterotrófico. BRPI 10 2013 020471 4.
- Jacob-Lopes, E., Zepka, L.Q., Pinto, L.A.A., and Queiroz, M.I. 2007. Characteristics of thin-layer drying of the cyanobacterium *Aphanothece microscopic Nägeli*. *Chemical Engineering and Processing* 46: 63-69.
- Kamm, B., and Kamm, M. 2004. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64: 137-145.
- Lynd, L.R., Wyman C.E., and Gerngross, T.U. 1999. Biocommodity engineering. *Biotechnology Progress* 15: 777-793
- Orchard, S., Al-Lazikani, B., Bryant, S., Clark, D., Calder, E., Dix, I., Engkvist, O., Forster, M., Gaulton, A., Gilson, M., Glen, R., Grigorov, M., Hammond-Kosack, M., Harland, L., Hopkins, A., Larminie, C., Lynch, N., Mann, R., Murray-Rust, P., Lo-Piparo, E., Steinbeck, C., Henning, D., Overington, J., and Thornton, J. 2011. Minimum information about a bioactive entity (MIABE). *Nature Reviews Drug Discovery* 10: 661-669.
- Porra, R.J., Thompson, W.A., Kriedemann, P.E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: Verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy.

- Biochimica et Biophysica Acta, 975:384–394.
- Queiroz, M.I., Hornes, M.O., Silva-Manetti, A.G., Jacob-Lopes, E. 2011. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece* *microscopica* Nägeli cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. *Applied Energy* 88: 3438-3443.
- Queiroz, M.I., Jacob-Lopes, E., Zepka, L.Q., Bastos, R., Goldbeck, R. 2007. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. *Bioresource Technology* 98: 2163-2169.
- Queiroz, M.I., L.Q. Zepka, M. Hornes, A.G.S. Manetti, and E. Jacob-Lopes. 2013. Fish processing wastewater as a platform of the microalgal biorefineries. *Biosystems Engineering* 115:195-202
- Ramírez-Mérida, L.G., Zepka, Q.L. y Jacob-Lopes, E. 2014. Microalgas y cianobacterias Aplicación en Medicina. *Revista Electronica PortalesMedicos.com*. 9(4): 149.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M., and Stanier, R.Y. 1979. Generic Assignments Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *Journal of General Microbiology* 111:61.
- Rødsrud, G., Lersch, M., Sjöde, A. 2012. History and future of world's most advanced biorefinery in operation. *Biomass and Bioenergy* 46: 46-59.
- Vieira J.G., da Silva Manetti A.G., Jacob-Lopes E., Queiroz M.I. 2012. Uptake of phosphorus from dairy wastewater by heterotrophic cultures of cyanobacteria. *Desalination and Water Treatment* 40: 224–230.
- Zepka, L.Q., Jacob-Lopes, E., Goldbeck, R., Souza-Soares, L.A., Queiroz, M.I. 2010. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece* *microscopica* Nägeli. *Bioresource Technology* 101: 7107-7111.