

Síntesis, caracterización y actividad antioxidante *in vitro* de una metaloclorofila de sodio y zinc obtenida de la microalga marina *Dunaliella tertiolecta*

Synthesis, characterization and *in vitro* antioxidant activity of a sodium zinc metallo-chlorophyll obtained from the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta*.

Meza-Ayala, K.A.¹ , Valdez-Ortiz, A.¹ , Medina-Godoy, S.² , Valdez-Ortiz, R.³ ,
Garzón-Tiznado, J.A.¹ , Germán-Báez L.J.^{1*} 

¹ Programa Integral de Posgrado en Biotecnología. Universidad Autónoma de Sinaloa. Prolongación Josefa Ortiz de Domínguez S/N, Ciudad Universitaria 80010, Culiacán, Sinaloa, México.

² Departamento de Biotecnología Agrícola, Alimentos Funcionales. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa, IPN. Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes 250, Col. San Joachin 81101, Guasave, Sinaloa, México.

³ Servicio de Nefrología, Hospital General de México. Dr. Eduardo Liceaga, Dr. Balmis 148, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc 06726, Ciudad de México, México.

RESUMEN

La clorofila es inestable y susceptible a modificaciones durante el procesamiento industrial, lo que reduce su funcionalidad y valor comercial. Por ello, su conversión a derivados hidrosolubles y termoestables, denominados metaloclorofilas, permite su aprovechamiento comercial. En este trabajo se describe un proceso para obtener una metaloclorofila de sodio y zinc a partir de la microalga marina *Dunaliella tertiolecta*, una fuente más sustentable y rentable que los vegetales verdes tradicionalmente utilizados. El proceso consistió en tres etapas: hidrólisis alcalina de la clorofila, adición del ion metálico (Zn^{2+}) y conversión a sales de clorofilina. Las concentraciones óptimas de cada etapa fueron: etanol-NaOH (15 %), $ZnSO_4$ (30 %) y etanol-NaOH (5 %), respectivamente. El rendimiento de conversión a metaloclorofilina de sodio y zinc fue de 565 ± 2.3 mg/g de clorofila (57 %), mostrando solubilidad en agua de 94.66 ± 1.33 %. Mediante espectroscopía UV-VIS y FTIR, la metaloclorofila obtenida presentó máximos de absorción y bandas características de este tipo de compuestos. Además, mostró alta estabilidad térmica entre 40-60 °C, y moderada entre 70-90 °C, esto durante un amplio intervalo de tiempo (5-60 min). Finalmente, se determinó su capacidad antioxidante mediante los ensayos de DPPH, FRAP y ABTS, mostrando ABTS los valores más altos [44.402 ± 1.198 mmol TEAC/100 g (dw)], superando los valores reportados en alimentos considerados fuentes importantes de antioxidantes. Estos resultados respaldan el potencial de una metaloclorofila de sodio y zinc generada a partir de una fuente sustentable, como una microalga marina, como un compuesto bioactivo con potencial aplicación como ingrediente funcional.

PALABRAS CLAVE: Clorofila; metaloclorofila; compuesto bioactivo; antioxidante; microalga.



Please cite this article as/Como citar este artículo:

Meza-Ayala, K.A., Valdez-Ortiz, A., Medina-Godoy, S., Valdez-Ortiz, R., Garzón-Tiznado, J.A., Germán-Báez L.J. (2025). Synthesis, characterization and *in vitro* antioxidant activity of a sodium zinc metallo-chlorophyll obtained from the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Revista Bio Ciencias*, 13, e1800.
<https://doi.org/10.15741/revbio.13.e1800>

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: January 08th 2025.

Accepted/Aceptado: November 20th 2025.

Available on line/Publicado: November 15th 2025.

*Corresponding Author:

Lourdes Janeth Germán-Báez. Programa Integral de Posgrado en Biotecnología. Universidad Autónoma de Sinaloa. Prolongación Josefa Ortiz de Domínguez S/N, Ciudad Universitaria 80010, Culiacán, Sinaloa, México. Teléfono: (667) 126 8713.

E-mail: ljgerman@uas.edu.mx

ABSTRACT

Chlorophyll is unstable and prone to modifications during industrial processing, reducing its functionality and commercial value. Therefore, its conversion into water-soluble and thermally stable derivatives, called metallo-chlorophylls, allows for commercial exploitation. Here, a process is described for obtaining a sodium and zinc metallo-chlorophyll from the marine microalgae *Dunaliella tertiolecta*, a source with greater sustainability and profitability than traditionally used green vegetables. The process consisted of three stages: alkaline hydrolysis of chlorophyll, addition of the metal ion (Zn^{2+}), and conversion to chlorophyllin salts. The optimal concentrations for each stage were determined: ethanol-NaOH (15 %), $ZnSO_4$ (30 %), and ethanol-NaOH (5 %), respectively. The yield of sodium and zinc metallo-chlorophyll was 565 ± 2.3 mg/g of chlorophyll (57 %), exhibiting a water solubility of 94.66 ± 1.33 %. Through UV-VIS and FTIR spectroscopy, the metallo-chlorophyll obtained here showed absorption maxima and characteristic bands of metallo-chlorophylls. In addition, it exhibited high thermal stability (40-60 °C) to moderate (70-90 °C) over a wide range of time (5-60 min). Finally, its antioxidant capacity was determined by DPPH, FRAP and ABTS assays, showing the highest values through ABTS assay [44.402 ± 1.198 mmol TEAC/100 g (dw)], surpassing values reported in various foods considered important antioxidant sources. These results support the potential of sodium and zinc metallo-chlorophyll, generated from a sustainable source, such as marine microalgae, as a bioactive compound with potential application as a functional ingredient.

KEY WORDS : Chlorophyll; metallo-chlorophyll; bioactive compound; antioxidant; microalgae.

Introducción

La alta prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas, en conjunto con la persistencia de enfermedades infecciosas, y su estrecha relación con la dieta y el estilo de vida, ha despertado un creciente interés mundial por alimentos que no solo aporten una nutrición básica, sino que además promueven la salud. Por lo que, en las últimas décadas, se ha mantenido un interés sostenido en identificar y caracterizar nuevas fuentes alimenticias, suplementos e ingredientes que contengan compuestos bioactivos, es decir, moléculas que aporten un beneficio adicional para la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades (Barbulova *et al.*, 2015; Kussman *et al.*, 2023).

Los organismos marinos están entre las principales fuentes reconocidas como productores de compuestos bioactivos, debido a su amplia distribución y disponibilidad, dado que el 70 % de

la superficie terrestre está cubierta por agua, lo que representa un suministro garantizado de este recurso (Ezquerria-Brauer & Chan-Higuera, 2021). Dentro de este grupo, destacan las microalgas marinas, representando una fuente altamente sustentable, en principio, porque su cultivo no compite por suelos de uso agroalimentario, ni requiere agua dulce, lo cual resulta relevante, considerando que solo el 2.5 % del agua en la Tierra corresponde a agua dulce y la mayor parte no está disponible para consumo por encontrarse en glaciares, nieve o hielo (CONAGUA, 2019). Además, las condiciones de agua dulce representan un ambiente desfavorable para el mantenimiento de los cultivos celulares axénicos, requisito esencial para garantizar la calidad de los compuestos extraídos. Otra característica de interés en el cultivo de microalgas marinas es su eficiente asimilación de nutrientes, lo que permite una productividad elevada y sostenida durante todo el año. Asimismo, ciertas especies pueden cultivarse bajo condiciones extremas de estrés biótico y abiótico, lo que las convierte en fuentes naturales, prometedoras y prácticamente ilimitadas de compuestos bioactivos (Levasseur et al., 2020).

Dunaliella tertiolecta es una microalga marina que ha despertado gran interés comercial por su alta producción de compuestos bioactivos, como clorofilas, carotenoides, xantófilas y otros pigmentos con probadas propiedades antioxidantes, antihipertensivas, broncodilatadoras, hepatoprotectoras y diversas actividades biológicas (Medina-Félix et al., 2020; Bezerra-daSilva et al., 2021). Entre estos, la clorofila es el más abundante, representando hasta el 10 % de su peso seco, lo que la convierte en uno de los metabolitos de mayor valor comercial en esta especie. En particular, las características morfológicas y fisiológicas de *D. tertiolecta* ofrecen ventajas significativas para la extracción de clorofila en comparación con fuentes tradicionales como vegetales verdes como la espinaca, hojas de bambú, lechuga, brócoli, berro, y germinados de trigo y de alfalfa; o inclusive que microalgas de agua dulce como *Chlorella* y *Arthrospira*. A diferencia de estas fuentes, que requieren agua dulce y poseen estructuras celulares complejas que dificultan la extracción y purificación de clorofila, *D. tertiolecta* puede cultivarse en ambientes marinos y presenta una morfología unicelular simple, careciendo de paredes rígidas de celulosa, lo que facilita la obtención eficiente de clorofila de alta pureza mediante procesos de menor gasto energético y de insumos químicos (Santana-Moura et al., 2020; Martínez et al., 2022). Estas características posicionan a *D. tertiolecta* como una alternativa más sostenible, rentable y escalable frente a las fuentes tradicionales de clorofila, además de ofrecer un valor agregado mediante el aprovechamiento de subproductos de la biomasa microalgal en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmecéutica (Li et al., 2016; Norzagaray-Valenzuela et al., 2018).

Tradicionalmente, la clorofila se ha utilizado como colorante natural e ingrediente funcional en diversos alimentos y bebidas, representando un mercado global de 252.18 millones de dólares en 2021 (POLARIS, 2022). Sin embargo, en su forma natural, la molécula de clorofila es altamente fotosensible, insoluble en agua y sensible a cambios bruscos de pH (Kang et al., 2018; Martins et al., 2023). Para superar estas limitaciones, que reducen su viabilidad comercial, se han realizado numerosos esfuerzos para convertir la clorofila en derivados más estables y con mayor valor agregado, con alto potencial de aplicación industrial. Entre estos, destacan las metaloclorofilas, como la clorofilina de sodio y zinc (SZC). La SZC es estructuralmente similar a la clorofila natural, pero difiere en cuanto al grupo fitol que ha sido eliminado, y el ion central de magnesio que es reemplazado por zinc, un ion metálico más estable. Estas modificaciones estructurales confieren

a la SZC la capacidad de ser soluble en agua, así como la tolerancia a cambios bruscos de pH y estabilidad a altas temperaturas, sin afectar sus importantes propiedades biológicas. Cabe mencionar que las metaloclorofilas ya se explotan comercialmente, etiquetadas frecuentemente como “clorofila”, aunque en realidad corresponden a compuestos como clorofilina de cobre y sodio (SCC), sin embargo, la evidencia científica que aborde específicamente las propiedades fisicoquímicas y biológicas de estos compuestos, sigue siendo limitada. De hecho, no se han reportado estudios previos sobre su síntesis a partir de clorofila extraída de *D. tertiolecta* (Banu & Pavithra, 2017; Martins *et al.*, 2023). Esto resalta el interés científico en la SZC y la importancia de generar nuevos conocimientos sobre su potencial aplicación como ingrediente funcional.

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue establecer una metodología para obtener SZC a partir de clorofila extraída de la microalga marina *D. tertiolecta*, y confirmar su identidad química mediante espectroscopía UV-Vis y FTIR. Adicionalmente, se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas y capacidad antioxidante, para determinar el potencial de la SZC como compuesto bioactivo en el desarrollo de productos o suplementos nutricionales, nutraceuticos y cosmeceuticos. Este enfoque no solo incrementa el valor de las microalgas marinas como fuente de ingredientes funcionales, sino que se alinea con la creciente demanda del consumidor por alternativas innovadoras, sostenibles y naturales, con valor agregado en el cuidado de la salud.

Material y Métodos

Cepa microalgal y reactivos químicos

La microalga marina *Dunaliella tertiolecta* (cepa DUT2) fue obtenida del Centro Biotecnológico de Microalgas de México S.A. de C.V. (MICROCELL®) en Culiacán, Sinaloa, México. Todos los solventes empleados para la extracción de clorofila fueron de grado analítico. Los reactivos Trolox, NaOH, ZnSO₄, 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) y clorofilina de cobre y sodio (SCC), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

Cultivo microalgal y extracción de clorofila

El cultivo de *D. tertiolecta* se realizó en medio F/2 (Guillard & Ryther, 1962) a 25 °C, bajo aireación constante (1 % CO₂), e iluminación continua de 120–130 µmol fotones m⁻² s⁻¹. Para establecer el cultivo, se empleó la metodología de transferencias sucesivas, partiendo del aislamiento de una sola colonia (CFU) en medio sólido, la cual se inoculó en 10 mL de medio líquido F/2, incrementando progresivamente el volumen hasta alcanzar 16 L. Durante cada etapa del escalamiento, se realizaron conteos celulares para monitorear la viabilidad y densidad del cultivo (Norzagaray-Valenzuela *et al.*, 2018); lo que permitió determinar el día máximo de crecimiento exponencial, tiempo al cual se cosechó la biomasa, utilizando quitosano como floculante orgánico (Meza-Ayala, 2017). La clorofila fue extraída a partir de esta biomasa obtenida; para ello, debido a su naturaleza anfipática, el método de extracción consistió en obtener una fracción lipofílica, correspondiente a la mezcla de aceite-clorofila, metodología descrita por Germán-Báez

et al. (2017). Posteriormente, la fracción lipofílica recuperada se sometió a rotaevaporación (65 cmHg / 45 °C) hasta eliminar completamente los solventes, obteniendo así clorofila en estado sólido. La pureza del extracto se analizó mediante cromatografía en capa fina (datos no mostrados), para asegurar que la clorofila obtenida estuviera formada exclusivamente por diferentes tipos de clorofila y sus derivados.

Obtención de clorofilina de sodio y zinc (SZC)

El proceso de obtención de SZC a partir de la clorofila extraída, se dividió en tres etapas principales: (1) *hidrólisis alcalina de la clorofila*, para la cual se utilizó 1 g de clorofila microalgal con 20 mL de la mezcla etanol-NaOH a cuatro diferentes concentraciones (5.0, 7.5, 10.0 y 15.0 %), bajo agitación constante (350 rpm) a 25 °C durante toda la noche. La reacción se detuvo añadiendo acetona pura (1:1, v/v), seguido de centrifugación (Thermo Forma 1L GP Centrifuge) a $3600 \times g$ durante 30 min. El pellet resultante se resuspendió en acetona al 65 % y se centrifugó nuevamente ($3600 \times g$, 30 min) para recuperar el sobrenadante, el cual contenía las clorofilinas solubles en agua. En esta etapa, la variable de respuesta fue la solubilidad en agua de cada tratamiento. (2) *Incorporación del ion metálico*; las clorofilinas solubles en agua obtenidas previamente, fueron acidificadas con HCl 10 N hasta un pH de 2–3; posteriormente, se añadió ZnSO_4 a tres concentraciones (10, 20 y 30 %) y se agitó por inversión en un Varimix durante 20 min. Posteriormente, la mezcla fue colocada en un baño María a 60 °C durante 1 h, lo que indujo la formación de un precipitado insoluble de clorofilinas de zinc (Zn-Chl), las cuales fueron recuperadas por centrifugación ($3600 \times g$, 30 min). La variable de respuesta en esta etapa fue la cantidad de Zn incorporado a la molécula, determinada mediante espectroscopía de absorción atómica con flama (FAAS), utilizando una flama aire-acetileno (Shimadzu AA-6800 con autosampler ASC-6100). Las mediciones se realizaron a 213.9, 285.2 y 324.8 nm, empleando lámparas de cátodo hueco específicas para Zn, Mg y Cu, respectivamente; el tiempo de integración fue de 5 s y el flujo de gas de 1.8 L min^{-1} , de acuerdo a metodologías previamente reportadas para el análisis de metaloclorofilas y compuestos bioactivos relacionados (AOAC, 1999; Suzuki et al., 2016). La calibración se efectuó mediante una curva externa multipunto ($0.1\text{--}5.0 \text{ mg L}^{-1}$) preparada a partir de soluciones estándar certificadas, y el control de calidad incluyó blancos, muestras duplicadas y pruebas de recuperación por adición. (3) *Conversión a sales de clorofilinas*. Durante esta etapa, el precipitado de Zn-Chl se disolvió en etanol-NaOH a tres diferentes concentraciones (2.5, 5.0 y 10.0 %); el pH se ajustó a 11 con NaOH 1 N y la mezcla se incubó a 45 °C para eliminar los solventes, obteniéndose de esta forma SZC en polvo. Las variables de respuesta en esta etapa fueron color y solubilidad en agua de la SZC obtenida de cada tratamiento. Las concentraciones empleadas en cada una de las tres etapas se definieron con base en ensayos preliminares, los cuales fueron basados en estudios previos sobre hidrólisis alcalina de ésteres (Theodorou et al., 2007), y su aplicación en la transformación de ciertos pigmentos microalgales (Gómez-Luna, 2007), así como en protocolos de obtención de otros tipos de metaloclorofilas (Li et al., 2016). Para determinar el proceso óptimo de obtención de SZC, se seleccionó el mejor tratamiento de cada una de las etapas antes mencionadas, lo que permitió establecer una propuesta para la producción de SZC, y cuya combinación se empleó para generar SZC a partir de la clorofila extraída de *D. tertiolecta*. A partir del proceso optimizado, se preparó un lote de SZC utilizado para los análisis posteriores. La eficiencia del proceso se

evaluó mediante el cálculo del rendimiento de SZC (mg/g de clorofila), tomando como base el peso inicial de clorofila microalgal en peso seco (dw).

Caracterización por espectroscopía UV–Vis y FTIR

Se obtuvieron los espectros UV–Vis y FTIR de la SZC. Para el análisis UV–Vis, se empleó una solución acuosa de SZC (125 µg/mL) y se registraron lecturas de absorbancia en el rango de 200–800 nm, con una resolución de paso de 2 nm, utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific Biomate 3S. Para el análisis por FTIR (400–3900 cm⁻¹; resolución 2 cm⁻¹) se obtuvieron espectros de transmitancia a partir de 1 mg de SZC completamente seca, molida y tamizada, utilizando un espectrómetro Cary 660 FTIR/ATR con accesorio de reflectancia total atenuada (ATR), colocando la muestra pulverizada directamente sobre el cristal ATR (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Las muestras analizadas por ambos métodos, incluyeron SZC, clorofila natural extraída de *D. tertiolecta* (material de partida) y clorofilina de cobre y sodio (SCC) de Sigma–Aldrich, utilizada como estándar comercial; estas dos últimas, se incluyeron como controles de referencia, debido a sus perfiles espectrales bien documentados, los cuales respaldan el análisis cualitativo de la SZC al permitir la comparación de sus bandas características y patrones de absorción con datos reportados previamente. Cabe destacar que todas las mediciones y análisis espectrales de la SZC se realizaron utilizando muestras obtenidas bajo las condiciones experimentales descritas en este estudio, sin emplear estándares externos para calibración. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado y escaneadas en un mismo día, con el fin de evitar efectos asociados a la deriva instrumental.

Propiedades fisicoquímicas

Dentro de las propiedades sensoriales y fisicoquímicas de la SZC obtenida, se evaluaron color, textura, solubilidad en distintos solventes y estabilidad térmica. El color y la textura de la SZC en estado sólido, se determinaron según Singh *et al.* (2020), así como mediante unidades de absorbancia de una solución de SZC (125 µg/mL) a la longitud de onda de máxima absorción (405 nm) obtenida por análisis de su espectro UV–Vis, utilizando como referencia la norma NMX-AA-017-SCFI-2021. Para determinar la solubilidad de la SZC, se siguió la metodología reportada por Anchundia *et al.* (2016), para ello, se disolvieron 5 mg de SZC en 5 mL del solvente a evaluar (acetona, cloroformo, etanol y agua), todas las muestras fueron homogeneizadas usando un Varimix por 30 min, y centrifugadas a 25 °C/3500 x g/15 min. Posteriormente, se recuperó el sobrenadante, y los pellets resultantes se colocaron en una incubadora a 60 °C por 24 h. Para el análisis, se determinó el peso de los sólidos obtenidos tras el secado de los pellets de cada tratamiento y se calculó el porcentaje de solubilidad. El análisis de la estabilidad térmica de la SZC a altas temperaturas, se evaluó según Ferruzzi y Schwartz (2005) empleando una solución acuosa de SZC a una concentración de 125 µg/mL, la cual fue sometida a temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 °C a diferentes tiempos (5, 15, 30, 45 y 60 min). Finalmente, se midieron las absorbancias en cada tratamiento a 635 nm y se calculó el porcentaje de degradación mediante la ecuación reportada por Singh *et al.* (2020).

Evaluación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante *in vitro* de la SZC se determinó mediante los ensayos DPPH, ABTS y FRAP, siguiendo la metodología propuesta por Martínez-Montaña *et al.* (2022). En cada ensayo, se obtuvo una curva estándar de Trolox, los resultados fueron calculados por regresión lineal y se expresaron como milimoles equivalentes de Trolox por 100 g de SZC en base seca [mmol TE/100 g (dw)].

Análisis estadístico

Los datos de cada parámetro evaluado se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), y las medias se compararon mediante la prueba de Fisher (LSD, $\alpha = 0.05$) usando el programa STATGRAPHICS Centurion XVI (Statpoint, Inc., Warrenton, Virginia). Previo al ANOVA, se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante inspección visual de los gráficos de residuos y de la distribución de varianzas proporcionados por el software, los cuales indicaron residuos con distribución normal y varianzas homogéneas entre grupos. Todos los tratamientos y evaluaciones se realizaron por triplicado.

Resultados y Discusión

Obtención de clorofilina de sodio y zinc (SZC)

Mediante la metodología aquí descrita, se extrajeron 10.64 g (dw) de clorofila, a partir de 56 g (dw) de biomasa completa de *D. tertiolecta*, lo que representa un rendimiento del 19 %, el cual es ligeramente inferior al 25 % de rendimiento reportado por Li *et al.* (2016) para la clorofila obtenida a partir de biomasa completa de *Scenedesmus* sp; no obstante, además de las diferencias propias debidas a las características propias a la especie y condiciones de cultivo, es importante destacar que dichos autores emplearon cromatografía en columna para la extracción, un método que, aunque puede ser más eficiente que la extracción con solventes orgánicos, utilizada en el presente estudio, también es más costoso, laborioso y requiere mayor tiempo de ejecución; además de que *Scenedesmus* sp. es una microalga de agua dulce, por lo que su cultivo compite directamente por los recursos hídricos destinados al consumo humano. En este sentido, el rendimiento obtenido en este estudio sugiere que *D. tertiolecta* es una fuente de clorofila con alto potencial de escalabilidad bajo un modelo de producción sostenible basado en el empleo de agua salina.

Con la finalidad de realizar un análisis comparativo entre el rendimiento de extracción de clorofila obtenido a partir del modelo microalgal empleado aquí (19%), y el cultivo de espinaca, considerada la fuente vegetal tradicional de clorofila de mayor impacto comercial, y más comúnmente empleado para satisfacer la demanda del mercado; tomamos en cuenta lo reportado por Heras-Cervantes (2006), quien obtuvo 10 g (dw) de clorofila a partir de 52 g (dw) de hojas de espinaca, lo que equivale a un rendimiento del 19.2 %, revelando que ambos modelos exhibieron

rendimientos similares. No obstante, debe tomarse en cuenta que el costo de producción de 52 g de hojas deshidratadas de espinaca es considerablemente más alto que el requerido para producir la misma cantidad de biomasa de *D. tertiolecta*. Según el reporte de la CCB (2015), el número de plantas necesarias para obtener dicha cantidad de espinaca bajo condiciones de agricultura protegida, requiere aproximadamente 1 m² de suelo cultivable y 180 L de agua dulce para riego, además de insumos adicionales como fertilizantes, herbicidas y control de plagas. Asimismo, el cultivo de espinaca puede bien ser considerado como un desafío porque, al igual que otros cultivos, su crecimiento se ve afectado por numerosos factores difíciles de controlar, como las inclemencias del tiempo, la susceptibilidad a plagas y enfermedades, así como los prolongados tiempos de producción. Adicionalmente, como se indica en el mismo reporte, la espinaca requiere cerca de 60 días para alcanzar la madurez de cosecha y es un cultivo estacional, disponible solo durante 6 meses al año, con altas exigencias en cuanto a clima y tipo de suelo. En contraparte, *D. tertiolecta* ha emergido como una fuente eficiente y sustentable de clorofila y sus derivados, en este caso metaclorofilinas como SZC, debido a sus características de cultivo y a su morfología celular, que facilita la extracción de compuestos bioactivos mediante técnicas sencillas y de bajo costo.

Una vez obtenida la clorofila nativa de *D. tertiolecta*, se llevaron a cabo las pruebas para su conversión al derivado hidrosoluble SZC. Este proceso de conversión se dividió en tres etapas; primero, se realizó la hidrólisis alcalina de la clorofila nativa con el objetivo de eliminar el grupo fitol, que corresponde a la porción hidrofóbica de la molécula, así como reemplazar los radicales alquilo por iones sodio hidrofílicos, obteniéndose así el derivado *clorofilina de sodio y magnesio*, que es soluble en agua. En este sentido, durante el desarrollo de esta etapa, se observó una correlación positiva, estadísticamente significativa ($p < 0.05$), entre la concentración de etanol–NaOH y las variables de respuesta analizadas, solubilidad y absorbancia (Tabla 1). La solubilidad aumentó progresivamente con el incremento en la concentración de etanol–NaOH, lo cual se reflejó en los valores de absorbancia. De este modo, la mayor absorbancia (405 nm) se registró en el tratamiento con etanol–NaOH al 15 %, con un valor de 2.845 AU, la cual fue la concentración más alta evaluada.

En la *clorofilina de sodio y magnesio* obtenida durante la primera etapa, la presencia del átomo de Mg genera inestabilidad en la molécula; por ello, la segunda etapa consistió en reemplazar el Mg con un ion metálico más estable, en este caso Zn, y convertir la clorofilina de sodio y magnesio en clorofilina de zinc, la cual es nuevamente insoluble en agua debido a la eliminación de los iones sodio presentes en la molécula. Bajo las condiciones aquí utilizadas, se logró el desplazamiento del Mg por el Zn dentro de la estructura molecular, observándose una mayor incorporación del metal en el tratamiento con la concentración más alta de ZnSO₄ evaluada (30 %), donde se detectó un contenido total de Zn de 13,600 ppm en la muestra analizada (Tabla 2). Asimismo, al comparar los demás elementos evaluados, como Mg y Cu, tanto en los diferentes tratamientos como en los controles (Tabla 1), fue posible calcular el porcentaje de desplazamiento, donde la SZC mostró un desplazamiento de Mg del 96.25 %, valor superior al registrado en la clorofilina de cobre y sodio (SCC), la cual presentó un 93.18 %.

La tercera y última etapa del proceso, consistió en la reincorporación de iones de sodio para convertir la clorofilina de zinc obtenida en sales de clorofilina, con el fin de obtener el producto final, SZC, mediante la adición de NaOH. Durante esta etapa, se observó una mayor solubilidad (94.66 ± 1.33 %) de la muestra obtenida a una concentración de etanol-NaOH del 5 %, lo que coincidió con el mejor resultado en términos de color (1.004 ± 0.016 AU). La Tabla 1 muestra los porcentajes de solubilidad y los valores de color para cada tratamiento. El incremento en la concentración de etanol-NaOH no fue proporcional al aumento de la solubilidad y el color; lo que podría deberse a que el uso excesivo de NaOH dificultó el ajuste del pH requerido para este tipo de reacción, lo que produjo resultados desfavorables.

Con base en los mejores resultados obtenidos en cada una de las tres etapas, fue posible establecer un proceso para la obtención de SZC a partir de la clorofila nativa extraída de *D. tertiolecta*, el cual consistió en: etapa 1, hidrólisis alcalina de la clorofila utilizando etanol-NaOH al 15 %; etapa 2, adición del ion metálico Zn para reemplazar el Mg utilizando ZnSO_4 al 30 %; y etapa 3, conversión a una sal de clorofilina, es decir, el producto final SZC, utilizando etanol-NaOH al 5 %. El rendimiento obtenido bajo este proceso fue de aproximadamente 0.565 g de SZC por cada 1 g de clorofila, correspondiente a una eficiencia del 57 %, calculada con base en la masa total de SZC obtenida, la cual resulta muy superior a la obtenida por Li *et al.* (2016), quienes obtuvieron solo 39.6 % de SCC como derivado de clorofila obtenida de la microalga de agua dulce *Scenedesmus sp.*

Tabla 1. Principales etapas del proceso de obtención de SZC a partir de *D. tertiolecta*.

ETAPA 1 Hidrólisis alcalina de la clorofila	Etanol-NaOH (%)	% Solubilidad		AU ¹ (405 nm)	
	5.0	86.66 ± 0.58 ^b		0.612 ± 0.022 ^b	
	7.5	92.67 ± 1.53 ^c		1.630 ± 0.013 ^c	
	10.0	92.00 ± 1.00 ^c		2.016 ± 0.051 ^d	
	15.0	96.70 ± 0.20 ^d		2.245 ± 0.033 ^d	
	C+	96.66 ± 0.58 ^d		2.998 ± 0.025 ^e	
ETAPA 2 Incorporación del ion metálico	C-	1.27 ± 0.17 ^a		0.085 ± 0.012 ^a	
	ZnSO ₄ (%)	Contenido de elementos (ppm) ²			
		Mg	Zn	Cu	
		10.0	130.0	6,000.0	73.0
		20.0	150.0	6,700.0	36.0
		30.0	82.4	13,600.0	19.0
C+	150.0	16.0	35,500.0		
C-	2,200.0	23.4	22.4		
ETAPA 3 Conversión a sales de clorofilina	Etanol-NaOH (%)	% Solubilidad		AU ¹ (405 nm)	
	2.5	76.00 ± 2.00 ^b		0.675 ± 0.022 ^b	
	5.0	94.66 ± 1.33 ^d		1.004 ± 0.016 ^d	
	10.0	86.00 ± 2.00 ^c		0.930 ± 0.019 ^c	
	C+	95.33 ± 1.15 ^d		2.722 ± 0.014 ^e	
	C-	2.00 ± 0.00 ^a		0.100 ± 1.670 ^a	

C+: Clorofilina de cobre y sodio (control positivo); C-: Clorofila de *D. tertiolecta* sin procesamiento (utilizada como control negativo); ¹Unidades de absorción; ²Valores obtenidos mediante espectroscopía de absorción atómica. Los valores en las etapas 1 y 3 representan la media de tres réplicas $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna para cada etapa, representan diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Fisher ($p < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia a partir de resultados experimentales.

Caracterización mediante espectroscopia UV-Vis y FTIR

Como se mencionó anteriormente, la SCC es una de las metaloclorofilinas más estudiadas y se utiliza como estándar de referencia para el análisis de otras metaloclorofilas debido a la similitud en su estructura molecular, difiriendo únicamente en el ion metálico central (García-Rodríguez & Altamirano-Lozano, 2007; Banu & Pavithra, 2017). Por esta razón, en la presente investigación, la SCC adquirida de Sigma-Aldrich se utilizó como estándar de referencia tanto en los ensayos UV-Vis como en FTIR. En la Figura 1 se muestran los espectros UV-Vis (200 a 800 nm) de la SZC obtenida y del control SCC, observándose en ambos casos, longitudes de onda de máxima absorción (λ_{max}) dentro de los rangos típicos reportados para metaloclorofilas (250, 400–430 y 620–660 nm), con λ_{max} a 250, 405 y 635 nm, respectivamente. Estos valores son similares a los reportados por Ferruzzi & Schwartz (2005), quienes obtuvieron valores de λ_{max} a 250, 406 y 635 nm para la SCC de Sigma-Aldrich. Estos resultados son también similares a los descritos por Li *et al.* (2016) para SCC obtenida a partir de la microalga *Scenedesmus* sp., así como para un estándar SCC (GB26406-2011), donde se reportaron λ_{max} a 418 y 642 nm. Farag (2006), mediante estudios de absorción óptica en películas delgadas de SCC preparadas por rocío pirolítico, observó λ_{max} a 250, 430 y 650 nm. En este sentido, la comparación de los valores de λ_{max} determinados en la SZC y en el control SCC, confirma que la SZC obtenida aquí, presenta el patrón de absorción característico de las metaloclorofilas y sus compuestos constituyentes. Según Farag (2006), la absorción a 250 nm está asociada a la presencia del átomo central en interacción con otras bandas propias de la SCC, lo cual explicaría su diferencia con los máximos de absorción reportados para clorofilas (400–450 nm y 600–690 nm), específicamente los observados en la clorofila nativa de *D. tertiolecta*, tal como se muestran en la Figura 1.

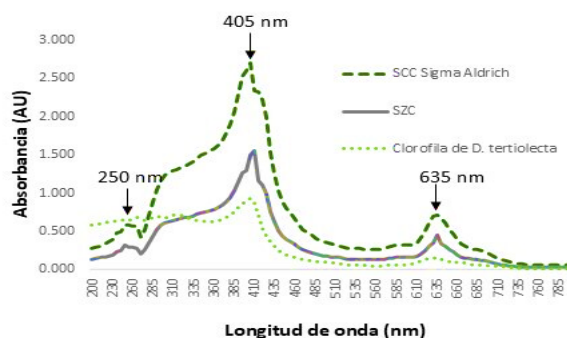


Figura 1. Espectros UV-Vis (200-800 nm) de la SZC; SCC de Sigma-Aldrich (estándar de referencia); y clorofila de *D. tertiolecta* sin procesar (control del proceso).

Las flechas indican la longitud de onda de los picos de máxima absorción en el espectro.

Fuente: Elaboración propia a partir de resultados experimentales.

En cuanto a los valores de λ_{max} de la SZC (0.328 AU a 250 nm, 1.503 AU a 405 nm y 0.452 AU a 635 nm) y los del control SCC (0.592 AU a 250 nm, 2.705 AU a 405 nm y 0.723 AU a 630 nm), se observó que la mayor absorción en ambas metaloclorofilas se registró a 405 nm, lo cual coincide con lo reportado por Zhan *et al.* (2014), quienes observaron la mayor absorción de tres diferentes metaloclorofilas generadas a partir de agujas de pino, SZC, SCC y clorofilina de hierro y sodio (SIC) a longitudes de onda de 415, 402 y 405 nm, respectivamente.

Los espectros IR de la SZC obtenida bajo las condiciones aquí descritas, mostraron bandas típicas de metaloclorofilas, las cuales fueron utilizadas para identificar la presencia de los principales grupos funcionales de la molécula, mismos que resultaron similares a los reportados por diversos autores para metaloclorofilas provenientes de distintas fuentes (Tabla 2). Las bandas de mayor intensidad en los espectros tanto de la SZC como del control SCC (Figura 2 a y b, respectivamente) se observaron entre 1390 y 2919 cm^{-1} , intervalo que puede asociarse con la presencia de anillos aromáticos (C=C), aminas secundarias (C=N), grupos alifáticos e interacciones aromáticas (CH). Además, se observó un ensanchamiento moderado entre 1112 y 1440 cm^{-1} , que podría estar relacionado con la presencia de aminas primarias (C-N) y enlaces simples entre los anillos de pirrol (C-C) (Suresh *et al.*, 2022).

Tabla 2. Bandas de absorción en el espectro IR de la CSZ y su concordancia con reportes previos de diferentes tipos de metaloclorofilas.

Bandas SZC (cm^{-1})	Grupo Funcional	Compuestos Relacionados	Bandas de Referencia	Autores
3285	O-H	Vibración del agua	3362	Holt & Jacobs (1955) ^d
			3366	Farag (2006) ^a , Kumar et al. (2015) ^d
			3239	Suresh et al. (2022) ^{a,b}
2919	C-H	Grupos aromáticos	2920	Holt & Jacobs (1995) ^d
			2973	Kumar et al. (2015) ^d
2851	C-H	Grupos alifáticos	2852	Farag (2006) ^a
			2856	Kumar et al. (2015) ^d
1564	C=C	Anillos aromáticos,	1610	Holt & Jacobs (1995) ^d
	C=N	Aminas conjugadas	1592	Farag (2006) ^a
			1602	Petrovic et al. (2006) ^{b,c}
			1562	Suresh et al. (2022) ^{a,b}

Continuación

Tabla 2. Bandas de absorción en el espectro IR de la CSZ y su concordancia con reportes previos de diferentes tipos de metaloclorofilas.

Bandas SZC (cm ⁻¹)	Grupo Funcional	Compuestos Relacionados	Bandas de Referencia	Autores
1440	-CH ₃	Grupo metilo	1454	Farag (2006) ^a
			1457	Petrovic et al. (2006) ^{b,c}
			1354	Farag (2006) ^a
1390	C-H	Ensanchamientos de grupos alifáticos (flexión)	1380	Petrovic et al. (2006) ^{b,c}
			1391	Suresh et al. (2022) ^{a,b}
			1122	Petrovic et al. (2006) ^{b,c}
1112	C-N C-O	Ensanchamientos de aminas, Enlaces oxígeno	1086	Kumar et al. (2015) ^d
			1094	Suresh et al. (2022) ^{a,b}
			888	Ahmad & Collins (1991) ^a
830	Zn+	Ion metálico	879	Farag (2006) ^a
			809	Suresh et al. (2022) ^{a,b}

^aClorofilina de cobre y sodio; ^bClorofilina de cobre; ^cClorofilina de zinc; ^dDerivados de clorofila sin ión metálico.

Adaptada de los autores citados en la tabla.

Finalmente, se observó una banda ancha en 3285 cm⁻¹, lo que sugiere la presencia de grupos OH enlazados a otros átomos de hidrógeno, amplificando la señal o la extensión de la vibración y, por lo tanto, generando un ensanchamiento de la banda. Sin embargo, la presencia de bandas con estas características en los espectros FTIR de pigmentos higroscópicos suele deberse a su interacción con moléculas de agua atmosférica, lo cual impide una correcta apreciación de los grupos funcionales presentes en el rango de 3200–3500 cm⁻¹ (Farag, 2006; Petrovic *et al.*, 2006).

Con relación a los resultados del presente estudio, los espectros FTIR de la SZC mostraron bandas similares a las reportadas entre 1000 y 2000 cm⁻¹ para complejos generados a partir de clorofila extraída de hojas de espinaca, específicamente clorofilina de cobre y clorofilina de zinc; ambos compuestos presentaron máximos en 1118 y 1122 cm⁻¹, respectivamente, característicos de enlaces oxígeno (CO). Asimismo, las bandas observadas en 1380, 1457 y 1602 cm⁻¹ en ambos compuestos, son típicas de grupos alifáticos (CH), grupos metilo (–CH₃), anillos aromáticos (C=C) y aminas conjugadas (C=N), respectivamente. No obstante, dichas metaloclorofilas difieren en la existencia de dos bandas adicionales, correspondientes a grupos

éster (1288 y 1271 cm^{-1}), las cuales también se han observado en espectros FTIR de clorofila, específicamente en 1285 cm^{-1} . Estas bandas se asocian a la formación de metaloclorofilas y se han atribuido a la sobresaturación de iones metálicos durante el proceso de producción. A altas concentraciones, el metal puede unirse al anillo de ciclopentanona, el cual se desprende durante la hidrólisis de la clorofila, originando un complejo quelato cíclico (Petrovic *et al.*, 2006). Cabe destacar que estas dos bandas no se observaron en los espectros FTIR de la SZC obtenida en este estudio; sin embargo, sí estuvieron presentes en los espectros de la clorofila nativa de *D. tertiolecta* (Figura 2c), así como en los espectros FTIR de hojas de espinaca y en los del control SCC empleado en esta investigación, que también mostró una banda en 1285 cm^{-1} , atribuida a grupos éster (Kang *et al.*, 2018). Por lo tanto, la concentración de Zn utilizada durante el proceso de producción aquí descrito, no parece inducir la formación de compuestos secundarios, como quelatos de ciclopentanona. Además, los espectros FTIR de la SZC coinciden con los reportados por Suresh *et al.* (2022), quienes analizaron clorofilina de cobre y SCC, obtenidas a partir de hojas de *Aloe vera*. Ambos espectros fueron similares entre sí, y todas las bandas señaladas por los autores (809 , 1094 , 1391 , 1562 y 3239 cm^{-1}) fueron también observadas en los espectros de la SZC obtenida en el presente estudio.

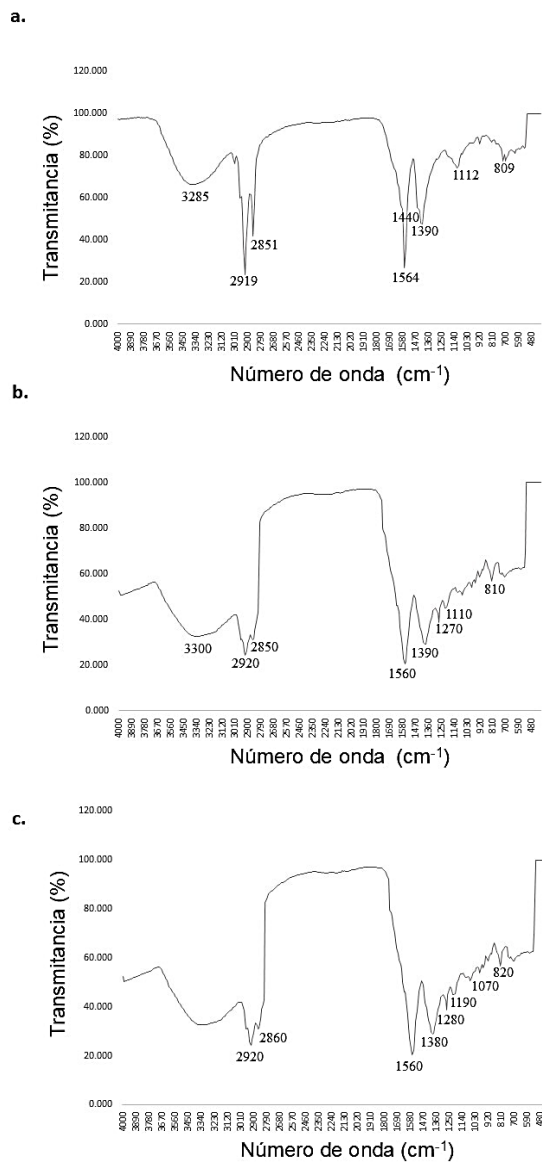


Figura 2. Espectro FTIR (400-3900 cm^{-1}).

a. Clorofilina de sodio y zinc (SZC); b. Clorofilina de cobre y sodio (SCC) de Sigma-Aldrich (estándar de referencia); c. Clorofila de *D. tertiolecta* sin procesamiento (control del proceso).

Fuente: Elaboración propia a partir de resultados experimentales.

Propiedades fisicoquímicas de la SZC

La SZC obtenida mediante el proceso desarrollado aquí, se presentó como un polvo fino de color verde jaspe oscuro, tal como fue descrito por Li *et al.* (2016) y Singh *et al.* (2020) para la SCC obtenida a partir de las microalgas *Scenedesmus sp.* y *Chlorella minutissima*, respectivamente. En cuanto a su solubilidad en diferentes tipos de disolventes (Tabla 3), se observó un incremento conforme aumentó la polaridad del solvente, registrándose la mayor solubilidad de la SZC en agua ($91.33 \pm 1.15 \%$), y la menor en cloroformo ($2.667 \pm 1.15 \%$), confirmando la naturaleza polar de las metaloclorofilas, en contraste con la clorofila nativa, que fue completamente insoluble en agua. Estos hallazgos coinciden con lo reportado para la SCC obtenida de *C. minutissima*, la cual fue totalmente soluble en agua, parcialmente soluble en etanol e insoluble en cloroformo (Singh *et al.*, 2020). La antes mencionada similitud estructural entre la SCC y la SZC podría explicar las coincidencias observadas en sus características sensoriales y fisicoquímicas. Esta comparabilidad respalda el uso de normativas técnicas como la National Food Safety Standard for Food Additives (GB 2760-2014) descrita en el GAIN REPORT (2011), establecido por el Ministerio de Salud de China, la cual regula la producción y uso seguro de la SCC (E141), así como referencias para la evaluación de la SZC. Actualmente, la SCC está aprobada como colorante o aditivo alimentario bajo la Directiva Europea 94/36/EC, el Reglamento Sanitario de los Alimentos de Chile (Decreto 977/96) y la Comisión del Codex Alimentarius (2024), a través del CODEX STAN 192-1995. En este contexto, y con base en la comparación con los requisitos técnicos establecidos por los organismos regulatorios mencionados para la clorofilina de cobre y sodio (SCC, E141), la SZC producida en este estudio cumple con varios de los criterios fisicoquímicos especificados para este tipo de aditivo alimentario; entre los que se incluyen la completa solubilidad en agua, la insolubilidad en cloroformo, el pH alcalino (9.5–11 en solución acuosa al 1 %), el color verde jaspe intenso, y la solución acuosa clara sin sedimentación. Estas características, comúnmente asociadas con las metaloclorofilas hidrosolubles, respaldan la comparabilidad técnica de la SZC con la SCC y su potencial uso en aplicaciones alimentarias como colorante natural o compuesto bioactivo, reconociendo que, hasta hoy, aún no se han establecido definiciones regulatorias específicas para la SZC.

Table 3. Solubilidad de la SZC en diferentes tipos de solventes.

Tipo de Solvente	% Solubilidad SZC	% Solubilidad C+
Cloroformo	$2.66 \pm 1.1^{\text{a}}$	$1.26 \pm 0.68^{\text{a}}$
Acetona	$24.00 \pm 2.00^{\text{b}}$	$19.00 \pm 1.85^{\text{b}}$
Etanol	$27.33 \pm 1.15^{\text{c}}$	$25.31 \pm 1.55^{\text{c}}$
Agua	$91.33 \pm 1.1^{\text{d}}$	$93.33 \pm 1.07^{\text{d}}$
Clorofila microalgal en agua ¹	$0.00 \pm 0.00^{\text{a}}$	$0.00 \pm 0.00^{\text{a}}$

C+: Clorofilina de cobre y sodio (control positivo); ¹Clorofila de *D. tertiolecta* sin procesamiento (control negativo); los valores representan el promedio de tres réplicas $\pm$ la desviación estándar. Letras diferentes en la misma columna representan diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de Fisher ($p < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia a partir de resultados experimentales.

Estabilidad térmica a altas temperaturas

La evaluación del comportamiento de la SZC bajo fluctuaciones de alta temperatura, es de gran importancia al considerar su posible uso en la formulación de productos industrializados. La estabilidad térmica que presente, servirá como guía para determinar los tipos de productos en los que puede ser incorporada (Ferruzzi & Schwartz, 2005; Mohd-Amin *et al.*, 2023). En este contexto, la SZC obtenida en el presente estudio, fue sometida a temperaturas elevadas, observándose que la degradación aumento al prolongar el tiempo de exposición a una temperatura determinada. Sin embargo, la degradación de la SZC entre distintas temperaturas no siempre mostró diferencias significativas cuando fue evaluada en los mismos intervalos de tiempo (Tabla 4). Este comportamiento fue también observado en el control SCC empleado en este estudio y coincide con los resultados reportados por Ferruzzi & Schwartz (2005) para el mismo compuesto (SCC) en solución acuosa, a la misma concentración utilizada en nuestros ensayos.

Tabla 4. Porcentaje de degradación de la SZC bajo diferentes condiciones de temperatura y tiempo.

T (°C)	Degradación de la SZC (%)				
	5 min	15 min	30 min	45 min	60 min
40	12.97 ± 0.74 ^a	15.07 ± 0.88 ^b	20.59 ± 0.94 ^{efgh}	20.82 ± 0.74 ^{fghi}	22.84 ± 0.61 ^{jk}
50	19.11 ± 0.23 ^c	19.65 ± 0.13 ^{cd}	19.96 ± 0.35 ^{de}	21.13 ± 0.35 ^{ghi}	23.69 ± 0.48 ^{lm}
60	20.04 ± 0.84 ^{def}	20.43 ± 0.13 ^{defg}	21.28 ± 0.97 ^{hi}	21.52 ± 0.13 ⁱ	23.85 ± 0.35 ^{mn}
70	20.59 ± 0.58 ^{hi}	22.54 ± 0.56 ^j	23.54 ± 0.46 ^{klm}	24.63 ± 0.81 ^{no}	26.88 ± 0.26 ^q
80	22.68 ± 0.13 ^j	22.99 ± 0.53 ^{kl}	24.24 ± 0.23 ^{mno}	25.79 ± 0.13 ^p	26.96 ± 0.71 ^q
90	29.21 ± 0.48 ^r	29.370 ± 0.003 ^r	29.91 ± 0.035 ^r	31.70 ± 0.40 ^s	34.49 ± 0.40 ^t
100	33.72 ± 0.26 ^t	38.228 ± 0.004 ^u	42.73 ± 0.13 ^v	48.79 ± 0.35 ^w	52.13 ± 0.35 ^x

Los valores representan el promedio de tres réplicas ± la desviación estándar. Letras diferentes representan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, según la prueba de Fisher ($p < 0,05$).

Fuente: Elaboración propia a partir de resultados experimentales.

La SZC mostró estabilidad a temperaturas de 40, 50 y 60 °C, con valores de degradación que oscilaron entre 12 % y 21 % durante los primeros 30 min de exposición. Este comportamiento es sumamente favorable, ya que los procesos de pasteurización térmica destacan entre los métodos de conservación y seguridad alimentaria que cumplen con las normativas sanitarias a nivel mundial. Además de ser eficientes, estos procesos han demostrado mantener intactas las propiedades de los alimentos, a diferencia de otras técnicas no térmicas, como el procesamiento por alta presión (HPP), el cual emplea niveles elevados de presión en frío (Bogahawatha *et al.*, 2018). En este sentido, los métodos de pasteurización térmica utilizados en productos alimentarios como jugos, cerveza, leche y otras bebidas, suelen implicar temperaturas entre 60 y

70 °C durante periodos cortos, generalmente de 5 a 10 min. Algunas técnicas incluso requieren solo segundos de exposición, como la pasteurización de alta temperatura y corto tiempo (HTST), que utiliza temperaturas de 70 ± 5 °C (Donalisio *et al.*, 2018). En el presente estudio, después de 5 min de exposición, la degradación de la SZC fue de 20.59 ± 0.58 % a 70 °C y de 22.68 ± 0.13 % a 80 °C, manteniéndose prácticamente constante hasta los 15 min, lo que indica una estabilidad cercana al 80 % bajo condiciones típicas de procesamiento industrial. Este resultado sugiere su potencial uso en la formulación de bebidas, suplementos alimenticios y otros productos que implican tratamientos térmicos moderados. La degradación máxima de la SZC (52.13 ± 0.35 %) se observó a 100 °C después de 60 min de exposición, cuyo valor es inferior al reportado por Ferruzzi & Schwartz (2005), quienes alcanzaron un porcentaje similar de degradación a 90 °C con solo 20 min de exposición, utilizando SCC de grado comercial.

Capacidad antioxidante (AOXC) de la SZC

Para evaluar la capacidad antioxidante (AOXC), es necesario considerar los diferentes mecanismos de acción antioxidante y las respectivas metodologías empleadas para medir cada uno de ellos; por esta razón, la determinación de la AOXC mediante un único método no es suficiente. En este estudio, la AOXC de la SZC fue evaluada utilizando tres métodos distintos, y los resultados fueron expresados como Capacidad Antioxidante Equivalente de Trolox (TEAC). Los resultados obtenidos de la SZC producida aquí, fueron valores de 17.72 ± 0.32 mmol TEAC/100 g (dw) mediante DPPH; 38.01 ± 1.83 mmol TEAC/100 g (dw) mediante FRAP; y 44.40 ± 1.19 mmol TEAC/100 g (dw) mediante ABTS. Como se aprecia, el resultado más alto se obtuvo a través del ensayo de ABTS, lo que sugiere que este método presenta la mayor afinidad hacia esta molécula; además, indica que la SZC posee una fuerte capacidad para oxidar el radical catiónico cromóforo ABTS•+ [2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)], que es soluble tanto en medios polares como no polares, y no se ve afectado por la fuerza iónica, permitiendo así la evaluación de antioxidantes tanto hidrofílicos como lipofílicos. Por esta razón, el valor obtenido mediante ABTS [44.402 ± 1.198 mmol TEAC/100 g (dw)] puede considerarse prácticamente como la AOXC total de la SZC (Pérez-Gálvez *et al.*, 2020). Derivado de lo anterior, podemos afirmar que la SZC exhibe una alta capacidad antioxidante, dado que este valor es comparable con los reportados para vegetales como alcachofa, frijoles (rojo y pinto) y soya, así como para frutas como zarzamoras y arándanos; todos estos, considerados buenos referentes en términos de su AOXC y localizados en el primer nivel [> 9 mmol TEAC/100 g (dw)] de la clasificación propuesta por Pennington y Fisher (2009), quienes sugirieron una clasificación de 6 niveles para frutas y vegetales con base en su capacidad antioxidante total.

De acuerdo con los valores de AOXC obtenidos por el método de FRAP, Carlsen *et al.* (2010) propusieron una clasificación compuesta por 24 niveles, divididos en tres categorías según su origen: vegetal, animal, o mixto; donde, con base en el valor de FRAP reportado para la SZC en este estudio [38.008 mmol TEAC/100 g (dw)], esta molécula se ubica en la primera categoría, correspondiente a alimentos de origen vegetal. Es importante resaltar que esta categoría contiene el grupo con mayor aporte de antioxidantes, y la SZC se ubica en el mismo nivel de las especias y hierbas, que incluye alimentos con una AOXC promedio de 29.02 mmol TEAC/100 g (dw). El valor de AOXC obtenido en la SZC, supera a los reportados para diversas variedades de laurel,

canela, nuez moscada, jengibre, eneldo, albahaca, y azafrán, con valores promedio de AOXC de 27.8, 26.5, 26.4, 20.3, 20.2, 19.9 and 17.5 mmol TEAC/100 g (dw), respectivamente. Cabe destacar que Carlsen *et al.* (2010), analizaron un total de 3139 alimentos, y el valor de AOXC de la SZC obtenida en este estudio, fue superior al de aproximadamente 2524 de ellos, lo que representa casi el 80 % de todos los alimentos evaluados. Incluso superó los valores reportados para alimentos y bebidas consideradas importantes fuentes de antioxidantes, tales como el té negro [1.0 mmol TEAC/100 g (dw)], el café negro [2.5 mmol TEAC/100 g (dw)], las semillas de girasol [6.4 mmol TEAC/100 g (dw)], el jugo de granada [2.1 mmol TEAC/100 g (dw)], y las hojas de *Moringa stenopetala* [11.9 mmol TEAC/100 g (dw)].

En un estudio realizado por Ferruzzi *et al.* (2002), se obtuvieron tanto derivados de clorofila carentes de iones metálicos como metaloclorofilas con diferentes iones, y se evaluó su capacidad antioxidante mediante los ensayos DPPH y ABTS. Los valores de AOXC para los derivados de clorofila sin iones metálicos fueron inferiores a los de la clorofila nativa a partir de la cual fueron originados; mientras que las distintas metaloclorofilas evaluadas, mostraron los valores más altos de AOXC entre todas las moléculas analizadas, incluidas las propias clorofilas nativas. Esto sugiere fuertemente que la presencia y el tipo de ion metálico en la molécula, ya sea el Mg presente en la clorofila nativa, o los metales incorporados durante la formación de las metaloclorofilas, desempeñan un papel importante en su AOXC. Aunado a lo anterior, diversos estudios han señalado que la AOXC varía entre distintos tipos de metaloclorofilas (Zhan *et al.*, 2014; Mohd-Amin *et al.*, 2023); asimismo, se ha destacado que, en tecnologías emergentes para el procesamiento industrial de frutas, vegetales y alimentos ricos en clorofilas, se incluyen etapas que contemplan la incorporación de iones metálicos específicos como estrategia para preservar el color y las propiedades biológicas (Kang *et al.*, 2018; Mohd-Amin *et al.*, 2023).

En conjunto, la alta capacidad antioxidante observada en la SZC producida bajo la metodología descrita aquí, junto con sus favorables características fisicoquímicas y estabilidad térmica, respaldan su potencial como un aditivo alimentario, alineado con la demanda actual de compuestos naturales con beneficios adicionales para la salud. No obstante, para fundamentar plenamente este potencial, se requieren más investigaciones, particularmente estudios que aborden su bioaccesibilidad, perfil de seguridad y comportamiento en matrices alimentarias reales. Dichas evaluaciones proporcionarían una base más sólida para considerar a la SZC como un ingrediente funcional viable, incrementando su posible aceptación en aplicaciones tanto industriales como nutracéuticas.

Conclusiones

En el presente estudio, se desarrolló un proceso eficiente para la obtención de SZC a partir de la clorofila extraída de la microalga marina *Dunaliella tertiolecta*, con rendimientos de hasta el 52 %. Mediante análisis de espectroscopía UV-Vis y FTIR, se validó la conformación química de la SZC, y sus propiedades fisicoquímicas coincidieron con las reportadas para metaloclorofilas provenientes de otras fuentes, cumpliendo con los criterios establecidos por la Norma Nacional de Seguridad Alimentaria para Aditivos Alimenticios (GB 2760-2014), específicamente los aplicables

a la SCC empleada como referente en el presente estudio. La estabilidad térmica de la SZC a las temperaturas tradicionalmente aplicadas en el procesamiento de alimentos también fue demostrada, reforzando su viabilidad para aplicaciones industriales. Finalmente, la AOXC de la SZC obtenida aquí, superó la de numerosas frutas y vegetales reconocidos como excelentes fuentes de antioxidantes, lo que sugiere su potencial uso como ingrediente alimentario funcional. Con base en los resultados aquí descritos, la SZC obtenida a través del proceso descrito aquí, se perfila como una metaloclorofila capaz de contribuir eficazmente al abastecimiento de la demanda global de ingredientes alimentarios funcionales, ofreciendo una alternativa más sustentable y rentable en comparación con aquellas que actualmente se derivan de vegetales verdes.

Contribución de los autores

Conceptualización del estudio: VOA, GBLJ; Desarrollo metodológico: MAKa, MGS, GTJA, GBLJ; Gestión de software: MAKa, GTJA, GBLJ; Validación experimental: MAKa, GBLJ; Análisis de resultados: MAKa, VOA, VOR, GBLJ; Gestión de datos: MAKa, GBLJ; Redacción y preparación del manuscrito: MAKa, VOA, GBLJ; Lectura, revisión y edición: MGS, VOR, GTJA; Dirección del proyecto: VOA, GBLJ; Financiamiento: VOA, GBLJ. Todos los autores leyeron y aprobaron la versión final de este manuscrito: MAKa, VOA, MGS, VOR, GTJA, and GBLJ.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada por la Universidad Autónoma de Sinaloa, a través del proyecto PROFAPI2022PRO_A2_029.

Agradecimientos

MAKA agradece a SECIHTI-México por la beca otorgada.

Declaración de intereses

Los autores declaran que no existe ningún potencial conflicto de intereses.

Referencias

- Ahmad, A., & Collins, R.A. (1991). FTIR characterization of triclinic lead phthalocyanine. *Journal of Physics D: Applied of Physics*, 24(10), 1894-1897. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/24/10/029>
- Anchundia, K., Santacruz, S., & Coloma, J. (2016). Caracterización física de películas comestibles a base de cáscara de plátano (*Musa Paradisiaca*). *Revista chilena de nutrición*, 43(4), 394-

399. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182016000400009>
- AOAC International [Association of Official Analytical Collaboration International]. (1999). Official method 999.10: Lead, cadmium, zinc, copper, and iron in foods, Atomic absorption spectrophotometry after dry ashing. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17(2).
- Banu, N., & Pavithra, S. (2017). A Review on the Bioactivity of Various Metallochlorophyllin- A Chlorophyll Derivative. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10(2), 1-7. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2017.00096.8>
- Barbulova, A., Colucci, G., & Apone, F. (2015). New trends in cosmetics: By-products of plant origin and their potential use as cosmetic active ingredients. *Cosmetics*, 2(2), 82–92. <https://doi.org/10.3390/cosmetics2020082>
- Bezerra-daSilva, M.R.O., Santana-Moura, Y.A., Figueiredo-Porto, A.L., DeAraújo-Viana-Marques, D., & Pedrosa-Bezerra, R. (2021). Assessment of the potential of *Dunaliella* microalgae for different biotechnological applications: A systematic review. *Algal Research*, 58, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102396>
- Bogahawatha, D., Buckow, R., Chandrapala, J., & Vasiljevic, T. (2018). Comparison between thermal pasteurization and high-pressure processing of bovine skim milk in relation to denaturation and immunogenicity of native milk proteins. *Innovate Food Science & Emerging Technologies*, 47, 301-308. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.03.016>
- Carlsen, M.H., Halvorsen, B.L., Holte, K., Bøhn, S.K., Dragland, S., Sampson, L., Willey, C., Senoo, H., Umezono, Y., Sanada, C., Barikmo, I., Berhe, N., Willett, W.C., Phillips, K.M., Jacobs, D.R., & Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Journal Nutrition*, 9(3), 1-11. <https://dx.doi.org/10.1186/1475-2891-9-3>
- CCB [Cámara de Comercio de Bogotá]. (2015). Manual: Espinaca. Programa de apoyo agrícola y agroindustrial vicepresidencia de fortalecimiento empresarial. Cámara de Comercio de Bogotá (ed). Colombia. <http://hdl.handle.net/11520/14310>
- CONAGUA [Comisión Nacional del Agua]. (2019). El agua en el mundo. Sistema Nacional de Información del Agua. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (ed). México. <https://www.gob.mx/conagua/acciones-y-programas/agua-en-el-mundo>
- Donalisio, M., Ritta, M., Francese, R., Cibra, A., Tonetto, P., Coscia, A., Giribaldi, M., Cavallarin, L., Moro, G., Bertino, E., & Lembo, D. (2018). High Temperature—Short Time Pasteurization Has a Lower Impact on the Antiviral Properties of human milk than holder pasteurization. *Frontiers in Pediatrics*, 6, 304. <https://doi.org/10.3389/fped.2018.00304>
- Ezquerria-Brauer, J.M., & Chan-Higuera, J.E. (2021). Capacidad antioxidante y mecanismo de acción de pigmentos en organismos marinos. *CienciaUAT*, 15(2), 186-197. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v15i2.1501>
- Farag, A.A.M. (2006). Optical absorption of sodium copper chlorophyllin thin films in UV–VIS–NIR region. *Spectrochimica Acta Part A*, 65, 667-672. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.12.026>
- Ferruzzi, M.G., & Schwartz, S.J. (2005). Thermal degradation of commercial grade sodium copper chlorophyllin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(18), 7098-79102. <https://doi.org/10.1021/jf051010s>
- Ferruzzi, M.G., Bohm, V., Courtney, P.D., & Schwartz, S.J. (2002). Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives determined by radical scavenging and bacterial

- reverse mutagenesis assays. *Food Chemistry and Toxicology*, 67(7), 2589- 2595. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08782.x>
- García-Rodríguez, M.C., & Altamirano-Lozano, M.A. (2007). La clorofilina como modulador y protector de daño al ADN: experiencia en el ratón *in vivo*. *Bioquímica*, 32(1), 15-24. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57632104>
- Germán-Báez, L.J., Valdez-Flores, M.A., Félix-Medina, J.V., Norzagaray-Valenzuela, C.D., Santos-Ballardo, D.U., Reyes-Moreno, C., Shelton, L.M., & Valdez-Ortiz, A. (2017). Chemical composition and physicochemical properties of *Phaeodactylum tricornutum* microalgal residual biomass. *Food Science and Technology International*, 23(8), 682- 689. <https://dx.doi.org/10.1177/1082013217717611>
- GAIN REPORT [Global Agricultural Information Network]. (2011). National food safety standards for uses of food additives (GB 2760-2014). Ministry of Health (ed). Beijing, China. https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/Report/DownloadReportByFileName?fileName=Food+Additive+Sodium+Copper+Chlorophyllin_Beijing_China+-+Peoples+Republic+of_5-31-2011.pdf
- Gómez-Luna, L.M. (2007). Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, XIX(2), 3-20. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543707001>
- Guillard, R.R., & Ryther, J.H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). *Journal of Microbiology*, 8, 229–239. <https://doi.org/10.1139/m62-029>
- Heras-Cervantes, C. (2006). Proceso de extracción de clorofila a partir de espinaca (*spinaca oleracea*). [Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo]. http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/7967/FIQ-L-2006-0018.pdf?sequence=11
- Holt, A.S., & Jacobs, E.E. (1955). Infra-Red Absorption Spectra of Chlorophylls and Derivatives. *Plant Physiology*, 30(6), 553-559. <https://doi.org/10.1104/pp.30.6.553>
- Kang, Y., Park, J., Jung, S.K., & Chang, Y.H. (2018). Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins. *Food Chemistry*, 245, 943-950. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.079>
- Kumar, S.S., Manoj, P., & Giridhar, P. (2015). Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis, chlorophyll content and antioxidant properties of native and defatted foliage of green leafy vegetables. *Journal Food and Science and Technology*, 52(12), 8131-8139. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1959-0>
- Kussman, M., Cunha, D. H., & Berciano, S. (2023). Bioactive compounds for human and planetary health. *Frontiers in Nutrition*, 10(3389), 1-14. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1193848>
- Levasseur, W., Perré, P., & Pozzobon, A. (2020). A review of high value-added molecules production by microalgae in light of the classification. *Biotechnology Advances*, 41(107545), 1-21. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107545>
- Li, T., Xu, J., Wu, H., Wang, G., Dai, S., Fan, J., He, H., & Xiang, W. (2016). A saponification method for chlorophyll removal from microalgae biomass as oil feedstock. *Marine Drugs*, 14(9), 162. <https://dx.doi.org/10.3390/md14090162>
- Martínez, K.A., Saide, A., Crespo, G., Martín, J., Romano, G., Reyes, F., Lauritano, C., & Lanora, A. (2022). Promising antiproliferative compound from the green microalga *Dunaliella tertiolecta* against human cancer cells. *Frontiers in Marine Science*, 9(2022), Article 778108. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.778108>

- doi.org/10.3389/fmars.2022.778108
- Martínez-Montaña, E., Sarmiento-Machado, R.S., Osuna-Ruíz, I., Benítez-García, I., Pacheco-Aguilar, R., Navarro-Peraza, R. S., Lugo-Sánchez, M.E., Valdez-Ortiz, A., Germán-Báez, L.J., Bañuelos-Vargas, I., Rodríguez-Tirado, V.A., & Salazar-Leyva, J.A. (2022). Effect of degree of hydrolysis on biochemical properties and biological activities (antioxidant and antihypertensive) of protein hydrolysates from pacific thread herring (*Ophistonema libertate*) Stickwater. *Waste and Biomass Valorization*, 13, 1015–1027. <https://doi.org/10.1007/s12649-021-01590-z>
- Martins, T., Barros, A.N., Rosa, E., & Antunes, L. (2023). Enhancing health benefits through chlorophylls and chlorophyll-rich Agro-Food: A Comprehensive Review. *Molecules*, 28(5344), 1-21. <https://doi.org/10.3390/molecules28145344>
- Medina-Félix, D., Campa-Córdova, A.I., López-Elías, J.A., Martínez-Córdova, L.R., Figueroa-Preciado, G., Cortés-Jacinto, E., Luna-González, A., Mendoza-Cano, F., & Huerta-Aldaz, N. (2020). Efecto dosis/frecuencia de la administración de *Dunaliella* sp. a la dieta de *Litopenaeus vannamei* durante una infección con *Vibrio parahaemolyticus*. (Resumen en extenso). Revista Bio Ciencias 8: (Suppl) Memorias del 3er Coloquio de Nutrigenómica y Biotecnología Acuícola 2020 (CONYBA) e1100. <http://doi.org/10.15741/revbio.08Suppl.e1100>
- Meza-Ayala, K.A. (2017). Evaluación del potencial antioxidante y antimicrobiano de la clorofila obtenida a partir de *Dunaliella tertiolecta*. [Tesis de Maestría en Ciencias en Biotecnología, Universidad Autónoma de Sinaloa]. <https://prbdoc.uas.edu.mx/wp-content/uploads/2020/08/11.-Meza-Ayala-A.-Karelia-.pdf>
- Mohd-Amin, S.F., Karim, R., Yusof, Y.A., & Muhammad, K. (2023). Effects of metal concentration, pH, and temperature on the chlorophyll derivative content, green colour, and antioxidant activity of amaranth (*Amaranthus viridis*) purees. *Applied Sciences*, 13 (1334), 2-18. <https://doi.org/10.3390/app13031344>
- NMX-AA-017-SCFI-2021 [Norma Oficial Mexicana]. (2021). Water Analysis - Measurement of True Color in Natural, Wastewater, Wastewater Treated and Sea Water– by Spectral Absorption Coefficient- Test Method (Cancel to NMXAA-017-1980). Diario Oficial de la Federación 01 de Julio de 2020. <https://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/agenda/DOFsr/nMX-AA-017-SCFI-2021.pdf>
- Norzagaray-Valenzuela, C.D., Germán-Báez, L.J., Valdez-Flores, M.A., Hernández-Verdugo S., Shelton, L.M., & Valdez-Ortiz, A. (2018). Establishment of an efficient genetic transformation method in *Dunaliella tertiolecta* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Microbiological Methods*, 150, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.05.010>
- Pennington, J.A.T., & Fisher, R.A. (2009). Classification of fruits and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 225, 523-531. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.11.012>
- Pérez-Gálvez, A., Viera, I., & Roca, M. (2020). Carotenoids and chlorophylls as antioxidants. *Antioxidants*, 9, 1-34. <https://doi.org/10.3390/antiox9060505>
- Petrovic, J., Nikolic, G., & Markovic, D. (2006). *In vitro* complexes of copper and zinc with chlorophyll. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 71(5), 501–512. <https://doi.org/10.2298/JSC0605501P>
- POLARIS. (2022). Chlorophyll Extract Market Share, Size, Trends, Industry Analysis Report, By Type (Liquid, Tablet, Powder); By Application (Food Additive, Cosmetics, Dietary

- Supplement); By Region; Segment Forecast, 2022 - 2030. POLARIS Market Research, New York: EE.UU. 113, Article PM2325. <https://www.polarismarketresearch.com/industry-analysis/chlorophyll-extract-market>
- Santana-Moura, Y.A., deAraújo-Viana-Marques, D., Figueiredo-Porto, A.L., Pedrosa-Bezerra, R., & Converti, A. (2020). Pigments production, growth kinetics, and bioenergetic patterns in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) in response to different culture media. *Energies Journal*, 13, 5347. <https://doi.org/10.3390/en13205347>
- Singh, V.L., Chakravarty, S., Chandra, N., & Mallick, N. (2020). Production of sodium copper chlorophyllin from a green microalga *Chlorella minutissima*: a value-added co-product for sustainable microalgal refinery. *Food and Bioproducts Processing*, 123, 322–334. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2020.07.011>
- Suresh, H.D., Nagananda, G.S., Minchitha, K.U., & Swetha, S.S. (2022). Synthesis and bio-evaluation of soluble sodium copper chlorophyllin complexes from the leaves of *Aloe vera*. *South African Journal of Botany*, 147, 1086-1095. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.11.055>
- Suzuki, I., Kubota, H., Terami, S., Hara, T., Hirakawa, Y., Iizuka, T., Tatebe, C., Ohtsuki, Sato, K., & Akiyama, H. (2016). Development of an analytical method for copper chlorophyll and sodium copper chlorophyllin in processed foods. *Japanese Journal of Food Chemistry and Safety*, 23(2), 55-62. https://doi.org/10.18891/jjfc.23.2_55
- CODEX STAN 192-1995. Comisión del Codex Alimentarius/FAO/OMS. (2024). Norma general para los aditivos alimentarios. Programa Conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, Comité del Codex sobre aditivos alimentarios. https://www.fao.org/gsfaonline/docs/CXS_192s.pdf
- Theodorou, V., Skobridis, K., Tzakos, A.G., & Ragoussis, V. (2007). A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Letters*, 48(46), 8230-8233. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2007.09.074>
- Zhan, R., Wu, J., & Ouyang, J. (2014). *In vitro* antioxidant activities of sodium zinc and sodium iron chlorophyllins from pine needles. *Food Technology & Biotechnology*. 52(4), 505–510. <https://dx.doi.org/10.17113/ftb.52.04.14.3592>