

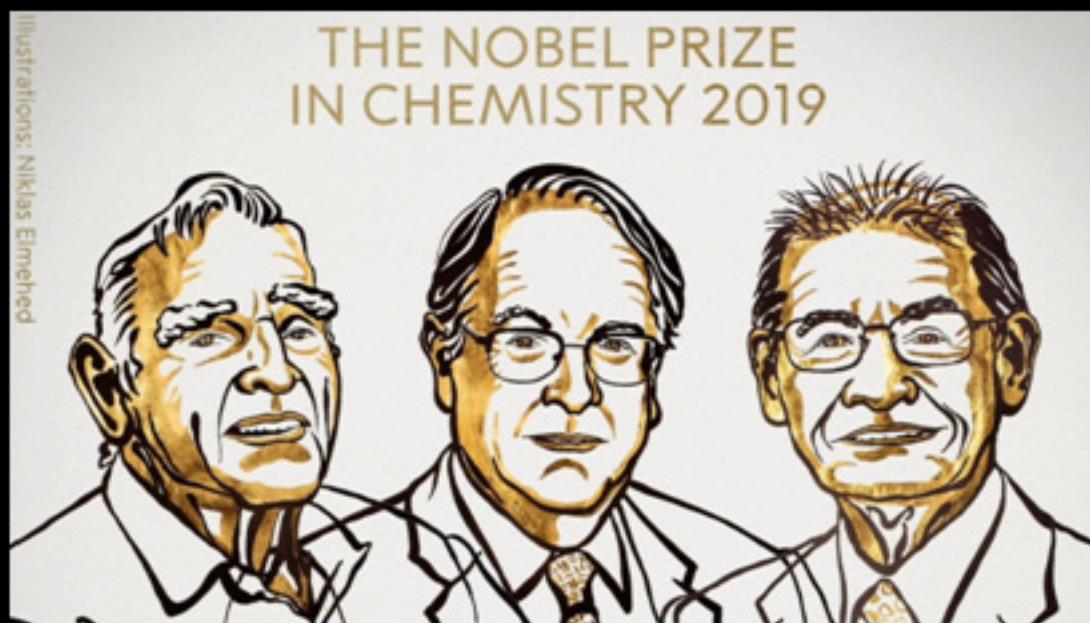
(+)

Avances en Química

Septiembre–Diciembre 2020

Volumen 15

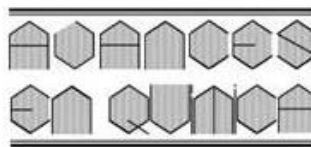
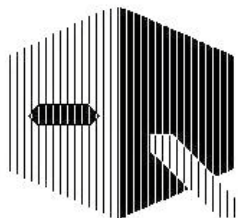
Número 3



Batería de ion litio

(-)





Avances en Química

Revista del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela. **Avances en Química** es una publicación cuatrimestral multidisciplinaria, de carácter científico, técnico y divulgativo, cuyo objetivo fundamental es contribuir a la difusión de información científica y técnica de cualquier área de la química. Otros objetivos de **Avances en Química** son:

- Incentivar el desarrollo de la investigación en química en el ámbito iberoamericano y proveer un medio para la publicación rápida de resultados resaltantes en investigación.
- Coadyuvar en la vinculación Universidad/Sector Productivo/Sociedad a los fines de lograr agregar valor a la materia prima de nuestra región.

Autoridades

Departamento de Química

Jefe: Carlos Ayala

Facultad de Ciencias

Decano: **Nelson Viloría**

Director: **Carlos Rondón**

Coordinador académico: **Andrés Abad Reyes**

Universidad de Los Andes

Rector: **Mario Bonucci**

Vicerrector Académico: **Patricia Rosenzweig**

Vicerrector Administrativo: **Manuel Aranguren**

Secretaria: **José María Andérez**

Avances en Química está indizada en:

Revencyt (www.revencyt.ula.ve)

Latindex (www.latindex.org)

Redalyc (<http://redalyc.uaemex.mx>)

DOAJ (www.doaj.org)

Scopus (www.scopus.com)

Copyright

Se autoriza la reproducción del material que contiene esta revista solo con fines educativos. Su reproducción o el uso del material con fines de lucro será respondido conforme a las leyes.

Depósito legal: PPI200602ME2232

ISSN: 1856-5301

Portada: Cristóbal Lárez Velásquez

Diseño y Diagramación: Cristóbal Lárez Velásquez

Sitio web: www.saber.ula.ve/avancesquimica

Dirección: Av. Alberto Carnevalli, Núcleo La Hechicera, Edif. A. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida 5101. Venezuela. Teléfono 0058 0274 2401381. Fax: 0058 0274 2401286

E-mail: clarez@ula.ve

Dirección para canje:

Universidad de Los Andes, Biblioteca Integrada de Arquitectura, Ciencia e Ingeniería (BIACI).
Núcleo La Hechicera, Edif. C. Mérida 5101, Venezuela.

Teléfono: 0058 0274 2401220

Fax: 058 0274 2401236

e-mail (canje): biaci@ula.ve

Avances en Química

Contenido

Volumen 15, número 3, Cuatrimestre septiembre – diciembre 2020

Página

Artículos científicos

Comparación entre la co-precipitación química y el uso de hidrogeles en la remoción de iones cobalto (II) disueltos en soluciones acuosas **73**

Jorge A. Cortes Ortega, Abraham G. Alvarado Mendoza, Rubén O. Muñoz García **México**

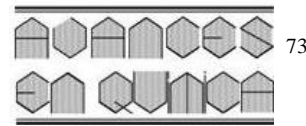
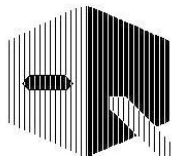
Disminución de polifenoles totales y taninos en residuales sólidos procedentes del beneficio de café para la producción de lipasas **81**

Jessica Ponce-Rodríguez, Anlly Vilcacundo-Alcívar, Francisco Macías-Menéndez, Ernesto Rosero-Delgado², Yunet Gómez-Salcedo **Ecuador**

Nota técnica

Chalcone-Flavanone Equilibrium in the Isomeric Mixture: 2',3,4,4',6'-Pentahydroxychalcone and Eriodictyol from *Stevia lucida* **89**

Pablo A. Chacon-Morales, Carolina Santiago-Dugarte, Juan M. Amaro-Luis **Venezuela/Ecuador**



Comparación entre la co-precipitación química y el uso de hidrogeles en la remoción de iones cobalto (II) disueltos en soluciones acuosas

Jorge Alberto Cortes Ortega*, Abraham Gabriel Alvarado Mendoza y Rubén Octavio Muñoz García

Departamento de química, Universidad de Guadalajara (C.U.C.E.I.)
Boulevard Marcelino García Barragán 1455
C.P. 44340, Guadalajara, Jalisco, México

(*) jorcortes@hotmail.com

Recibido: 29/06/2020

Revisado: 30/09/2020

Aceptado: 17/11/2020

Resumen

En este trabajo se presenta la remoción de iones cobalto presentes en solución acuosa, empleando hidrogeles de acrilamida/ácido itacónico como medio de transporte y dosificadores de iones hidroxilo (OH⁻). Este proceso se llevó a cabo en dos etapas, en la primera los hidrogeles totalmente secos (xerogel) se colocaron en soluciones 0,1 M de NaOH y posteriormente fueron colocados en las soluciones acuosas que contenían al metal, iniciando la liberación de los grupos OH⁻ los cuales reaccionan con los iones Co⁺² para formar Co(OH)₂ sobre la superficie del hidrogel debido a la insolubilidad del hidróxido formado, con esto se evita la penetración de iones Co⁺² hacia el hidrogel y la dispersión del sólido en la solución, al terminar la reacción de precipitación el sólido obtenido puede ser fácilmente removido, mediante la decantación de la solución residual y el lavado del hidrogel con agua destilada

Palabras claves: cobalto; acrilamida; ácido itacónico; hidrogeles; remediación de aguas industriales

Abstract

Comparison between chemical coprecipitation and the use of hydrogels in the removal of dissolved cobalt (II) ions in aqueous solutions. In this work, the removal of cobalt ions dissolved in aqueous solution is presented, using acrylamide / itaconic acid hydrogels as transport medium and hydroxyl ions (OH⁻) dispensers. This process was carried out in two stages, in the first the totally dry hydrogels (xerogel) were placed in 0.1 M NaOH solutions and later they were placed in the aqueous solutions containing the metal, initiating the release of the OH⁻ groups, which react with the Co⁺² ions to form Co(OH)₂ on the surface of the hydrogel due to the insolubility of the hydroxide formed, this prevents the penetration of Co⁺² ions towards the hydrogel and the dispersion of the solid in the solution, At the end of the precipitation reaction, the solid obtained can be easily removed by decanting the residual solution and washing the hydrogel with distilled water.

Keywords: Cobalt; Acrylamide; Itaconic Acid; Hydrogels; Industrial Water Remediation

Introducción

El aumento en el uso de metales pesados como el cobalto en muchos procesos tecnológicos e industriales ha incrementado en gran medida su concentración en aguas residuales provocando un serio problema ambiental y para la salud de humanos, plantas y animales¹⁻⁴. Debido a esto se han desarrollado distintos materiales, procesos y métodos de recuperación de metales pesados disueltos en forma de iones. Se encuentran métodos novedosos como: oxidación-reducción⁵, nano y ultrafiltración^{6,7}, tratamientos electroquímicos⁸, separación por medio de membranas⁹ y electrodiálisis¹⁰, hasta métodos más flexibles, económicos y que no requieren tecnologías avanzadas como la extracción con diferentes tipos de ácido^{11,12} y el método de adsorción. En este último caso se emplea una sustancia capaz de adsorber sobre su superficie o dentro de sus partículas a los iones metálicos que se desean remover. Por

ejemplo, el uso de carbón activado¹³ e hidrogeles¹⁴⁻¹⁶. Los hidrogeles son un material flexible, económico y de alto rendimiento en la recuperación y remoción de metales pesados presentes en soluciones acuosas en forma de iones, por lo cual han recibido un gran interés en los últimos veinte años. Para la remoción de iones cobalto (II) en solución acuosa se han empleado distintas técnicas. Mansour *et al.*¹⁷ emplearon la técnica de electrocoagulación de corriente alterna para remover el 95% de Co⁺² en solución acuosa pH de 7,5 con una densidad de corriente de 0,04 A/m² en un tiempo de 35 min y una concentración de iones de 25 mg/L. Ketsela *et al.*¹⁸ emplearon carbón activado sintetizado a partir del altramuz blanco, para remover iones Co⁺² presentes en soluciones acuosas, la máxima eficiencia de adsorción obtenida fue de 90,36% en un medio de pH 5, con tiempo de contacto 30 min y temperatura de 55 °C con 2 g de adsorbente y una concentración inicial de

iones de 50 mg/L. En trabajos previos nuestro grupo de investigación encontró que el uso de hidrogeles de acrilamida/ácido crotonico hinchados en soluciones acuosas de NaOH 0,1 M ayudó a incrementar la cantidad removida de iones Ni^{+2} presentes en soluciones acuosas. Esto se logró formando hidróxido de níquel¹⁹ sobre la superficie del hidrogel el cual actúa como un medio de transporte de iones OH^- , removiendo hasta el 90% del metal presente.

En este trabajo se presenta la síntesis de hidrogeles compuestos de poli (acrilamida-co-ácido itacónico) con una relación másica de 80/20 y la comparación entre dos técnicas de remoción de iones Co^{+2} desde soluciones acuosas. En la primera se llevó a cabo la precipitación química de los iones añadiendo un volumen determinado de una solución de NaOH 0,1 M. En la segunda técnica se emplearon los hidrogeles sintetizados en la recuperación de iones Co^{+2} . Los polímeros totalmente secos (xerogel) se sumergieron en soluciones acuosas de NaOH con un valor de pH igual a 13 durante 48 h, posteriormente los hidrogeles (xerogeles hinchados con la solución acuosa de NaOH) fueron colocados dentro de soluciones acuosas de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, los iones OH^- presentes en el hidrogel reaccionaron con los iones Co^{+2} formando hidróxido de cobalto sobre la superficie del gel, logrando una remoción del 94%.

Parte experimental

Métodos y materiales

Los monómeros acrilamida (AM) y ácido itacónico (AI) ambos con una pureza de 99% fueron obtenidos de Sigma y Aldrich respectivamente. La sal de cobalto empleada en el desarrollo de este trabajo fue el cloruro de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) obtenido de Sigma con pureza de 99%. El iniciador empleado en las reacciones de polimerización fue el persulfato de potasio (KPS, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) con una pureza del 99% de Aldrich. Como agente entrecruzante se empleó N',N'-metilbisacrilamida (NMBA) con pureza de 99% obtenido de TCI. Se empleó el acelerador N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina (TMEDA) de Tokyo Kasei para llevar a cabo la reacción a temperatura de 30 °C. Finalmente, como medio de reacción se empleó agua bi-distilada de Productos Selectopura. Todos los reactivos fueron empleados como se recibieron.

Síntesis de los hidrogeles.

Se prepararon distintas soluciones acuosas con una composición de 90% de agua y 10% de monómeros, con una relación en masa de acrilamida/ácido itacónico igual a 80/20. Además, se adicionaron el 1% de NMBA, 2% de

KPS y 3% de TMEDA en masa con respecto al total de monómeros. Posteriormente, las soluciones se colocaron en recipientes cilíndricos de vidrio los cuales fueron sellados y colocados en un baño de reacción a 30 °C por 24 h, al cabo de este tiempo las muestras fueron retiradas del recipiente, se cortaron en discos de 2 cm de espesor y se colocaron en agua bi-distilada por 7 días para retirar las trazas de reactivos, al finalizar este tiempo el agua de lavado se reemplazó cada 6 h

durante 3 días más. Finalmente, los hidrogeles fueron introducidos a una estufa de vacío a 50 °C hasta alcanzar peso constante.

Remoción de los iones cobalto

Con el objetivo de maximizar la remoción de iones cobalto se llevaron a cabo distintos métodos, en los cuales se estudió la variación de la relación másica de solución de NaOH a xerogel empleado, la concentración de iones OH^- presentes en el hidrogel, la concentración de iones Co^{+2} disueltos en la solución del metal y el número de veces que el hidrogel fue empleado en el proceso sobre la remoción de iones Co^{+2} .

Método 1: los xerogeles fueron inmersos en soluciones acuosas 0,1 M de NaOH con un tiempo de residencia de 48 h a temperatura constante de 30 °C en relaciones másicas de 50/1, 65/1, 100/1, 125/1 y 150/1 de solución a xerogel empleado con el objetivo de determinar la proporción adecuada para que los iones OH^- penetren al polímero y posteriormente sean liberados desde la matriz en la solución del metal para llevar a cabo la reacción de precipitación

La capacidad de absorber agua de los hidrogeles se calculó mediante la ecuación 1:

$$W = \frac{\text{peso húmedo} - \text{peso seco}}{\text{peso seco}} \quad (1)$$

Con ello se midió la masa de agua absorbida por cada gramo de polímero seco (xerogel). Esta misma ecuación fue empleada para calcular posteriormente la cantidad de solución de iones cobalto absorbida por el hidrogel.

Método 2: los xerogeles fueron inmersos en soluciones acuosas 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 M de NaOH, con un tiempo de residencia de 48 h a temperatura constante de 30 °C. Una vez concluido el periodo de tiempo se retiraron de la solución de NaOH y se colocaron en las soluciones de CoCl_2 . El objetivo fue medir el efecto de la concentración de los iones OH^- presentes en el hidrogel sobre la capacidad de este para remover los iones Co^{+2} .

Método 3: los hidrogeles previamente hinchados en las soluciones acuosas 0,1 M se colocaron en soluciones de ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) de distinta concentración. La remoción de metales se llevó a cabo sin agitación con un tiempo de residencia de los hidrogeles en estas soluciones de 48 h a una temperatura constante de 30 °C.

Método 4: los hidrogeles empleados en la remoción de los iones Co^{+2} fueron lavados con agua bi-distilada y posteriormente se colocaron una estufa de vacío a 50 °C hasta alcanzar peso constante, para ser reutilizados en el proceso. Se evaluó la capacidad del hidrogel para remover iones Co^{+2} en función del número de veces (ciclos) que se ha utilizado.

Una vez que se concluyó el tiempo de residencia del hidrogel en la solución de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ la solución residual fue decantada de tal manera que los primeros 15 ml se recolectaron para

la medición del cobalto residual, mediante espectroscopia UV vis, empleando un espectrofotómetro de marca UNICO modelo 250, y una curva de calibración construida previamente con base en lo reportado para el uso de esta técnica²⁰. El material sólido se colocó en una estufa de vacío a 50 °C para su secado. Todos los experimentos se realizaron por triplicado, reportándose los valores con desviaciones estándar menores al 5%.

Para determinar la efectividad del uso de hidrogeles en la remoción de los iones Co^{+2} , se realizó una prueba de co-precipitación química en solución, para ello se prepararon soluciones acuosas de 1800 ppm de $(\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O})$ a las cuales se les adicionó un volumen determinado de solución 0,1 M de NaOH, cuyo objetivo fue encontrar la relación molar entre los iones Co^{+2} y los iones OH^- a la cual se logra precipitar la mayor cantidad de $\text{Co}(\text{OH})_2$ sin la presencia del hidrogel, este estudio fue la referencia para evaluar la efectividad de los hidrogeles, es decir, si se logra mejorar la remoción de iones Co^{+2} con la presencia de los hidrogeles.

Resultados

En la prueba de co-precipitación química se encontró que en un valor de relación molar de iones $\text{OH}^-/\text{Co}^{+2}$ igual a 2,55 se removió el 90% del total de cobalto disuelto (figura 1). Al incrementar este valor la remoción de iones metálicos no fue significativa y la cantidad de solución de NaOH 0,1 M que debía adicionarse se incrementó de manera apreciable como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. % de recuperación de iones cobalto como función de la proporción de moles de NaOH adicionados por cada mol de cobalto, cuando se mezclan soluciones de 1000 ppm de cobalto con soluciones 0,1 Molar de NaOH.

NaOH (mL)	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
CoCl_2 (mL)	38	36	34	32	30	28	26	24	22	20	18
% recuperación	3,62	5,92	15,76	22,32	39,55	55,05	73,94	91,21	95,70	95,28	93,14
moles $\text{OH}^-/\text{mol Co}$	0,16	0,35	0,55	0,78	1,04	1,33	1,68	2,07	2,55	3,11	3,79

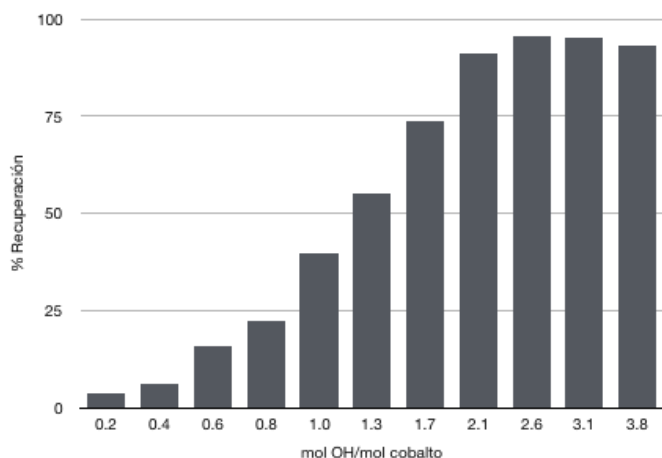


Fig. 1: % de recuperación de iones cobalto como una función de la proporción de moles de sosa adicionados por cada mol de cobalto, cuando se mezclan soluciones de 1800 ppm. de cobalto con soluciones 0,1 M de NaOH.

Los resultados obtenidos mediante el método A se presentan en la tabla 2, se encontró que para la relación 100/1 gramo de solución 0,1 M de NaOH/gramo de xerogel (g sln NaOH 0,1 M/xerogel), la cantidad de solución captada por el hidrogel fue de 61,4 gramos de solución 0,1 M de NaOH/gramo de xerogel (W_{NaOH}) en 48 h, una vez que este hidrogel fue colocado en la solución acuosa de cloruro de cobalto se obtuvo un hinchamiento de 34,3 gramos de solución de cobalto 1000 ppm/gramo de xerogel (W_{Co}) recuperando el 95% del cobalto inicial presente en la solución (% Co_{rec}) o una relación másica de 0,099 gramos de Co^{+2} / gramos de xerogel empleado ($g_{\text{Co}}/g_{\text{xerogel}}$) con una relación molar de OH^-/Co igual a 1,91 ($\text{mol}_{\text{OH}^-}/\text{mol}_{\text{Co}}$), valores similares de porcentaje de iones Co^{+2} removidos se encontraron para las relaciones 125/1 y 150/1. En la tabla 2, se muestra que la cantidad de metal removido por cada gramo de xerogel se incrementó al aumentar la cantidad de solución de NaOH donde sumergió el xerogel previamente, se obtuvo un valor de remoción máximo de 0,155 gramos de cobalto por cada gramo de xerogel, lo que representa el 94% del metal presente originalmente. El resto de las muestras alcanzó un porcentaje de remoción similar, excepto la muestra 50/1 que sólo fue capaz de remover el 39% de del ion metálico disuelto inicialmente, lo cual es debido a que el hinchamiento para esta muestra fue de 48,2 gramos de solución de NaOH 0,1 M/gramo de xerogel, lo que representa casi la totalidad de la solución colocada inicialmente, por lo que no había suficiente solución para que el proceso de hinchamiento continuara, por lo que la cantidad de iones OH^- presentes dentro del hidrogel está restringido al existente en la solución de NaOH, por esta razón esta muestra presentó una baja remoción del metal.

Como los hidrogeles son materiales heterogéneos, entonces la velocidad a la que absorben la solución en la cual se colocan pueden variar, lo cual se puede observar en la tabla 2, los valores de los hinchamientos presentan una desviación estándar aproximada del 10%, entre las muestras estudiadas, por lo que el análisis de remoción de iones Co^{+2} se realizó como una función de los iones OH^- presentes en el hidrogel en lugar del análisis por cada gramo de xerogel, tomando en cuenta el hinchamiento para cada muestra se encontró que la relación molar de $\text{OH}^-/\text{Co}^{+2}$ es la que permite remover la mayor cantidad de iones disueltos. Cuando la relación molar de $\text{OH}^-/\text{Co}^{+2}$ incrementa como en las muestras de 50/1 y 65/1 la cantidad de iones removidos es menor. Con esto se puede afirmar que el uso de hidrogeles para la remoción de iones cobalto es efectivo, ya que cuando sólo se lleva a cabo la co-precipitación química debe emplearse una relación molar de $\text{OH}^-/\text{Co}^{+2}$ igual a 2,1.

En la aplicación del método 2 se observó que un incremento en la concentración de las soluciones de NaOH [NaOH], en las cuales los xerogeles fueron hidratados provocó una disminución en la capacidad de absorción de iones Co^{+2} de los hidrogeles, esto se debe a que se disminuye el área superficial del hidrogel, que es el otro factor determinante para la remo-

Tabla 2. Recuperación de iones cobalto como una función de la proporción de sosa/xerogel, donde se sumerge el xerogel en soluciones 0,1 M de NaOH y en soluciones de 1000 ppm de cobalto.

$g_{\text{NaOH } 0,1 \text{ M}}/g_{\text{xerogel}}$ (masa)	$g_{\text{sln Co}^{+2}}/g_{\text{xerogel}}$ (masa)	W_{NaOH} ($g_{\text{sln NaOH}}/g_{\text{xerogel}}$)	W_{Co} ($g_{\text{sln Co}}/g_{\text{xerogel}}$)	%Co _{rec}	$g_{\text{Co}}/g_{\text{xerogel}}$	$\text{mol}_{\text{OH}^-}/\text{mol}_{\text{Co}}$
50	200	48,2	7,5	40,2	0,069	4,19
65	200	56,1	23,0	88,7	0,075	2,25
100	200	61,4	34,3	95,0	0,099	1,91
125	200	59,6	52,1	97,7	0,113	1,91
150	200	61,7	44,3	94,0	0,155	1,92

ción de iones cobalto, lo cual se puede observar en la tabla 3. Debido a la concentración de las soluciones de NaOH empleadas, la cantidad de moles de iones OH⁻ por mol de ion Co⁺² inicial en la solución se incrementa ($\text{mol}_{\text{NaOH}}/\text{mol}_{\text{Co}} \text{ inicial}$), provocando una disminución en la cantidad de iones removidos, en soluciones acuosa con concentración 0,1 y 0,5 M de NaOH sólo logro removerse ~60% (%rem) de la concentración inicial de iones Co⁺². En la tabla 3 se muestran también la masa de NaOH absorbida por gramo de xerogel ($m_{\text{NaOH}}/m_{\text{xerogel}}$).

Los resultados del método 3 se muestran a continuación. Los hidrogeles hinchados en las soluciones de NaOH fueron sumergidos en soluciones de 1000 ppm de CoCl₂·6H₂O, incrementando la relación gramos de solución de Co/gramo de xerogel ($g_{\text{sln Co}}/g_{\text{xerogel}}$); se encontró que la cantidad de cobalto removido por los hidrogeles alcanzó un valor de $g_{\text{sln Co}}/g_{\text{xerogel}} = 0,27$ cuando la relación $g_{\text{sln Co}}/g_{\text{xerogel}}$ fue de 300/1, lo que representa el 90% de iones Co⁺² removidos (%Co_{rec}). Estos resultados se muestran en la tabla 4.

La relación $g_{\text{Co}}/g_{\text{xerogel}}$ incrementa a 0,35 para una relación másica de 750 $g_{\text{sln Co}}/g_{\text{xerogel}}$, con una relación $\text{mol}_{\text{OH}^-}/\text{mol}_{\text{Co}}$ de 1,76, este valor es menor a la relación $\text{mol}_{\text{OH}^-}/\text{mol}_{\text{Co}} = 2,1$ obtenida en las muestras de co-precipitación química. Sin embargo, los hidrogeles colocados en estas muestras presentan cambios bruscos en su capacidad de absorber la solución de Co⁺², debido a la presencia de iones cobalto en exceso con respecto de los iones OH⁻, por lo que cuando la reacción de precipitación ha terminado y los iones OH⁻ están agotados, los iones Co⁺² presentes en la solución provocan la formación de pliegues en el hidrogel cuando estos colapsan, en estos pliegues se depositan iones cobalto sin reaccionar ($g_{\text{sal}}/g_{\text{xerogel}}$) provocando un aumento en la remoción de los iones cobalto mayor a la remoción obtenida en la co-precipitación química.

Debido a que los experimentos fueron realizados sin agitación, se modificó el volumen de agua utilizado en la remoción de los iones metálicos, manteniendo la relación de g cobalto/g xerogel en el valor de 0,1, se encontró que el volumen de agua utilizado no es factor que modifique la capacidad del hidrogel

Tabla 3. Recuperación de iones cobalto como una función de la concentración de NaOH de la solución donde se sumerge el xerogel y colocados posteriormente en soluciones de 1000 ppm. de cobalto. Con una proporción de solución de metal/xerogel de 150/1.

[NaOH] (mol/L)	W_{NaOH} ($g_{\text{sln}}/g_{\text{xerogel}}$)	W_{Co} ($g_{\text{slnCo}}/g_{\text{xerogel}}$)	$\text{mol}_{\text{NaOH}}/\text{mol}_{\text{Co}} \text{ inicial}$	%Co _{rec}	$m_{\text{NaOH}}/m_{\text{xerogel}}$ ($g_{\text{sln}}/g_{\text{xerogel}}$)	$g_{\text{sln NaOH}}/g_{\text{xerogel}}$ ($g_{\text{sln}}/g_{\text{xerogel}}$)
0,10	72,73	103,93	284	86,86	150	151
0,20	61,76	115,47	4,91	94,60	150	150
0,30	53,80	112,50	6,39	89,06	150	193
0,40	44,75	91,29	7,28	58,09	150	151
0,50	60,95	112,40	11,98	65,16	150	151

Tabla 4. Extracción de iones cobalto como una función de la proporción de solución de cobalto/xerogel, desde soluciones de 1000 ppm de Cobalto, los xerogel fueron colocados en una proporción de sosa/xerogel de 150/1.

$g_{\text{sln Co}}/g_{\text{xerogel}}$	W_{NaOH} ($g_{\text{sln}}/g_{\text{xerogel}}$)	W_{Co} ($g_{\text{slnCo}}/g_{\text{xerogel}}$)	%Co _{rec}	$g_{\text{Co}}/g_{\text{xerogel}}$	$g_{\text{sal}}/g_{\text{xerogel}}$	$\text{mol}_{\text{OH}^-}/\text{mol}_{\text{Co}}$
100	98,83	141,09	76,30	0,08	0,41	7,18
200	91,96	129,51	81,22	0,16	0,81	3,34
300	92,68	44,47	90,37	0,27	1,21	1,99
496	85,42	5,24	60,52	0,30	2,01	1,65
750	105,67	5,18	46,89	0,35	3,04	1,76
1000	80,25	3,16	27,08	0,27	4,05	1,72

en la remoción del metal. La cantidad de iones cobalto removido fue de 85% (Tabla 5), esto demuestra que el hidrogel puede remover iones cobalto hasta en una proporción de 4333/1 g de solución/g de xerogel lo cual lo puede realizar sin el proceso de agitación. Para determinar el límite de detección y eliminación de los iones cobalto se colocó una muestra de xerogel en una solución de 22 ppm de cobalto con una proporción de gramos de solución de Co^{+2} /g de xerogel igual a 15000/1: En la figura 2 se puede observar el sólido formado en la superficie del hidrogel a esta proporción, con lo cual podemos establecer un proceso en el que los hidrogeles presentes pueden ayudar a remover iones Co^{+2} al nivel de trazas químicas.

Tabla 5. Remoción de iones cobalto como una función de la proporción de solución/xerogel, pero manteniendo la proporción de sal/xerogel en cada solución del metal estudiada, esta proporción fue de 0,40g de sal por cada gramo de xerogel.

$g_{\text{sln}}/g_{\text{xer}}$	$[\text{Co}]_{\text{inicial}}$	W_{NaOH}	W_{Co}	$g_{\text{Co}}/g_{\text{xerogel}}$	$[\text{Co}]_{\text{final}}$	
		$(g_{\text{sln}}/g_{\text{xerogel}})$	$(g_{\text{sln}}/g_{\text{xerogel}})$	$\% \text{Co}_{\text{rec}}$		
100	976	58,43	64,88	91,08	0,089	96,47
200	482	68,75	131,63	82,89	0,080	121,48
300	341	67,60	137,09	75,46	0,077	108,97
400	253	69,56	182,09	76,22	0,077	83,97
500	195	52,37	147,45	71,74	0,070	58,96
1000	107	57,05	213,24	70,00	0,072	21,4461
4000	24	67,13	350,70	67,94	0,066	8,9421
4336	22	70,10	327,62	99,00	0,097	<8,9421

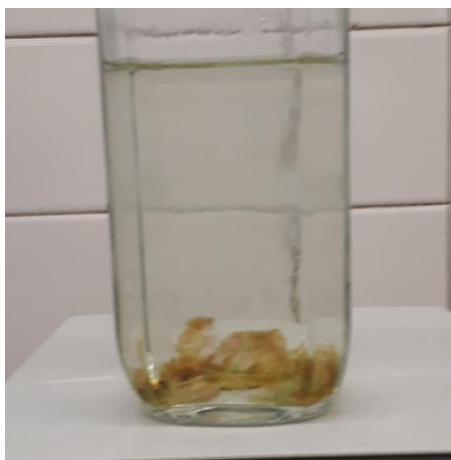


Fig. 2: Cobalto depositado en la superficie del hidrogel después del proceso de remoción.

En el método 4 estudiamos la cantidad de veces que se puede utilizar el hidrogel para el proceso de remoción de cobalto (Ciclos), después de cada experimento de remoción de iones cobalto realizado, el hidrogel fue removido de la solución del metal y se sumergió en una solución fresca de NaOH 0,1 M, en la cantidad suficiente para que la proporción de gramos de solución 0,1 M de NaOH/ gramos de xerogel fue de 125/1 en masa. La muestra de hidrogel fue utilizada en 8 ocasiones y la capacidad de remoción de cobalto disminuyó en 24% con

Tabla 6. Extracciones de iones cobalto en función del número de ocasiones en que se utilizó el hidrogel a 30 °C, con una proporción de NaOH/xerogel de 125/1, relación de solución de cobalto/xerogel de 250/1 con una concentración de 1000 ppm.

Ciclo	$\% \text{Co}_{\text{rec}}$	$g_{\text{Co}}/g_{\text{xerogel}}$	W_{NaOH}	W_{Co}	$[\text{Co}]_{\text{final}}$	$\text{mol}_{\text{OH}^-}/\text{mol}_{\text{Co}}$
			$(g_{\text{sln}}/g_{\text{xerogel}})$	$(g_{\text{sln}}/g_{\text{xerogel}})$	(ppm)	
1	89,9	0,21	64,8	20,6	86	1,78
2	79,9	0,19	55,8	5,2	168	1,69
3	36,4	0,17	51,4	9,1	352	3,29
4	68,0	0,16	41,0	13,4	291	1,47
5	70,2	0,16	37,3	14,3	264	1,33
6	67,4	0,16	35,1	15,1	305	1,25
7	77,8	0,18	40,1	18,2	195	1,27
8	77,8	0,18	43,0	18,9	236	1,37

respecto al primer ciclo. Cuando se analizó la cantidad de moles de iones OH^- necesarios para remover iones Co^{+2} , se encontró una disminución con respecto al parámetro establecido como punto de comparación con la co-precipitación química ($\text{mol}_{\text{OH}^-}/\text{mol}_{\text{Co}^{+2}} = 0,21$, tabla 6). En todos los casos la cantidad de Co^{+2} fue $\sim 0,19 g_{\text{Co}}/g_{\text{xerogel}}$. Finalmente, se modificó el pH de la solución de iones cobalto mediante la adición de HCl o NaOH para determinar el efecto sobre la remoción de iones cobalto; se encontró que no existe un cambio significativo en el intervalo de pH = 3 hasta pH = 12, donde se remueven en promedio $0,19 g_{\text{Co}}/g_{\text{xerogel}}$ cuando se emplearon soluciones de $\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ de 1500 ppm. Solo a pH = 1 no existe formación de hidróxido de cobalto sólido y se removió el 3% de los iones metálicos presentes por la absorción del metal en el hidrogel, esto debido a que los iones OH^- contenidos en el hidrogel primero son neutralizados con los iones H^+ de la solución y los iones restantes reaccionan con los Co^{+2} residuales formando el hidróxido correspondiente, el cual no es suficiente para que se forme una cantidad de sólido que se pueda observar, debido a que este sólido disperso no absorbe en la región UV donde si lo hacen los iones. Para la solución con un valor de pH = 2, se formó una pequeña cantidad de sólido, similar a la solución con pH = 1; cabe mencionar que la cantidad de cobalto removido por la absorción del hidrogel tiene valores semejantes a los encontrados en estudios previos de hidrogeles empleados en la remoción de iones metálicos¹⁰. En la tabla 7 se presentan los datos encontrados en este experimento.

En la figura 3 se resume el proceso de extracción de los iones cobalto: el xerogel es hidratado en la solución 0,1 M de NaOH durante 48 h (a); posteriormente, el hidrogel hinchado se sumergió en la solución acuosa de iones cobalto en la figura y se puede observar cómo se inicia el proceso de precipitación de los iones cobalto al formarse el hidróxido de cobalto (b); la remoción de los iones cobalto continúa y con ello la purificación del agua (c); el hidrogel es retirado de la solución acuosa de iones Co^{+2} con el hidróxido formado en su superficie y entre los pliegues del hidrogel iones metálicos, fueron lavados con agua bidestilada y posteriormente colocados de nuevo en

una solución fresca 0,1 M de NaOH (d); la solución residual de cobalto se decanta para llevar a cabo la recuperación del hidróxido de cobalto formado (e); finalmente, se puede observar la clarificación de la solución y el precipitado verde/azulado del sólido obtenido (f).

Tabla 7. Extracción de iones cobalto como una función del pH de la solución de iones cobalto, con una concentración de 1500 ppm. de cobalto, una proporción de 125 gramos de solución de NaOH por cada gramo de xerogel y una relación de 200 gramos de solución por cada gramo de xerogel

pH	W_{NaOH}	W_{Co}	$[Co]_{final}$	$g_{Co}/g_{xerogel}$	
	($g_{sln}/g_{xerogel}$)	($g_{sln}/g_{xerogel}$)	(ppm)	% Co_{rec}	
1	61	9	1134	5,70	0,02
2	53	11	1197	4,39	0,01
3	58	8	622	48,99	0,15
4	54	14	522	56,52	0,16
5	54	11	472	61,57	0,18
6	61	16	384	63,62	0,19
8	60	9	447	63,87	0,20
9	58	14	397	59,79	0,18
10	57	18	434	66,59	0,21
11	64	21	484	64,34	0,21
12	53	35	409	71,44	0,22

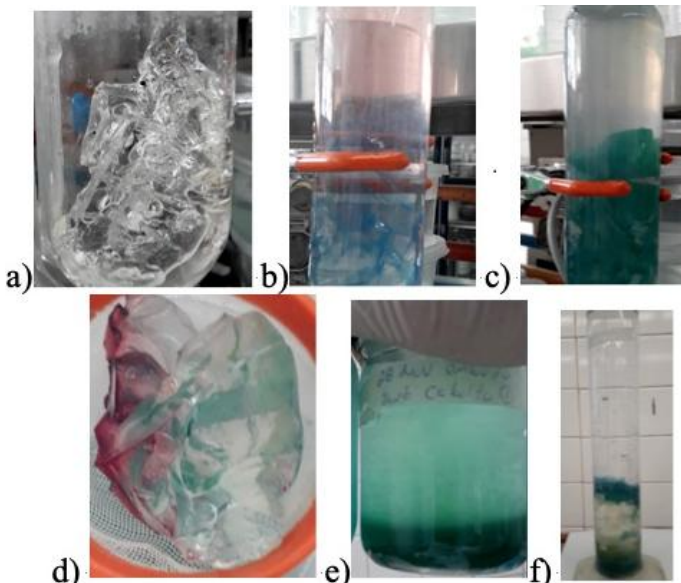


Fig. 3: Resumen el proceso de extracción de los iones cobalto mediante el uso de hidrogeles de acrilamida/ácido itacónico.

Conclusiones

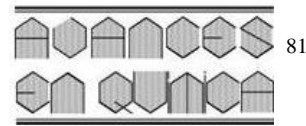
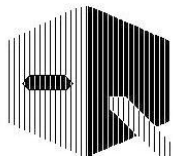
En el presente trabajo se llevó a cabo la comparación entre la técnica de co-precipitación química y el uso de hidrogeles en la capacidad para remover iones Co^{+2} disueltos en soluciones acuosas. Los hidrogeles empleados compuestos de poli (acrilamida-co-ácido itacónico) 80/20 mostraron una mayor capacidad en la remoción de estos iones metálicos al actuar como medio de transporte y suministro de iones OH^- , los cuales reaccionan con el Co^{+2} disuelto formando el $Co(OH)_2$ sobre la

superficie del hidrogel. La concentración de iones metálicos iniciales en solución no mostró un efecto significativo en la capacidad de remoción del hidrogel, pero sí lo hizo la concentración de iones OH^- , pues a mayor concentración de ésta menor capacidad de remoción de Co^{+2} . Además, el pH de la solución de iones metálicos no mostró efectos significativos en la capacidad de remoción del hidrogel entre valores de pH entre 3 y 12. Finalmente, se logró la remoción de los iones metálicos en soluciones con una concentración inicial de 22 ppm, con una proporción de 4333/1 respecto del xerogel, con lo que se presenta un nuevo método para remover y recuperar iones cobalto en soluciones diluidas; los experimentos fueron llevados a cabo sin necesidad de agitación mecánica y modificando las dimensiones geométricas de los recipientes donde se realizaron los experimentos, lo cual no mostró efectos significativos en la capacidad de remoción de iones Co^{+2} del hidrogel.

Referencias

1. J Lu, DY Dreisinger, T Glüc. Cobalt electrowinning – A systematic investigation for high quality electrolytic cobalt production. **Hydrometallurgy**, **178(6)**, 19-29 (2018).
2. F Mazur, L Liu, H Li, J Huang, R Chandrawati. Core-satellite gold nanoparticle biosensors for monitoring cobalt ions in biological samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **268(9)**, 182-187 (2018).
3. Y Tian, L Xu, J Bao, J Qian, H Su, H Li *et al.* Hollow cobalt oxide nanoparticles embedded in nitrogen-doped carbon nanosheets as an efficient bifunctional catalyst for Zn-air battery. **J. Energy Chemistry**, **33(6)**, 59-66(2018).
4. J Yun, D Park, SY Jung, J Wang. Fabrication of nanosized cobalt powder from Cobalt(II) hydroxide of spent lithium ion battery. **Applied Surface Science**, **415(9)**, 80-84(2017).
5. M Amara, H Kerdjoudj, A Bouguelia, M Trari. A combination between membrane selectivity and photoelectrochemistry to the separation of copper, zinc and nickel in aqueous solutions. **J. Membrane Science**, **312**, 125-131 (2008).
6. ZVP Murthy, LB Chaudhari. Application of nanofiltration for the rejection of nickel ions from aqueous solutions and estimation of membrane transport parameters. **J. Hazardous Materials**, **160**, 70-77 (2008).
7. X Chen, G Huang, J Wang. Electrochemical reduction/oxidation in the treatment of heavy metal wastewater. **J. Metallurgical Engineering**, **2**, 161-164 (2013).
8. F Akbal, S Camc. Copper, chromium and nickel removal from metal plating wastewater by electrocoagulation. **Desalination**, **269**, 214-222 (2011).
9. B Pospiech, W Walkowiak. Separation of copper (II), cobalt (II) and nickel (II) from choride solutions by polymer inclusion membranes. **Sep. Purif. Technol.**, **57**, 461-465 (2007).
10. K Dermentzis. Removal of nickel from electroplating rinse waters using electrostatic shielding electro dialysis/electrodeionization. **J. Hazardous Materials**, **173**, 647-652 (2009).

11. G Ortega, P Medina, M Falcon, J Ariza, A Remedios. Comportamiento de la extracción y selectividad de níquel y cobalto de colas amoniacales con ácido piroleñoso de bagazo de caña. **Tecnología Química**, **30(2)**, 58-66(2010).
12. Y Ramírez, E Fernández, A Palacios. Recuperación de cobalto por extracción con ácidos orgánicos a partir del licor de desecho de la empresa Ernesto Ché Guevara. **Revista Cubana de Química**, **17(1)**, 32-29(2005).
13. M Penedo, E Manals, F Vendrell, D Salas. Aplicación de carbón activado de cascarón de coco en adsorción de especies metálicas contenidas en el licor de desecho (WL) de la lixiviación ácida de mineral laterítico. **Tecnología Química**, **36(1)**, 117-129(2015).
14. A Ramirez, H Atudillo, L Prin, B Rojas de Gáscue. Evaluación de hidrogeles de acrilamida-co-ácido itacónico en la disminución se iones de Fe con potenciales usos en plantas para tratamientos de aguas potabilizadoras. **Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales**, **5**, 32-25(2012).
15. N Tapia, M Oliveira, A Yarango, N Rojas. Estudio de la biosorción del Cu(II) por gránulos del biopolímero de alginato de calcio. **Revista Peruana de Química e Ingeniería Química**, **6(1)** 37-42 (2003).
16. C Alvarez, J Cortes. Use of pH-thermosensitive hydrogels for nickel ion removal and recovery. **Polímeros**, **27(1)**, 35-40 (2017).
17. S.E. Mansour, I.H. Hasieb, H.A. Khalaf. Removal of cobalt from drinking water by alternating current electrocoagulation technique. **J. Applied Sciences (Faisalabad)**, **12(8)**, 787-792 (2012).
18. G Ketsela, Z Animen, A Talema. Adsorption of Lead (II), Cobalt (II) and Iron (II) From Aqueous Solution by Activated Carbon Prepared From White Lupine (GIBITO) HSUK. **J. Thermodynamics and Catalysis**, **11**, 203- (2020).
19. J Correa, M Valadez, G Carbajal, J Cortes. Síntesis de hidróxidos de níquel utilizando hidrogeles de acrilamida-ácido crotonico. XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México A.C, Puebla, México, pags. 78-80 (2018).
Disponible: http://www.sociedadpolimerica.org.mx/sites/default/files/Extensos_XXXI_SPM_2018_compressed.pdf
- 20 SO Camelino, M Minchiotti, R Bariles, RL Padilla, J Colazo. Optimización de un procedimiento para la determinación de oro mediante espectrofotometría UV/Vis. **Revista Matéria**, **23(2)**, artículo e-12005 (2018).
Disponible: <https://www.scielo.br/pdf/rmat/v23n2/1517-7076-rmat-23-02-e12005.pdf>



Disminución de polifenoles totales y taninos en residuales sólidos procedentes del beneficio de café para la producción de lipasas

Jessica Ponce-Rodríguez^{1*}, Anlly Vilcacundo-Alcívar², Francisco Macías-Menéndez², Ernesto Alonso Rosero-Delgado², Yunet Gómez-Salcedo²

¹⁾ Maestría en Ingeniería Química, Instituto de Posgrado, Universidad Técnica de Manabí, Portoviejo, Av. Urbina y Che Guevara, Portoviejo, Manabí, Ecuador.

²⁾ Carrera de Ingeniería Química, Facultad de Ciencias Matemáticas, Físicas y Químicas, Universidad Técnica de Manabí (UTM), Portoviejo, Manabí, Ecuador.

(*) j.ponce.3@hotmail.com

Recibido: 03/12/2020

Revisado: 17/12/2020

Aceptado: 27/12/2020

Resumen

Se determinó del residual de café la humedad, proteína, nitrógeno y lignina. Se evaluaron los efectos de la temperatura y el tiempo de exposición del pre-tratamiento alcalino en la disminución de polifenoles totales y taninos, obteniendo un mejor resultado a una temperatura igual a 73 °C y un tiempo de 20 min. Posteriormente, se obtuvieron las condiciones óptimas de fermentación mediante la evaluación de los efectos del pH y la temperatura sobre la actividad de la lipasa. Como resultado, se obtuvo que los valores óptimos de pH y temperatura fueron 3,5 y 35 °C respectivamente, obteniendo una actividad de lipasa de $99,44 \pm 3,47 \text{ U} \cdot \text{gS}^{-1}$, demostrando el uso de los sólidos del beneficio del café como sustrato en la obtención de lipasa.

Palabras clave: *Aspergillus niger*; biomasa; lipasa; polifenoles; taninos

Abstract

Reduction of total polyphenols and tannins in solid residues from coffee processing for lipase production. Moisture, protein, nitrogen and lignin from the coffee residual were determined. The effects of the temperature and the exposure time of the alkaline pretreatment in the reduction of total polyphenols and tannins were evaluated. A better result at a temperature equal to 73 °C and a time of 20 min was found. Subsequently, the optimal pH and temperature conditions effects on lipase activity were evaluated. As a result, the optimal pH and temperature values were 3.5 and 35 °C respectively, obtaining a lipase activity of $99.44 \pm 3.47 \text{ U} \cdot \text{gS}^{-1}$, proving these the use of coffee processing solids as a substrate in obtaining lipase.

Keywords: *Aspergillus niger*; Biomass; Lipase; Polyphenols; Tannins

Introducción

Uno de los efectos negativos que acompaña el crecimiento de la agroindustria es el aumento de residuos orgánicos. Algunos de estos residuos son tratados inadecuadamente, lo que produce contaminación ambiental y molestias por presencia de olores, proliferación de roedores e insectos, entre otros efectos negativos¹. Una posible respuesta a esta problemática, además de las alternativas de tratamientos de residuales, es su aprovechamiento a través de procesos biotecnológicos, como la fermentación en estado sólido, para la obtención de productos de interés económico como enzimas u otros metabolitos^{2,3}.

La agroindustria del café genera un gran volumen de residuos, que en la actualidad constituyen una problemática a nivel ambiental, además, de ser un tema de investigación⁴. Los residuos sólidos de la etapa del beneficio del café representan alrededor del 50% de la masa total⁵. Estos residuos están

compuestos por la cáscara, la piel y la pulpa del café⁶, los cuales son productos ricos en materia orgánica, lo que podrían hacerlos adecuados para la elaboración de productos de interés científico y comercial, como la elaboración de bioetanol⁷ o la producción de enzimas⁸ como la lipasa, la cual tiene importantes aplicaciones en la industria alimentaria, como la producción de grasas con propiedades físicas y químicas deseables⁹. Para que estos residuos sean aptos para el proceso de fermentación en estado sólido, es necesario someterlos a pre-tratamientos para la disminución de su contenido de lignina¹⁰. Según Ortiz¹¹, para lograr la hidrólisis de este compuesto se han propuestos diversos pre-tratamientos, entre los cuales se encuentran los físicos como: mecánicos y térmicos; y los químicos empleando ácidos, bases o la combinación de ambos. El pre-tratamiento alcalino es un método eficaz para la remoción de lignina, que consiste en la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos, una rotura de

la estructura de la lignina y en la solubilización, redistribución y condensación de la lignina¹².

Por otro lado, una característica de estos residuos es que contienen sustancias como polifenoles, taninos y cafeína en su composición¹³. Entre estas sustancias, los polifenoles y taninos son los más dañinos, atribuyéndoles propiedades recalcitrantes durante la biodegradación del residual¹⁴ y efectos inhibidores en las enzimas¹⁵. Estas características conllevan a que los pre-tratamientos químicos o biológicos también tengan como objetivo la transformación de la composición de estos residuales, en cuanto al contenido de taninos.

La presente investigación tiene como objetivo, determinar las transformaciones que ocurren en la composición del residual sólido del beneficio del café, durante el pre-tratamiento alcalino, y la propuesta de las condiciones de temperatura y pH más favorables para la actividad de la lipasa, implicada en la fermentación del residual.

Materiales y métodos

Procedencia y manejo del residuo de café

El residual consiste en pulpa y cáscara de café de la especie *Coffea arabica* L., procedente de la etapa de beneficio del fruto, recolectada en el sitio San Pablo (zona rural), cantón Jipijapa en la provincia de Manabí. Posterior a la colecta, el residual se almacenó en bolsas plásticas herméticas a 4 °C, hasta su empleo en la experimentación.

El residual se secó, en un secador con circulación de aire a una temperatura de 60 °C¹⁶, hasta obtener una humedad inferior a 13%¹⁷. El contenido de humedad se determinó mediante un analizador marca Boeco, modelo BMA I50. El material seco se trituró y tamizó para obtener partículas con un tamaño promedio de 11,5 mm¹⁸.

Caracterización del residual

El residual se caracterizó en cuanto al contenido de proteínas y nitrógeno por el método Kjeldahl, de acuerdo a el método oficial descrito por la AOAC¹⁹ y contenido de lignina mediante el método de Klason, descrito por Godoy²⁰ y por Schwanninger²¹.

Pre-tratamiento alcalino

El pre-tratamiento alcalino se desarrolló según la metodología descrita por Menezes²². Para cada tratamiento, se procedió a mezclar 100 g de muestra del residual sólido y 1 L de hidróxido de sodio, durante un tiempo, una concentración de hidróxido de sodio y temperatura de exposición, definido por el diseño experimental (tablas 1 y 2). En el pre-tratamiento de la tabla 1, se evaluaron dos factores: el tiempo y la temperatura de exposición al pre-tratamiento a una concentración de hidróxido de sodio al 6% y, en el pre-tratamiento de la tabla 2, se evaluaron los factores concentración de hidróxido y tiempo a una temperatura de 121 °C. El residual pre-tratado se recuperó mediante filtración y lavado con 1,5 L de agua destilada

a 70 °C, de acuerdo al método propuesto por Chen²³. Después del lavado, el residual pre-tratado se secó en una mufla (Thermo Scientific THERMOLYN 48010) a una temperatura de 60 °C por 6 horas, para eliminar el exceso de agua.

Tabla 1. Pre-tratamiento alcalino temperatura-tiempo

Variable	-1	0	1
Temperatura (°C)	25	73	121
Tiempo (min)	20	40	60

-1 nivel bajo (25 °C, 20 min), 0 nivel medio (73 °C, 40 min), 1 nivel alto (121 °C, 60 min)

Tabla 2. Pre-tratamiento alcalino tiempo-concentración

Variable	-1	0	1
[NaOH] (%p/p)	2	4	6
Tiempo (min)	20	40	60

-1 nivel bajo (25 %, 20 min), 0 nivel medio (4 %, 40 min), 1 nivel alto (6 %, 60 min)

Se realizaron pruebas de normalidad y homocedasticidad, en las que se constató que los datos cumplen con una distribución normal y que la varianza de los errores de la variable respuesta es constante. Posteriormente se efectuó un análisis de varianza (ANOVA), con la finalidad de determinar si existían diferencias en el efecto de los pre-tratamientos. Las diferencias entre las medias de los tratamientos se calcularon mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando el software estadístico software Statgraphics Centurion XV.

Determinación de polifenoles totales

La extracción de polifenoles se realizó del residual sólido, antes y después del pretratamiento, de acuerdo a las condiciones óptimas reportadas en investigaciones anteriores²⁴. Para la cuantificación de polifenoles totales, se midieron 60 µL de la muestra a la que se agregaron 4,74 mL de agua destilada y 300 µL del reactivo Folin & Ciocalteu's phenol reagent, la mezcla se homogenizó utilizando el Pulsing vortex mixer (Fisher Scientific 022L5375), se esperó el tiempo de reacción (máximo 8 min).

Se añadieron 900 µL, de una solución de carbonato de sodio anhidro granular al 20%, y la solución resultante se almacenó a 20 °C durante dos horas. El blanco se preparó de igual forma, pero empleando agua destilada en lugar de muestra, correspondiendo a un volumen de 4,8 mL, para luego leer su concentración a 730 nm en un Espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Fisher Scientific – Evolution 60S). Los resultados se expresaron en equivalentes de ácido gálico (mg GAE.g⁻¹).

Cuantificación de taninos totales

La cuantificación se realizó por diferencia de polifenoles totales y polifenoles no tánicos. Se mezclaron 100 mL del extracto del residual sólido del beneficio de café, con 50 mL de solución de gelatina al 0,25%/100 mL de solución ácida de

cloruro de sodio y 20 g de caolín en polvo. La mezcla se agitó durante 15 min. Este método fue aplicado de acuerdo a lo mencionado por Bajaj²⁵. Seguidamente el sobrenadante se centrifugó (Eppendorf Centrifuge 5804 R) a 5000 rpm durante 5 minutos y 25 °C.

Posteriormente a la centrifugación se observó un precipitado que corresponde a los compuestos tánicos de la muestra y en el sobrenadante los polifenoles no tánicos; por lo tanto, a la muestra sobrenadante se le aplica el método descrito anteriormente para cuantificación de polifenoles totales, lo cual corresponderá al valor de polifenoles no tánicos presentes en el residual.

Preparación de la solución de esporas para la fermentación

La solución de las esporas se obtuvo siguiendo la metodología descrita por Gutiérrez²⁶, con algunas modificaciones. Se tomó el microorganismo (*Aspergillus niger*) y se inoculó en varios matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían como medio, 30 mL del agar papa dextrosa (PDA). Posteriormente se procedió con la incubación (Incubadora MEMMERT SN30) a 30°C durante siete días, hasta que se observó la superficie del agar completamente cubierta de esporas. Posteriormente, a cada matraz se le añadieron aproximadamente 20 mL de una solución de elementos trazas, previamente esterilizada, compuesta por FeSO₄·7H₂O 0,005 g/L, CuSO₄·5H₂O 0,001 g/L, MnSO₄·7H₂O 0,0015 g/L, ZnSO₄·7H₂O 0,003 g/L y 1 g/L de aceite de oliva.

Luego, los matraces se colocaron en una zaranda a 120 rpm por 30 minutos. El contenido de cada matraz se filtró a través de papel de Ø=125 mm y filtros de jeringa (Thermo Scientific™ PTFE Target2™) de 0,45 µm. El filtrado se recogió en un recipiente estéril y almacenó a 4 °C. El conteo del número de esporas por mL se llevó a cabo en la cámara de Neubauer.

Fermentación en estado sólido

Las condiciones de pre-tratamiento, a las que se somete el residual previo a la fermentación, se determinaron previamente²⁷. Se empleó una solución de NaOH a una concentración de 6%, 60 min de exposición al pre-tratamiento y una temperatura de proceso de 35,67 °C. Para la preparación de la fermentación en estado sólido se siguió la metodología descrita por Vilcacundo-Alcívar²⁷. La preparación del inoculo del *A. niger* para la fermentación en estado sólido se realizó inoculando el hongo en matraces Erlenmeyer de 50 mL, que contenían 5 gramos del residual hidrolizado, 1,5% (p/p sólido seco) de aceite de oliva como inductor para la producción de enzimas lipasas, una solución de 10⁷ esporas/g sólido seco y sulfato de amonio suficiente para tener una relación C/N 12:1, necesario para el crecimiento del *A. niger*, el medio tenía un rango de humedad relativa entre 78 – 85%.

Para la fermentación sólida se evaluó diseño experimental factorial n^k, con 2 factores y 3 niveles, diseñado por medio del software Statgraphics Centurion XV. Los factores que se analizaron fueron pH y temperatura en la fermentación en estado

sólido. Como variable de respuesta, se midió la actividad de lipasa. El pH fue regulado mediante la adición de ácido clorhídrico 1 N. El diseño experimental se describe en la tabla 3.

Tabla 3. Fermentación en estado sólido

Variable	-1	0	1
pH	3,5	5,5	7,5
Temperatura (°C)	25	35	45

-1 nivel bajo (3,5; 25 °C), 0 nivel medio (5,5; 35°C min), 1 nivel alto (7,5; 45 °C)

Determinación de lipasas

Para la determinación de lipasas se siguió la metodología descrita por Nema²⁸. En general, la actividad enzimática se puede expresar en términos de unidades por mililitro o unidades por gramo de sustrato seco y puede ser calculada mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de lipasa } \left(\frac{U}{gS} \right) = \frac{A * C}{E} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde A = mL de NaOH consumido por minuto; C = concentración de NaOH [mM]; E = concentración de la muestra en g/mL; U/gS = µmol de ácidos grasos liberados por minuto por gramo de sustrato sólido seco del que se ha extraído la enzima.

Resultados y discusión

Caracterización del residual

El contenido de humedad del residual fue de 74,4502 ± 2,35%. El contenido de nitrógeno y proteínas 1,32 ± 0,00 % y 8,28 ± 0,02 %, respectivamente, siendo estos resultados similares a los reportados en estudios anteriores^{29,30}. El porcentaje de lignina en el residual fue de 13,13 ± 0,06 %, un valor cercano a los reportados por Giroto³¹ y Gurrám³². Las diferencias que se encuentran en la literatura en cuanto a la composición del residual, se deben a diferentes factores entre ellos el tiempo de cosecha, condiciones de cultivo, la variedad del café utilizado o a las diferentes propiedades del residual debido a las diferencias de suelo y clima.

Pre-tratamiento alcalino

En la tabla 4 se muestran los resultados, donde se evaluó el efecto de la temperatura, la concentración de NaOH y el tiempo de exposición del residual al pre-tratamiento alcalino en la disminución de la concentración de polifenoles y taninos. Los resultados del ANOVA (tablas 5 y 6) presentaron una diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$) y, mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey, se demostró que existen diferencias significativas en la concentración de polifenoles y taninos entre las medias de la variantes temperatura (25, 73 y 121 °C), concentración de NaOH (2, 4 y 6%) y tiempo de exposición (20, 40 y 60 min), utilizando un nivel de confianza del 95%. Se demostró la existencia de diferencias significativas entre las variantes de tiempo y concentración de hidróxido

de sodio; sin embargo, en el caso de la temperatura no hubo una diferencia significativa entre 25 y 73 °C.

Tabla 4. Efecto del tiempo de exposición, concentración de Na(OH) y la temperatura en la concentración de los polifenoles totales y taninos del residual sólido del café

Variantes	T (°C)	t (min)	NaOH (%)	Taninos* (mgGAE.g ⁻¹)	Polifenoles totales* (mgGAE.g ⁻¹)
Inicial	-	-	-	10,32 ± 1,47	12,66 ± 1,76
1	25	20	6	3,81 ± 0,65	4,72 ± 0,68
2	25	40	6	3,96 ± 0,34	4,82 ± 0,33
3	25	60	6	4,26 ± 0,21	5,07 ± 0,23
4	73	20	6	3,15 ± 0,22	4,08 ± 0,48
5	73	40	6	4,11 ± 0,18	5,15 ± 0,21
6	73	60	6	5,66 ± 0,21	6,84 ± 0,26
7	121	20	6	5,18 ± 0,33	6,24 ± 0,25
8	121	40	6	6,10 ± 0,21	8,33 ± 0,01
9	121	60	6	8,83 ± 0,66	12,06 ± 0,56
10	121	20	4	6,49 ± 0,02	7,97 ± 0,02
11	121	40	4	6,56 ± 0,28	8,80 ± 0,01
12	121	60	4	7,30 ± 0,59	9,51 ± 1,04
13	121	20	2	6,97 ± 0,16	9,16 ± 0,01
14	121	40	2	7,66 ± 1,57	9,31 ± 1,52
15	121	60	2	7,89 ± 0,86	10,88 ± 0,97

*Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones ± la desviación estándar

Tabla 5. Análisis de varianza para los taninos en el pre-tratamiento alcalino.

FACTOR	GL	F VALOR	P VALOR
A	2	27,17	3,48x10 ⁻¹¹
B	2	12,66	1,03x10 ⁻⁰⁴
C	2	5,30	0,01
A:B	4	6,55	6,52x10 ⁻⁰⁴
A:C	0	-	-
B:C	4	6,92	4,54x10 ⁻⁰⁴
A:B:C	0	-	-

A: Temperatura, B: Tiempo, C: Concentración

Tabla 6. Análisis de varianza para los polifenoles en el pre-tratamiento alcalino

FACTOR	GL	F VALOR	P VALOR
A	2	113,415	1,03x10 ⁻¹⁴
B	2	20,806	2,15x10 ⁻⁰⁶
C	2	7,436	2,38x10 ⁻⁰³
A:B	4	15,172	6,86x10 ⁻⁰⁷
A:C	0	-	-
B:C	4	12,153	5,45x10 ⁻⁰⁶
A:B:C	0	-	-

A: Temperatura, B: Tiempo, C: Concentración

Según el análisis estadístico, en cuanto a la disminución en la concentración de polifenoles y taninos, el tratamiento más efectivo fue la variante 4 (temperatura de 73 °C y un tiempo de exposición de 20 min), con una disminución de polifenoles totales de 12,66 ± 1,76 a 4,08 ± 0,478 mg GAE·g⁻¹ y de taninos de 10,32 ± 1,47 a 3,15 ± 0,217 mg GAE·g⁻¹. Con estos resultados se puede sugerir que el pre-tratamiento alcalino influye sobre la composición del residual, provocando la reducción del contenido de polifenoles totales y taninos. Esta reducción podría afectar en forma positiva a procesos de biodegradación, debido que los polifenoles y taninos son compuestos resistentes a la descomposición microbiana¹⁴. Sin embargo, este tratamiento también demostró tener un porcentaje de remoción de lignina igual a 28,32%²⁷, el cual es significativamente más bajo que el de otros estudios similares³³, esto se debió principalmente porque la condición de pre-tratamiento en la que se obtuvo una mayor disminución de polifenoles y taninos no fue tan agresiva.

Fermentación en estado sólido

Los resultados del efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad enzimática se muestran en la tabla 7. Mediante el análisis de varianza ANOVA (tabla 8), realizado a los valores de las variables respuesta de un total de 27 muestras de los diferentes tratamientos, se constató que el pH y la temperatura afectan de manera estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$) a la actividad enzimática. Mediante la prueba de rangos múltiples de Tukey (tablas 9 y 10) se determinó que no existen diferencias de medias cuando la temperatura es de 25 o 45 °C, teniendo una actividad enzimática mayor a la temperatura de 35 °C. En el caso del pH, se determinó que existen diferencias entre las medias, siendo el pH de 3,5 el que logró mayor actividad enzimática. El valor de pH obtenido se encuentra dentro del rango esperado ya que un pH extremadamente ácido (menor a 1,5) puede producir una inhibición en el crecimiento fúngico. Por el contrario, un pH muy alcalino podría disminuir

Tabla 7. Efecto de la temperatura y el pH en la actividad enzimática (lipasa).

Variantes	TEMPERATURA (°C)	PH	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA (U/GS)
1	45	7,5	44,44 ± 5,09
2	45	5,5	56,67 ± 6,67
3	45	3,5	72,22 ± 5,09
4	35	7,5	50,56 ± 3,47
5	35	5,5	61,44 ± 4,67
6	35	3,5	99,44 ± 3,47
7	25	7,5	59,89 ± 1,17
8	25	5,5	60,22 ± 0,38
9	25	3,5	64,00 ± 0,67

Los valores corresponden al promedio de tres determinaciones ± la desviación estándar

Tabla 8. Análisis de varianza para la fermentación en estado sólido

FACTOR	GL	F VALOR	P VALOR
TEMPERATURA	2	24,11	$8,10 \times 10^{-06}$
PH	2	107,86	$9,53 \times 10^{-11}$
TEMPERATURA:PH	4	26,43	$2,54 \times 10^{-07}$

Tabla 9. Prueba *post-hoc* para la temperatura en la fermentación en estado sólido.

	TEMPERATURA		SUBCONJUNTO	
	(°C)	N	1	2
DHS de Tukey ^{a,b}	45	9	57,78	
	25	9	61,37	
	35	9		70,48
Sig.			0,17	1,00

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

^a Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000. ^b Alfa = 0,05

Tabla 10. Prueba *post-hoc* para el pH en la fermentación en estado sólido.

	pH	N	SUBCONJUNTO		
			1	2	3
DHS de Tukey ^{a,b}	7,5	9	51,63		
	5,5	9		59,45	
	3,5	9			78,56
Sig.			1,00	1,00	1,00

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

^a Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 9,000. ^b Alfa = 0,05

la actividad lipolítica, puesto que un medio con este carácter, junto con la acumulación de las proteasas produce inestabilidad en la enzima³⁴. Por otro lado, en el caso de la temperatura, si la temperatura es muy alta podría provocar una desnaturalización de la enzima³⁵, lo que podría explicar que la actividad de lipasa sea menor a una temperatura de 45°C.

En la figura 1 se muestra el diagrama de Pareto estandarizado para la fermentación en estado sólido. Esta herramienta identifica los factores que exhiben un mayor efecto acumulativo

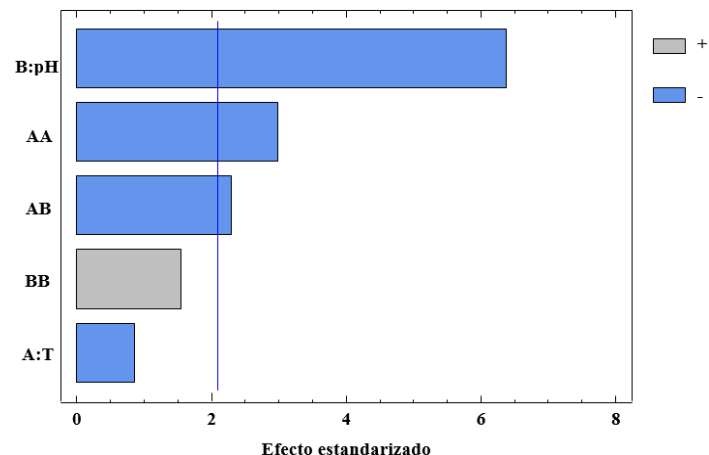


Fig. 1: Diagrama de Pareto.

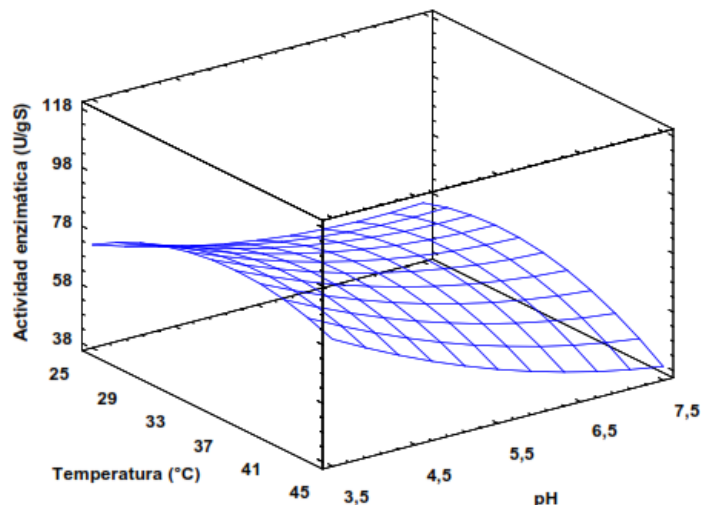


Fig. 2: Diagrama de superficie respuesta.

sobre la variable respuesta y representa gráficamente los efectos estandarizados para cada factor. La figura muestra que, al modificar los valores del pH, por el efecto cuadrático de la temperatura y las interacciones pH-temperatura, existe un efecto inversamente proporcional sobre la variable respuesta; la actividad enzimática. Por lo tanto, se estableció que a medida que aumenta el pH y la temperatura, disminuye la actividad enzimática.

La actividad enzimática disminuye a la vez que el pH se vuelve más alcalino, mientras que para el caso de la temperatura el mejor valor se encuentra cerca de 35 °C (Fig. 2). Los resultados muestran que la actividad enzimática es más eficiente en un pH de 3,5 y a una temperatura alrededor de 35 °C.

La mejor condición de fermentación fue la combinación de un pH de 3,5 y una temperatura de 35 °C, obteniendo $99,44 \pm 3,47$ U/gS. Este resultado fue mayor al reportado por Damaso³⁶, utilizando residuos agroindustriales suplementados con subproductos del proceso de refinado de aceite de maíz o aceite de oliva como sustrato, y *A. niger* como microorganismo. Sin embargo, la actividad enzimática obtenida fue menor a la reportada por Mohseni³⁷, al utilizar salvado de arroz como sustrato y el microorganismo *A. niger*. Estas diferencias entre los resultados se deben al sustrato empleado, al método de pre-tratamiento que se usó y las condiciones de fermentación utilizadas en cada experimento.

Conclusiones

El pre-tratamiento alcalino mostro tener un efecto en la disminución de los polifenoles, se observó que a una temperatura de 73 °C y un tiempo de 20 minutos mostro tener una mayor disminución en la concentración de polifenoles y taninos; sin embargo, el pre-tratamiento antes mencionado también demostró tener una remoción de lignina menor a la esperada, en comparación con los pre-tratamientos a una temperatura y tiempo mayor.

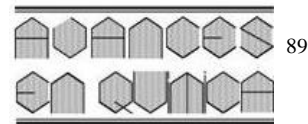
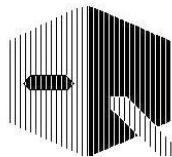
Por otro lado, el pH y temperatura óptimos para tener una mayor actividad enzimática fue de 3,5 y 35 °C, respectiva-

mente, obteniendo un resultado de $99,44 \pm 3,47$ U/gS, valor que confirma el posible uso de los residuos sólidos del beneficio del café como sustrato para la obtención de lipasa, aprovechando un subproducto que de otra manera sería desechado ocasionando un grave daño al medio ambiente.

Referencias

1. YA Vargas-Corredor, LI Pérez-Pérez. Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. **Revista Facultad de Ciencias Básicas**, **14(1)**, 59–72 (2018).
2. AS Franca, LS Oliveira. Alternative uses for coffee husks: A solid waste from green coffee production. **Ingeniería Química, Biológica y Ambiental**, 21–24 (2009).
3. S Saval. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales: Pasado, Presente y Futuro. **BioTecnología**, **16(2)**, 14–46 (2012).
4. JE Wong, S Guyot, R Rodríguez, G Gutiérrez, JC Contreras, G Saucedo, CN Aguilar. Alternativas Actuales para el Manejo Sustentable de los Residuos de la Industria del Café en México. **Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila**, **5(10)**, 33–40 (2013).
5. D Pujol, C Liu, J Gominho, MA Olivella, N Fiol, I Villaescusa, H Pereira. The chemical composition of exhausted coffee waste. **Industrial Crops and Products**, **50**, 423–429 (2013).
6. R Ravindran, GA Williams, AK Jaiswal. Spent coffee waste as a potential media component for xylanase production and potential application in juice enrichment. **Foods**, **8(11)**, 585 (2019).
7. EG Menezes, JR do Carmo, AG Menezes, GL Alves, CJ Pimenta, F Queiroz. Use of different extracts of coffee pulp for the production of bioethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **169(2)**, 673–687 (2013).
8. P Murthy, M Naidu. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. **World Applied Sciences Journal**, **8(2)**, 199–205 (2010).
9. AE Aceves, LM Castañeda. Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. **Vitae**, **19(3)**, 244–247 (2012).
10. JS Kim, YY Lee, TH Kim. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, **199**, 42–48 (2016).
11. WG Ortiz. Tratamientos aplicables a materiales lignocelulósicos para la obtención de etanol y productos químicos. **Revista de Tecnología**, **13(1)**, 33–44 (2016).
12. EM Cardona, JA Rios, JD Peña, LA Rios. Pre-tratamiento Alcalino de Pasto Elefante (*Pennisetum sp*) y King Grass (*Pennisetum hybridum*) Cultivados en Colombia para la Producción de Bioetanol. **Informacion Tecnológica**, **24(5)**, 69–80 (2013).
13. CM Machado, CR Soccol, BH De Oliveira, A Pandey. Gibberellic acid production by solid-state fermentation in coffee husk. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **102(1)**, 179–191 (2002).
14. CN Aguilar, M Cruz, R Rodríguez, G Gutierrez-Sánchez, A Ramírez-Coronel, C Augur. Catechin degradation by several fungal strains isolated from Mexican desert. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, **14(2)**, 426–429 (2004).
15. W Tejerina, R Farfán, C Cuevas. Efectos del amoniaco, sulfuro y taninos sobre la actividad de un lodo anaerobico. **Avances En Energías Renovables y Medio Ambiente**, **11**, 23–28 (2007).
16. J Serna, L Torres, K Martínez, M Hernández. Aprovechamiento de la pulpa de café como alternativa de valorización de subproductos. **Revista Ion**, **31(1)**, 39 (2018).
17. R Bermúdez, N García, M Serrano, M Rodríguez, I Mustelie. Conversión de residuales agroindustriales en productos de valor agregado por fermentación en estado sólido. **Tecnología Química**, **34(3)**, 263–274 (2014).
18. J Shi, Z Pan, TH McHugh, D Wood, Y Zhu, RJ Avena-Bustillos, E Hirschberg. Effect of berry size and sodium hydroxide pretreatment on the drying characteristics of blueberries under infrared radiation heating. **Journal of Food Science**, **73(6)**, 259–265 (2008).
19. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Methods of analysis of association of official analytical chemists. AOAC International, United States (2019).
20. E.A Godoy, JC De Carvalho, AM Alves, DA Lazo. Estudio del contenido y la calidad de la lignina mediante pirólisis analítica en madera de *Pinus caribaea*. **Maderas: Ciencia y Tecnología**, **9(2)**, 179–188 (2007).
21. M Schwanninger, B Hinterstoisser. Klason lignin: Modifications to improve the precision of the standardized determination. **Holzforschung**, **56(2)**, 161–166 (2002).
22. EG Menezes, JR do Carmo, JG Alves, AG Menezes, IC Guimarães, F Queiroz, CJ Pimenta. Optimization of alkaline pretreatment of coffee pulp for production of bioethanol. **Biotechnology Progress**, **30(2)**, 451–462 (2014).
23. Y Chen, RR Sharma-Shivappa, D Keshwani, C Chen. Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, **142(3)**, 276–290 (2007).
24. SI Mussatto, LF Ballesteros, S Martins, JA Teixeira. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. **Separation and Purification Technology**, **83(1)**, 173–179 (2011).
25. KL Bajaj, AK Devsharma. A colorimetric method for the determination of tannins in tea. **Mikrochimica Acta**, **68(3–4)**, 249–253 (1977).
26. Y Gutiérrez, J Dustet, J Martínez. Estudio de la etapa de fermentación para producir una lipasa de *A. niger* con potencialidades para la aplicación en la industria alimenticia. Tesis de Maestría. Instituto Superior Politécnico “José Antonio Echeverría”, Ciudad La Habana, Cuba (2008).

27. A Vilcacundo-Alcívar, F Macías-Menéndez, J Ponce-Rodríguez, Y Gómez-Salcedo, E Rosero-Delgado. (En prensa). Evaluación del proceso de hidrólisis de residuales sólidos del beneficio de café para la producción de enzimas lipasas. **Bases de la Ciencia**, **5(3)**, (2020)
28. A Nema, S Patnala, V Mandari, S Kota, S Devarai. Production and optimization of lipase using *Aspergillus niger* MTCC 872 by solid-state fermentation. **Bulletin of the National Research Centre**, **43(1)**, 1-8 (2019).
29. M Encalada, P Fernández, N Jumbo, A Quichimbo. Ensilaje de pulpa de café con la aplicación de aditivos, en el cantón Loja. **Bosques Latitud Cero**, **7(2)**, 71-82 (2017).
30. AN Salazar, RS Acuña, MG de Salcedo. Composición química de la pulpa de café a diferentes tiempos de ensilaje para su uso potencial en la alimentación animal. **Zootecnia Tropical**, **27(2)**, 135–141 (2009).
31. F Giroto, MC Lavagnolo, A Pivato. Spent Coffee Grounds Alkaline Pre-treatment as Biorefinery Option to Enhance their Anaerobic Digestion Yield. **Waste and Biomass Valorization**, **9(12)**, 2565–2570 (2018).
32. R Gurram, M Al-Shannag, S Knapp, T Das, E Singaas, M Alkasrawi. Technical possibilities of bioethanol production from coffee pulp: A renewable feedstock. **Clean Technologies and Environmental Policy**, **18(1)**, 269–278 (2016).
33. J Zhu, C Wan, Y Li. Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment. **Bioresource Technology**, **101(19)**, 7523–7528 (2010).
34. MC Cujilema-Quitio, G León-Revelo, MR Porro, L Taramona-Ruiz, L Ramos-Sanchez. Producción de lipasas por fermentación sólida con *Aspergillus niger*: influencia del pH. **Revista Centro Azúcar**, **45**, 1–9 (2018).
35. OA Figueroa, JE Zapata, CP Sánchez. Optimización de la hidrólisis enzimática de proteínas de plasma bovino. **Informacion Tecnologica**, **27(2)**, 39–52 (2016).
36. MC Damaso, MA Passianoto, SC De Freitas, DM Freire, RC Lago, S Couri. Utilization of agroindustrial residues for lipase production by solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, **39(4)**, 676–681 (2008).
37. S Mohseni, GD Najafpour, Z Vaseghi, S Mahjoub. Solid State Fermentation of Agricultural Residues for Lipase in a Tray-Bioreactor. **World Applied Sciences Journal**, **16(7)**, 1034–1039 (2012).



Chalcone-Flavanone Equilibrium in the Isomeric Mixture: 2',3,4,4',6'-Pentahydroxychalcone and Eriodictyol from *Stevia lucida*

Pablo A. Chacon-Morales¹, Carolina Santiago-Dugarte^{1,2} Juan M. Amaro-Luis^{1*}

¹) Natural Products Laboratory, Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Los Andes, Mérida 5101, Venezuela

²) Biotechnology Engineering, Universidad Politécnica Salesiana, Km 19.5 Vía a la Costa, Guayaquil 090901, Ecuador

(*) jmamaroluis@gmail.com

Recibido: 29/09/2020

Revisado: 15/12/2020

Aceptado: 28/12/2020

Abstract

From the leaves and stems of *Stevia lucida* Lagasca (Asteraceae), an equilibrium chalcone-flavanone isomeric mixture, composed of 2',3,4,4',6'-pentahydroxychalcone (**8**) (eriodictyol-chalcone) and eriodictyol (**9**) [ratio **8/9** 5:3], was isolated as an isomorphous crystal. The mixture was structurally characterized by spectroscopic methods, including 1D- and 2D-NMR experiments. The presence of chalcones in the genus *Stevia* is reported here for the second time.

Keywords: Chalcones; Flavanones; Equilibrium Mixture; 2',3,4,4',6'-Pentahydroxychalcone; Eriodictyol; *Stevia*

Resumen

A partir de las hojas y tallos de *Stevia lucida* Lagasca (Asteraceae), se aisló una mezcla isomérica chalcona-flavanona en equilibrio, compuesta de 2',3,4,4',6'-pentahidroxichalcona (**8**) (eriodictyol-chalcona) y eriodictyol (**9**), como un cristal isomorfo en una proporción (**8/9**) 5:3. La mezcla se caracterizó estructuralmente mediante métodos espectroscópicos, incluidos experimentos de RMN 1D y 2D. La presencia de chalconas en el género *Stevia* se reporta aquí por segunda vez.

Palabras claves: chalconas; flavanonas; mezcla en equilibrio; 2',3,4,4',6' pentahidroxichalcona; eriodictyol; *Stevia*

Introduction

Flavonoids constitute one of the most important classes of naturally occurring phenols with interesting biological properties that demonstrate their great potential as treatment options to several human pathologies¹⁻⁴. The scientific literature on the wide range of biological and pharmacological activities of flavonoids is extensive and review articles abound⁵⁻¹². The so-called "minor flavonoids", among which stand out chalcones and flavanones, have received considerable attention in recent years, in the field of their biological activities¹³⁻¹⁸.

It is currently well established that, from a biosynthetic perspective, flavonoids originate through the "general phenylpropanoid pathway", starting with *L*-phenylalanine (**1**) and then transforming it into *trans*-cinnamic acid (**2**) which it is hydroxylated to *p*-coumaric acid (**3**) and this evolves by esterification to *p*-coumaroyl-CoA (**4**). On some plants, the latter (**4**) may be hydroxylated in position 3 to give caffeoyl-CoA (**5**), which can also serve as substrate in the next biosynthetic stage¹⁹⁻²¹ (Fig. 1). The known enzymes related to this pathway are phenylalanine ammonia-

lyase (PAL), cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H), *p*-coumarate:CoA ligase (4CL), and 4-coumaroyl:CoA 3-hydroxylase (CC3H)²². Since the mid-1970s, substantial progress has been made on plant cell suspension cultures and these were a valuable source for the isolation and characterization of flavonoid enzymes^{23,24}. The next biosynthetic stage carried out by the enzyme chalcone synthase (CHS)²⁵ focuses on the condensation of *p*-coumaroyl-coenzyme-CoA (**4**) with three molecules of malonyl-CoA (**5**) [generated by the reaction of acetyl-CoA and CO₂ catalyzed by acetyl: CoA carboxylase (ACC)] giving the C-15 intermediate 2',4,4',6'-tetrahydroxychalcone (**6**). The most important stage in flavonoid biosynthesis is that corresponding to the conversion of chalcone (**6**) into the flavanone naringenin (**7**) since all the other flavonoids are generated from the latter. This stage is catalyzed by the chalcone isomerase (CHI) enzyme, which generates a chalcone-flavanone equilibrium²⁶.

Stevia lucida Lagasca (Asteraceae) is a widely distributed species in the Venezuelan Andean Region²⁷. From a phytochemical point of view, we have studied this species for

more than three decades and have achieved to isolate and identify several steroids²⁸, flavonoids^{28,29}, diterpenes of the labdane³⁰ and *ent*-kaurane series including an interesting new *ent*-kaurenolido³¹, longipinane sesquiterpenes³², some eudesmanolides³³, and (+)-mellein²⁹, the first isocoumarin reported for the genus *Stevia*. 7 β ,9 α -dihydroxyongipin-2-en-1-one, the most abundant sesquiterpene in *S. lucida*, has been an excellent substrate for chemical reactions^{34,35}, particularly Wagner-Meerwein rearrangements³⁶⁻³⁸, which lead to new regrouped sesquiterpene skeletons. Other researchers have also investigated *S. lucida*, describing as components of this species a new labdane diterpenic acid³⁹ and several longipinene diesters⁴⁰.

Recently, we reported the isolation and characterization of the first three chalcones present in the genus *Stevia*⁴¹. Now, we describe a fourth chalcone, the 2',3,4,4',6'-pentahydroxy-chalcone (also called eriodictyol chalcone) (**8**) obtained from *Stevia lucida*, with the particularity that it is in its natural state in equilibrium with the corresponding flavanone eriodictyol (**9**). The mixture could not be separated by conventional chromatographic methods and it was characterized as such, through of a detailed spectral study that includes 1D and 2D-NMR techniques.

Experimental

General experimental procedures

Melting point was determined using a Fisher-Johns apparatus and it is uncorrected. UV spectra were obtained in a Perkin-

Elmer spectrophotometer, Lambda 3B, using quartz cells with 1 cm thick and methanol (Merck-Uvasol) as solvent. IR measurement was obtained on a Perkin-Elmer FT-1725X spectrophotometer as KBr pellets. 1D and 2D NMR spectra in DMSO-*d*₆ were acquired using a Bruker-Avance DRX-400 instrument, operating at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C. Mass spectra were recorded on a Hewlett-Packard mass spectrometer, model 5890 (70 eV). TLC were developed on 0.25 mm layers of silica gel PF 254 (Merck); spots were visualized using UV light (254 and 365 nm) and subsequently by spraying with a mixture *v/v* CH₃COOH-H₂O-H₂SO₄ (20:4:1) and then heating with air-flow at 100 °C for few minutes. VCC was performed with silica gel Merck 60 (63-200 μ m, 70-230 mesh).

Plant material

Plant material (leaves and stems) was collected at "Páramo de la Negra, Municipio Rivas Dávila, Estado Mérida, Venezuela". Species was identified as *Stevia lucida* Lagasca by Eng. Juan Carmona Arzola, Department of Pharmacognosy and Organic Medicaments, Faculty of Pharmacy and Bioanalysis, University of Los Andes (ULA); a *voucher specimen* (JM Amaro-Luis & P. Chacón, No. 2332) was deposited at the Herbario MERF of this faculty.

Extraction and purification of the equilibrium mixture of **8** and **9**

The dry uncrushed leaves and stems (\approx 4.0 kg) were exhaustively extracted with ethanol in a soxhlet. The obtained solu-

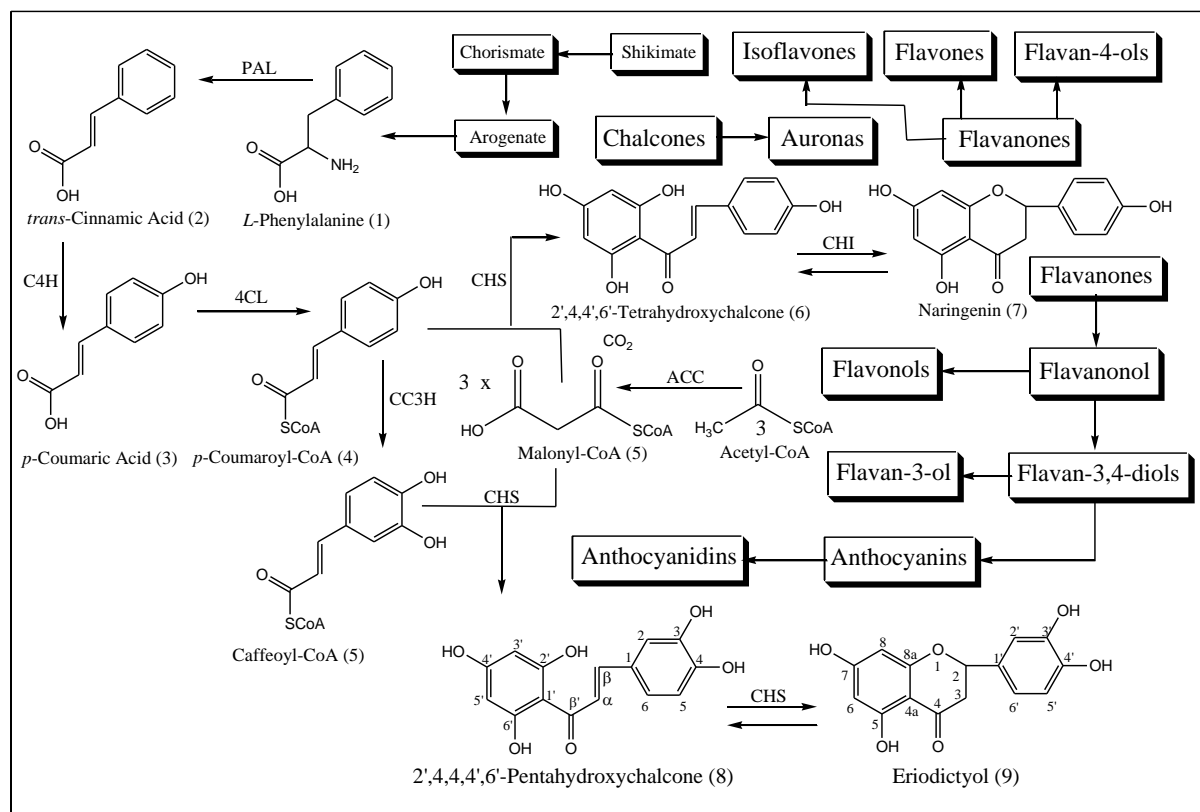


Fig. 1: Biosynthesis of Flavonoids.

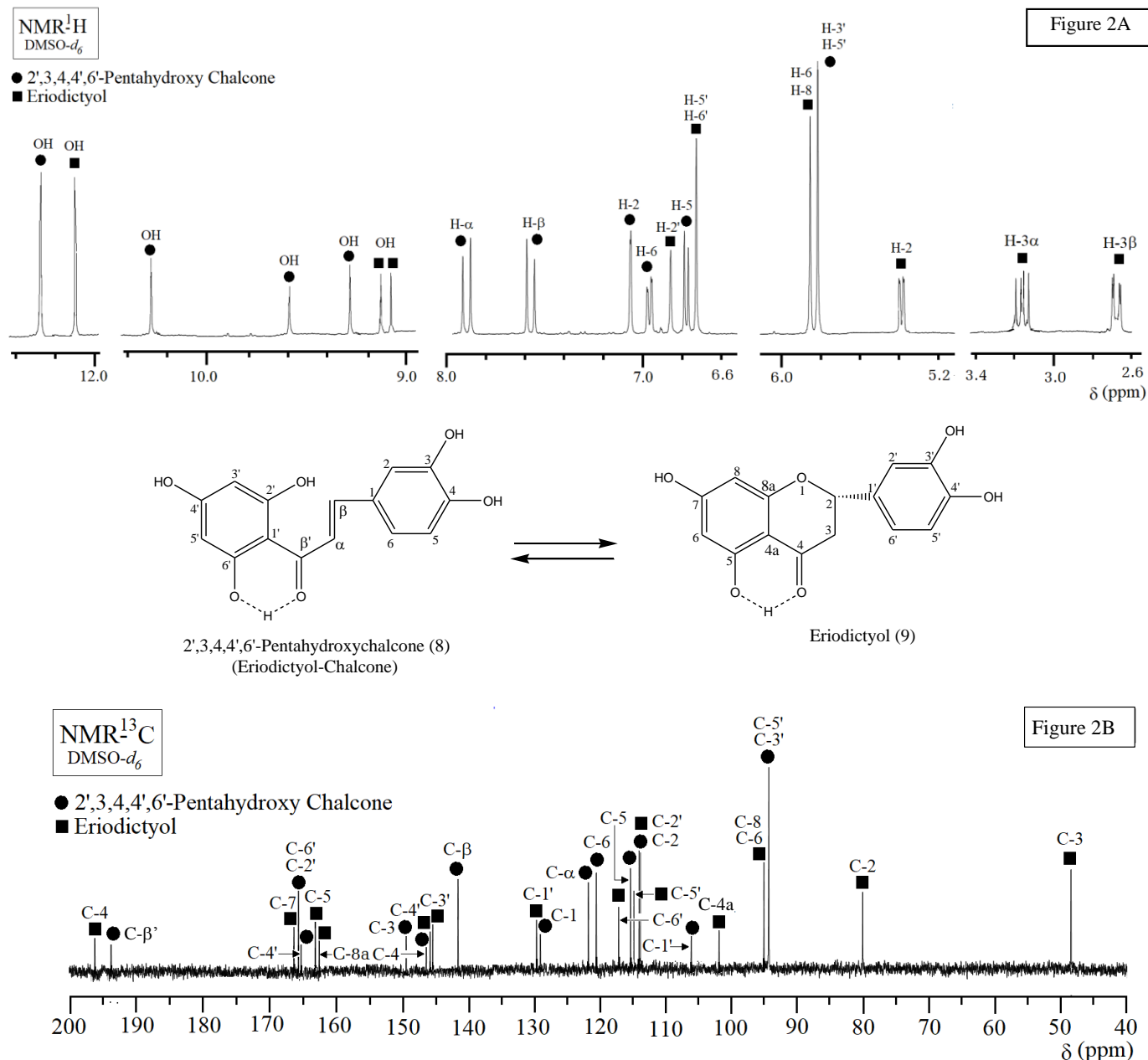


Fig. 2: ¹H NMR and ¹³C NMR spectra of 2'equilibrium 2',3,4,4',6' Pentahydroxychalcone (Eriodictyol-Chalcone) (**8**) and Eriodictyol (**9**).

tion was filtered and concentrated “*in vacuo*” in a rotary evaporator at temperature not exceeding 40 °C, to produce a crude extract (970 g), which was preadsorbed on silica gel and extracted successively with petroleum ether, acetone, and methanol, exhaustively in each case. Acetone-solution was concentrated under reduced pressure to dryness and a brown residue was obtained (\cong 270 g). The acetone extract was preadsorbed on silica gel and chromatographed (VLC) over silica gel 60, eluting with hexane and EtOAc in mixtures of increasing polarity. Fractions of 500 mL were collected and combined according to the TLC characteristics to afford twelve major fractions (A-L). Combined fraction “H” [53-57], eluted with hexane-EtOAc (2:3), was purified by repeated flash chromatography, Sephadex filtration chromatography,

preparative TLC and crystallization to furnish an isomorphous crystalline equilibrium mixture of **8** and **9**.

Equilibrium mixture of **8** and **9**

Liquid recovered by filtration after washing with methanol the scraped silica gel from the preparative TLC of combined fraction “H”, was concentrated to dryness yielding a pale yellow solid, whose chromatographic behavior was typical of a flavonoid. Crystallization in methanol gave yellow flakes; m.p. = 262-264 °C. $[\alpha]_D = -2.8^\circ$ (c, 0,5 MeOH). UV, λ_{\max} : (CH₃OH, nm) 225, 287, 330 (sh); IR, ν_{\max} . (cm⁻¹): 3363 (OH), 1636 (C=O), 1604 (C=C), 1521, 1447, 1160 and 1085 (C-O). EI-MS, *m/z* (%): 288 [M⁺] (69), 270 [M⁺-H₂O] (14), 179 (24), 166 (40), 163 (18), 153 (100), 152 (12), 136 (70), 123 (16).

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) Data corresponding to 2',3,4,4',6'-pentahydroxychalcone (**8**) $^{\bullet}$ δ_{H} : 7.94 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H- α), 7.61 (1H, d, $J = 15.5$ Hz, H- β), 5.88 (2H, s, H-3' and H-5'), 7.11 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2), 6.83 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-5), 7.02 (1H, dd, $J = 8.1$ and 1.7 Hz, H-6), 12.60 (1H, s, OH), 10.45 (1H, s, OH), 9.66 (1H, s, OH), 9.31 (1H, s, OH); Data corresponding to eriodictyol (**9**) $^{\blacksquare}$ δ_{H} : 5.41 (1H, dd, $J = 12.4$ and 3.0 Hz, H-2), 3.22 (1H, dd, $J = 17.1$ and 12.4 Hz, H-3 α ax), 2.71 (1H, dd, $J = 17.1$ and 3.0 Hz, H-3 β ec), 5.91 (2H, s, H-6 and H-8), 6.91 (1H, bs, H-2'), 6.78 (2H, bs, H-5' and H-6'), 9.08 (1H, s, OH), 9.08 (1H, s, OH), 12.18 (1H, s, OH). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ_{C} : 192.5 ($>\text{C}=\text{O}$, C- β'), 124.5 ($=\text{CH-}$, C- α), 143.7 ($=\text{CH-}$, C- β), 105.1 ($>\text{C=}$, C-1'), 165.3 ($=\text{C-O-}$, C-2'), 95.8 ($=\text{CH-}$, C-3'), 165.6 ($=\text{C-O-}$, C-4'), 95.8 ($=\text{CH-}$, C-5'), 165.3 ($=\text{C-O-}$, C-6'), 127.6 ($>\text{C=}$, C-1), 115.2 ($=\text{CH-}$, C-2), 146.6 ($=\text{C-O-}$, C-3), 149.4 ($=\text{C-O-}$, C-4), 116.8 ($=\text{CH-}$, C-5), 122.9 ($=\text{CH-}$, C-6); $\delta_{\text{C}}^{\blacksquare}$: 79.3 ($>\text{CH-}$, C-2), 43.0 ($>\text{CH}_2$, C-3), 197.2 ($>\text{C}=\text{O}$, C-4), 164.4 ($=\text{C-O-}$, C-5), 96.7 ($=\text{CH-}$, C-6), 167.5 ($=\text{C-O-}$, C-7), 96.7 ($=\text{CH-}$, C-8), 163.8 ($=\text{C-O-}$, C-8a), 102.7 ($>\text{C=}$, C-4a), 130.4 ($>\text{C=}$, C-1'), 115.3 ($=\text{CH-}$, C-2'), 146.1 ($=\text{C-O-}$, C-3'), 146.6 ($=\text{C-O-}$, C-4'), 116.3 ($=\text{CH-}$, C-5'), 118.8 ($=\text{CH-}$, C-6').

Results and Discussion

The equilibrium isomeric flavonoid mixture crystallized as yellow flakes; m.p. = 262-264 °C. The EI-MS shows a peak corresponding to a molecular ion at m/z : 288 [M^+] which, according to the NMR data, can be assigned to the molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$. The presence in its UV spectrum of three bands at λ_{max} : 225, 287, 330 (sh) indicates that it is a chalcone-flavanone mixture⁴². An overview of the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra (Fig. 2), clearly shows that it is a mixture of two compounds whose ratio is 5:3 (**8/9**). Analyzing both spectra in detail, together with the $^1\text{H-}^1\text{H}$ COSY, HMQC, and HMBC (Fig. 3) 2D-NMR spectra, the chalcone-related signals (identified with the sign " \bullet ") and those of the flavanone (identified with the sign " \blacksquare ") could be unequivocally assigned (see experimental; Fig. 2). Next, we will comment and discuss individually the data of each of the compounds that make up the mixture.

Compound (**8**): The molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$ revealed ten unsaturation degrees. ^{13}C NMR data analysis (Fig. 2B) allow the characterization in the molecule of functional groups completing eight degrees of unsaturation, a ketone [δ_{C} 192.5 ($>\text{C}=\text{O}$, C-1'')] and fourteen sp^2 carbons that form seven double bonds and therefore, the remaining unsaturation should correspond to two rings, forming a system composed of two benzene nuclei. The remaining spectral data allowed to conclude that this compound is the 2',3,4,4',6'-pentahydroxychalcone (eriodictyol chalcone).

This chalcone is not very abundant in Nature, having been sporadically isolated only from four species: *Galium verum* (Rubiaceae)⁴³, *Limonium cv. 'Gold Coast'* (Plumbaginaceae)⁴⁴, *Tulipa aff. 'Apeldoorn'* (Liliaceae)⁴⁵ and *Sorghum bicolor* (Poaceae)⁴⁶, however, it has been detected by GC/MS in the peel of tomato fruits *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae)⁴⁷, and in some medicinal plants: *Artemisia argyi* (Asteraceae)⁴⁸, *Populus sieboldii* (Salicaceae)⁴⁹ and *Pouteria lucuma* (Sapotaceae)⁵⁰. An interesting aspect to highlight is the frequency with which its biosynthesis from caffeoyl-CoA (**6**) has been induced in some plants by genetic engineering, using the enzyme chalcone synthase (CHS); in general, plants of nutritional interest have been used: Tomato (*Lycopersicon esculentum*)⁵¹, barley (*Hordeum vulgare*)⁵², rice (*Oryza sativa*)⁵³, carrot (*Daucus carota*)⁵⁴, apple (*Malus x domestica*)⁵⁵ and pear (*Pyrus communis*)⁵⁵, which support the possible interest of this chalcone as a phytochemical additive in the diet to be ingested in human consumption⁵⁶.

The spectrum of biological activity of this chalcone has been studied, highlighting its antioxidant activity (Rancimat Test // induction periods in lard at concentrations of 0.025, 0.05 and 0.1% = 20, 40, and 73 h, respectively)⁵⁷ and its relative DPPH radical scavenging equivalence (DPPH assay in acetone = 3.8 at 30 min. when tocopherol in ethanol was used as standard)⁵⁸. In an "in vitro" study on antimalarial activity, antiplasmodial effects were evaluated observing that (**8**), when it is given at 1 mM concentration, caused a relevant growth inhibition (88%) of 3D7 *Plasmodium falciparum* strain, after 48 hours incubation; in another experiment, the growth of the parasite was investigated when artemisinin, in sublethal doses ranging from 0.625 to 5.0 nM, was added to a 1.0 mM sample of (**8**), detecting considerable additive effects that induce a substantial potentiation of the antimalarial action of artemisinin⁵⁹.

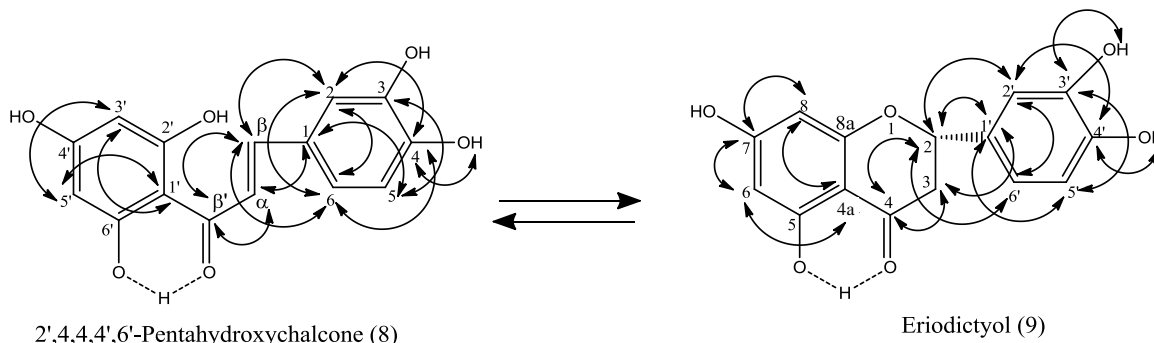


Fig. 3: HMBC Spectrum Correlations of 2',3,4,4',6'- Pentahydroxychalcone (Eriodictyol-Chalcone) (**8**) and Eriodictyol (**9**).

Another activity of notable interest is the capacity of (**8**) as an antidepressant agent, which was evaluated "in vivo" in mice; the activity of the compound, at a dose of 10 mg/kg, was measured using the forced swimming test, in which it was detected that the mean and standard error of the mean (\pm SEM) for the duration of immobility of ten mice was 98.5 ± 11.0 sec; this value qualifies (**8**) as a potent antidepressant since it has a $P < 0.01$ against Fluoxetine, a reference antidepressant drug⁶⁰. Finally, it is particularly notable that this chalcone exhibits an inhibitory effect on several enzymes such as phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) ($IC_{50} = 2.5$ and $8.2 \mu M$)⁶¹, protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) ($IC_{50} = 1.26 \mu M$)⁶², aromatase (CYP19A1) ($IC_{50} = 2.8 \mu M$)⁶³, 5-lipoxygenase (5-LOX) ($IC_{50} = 0.043 \mu M$)⁶⁴ and cyclooxygenase (COX) ($IC_{50} = 34.0 \mu M$)⁶⁴. Consequently, it could be stated that chalcone (**8**) seems to be a potential herbicide for its ability to inhibit PEPC, a promising candidate for the treatment of a variety of inflammatory and allergic diseases due to its action on 5-LOX and COX or a therapeutic approach to prevent the development and progression of breast cancer based on its activity on CYP19A1.

Compound (**9**): The signals (typified as signals ■) in the ¹H NMR and ¹³C NMR spectra corresponding to the second component of the mixture are congruent with those of a flavanone, which was identified with eriodictyol (3',4',5,7-tetrahydroxyflavanone). This flavanone was isolated for the first time in 1906 from *Eriodictyon californicum* (Hooker and Arnott) Greene, a California medicinal plant commonly known as "Yerba Santa"⁶⁵, but its structure was not definitively established until 1929, which was also unequivocally supported by its synthesis^{66,67}. Since then, this flavanone has been reported in many higher plants⁶⁸ and particularly in species of the genus *Citrus* (Rutaceae)⁶⁹.

From the biological and pharmacological point of view, eriodictyol has a wide spectrum of activities, as can be contrasted when analyzing the recent review of Islam *et al.*⁶⁸; however, it is appropriate to highlight the most recent papers on its anti-oxidants⁷⁰, anti-inflammatory⁷¹, cardiovascular⁷², and anti-carcinogenic^{73,74} activities, as well as the critical role it plays in diabetes mellitus⁷⁵. At this time, it is particularly interesting to note that eriodictyol is described as an interesting molecule for treating COVID-19, as it is revealed by rigorous studies using a molecular docking approach, via the world's most powerful supercomputer SUMMIT⁷⁶. In these studies, it was confirmed that eriodictyol might affect the life cycle of the SARS-CoV-2 virus by interacting with various amino acids and proteins, binding to multiple targets with efficient binding energy (between -6.7 and -8.8 kcal/mol) and within the active site⁷⁷; consequently, eriodictyol can become a multi-target molecule which can be a strong candidate for the treatment of coronavirus infection when repurposed against SARS-CoV-2.

In accordance with all the above and in harmony with the title of this article, it is appropriate to make some comments about the chalcone-flavanone equilibrium. The scientific literature reveals that it is rare to find this equilibrium type in the same plant species; however, the presence of the equilibrium 2',3,4,4',6'-pentahydroxychalcone (eriodictyol chalcone)-eriodictyol [(**8**) \rightleftharpoons (**9**)], has been reported in certain common plants such as tomato (*Lycopersicon esculentum*, Solanaceae)⁴⁷, sorghum (*Sorghum bicolor*, Poaceae)⁴⁶ and poplar *Populus sieboldii*, Salicaceae)⁴⁹ and also in incubations with plant enzyme preparations obtained from fresh vegetable materials such as flowers of defined genotypes of carnation (*Dianthus caryophyllus*, Caryophyllaceae)⁷⁸ or anthers and pollen of tulips (*Tulipa* *cf.* "Apeldoorn", Liliaceae)⁷⁹.

The synthetic cyclization of chalcones into flavanones and vice versa has been widely studied⁸⁰⁻⁸². Both processes have been carried out chemically using acids [acetic acid, trifluoroacetic acid, methane sulphonic acid, amino acids, Lewis acids and mineral acids such as HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, polyphosphoric acid, etc.], bases [alkali metal hydroxides, sodium acetate, potassium carbonate in acetone under reflux condition, amine bases, cobalt(II) Schiff-base], aqueous buffers at variable pH, acidic ion-exchange resin, phase-transfer catalysts, catalysis by Co(III)-salts complexes, bovine serum albumin (BSA), oxidizing agent as potassium ferricyanide, silica gel, zeolites, celite supported potassium fluoride, Amberlyst A-21, photochemical processes, thermal reactions at 60 °C in the solid-state or in the melt at 230 °C, microwave irradiation or under electrochemical conditions. It should be noted that the chalcone-flavanone equilibrium conforms a scaffold that can function as a dynamic covalent molecular switch, that is, a molecule that is capable of being reversibly biased towards two states in response to an external stimulus⁸³, the development of these systems (the so-called "molecular switches") have been a mature area of research during the last decade, as they have application in a variety of fields including sensors, chemical biology, and functional materials⁸⁴. Finally, the cyclization of chalcones can lead to flavonoids other than flavanones; an example of this is the transformation of the eriodictyol chalcone (**8**) into the aurone aureusidin, through a crude peroxidase, polyphenol oxidase (PPO)⁸⁵.

As conclusion, it is undeniable to say that in our case since we never use acids or bases in the extraction and isolation processes, the coexistence of the chalcone-flavanone equilibrium is natural, and must be regulated by the action of the enzyme chalcone isomerase (CHI). This equilibrium, being photo-synthetically originated, could be considered a dynamic covalent photoswitch.

Acknowledgments

The authors are grateful to CDCHT-ULA for financial support (Grant C-1935-15-08-ED). Thank are also due to Eng. Juan Carmo- na Arzola, Department of Pharmacognosy and Organic Medicaments, Faculty of Pharmacy and Bioanalysis, University of Los

Andes (ULA) for the identification of plant material. We also would like to thank Dr. Ángel E. Amesty, Instituto Universitario de Bio-Organica, Universidad de La Laguna. Tenerife, Spain, for the EIMS.

Conflicts of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- BH Havsteen. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, **96**, 67-202 (2002)
- CR Ferraz, TT Carvalho, MF Manchope, NA Artero, FS Rasquel-Oliveira, V Fattori, R Casagrande, WA Verri Jr. Therapeutic potential of flavonoids in pain and inflammation: Mechanisms of action, pre-clinical and clinical data, and pharmaceutical development. **Molecules**, **25**, 762-797 (2020).
- Â Bisol, P Santos de Campos, M Lazzaron Lamers. Flavonoids as anticancer therapies: A systematic review of clinical trials. **Phytother. Res.**, **34**, 568-582 (2020).
- SS Costa, JNSS Couceiro, ICV Silva, DC Malvar, MAS Coutinho, LMM Camargo, MF Muzitano, FA Vanderlinde. Flavonoids in the therapy and prophylaxis of flu: A patent review. **Expert Opin. Ther. Patents**, **22**, 1111-1121 (2012).
- MM Jucá, FMS Cysne Filho, J Cunha de Almeida, D da Silva Mesquita, J Rodrigues de Moraes Barriga, KC Ferreira Dias, TM Barbosa, L Costa Vasconcelos, LK Almeida Moreira Leal, JE Ribeiro, SM Mendes Vasconcelos. Flavonoids: Biological activities and therapeutic potential. **Nat. Prod. Res.**, **34**, 692-705 (2020).
- AM González-Paramás, B Ayuda-Durán, S Martínez, S González-Manzano, C Santos-Buelga. The mechanisms behind the biological activity of flavonoids. **Curr. Med. Chem.**, **26**, 6976-6985 (2019).
- S Kumar, AK Pandey. Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview. **The Scientific World Journal**, **13**, ID 162750 (2013).
- AK Verma, R Pratap. The biological potential of flavones. **Nat. Prod. Rep.**, **27**, 1571-1593 (2010).
- RJ Nijveldt, E van Nood, DEC van Hoorn, PG Boelens, K van Norren, PAM van Leeuwen. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr.**, **74**, 418-425 (2001).
- A Ahmad, M Kaleem, Z Ahmed, H Shafiq. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections-A review. **Food Res. Internat.**, **77**, 221-235 (2015).
- D Ravishankar, AK Rajora, F Greco, HMI Osborn. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. **Intern. J. Biochem. Cell Biol.**, **45**, 2821-2831 (2013).
- KE Heim, AR Tagliaferro, DJ Bobilya. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutrit. Biochem.**, **13**, 572-584 (2002).
- NK Sahu, SS Balbhadra, J Choudhary, DV Kohli. Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: A review. **Curr. Med. Chem.**, **19**, 209-225 (2012).
- AM Katsori, D Hadjipavlou-Litina. Recent progress in therapeutic applications of chalcones. **Expert Opin. Ther. Patents**, **21**, 1575-1596 (2011).
- DI Batovska, IT Todorova. Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones. **Curr. Clin. Pharmacol.**, **5**, 1-29 (2010).
- G Brahmachari. Naturally occurring flavanones: An overview. **Nat. Prod. Commun.**, **3**, 1337-1354 (2008).
- K Patel, GK Singh, DK Patel. A review on pharmacological and analytical aspects of naringenin. **Chin. J. Integr. Med.**, **24**, 551-560 (2018).
- A Roohbakhsh, H Parhiz, F Soltani, R Rezaee, M Iranshahi. Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin-A mini-review. **Life Sciences**, **113**, 1-6 (2014).
- G Forkmann, W Heller. Biosynthesis of flavonoids. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry, Vol 1 Polyketides and Other Secondary Metabolites Including Fatty Acids and Their Derivatives*. D Barton, K Nakanishi, O Meth-Cohn, U Sankawa (Eds), pp 713-748. Pergamon Press, London (1999).
- K Yonekura-Sakakibara, Y Higashi, R Nakabayashi. The origin and evolution of plant flavonoid metabolism. **Front. Plant Sci.**, **10**, 943 (2019).
- B Winkel-Shirley. Flavonoid biosynthesis, a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. **Plant Physiol.**, **126**, 485-493 (2001).
- JL Ferrer, MB Austin, C Stewart Jr., JP Noel. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiol. Biochem.**, **46**, 356-370 (2008).
- H Grisebach, K Hahlbrock. Enzymology and regulation of flavonoid and lignin biosynthesis in plants and plant cell suspension cultures. In: *Recent Advances in Phytochemistry, Vol. 8 Metabolism and Regulation of Secondary Plant Products*. VC Runeckles, EE Conn (Eds), pp 21-52. Academic Press. New York (1974).
- Y Wang, S Chen, O Yu. Metabolic engineering of flavonoids in plants and microorganisms. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **91**, 949-956 (2011).
- TTH Dao, HJM Linthorst, R Verpoorte. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochem. Rev.**, **10**, 397-412 (2011).
- YC Yin, XD Zhang, ZQ Gao, T Hu, Y Liu. The research progress of chalcone isomerase (CHI) in plants. **Mol. Biotechnol.**, **61**, 32-52 (2019).
- O Hokche, PE Berry, O Huber. *Nuevo Catálogo de la Flora Vascular de Venezuela*. Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser. Caracas, Venezuela (2008).
- JM Amaro, M Hung. Estudio fitoquímico de la flora andina venezolana III. Flavonoides y esteroides de la *Stevia lucida* Lagasca. **Rev. Fac. Farm. ULA**, **25**, 125-134 (1985).

29. P Chacón-Morales, JM Amaro-Luis, A Bahsas. Isolation and characterization of (+)-mellein, the first isocoumarin reported in *Stevia* genus. **Av. Quím.**, **8**, 145-151 (2013).
30. JM Amaro, M Hung. Estudio fitoquímico de la flora andina venezolana IV. Estructura del ácido labd-13(Z)-en-8 α -ol-15-oico, un componente de la *Stevia lucida* Lagasca. **Acta Cient. Venez.**, **39**, 21-24 (1988).
31. JM Amaro-Luis. An *ent*-kaurenolide from *Stevia lucida*. **Phytochemistry**, **32**, 1611-1613 (1993).
32. JM Amaro, M Adrián, CM. Cerda, P Joseph-Nathan. Longipinene derivatives from *Stevia lucida* and *S. triflora*. **Phytochemistry**, **27**, 1409-1412 (1988).
33. PA Chacón-Morales, C Santiago Dugarte, JM Amaro-Luis. Helenin from *Stevia lucida*. The first report of this natural eudesmanolide mixture in Eupatorieae tribe. **Nat. Prod. Res.**, 1-4 (2020) DOI: 10.1080/14786419.2020.1739677.
34. P Chacón-Morales, JM Amaro-Luis. Síntesis de un derivado diosfenólico a partir de la 7 β ,9 α -dihidroxi-longipin-2-en-1-ona. **Av. Quím.**, **10**, 41-47 (2015).
35. PA Chacón-Morales, C Santiago-Dugarte, JM Amaro-Luis. Unexpected reduction-allylic oxidation of hemisynthetic diosphenols from longipinene derivatives. **Phytochem. Lett.**, **39**, 105-110 (2020).
36. PA Chacón-Morales, JM Amaro-Luis. Meridane and uladane, two unprecedented sesquiterpene skeletons obtained by Wagner-Meerwein rearrangements of longipinane derivatives. **Tetrah. Lett.**, **57**, 2713-2716 (2016).
37. DS Reddy, AG Kutateladze. Computational structure revision of a longipinane derivative meridane. **Tetrah. Lett.**, **57**, 4727-4729 (2016).
38. PA Chacón-Morales, JM Amaro-Luis, AG Kutateladze. Structure determination and mechanism of formation of a *secomoreliane* derivative supported by computational analysis. **J. Nat. Prod.**, **80**, 1210-1214 (2017).
39. M Salmón, A Ortega, G García de la Mora, E Angeles. A Diterpenic Acid from *Stevia lucida*. **Phytochemistry**, **22**, 1512-1513 (1983).
40. D Guerra-Ramírez, CM Cerda-García-Rojas, AM Puentes, P Joseph-Nathan. Longipinene diesters from *Stevia lucida*. **Phytochemistry**, **48**, 151-154 (1998).
41. PA Chacón Morales, C Santiago Dugarte, JM Amaro Luis. 2',3,4-trihydroxychalcone, phloretin and calomelanone from *Stevia lucida*. The first chalcones reported in *Stevia* genus. **Biochem. System. Ecol.**, **77**, 57-60 (2018).
42. TJ Mabry, KR Markham, MB Thomas. *The Systematic Identification of Flavonoids*, pp 165-174; 227-230. Springer-Verlag. Berlin (1970).
43. A Shafaghat, F Salimi, N Alaniyan, Z Shoaiei. Flavonoids and an ester derivative isolated from *Galium verum* L. **World Appl. Sci. J.**, **11**, 473-477 (2010).
44. S Asen, JR Plimmer. 4,6,4'-Trihydroxyaurone and other flavonoids from *Limonium*. **Phytochemistry**, **11**, 2601-2603 (1972).
45. L Quast, R Wiermann. Über das vorkommen verschieden substituierter chalkone während der mikrosporogenese bei *Tulipa*. **Experientia**, **29**, 1165-1166 (1973).
46. AE Kambal, EC Bate-Smith. A genetic and biochemical study on pericarp pigments in a cross between two cultivars of grain sorghum, *Sorghum bicolor*. **Heredity**, **37**, 413-416 (1976).
47. Y Iijima, K Suda, T Suzuki, K Aoki, D Shibata. Metabolite profiling of chalcones and flavanones in tomato fruit. **J. Japan. Soc. Hort. Sci.**, **77**, 94-102 (2008).
48. B Han, Z Xin, S Ma, W Liu, B Zhang, L Ran, L Yi, D Ren. Comprehensive characterization and identification of antioxidants in *Folium Artemisiae argyi* using high-resolution tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, **1063**, 84-92 (2017).
49. W Greenaway, S English, J May, FR Whatley. Analysis of phenolics of bud exudate of *Populus sieboldii* by GC-MS. **Phytochemistry**, **30**, 3005-3008 (1991).
50. P Guerrero-Castillo, S Reyes, J Robles, MJ Simirgiotis, B Sepulveda, R Fernandez-Burgos, C Areche. Biological activity and chemical characterization of *Pouteria lucuma* seeds: A possible use of an agricultural waste. **Wast. Manag.**, **88**, 319-327 (2019).
51. M Alberstein, M Eisenstein, H Abeliovich. Removing allosteric feedback inhibition of tomato 4-coumarate:CoA ligase by directed evolution. **The Plant Journal**, **69**, 57-69 (2012).
52. AB Christensen, PL Gregersen, J Schröder, DB Collinge. A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. **Plant Mol. Biol.**, **37**, 849-857 (1998).
53. A Peters, HAW Schneider-Poetsch, H Schwarz, G Weissenböck. Biochemical and immunological characterization of chalcone synthase from rye leaves. **J. Plant Physiol.**, **133**, 178-182 (1988).
54. W Hinderer, HU Seitz. Chalcone synthase from cell suspension cultures of *Daucus carota* L. **Arch. Biochem. Biophys.**, **240**, 265-272, (1985).
55. C Gosch, H Halbwirth, B Schneider, D Hölscher, K Stich. Cloning and heterologous expression of glycosyltransferases from *Malus x domestica* and *Pyrus communis*, which convert phloretin to phloretin 20-O-glucoside (phloridzin). **Plant Sci.**, **178**, 299-306 (2010).
56. FA Tomás-Barberán, MN Clifford. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones-Nature, occurrence and dietary burden. **J. Sci. Food Agric.**, **80**, 1073-1080. (2000).
57. SZ Dzedzic, BJF Hudson. Polyhydroxy chalcones and flavanones as antioxidants for edible oils. **Food Chem.**, **12**, 205-212 (1983).
58. J Nishida, J Kawabata. DPPH radical scavenging reaction of hydroxy- and methoxychalcones. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, **70**, 193-202 (2006).
59. AR Bilia, AR Sannella, FF Vincieri, L Messori, A Casini, C Gabbiani, C Severini, G Majori. Antiplasmodial effects of a few selected natural flavonoids and their modulation of artemisinin activity. **Nat. Prod. Commun.**, **12**, 1999-2002 (2008).

60. X Sui, YC Quan, Y Chang, RP Zhang, YF Xu, LP Guan. Synthesis and studies on antidepressant activity of 2',4',6'-trihydroxychalcone derivatives. **Med. Chem. Res.**, **21**, 1290-1296 (2012).
61. GTT Nguyen, G Erlenkamp, O Jäck, A Küberl, M Bott, F Fiorani, H Gohlke, G Groth. Chalcone-based selective inhibitors of a C4 plant key enzyme as novel potential herbicides. **Sci. Rep.**, **6**, 27333 (2016).
62. LP Sun, LX Gao, WP Ma, FJ Nan, J Li, HR Piao. Synthesis and biological evaluation of 2,4,6-trihydroxychalcone derivatives as novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors. **Chem. Biol. Drug. Des.**, **80**, 584-590 (2012).
63. JC Le Bail, C Pouget, C Fagnere, JP Basly, AJ Chulia, G Habrioux. Chalcones are potent inhibitors of aromatase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities. **Life Sci.**, **68**, 751-761 (2001).
64. S Sogawa, Y Nihro, H Ueda, A Izumi, T Miki, H Matsumoto, T Satoh. 3,4-Dihydroxychalcones as potent 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. **J. Med. Chem.**, **36**, 3904-3909 (1993).
65. FB Power, Tutin F. Chemical Examination of Eriodictyon. **Proc. Am. Pharm. Assoc.**, **54**, 352-369 (1906); **Pharmac. Rev.**, **24**, 300-304 (1907).
66. J Shinoda, I Sato. New synthesis of polyoxy-chalcone, -hydrochalcone and -flavanone, Part 4: On the structure of eriodictyol and homoeriodictyol in the synthetic rod of 3', 4'-dimethoxy-5, 7-bioxyflavanone. **Yakugaku Zasshi**, **49**, 64-70 (1929).
67. J Shinoda, I Sato. New synthesis of polyoxy-chalcone, -hydrochalcone and -flavanone, Part 5: Synthesis of eryodictyol and homoeryodictyol. **Yakugaku Zasshi**, **49**, 71-78 (1929).
68. A Islam, S Islam, K Rahman, N Uddin, R Akanda. The pharmacological and biological roles of eriodictyol. **Arch. Pharm. Res.**, **43**, 582-592 (2020).
69. D Barreca, G Gattuso, E Bellocco, A Calderaro, D Trombetta, A Smeriglio, G Laganá, M Daglia, S Meneghini, SM Nabavi. Flavanones: *Citrus* phytochemical with health-promoting properties. **BioFactors**, **43**, 495-506 (2017).
70. S Belli, M Rossi, N Molasky, L Middleton, C Caldwell, C Bartow-McKenney, M Duong, J Chiu, E Gibbs, A Caldwell, C Gahn, F Caruso. Effective and novel application of hydrodynamic voltammetry to the study of superoxide radical scavenging by natural phenolic antioxidants. **Antioxidants**, **8**, 14 (2019).
71. X Wang, R Deng, J Dong, L Huang, J Li, B Zhang. Eriodictyol ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by suppressing the inflammatory COX-2/NLRP3/NF- κ B pathway in mice. **J. Biochem. Mol. Toxicol.**, **34**, e22434 (2020).
72. P. Rajesh, V Manju. Eriodictyol imparting cardioprotection and lipid modulation in isoproterenol-induced myocardial infarcted rats. **Res. J. Chem. Environ.**, **24**, 112-119 (2020).
73. W Li, Q Du, X Li, X Zheng, F Lv, X Xi, G Huang, J Yang, S Liu. Eriodictyol inhibits proliferation, metastasis and induces apoptosis of glioma cells via PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway. **Front. Pharmacol.**, **11**, 114 (2020).
74. L Yu, X Liu. Eriodictyol suppresses survival of cervical cancer cells through mediation of PTEN/Akt signaling pathway. **Curr. Top. Nutra. Res.**, **18**, 196-200 (2020).
75. JL Liu, YC Kong, JY Miao, XY Mei, SY Wub, YC Yan, XY Cao. Spectroscopy and molecular docking analysis reveal structural specificity of flavonoids in the inhibition of α -glucosidase activity. **Int. J. Biol. Macromol.**, **152**, 981-989 (2020).
76. M Smith, JC Smith. Repurposing therapeutics for COVID-19: Supercomputer-based docking to the SARS-CoV-2 viral spike protein and viral spike protein-human ACE2 interface. **ChemRxiv**TM, DOI:10.26434/chemrxiv.11871402.v4 (2020). [this article is a preprint; it may not have been peer reviewed].
77. RR Deshpande, AP Tiwari, N Nyayanit, M Modak. *In silico* molecular docking analysis for repurposing therapeutics against multiple proteins from SARS-CoV-2. **Eur. J. Pharmacol.**, **886**, 173430 (2020).
78. R Spribille, G Forkmann. Chalcone synthesis and hydroxylation of flavonoids in 3'-position with enzyme preparation from flowers of *Dianthus caryophyllus* L. (carnation). **Planta**, **155**, 176-182 (1982).
79. R Sütfeld, R Wiermann. The Formation of flavanones from hydroxycinnamoyl-coenzyme A thiol esters and malonyl-coenzyme A by enzyme extracts from anthers. **Z. Pflanzenphysiol.**, **79**, 467-472 (1976).
80. C Dittmer, G Raabe, L Hintermann. Asymmetric cyclization of 2-hydroxychalcones to flavanones: Catalysis by chiral Brønsted acids and bases. **Eur. J. Org. Chem.**, 5886-5898 (2007) and reference here cited.
81. P Kulkarni, P Wagh, P Zubaidha. An improved and eco-friendly method for the synthesis of flavanone by the cyclization of 2'-hydroxy chalcone using methane sulphonic acid as catalyst. **Chem. J.**, **2**, 106-110 (2012) and reference here cited.
82. DG Bhosale, PS Kulkarni. Ferric sulphate solid acid catalyst for cyclization of 2'-hydroxychalcone to flavanone under microwave condition. **Iran. J. Org. Chem.**, **5**, 1061-1064 (2013) and reference here cited.
83. J Mai, E Hoxha, CE. Morton, BM Muller, MJ Adler. Towards a dynamic covalent molecular switch: Substituent effects in chalcone/flavanone isomerism. **Org. Biomol. Chem.**, **11**, 3421-3423 (2013).
84. BM Muller, TJ Litberg, RA Yocum, CA Pniewski, MJ Adler. Extended aromatic and heteroaromatic ring systems in the chalcone-flavanone molecular switch scaffold. **J. Org. Chem.**, **81**, 5775-5781 (2016).
85. S Moussouni, A Detsi, M Majdalani, DP Makris, P Kefalas. Crude peroxidase from onion solid waste as a tool for organic synthesis. Part I: Cyclization of 2',3,4,4',6'-pentahydroxy-chalcone into aureusidin. **Tetrahedron Lett.**, **51**, 4076-4078 (2010).