

Short Communication

Auto-hydrolysis of *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson and its relation to quercetin concentration

[Autohidrólisis de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson y su relación con la concentración de quercetina]Alejandrina M. Llaure-Mora¹ & Mayar L. Ganoza-Yupanqui²¹Escuela de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú²Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú*Correspondence to: mzanoza@unitru.edu.pe

Abstract: The application of auto-hydrolysis of *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson aimed to determine the increase in quercetin concentration. Auto-hydrolysis was developed with aerial parts of *T. paronychioides* in aqueous medium at 25°C with 20 rpm by 0, 2, 5, 8, 24, 48, 96 and 168 h, with 3 repetitions per test. Quercetin standards at concentrations of 5 to 80 ppm and auto-hydrolyzed extracts were evaluated by HPLC. The auto-hydrolyzed extracts showed Quercetin peaks from 8 h. Quercetin concentrations at 48, 96 and 168 h were 0.036 ± 0.0048 , 0.033 ± 0.0105 and 0.026 ± 0.0068 mg quercetin/g, respectively, being statistically equal. In conclusion, the auto-hydrolysis of *T. paronychioides* generates the highest concentration of quercetin at 48 h.

Keywords: Auto-hydrolysis; HPLC; *Tiquilia paronychioides*; Quercetin; β -glucosidasas

Resumen: La aplicación de la autohidrólisis de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson tuvo como objetivo determinar el incremento de la concentración de quercetina. La autohidrólisis se desarrolló con partes aéreas de *T. paronychioides* en medio acuoso a 25°C con 20 rpm por 0, 2, 5, 8, 24, 48, 96 y 168 h, con 3 repeticiones por ensayo. Los estándares de quercetina a concentraciones de 5 a 80 ppm y los extractos autohidrolizados fueron evaluados por CLAR. Los extractos autohidrolizados presentaron picos de quercetina a partir de las 8 h. Las concentraciones de quercetina a 48, 96 y 168 h fueron $0,036 \pm 0,0048$; $0,033 \pm 0,0105$ y $0,026 \pm 0,0068$ mg quercetina/g, respectivamente, siendo estadísticamente iguales. En conclusión, la autohidrólisis de *T. paronychioides* genera la mayor concentración de quercetina a 48 h.

Palabras clave: Autohidrólisis; CLAR; *Tiquilia paronychioides*; Quercetina; β -glucosidasas.

Received: December 30, 2021

Accepted: January 15, 2021

This article must be cited as: Llaure-Mora AM, Ganoza-Yupanqui ML. 2021. Auto-hydrolysis of *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson and its relation to quercetin concentration. *Med Plant Commun* 4 (3-4): 76 – 81.

INTRODUCCIÓN

Actualmente se buscan nuevas técnicas y métodos que mejoren la extracción de agliconas a partir de flavonoides glicosilados (Šibul et al., 2016). Para que se realice una buena extracción se debe someter a condiciones adecuadas de temperatura, solvente, tiempo de extracción y sistemas enzimáticos. Además, éstas deben buscar reducir la pérdida o degradación de los compuestos (Šibul et al., 2016; Zhang et al., 2018).

Un flavonoide de interés con poder antioxidante es la quercetina (QC), la cual se encuentra glicosilada en forma de rutina o de sus derivados glucosídicos. La QC se puede obtener a partir de la hidrólisis ácida, básica o enzimática de rutina y sus derivados (Yang et al., 2019). Sin embargo, el empleo de los ácidos y bases puede generar degradación del compuesto, a diferencia de las enzimas que no producen degradación de las agliconas y generan una mayor proporción de estas (Yang et al., 2019; Weiz, 2018).

Las enzimas usadas para la hidrólisis del enlace glucosídico son las β -glucosidasas, estas se encuentran presentes en hongos, bacterias y plantas (Weiz, 2018). Para la utilización de estas enzimas se debe realizar un proceso de aislamiento y purificación, lo cual es ciertamente costoso (Singh, 2016). Recientemente se ha probado un método que emplea las enzimas endógenas de las células vegetales denominado autohidrólisis, según el estudio realizado por Malca-García, la autohidrólisis de la “red clover” le permitió obtener una mayor concentración de agliconas (isoflavonas), considerándolo un método eficaz y económico en comparación a las otras hidrólisis (ácida, básica y enzimática) (Malca-García et al., 2021).

Tiquilia paronychioides (Phil.) A.T. Richardson es una planta medicinal poco estudiada y dispensada en las farmacias de medicina complementaria (Seguro Social de Salud, 2008). Crece a una altitud de 30 - 500 msnm en lugares desérticos, suelos areno-arcillosos y a temperaturas de 15-30°C (Bussmann y Sharon, 2015; Mostacero León, 2015). Tradicionalmente se le conoce como depurativo, sedante, diurético, antioxidante y antiinflamatorio, estas tres últimos han sido demostrados en estudios farmacológicos in vivo e in vitro (Saldaña-Bobadilla et al., 2020). Los pocos estudios fitoquímicos reportan compuestos triterpenoides y esteroides, leucoantocianidinas, catequinas y flavonoides (Saldaña-Bobadilla et al., 2020; Chan et al., 2009; Tomas y Angulo, 2002). Un último estudio ha reportado como marcadores químicos a la rutina, kaempferol y ácido rosmarínico (Zavala Urtecho, 2020).

El objetivo de este estudio es determinar la relación de la autohidrólisis *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson con la concentración de QC para ser considerarlo como un nuevo método para obtener QC a partir de la ruptura del enlace glucosídico.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal

La especie vegetal denominada localmente como “flor de arena” fue recolectada en mayo del 2019 en el centro poblado de El Milagro, distrito de Huanchaco, provincia de Trujillo, departamento de La Libertad (Perú). La especie fue identificada taxonómicamente como *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson, en el Herbarium Truxillense de la Universidad Nacional de Trujillo. Se utilizaron las partes áreas (hojas y flores) (Zavala Urtecho, 2020).

Preparación de la muestra

La muestra de *T. paronychioides* fue secada a 40°C por 48 horas en una estufa con circulación forzada y luego triturada hasta obtener partículas con diámetros entre 355 y 212 μm (Zavala Urtecho, 2020).

Autohidrólisis de Tiquilia paronychioides

Para cada extracto autohidrolizado se emplearon 3 g de muestra triturada y 36 mL de agua ultrapura, la maceraron se realizó por triplicado para las 2, 5, 8, 24, 48, 96 y 168 horas, obteniéndose en total 21 ensayos. Las condiciones de los macerados se programaron en una incubadora a 20 rpm con una temperatura de 25°C. Luego se filtraron al vacío y los residuos de los filtros se llevaron a secar a 40°C durante 2 días; una vez secos se realizaron las extracciones con 30 mL de metanol por 15 min a 25°C en baño de ultrasonido. Los extractos obtenidos se filtraron y secaron al vacío en un rotaevaporador a 40°C (Malca-García et al., 2021). También se obtuvieron 3 extractos metanólicos sin previa autohidrólisis (extracto referente) para poder realizar la comparación con los extractos autohidrolizados.

Cuantificación de quercetina por HPLC-DAD

Se prepararon soluciones estándares de QC a 5, 10, 20, 40 y 80 ppm en metanol (Alvarado Gil, 2012). Los extractos secos fueron disueltos en metanol a una concentración de 2 mg/mL. Tanto los estándares como extractos fueron filtrados directamente a viales ámbar y analizaron por el equipo de HPLC-DAD (Hitachi LaChrom Elite®). Las señales del cromatograma se monitorearon a 254 nm. Se emplearon como fase móvil ácido fórmico 0,1% y ACN en gradiente. La fase estacionaria fue una columna C18 (250 mm x 4,6 mm; ϕ : 5 μ m), con una velocidad de flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección de 10 μ L a 30°C por 78 minutos (Zavala Urtecho, 2020).

RESULTADOS

La ecuación de la curva de calibración de los estándares de QC fue $y=139412x$ con un coeficiente de correlación (R^2) de 0.9997, a partir de la cual se determinaron las concentraciones de QC en mg/mL.

Tabla No. 1

Concentración de quercetina de los extractos autohidrolizados de *T. paronychioides* por unidad de tiempo expresados en mg de Quercetina/g de muestra seca
a y b son diferencias significativas, $p<0.05$

Horas	mg de QC/ g de muestra seca			$\bar{x} \pm DS$
	M ₁	M ₂	M ₃	
2	0,000	0,000	0,000	0,000
5	0,000	0,000	0,000	0,000
8	0,002	0,002	0,002	0,002 \pm 0,0003 ^b
24	0,011	0,005	0,006	0,008 \pm 0,0029 ^b
48	0,033	0,042	0,032	0,036 \pm 0,0048 ^a
96	0,018	0,037	0,042	0,033 \pm 0,0105 ^a
168	0,029	0,016	0,032	0,026 \pm 0,0068 ^a

DISCUSION

Los picos de los cromatogramas de los extractos metanólicos de *T. paronychioides* (Figura No. 1) representan a los triterpenoides, esteroides, leucoantocianidinas, catequinas, CF (ácido rosmarínico) y flavonoides (rutina y kaempferol), los dos últimos identificados como sus marcadores químicos por HPLC-MS/MS (Chang et al., 2009; Huamán et al., 2013; Zavala Urtecho, 2020). En el cromatograma del extracto referente no se detectó el pico de QC a 48.34 min, correspondiente al estándar de quercetina, esto sucede porque varios de los compuestos fenólicos aún siguen unidos a azúcares (Latos-Brozio y Masek, 2019), los cuales les permiten ser solubles en agua y quedarse en la fase acuosa después del filtrado (Zeng et al., 2020). La presencia del nuevo pico correspondiente a QC se observó notablemente a partir de las 8 h de autohidrólisis, así como el incremento del área del pico conforme avanzaba el tiempo (Barba et al., 2014). La máxima área del pico de QC se observó a las 48 h, lo cual fue semejante a lo encontrado en el estudio de la autohidrólisis de la especie *Trifolium pratense*, en donde el área máxima del pico de agliconas de isoflavonas se produjo al segundo día, para luego empezar a decrecer (Malca-García et al., 2021).

Las concentraciones de QC obtenidas de los extractos autohidrolizados se presentaron en la Tabla No. 1, al aplicar ANOVA y Tukey a cada una de ellas, se determinó que las concentraciones a 48, 96 y 168 h fueron estadísticamente iguales, no existiendo diferencia significativa entre ellas (Figura No. 2). Esto significa que hay un punto en la reacción en que las enzimas β -glucosidasas se saturan, provocando que la reacción llegue a su velocidad máxima y la producción de

agliconas sea lenta (Dong, 2021). El mismo comportamiento mostraron las β -glucosidasas extraídas de *Glycine max* L. Merrill “soja” utilizadas en la hidrólisis de isoflavonas de soja (Yoshiara et al., 2018).

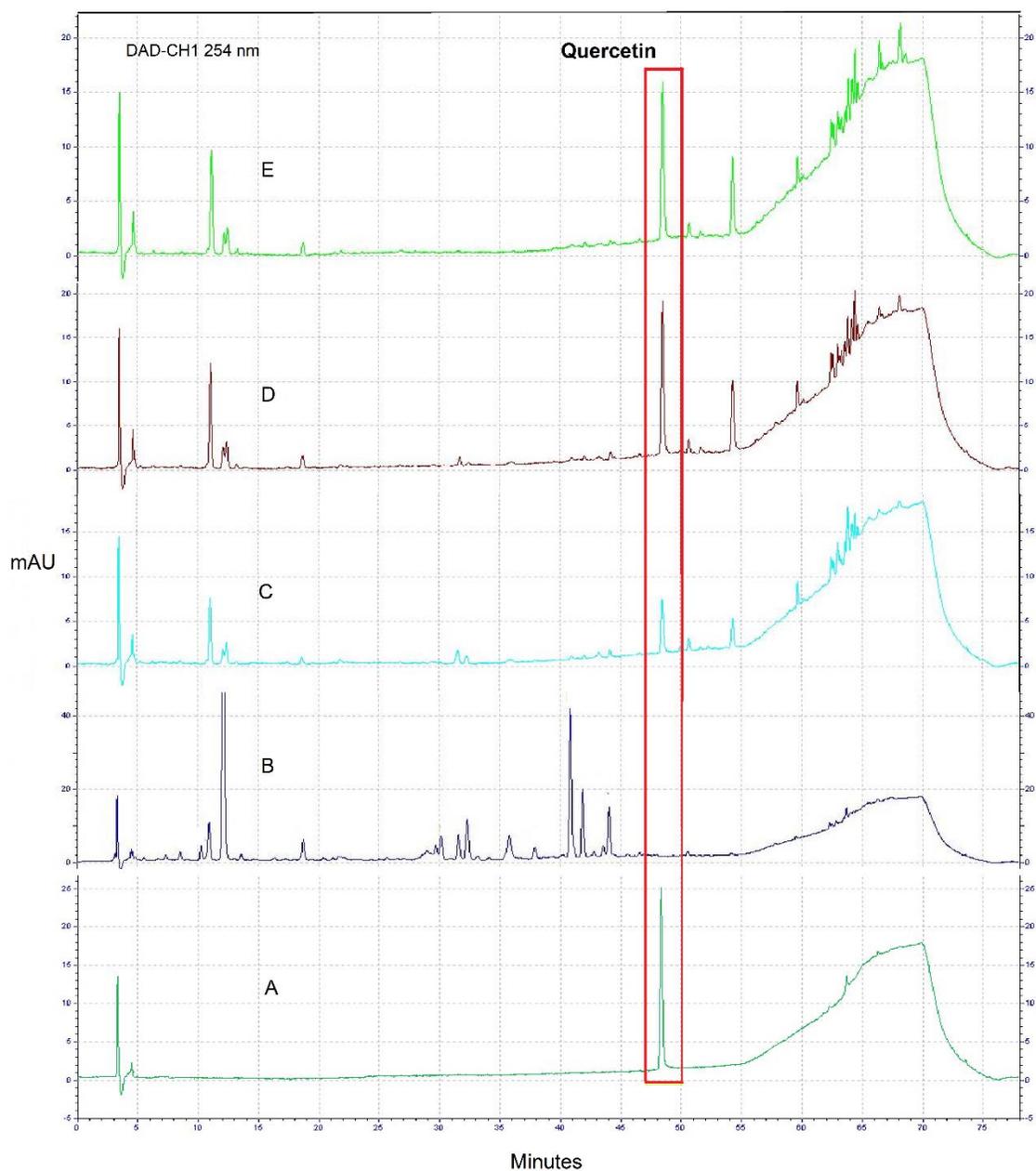


Figura No. 1

Cromatogramas HPLC: estándar QC a 10 ppm (A), extracto referente (B) y los extractos autohidrolizados de *T. paronychioides* de 24 h (C), 48 h (D) y 96 h (E) a 254 nm

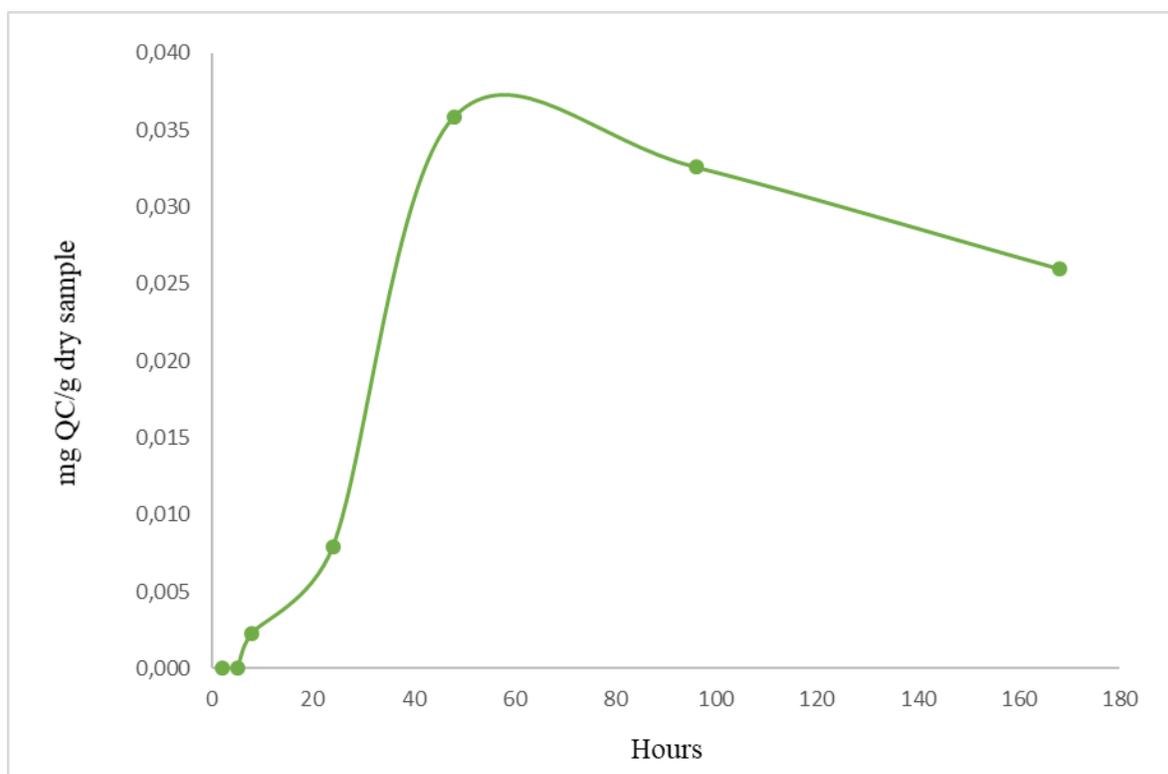


Figura N° 2

Evolución de la concentración de quercetina de los extractos autohidrolizados de *T. paronychioides*

CONCLUSIONES

La autohidrólisis de *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson genera un aumento significativo en la obtención de quercetina hasta las 48 h.

REFERENCIAS

- Alvarado Gil GR. 2012. **Influencia de los tipos de hibridación del turión de *Asparagus officinalis* L. “esparrago verde” sobre la concentración de quercetina, determinada por cromatografía líquida de alta resolución.** Tesis, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- Barba FJ, Esteve MJ, Frígola A. 2014. Bioactive components from leaf vegetable products. *Stud Nat Prod Chem* 41: 321-346. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63294-4.00011-5>
- Bussmann RW, Sharon D. 2015. **Medicinal plants of the Andes and the Amazon-the magic and medicinal flora of northern Peru.** William L. Brown Center, St. Louis, USA.
- Chang A, Klinar S, Castillo P, Peralta K. 2009. Screening fitoquímico de *Gentianella alborosea*, *Desmodium* sp. y *Tiquilia paronychioides*. *Fitoica* 4: 7-11.
- Dong J. 2021. On catalytic kinetics of enzymes. *Processes* 9: 271. <https://doi.org/10.3390/pr9020271>
- Huamán O, Sandoval M, Béjar E, Huamán Z, Tarazona V. 2013. Efecto del extracto acuoso de hojas de *Tiquilia paronychioides* (flor de arena) sobre la hiperplasia benigna de próstata, inducida por enantato de testosterona en ratas. *Ann Fac Med* 74: 19-29.
- Latos-Brozio M, Masek A. 2019. Structure-activity relationships analysis of monomeric and polymeric polyphenols (quercetin, rutin and catechin) obtained by various polymerization methods. *Chem Biodivers* 12: e1900426. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201900426>
- Malca-García GR, Liu Y, Dong H, Nikolić D, Friesen J, Lankin D, McAlpine J, Chen S, Dietz B, Pauli G. 2021. Auto-hydrolysis of red clover as “green” approach to (iso)flavonoid enriched products. *Fitoterapia* 152: 104878.

<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104878>

- Mostacero León J. 2015. **Características edafoclimáticas y fitogeográficas de las plantas medicinales del dominio andino noroccidental del Perú, durante 1976 al 2004**. Tesis, Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Saldaña-Bobadilla V, Kenedy-Ramirez J, Perez-Chauca E, Minchán-Herrera P. 2020. *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A. T. Richardson (Boraginaceae): An ethnobotanical, ethnopharmacological, and toxicological review. **Ethnobot Res Appl** 19:25. <https://doi.org/10.32859/era.19.25.1-13>
- Seguro Social de Salud. 2008. **Petitorio nacional de productos, recursos e insumos terapéuticos afines de uso en medicina complementaria**. EsSalud, Perú.
- Šibul F, Orčić D, Svirčev E, Mimica-Dukić N. 2016. Optimization of extraction conditions for secondary biomolecules from various plant species. **Hemijska Industrija** 70: 473-483. <https://doi.org/10.2298/HEMIND150531053S>
- Singh G, Verma AK, Kumar V. 2016. Catalytic properties, functional attributes and industrial applications of β -glucosidases. **3 Biotech** 6: 3. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0328-z> .
- Tomas G, Angulo J. 2002. Estudio fitoquímico de la *Tiquilia paronychioides* (Phil.) A. Richardson “flor de arena.” **Rev Peru Quím Ing Quím** 5: 43-46.
- Weiz G. 2018. **Sistemas mono-enzimáticos de desglucosilación de flavonoides (diglicosidasas) para su aplicación en procesos tecnológicos**. Tesis, Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Argentina.
- Yang J, Lee H, Sung J, Kim Y, Jeong HS, Lee J. 2019. Conversion of rutin to quercetin by acid treatment in relation to biological activities. **Prev Nut Food Sci** 24: 313-320. <https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.313>
- Yoshiara LY, Madeira TB, de Camargo AC, Shahidi F, Ida EI. 2018. Multistep optimization of β -Glucosidase extraction from germinated soybeans (*Glycine max* L. Merrill) and recovery of isoflavone aglycones. **Foods** 7: 110. <https://doi.org/10.3390/foods7070110>
- Zavala Urtecho ED. 2020. **Marcadores químicos de *Tiquilia Paronychioides* (Phil.) A.T. Richardson “flor de arena”**. Tesis, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- Zeng Y, Song J, Zhang M, Wang H, Zhang Y, Suo H. 2020. Comparison of in vitro and in vivo antioxidant activities of six flavonoids with similar structures. **Antioxidants** 9: 732. <https://doi.org/10.3390/antiox9080732>
- Zhang QW, Lin LG, Ye WC. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. **Chin Med** 13: 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>