

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Químicas

Carrera de Bioquímica y Farmacia

Metódicas extractivas y aislamiento de ácido aristolóquico a partir de matrices naturales


Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico

Autor:

María Cumandá Toral Tello

Director:

Lorena Viviana Mora Bravo

ORCID: 0000-0002-0464-8280

Cuenca, Ecuador

2023-10-04

Resumen

Las plantas medicinales del género *Aristolochia* usadas para tratar distintas patologías, contienen gran cantidad de ácidos aristolóquicos, tanto de tipo I y II, relacionados con el desarrollo de nefropatías y cánceres de alto riesgo por su toxicidad. Siendo considerado un peligro para la salud de quienes lo usan. En el presente estudio se determinaron metódicas extractivas y de aislamiento de ácido aristolóquico de matrices naturales, que sean efectivos para obtener un extracto estandarizado de la planta de *Aristolochia*. Para el desarrollo del estudio se analizó en el bejuco de Zaragoza (*Aristolochia*) de las ciudades de Puyo y Macas, para su posterior extracción con fluidos supercríticos y extracción asistida con ultrasonido, utilizando el metanol como solvente. Posteriormente se identificaron los metabolitos obtenidos por cromatografía en capa fina (TLC) para verificar la presencia de ácido aristolóquico. Los resultados demostraron que el ácido aristolóquico presentan un factor de retención en rangos de R_f 0.61-0.77, que son visibles mediante bandas de coloración amarilla a luz blanca, oscura o gris a luz UV de 254 nm y coloración negra con un halo amarillo a luz UV de 366 nm, características que permiten evidenciar la presencia de ácido aristolóquico en estas muestras.

Palabras clave: ácido aristolóquico, maceración, *Aristolochia*, fluidos supercríticos, ultrasonido, cromatografía en capa fina



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The medicinal plants of the genus *Aristolochia* used to treat different pathologies, contain a large amount of aristolochic acids, both type I and II, related to the development of nephropathies and high-risk cancers due to their toxicity. They are considered a health hazard for those who use them. In the present study, the methods for extracting and isolating aristolochic acid from natural matrices were determined, which are effective to obtain a standardized extract of the *Aristolochia* plant. For the development of the study, the Zaragoza liana (*Aristolochia*) from the cities of Puyo and Macas was analyzed for its subsequent extraction with supercritical fluids and ultrasound-assisted extraction, using methanol as solvent. Subsequently, the metabolites obtained were identified by thin layer chromatography (TLC) to verify the presence of aristolochic acid. The results showed that aristolochic acid has a retention factor in the range of Rf 0.61-0.77, which are visible by bands of yellow coloration at white light, dark or gray at UV light of 254 nm and black coloration with a yellow halo at UV light of 366 nm, characteristics that allow evidencing the presence of aristolochic acid in these samples.

Keywords: aristolochic acid, maceration, *Aristolochia*, supercritical fluids, ultrasound, thin layer chromatography



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Introducción	10
1. Marco Teórico	12
1.1. Generalidades.....	12
1.2. Descripción taxonómica.....	12
1.3. Descripción de ácido aristolóquico	12
1.4. Composición fitoquímica.....	13
1.5. Formas de consumo.....	13
1.6. Importancia farmacológica.....	13
1.7. Prohibición del ácido aristolóquico	13
1.8. Procesos extractivos	14
1.8.1. Triturado y tamizado	14
2. Metodología	17
2.1. Diseño del estudio	17
2.2. Reactivos y Equipos	17
2.3. Recolección de materia vegetal	17
2.4. Preparación de la muestra vegetal.....	18
2.5. Trituración de la muestra	19
2.6. Proceso de extracción	19
2.6.1. Humectación y maceración	20
2.6.2. Maceración combinada con ultrasonido	21
2.6.3. Concentración de extractos en rotavapor.	21
2.6.4. Secado con nitrógeno.....	21
2.6.5. Proceso de liofilizado.....	22
2.6.6. Extracción con fluidos supercríticos	22
2.6.7. Identificación de ácido aristolóquico	22
2.6.7.1. Cromatografía en capa fina	22
3. Resultados Y Discusiones.	24
3.1. Datos de recolección	24
3.2. Secado de las muestras de bejuco de la Zaragoza	24
3.3. Rendimiento de extracción de bejuco de Zaragoza obtenida por maceración asistida con ultrasonido frente a rendimiento de extracción por fluidos supercríticos	25
3.4. Identificación por Cromatografía en capa fina	25

4. Conclusiones y Recomendaciones	31
Referencias.....	32
Anexos.....	36
Anexo A. Plantas recolectadas.....	36
Anexo B. Equipos utilizados en el ensayo	37
Anexo C. Tablas de preparación de compuestos.....	39

Índice de figuras

Figura 1 . Hojas y tallo de las muestras de Puyo y Macas.	18
Figura 2 . Diagrama de proceso de extracción y concentración de metabolitos.....	20
Figura 3 . TLC con fase móvil cloroformo:metanol:ácido acético a 254 y 366 nm. Rev. SnCl ₂ *2H ₂ O.....	26
Figura 4 . TLC con fase móvil cloroformo:metanol:ácido acético a 254 y 366 nm, Rev. Reactivo Dragendorff.	26
Figura 5 . TLC con fase móvil cloroformo:metanol a 254 y 366 nm. Rev. SnCl ₂ *2H ₂ O	27
Figura 6 . TLC con fase móvil cloroformo:metanol a 254 y 366 nm, Rev. Reactivo Dragendorff.	28

Índice de tablas

Tabla 1 . Datos geográficos del lugar de recolección.	24
--	----

Dedicatoria

Este proyecto se lo dedico primero a mi madre Germania y mi abuelita Concepción, por haberme forjado en carácter, por ser mi fortaleza y soporte para culminar este largo trayecto, por darme su ejemplo de trabajo y dedicación, a mis hermanos Alejandra y Cristóbal y mi primo Santiago, por ser mi apoyo y guía con sus palabras de aliento en todo momento, y no dejarme desvanecer en el camino, por estar en mis momentos de alegría como de tristeza, a mi enamorado Oswaldo por ser mi compañía, que con sus palabras de apoyo o reprensión me ayudaron a terminar este proyecto, por creer en mí y en mi capacidad, por alentarme a culminar sin soltar mi mano, a mis tíos María, Patricio y Nora, por su confianza depositada en mí, por creer y siempre estar presentes en este trayecto con palabras de apoyo y fortaleza, con muestras de cariño en los momentos más difíciles, en fin, a todos ustedes por ser mi motivación para seguir adelante. A mis amigas Natalia, Tamara, Juliana y Arlette por hacer de esta vida universitaria una aventura, por volver más amena la carrera y por la motivación brindada durante estos 5 años.

Agradecimientos

Quiero agradecer a todos los miembros de la Universidad de Cuenca quienes han sido parte en este camino de formación como Bioquímica Farmacéutica, a cada uno de los profesores quienes me han guiado en mi formación profesional y personal, en especial a la Dra. Jessica Calle, Dr. Fabián León y Dra. Nancy Cuzco, quienes, junto con mi tutora, la Dra. Viviana Mora, me brindaron su apoyo y conocimiento en la realización de este proyecto.

Introducción

Las enfermedades renales se han convertido en un problema de salud muy serio, siendo la nefrotoxicidad una de sus causas más recurrentes en los ingresos hospitalarios. Asociados comúnmente al uso tanto de fármacos como de medicina tradicional a base de hierbas, debido a que el órgano principal que actúa en la detoxificación del organismo es el riñón (Moreno, 2021).

De manera tradicional algunas especies han sido identificadas como medicinales siendo utilizadas como remedios caseros para el tratamiento de diversas dolencias y/o enfermedades sin poseer algún tipo de conocimiento sobre todos los metabolitos que estas pudiesen albergar. Ya que además de sus conocidos beneficios curativos, pueden dar lugar a posibles efectos secundarios a largo plazo y así desembocar en diversas patologías (Caballero-Serrano et al., 2019).

El ácido aristolóquico es un compuesto natural que se encuentran en plantas herbáceas del género *Aristolochia* que contiene diferentes componentes tóxicos como son ácido aristolóquico tipo I (AA-I) y ácido aristolóquico tipo II (AA-II). Este género es muy empleado en la medicina tradicional, con el fin de tratar distintas enfermedades por sus beneficios conocidos como agente antiinflamatorio, analgésico, expectorante, antibacteriano, entre otros. Sin embargo, mediante investigaciones se ha logrado determinar que además de sus propiedades farmacológicas este puede ser causante de nefrotoxicidad y carcinogénesis, debido principalmente a la administración a largo plazo (Fang et al., 2019; M. Zhang et al., 2021).

Mediante estudios se conocen varios métodos de extracción e identificación aplicados sobre la fuente natural de ácido aristolóquico en diferentes países como China, Sudán, Brasil, Chile, Rusia, etc., sin embargo en ninguno se determina cual es el método de extracción adecuado para obtener el ácido aristolóquico de manera eficaz, es por esto que en este trabajo se busca comparar dos de los métodos más mencionados en la literatura, para conocer con cual de estos métodos de extracción se obtiene una mejor concentración de metabolitos, dentro de ellos el ácido aristolóquico.

Los objetivos de este trabajo de titulación fueron:

Objetivo general:

Evaluar métodos de extracción e identificación de ácido aristolóquico en plantas del género *Aristolochia*.

Objetivos específicos:

1. Evaluar dos métodos de obtención de extractos en plantas del género *Aristolochia*, con el fin de identificar la presencia de ácido aristolóquico por cromatografía en capa fina.
2. Establecer una metodología de identificación del metabolito secundario en estudio, basados en revelado químico y factor de retención.

1. Marco Teórico

1.1. Generalidades

El ácido aristolóquico (AA) es un alcaloide de nitrofenantreno, componente biológicamente activo que se encuentra en derivados de plantas naturales de la familia Aristolochaceae principalmente en especies del género *Aristolochia* y *Asarum*. El género más empleado en la medicina tradicional es *Aristolochia* existen alrededor de 500 especies, se utiliza en distintas partes del mundo como adelgazante, antídoto de serpiente, cólicos por menstruación, entre otros. (Baltazar et al., 2021).

1.2. Descripción taxonómica

La familia *Aristolochiaceae* consta de siete géneros, con más de 600 especies, dentro de los cuales los principales son *Asarum* y *Aristolochia* que contienen ácido aristolóquico. Las especies se pueden encontrar distribuidas en Europa, América y Asia, en zonas tropicales, subtropicales y templadas (Lerma-Herrera et al., 2022).

Las especies de esta familia suelen ser perennes con raíces o rizomas subterráneos, herbáceas, que pueden encontrarse ya sea como lianas, trepadoras o arbustos con flores vistosas. (Paizanni & Santana, 2018).

Aristolochia

Las especies de este género son herbáceas, perennes, que se muestran como lianas, enredaderas, arbustos, con flores vistosas de color amarillo y verde, en forma de pipa con una base acampanada, por lo que es conocida como flor de pato o pie de elefante, así también se destaca por contener en su pétalo un moteado marrón, púrpura y blanco, además tiene un olor fétido característico a carne podrida; cuenta con gran cantidad de semillas, planas o convexas, que suelen tener una membrana aceitosa. Su tallo es delgado y leñoso que se enrolla alrededor de cercas, cables u otras plantas; sus hojas son anchas con base curva en forma de corazón. Su crecimiento se da mejor en áreas de suelo húmedo, con la luz del sol o sombra parcial (González, 1990; Lerma-Herrera et al., 2022).

1.3. Descripción de ácido aristolóquico

El ácido aristolóquico es un alcaloide derivados del fenantreno de tipo aporfina. Su estructura está relacionada con ácidos carboxílicos de nitrofenantreno, dentro de los cuales se incluye AA-I, AA-II, AA-C, AA-D, siendo los principales el ácido aristolóquico I y ácido aristolóquico II. Se encuentra compuesto por una mezcla de dos metabolitos que son químicamente el ácido 8-metoxi-6-nitro-fenantreno-(3,4-d)-1,3- dioxolo-5-carboxílico (AAI) y el ácido 6-nitro- ácido

fenantro-(3,4-d)-1,3-dioxolo-5-carboxílico (AAll), donde estructuralmente solo cambia por la presencia del grupo O-metoxi en la posición 8 (AAI), mientras que en el AA II está ausente.

En la posición 3 el grupo carboxilo es un requerimiento estructural para el transporte de AA, sin embargo, el grupo O-metoxi de la posición 8 muestra ser la clave funcional para la toxicidad inducida por ácido aristolóquico en ratones.

1.4. Composición fitoquímica

Aristolochia cuenta con gran cantidad de metabolitos principalmente secundarios. Se ha descrito la presencia de alcaloides, cumarinas, polifenoles, flavonoides, taninos, etc. principalmente en extractos con etanol y diclorometano en n-hexano se encuentra diterpenos, triterpenos, cumarinas. Debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios que contiene la *Aristolochia* es usada con fines medicinales en distintas partes del mundo. Sin embargo, contiene los compuestos de ácido aristolóquico que son los principales causantes de daños en la salud cuando es consumida por largos periodos de tiempo (Lerma-Herrera et al., 2022; Alois et al., 2022).

1.5. Formas de consumo

Las especies de *Aristolochia* a más de ser usada como planta ornamental, es consumida en la medicina tradicional china, ya sea por medio de infusiones o formas farmacéuticas como píldoras, polvos, cápsulas, entre otras. (Jordan & Perwaiz, 2014).

1.6. Importancia farmacológica

Se ha descrito que estas especies tienen un gran poder curativo, ya sea cómo analgésico, antiinflamatorio, antimicrobiano, para problemas de la piel, mordeduras de serpiente o picaduras de insectos, infecciones, desintoxicante, entre otros. También se ha descrito que solían ser consumidas a diario, especialmente los polvos a base de ácido aristolóquico que empleaban en Europa para adelgazar. Todas sus propiedades se atribuyen a su composición de metabolitos secundarios. Sin embargo, dentro de estos metabolitos se encuentra el ácido aristolóquico, que ha demostrado ser el causante de problemas en la salud (Kuo et al., 2012; Zhang et al., 2021).

1.7. Prohibición del ácido aristolóquico

El ácido aristolóquico se clasifica como cancerígeno de tipo I para humanos, que actúan por un mecanismo genotóxico, por La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), quedando prohibido en varios países, especialmente Europa y Asia el consumo de formas farmacéuticas que contengan ácido aristolóquico. Sin embargo, debido a su fácil desarrollo y distribución mundial, muchas personas siguen expuestas al uso de ácidos

aristolóquicos, especialmente lo AA-I y AA-II, que pueden llegar a causar en las personas serios problemas de salud como neoplasias, nefrotoxicidad, toxicidad gástrica, entre otras patologías (H.-M. Zhang et al., 2019).

1.8. Procesos extractivos

1.8.1. Triturado y tamizado

Para la trituración se requiere de un equipo que consiste en un rotor estator el cual desintegra las membranas usando fuerzas de fricción creada por fuerzas de impacto con presión alta y velocidades de hasta 1500 rpm. Es de fácil aplicación para industria, tecnología simple y robusta que reduce los costos de producción. Cabe recalcar que la morfología de las muestras dependerá del número de pasadas de la misma en la máquina trituradora (Blanco et al., 2018).

La tamización se da como un proceso de separación del tamaño de membrana para una correcta separación de estas creando de este modo una mayor área superficial de contacto que produce mayor penetración del solvente en la muestra (Blanco et al., 2018).

1.8.2. Ultrasonido con maceración asistida

1.8.2.1. Maceración

Este método consiste en la extracción de compuestos presentes en la matriz natural al sumergirlo en líquido durante un determinado tiempo, siendo empleado desde hace varios años, por ser simple y económico. El proceso se debe realizar en un recipiente tapado ya que ayudará a evitar que se evapore el solvente usado, puesto que para macerar se necesita sumergir la muestra ya sea húmeda o seca, triturada preferentemente, en un solvente que ayudará a extraer los componentes de la planta. El tiempo mínimo en el que se realiza una maceración es de tres días con agitación continua. Una vez que se encuentra completa la extracción se debe limpiar el líquido, ya sea por decantación o filtración. Para escoger el solvente que se emplea se debe tener en cuenta el o los metabolitos que se desea analizar, así como su polaridad, ya que de este depende los compuestos fitoquímicos que se rescaten de la muestra. Sin embargo, ha demostrado tener baja eficiencia con ciertos metabolitos por lo que actualmente se emplea en conjunto con métodos de extracción más avanzados, ya sea con ultrasonido, microondas, etc.(Bitwell et al., 2023).

1.8.2.2. Ultrasonido

Esta técnica se basa en el principio de crear burbujas de cavitación con un eventual colapso y cizallamiento alto permitiendo la extracción. Está utiliza energía ultrasónica mayor a 20 kHz para esto se emplea un baño ultrasónico o una sonda ultrasónica que amplifica la transferencia de masas permitiendo acceso rápido del solvente a los componentes celulares de la materia vegetal. Por lo que se dice que los dos mecanismos de extracción que esta técnica puede aplicar son la difusión a través de la membrana celular y otro es el lavado del contenido de la célula una vez rota la pared celular (Jha & Sit, 2022).

1.8.2.3. Rotavapor

Este equipo se utiliza principalmente para la destilación de disolventes a condiciones de vacío, su uso puede ser biológico, químico o farmacéutico, etc. Es usado en muchos laboratorios como una manera eficiente de remover solventes orgánicos (Leusen, 1994), debido a una destilación continua de gran cantidad de solventes volátiles en descompresión, adecuado para reflujo o evaporaciones de gran cantidad de solvente, procesos de reacción o concentración de componentes traza (Wang et al., 2018) teniendo a la temperatura como el factor más decisivo en la fidelidad de los resultados.

1.8.2.4. Liofilización

Se trata de una secuencia de deshidratación en el cual se elimina el agua de una muestra al vacío, lo que permite que esta cambie su estado de sólido a gaseoso sin transitar la fase líquida. Este método es ampliamente utilizado para la industria farmacéutica para evitar cadenas de frío y aumentar su media de vida (Neto et al., 2023) ya que se concentran para su conservación (Paredes et al., 2016). Sin embargo, mediante este método las muestras podrían estar expuestas a varios factores estresantes, como variación del pH interfaces sólido-líquido o pérdida de hidratación que comprometen la estabilidad para lo cual se recomienda adición de excipientes para contrarrestar estos factores. (Aves et al., 2022).

1.8.2.5. Fluidos supercríticos

La extracción de analitos con fluidos supercríticos (SFE) es una técnica aplicada a matrices semi sólidas, sólidas y líquidas, útil para compuestos activos volátiles y lipofílicos. Se emplea por su alta selectividad y eficiencia, además de no ser inflamable, tóxico y corrosivo, es fácil de manejar, económico y tiene respeto por el medio ambiente Los puntos críticos de este método son la temperatura y presión a las que la sustancia puede vaporizarse por lo que el disolvente a utilizarse es el dióxido de carbono CO₂. En particular, para extraer el ácido

aristolóquico se ha descrito un método a una temperatura de 50°C, presión de 194 bar, concentración del agente de arrastre y tiempo de extracción de 4 horas. (Liang et al., 2010).

1.9. Proceso de identificación

1.9.1. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica analítica sencilla, que permite la separación de los componentes de la muestra debido a la migración diferencial a través de la fase estacionaria. Este método permite determinar la pureza de los compuestos, identificarlos y compararlos con analitos puros o estándares, donde se utiliza una placa principalmente de gel de sílice que se encuentra inmersa de forma vertical en una fase móvil. Comúnmente es empleada de forma preliminar o para la confirmación de la presencia de los analitos. En varios estudios mencionan se aplica la técnica de TLC para verificar la presencia de ácido aristolóquico, denominando a la técnica como Cromatografía en capa fina preliminar (PTLC).

2. Metodología

2.1. Diseño del estudio

Este proyecto está basado en un diseño práctico que tiene como fin extraer y aislar el ácido aristolóquico de matrices naturales del género *Aristolochia* por métodos comunes como maceración, además de emplear métodos de extracción más avanzados y amigables con el medio ambiente como son: maceración asistida por ultrasonido y fluidos supercríticos. Buscando determinar que método me servirá para obtener mayor cantidad de ácido aristolóquico.

2.2. Reactivos y Equipos

Reactivos	Equipos
Metanol	Baño de ultrasonido Branson 8893, Estados Unidos
Cloroformo	Rotavapor marca Laborota 4000 Efficient de Heidolph ® (Schwabach, Alemania)
Ácido acético	Biofreezer Fisher Scientific ® R134A (Massachusetts, Estados Unidos)
Ácido clorhídrico	Liofilizador, FreeZone 2.5 de LABCONCO ®, (Kansas, Estados Unidos)
Cloruro de estaño dihidratado	Equipo de fluido supercrítico, marca Waters ®, modelo MV10 (Milford, Estados Unidos)
Agua tipo 2	Horno utility, modelo 61305 VWR,
Nitrógeno gaseoso grado 3	CAMAG ® TLC Visualizador.
Dioxido de carbono, marca linde (Alemania).	
Reactivo de Dragendorff	

2.3. Recolección de materia vegetal

Las muestras vegetales a estudiar se tratan de la especie *Aristolochia sp*, conocida como bejuco de la Zaragoza, las mismas fueron recolectadas en las provincias de Pastaza (Puyo) y Morona Santiago (Macas).

Las muestras de bejuco se encontraron como enredaderas cultivadas de manera doméstica. En el muestreo se recolectó la parte aérea (tallos y hojas) de dos diferentes muestras de bejuco de Zaragoza. Para el análisis se recolectó aproximadamente 150 g de muestra fresca, tomando en cuenta que las plantas que se encuentren entre la edad joven y madura,

presenten mejores características como color, tamaño, sin signos de deterioro (quemazón foliar, manchas foliar), entre otros. Se logró observar que las muestras presentaban diferencias en cuanto al grosor del tallo y en tamaño de las hojas siendo más grueso el tallo y más grande las hojas de la planta recolectada en Puyo (Figura 1).

Figura 1. Hojas y tallo de las muestras de Puyo y Macas.



2.4. Preparación de la muestra vegetal

La muestra fresca se llevó al laboratorio de Plantas Medicinales y Productos Naturales del departamento de Biociencias de la Universidad de Cuenca para realizar la selección y secado de las partes que se analizarán. Inicialmente se pesó cada una de las muestras para proceder a escoger las partes sin deterioro. Luego se inició con el lavado de las plantas con agua potable y se escurrió esto por 3 veces y por último se colocó por 10 minutos en agua destilada y se escurrió nuevamente. Después de esto se colocó sobre la malla cubierta con papel absorbente para quitar el exceso de agua y por último en las mallas del secador eléctrico cubiertas con papel periódico de manera esparcida y separada para que haya un adecuado flujo de aire y el secado sea uniforme a una temperatura de 48°C. Se revisó a las 48 horas para verificar el estado del secado de las muestras y a las 72 horas se procedió a sacar las muestras del secador eléctrico.

2.5. Trituración de la muestra

Para comenzar con la trituración, se pesó cada una de las muestras secas y se procedió a realizar la trituración en una licuadora de marca Oster. El proceso consiste en colocar una parte de la materia seca en la licuadora por 10 segundos y se apaga se espera un momento y se repite el procedimiento tres veces. Posterior se pasó por un cernidor de luz de malla pequeña y se almacena en una bolsa plástica hermética, este proceso se realiza hasta que esté triturada y tamizada toda la muestra. En el caso de los tallos estos se trocea hasta dejarlos en un tamaño aproximado de 1 a 3 mm. Una vez triturada y tamizada las dos muestras por completo se pesó nuevamente cada una obteniendo un peso seco final para la muestra de Puyo y Macas, que se les denominará T01 y T02 respectivamente. Se almacenó en congelación a -80°C .

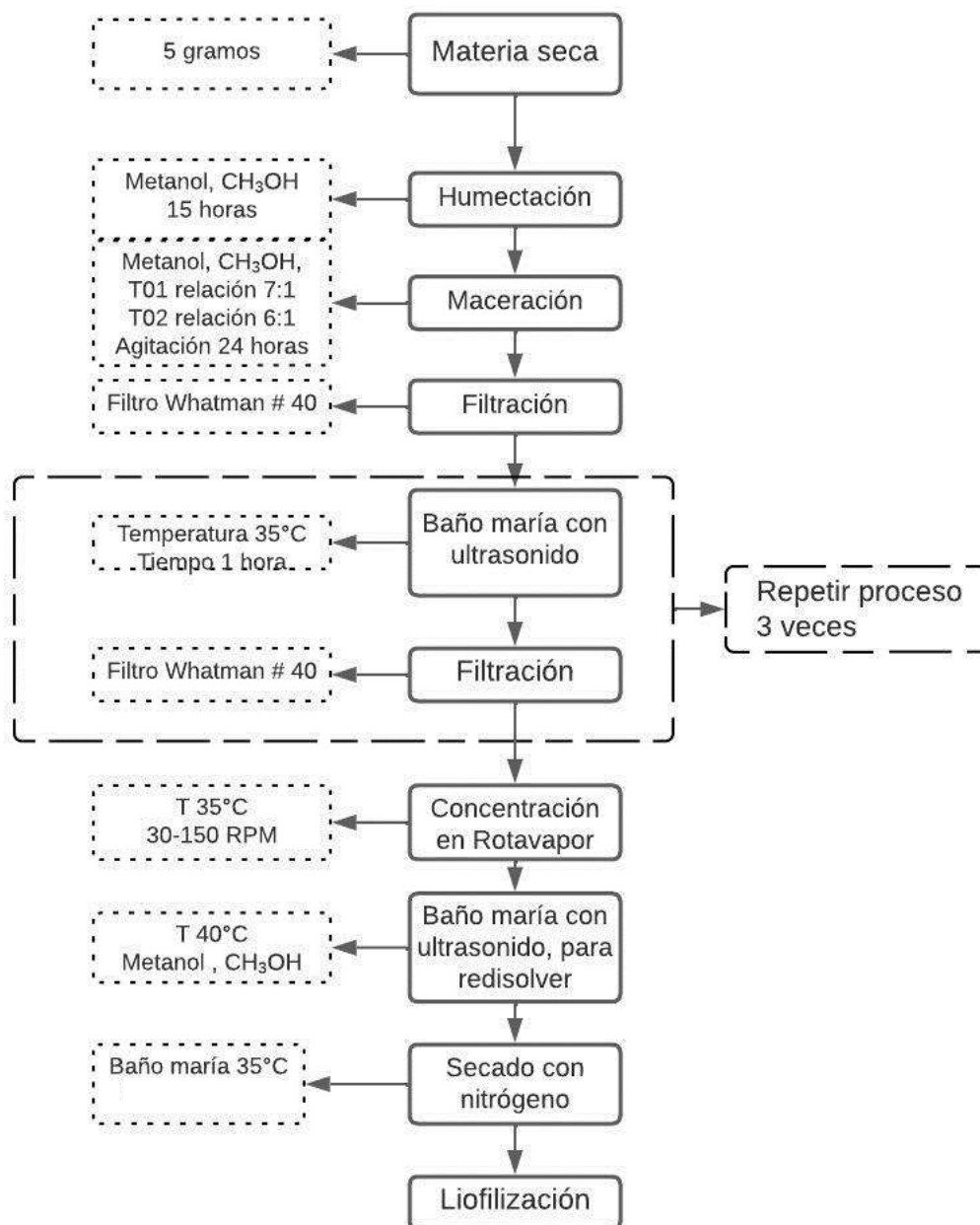
2.6. Proceso de extracción

Este proceso constó de tres fases para obtener el concentrado final de metabolitos, una fase de extracción, la segunda de concentración, y por último la fase liofilización que ayudará a la conservación de la muestra.

En la primera fase se empleó dos técnicas que consiste en una maceración asistida por ultrasonido con una previa humectación de la muestra. La maceración se realiza con agitación para aumentar la extracción de metabolitos, utilizando un solvente polar que es el metanol de tipo análisis en cantidad suficiente que permita una adecuada superficie de contacto, esto sirve para remover los metabolitos presentes en las plantas, la sonicación se emplea para aumentar el contacto del solvente con los componentes y por ende aumentar la cantidad de metabolitos.

La segunda fase consiste en la concentración de metabolitos evaporando el solvente por medio de una destilación para luego condensarla, y la tercera fase consiste en realizar un proceso de liofilización que va a deshidratar la muestra y ayuda en su conservación para su posterior almacenaje (figura 2)

Figura 2. Diagrama de proceso de extracción y concentración de metabolitos.



2.6.1. Humectación y maceración

Para la extracción de metabolitos presentes en la planta seca se utilizó el proceso de maceración. Se inició pesando 5 g de cada droga seca colocando en un frasco etiquetado adecuadamente, previo a la maceración se humectó las muestras durante 15 horas con metanol c.s.p., la cantidad utilizada de metanol para las dos muestras fue de 7 ml. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a macerar, para lo cual en la muestra T01 se emplea una relación 7:1, 35ml de metanol en 5 g de muestra, y para la muestra T02 se realiza una

proporción 6:1, 30 ml de metanol con 5 g de muestra, de manera que no se sobresature las muestras. Cabe mencionar que este proceso se realizó por duplicado en cada muestra seca, se cubre con papel aluminio los frascos y se deja en agitador a 100 rpm por 24 horas.

2.6.2. Maceración combinada con ultrasonido

Posterior a las 23 horas se realizó filtración del macerado, en filtro Whatman #40 y se recogió en un balón de aforo. El residuo que queda en el filtro se colocó nuevamente en el frasco y se le agregó solvente en una relación 5:1, 25 ml de metanol: 5 g de muestra, en cada una de las muestras, luego se llevó al baño con ultrasonido por 1 hora a 35°C, controlando que la temperatura no se eleve por encima de los 40°C (figura 4). Después de este tiempo se filtró nuevamente y el residuo vuelve al frasco donde se agregó en cada frasco solvente en una proporción 3:1, 15ml de metanol: 5 g de muestra, y se repite nuevamente el proceso ya mencionado, por último, se aplicó una última proporción 1:1 para la muestra T01 y 2:1 para la muestra T02, de tal manera que se iguale el volumen utilizado de metanol. Se juntaron todos los filtrados de la misma muestra en sus balones correspondientes, previamente etiquetados.

2.6.3. Concentración de extractos en rotavapor.

Para concentrar las muestras y eliminar el solvente empleado en la extracción anterior se usó el equipo de rotavapor. Para iniciar se verificó que el circulador de agua y refrigerante se encuentre a 4°C. Se colocó el balón con el extracto en agua de baño maría del equipo que se encontró a una temperatura de 35°C. Se inició con 30 rpm hasta que se formó una película uniforme en todo el balón, se generó el vacío y una vez que comenzó a destilar el solvente se aumentó las revoluciones a 90 rpm sumergiendo el balón en el agua, se terminó de aumentar la revoluciones a 150 rpm. Se observó que ya no exista líquido en el extracto, se recargó con más extracto líquido hasta agotar todo. Una vez evaporado todo el metanol se sacó el balón del equipo y se re disolvió con una pequeña cantidad de metanol en baño maría a 40°C. Se llevó a baño ultrasónico para ayudar a quitar el concentrado de las paredes del balón, se colocó nuevamente una cantidad de metanol menor a la anterior y se repitió el proceso hasta que ya no quede pigmento en el balón. Se pone el concentrado en un tubo tapa rosca.

2.6.4. Secado con nitrógeno

Al extracto recolectado anteriormente en tubos se realizó un secado con nitrógeno gaseoso grado 3, en baño maría a 35°C, la altura que debe tener los tubos de la pipetas al extracto es

de 2 cm, y el flujo no debe ser tan fuerte. Al final del secado debe quedar 4 cm de extracto que posteriormente se pasó a un tubo para liofilizar, al tubo tapa rosca se le agregó agua hasta el nivel de la marca de residuo para lavarlo con ayuda del baño maría con ultrasonido y se agitó hasta quitar residuos de las paredes del tubo, el residuo del lavado se colocó en el tubo para liofilizar, y se repite el proceso hasta que quede limpio el tubo tapa rosca.

2.6.5. Proceso de liofilizado

El tubo para liofilizar que contiene el extracto con agua se llevó a congelar en el biofreezer a -80°C . Se inicia colocándolo en forma horizontal por 5 min, luego de este tiempo se giró el tubo y se lo dejó por 3 min, se giró nuevamente por 3 o 2 min y se repitió el proceso, pero disminuyendo el tiempo entre giro y giro hasta que se haya congelado completamente en forma circular pegado a las paredes del tubo. Se dejó durante 2 horas en congelación, y por último se llevó los tubos al equipo liofilizador, empleado las condiciones de liofilización que fueron a una presión de 0.090 mBar y una temperatura de -52°C .

2.6.6. Extracción con fluidos supercríticos

Para la extracción se utilizó el equipo de fluidos super críticos siguiendo el Procedimiento Normalizado de Trabajo establecido en el Laboratorio de Fitoquímica del grupo de Plantas Medicinales de la Universidad de Cuenca, que emplea como solvente no polar dióxido de carbono, con una pureza de 99.99%. En un inicio se pesó 2,3 g de cada muestra que se colocó en las celdas, se acomodó la celda en el portamuestra conectado con los puertos. Para la extracción se empleó un método automático, donde el co-solvente polar fue metanol grado HPLC con un flujo de 0.5ml/min que representa el 10% del flujo, y el CO_2 tuvo un flujo de 4.5ml/min; a una temperatura de 60°C , con una presión de 200 bar. La extracción se dió en modo dinámico por 20 min, estático por 30 min y nuevamente dinámico por 10 min, por dos ciclos, obteniendo como tiempo de extracción de 120 min. Se recolectó la muestra en tubos tapa rosca, para posteriormente concentrar con nitrógeno hasta dejar aproximadamente 4 ml de muestra, y se almacenó en refrigeración.

2.6.7. Identificación de ácido aristolóquico

2.6.7.1. Cromatografía en capa fina

Para identificar la presencia de ácido aristolóquico de los extractos obtenidos de los bejuco de la Zaragoza se empleó un proceso del Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad de Cuenca, basado en la metodología de para TLC de Abdelgadir et al., (2011), la cual se modificó con el fin de poder observar de mejor manera la presencia. Se prepararon placas de gel de sílice 60 F_{254} de longitud de 5 x 10 cm con respaldo de vidrio y de plástico, se las activó en el Horno Utility a una temperatura de 100°C por 1 hora. Se preparó dos fases móviles, la

primera fue de cloroformo:metanol (6:1) y la segunda fase fue cloroformo:metanol:ácido acético (90:8:2), las cuales acondicionaron por 30 min antes, dentro de la cámara, además se usó como reveladores el reactivo de Dragendorff y reactivo de cloruro de estaño ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Después de revelado con $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se lo colocó en la estufa a 100°C de 10 a 15min. Se observa a luz blanca, a 254 nm y 366 nm utilizando el equipo CAMAG® TLC Visualizador.

Análisis de datos

Cabe recordar que las condiciones en las que se identificó principalmente la presencia de ácido aristolóquico son la coloración amarilla bajo luz blanca, una coloración oscura gris o negra bajo luz UV a 254 nm y una coloración negra con un halo amarillo a 366 nm que conducen a un rango de R_f entre 0.53 - 0.80 (Dey et al., 2021), (Blatter & Reich, 2004), (Sudhakaran, 2014), (Ioset et al., 2003), (Abdelgadir et al., 2011).

3. Resultados Y Discusiones.

3.1. Datos de recolección

La especie de bejuco de Zaragoza se recolectaron en lugares distintos para realizar una comparación de la presencia de ácido aristolóquico, por lo que se le llamará T01 a la muestra de Puyo y T02 a la muestra de Macas (tabla 1).

Tabla 1. Datos geográficos del lugar de recolección.

	T01	T02
Sector	Siguín, vía Macas	Barrio la florida
Longitud	-77.907296	-78.122302
Latitud	-1.545143	-2.287472
Elevación	983.3 m.s.n.m	1063.7 m.s.n.m.
Temperatura	25°C	23°C
Fecha de recolección	02-03-2023	02-03- 2023

3.2. Secado de las muestras de bejuco de la Zaragoza

Las muestras frescas inicialmente pesaron 176.34 g para T01 y 156.57 g para T02 que después del proceso de secado dio como resultado un peso seco de 72.25 y 39.26 g para T01 y T02 respectivamente. Esto pudo deberse a que el porcentaje de humedad que presentó cada muestra tuvo una notable variación del 15%. Siendo mayor el contenido de humedad en la muestra obtenida en la ciudad de Macas con 75% de humedad que de la muestra de Puyo con 60% de humedad, pudiendo deberse a la madurez de las plantas que se definió por las características como son las flores, el grosor del tallo y tamaño de las hojas. En general, el rango de humedad observado concuerda con un estudio realizado por (Claro & Ruiz, 2010), donde menciona que en hojas y tallos jóvenes y tomados al azar presentan un contenido de humedad entre 60-80%, conteniendo mayor humedad las hojas y tallos jóvenes.

3.3. Rendimiento de extracción de bejuco de Zaragoza obtenida por maceración asistida con ultrasonido frente a rendimiento de extracción por fluidos supercríticos

El rendimiento de extracto obtenido por maceración asistida con ultrasonido de la muestra T02 tuvo mayor porcentaje que la muestra T01, ya que de 10 g de muestra seca se obtuvo 11.9% y 7.1% g de extracto liofilizado, respectivamente. De la misma manera, se observa que el rendimiento obtenido después de la extracción por fluidos supercríticos de 2,3 g resulta 10% y 15.2 % para los extractos de T01 y T02, según corresponda, luego de reducir con nitrógeno gaseoso la muestra. Con estos resultados se puede mencionar que la extracción con fluidos supercríticos muestra un mejor rendimiento en comparación con la maceración asistida por ultrasonido. Por lo tanto, la extracción por fluidos supercríticos es más eficiente que la maceración asistida por ultrasonido.

3.4. Identificación por Cromatografía en capa fina

Se determinó la presencia de ácido aristolóquico mediante la coloración que mostró este metabolito, un color amarillo a luz visible, oscura o gris a luz UV de 254 nm y negra con un halo amarillo a luz UV de 366 nm, misma que se observa en las imágenes, esta coloración fue comparada con la literatura de estudios aplicados a diferentes especies de *Aristolochia*.

Al emplear la mezcla de cloroformo:metanol:ácido acético como fase móvil, a partir de los extractos obtenidos por fluidos supercríticos, se observó la presencia de una coloración oscura con un halo amarillo a una longitud de onda de 366 nm que puede significar la presencia de ácido aristolóquico, con un Rf de 0.63 y 0.66 para los extractos T02 y T01, respectivamente, que fueron revelados con cloruro de estaño dihidratado (Figura 3). Estos valores fueron similares para la placa revelada con el reactivo de dragendoff se obtuvo un Rf de 0.61 para T02 y Rf de 0.63 para T01. Sin embargo, cabe mencionar que la intensidad de color se observa más aumentada en el extracto T02 que en el extracto T01. Por otro lado, para los extractos obtenidos por maceración asistida por ultrasonido no se observó la presencia de bandas que representen ácido aristolóquico (Figura 4).

Figura 3. TLC con fase móvil cloroformo:metanol:ácido acético a 254 y 366 nm, Rev. $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

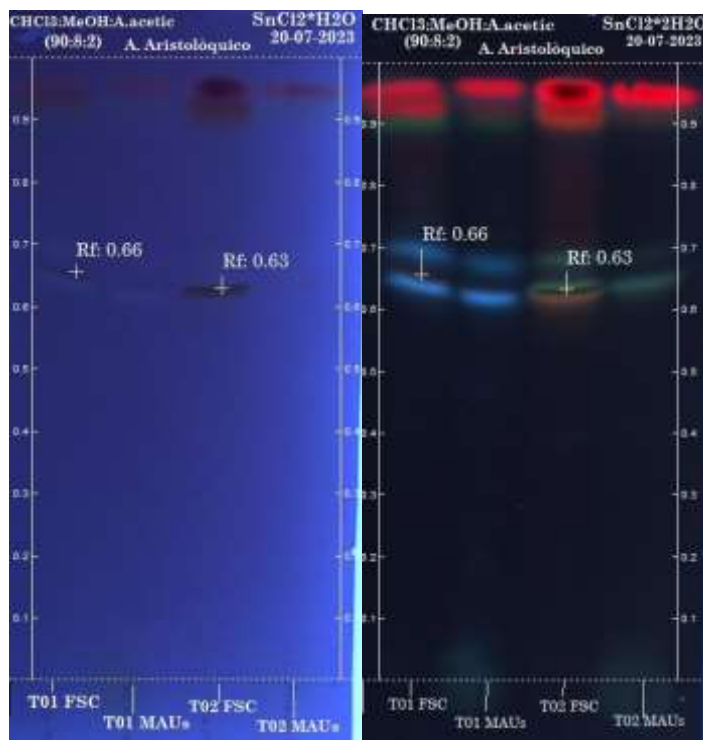
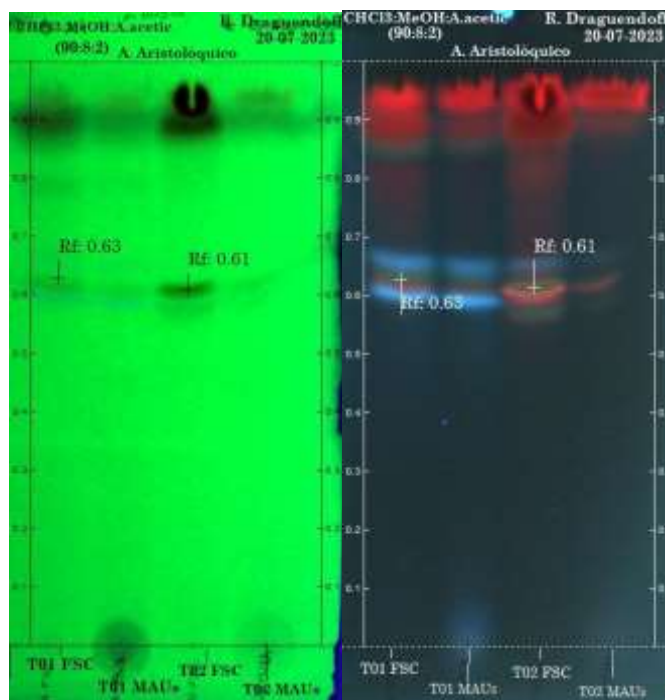


Figura 4. TLC con fase móvil cloroformo:metanol:ácido acético a 254 y 366 nm, Rev. Reactivo Dragendorff.



Para la segunda mezcla de fase móvil de cloroformo:metanol se presenci  de igual manera la coloración oscura con halo amarillo. Sin embargo, a diferencia del anterior solo muestra un Rf 0.63 y 0.77 para el extracto T02 obtenido por fluido supercríticos revelada con cloruro de estaño dihidratado (Figura 5). Estos valores y la coloración fueron similares en la placa revelada con el reactivo de dragendorff con un Rf de 0.68 y 0.77 en el extracto T02 (figura 6). En ambas placas se puede notar una coloración más intensa en el Rf de 0.77. De igual manera no se presentaron bandas en la extracción por maceración asistida con ultrasonido que indiquen la presencia de ácido aristolóquico.

Figura 5. TLC con fase móvil cloroformo:metanol a 254 y 366 nm. Rev. $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

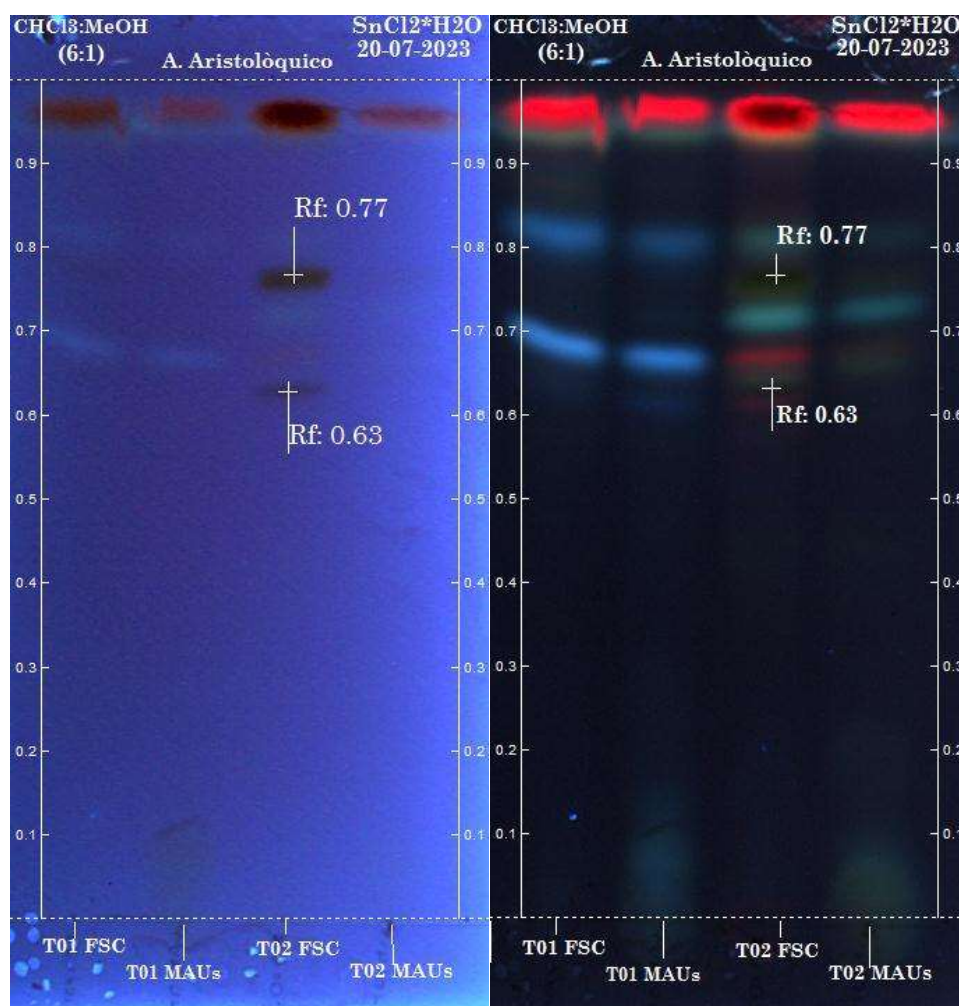
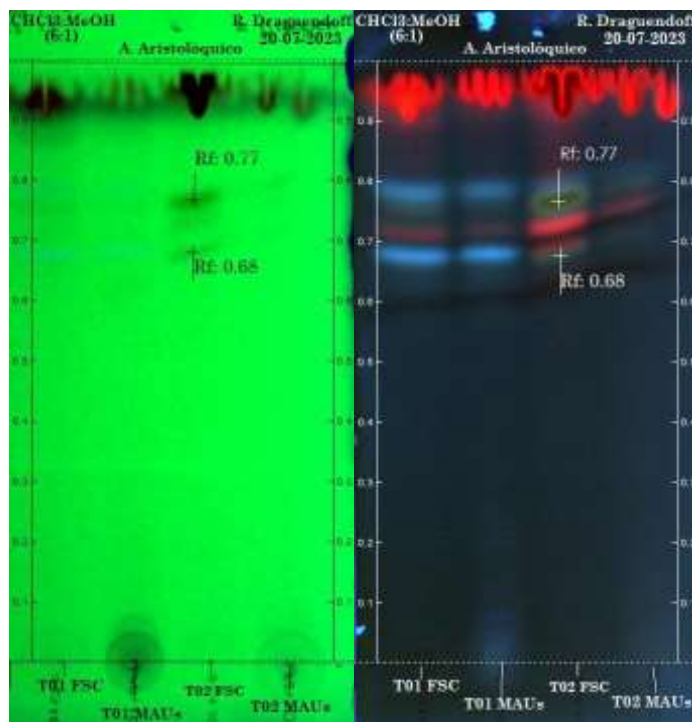


Figura 6. TLC con fase móvil cloroformo:metanol a 254 y 366 nm, Rev. Reactivo Dragendorff.



En este proyecto se usa dos reveladores, el primero se trata del reactivo de dragendorff, el cual permitió la visualizar la presencia del metabolito. Sin embargo, la intensidad de la coloración fue menor que la del revelador de reactivo de $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ que muestra una coloración más intensa, permitiendo una identificación más clara, demostrando así que el $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ permite una mejor visualización de las muestras.

En cuanto al factor de retención resultó en un rango de Rf entre 0.61-0.77 que, al comparar con investigaciones de Dey, Blatter & Reich, Sudhakaran, Ioset, Abdelgadir, basadas en similares metodologías donde se concluye un rango de Rf entre 0.53 - 0.80.

En este estudio se observó que la muestra T02 obtenida por fluido supercrítico presenta en las dos fases móviles las condiciones que pueden indicar la presencia de ácido aristolóquico. Por otro lado, en la muestra T01 solamente se observa estas condiciones en la fase móvil cloroformo:metanol:ácido acético. Esto quiere decir que la presencia de bandas que indiquen el hallazgo del metabolito depende de varios factores como pueden ser el método de extracción, la naturaleza del compuesto, concentración del compuesto, así como su afinidad por la fase estacionaria y fase móvil, entre otros. de acuerdo con Miller (2005).

Es importante mencionar que la concentración de metabolitos varía dependiendo de la eficiencia del método de extracción. Puesto que, un método de extracción eficiente permite recuperar la mayor cantidad de metabolitos posibles de la muestra. Si la extracción es incompleta, los metabolitos pueden quedar atrás en la matriz de muestra y no se detectarán en concentraciones significativas (Azuola & Vargas, 2017).

Al realizar la extracción, solamente con fluidos supercríticos se pudo observar la presencia del metabolito en las placas de cromatografía de capa fina. Esto puede deberse a los parámetros que se emplea en este método, puesto que para la extracción se emplea un solvente apolar que es el dióxido de carbono CO_2 , que tiene una temperatura crítica de 31°C y una presión de 74 bar. Que al superar los puntos críticos de la presión y temperatura se logra obtener el fluido supercrítico, que presenta una densidad y viscosidad que permiten una mayor difusión del solvente por las membranas, produciendo un aumento en la penetración a los poros lo que conlleva de esta manera a obtener un gran rendimiento del extracto final. Además, se emplea un co-solvente que confiere cierta polaridad al fluido supercrítico, aumentando su capacidad como disolvente (Páez et al., 2016).

Por otro lado, la extracción por maceración asistida con ultrasonido, conforme con Azuola & Vargas (2017), emplea sonidos de alta frecuencia y potencia que van hasta 100 kHz, buscando desprender los compuestos de interés. Para esto se debe tener en cuenta la temperatura, el tiempo de extracción, así como de la duración del ciclo de sonicación que se aplica, ya que esto es muy importante obtener mayor concentración de metabolitos, tomando en cuenta la sustancia que se desea extraer. Mismos que fueron tomados en cuenta en este estudio empleando tres ciclos de una hora a 40°C . Sin embargo, no se pudo evidenciar la presencia del metabolito de interés.

De acuerdo con los resultados obtenidos la ausencia de metabolitos en las placas de cromatografía en capa fina puede deberse principalmente al método de extracción, ya que un adecuado método de extracción puede purificar la muestra y eliminar compuestos no deseados. Así como, puede concentrar la muestra al eliminar solventes o diluyentes no deseados. Una muestra más concentrada puede producir bandas más intensas en la cromatografía (Miller, 2005).

Además, Miller (2005) menciona que la fase móvil en cromatografía influye significativamente en la presencia de bandas en una cromatografía en capa fina. Ya que, debe ser capaz de disolver las sustancias esperadas. Si una sustancia es poco soluble en la fase móvil, puede no moverse adecuadamente a través de la placa y puede dar lugar a una banda débil o

ausente. Comparativamente con los resultados que se obtuvo en la fase móvil cloroformo:metanol, la ausencia de banda en la placa puede deberse a la concentración de metabolito, así como la afinidad que esta muestra tuvo con esta fase.

4. Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

Este estudio tuvo por objetivo determinar el método de extracción e identificación adecuados para la obtención del ácido aristolóquico, a partir de la especie bejuco de Zaragoza. Se evaluó los métodos de maceración asistida por ultrasonido y fluidos supercríticos determinando el más óptimo por medio de la identificación del ácido aristolóquico por cromatografía en capa fina, utilizando dos mezclas de fases móviles diferentes.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se demostró que el método de extracción con el cual se podría evidenciar la presencia de ácido aristolóquico fue el de fluidos supercríticos, ya que muestra presencia de metabolitos en las placas de cromatografía. Además, la fase móvil que muestra mejor afinidad fue la mezcla de cloroformo:metanol:ácido acético, junto con el revelador de cloruro de estaño dihidratado que permitió una mejor visualización de las bandas.

En base al ensayo realizado se concluye que el método de extracción óptimo es el método de fluidos supercríticos, por las condiciones que se presentaron en las placas de cromatografía, haciendo sospechar de la presencia de ácido aristolóquico. Sin embargo, no se puede concluir el método de identificación idóneo debido a que para comprobar la presencia de ácido aristolóquico, además de las condiciones aplicadas, se requiere de un patrón de referencia.

Recomendaciones

Realizar la identificación del ácido aristolóquico utilizando un patrón de referencia, para confirmar la presencia de este compuesto en las muestras recolectadas

Mejorar la metodología de extracción por fluidos supercríticos para aumentar la eficacia en el proceso extractivo.

Realizar la extracción de la for del bejuco de Zaragoza en su época de floración.

Recolectar las muestras de distintos sectores para realizar el análisis.

Referencias

- Abdelgadir, A. A., Ahmed, E. M., & Eltohami, M. S. (2011). Isolation, Characterization and Quantity Determination of Aristolochic Acids, Toxic Compounds in *Aristolochia bracteolata* L. *Environmental Health Insights*, 5, EHI.S6292. <https://doi.org/10.4137/EHI.S6292>
- Aves, K.-L., Janitzek, C. M., Fougeroux, C. E., Theander, T. G., & Sander, A. F. (2022). Freeze-Drying of a Capsid Virus-like Particle-Based Platform Allows Stable Storage of Vaccines at Ambient Temperature. *Pharmaceutics*, 14(6), 1301. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14061301>
- Baltazar, A., Faria, B., Bispo, C., & Cordeiro, M. (2021). Ácido Aristolóquico – Nefropatia e o Cancro. *Acta Portuguesa de Nutrição 2021*, 24, 70-75. <https://doi.org/10.21011/apn.2021.2413>
- Bitwell, C., Indra, S. S., Luke, C., & Kakoma, M. K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, 19, e01585. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585>
- Blanco, A., Monte, M. C., Campano, C., Balea, A., Merayo, N., & Negro, C. (2018). Chapter 5 - Nanocellulose for Industrial Use: Cellulose Nanofibers (CNF), Cellulose Nanocrystals (CNC), and Bacterial Cellulose (BC). En C. Mustansar Hussain (Ed.), *Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications* (pp. 74-126). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813351-4.00005-5>
- Blatter, A., & Reich, E. (2004). High Performance Thin-Layer Chromatographic Analysis of Aristolochic Acids in Chinese Drugs. *JPC – Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*, 17(5), 355-359. <https://doi.org/10.1556/JPC.17.2004.5.6>
- Caballero-Serrano, V., McLaren, B., Carrasco, J. C., Alday, J. G., Fiallos, L., Amigo, J., & Onaindia, M. (2019). Traditional ecological knowledge and medicinal plant diversity in Ecuadorian Amazon home gardens. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00524. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00524>

- Claro, R. A., & Ruiz, N. (2010). *Aceptación de una dieta artificial por larvas de la mariposa Battus polydamas polydamas (LEPIDOPTERA: PAPILIONIDAE)*. 15, 47-62.
- Dey, A., Nongdam, P., Nandy, S., Mukherjee, S., Mukherjee, A., Tikendra, L., Hazra, A. K., & Pandey, D. K. (2021). Polyamine elicited aristolochic acid production in in vitro clonally fidel *Aristolochia indica* L.: An ISSR and RAPD markers and HPTLC based study. *South African Journal of Botany*, 140, 326-335. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.06.018>
- Fang, L., Tian, M., Row, K. H., Yan, X., & Xiao, W. (2019). Isolation of aristolochic acid I from herbal plant using molecular imprinted polymer composited ionic liquid-based zeolitic imidazolate framework-67. *Journal of Separation Science*, 42(19), 3047-3053. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900554>
- González, F. (1990). *Flor de Colombia*. 1990, 9-45.
- Huebla Quishpe, D. E. (2016). *Extracción aislamiento y purificación de alcaloides del extracto del tallo de zaragosa (Aristolochia elegans)*. 56.
- loset, J.-R., Raelison, G. E., & Hostettmann, K. (2003). Detection of aristolochic acid in Chinese phytomedicines and dietary supplements used as slimming regimens. *Food and Chemical Toxicology*, 41(1), 29-36. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00219-3](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00219-3)
- Jadot, I., Declèves, A.-E., Nortier, J., & Caron, N. (2017). An Integrated View of Aristolochic Acid Nephropathy: Update of the Literature. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ijms18020297>
- Jha, A. K., & Sit, N. (2022). Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 119, 579-591. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.019>

- Jordan, S. A., & Perwaiz, S. (2014). Aristolochic Acids. En P. Wexler (Ed.), *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)* (pp. 298-301). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.01164-7>
- Kuo, P.-C., Li, Y.-C., & Wu, T.-S. (2012). Chemical Constituents and Pharmacology of the Aristolochia (馬兜鈴 mǎdōu líng) species. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 2(4), 249-266. [https://doi.org/10.1016/S2225-4110\(16\)30111-0](https://doi.org/10.1016/S2225-4110(16)30111-0)
- Lerma-Herrera, M. A., Beiza-Granados, L., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Navarro-Santos, P., Herrera-Bucio, R., Aviña-Verduzco, J., & García-Gutiérrez, H. A. (2022). Biological Activities of Organic Extracts of the Genus Aristolochia: A Review from 2005 to 2021. *Molecules*, 27(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/molecules27123937>
- Leusen, D. van. (1994, enero 1). *Prevent the Loss of Volatile Solvents in Rotary Evaporators with a Simple Device* (world) [Research-article]. ACS Publications; Division of Chemical Education. <https://doi.org/10.1021/ed071p54.2>
- Liang, Q., Chow, A. H. L., Wang, Y., Tong, H. H. Y., & Zheng, Y. (2010). Removal of toxic aristolochic acid components from Aristolochia plants by supercritical fluid extraction. *Separation and Purification Technology*, 72(3), 269-274. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2010.02.016>
- Moreno, C. M. (2021, abril 26). *Nefrotoxicidad inducida por fármacos en el periodo perioperatorio y la UCI*. AnestesiaR. <https://anestesar.org/2021/nefrotoxicidad-inducida-por-farmacos-en-el-periodo-perioperatorio-y-la-uci/>
- Neto, M. M., Wright, E., Temperton, N., Soema, P., Ten Have, R., Ploemen, I., & Scott, S. (2023). Application and comparison of lyophilisation protocols to enhance stable long-term storage of filovirus pseudotypes for use in antibody neutralisation tests. *Journal of Applied Microbiology*, 134(2), Ixac067. <https://doi.org/10.1093/jambio/ixac067>

Páez, M. A. R., Narváez, C. M. R., Bermúdez, L. M. C., Muñoz, L. M., Gómez, D. D., Carvalho, C. P., & Rico, J. M. Q. (2016). *Guía de extracción por fluidos supercríticos: fundamentos y aplicaciones*.

Paizanni, A., & Santana, F. (2018). Flora de Bajío y Regiones Adyacentes. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2018, 1-32.
<https://doi.org/10.1155/2014/820589>

Paredes, J. D., Sosa, Á., Fusco, M., Teves, M. R., Wendel, G. H., & Pelzer, L. E. (2016). Antidiarrhoeal activity of *Aristolochia argentina* Gris. (Aristolochiaceae) in rodents. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6,(2), 146-152.
<https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60223>

Sudhakaran, M. V. (2014). Pharmacognostic and HPTLC Fingerprint Profile of the Root of *Aristolochia indica* Linn. And Quantification of the Marker Compound. *European Journal of Medicinal Plants*, 1113-1124.
<https://doi.org/10.9734/EJMP/2014/9570>

Wang, L., Liu, Y., Pu, F., Zhang, W., & Zhou, Z. (2018). Effect of Rotary Evaporator Water Bath Temperature on Recovery Rate of Phthalate Esters. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 101(6), 810-813.
<https://doi.org/10.1007/s00128-018-2440-3>

Zhang, H.-M., Zhao, X.-H., Sun, Z.-H., Li, G.-C., Liu, G.-C., Sun, L.-R., Hou, J.-Q., & Zhou, W. (2019). Recognition of the toxicity of aristolochic acid. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 44(2), 157-162.
<https://doi.org/10.1111/jcpt.12789>

Zhang, M., Liu, H., Han, Y., Bai, L., & Yan, H. (2021). A review on the pharmacological properties, toxicological characteristics, pathogenic mechanism and analytical methods of aristolochic acids. *Toxin Reviews*, 40(4), 606-615. <https://doi.org/10.1080/15569543.2020.1811344>

Anexos

Anexo A. Plantas recolectadas

Anexo 1.1. Flor de bejuco de Zaragoza



Anexo 1.2. Hojas de bejuco de Zaragoza



Anexo 1.3. Tallos de bejuco de Zaragoza, Puyo y Macas, respectivamente.



Anexo B. Equipos utilizados en el ensayo

Anexo 2.1. Equipo de Baño de ultrasonido Branson 8893



Anexo 2.2. Equipo Liofilizador, FreeZone 2.5 de LABCONCO ®



Anexo 2.3. Equipo de fluido supercrítico, marca Waters ®, modelo MV10



Anexo 2.4. Rotavapor marca Laborota 4000 Efficient de Heidolph ®



Anexo 2.5. Equipo CAMAG ® visualizador TLC



Anexo C. Tablas de preparación de compuestos

Anexo 3.1. Preparación fase móvil.

Cloroformo, CHCl₃: Metanol, CH₃OH, relación 6:1 para 35 ml	
Cloroformo	30 ml
Metanol	5 ml

Anexo 3.2. Preparación fase móvil 2.

Cloroformo, CHCl₃: Metanol, CH₃OH:Ácido acético, CH₃COOH relación 90:8:2 para 35 ml	
Cloroformo	31.5 ml
Metanol	2.8 ml
Ácido acético	0.7 ml

Anexo 3.3. Preparación Reactivo de Dragendorff.

Reactivo de Dragendorff para 50 ml	
Solución madre	4 ml
Ácido acético	8 ml
Agua tipo 2	38 ml

Anexo 3.4. Preparación de reactivo cloruro de estaño dihidratado.

Reactivo de Cloruro de estaño dihidratado para 50 ml	
Ácido clorhídrico, HCl, 36%	8 ml
Agua tipo 2	42 ml
Cloruro de estaño dihidratado $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.2 g