



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**Facultad de Ciencias Químicas**  
**Carrera de Bioquímica y Farmacia**

**“Comparación de las gradientes cromatográficas de las principales especies de  
*Desmodium*”**

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

**Autores:**

- Mariuxi del Cisne Asanza Aguilar  
CI: 0706336302  
Correo: mariuxcis2016@gmail.com
- Josselyn Stephanny Gutierrez Yaguana  
CI: 0750498651  
Correo: jsgy\_96@hotmail.com

**Tutora:**

- Nancy Mirian Cuzco Quizhpi  
CI: 0301624854

**Asesor:**

Fabián León Tamariz  
C.I. 0102311610

**Cuenca, Ecuador**

**22 de marzo del 2022**



## RESUMEN

El género *Desmodium* ha sido muy estudiado debido a su amplio uso etno-farmacológico. La literatura reporta que los flavonoides son los principales compuestos de este género; los mismos que son identificados generalmente por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Dado que para el desarrollo de esta técnica es importante tomar en cuenta las variables cromatográficas más relevantes y debido a la escasa existencia de investigaciones en las que se recopila y compara información sobre las diferentes metodologías cromatográficas, se realizó esta revisión bibliográfica narrativa cuyo objetivo fue establecer una base de datos informativa acerca de las distintas metodologías del fingerprint cromatográfico y sus diferencias, en las principales especies del género *Desmodium*. Se inició con una búsqueda exhaustiva de artículos originales, en inglés y español publicados desde el 2010 sobre la metodología y los resultados obtenidos a partir de las huellas dactilares mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para las principales especies del género *Desmodium*. El análisis de un total de 18 artículos permitió obtener una base de datos comparativa, dando como resultado el destacado uso de extractos hidroalcohólicos, además existe la particularidad que en todos los casos se empleó las columnas de partículas C18 junto a una fase móvil conformada por un disolvente orgánico y una solución acuosa acidificada, y se verificó que la mayoría de los estudios determinó flavonoides como sus principales metabolitos secundarios, de los cuales la vitexina, isovitexina, schaftoside e isoschaftoside se presentan como picos comunes entre los cromatogramas.

**PALABRAS CLAVE:** *Desmodium*. Huella digital. Cromatografía líquida de alta resolución. HPLC. Flavonoides.



## ABSTRACT

The *Desmodium* genre has been extensively studied due to its wide pharmacologic use associated to flavonoids; which are generally identified by the high performance liquid chromatography (HPLC), since for the development of this technique is important to take into account the most relevant chromatographic variables and due to the scarce existence of investigations in which information is collected and compared on the different chromatographic methodologies, this bibliographic review was made with the main objective of establishing an informative database about the different chromatographic fingerprint methodologies and their differences, between the principal species of the *Desmodium* genre. It began with an exhaustive search for original articles that have been published in English and Spanish since 2010 about the methodology and the results obtained from the fingerprints by the high performance liquid chromatography (HPLC) for the main species of the *Desmodium* genre. The analysis of a total of 18 articles allowed to obtain a comparative database, the same that facilitated the determination of the most relevant variables like the extractive processes, the analyses conditions, and the identified metabolites, resulting in the prominent use of C18 particle columns along with a mobile phase made up of an organic solvent and an acidified aqueous solution, and it was verified that most of the studies determined flavonoids as their main secondary metabolites, of which vitexin, isovitexin, schaftoside and isoschaftoside appear as common peaks among the chromatograms.

**KEY WORDS:** *Desmodium*. Fingerprint. High performance liquid chromatography. HPLC. Flavonoids.



## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
CLÁUSULAS .....	7
DEDICATORIA .....	11
AGRADECIMIENTOS .....	12
CAPÍTULO I.....	13
1.1. INTRODUCCIÓN .....	13
1.2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS .....	14
1.2.1. Objetivo general .....	14
1.2.2. Objetivos específicos .....	14
CAPITULO II.....	15
2. CONTENIDO TEÓRICO .....	15
2.1. DESMODIUM .....	15
2.1.1. Fundamento botánico y taxonómico .....	15
2.1.2. Perfil fitoquímico.....	16
2.1.3. Usos .....	16
2.2. CROMATOGRAFÍA.....	17
2.2.1. Definición .....	18
2.2.2. Generalidades .....	18
2.3. HPLC .....	19
2.3.1. Principios .....	19
2.3.2. Información sobre la composición de la muestra para establecer el objetivo del análisis HPLC.....	20
2.3.3. Obtención del extracto a utilizar.....	20
2.3.4. Método .....	21
CAPITULO III.....	26
3. METODOLOGÍA .....	26
3.1. Diseño y tipo de estudio .....	26
3.2. Estrategias de búsqueda .....	26
3.3. Criterios de selección .....	27
3.4. Criterios de Inclusión.....	27
3.5. Criterios de exclusión.....	27
3.6. Selección de artículos .....	27
3.7. Recolección de datos .....	28



<b>CAPÍTULO IV</b> .....	29
<b>RESULTADOS</b> .....	29
<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	48
<b>CONCLUSIÓN</b> .....	51
<b>RECOMENDACIONES</b> .....	53
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	54



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Desmodium adscendens</i> .....	29
Tabla 2. <i>Desmodium affine</i> Schlttl .....	32
Tabla 3. <i>Desmodium barbatum</i> .....	32
Tabla 4. <i>Desmodium cuneatum</i> .....	33
Tabla 5. <i>Desmodium gangeticum</i> .....	34
Tabla 6. <i>Desmodium incanum</i> .....	36
Tabla 7. <i>Desmodium intortum</i> .....	37
Tabla 8. <i>Desmodium leiocarpum</i> .....	38
Tabla 9. <i>Desmodium ovalifolium</i> .....	39
Tabla 10. <i>Desmodium styracifolium</i> .....	39
Tabla 11. <i>Desmodium subsericeum</i> .....	43
Tabla 12. <i>Desmodium tortuosum</i> .....	44
Tabla 13. <i>Desmodium triflorum</i> .....	45
Tabla 14. <i>Desmodium uncinatum</i> .....	46



## CLÁUSULAS

### Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Mariuxi del Cisne Asanza Aguilar en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Comparación de las gradientes cromatográficas de las principales especies de *Desmodium*”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 22 de marzo de 2022

---

Mariuxi del Cisne Asanza Aguilar

C.I: 0706336302



**Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional**

---

Josselyn Stephanny Gutiérrez Yaguana, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Comparación de las gradientes cromatográficas de las principales especies de *Desmodium*”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 11 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 22 de marzo de 2022

---

Josselyn Stephanny Gutiérrez Yaguana

0750498651



## Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Mariuxi del Cisne Asanza Aguilar, autora del trabajo de titulación "Comparación de los gradientes cromatográficos de las principales especies de *Desmodium*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 22 de marzo de 2022

---

Mariuxi del Cisne Asanza Aguilar

C.I: 0706336302



### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Josselyn Stephanny Gutiérrez Yaguana, autora del trabajo de titulación “Comparación de las gradientes cromatográficas de las principales especies de *Desmodium*”, certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de la exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 22 de marzo de 2022

---

Josselyn Stephanny Gutiérrez Yaguana

0750498651



## DEDICATORIA

Me gustaría dedicar esta tesis a toda mi familia de manera especial a mis abuelos, mis tíos y mi madre quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más. A mi hermanita Anyely por todo su cariño y estar conmigo en todo momento. A la más pequeñita de la casa mi prima Enara. Finalmente quiero dedicar esta tesis a mis amigos, por apoyarme, por extender su mano en momentos difíciles y por el amor brindado cada día.

Con cariño, Mariuxi

El desarrollo del presente trabajo de titulación se lo dedico de todo corazón a mis padres Rodrigo y Elizabeth, quienes me apoyaron incondicionalmente a lo largo de toda mi formación universitaria, por la paciencia y consejos brindados en cada momento de mi vida. A mi hijo Mathias que con sus alegrías es mi motor y la luz de mí vivir. A mis hermanos Claudio y Madeleyne por el apoyo en cada etapa de mi vida. De igual manera a la sra. Sara por haberme ayudado incondicionalmente a lo largo de todo este proceso. A todas las personas que me brindaron ánimos durante el desarrollo del presente trabajo, gracias por todo.

Con cariño, Josselyn.



## AGRADECIMIENTOS

Al concluir una etapa maravillosa de nuestra vida queremos extender un profundo agradecimiento a quienes hicieron posible este sueño, a todas las autoridades y personal que hacen a la Universidad de Cuenca por abrirnos las puertas y permitir formarnos como profesionales.

Gracias a la Dra. Nancy Cuzco, tutora de nuestra tesis, a quien hacemos llegar nuestro más sincero agradecimiento, por permitirnos ser partícipes de uno de sus proyectos dentro de la Universidad y por su entrega incondicional durante el desarrollo de este trabajo de investigación, de la misma manera a nuestro asesor Dr. Fabian León, por su ayuda para el desarrollo del mismo, por ser parte de este maravilloso proceso al guiarnos en todas nuestra inquietudes.

A todos los docentes por todos sus conocimientos que nos impartieron a lo largo de toda la formación universitaria.



## CAPÍTULO I

### 1.1.INTRODUCCIÓN

Habitualmente las plantas han sido empleadas como fármacos, pues durante muchos años los remedios naturales y en especial las plantas medicinales fueron el principal e inclusive el único recurso disponible para el tratamiento de enfermedades. En la actualidad, las plantas medicinales continúan formando parte principal de las estrategias llevadas a cabo por la población, sobre todo de aquellos países en vías de desarrollo, para hacer frente a una variedad de enfermedades.

El género *Desmodium* es integrante de la familia Fabaceae mismo que abarca alrededor de 350 especies encontrándose ampliamente distribuido alrededor de todo el mundo. El creciente estudio de este género se debe a su amplio uso en la medicina tradicional, dichos estudios han evaluado los usos etnofarmacológicos, la fitoquímica, la farmacología y la toxicología de las especies de *Desmodium* (Farid et al., 2018; Ma et al., 2011). Como consecuencia del incremento de los estudios efectuados en este género surgió la necesidad de desarrollar procedimientos eficaces que confirmen la identidad de las especies, aseguren la confiabilidad y precisión de las investigaciones farmacológicas y clínicas para conocer su bioactividad y posibles efectos colaterales de los principios activos, así como mejorar el control de calidad de productos provenientes de este género (Lucio Gutiérrez, 2012).

En los últimos años, varios investigadores han establecido al fingerprint cromatográfico de las plantas medicinales como un procedimiento eficaz para su identificación química. La técnica denominada “huella dactilar o fingerprint”, tiene como objetivo establecer, analizar y comparar patrones de metabolitos en un sistema biológico dado, como los presentes en una planta, proporcionando la composición completa de todos los componentes de cada individuo, los cuales permitirán relacionar con las propiedades farmacológicas de las distintas especies (Chen et al., 2020; Lucio Gutiérrez, 2012). El fingerprint puede ser generado mediante cromatografía



líquida de alta resolución (HPLC), debido a su alta sensibilidad, exactitud y precisión, siendo ésta la herramienta más adecuada para identificar los principales metabolitos secundarios reportados dentro de un género. Esta técnica consiste en la separación de componentes de una mezcla mediante la utilización de una fase estacionaria llamada columna que generalmente está compuesta de sólidos adsorbidos en un soporte sólido y una fase móvil compuesta por líquidos que junto con la muestra es inyectada y se desplazarán por la fase estacionaria mediante presión y por un mecanismo de adsorción, reparto, afinidad química y/o tamaño de los solutos; los componentes de la mezcla se separarán y podrán ser identificados por un detector a la longitud de onda específica para el metabolito analizado (Araceli et al., s. f.; Chavez, 2018; Chen et al., 2020).

El empleo de esta técnica es aprobada por organizaciones como la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), como una de las primeras valoraciones que deben ser aplicadas a las plantas para poder corroborar su autenticidad y calidad (Lucio Gutiérrez, 2012).

## **1.2.OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS**

### **1.2.1. Objetivo general**

Establecer una base de datos informativa acerca de las distintas metodologías del fingerprint cromatográfico y sus diferencias en las principales especies del género *Desmodium*.

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- Comparar las metodologías del fingerprint por cromatografía líquida de alta resolución descritas para las principales especies del género *Desmodium*.
- Establecer las principales diferencias metodológicas entre los análisis aplicados a distintas especies del género *Desmodium*.



## CAPITULO II

### 2. CONTENIDO TEÓRICO

#### 2.1. DESMODIUM

##### 2.1.1. Fundamento botánico y taxonómico

El género *Desmodium* fue descrito por Desvaux en 1813, en la actualidad es uno de los más importantes y con mayor diversidad dentro de la familia Fabaceae, este género está representado por alrededor de 350 especies, las cuales se encuentran distribuidas principalmente en países tropicales y subtropicales en todo mundo, pero es poco común en las regiones templadas del hemisferio norte, en donde crecen con precipitaciones entre 500 y 1000 mm, temperaturas entre 12 y 30 °C y con una humedad atmosférica entre 70 y 90% (Ma et al., 2011; Ohashi et al., 2021; Rastogi et al., 2011). Los centros de diversidad de este género se encuentran en el Sureste de Asia y en América principalmente en México y Brasil (Lima et al., 2014; Torres-Colín et al., 2015).

Dentro del género *Desmodium* se encuentran especies como: *Desmodium adscendens*, *D. blandum*, *D. canum*, *D. caudatum*, *D. gangeticum*, *D. gyrans*, *D. microphyllum*, *D. oxyphyllum*, *D. podocarpum*, *D. pulchellum*, *D. sambuense*, *D. styracifolium*, *D. tiliaefolium*, *D. triflorum*, *D. uncinatum* entre otras. En Ecuador también se ha reportado *D. procumbens*, *D. intortum*, *D. uncinatum*, *D. tortousum*, *D. molliculum*, entre otras y en los potreros de la costa y los valles bajos de la sierra abundan especies nativas como *D. barbatum*, *D. canum*, *D. heterocarpum*, *D. discolor*, comúnmente conocidas como pega-pega, amor seco, amor fino, por la característica de sus semillas de pegarse a la ropa de las personas o la piel de los animales. En nuestro país, la distribución de este género abarca muchas provincias, en alturas que van desde el nivel del mar hasta los 4000 m.s.n.m, es muy común en campos abiertos, pastizales e incluso en zonas de cultivos (León et al., 2018; Lima et al., 2014; Rolando, 1978).



Fenotípicamente, este género se caracteriza por ser “arbustos o hierbas que poseen estípulas libres o unidas, hojas folioladas o pinnadas, inflorescencias axilares o terminales, falsamente racemosas o paniculadas, cáliz pequeño (tubo generalmente de 1-2 mm, lóbulos de 1-5 mm), de 5 lóbulos, ya sea con lóbulos subiguales, ovario sésil, vaina articulada transversalmente, aplanada a menudo con pelos en forma de gancho” (Lima et al., 2014).

### **2.1.2. Perfil fitoquímico**

Debido a sus múltiples usos en medicina tradicional y su importancia en la misma, cada día existen más estudios fitoquímicos en las plantas de este género, por lo que se han descrito alrededor de 200 compuestos como flavonoides, alcaloides, esteroides, taninos, terpenoides y saponinas, entre otros. Varias investigaciones fitoquímicas de las principales especies de *Desmodium* han mostrado que los flavonoides, especialmente isoflavonoides, y alcaloides de tipo indol son los compuestos más abundantes; además, se consideran responsables de la mayoría de actividades farmacológicas descritas para este género (León et al., 2018; Ma et al., 2011; Olascuaga-Castillo et al., 2020).

Las plantas medicinales, incluyendo las de este género, difieren significativamente en la cantidad de metabolitos secundarios según su ubicación geográfica. Aunque entre las mismas especies comparten patrones similares, las concentraciones de los picos comunes que se presentan en los cromatogramas varían, esto no solo por la ubicación de la planta sino, por variaciones en los años de cultivo, época de cosecha, climas y medio ambiente. Según estudios y de forma general, se ha determinado que las muestras que presentan concentraciones más altas de flavonoides procedían de regiones a menor altitud (Xianduo Sun et al., 2018).

### **2.1.3. Usos**

Como se ha observado en fuentes bibliográficas, las especies de este género poseen diversas características, lo que les proporciona una gran cantidad de utilidades que pueden ir desde



cultivos, abonos verdes, forrajes, hasta una amplia gama de aplicaciones con fines medicinales. Los usos tradicionales del género *Desmodium* se han transmitido a lo largo de los años, sus distintas especies son comúnmente utilizadas para aliviar inflamaciones respiratorias, infecciones de la piel, micosis, cicatrización de heridas, como antiséptico, diarrea, dolor de estómago, neutralizar toxinas, mejorar la circulación sanguínea, para el tratamiento de enfermedades como el asma, reumatismo, abscesos, desnutrición infantil, enfermedades reumáticas, entre otras (Ma et al., 2011; Olascuaga-Castillo et al., 2020; Rahman & Rahman, 2012).

A nivel de nuestro país se ha reportado principalmente los usos de *D. molliculum* comúnmente conocida como hierba del infante y de *D. tortosum* conocida como hierba de San Antonio. La primera se usa como especie sedativa y para aliviar inflamaciones respiratorias, infecciones persistentes de la piel, micosis y acné. Mejora las funciones de riñones y es diurética. Para *D. tortosum* se describe su uso en enfermedades respiratorias (León et al., 2018).

En cuanto a las estructuras empleadas, la planta entera es la más utilizada, seguida de las hojas y raíces, generalmente se preparan por decocción o infusión y pueden administrarse por vía oral o tópica en las zonas afectadas (León et al., 2018; Ma et al., 2011).

## **2.2. CROMATOGRAFÍA**

En el siglo XXI la cromatografía se ha convertido en el principal método analítico en varias disciplinas de la ciencia, cuyo descubrimiento se atribuye al botánico ruso M.S. Tswett a principios del siglo XX en 1906, con el paso de los años y la necesidad de nuevas técnicas confiables que faciliten la separación, aislamiento, purificación y cuantificación de componentes presentes en muestras líquidas, sólidas o gaseosas muchos investigadores realizaron importantes avances y notables mejorías que ayudaron a la evolución de la cromatografía, convirtiéndose en una técnica de análisis mediante el acoplamiento de



dispositivos para monitorear los compuestos separados (Cazes & Scott, 2002; Lough & Wainer, 1995; Miller, 1993; Poole, 2003; Wixom, 2001).

### **2.2.1. Definición**

Keulemans en 1959 definió a la cromatografía como un proceso físico de separación la cual se logra por la distribución de los compuestos a separar en dos fases inmiscibles como lo son una fase móvil o fluido y una fase estacionaria o lecho cromatográfico en el cual los analitos recorrerán dicho lecho con la ayuda de la fase móvil para poder ser retenidos (Cazes & Scott, 2002; Poole, 2003).

### **2.2.2. Generalidades**

El proceso de las técnicas cromatográficas abarca la disolución de la muestra o analito en la fase móvil que puede estar conformado por un líquido o gas (líquida o de gases respectivamente), esta fase junto a la muestra se desplazarán por el lecho cromatográfico que contiene una fase estacionaria (sólido o líquido) que se van a mantener fijos en una columna o superficie plana; ambas fases son completamente inmiscibles entre sí, lo que facilita el transporte de los componentes de la muestra (llamados solutos o analitos) a separar. La clave del proceso cromatográfico radica en la velocidad con la que se mueve cada soluto de la muestra y la afinidad de éstos por cada fase; siendo así que una estrecha afinidad de los solutos por la fase estacionaria avanzarán de manera lenta por ser mayormente retenidos en esta fase, a diferencia de los solutos con mayor afinidad a la fase móvil que se moverán con mayor rapidez por la fase estacionaria al no ser retenidos por la misma, por tal razón, la separación de los componentes va a ser el resultado de los continuos movimientos de éstos a su paso por la fase estacionaria a diferente velocidad, originando que cada componente tenga tiempos de retención diferentes (Cazes & Scott, 2002; Lindsay, 1992; Sgariglia et al., 2010).



## 2.3. HPLC

### 2.3.1. Principios

La evolución de la cromatografía toma un precedente importante en 1930 con el redescubrimiento del trabajo del botánico M.S. Tswett; en 1941 Martin y Synge narran el descubrimiento de la cromatografía líquida-líquida (LC), fundamentaron los principios de la cromatografía líquido-gas (GLC), y de la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), esta última técnica cobra importancia en 1964 cuando Csaba Horvath construyó el primer dispositivo HPLC para el aislamiento de compuestos; en su fase inicial necesita el uso de altas presiones de operación y de pequeñas partículas de empaquetamiento. Actualmente, esta técnica es considerada como una de las más utilizadas en la industria, predominando en la farmacéutica, también es de importancia su uso en la evaluación y seguimiento en el proceso para nuevas formulaciones, de la misma manera es usado en el control de calidad en múltiples preparaciones farmacéuticas a base de productos naturales para lograr la autenticidad de los principios activos debido a su alto poder de resolución y eficiencia para analizar y separar componentes de una mezcla (Heftmann, 2004; Lee, 2011; Pryde & Gilbert, 1979, 1979; Sgariglia et al., 2010).

Su técnica emplea una fase móvil y estacionaria (inmiscibles entre sí), un líquido conforma la fase móvil mientras que la fase estacionaria es una columna que contiene partículas sólidas; los componentes de la muestra primeramente se diluirán en un disolvente adecuado que junto a la fase móvil pasaran por la columna a elevadas presiones provocando que el tiempo de permanencia en la fase estacionaria y el tiempo de difusión dentro de la fase disminuyan, debido a la afinidad de los componentes por la fase estacionaria, es así que los componentes con mayor afinidad a esta fase se desplazarán a menor velocidad mientras que los que no tengan afinidad a la fase su velocidad será mayor, la diferencia de velocidades originará la separación de los componentes en una mezcla; finalmente al término de la columna existe un detector que



va a permitir detectar cuanto soluto sale (Braithwaite & Smith, 1995; Giddings, 2002; Scott, 2003).

### **2.3.2. Información sobre la composición de la muestra para establecer el objetivo del análisis HPLC.**

Para el desarrollo de un método cromatográfico, inicialmente se debe obtener información de la muestra, principalmente su composición química y la naturaleza de la misma. La recolección de la información ayudará al investigador a conocer el número de compuestos presentes en la muestra así como sus estructuras químicas, espectro UV de cada compuesto, rango de concentración de compuestos, la solubilidad de la muestra, impurezas, productos de degradación y metabolitos, el conocimiento de éstas y más variables permitirá al investigador establecer el/los objetivos del análisis (Snyder et al., 1997, 2010).

### **2.3.3. Obtención del extracto a utilizar.**

Este paso es considerado como un punto crítico dentro de la metodología porque de la preparación de la muestra dependerá la exactitud, precisión y cuantificación del analito(s) objetivo(s), e influenciará en los resultados obtenidos y las metas de estudio a cumplir (Ahuja & Rasmussen, 2007; C. Yang et al., 2013).

Los componentes de las muestras como materias primas deben diluirse y/o extraerse en disolventes (menstruo) adecuados según la solubilidad del analito a identificar y/o analizar para eliminar interferencias, las técnicas de extracción en el análisis fitoquímico incluyen a la homogenización de tejidos vegetales, extracción exhaustiva en serie, soxhlet, maceración, decocción, infusión, percolación, digestión y filtración. La elección del método de extracción dependerá de la estabilidad del material vegetal al calor, la naturaleza del disolvente, la duración de la extracción y el volumen final requerido por el analista (Ahuja & Rasmussen, 2007; Banu & Cathrine, 2015; Chemat et al., 2017).



En la elección del menstruo, se debe considerar que el disolvente a utilizar debe de ser seguro (no tóxico e inflamable), no puede reaccionar con el extracto, de fácil recuperación y eliminación del extracto, baja viscosidad para penetrar fácilmente y su temperatura de ebullición lo más baja posible para evitar degradaciones (Abubakar & Haque, 2020). Se puede utilizar una secuencia de disolventes desde el menos polar al mayor polar comenzando desde éter < cloroformo < acetona < etanol < metanol < agua (Altemimi et al., 2017).

Comúnmente en investigaciones se utiliza la maceración y percolación como métodos de extracción; se sugiere la maceración como el método más aplicable debido a su simplicidad y menor costo, aunque el tiempo de exposición del material vegetal al menstruo es mayor en comparación con otros métodos modernos, como por ejemplo la extracción asistida por ultrasonido en donde el tiempo de contacto es menor debido a que favorece la ruptura de la pared celular produciendo un aumento en la penetración del solvente (Abubakar & Haque, 2020; Nn, 2015).

La muestra lista para ser inyectada en el equipo cromatográfico debe de cumplir con los siguientes criterios (Ahuja & Rasmussen, 2007; C. Yang et al., 2013):

- Debe ser representativa de la muestra original.
- Presentar solubilidad completa en la fase móvil.
- Debe de ser estable durante todo el tiempo del análisis cromatográfico.
- Debe ser libre de impurezas y contaminantes que afecten al equipo HPLC.
- La concentración de la muestra debe de ser la adecuada y compatible con el método de detección elegido.

#### **2.3.4. Método**

La revisión de las características generales de HPLC permite desarrollar una metodología adecuada para el análisis fitoquímico. En la separación de los componentes de una mezcla es



necesario conocer las condiciones experimentales como columna, temperatura, fase móvil, entre otras (Snyder et al., 1997, 2010).

#### **2.3.4.1. Elección del modo de operación HPLC.**

La elección de una técnica se realiza en función al tipo de interacciones moleculares que se dan entre los compuestos del analito y la columna cromatográfica. La afinidad de los componentes del analito por la fase estacionaria conducirán a la separación adecuada de los elementos de la muestra permitiendo su posterior detección (Kazakevich & LoBrutto, 2007; S. C. Moldoveanu & David, 2013).

**Fase Normal:** En este tipo de cromatografía la fase estacionaria (Sílice o alumina) es polar ya que su superficie esta cubierta por grupos OH, o químicamente ligada a grupos tales como Amino (NH<sub>2</sub>), ciano (CN), diol (2OH) que le otorgan la polaridad. Las fases móviles son apolares, así se emplean solventes orgánicos como hexano, cloruro de metileno, cloroformo, éter, tetrahidrofurano o mezclas de estos (S. C. Moldoveanu & David, 2013). La mayoría de los compuestos apolares eluyen primero y los más polares al final debido a que las interacciones entre la fase estacionaria y el analito son fuertes contrariamente a las interacciones analito disolvente (Kazakevich & LoBrutto, 2007; S. C. Moldoveanu & David, 2013).

**Fase Reversa:** Es la técnica de separación más utilizada debido a su variedad de aplicaciones, simplicidad y versatilidad, que permiten el análisis de sustancias con diversas polaridad y peso molecular; este modo de operación utiliza una fase estacionaria hidrofóbica y una fase móvil de polaridad moderada que emplea generalmente soluciones a base de agua. La fase estacionaria es obtenida por la unión de largas cadenas de hidrocarburos sobre una superficie solida (sílice), comúnmente se utiliza la columna C8 o C18. Las fases móviles generalmente son acuosas, tamponadas; típicamente se mezcla con solventes orgánicos como acetonitrilo,



metanol o tetrahidrofurano las cuales tienen tampones o ácidos para poder controlar el pH (Kazakevich & LoBrutto, 2007; S. C. Moldoveanu & David, 2013; Venn, 2000).

#### **2.3.4.2. Selección del detector a utilizar**

La identificación de la variedad de compuestos presentes en las muestras necesita de detectores que provean un perfil cromatográfico con picos limpios, generalmente se utilizan detectores UV por su alta sensibilidad y porque la mayoría de compuestos fitoquímicos se encuentran dentro del rango de absorbancia de 190 a 800 nm y su monitoreo es a una sola longitud de onda. Para la elección del detector se puede considerar los siguientes criterios (Boligon & Linde, 2014; Kumar, 2017; Parriott, 1993; Scott, 2003)

- Sensibilidad o concentración mínima detectable.
- Debe de usar pequeños volúmenes para su detección, debido a que un gran flujo destruiría la resolución cromatográfica.
- Esquema de detección con respuestas adecuadas al método cromatográfico.
- Debe de tener correlación con las fases móviles usadas debido a que estas proveen señales de alta intensidad al detector; por ejemplo, agua y metanol no son compatibles con la detección IR.
- Alta selectividad para poder segregar un compuesto de otro, como por ejemplo detectores como detección UV, espectrometría de masas, detector de matriz de diodos.

El tipo de detector más usado son los de absorbancia, debido a que proporcionan una buena sensibilidad de los compuestos que absorben la luz, además por ser fáciles de operar. El detector UV es de uso muy común para el análisis de HPLC, debido a que la mayoría de compuestos absorben en la región UV o visible, estos detectores son de tres diferentes tipos: detectores de longitud de onda fija, detectores de longitud de onda variable y detectores de



diodos. Un detector UV estándar permite elegir una longitud de onda entre 195 y 370 nm en donde el más utilizado es el de 254 nm (Dark, 1986; Smith, 1971; Sunil, 2018; Swartz, 2010).

### **2.3.4.3. Condiciones generales**

Se debe tener en cuenta varias condiciones sobre las columnas cromatográficas, ya que la fase estacionaria es denominada como el corazón del sistema HPLC. Existe una gran variedad de columnas para diferentes tipos de muestras, generalmente son de acero inoxidable con longitudes de 3 a 30 cm, el diámetro interno (ID) puede variar entre 4 a 10 mm y tamaños de partículas de 1,5 a 10  $\mu\text{m}$  y finalmente el tamaño de los poros en la columna generalmente varía entre 60– 300 Å. La retención de la muestra y la superficie de la columna aumenta a medida que el tamaño de los poros disminuye, generalmente se prefiere que el tamaño de los poros sea un poco estrecho; ya que su disminución aumenta la eficiencia. Las longitudes de columna corta provocan un tiempo de análisis reducido, menor consumo de solventes, ahorro de costos y mayor sensibilidad y finalmente el diámetro interno de la partícula determina la escala del HPLC a utilizar, entre menor sea el ID menor será el flujo de la fase móvil (McPolin, 2009; Snyder et al., 1997, 2010).

Una segunda condición a considerar es la temperatura de trabajo de la columna, la cual permite que la fase móvil se encuentre a la temperatura deseada; generalmente se trabaja con temperatura ambiente hasta 50°C. El aumento de la temperatura puede provocar ciertas condiciones beneficiosas que se deben manejar con cuidado como la disminución del tiempo de ejecución mientras se mantenga la eficiencia de la columna, también influye en la disminución de la viscosidad de la fase móvil permitiendo mayor velocidad de flujo para la misma presión, pero el coeficiente de disolución del soluto aumenta. El tamaño de la muestra también es un parámetro importante dentro de las condiciones de separación, generalmente se trabaja con volúmenes de muestra muy pequeños para que no influyan en la altura o área de los picos del cromatograma así como en la resolución ni tiempos de retención de la muestra;



las separaciones con volúmenes de muestra grandes provocan sobrecarga en la columna y en el detector, lo más adecuado sería diluir la muestra para volver a realizar un nuevo análisis (McPolin, 2009; Snyder et al., 2010).

La elección de las fases móviles es un paso crítico en el fingerprint cromatográfico para poder generar una separación exitosa, la selección de una determinada fase móvil dependerá de la columna cromatografica elegida de acuerdo al modo de operación de HPLC, debido a que los materiales de empaque de las columnas están hechos para fases móviles orgánicas y otras para fases acuosas (S. C. Moldoveanu & David, 2013; Snyder & Dolan, 2006).



## CAPITULO III

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Diseño y tipo de estudio

El presente trabajo es una revisión de literatura con acompañamiento tabular en el cual se realizó una búsqueda exhaustiva de artículos publicados desde el 2010 sobre la metodología y los resultados obtenidos a partir de las huellas dactilares mediante HPLC para las principales especies del género *Desmodium*.

#### 3.2. Estrategias de búsqueda

- Bases de datos analizadas

La búsqueda de los documentos bibliográficos de artículos sobre gradientes cromatográficas de las principales especies de *Desmodium* se se realizó en las bases de datos digitales: Scopus, ScienceDirect, PubMed, SciELO, Google Académico, SpringerLink, EBSCOHost.

- Terminología de búsqueda

La búsqueda en cada una de las bases ya mencionadas se realizó en inglés y español, mediante el empleo de palabras clave como “*Desmodium*”, “fingerprint”, “High Performance Liquid Chromatography”, “HPLC”, “huellas dactilares”. Se utilizaron los operadores booleanos “AND” y “OR”. Las ecuaciones de búsqueda a emplear en cada una de las bases de datos son:

- 1) “*Desmodium*” AND (“High Performance Liquid Chromatography” OR “HPLC” OR “fingerprint”).
- 2) “*Desmdium*” AND (“HPLC” OR “cromatografía líquida de alta resolución” OR “huellas dactilares”).



### 3.3. Criterios de selección

Primero se procedió a la lectura del título y resumen de cada artículo que se obtuvo como resultado de la búsqueda con las ecuaciones ya mencionadas, en donde se emplearon los siguientes criterios de inclusión y exclusión.

### 3.4. Criterios de Inclusión

- Artículos originales, priorizando estudios con diseños de investigación experimentales.
- Artículos en inglés y español.
- Artículos con fecha de publicación a partir del año 2010.

### 3.5. Criterios de exclusión

- Artículos que no permitan acceso al texto completo.
- Artículos con información no relacionada al tema de investigación
- Artículos duplicados.

### 3.6. Selección de artículos

Todos los artículos encontrados en cada una de las bases de datos y que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión fueron descargados, almacenados y ordenados según la base de datos de la cual se obtuvieron. Una vez almacenados se procedió a la lectura de cada artículo seleccionado.

#### • Universo y muestra

Al finalizar la búsqueda en las bases de datos se obtuvo un total de 60 artículos, los mismos que luego de realizar la lectura y el análisis se seleccionaron de la siguiente manera:

- **Incluidos:** Se incluyó en el trabajo un total de 18 artículos



- **Excluidos:** Se excluyó 22 artículos que hacía referencia a hplc preparativo o semi-preparativo; y además se excluyeron 20 artículos que se repetían entre las bases de datos.

### 3.7. Recolección de datos

Los artículos incluidos fueron analizados de manera detallada y la información relevante de cada uno fue registrada en una base de datos en EXCEL. La base de datos se realizó agrupando los artículos por especies para poder realizar la respectiva comparación y discusión. Posteriormente estas tablas enumeradas de 1 a 14 fueron trasladadas al presente documento como exposición del resultado de una búsqueda exhaustiva de las gradientes cromatográficas utilizadas en el análisis HPLC de las principales especies del género *Desmodium*.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Tabla 1. *Desmodium adscendens*

Muestra	Extracto		Estándar	Metodología	Fase Móvil	Gradiente de elución	Vel. De flujo	Resultados	Autor		
1 Hojas proporcionadas por Reform (Parma, Italy).	La muestra fue secada y triturada; se tomó 2,5g para mezclar con 2,5 g de gel de sílice funcionalizado con octadecilo.	Saponinas y flavonoides, extracción con agua, metanol, cloruro de metileno y n-hexano.	Vitexina, saponarina (apigenina-8-C-7-O-diglucósido), vitexina 2-O-ramnosido y apigenina-7-O-glucósido	HPLC Ultimate 3000	Soya saponinas: Ác. Acético al 0.5% en agua (A) y ác.acético al 0.5% en acetonitrilo (B).	Inicialmente 88:12 (A: B) y graduado de 0:100 (A: B) en 38 min.	0,25 ml/min	Solo la fracción metanólica exhibió la presencia significativa de flavonoides y saponinas, los alcaloides, siendo constituyentes menores de <i>D. adscendens</i> . Se identificaron cuatro saponinas y cuatro alcaloides; a diferencia de la cantidad de flavonoides identificados fue de 35 picos, detallados en el anexo 1.	(Baiocchi et al., 2013)		
		0.2g de polvo se colocó con HCl al 1% a temperatura ambiente de tres a cuatro días, se centrifugó y se realizó la extracción de fase sólida (SPE) con una columna de ác. Sulfónico aromático, se preparó lavando con metanol al 80% y agua destilada, después el sobrenadante de la muestra se cargó en la		Duplicado: Dtector UV DAD a 330 nm y espectrotometro de masas de alta resolución (HRMS).						Alcaloides Ác. Heptafluorobutanoico en agua 5mM (A) y acetonitrilo (B).	Inicialmente 7: 93 (A: B) graduado a 71:29 en 21 min.
										Flavonoides: Ác. Acético al 0.5% en agua (A) y ác.acético al	Inicialmente 90:10 (A: B) durante 36 min, 88:12 (A: B) durante 25



		columna para adsorber alcaloides, esta se enjuagó con HCl al 1% y metanol. Los alcaloides fueron eluidos usando etanol / NH <sub>4</sub> OH al 10% en metanol (1:1). El disolvente se evaporó y el residuo se disolvió en 50 µL de metanol.			0.5% en acetonitrilo (B).	min, 85:15 (A: B) durante 10 min, 82:18 (A: B) durante 14 min y finalmente se cambió a 70:30 (A: B).			
2	Plantas enteras recolectadas del Aburi Botanical Gardens, Ghana en marzo del 2015.	La muestra fue secada, pulverizada y macerada con etanol al 70%. Se evapora a 50 °C el producto resultante. El extracto semi seco se congeló a -20°C y liofilizó para la obtención de un extracto crudo seco con un rendimiento del 10%. Se mantiene el extracto en un desecador.		HPLC Perkin Elmer Flexar  Bondapak C18 (300 × 2,1 mm, 10 µm).  Detección UV a 315 nm.	Acido fórmico en agua al 0,1% (A) y acetonitrilo (B).	(0 -10 min) 100:0 (A:B); (10 – 50 min) 50:50 (A:B) y finalmente (50 – 52 min) se vuelve a 100:0 (A: B).	1,0 ml/min	El análisis fitoquímico mostró la presencia de saponinas, glucósidos, alcaloides, taninos y flavonoides. Los dos picos principales con retenciones tiempo (en minutos) de 28.02 y 30.06 obtenido del análisis de HPLC tienen bandas de absorción en el UV en regiones de λ 220-350 nm que se pueden asociar con la presencia de flavonoides.	(Amoaten g et al., 2017)
3	Hojas recolectadas (marzo 2009) en la	Todo el material vegetal se secó, molió y tamizó (1mm) para almacenarse a 4 °C.	Apigenina, luteolina, keampferol, quercetina,	Sistema Dionex Columna C18 (Phenomenex,	Ácido trifluoroacético en agua al 0,1% (A) y	(0-10 min) 85:15 (A: B); (10-20 min) 80:20 (A: B); (20-25min)	0,75 ml/min	Los espectros obtenidos se compararon con los de los estándares dando como resultado la identificación de vitexina	(Zielińska -Pisklak et al., 2015)



	región de Brong-Ahafo en el sur de Ghana.	Se tomó 200 g de muestra se extrajo con 700 ml de etanol al 60% por tres veces, durante 5h a 90°C, mediante filtración se obtuvo un extracto el cual se evapora el disolvente. Se redisuelve el extracto en dos ml de metanol y se filtró (filtro de membrana Millipore) antes de su inyección.	vitexina, isovitexina, vitexina 2''-O-ramnosido, apigenina 7-O-glucósido, apigenina 7-O-diglucósido y apigenina 7-O ramnoglucósido.	250 x 4,6 mm, 5 µm)  30°C  Detección UV a 214, 224, 270 y 336 nm.	ácido trifluoroacético o al 0,1% en acetonitrilo (B).	80:20 (A: B); (25-45 min) 10:90 (A: B); (45-55 min) 10:90 (A: B); (55-65 min) 85:15 (A: B).		e isovitexina con tiempos de retención de 2,5 y 1,5 min, respectivamente. Dentro del espectro también se encontraron dos compuestos que no se ajustaban al de los estándares disponibles, por ello su identificación y confirmación se realizó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear, en donde se indica que se trata de flavonoides isoméricos identificados como isovitexina-2''-O-xilósido y vitexina-2''-O-xilosido.	
4	Hojas recolectadas en dos estados del sur de Brasil, estado de Campo Largo (a) y en el estado de Águas Mornas (b)	La muestra fue secada y molida a temperatura ambiente, se maceró por 36 h con metanol en proporción 1:20 (p/v). Se filtró y se eliminó el disolvente. El residuo se re suspendió en 10 ml de agua desionizada para ser liofilizado, se volvieron a diluir y filtrar con metanol para obtener soluciones de 1 mg/ml.	Genisteína e isovitexina (a) e Isovitecina y luteolina (b)	Sistema Waters Alliance 2690.  Columna C18 (Nova-Pak®, 250 x 3,9 mm, 4 µm).  Detector UV a 254 nm.	Ácido trifluoroacético o en agua al 0,01% (A) y ácido trifluoroacético o al 0.8% en acetonitrilo (B).	Inicialmente 70:30 (A: B); (0-3 min) 8:52 (A: B); (3-4 min) 55:45 (A: B); (4-6 min) 40:60 (A: B); (6-8 min) 45:55 (A: B); (8-10 min) 78:22 (A: B); (10-14 min) 70:30 (A: B) .	0,7 ml/min	Identificación de genisteína e isovitexina para muestra (a) e isovitexina y luteolina en muestra (b) mediante la comparación entre los picos de muestras estándar y el extracto mediante el tiempo de retención y perfil UV como parámetros de identificación.	(de Morais et al., 2017)



Tabla 2. *Desmodium affine Schltldl*

Muestra	Extracto	Estándar	Metodología	Fase Móvil	Gradiente de elución	Vel. De flujo	Resultados	Autor
1	Hojas recolectadas en dos estados el sur de Brasil, estado de Campo Largo (a) y en el estado de Águas Mornas (b).	Isovitexina, vitexina y apigenina (a) Apigenina (b).	Sistema Waters Alliance 2690.  Columna C18 (Nova-Pak®, 250 x 3,9 mm, 4 µm,).  Detector UV a 254 nm.	Ác. trifluoroacético en agua al 0,01% (A) y ácido trifluoroacético al 0.8% en acetonitrilo (B).	Inicialmente 70:30 (A: B); (0-3 min) 8:52 (A: B); (3-4 min) 55:45 (A: B); (4-6 min) 40:60 (A: B); (6-8 min) 45:55 (A: B); (8-10 min) 78:22 (A: B); (10-14 min) 70:30 (A: B) .	0,7 ml/min	Identificación de compuestos isovitexina, vitexina y apigenina para la muestra (a) y apigenina en muestra (b) mediante la comparación entre los picos de muestras estándar y el extracto mediante el tiempo de retención y perfil UV.	(de Morais et al., 2017)

Tabla 3. *Desmodium barbatum*

Muestra	Extracto	Estándar	Metodología	Fase Móvil	Gradiente de elución	Vel. De flujo	Resultados	Autor
1	Hojas recolectadas en el sur de Brasil en el estado de Capao da Canoa.	Vitexina	Sistema Waters Alliance 2690.  Columna C18 (Nova-Pak®, 250 x 3,9 mm, 4 µm,).	Ác. trifluoroacético en agua al 0,01% (A), ácido trifluoroacético al 0.8% en	Inicialmente 70:30 (A: B); (0-3 min) 8:52 (A: B); (3-4 min) 55:45 (A: B); (4-6 min) 40:60	0,7 ml/min	Identificación de vitexina mediante la comparación entre los picos de muestras estándar y el extracto mediante el tiempo de retención y perfil UV.	(de Morais et al., 2017)



	filtrar con metanol para obtener soluciones de 1 mg/ml.		Detector UV a 254 nm.	acetonitrilo (B).	(A: B); (6-8 min) 45:55 (A: B); (8-10 min) 78:22 (A: B); (10-14 min) 70:30 (A: B).			
--	---	--	-----------------------	-------------------	---	--	--	--

Tabla 4. *Desmodium cuneatum*

Muestra	Extracto	Estándar	Metodología	Fase Móvil	Gradiente de elución	Vel. De flujo	Resultados	Autor
1 Hojas recolectadas en dos estados en del sur de Brasil, estado de Viamão (a) y en el estado de Osório (b).	La muestra fue secada y molida a temperatura ambiente, se maceró por 36 h con metanol en proporción 1:20 (p/v). Se filtró y se eliminó el disolvente. El residuo se re suspendió en 10 ml de agua desionizada para ser liofilizado, se volvieron a diluir y filtrar con metanol para obtener soluciones de 1 mg/ml.	Isovitexina, vitexina y flavona (a). Isovitexina y vitexina (b).	Sistema Waters Alliance 2690.  Columna C18 (Nova-Pak ®, 250 x 3,9 mm, 4 µm,).  Detector UV a 254 nm.	Ác. trifluoroacético al 0,01% en agua (A) y ác. trifluoroacético al 0.8% en acetonitrilo (B).	Inicialmente 70:30 (A: B); (0-3 min) 8:52 (A: B); (3-4 min) 55:45 (A: B); (4-6 min) 40:60 (A: B); (6-8 min) 45:55 (A: B); (8-10 min) 78:22 (A: B); (10-14 min) 70:30 (A: B).	0,7 ml/min	Identificación de isovitexina, vitexina en ambas muestras, también se identifico flavona solo en la muestra (a) mediante la comparación entre los picos de muestras estándar y el extracto mediante el tiempo de retención y perfil UV.	(de Morais et al., 2017)



Tabla 5. *Desmodium gangeticum*

Muestra	Extracto	Estándar	Metodología	Fase Móvil	Gradiente de elución	Vel. De flujo	Resultados	Autor
1	Plantas enteras maduras de varias regiones de Taiwn.	Ácido clorogénico, rutina y vitexina	HPLC Hitachi L-7100  Columna LiChroCART Purospher Star RP-18e (250 × 4 mm, 5 µm).  Detector de PAD a 330 nm.	Ác. fórmico al 0.2% en agua (A) y acetonitrilo (B).	(0 – 10 min) 95:5 a 86:14 (A: B); (10 – 20 min) 86:14 (A: B); (20 – 60 min) 86:14 a 72:28 (A: B) y (60 – 85 min) 72:28 a 45:55 (A: B).	0,7 ml/min	Ácido clorogénico y la rutina están presentes en <i>D. gangeticum</i> , el primero presentó un $t_R$ de 17.36 min.	(Tsai et al., 2011)
2	Raíces de <i>D. gangeticum</i>	Alcaloide gangoide	Columna C18  Detector UV a 280nm.	Metanol al 20% en agua.		0,81 ml/min	Identificación del compuesto mediante cromatografía, también se realizó la determinación del contenido porcentual del alcaloide. Observar anexo 2.	(Yada v & Gupta, 2014)
3	1.3 Kg de las partes aéreas de las plantas se recolectaron	Rutina, kaempferol-3-O-robinobiosido y nicotiflorina.	HPLC (Shimadzu, Japón)  Columna Waters Spherisorb	Ác. acético al 0.5% en agua (A) y metanol (B).		1,0 ml/min	Obtención de un cromatograma mediante PDA tridimensional que demuestra el perfil de fitoquímicos separados en condiciones optimizadas que permiten la	(Yada v et al., 2012)



	localmente en Lucknow en diciembre de 2006.	finalmente la extracción asistida por microondas durante 20 min a 50 °C.		ODS2 (250 x 4, 6 mm, 10 µm).  30°C  Detector de matriz de fotodiodos (PDA) a 350 nm.				identificación de tres compuestos mediante la comparación de sus tiempos de retención con el de los estándares, adicionalmente fueron cuantificados porcentualmente. Observar anexo 3.	
4	Partes aéreas recolectadas del jardín de hierbas de Dehradun (Green Biotech).	A 200 g de polvo seco con 2,5 L de disolvente se tomaron en un matraz y se extraen durante 24 horas. Una vez completada la extracción se secó. Luego, el residuo se extrajo con otros disolventes sucesivamente de la misma manera. El extracto se tomó en un plato de porcelana y el solvente se evaporó, finalmente se redujo a sequedad para obtener extracto seco. Debido al estudio de la literatura, los flavonoides se caracterizaron a partir del DC (extracto acuoso) mediante el método RP-HPLC.	Rutina, quercetina, genisteína y daidzeína.	LC-100, Cyberlab TM  Columna C-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)  25°C  Detector UV 254 nm.	Agua (A) y metanol (B)	30:70 (A: B)	0.5 mL/min	El tiempo de retención (T <sub>R</sub> ) de varios flavonoides se comparó con los estándares. Se encontró que la T <sub>R</sub> de la rutina, quercetina, genisteína y daidzeína era de 5,482, 7,96, 9,47 y 11,001, respectivamente.	(Malik et al., 2019)



Tabla 6. *Desmodium incanum*

Muestra	Extracto	Estándar	Metodología	Fase Móvil	Gradiente de elución	Vel. De flujo	Resultados	Autor	
1	Plantas enteras obtenidas de semillas que se cultivaron en suelo arenoso por varias semanas de germinación.	A dos semanas de germinación las plantas se lavaron y colocaron en una solución hidropónica (40% Long Ashton). Después de un mes la solución hidropónica pasó a 5 ml/min usando una bomba de peristalsis a través de una pipeta Pasteur que contenía polímero XAD-4 Amberlite para atrapar el material orgánico. La trampa se lavó con metanol, se eliminó el disolvente. El residuo se disolvió en 1 ml de metanol.	Vicenin 2, vitexina, isoschaftoside.	Sistema HPLC de la serie Shimadzu VP ACE AQ.  Columna C18 (250 x 4.6 mm, 5 um).  Detector UV a 350nm y espectrofotómetro de masas.	Ác. fórmico al 5% en agua (A) y metanol (B).	Inicialmente 95:5 (A: B); a los 3 min 85:15 (A: B); a los 13 min 75:25 (A: B); a los 25 min 70:30 (A: B); 45:55 (A: B); a los 46 min 5:95 (A: B); finalmente a los 60 min 95:5 (A: B).	1,0 ml/min	Se identificaron 6-C-galactosil-8-C-glucosilapigenina con un t <sub>R</sub> de 14.30 min, vicenin 2 (6-C-glucosil-8-C-glucosilapigenina) con un t <sub>R</sub> de 16.21, isoschaftoside (6-C-arabinosil-8-C-glucosilapigenina) con un t <sub>R</sub> de 19.72 min, 6-C-glucosil-8-C-galactosilapigenina con un t <sub>R</sub> de 16.72 min, 6-C-galactosil-8-C-arabinosilapigenina con un t <sub>R</sub> de 18.44 min y 6-C-arabinosil-8-C-galactosilapigenina con un t <sub>R</sub> de 19.72 min.	(Hooper et al., 2015)
2	Hojas recolectadas en dos estados del sur de	La muestra fue secada y molida a temperatura ambiente, se maceró por 36 h con metanol en proporción 1:20 (p/v). Se filtró y se eliminó el disolvente. El residuo se re suspendió	Genisteína, vitexina y luteolina (a)	Sistema Waters Alliance 2690.  Columna C18 (Nova-Pak ®,	Ácido trifluoroacético al 0,01% en agua (A), y ácido	Inicialmente 70:30 (A: B); (0-3 min) 8:52 (A: B); (3-4 min) 55:45	0,7 ml/min	Identificación de genisteína, vitexina y luteolina en la muestra (a) e isovitexina y apigenina en la muestra (b),	(de Morais et al., 2017)



Brasil, en el estado de Mandirituba (a) y en el estado de Águas Mornas (b).	en 10 ml de agua desionizada para ser liofilizado, se volvieron a diluir y filtrar con metanol para obtener soluciones de 1 mg/ml.	Isovitexina y apigenina (b)	250 x 3,9 mm, 4 µm,).  Detector UV a 254 nm.	trifluoroacético o al 0,08% en acetonitrilo (B).	(A: B); (4-6 min) 40:60 (A: B); (6-8 min) 45:55 (A: B); (8-10 min) 78:22 (A: B); (10-14 min) 70:30 (A: B).		mediante la comparación entre los picos de muestras estándar y el extracto mediante el $T_R$ y perfil UV.	
---	--	-----------------------------	--	--	--	--	---	--

Tabla 7. *Desmodium intortum*

Muestra	Extracto	Estándar	Metodología	Fase Móvil	Gradiente de elución	Vel. De flujo	Resultados	Autor
1 Plantas enteras obtenidas de semillas que se cultivaron en suelo arenoso por varias semanas de germinación.	A dos semanas de germinación las plantas se lavaron y colocaron en una solución hidropónica (40% Long Ashton). Después de un mes la solución hidropónica pasó a 5 ml/min usando una bomba de peristalsis a través de una pipeta Pasteur que contenía polímero XAD-4 Amberlite para atrapar el material orgánico. La trampa se lavó con metanol, se eliminó el disolvente. El residuo se disolvió en 1 ml de metanol.	Vicenin 2, vitexina, isoschaftoside.	Sistema HPLC de la serie Shimadzu VP ACE AQ.  Columna C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm).  Detector UV a 350nm y espectrofotómetro de masas.	Ác. fórmico al 5% en agua (A) y Metanol (B).	Inicialmente 95:5 (A: B); a los 3 min 85:15 (A: B); a los 13 min 75:25 (A: B); a los 25 min 70:30 (A: B); a los 45 min 45:55 (A: B); a los 46 min 5:95 (A: B); finalmente a los 60 min 95:5 (A: B).	1,0 ml/min	Se identificaron vicenin 2 (6-C-glucosil-8-C-glucosilapigenina) con un $t_R$ de 16.21 e isoschaftoside (6-C-arabinosil-8-C-glucosilapigenina) con un $t_R$ de 19.72 min.	(Hooper et al., 2015)



2	Plantas enteras maduras de varias regiones de Taiwn.	La muestra fue secada, molida y triturada, se tomó 500 g se extrajo con 2 L de etanol al 70% tres veces. Los filtrados se recogieron y concentraron a presión reducida, la solución restante se liofilizó antes de obtener el extracto final.	Ácido clorogénico, rutina y vitexina	HPLC Hitachi L-7100  Columna LiChroCART Purospher Star RP-18e (250 × 4 mm, 5 µm).  Detector de PAD a 330 nm.	Ác. fórmico al 0,2% en agua (A) y acetonitrilo (B).	(0 – 10 min) 95:5 a 86:14 (A: B); (10 – 20 min) 86:14 (A: B); (20 – 60 min) 86:14 a 72:28 (A: B) y (60 – 85 min) 72:28 a 45:55 (A: B).	0,7 ml/min	Se detemrinó la presencia de vitexina con un t <sub>R</sub> de 35.41 min.	(Tsai et al., 2011)
---	--	---	--------------------------------------	--	---	--	------------	---	---------------------

Tabla 8. *Desmodium leiocarpum*

Muestra	Extracto	Estándar	Metodología	Fase Móvil	Gradiente de elución	Vel. De flujo	Resultados	Autor
1	Hojas recolectadas en dos estados en el sur de Brasil, estado de Campo Largo (a) y estado de Jaguariaíva (b).	Vitexina (a)  Isovitexina, vitexina y luteolina (b).	Sistema Waters Alliance 2690.  Columna C18 (Nova-Pak ®, 250 x 3,9 mm, 4 µm,).  Detector UV a 254 nm.	Ácido trifluoroacético al 0,01% en agua (A), y ácido trifluoroacético al 0,08% en acetonitrilo (B).	Inicialmente 70:30 (A: B); (0-3 min) 8:52 (A: B); (3-4 min) 55:45 (A: B); (4-6 min) 40:60 (A: B); (6-8 min) 45:55 (A: B); (8-10 min) 78:22 (A: B); (10-14 min) 70:30 (A: B).	0,7 ml/min	Identificación de isovitexina, luteolina y vitexina en la muestra (b), el ultimo compuesto también fue identificado en la muestra (a), mediante la comparación entre los picos de muestras estándar y el extracto mediante el tiempo de retención y perfil UV.	(de Morais et al., 2017)

Tabla 9. *Desmodium ovalifolium*

Muestra	Extracto	Estándar	Metodología	Fase Móvil	Gradiente de elución	Vel. De flujo	Resultados	Autor
1	Partes aéreas de plantas en floración, etapas vegetativas y fructíferas; recolectadas en Pucallpa, Perú (mayo - agosto 2008).	Biochanina A, genisteína y daidzeína.	Dionex Summit HPLC  Columna Gemini C18 (250 x, 4,6 mm, 5 µm).  45°C  Detector de matriz de diodos a 250 y 260nm.	Ác. trifluoroacético al 0,1% en agua (A) y acetonitrilo (B)	Inicialmente 85:15 (A: B), pasa a 30:70 (A: B) durante 40 min.	0,8 ml/min	Detección de 3 isoflavonas mediante cromatogramas obtenidos comparados con los estándares, adicionalmente se realizó la cuantificación de biochanina A, genisteína y daidzeína, dando como resultados los valores de 3.9, 10.6, 8.7 por µg/g de materia seca, respectivamente para cada isoflavona.	(Leuner et al., 2013)

Tabla 10. *Desmodium styracifolium*

Muestra	Extracto	Estándar	Metodología	Fase Móvil	Gradiente de elución	Vel. De flujo	Resultados	Autor
1	Planta entera obtenida en China.	Formononetina y aromadendrina	AcquityTM Sistema UPLC  Columna C18 SunFireTM	Ác. acético al 0.4% en agua (A) y acetonitrilo (B).	(0 – 10 min) 78:22 a 67:33 (A: B); (10 – 20 min) 67:33	1,0 ml/min	Se identificaron y analizaron formononetina y la aromadendrina como inhibidores de la ADH. Este método demostró ser	(Liu et al., 2015)



		ml de agua para extracciones sucesivas con volúmenes iguales de éter de petróleo, acetato de etilo y n-butanol. El extracto de acetato de etilo evaporado (0,19 g) se disolvió en 150 mL de agua, se filtró a través de una membrana de 0,45 $\mu\text{m}$ .		(250 $\times$ 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )  25 °C  Detector UV a 254nm.		a 60:40 (A: B).		rápido y eficaz para la identificación de compuestos activos en productos naturales.	
2	31 lotes de partes aéreas de la planta proveniente s n de las provincias de Guangdong (GD) a 8 - 21 msnm y Guangxi (GX) a 182 msnm en China.	Se pulverizó y se tamizó (N°60). A 0,2 g de muestra se añadió 25ml de metanol al 80% y se colocó en un baño de ultrasonido por 20 min. La mezcla se evaporó y se diluyó con 10 ml de metanol al 50% y se filtró a través de una membrana de 0.22 $\mu\text{m}$ .	Schaftoside, isoorientina, isoschaftoside e isovitexina	Water e2695 system  Columna C18 Phenomenex Polar (250 $\times$ 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )  30 °C  Detector UV PAD a 335nm.	Ác. fórmico al 0.5% en agua (A) y acetonitrilo (B).	Inicialmente (0 – 20 min) 87:13 (A: B); (20 – 35 min) 85:15 (A: B); finalmente (35 – 60 min) 84:16 (A: B).	0,8 ml/min	Los cromatogramas completos fueron generalmente consistentes y estables entre plantas derivadas de diferentes ubicaciones. Varias muestras compartían patrones cromatográficos similares. Se determinaron un total de 11 picos comunes y según la comparación de los tiempos de retención con los estándares se identificaron como schaftoside, isoorientina, isoschaftoside e isovitexina respectivamente.	(Chen et al., 2020)



<p>3 15 muestras provenientes de China. No especifica parte de la planta usada.</p>	<p>La muestra fue pulverizada, 0,5g del polvo se diluyó con 30 ml de metanol al 80% y se colocó en un baño de ultrasonido durante 40min. El extracto se evaporó y el residuo se disolvió en metanol al 50%, se aforó hasta 10ml y se filtró la solución a través de una membrana de 0.45 µm.</p>	<p>Vicenin 2, homoadonivernita, vicenin 1, schaftoside, vicenin 3, isovitexina y genistina</p>	<p>LC-2010 liquid chromatograph.  Columna Ultimate XB-C-18 (250 x 4.6 mm, 5µm).  30 °C  Detector UV PAD a 272nm</p>	<p>Ác. fórmico al 0.1% en agua (A) y acetonitrilo (B).</p>	<p>Inicialmente 88:12 (A: B) durante 8 min, 86:14 (A: B) durante 37 min, 85:15 (A: B) durante 10 min, 65:35 (A: B) durante 15 min, 50:50 (A: B) durante 10 min, finalmente 45:55 (A: B) durante 10 min.</p>	<p>1,0 ml/min</p>	<p>Se observaron más de 35 picos en el fingerprint, de los cuales 20 fueron definidos como picos comunes, observar anexo 4. Además, el análisis de similitud sugirió que la mayoría de las muestras de diferentes hábitats compartían patrones cromatográficos similares. El pico de abundancia común varió, lo que podría deberse a variaciones en los años de cultivo, época de cosecha, climas geográficos y medio ambiente.</p>	<p>(Zhou et al., 2012)</p>
<p>4 25 muestras de partes aéreas de la planta, recolectadas de Guangxi (182 msnm), Guangdong</p>	<p>0,5g de cada muestra se extrajo con 20 ml de metanol al 80% en un baño de agua ultrasónico durante 30 min. La muestra se volvió a pesar y el líquido perdido se volvió a llenar con metanol al 80%. La solución de muestra se filtró a través de un filtro de membrana de 0,45 µm.</p>	<p>Vicenin-1; schaftoside, isoschaftoside, vicenin-3 e isovitexina.</p>	<p>Agilent Infinity 1260 II HPLC  Columna Agilent TC-C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm)  30 °C</p>	<p>Ác fórmico al 0.1% en agua (A) y acetonitrilo (B).</p>	<p>Inicialmente 88:12 (A: B) durante 15 min, 86:14 (A: B) durante 20 min, 81:18 (A: B) durante 10 min, 80:20 (A: B) durante 5 min, 65: 35 (A: B) durante</p>	<p>1,0 ml/min</p>	<p>Se detectaron 39 picos comunes y las concentraciones de los compuestos estándar en las 25 muestras eran diferentes entre sí, particularmente en muestras de diferentes regiones. Los t<sub>R</sub> fueron 30.5 para vicenin 1, 35 para schaftoside, 42 para</p>	<p>(Xianduo Sun et al., 2018)</p>



	(8 – 21 msnm) y Hainan (154 msnm) en China.			Detector UV a 272 nm.		15 min, finalmente 100 de A durante 17 min.		isoschaftoside, 44.5 para vicenin-3 y 49 para isovitexina. Las muestras con concentraciones más altas de los compuestos estándar procedían de regiones a menor altitud.	
5	Seis lotes de extracto total de flavonoides de <i>D. Styracifoliu m</i> (TFEHDS) preparados previamente e por la técnica de resinas de adsorción macroporos a.	Una alícuota de 25 mg del TFEHDS se re disuelve hasta 50 ml con 50% etanol acuoso a temperatura ambiente, finalmente se recupera a su volumen máximo con 50% de etanol acuoso y se filtró a través de un filtro millipore de 0.45 um antes del análisis.	25 estándares (anexo 5)	Sistema LC Agilent 1200  Columna C18 ZORBAX SB- (250 × 4,6 mm,5 um)  25°C  Detección mediante Espectrometría de masas.	Ác.acético al 0.1% en agua (A) y metanol (B).	Inicialmente 75:25 (A: B), (0–35min) 58:42 (A: B), (35 a 47 min) 5-95 (A: B).	1,0 ml/min	Se identificaron cualitativa y cuantitativamente 25 compuestos mediante comparación del tiempo de retención con los datos del cromatograma obtenido de los estándares, que se detallan en el anexo 5.	(Guo et al., 2015)
6	Plantas obtenidas de Yiyang Hengkang Medicine	Se tomo 110 g de muestra picada para una extracción de dos veces (3h cada una) con 550 ml de etanol al 95%. Luego todos los extractos se combinaron, filtraron y evaporan hasta sequedad obteniéndose 4.67g	Ácido vanílico, β-sitosterol, formononetina y	Dionex Ultimate 3000  Columna C18 SunFireTM (250 × 4.6 mm, 5 μm)	Ác. acético al 0.4% en agua (A) y acetonitrilo (B).	Inicialmente 78:22 (A:B), (0-10 min) 33:67 (A:B), (10-25 min) 45:55 (A:B)	1,0 ml/min	Obtención de un cromatograma a 254 nm que muestra a 4 compuestos completamente separados con Rt (aproximados) de	(Su et al., 2013)



		por evaporación rotatoria a 55 °C bajo presión reducida. El residuo concentrado fue diluido con 0,5 L de agua y se extrajo sucesivamente con acetato de etilo.	aromadendrina	25°C Detección mediante Espectrometría de masas a 190-400 nm.				5,5; 8; 17 y 20,5 min, son identificados como ácido vanílico, β-sitosterol, formononetina y aromadendrina respectivamente, su identificación estructural por espectrometría de masas.	
7	Partes aéreas de la planta.	Los glucósidos de flavona totales se extrajeron con agua, precipitación con alcohol y filtración de forma rutinaria. Luego a través de una membrana de microfiltración (0,2 um). Posteriormente, se hizo fluir a través de una membrana de ultrafiltración. Finalmente, el producto se secó mediante secado rápido al vacío.	Vicenin-2, schaftoside e isovitexina.	HPLC (LC-20, Shimadzu, Japón)  Columna C18 (250 x 4.6 mm)  35 °C  Detector UV a 280 nm.	Ac. Fosfórico en agua (A) y acetonitrilo (B).		0.2 ml/min	El contenido de tres glucósidos de flavona en los extractos concentrados de <i>D. styracifolium</i> es de 4.88%, 9.76%, 1.89% respectivamente.	(K. Yang et al., 2020)

Tabla 11. *Desmodium subsericeum*

Muestra	Extracto	Estándar	Metodología	Fase Móvil	Gradiente de elución	Vel. De flujo	Resultados	Autor	
1	Hojas recolectadas en el sur de Brasil en el estado	La muestra fue secada y molida a temperatura ambiente, se maceró por 36 h con metanol en proporción 1:20 (p/v). Se filtró y se eliminó el disolvente. El residuo se re	Vitexina y luteolina.	Sistema Waters Alliance 2690.  Columna C18 (Nova-Pak ®,	Ácido trifluoroacético al 0,01% en agua (A), y ácido	Inicialmente 70:30 (A: B); (0-3 min) 8:52 (A: B); (3-4 min) 55:45	0,7 ml/min	Identificación de vitexina y luteolina mediante la comparación entre los picos de muestras estándar y el extracto	(de Morais)



de Campo Largo.	suspendió en 10 ml de agua desionizada para ser liofilizado, se volvieron a diluir y filtrar con metanol para obtener soluciones de 1 mg/ml.		250 x 3,9 mm, 4 µm,).  Detector UV a 254 nm.	trifluoroacético al 0,08% en acetonitrilo (B).	(A: B); (4-6 min) 40:60 (A: B); (6-8 min) 45:55 (A: B); (8-10 min) 78:22 (A: B); (10-14 min) 70:30 (A: B).		mediante el tiempo de retención y perfil UV.	et al., 2017)
-----------------	--	--	--	--	--	--	--	---------------

Tabla 12. *Desmodium tortuosum*

Muestra	Extracto	Estándar	Metodología	Fase Móvil	Gradiente de elución	Vel. De flujo	Resultados	Autor
1 Partes aéreas de plantas en floración, etapas vegetativas y fructíferas; recolectadas en Pucallpa, Perú (mayo - agosto 2008).	Las muestras fueron secadas (< 60 °C), molidas y pulverizadas; se añadió flavona (0,5 mg/g) como patrón interno antes de la extracción. En la extracción tipo Soxhlet se utilizó metanol acuoso al 90%, luego de de 1h (10 min de inmersión y 50 min de lavado) se eliminó el solvente. El residuo se diluyó posteriormente en fase móvil y se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm.	Daidzeína y formononetina	Dionex Summit HPLC  Columna Gemini C18 (250 x, 4,6 mm, 5 µm).  45°C  Detector de matriz de diodos a 250 y 260nm.	Ác. trifluoroacético al 0,1% en agua (A) y acetonitrilo (B).	Inicialmente 85:15 (A: B), pasa a 30:70 (A: B) durante 40 min.	0,8 mL/min	Detección de 2 isoflavonas mediante cromatogramas obtenidos comparados con los estándares, adicionalmente se realizó la cuantificación de daidzeína y formononetina, dando como resultados los valores de 50.6 y 3.0 por µg/g de materia seca, respectivamente para cada isoflavona.	(Leuner et al., 2013)



2	Plantas enteras maduras de varias regiones de Taiwn.	La muestra fue secada, molida y triturada, se tomó 500 g se extrajo con 2 L de etanol al 70% tres veces. Los filtrados se recogieron y concentraron a presión reducida, la solución restante se liofilizó antes de obtener el extracto final.	Ácido clorogénico, rutina y vitexina	HPLC Hitachi L-7100  Columna LiChroCART Purospher Star RP-18e (250 × 4 mm, 5 µm).  Detector de PAD a 330 nm.	Ác. fórmico al 0.2% en agua (A) y acetonitrilo (B).	(0 -10 min) 95:5 a 86:14 (A: B); (10 – 20 min) 86:14 (A: B); (20 - 60 min) 86:14 a 72:28 (A: B) y (60 – 85 min) 72:28 a 45:55 (A: B).	0,7 ml/min	Se determinò la presencia de vitexina con un t <sub>R</sub> de 35.41 min.	(Tsai et al., 2011)
---	--	---	--------------------------------------	--	---	---	------------	---	---------------------

Tabla 13. *Desmodium triflorum*

Muestra	Extracto	Estándar	Metodología	Fase Móvil	Gradiente de elución	Vel. De flujo	Resultados	Autor
1	Planta entera madura de Taichung, Taiwán a 112 msnm.	Vitexina.	Water HPLC 2695 LiChroCART RP-  Endcapped column C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm).  Detector de Matriz de fotodiodos a 336nm.	Ác. fórmico al 0.2% en agua (A) y acetonitrilo (B).	80:20 (A: B)	0,8 ml/min	El tiempo de retención de la vitexina fue de 8.71 minutos. La presencia de la misma se encontró en el extracto metanólico con un tiempo de retención de 8.64 minutos, acetato de etilo con un tiempo de retención de 8.62 minutos y n-butanol con un tiempo de retención de 8.74 minutos, este ultimo tenía un contenido mayor de vitexina.	(Lai et al., 2010)



2	Plantas enteras maduras de varias regiones de Taiwn.	La muestra fue secada, molida y triturada, se tomó 500 g se extrajo con 2 L de etanol al 70% tres veces. Los filtrados se recogieron y concentraron a presión reducida, la solución restante se liofilizó antes de obtener el extracto final.	Ácido clorogénico, rutina y vitexina	HPLC Hitachi L-7100  Columna LiChroCART Purospher Star RP-18e (250 × 4 mm, 5 μm).  Detector de PAD a 330 nm.	Ác. fórmico al 0.2% en agua (A) y acetonitrilo (B).	(0 -10 min) 95:5 a 86:14 (A: B); (10 – 20 min) 86:14 (A: B); (20 - 60 min) 86:14 a 72:28 (A: B) y (60 – 85 min) 72:28 a 45:55 (A: B).	0,7 ml/min	Se identificó la presencia de vitexina, ác. Clorogénico y rutinas, y se reportar un t <sub>R</sub> de 35.41 para vitexina y 17.35 para ác. Clorogénico.	(Tsai et al., 2011)
---	--	---	--------------------------------------	--	---	---	------------	---	---------------------

Tabla 14. *Desmodium uncinatum*

Muestra	Extracto	Estándar	Metodología	Fase Móvil	Gradiente de elución	Vel. De flujo	Resultados	Autor
1	Plantas enteras maduras de varias regiones de Taiwn.	Ácido clorogénico, rutina y vitexina	HPLC Hitachi L-7100  Columna LiChroCART Purospher Star RP-18e (250 × 4 mm, 5 μm).  Detector de PAD a 330 nm.	Ác. fórmico al 0.2% en agua (A) y acetonitrilo (B).	(0 -10 min) 95:5 a 86:14 (A: B); (10 – 20 min) 86:14 (A: B); (20 - 60 min) 86:14 a 72:28 (A: B) y (60 – 85 min) 72:28 a 45:55 (A: B).	0,7 ml/min	Se reporta la presencia de vitexina con un t <sub>R</sub> de 35.41 minutos.	(Tsai et al., 2011)
2	Plantas enteras obtenidas	A dos semanas de germinación las plantas se lavaron y colocaron en una solución hidropónica (40% Long	Sistema HPLC de la serie Shimadzu VP	Ác. fórmico al 5% en agua	Inicialmente 95:5 (A: B); a los 3 min	1,0 ml/min	Se identificaron vicenin 2 (6-C-glucosil-8-C-glucosilapigenina) con un	(Hooper



	de semillas que se cultivaron en suelo arenoso hasta aproximadamente varias semanas de germinación.	Ashton). Después de un mes la solución hidropónica pasó a 5 ml/min usando una bomba de peristalsis a través de una pipeta Pasteur que contenía polímero XAD-4 Amberlite para atrapar el material orgánico. La trampa se lavó con metanol, se eliminó el disolvente. El residuo se disolvió en 1 ml de metanol.	Vicenin 2, vitexina, isoschaftoside.	ACE AQ.  Columna C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm).  Detector UV a 350nm y espectrofotómetro de masas.	(A) y metanol (B).	85:15 (A:B); a los 13 min 75:25 (A:B); a los 25 min 70:30 (A:B); a los 35 min 45:55 (A:B); a los 46 min 5:95 y a los 60 min 95:5.		t <sub>R</sub> de 16.21, isoschaftoside (6-C-arabinosil-8-C-glucosilapigenina) con un t <sub>R</sub> de 19.72 min, 2''O-glucosil-8-C-glucosilapigenina con un t <sub>R</sub> de 20.15 min y vitexina (8-C-glucosilapigenina) con un t <sub>R</sub> de 26.43 min.	et al., 2015)
3	Hojas recolectadas en dos estados del sur de Brasil, en el estado de Campo Largo (a) y en el estado de Águas Mornas (b).	La muestra fue secada y molida a temperatura ambiente, se maceró por 36 h con metanol en proporción 1:20 (p/v). Se filtró y se eliminó el disolvente. El residuo se re suspendió en 10 ml de agua desionizada para ser liofilizado, se volvieron a diluir y filtrar con metanol para obtener soluciones de 1 mg/ml.	Luteolina (a).  Isovitexina, vitexina y luteolina (b).	Sistema Waters Alliance 2690.  Columna C18 (Nova-Pak ®, 250 x 3,9 mm, 4 µm,).  Detector UV a 254 nm.	Ácido trifluoroacético al 0,01% en agua (A), y ácido trifluoroacético al 0,08% en acetonitrilo (B).	Inicialmente 70:30 (A: B); (0-3 min) 8:52 (A: B); (3-4 min) 55:45 (A: B); (4-6 min) 40:60 (A: B); (6-8 min) 45:55 (A: B); (8-10 min) 78:22 (A: B); (10-14 min) 70:30 (A: B).	0,7 ml/min	Identificación de luteolina en ambas muestras mientras que isovitexina, vitexina solo en la muestra (b), mediante la comparación entre los picos de muestras estándar y el extracto mediante el tiempo de retención y perfil UV como parámetros de identificación.	(de Morais et al., 2017)



## ANÁLISIS DE RESULTADOS

Esta revisión bibliográfica permitió el análisis de 18 artículos originales que mencionan las diferentes condiciones cromatográficas que pueden ser utilizadas en el análisis de las especies del género *Desmodium*. En donde se observó que las especies *D. adscendens*, *D. gangeticum* y *D. styracifolium* han sido las más estudiadas dentro de estos artículos. De los cuales se sustrajeron 38 corridas cromatográficas, en donde se observó que en la mayoría de los análisis HPLC se empleó como material vegetal las plantas enteras, hojas y/o las partes aéreas para la obtención de los extractos, debido a que en estas estructuras se encuentran la mayor parte de metabolitos secundarios del género *Desmodium*. Para la obtención de estos extractos que en su mayoría fueron hidroalcohólicos los investigadores utilizaron la maceración y la percolación principalmente, ya que son los métodos más usados debido a su fácil realización y alcance, los mismos que son sugeridos por la Farmacopea (Rockville. US. United States Pharmacopeial Convention, I, 2008); a diferencia de tres artículos en los cuales reportan usar la extracción asistida por ultrasonido como se detalla en la Tabla 10 para las muestras 2, 3 y 4, este método favorece la ruptura de la pared celular, dando como resultado un aumento en la penetración del solvente lo cual representa una ventaja frente a otros métodos tradicionales como la extracción por solventes, debido que ha demostrado una mayor eficacia en el proceso extractivo y permite disminuir el tiempo del mismo (Campo Vera et al., 2018; Chemat et al., 2017; Medina, 2017; Xianduo Sun et al., 2018; Zhou et al., 2012). También en tres artículos detallados en la tabla 9 y 10 para la muestra 1 y la tabla 12 igualmente en la muestra 1 reportan usar extracción por Soxhlet, finalmente en una sola metodología descrita en la tabla 13 para la muestra 1 los investigadores deciden realizar la extracción por evaporación, en donde los autores consideraron que es un método sencillo y de rápida realización para la obtención del extracto. Stecher y colaboradores mencionan que los principales objetivos de la preparación de la muestra para el análisis cromatográfico son la disolución de los analitos y la eliminación de los



compuestos interferentes tanto como sea posible; por ello es común que se utilice la extracción en fase sólida para la preconcentración y limpieza de las muestras (Stecher et al., 2003); Baiocchi y colaboradores en su estudio reportan usar este método para la concentración de alcaloides, a través de la retención de estos en columnas de DVB (Divinilbenceno) de poliestireno modificado con ácido sulfónico de extracción en fase sólida, con lo cual en esta investigación se logró una precisión en la identificación cualitativa y cuantitativa de los alcaloides, flavonoides y saponinas (Baiocchi et al., 2013).

Para la separación por HPLC de las especies de *Desmodium* analizadas, todos los investigadores han utilizado columnas tipo C18 de partículas de distinto diámetro, en donde se ha observado que a mayor longitud de la columna mayor resolución en los picos identificados, debido a que se da una mayor interacción entre los metabolitos de la muestra y la fase estacionaria, en donde la más utilizada fue la columna C18 (250 x 4,6 mm, 5µm) con 14 determinaciones seguido de la columna C18 (250 x 3,9 mm, 4µm), el resto de las columnas fueron utilizadas entre 1 o dos veces entre las determinaciones. (Núñez, 2008). La fase móvil, también juega un papel importante, en cromatografía de fase reversa, ya que por su polaridad y capilaridad va a solubilizar al mayor número de metabolitos del extracto, las 38 corridas cromatográficas utilizaron soluciones hidro-orgánicas tamponadas de las cuales se usaron 7 metanol que fueron usadas en la tabla 5 en las muestras 2,3 y 4 al igual que en la tabla 7 muestra 1, también en la tabla 10 muestra 5 y finalmente en la tabla 14 muestra 2; el resto de los análisis cromatográficos (30) usaron acetonitrilo, esto se puede observar en cada uno de los estudios resumidos en las tablas de resultados. Además, la teoría nos indica que se puede agregar modificadores de pH a la fase móvil, estos pueden ser ácidos o bases, así como lo reportan la mayoría de los autores haber usado ácido acético, trifluoroacético o fórmico, debido a que se logra una mayor sensibilidad frente a los analitos básicos cuando este ya está ionizado en una fase móvil ácida; a diferencia de los autores de las metodologías descritas en la tabla 5 para la



muestras 2 y 4 en los cuales no se utilizó ningún modificador de pH. La retención cromatográfica de las sustancias ionizables depende de la diferencia entre el pH de la fase móvil y el pKa del analito en la misma fase móvil (S. C. Moldoveanu & David, 2017; S. Moldoveanu & David, 2016).

Para la identificación de los compuestos en cada uno de los extractos utilizaron principalmente detectores tipo UV y por medio de patrones se realizó la comparación para la determinación de los compuestos. Los metabolitos secundarios presentes en este género fueron los flavonoides detectados en un rango de longitud de onda entre 214 y 350 nm, se identificaron vitexina, isovitexina, schaftoside, vicenin 2, genisteína, isoschaftoside, luteolina, apigenina, isoorientín, hidroxinaringenina, floretina, nothofagina, daidzin, formononetina 2, biochanina, entre otros que no se presentaron en todas las especies. La vitexina, isovitexina, schaftoside e isoschaftoside se presentan como picos comunes entre los cromatogramas en varias especies de este género, es decir que la mayoría de las muestras de diferentes hábitats comparten patrones cromatográficos. Aunque, la concentración de estos picos fue diferente, lo que podría deberse a variaciones en la época de cosecha, climas geográficos y polución medioambiental. Según Xianduo y colaboradores las muestras con concentraciones más altas de los flavonoides procedían de regiones a menor altitud (8 – 182 msnm) (Xianduo Sun et al., 2018).



## CONCLUSIÓN

*Desmodium* es un género que presenta excelentes propiedades terapéuticas contra muchas enfermedades como antiinflamatorio en las vías respiratorias, infecciones de la piel, dolor estomacal entre otras; por lo que en la presente revisión bibliográfica se recopiló 18 artículos científicos, de los cuales se extrajeron distintas metodologías para 14 especies del género, que permitieron la elaboración de una base de datos informativa; la misma que facilitó la determinación de las variables más relevantes a analizar como los procesos extractivos, condiciones del análisis cromatográfico y metabolitos identificados.

Dentro de la revisión bibliográfica se concluye que la especie más analizada es *Desmodium styracifolium* con siete análisis cromatográficos. La comparación de las distintas metodologías cromatográficas permitió concluir que las plantas enteras fueron las más utilizadas con doce determinaciones seguida de las hojas con diez análisis dejando en tercer lugar a las partes aéreas como muestras que pueden usarse para el HPLC, al igual que la maceración y percolación para el tratamiento de las mismas fueron los dos métodos mayormente utilizados en los análisis cromatográficos, dando mejores resultados los extractos hidroalcohólicos con etanol y metanol para este género. En cuanto a las condiciones de análisis se recomienda el uso de la columna de partículas de fase reversa C18, siendo la más usada la C18 (250 x 4,6 mm, 5µm), con una fase móvil que contenga un solvente orgánico como el acetonitrilo que fue utilizado en 30 de las 38 fases móviles y un solvente acuoso acidificado para lograr una mayor sensibilidad del metabolito ionizado.

El mayor grupo identificado han sido los flavonoides en un rango de detección que va desde los 200 hasta 350 nm, y según las investigaciones requieren diferentes métodos extractivos, en donde las diferencias metodológicas radican en la clase de flavonoides a identificar, así como la investigación de otros metabolitos como alcaloides y saponinas. Los resultados analizados permitieron concluir que los principales flavonoides e isoflavonoides de este género son la



vitexina, isovitexina, schaftoside e isoschaftoside ya que se presentan como picos comunes en varias especies, aunque con diferentes concentraciones debido a la región, condiciones ambientales y época de cosecha.



## RECOMENDACIONES

- Realizar estudios investigativos sobre fingerprint en las principales especies del género *Desmodium* a nivel de latinoamerica, debido a la poca disponibilidad de información en dicha región.
- Realizar estudios experimentales para poder comprobar la reproducibilidad de los métodos descritos en la base de datos.
- Realizar investigaciones experimentales para determinar los fingerprint en plantas endémicas y lograr la identificación de nuevas especies y compuestos.



## BIBLIOGRAFÍA

- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(1), 1-10. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19)
- Ahuja, S., & Rasmussen, H. (2007). *HPLC Method Development for Pharmaceuticals*. Elsevier.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants*, 6(4), 42. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>
- Amoateng, P., Adjei, S., Osei-Safo, D., Kukuia, K. K. E., Karikari, T. K., & Nyarko, A. K. (2017). An ethanolic extract of *Desmodium adscendens* exhibits antipsychotic-like activity in mice. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 28(5), 507-518. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2016-0115>
- Araceli, M., Soberón, J. R., & Alejandro, D. (s. f.). *CROMATOGRAFÍA: CONCEPTOS Y APLICACIONES*. 6.
- Baiocchi, C., Medana, C., Giancotti, V., Aigotti, R., Dal Bello, F., Massolino, C., Gastaldi, D., & Grandi, M. (2013). Qualitative characterization of *Desmodium adscendens* constituents by high-performance liquid chromatography-diode array ultraviolet-electrospray ionization multistage mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry (Chichester, England)*, 19(1), 1-15. <https://doi.org/10.1255/ejms.1214>
- Banu, K. S., & Cathrine, L. (2015). General Techniques Involved in Phytochemical Analysis. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science*, 2, 25-32.
- Boligon, A., & Linde, M. (2014). Importance of HPLC in Analysis of Plants Extracts. *Austin Chromatography*, 1. <https://www.semanticscholar.org/paper/Importance-of-HPLC-in-Analysis-of-Plants-Extracts-Boligon-Linde/341909f80dba4b5c74c2c4313b65e6704832d03b>
- Braithwaite, A., & Smith, J. F. (1995). *Chromatographic Methods*. Springer Netherlands.
- Campo Vera, Y., Gelvez Ordoñez, V., & Ayala Aponte, A. (2018). Ultrasonido en el procesamiento (homogenización, extracción y secado) de alimentos. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 16(1), 102. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(16\)102-113](https://doi.org/10.18684/BSAA(16)102-113)
- Cazes, J., & Scott, R. P. W. (2002). *Chromatography Theory*. CRC Press.



- Chavez, J. (2018). *DETERMINACION Y CUANTIFICACION DE FLAVONOIDES MEDIANTE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESIÓN (HPLC) A PARTIR DEL EXTRACTO POLAR ACIDO DE Euphorbia laurifolia juss ex lam Y SU ACTIVIDAD TÓXICA* [Pregrado, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa]. <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/6280/QUchchjd.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540-560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chen, L., Tang, X., Yang, Q., & Cheng, X. (2020). Quantitative and Chemical Fingerprint Analysis of *Desmodium styracifolium* by High-Performance Liquid Chromatography Combined with Chemometrics. *Journal of Chromatographic Science*, 58(4), 294-302. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz112>
- Dark, W. A. (1986). UV and dRI Detectors in Liquid Chromatography: The Workhorse Detectors. *Journal of Chromatographic Science*, 24(11), 495-498. <https://doi.org/10.1093/chromsci/24.11.495>
- de Moraes, C. B., Scopel, M., Pedrazza, G. P. R., da Silva, F. K., Dalla Lana, D. F., Tonello, M. L., Miotto, S. T. S., Machado, M. M., De Oliveira, L. F. S., Fuentefria, A. M., & Zuanazzi, J. A. S. (2017). Anti-dermatophyte activity of Leguminosae plants from Southern Brazil with emphasis on *Mimosa pigra* (Leguminosae). *Journal de Mycologie Médicale*, 27(4), 530-538. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.07.006>
- Farid, B., Rafiou, M., Marcellin, A., Durand, D.-N., Nabede, A., Sylvestre, A., Haziz, S., Adolphe, A., Aly, S., & Lamine, B.-M. (2018). Ethnobotanical Survey of Three Species of *Desmodium* genus (*Desmodium ramosissimum*, *Desmodium gangeticum* and *Desmodium adscendens*) Used in Traditional Medicine, Benin. *International Journal of Sciences*, 4(12), 26-33. <https://doi.org/10.18483/ijSci.1860>
- Giddings, J. C. (2002). *Dynamics of Chromatography: Principles and Theory*. CRC Press.
- Guo, P., Yan, W., Han, Q., Wang, C., & Zhang, Z. (2015). Simultaneous quantification of 25 active constituents in the total flavonoids extract from *Herba Desmodii Styracifolii* by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass



- spectrometry. *Journal of Separation Science*, 38(7), 1156-1163.  
<https://doi.org/10.1002/jssc.201401360>
- Heftmann, E. (2004). *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods—Part A: Fundamentals and techniques* (6th ed., Vol. 69A). Elsevier.
- Hooper, A. M., Caulfield, J. C., Hao, B., Pickett, J. A., Midega, C. A. O., & Khan, Z. R. (2015). Isolation and identification of *Desmodium* root exudates from drought tolerant species used as intercrops against *Striga hermonthica*. *Phytochemistry*, 117, 380-387.  
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.06.026>
- Kazakevich, Y. V., & LoBrutto, R. (2007). *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. John Wiley & Sons.
- Kumar, B. R. (2017). Application of HPLC and ESI-MS techniques in the analysis of phenolic acids and flavonoids from green leafy vegetables (GLVs). *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 7(6), 349-364. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2017.06.005>
- Lai, S.-C., Ho, Y.-L., Huang, S.-C., Huang, T.-H., Lai, Z.-R., Wu, C.-R., Lian, K.-Y., & Chang, Y.-S. (2010). Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Desmodium triflorum* (L.) DC. *The American Journal of Chinese Medicine*, 38(02), 329-342.  
<https://doi.org/10.1142/S0192415X10007889>
- Lee, T. D. (2011). Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 22(1), 196.  
<https://doi.org/10.1007/s13361-010-0021-8>
- León, R., Bonifaz, N., & Gutiérrez, F. (2018). *Pastos y forrajes del Ecuador Siembra y producción de pasturas*. <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/19019>
- Leuner, O., Havlik, J., Hummelova, J., Prokudina, E., Novy, P., & Kokoska, L. (2013). Distribution of isoflavones and coumestrol in neglected tropical and subtropical legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(3), 575-579.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.5835>
- Lima, L. C. P., Queiroz, L. P. D., Tozzi, A. M. G. D. A., & Lewis, G. P. (2014). A Taxonomic Revision of *Desmodium* (Leguminosae, Papilionoideae) in Brazil. *Phytotaxa*, 169(1), 1. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.169.1.1>
- Lindsay, S. (1992). *High Performance Liquid Chromatography* (2nd ed.). John Wiley & Sons.
- Liu, L., Chen, M., & Chen, X. (2015). Analysis of alcohol dehydrogenase inhibitors from *Desmodium styracifolium* using centrifugal ultrafiltration coupled with HPLC-MS.



- Lough, W. J., & Wainer, I. W. (1995). *High Performance Liquid Chromatography: Fundamental Principles and Practice*. CRC Press.
- Lucio Gutiérrez, J. R. (2012). *Aplicación de Métodos Quimiométricos para la Caracterización y Control de Calidad de Plantas Medicinales* [Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona].  
[https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/96257/jr1g1de1.pdf?sequence=1&fbclid=IwAR06rixaYmKLQBvyGphk-\\_mnJL810kqrhzBKSeA07GC7qFCfMUA3gPMYVvc](https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/96257/jr1g1de1.pdf?sequence=1&fbclid=IwAR06rixaYmKLQBvyGphk-_mnJL810kqrhzBKSeA07GC7qFCfMUA3gPMYVvc)
- Ma, X., Zheng, C., Hu, C., Rahman, K., & Qin, L. (2011). The genus *Desmodium* (Fabaceae)-traditional uses in Chinese medicine, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 138(2), 314-332. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.053>
- Malik, J., Krishan, A., & Deovrat, K. (2019). *Characterization of Flavonoids in Aqueous extract of Desmodium gangeticum by RP-HPLC*. 1-4.  
<https://doi.org/10.36348/GAJPDR.v01i01.001>
- McPolin, O. (2009). *An Introduction to HPLC for Pharmaceutical Analysis*. Lulu.com.
- Medina, N. (2017). *Efecto del ultrasonido en la extracción y nanoencapsulación de polifenoles*. [Centro de Investigación y asistencia en tecnología y diseño del Estado de Jalisco].  
<https://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1023/447/1/Nelly%20Carolina%20Medina.pdf>
- Miller, J. M. (1993). *CHROMATOGRAPHY Concepts and Contrasts* (2nd ed.).
- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2013). *Essentials in Modern HPLC Separations*. Newnes.
- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2017). Chapter 13—Solvents, Buffers, and Additives Used in the Mobile Phase. En S. C. Moldoveanu & V. David (Eds.), *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis* (pp. 393-450). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803684-6.00013-5>
- Moldoveanu, S., & David, V. (2016). *Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*. Elsevier.
- Nn, A. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal and Aromatic plants*, 4, 1-6.  
<https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>



- Núñez, O. (2008). Columnas monolíticas de base sílice: Propiedades, preparación, modificaciones químicas y aplicaciones en cromatografía de líquidos. *Boletín de la Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines*, 29, 59-77.
- Ohashi, K., Ohashi, H., Nemoto, T., & Nata, K. (2021). *Phylogenetic Analyses for a New Classification of the Desmodium Group of Leguminosae Tribe Desmodieae 5. Last Desmodium Native to Asia and Australia*.
- Olascuaga-Castillo, K., Rubio-Guevara, S., Valdiviezo-Campos, J. E., & Blanco-Olano, C. (2020). *Desmodium molliculum* (Kunth) DC (Fabaceae); Ethnobotanical, phytochemical and pharmacological profile of a Peruvian Andean plant. *Ethnobotany Research and Applications*, 19(0), 1-13.
- Parriott, D. (1993). *A Practical Guide to HPLC Detection*. Academic Press.
- Poole, C. F. (2003). *The Essence of Chromatography*. Elsevier.
- Pryde, S., & Gilbert, M. T. (1979). *Applications of High Performance Liquid Chromatography*. Springer Science & Business Media.
- Rahman, M. Z., & Rahman, M. O. (2012). Morphometric analysis of *Desmodium Desv.* In Bangladesh. *Bangladesh Journal of Botany*, 41(2), 143-148. <https://doi.org/10.3329/bjb.v41i2.13438>
- Rastogi, S., Pandey, M. M., & Rawat, A. K. S. (2011). An ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological profile of *Desmodium gangeticum* (L.) DC. and *Desmodium adscendens* (Sw.) DC. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(2), 283-296. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.031>
- Rockville. US. United States Pharmacopeial Convention, I. (2008). CHROMATOGRAPHY. En *USP 31. Farmacopea de los Estados Unidos de América. NF 26. Formulario Nacional* (31.<sup>a</sup> ed., Vol. 3, p. 232). Rockville.
- Rolando, C. (1978). *Leguminosas forrajeras para el Trópico ecuatoriano*. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1568>
- Scott, R. P. W. (2003). *LIQUID CHROMATOGRAPHY* (Chrom-Ed Book Series).
- Sgariglia, M. A., Soberón, J. R., Sampietro, D. A., & Vattuone, M. A. (2010). CROMATOGRAFÍA: CONCEPTOS Y APLICACIONES. *Arakuku*. [https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/75465/CONICET\\_Digital\\_Nro.3655a360-b03b-44c8-8519-bc747d073f7c\\_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y](https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/75465/CONICET_Digital_Nro.3655a360-b03b-44c8-8519-bc747d073f7c_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y)



- Smith, W. T. (1971). Practical pharmaceutical chemistry. Second Edition- Part 2 (Beckett, A.H.; Stenlake, J.B.). *Journal of Chemical Education*, 48(2), A126. <https://doi.org/10.1021/ed048pA126.1>
- Snyder, L. R., & Dolan, J. W. (2006). *High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model*. John Wiley & Sons.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Glajch, J. L. (1997). *Practical HPLC Method Development*. John Wiley & Sons.
- Stecher, G., Huck, C. W., Stöggel, W. M., & Bonn, G. K. (2003). Phytoanalysis: A challenge in phytomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(1), 1-14. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00108-0](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00108-0)
- Su, W., Liu, Q., Yang, Q., Yu, J., & Chen, X. (2013). Separation and purification of four compounds from *Desmodium styracifolium* using off-line two-dimensional high-speed counter-current chromatography. *Journal of Separation Science*, 36(20), 3338-3344. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300653>
- Sunil, A. (2018). HPLC Detectors, Their Types and Use: A Review. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, 6(5). <https://doi.org/10.19080/OMCIJ.2018.06.555700>
- Swartz, M. (2010). HPLC detectors: A brief review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies - J LIQ CHROMATOGR RELAT TECHNO*, 33, 1130-1150. <https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356>
- Torres-Colín, L., Delgado-Salinas, A., Sotuyo, S., & Pérez-Escobar, M. (2015). *Desmodium raymundoramirezii* (Desmodieae: Leguminosae), una especie nueva de la sierra Madre del Sur, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 86(4), 882-887. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.09.006>
- Tsai, J.-C., Huang, G.-J., Chiu, T.-H., Huang, S.-S., Huang, S.-C., Huang, T.-H., Lai, S.-C., & Lee, C.-Y. (2011). Antioxidant activities of phenolic components from various plants of *Desmodium* species. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(4), 468-476. <https://doi.org/10.5897/AJPP11.059>
- Venn, R. F. (2000). *Principles and Practice of Bioanalysis*. CRC Press.



- Wixom, R. L. (2001). Chapter 1 The beginnings of chromatography—The pioneers (1900–1960). En C. W. Gehrke, R. L. Wixom, & E. Bayer (Eds.), *Journal of Chromatography Library* (Vol. 64, p. 38). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(01\)80007-5](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(01)80007-5)
- Xianduo Sun, X. S., Xiaomin Tang, X. T., & Quan Yang, Q. Y. (2018). *An effective quantitative fingerprint method for evaluating the quality consistency of Desmodium styracifolium*. 10, 579-584. <https://doi.org/10.1691/ph.2018.8590>
- Yadav, A. K., & Gupta, M. M. (2014). Validated RP-HPLC and HPTLC methods for determination of anti-inflammatory bis-indole alkaloid in *Desmodium gangeticum*. *Natural Product Research*, 28(4), 275-277. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.841690>
- Yadav, A. K., Singh, S. C., & Gupta, M. M. (2012). A Validated Stability-Indicating Hplc-Pda Method for Analysis of *Desmodium Gangeticum*: An Important Ingredient of Ayurvedic Drug “Dashmool”. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35(8), 1038-1052. <https://doi.org/10.1080/10826076.2011.615093>
- Yang, C., Ren, C., Piao, X., Kannan, N., & Li, D. (2013). An on-line sample pretreatment technique for the HPLC analysis of plant samples. *Journal of Separation Science*, 36(21-22), 3599-3607. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300722>
- Yang, K., Guo, Z.-B., & Li, K.-P. (2020). Membrane-based separation and concentration of total flavone glycosides from *Desmodium styracifolium*. *E3S Web of Conferences*, 145, 01016. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014501016>
- Zhou, C., Luo, J.-G., & Kong, L.-Y. (2012). Quality Evaluation of *Desmodium styracifolium* Using High-performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection and Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectrometry: Quality Evaluation of *Desmodium Styracifolium*. *Phytochemical Analysis*, 23(3), 240-247. <https://doi.org/10.1002/pca.1349>
- Zielińska-Pisklak, M. A., Kaliszewska, D., Stolarczyk, M., & Kiss, A. K. (2015). Activity-guided isolation, identification and quantification of biologically active isomeric compounds from folk medicinal plant *Desmodium adscendens* using high performance liquid chromatography with diode array detector, mass spectrometry and multidimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 102, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.08.033>



## ANEXOS

Anexo 1. Metabolitos identificados en *D. adscendens*. Tabla 1 (Baiocchi et al., 2013).

Número	Identidad asignada	tr
<b>Soyasaponinas</b>		
1	Soyasaponina I	26. 6 min.
2	Deshidrosoyasaponina I	28.9 min.
3	Soyasapogenol B	41.8 min
4	Soyasaponina III.	27.6 min
<b>Alcaloides</b>		
1	Hordenin	-
2	Dimetiltriptamina	-
3	Dimetoxifeniletamina	-
4	Salsoline	-
<b>Flavonoides</b>		
1	6C, 8C-dihexosil-kaempferol	10.7 min
2	5-O-hexosil-apigenina	12.3 min
3	6-C, 8-C-dihexosil-apigenina	18.1 min
4	6-C-pentosil-8-C-hexosil-kaempferol	20.5 min
5	6-C-hexosil-8-C-pentosil-kaempferol	22.5 min
6	5-O-hexosil-kaempferol	24.5 min
7	6-C-hexosil-8-C-pentosil-diosmetina	25. 2 min
8	6-C-pentosil-8-C-hexosil-kaempferol	25.6 min
9	6-C-hexosil-8-C-pentosil-kaempferol	27.7 min
10	6-C-pentosil-8-C-hexosil-apigenina	27.9 min
11	8-C-hexosil-kaempferol	31.9 min
12	6-C-pentosil-8-C-hexosil-kaempferol	32.1 min
13	6-C-pentosil-8-C-hexosil-apigenina	35.5 min
14	6-C-hexosil-8-C-ramnosil-kaempferol	38.6 min
15	6-C-hexosil-8-C-pentosil-apigenina	44.3 min
16	5-O-pentosil-1,6-ramnosil-kaempferol	44.8 min
17	Saponarina (6-C-hexosil-7-O-hexosil-apigenina)	46.4 min
18	7-O-pentosil-1,6-ramnosil-kaempferol	47.1 min
19	6-C-hexosil-8-C-pentosil-apigenina	48.6 min
20	Vitexina (8-C-hexosil-apigenina)	52.5 min
21	5-O-ramnosil- (1-6) -hexosil-apigenina	53.2 min
22	5-O-pentosil- (1-6) -hexosil-apigenina	54.5 min
23	6-C-hexosil-8-C-pentosil-kaempferol	54.6 min
24	Astragalina (3-O-hexosil-kaempferol)	57.9 min
25	6-C-hexosil-8-C-ramnosil-apigenina	61.7 min
26	5-O-pentosil- (1,6) -hexosil-diosmetina	62.3 min
27	6-C-hexosil-8-C-pentosil-apigenina	64.9 min
28	6-C-ramnosil-8-C-hexosil-apigenina	65.2 min
29	6-C-hexosil-7-O-ramnosil-apigenina	67.8 min
30	7-O-rhamnosil-quercetina	70.2 min
31	6-C-ramnosil-8-C-hexosil-apigenina	71.2 min



32	7-O-hexosil-kaempferol	72.5 min
33	1,6-ramnosil-7-O-hexosil-7-apigenina	74.7 min
34	7-O-hexosil-apigenina	76.1 min
35	7-O-pentosil-1,6-hexosil-diosmetina	78.1 min

**Anexo 2. Contenido porcentual del alcaloide gangoide en diferentes extractos de la raíz de *D. gangeticum* (Yadav et al., 2012).**

% de contenido de gangoide cuantificado (p/p) <sup>a</sup>				
Solvente	Técnica de extracción			
	Percolación fría <sup>b</sup>	Extracción en caliente <sup>c</sup>	Ultrasonificación <sup>d</sup>	Microondas <sup>e</sup>
Cloroformo	0.0110	0.0170	0.0119	0.0168
Metanol	0.1296	0.1981	0.1919	0.1808
Agua	0.1716	0.2636	0.1956	0.2054

<sup>a</sup> Sobre la base del peso seco de la planta

<sup>b</sup> Durante la noche a temperatura ambiente.

<sup>c</sup> Durante 30 min a 100 °C.

<sup>d</sup> Durante 30 min a temperatura ambiente.

<sup>e</sup> Durante 15 min a 50 °C (350W).

**Anexo 3. Tiempo de retención y contenido porcentual de los compuestos identificados en *D. gangeticum***

Compuestos	Análisis HPLC-PDA.	Técnica de extracción							
		% cuantificado (p/p) <sup>a</sup>							
	Rt (min)	Percolación fría <sup>b</sup>		Extracción en caliente <sup>c</sup>		Ultrasonificación <sup>d</sup>		Microondas <sup>e</sup>	
		Etanol	Agua	Etanol	Agua	Etanol	Agua	Etanol	Agua
Rutina	8.60	0,0058	ND	0.0117	0,0087	0,0021	0,0045	0.0133	0,0085
Kaempferol-3-O-robinobiósido	11.16	0,0015	ND	0,0021	0,0014	0,0003	0,0005	0,0027	0,0012
Nicotiflorina	12.33	0,0029	ND	0,0032	0,0031	0,0006	0,0009	0,0035	0,0026

<sup>a</sup> Sobre la base del peso seco de la planta

<sup>b</sup> Durante 20 horas.

<sup>c</sup> Durante 30 min a 100 °C.

<sup>d</sup> Durante 30 min a temperatura ambiente.

<sup>e</sup> Durante 20 min a 50 °C (365W).

Rt: Tiempo de retención.

**Anexo 4. Compuestos identificados en *D. Styracifolium* (Zhou et al., 2012)**

Número	Identidad asignada	(tr)
1	Desconocido	15.4 min.



2	Vicenin 2	21.6 min.
3	Homoardonivertina	24.3 min
4	Vicenin 1	29.5 min
5	Schaftoside	33.8 min
6	Desconocido	40.2 min
7	Isoschaftoside	41.7 min
8	Vicenin 3	45.9 min
9	Isovitexina	52.5 min
10	Isoorientina	58.6 min
11	Desconocido	61.7 min
12	Genistin	66.4 min
13	2'-hidroxigenisteína	71.2 min
14	7,4'-Dihidroxi-3'-metoxi-isoflavona	72.9 min
15	Luteolina	73.2 min
16	Apigenina	77 min
17	Chrysoeriol	77.8 min
18	5,7-Dihidroxi-2'-metoxi-3', 4'-metilendioxiisoflavanona	78.9 min
19	5,7-dihidroxi-2', 3', 4'-trimetoxi-isoflavanona	85.4 min
20	Homoferreirina	86.6 min

**Anexo 5. Cuantificación de 25 componentes en 6 lotes de extracto total de flavonoides de *D. Styracifolium* (Guo et al., 2015).**

Compuesto	Contenido (ug/g) <sup>a</sup>					
	Lotes de extracto					
	1	2	3	4	5	6
Ácido protocatéquico	37.45 ± 0.44	37.02 ± 0.46	36.76 ± 0.40	38.14 ± 0.77	37.91 ± 0.62	37.55 ± 0.53
Ácido cafeico	630.13 ± 5.04	629.75 ± 4.87	625.98 ± 4.23	630.54 ± 5.43	628.70 ± 4.56	626.46 ± 4.45
Ácido ferúlico	388.72 ± 2.92	387.45 ± 2.29	386.91 ± 2.22	389.80 ± 3.29	387.85 ± 2.73	385.42 ± 2.04
Liquiritigenina	22.88 ± 0.27	23.70 ± 0.39	22.75 ± 0.16	23.00 ± 0.2	22.65 ± 0.11	21.89 ± 0.05
Apigenina	250.72 ± 1.90	251.12 ± 2.11	250.26 ± 1.89	252.70 ± 2.70	250.82 ± 2.65	254.38 ± 2.45
Genisteína	150.91 ± 1.29	151.85 ± 1.27	150.80 ± 1.19	152.18 ± 1.74	150.79 ± 0.97	156.10 ± 2.26
Naringenina	20.23 ± 0.25	22.20 ± 0.14	21.25 ± 0.06	21.34 ± 0.08	23.58 ± 0.28	20.66 ± 0.07
Acacetina	75.46 ± 1.61	76.22 ± 1.10	76.09 ± 1.05	72.83 ± 0.50	75.44 ± 0.85	74.86 ± 0.62
Kaempferol	54.48 ± 1.44	53.82 ± 1.09	52.56 ± 0.92	53.73 ± 1.02	54.21 ± 1.40	55.52 ± 1.53
Luteolina	458.92 ± 3.24	458.86 ± 3.37	460.97 ± 3.54	461.90 ± 3.55	459.78 ± 3.34	459.05 ± 3.05
Diosmetina	18.87 ± 0.14	17.75 ± 0.09	19.62 ± 0.34	19.12 ± 0.32	16.86 ± 0.05	18.90 ± 0.08
Quercetina	24.16 ± 0.04	23.75 ± 0.20	24.23 ± 0.46	24.05 ± 0.31	23.89 ± 0.22	21.96 ± 0.08
Isorhamnetina	154.80 ± 0.75	152.77 ± 0.64	156.83 ± 0.89	157.47 ± 1.04	156.89 ± 0.97	152.68 ± 0.56
Ácido clorogénico	93.45 ± 0.54	90.76 ± 1.11	94.12 ± 0.73	93.62 ± 0.52	92.79 ± 0.3	90.15 ± 2.21
Genistina	1.51 ± 0.04	1.60 ± 0.06	1.59 ± 0.05	1.48 ± 0.00	1.51 ± 0.05	1.50 ± 0.03
Vitexina	255.16 ± 0.75	230.00 ± 1.49	256.83 ± 1.23	258.42 ± 1.45	255.57 ± 0.92	254.76 ± 0.80
Isovitexina	6.25 ± 0.15	5.89 ± 0.05	6.03 ± 0.12	5.95 ± 0.06	6.75 ± 0.20	6.45 ± 0.18
Homoorientina	3.25 ± 0.00	3.33 ± 0.03	3.31 ± 0.02	3.27 ± 0.01	3.13 ± 0.00	3.44 ± 0.06



Isoquercitrina	1.87 ± 0.03	1.52 ± 0.00	1.55 ± 0.00	2.07 ± 0.04	1.72 ± 0.01	2.13 ± 0.06
Hiperina	50.49 ± 0.47	0 47.56 ± 0.25	48.22 ± 0.26	46.21 ± 0.14	49.58 ± 0.29	50.32 ± 0.32
Schaftoside	113.83 ± 1.34	110.39 ± 1.07	112.95 ± 1.55	114.01 ± 1.49	113.94 ± 1.37	113.52 ± 1.18
Isoschaftoside	883.33 ± 5.31	884.01 ± 6.02	880.84 ± 4.01	883.67 ± 5.91	882.80 ± 4.07	883.62 ± 5.78
Diosmina	2.07 ± 0.01	2.12 ± 0.03	2.08 ± 0.00	2.33 ± 0.05	2.45 ± 0.08	2.57 ± 0.12
Rutina	272.00 ± 2.05	269.59 ± 1.23	271.57 ± 1.75	270.45 ± 1.46	272.60 ± 2.19	272.49 ± 2.12
Hesperidina	80.81 ± 0.78	81.23 ± 1.03	78.54 ± 0.69	76.94 ± 0.47	81.01 ± 0.94	80.70 ± 1.11

<sup>a</sup> Contenido = media ± SD (n = 3).