



**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE SEPARACIÓN Y  
CUANTIFICACIÓN PARA EL ÁCIDO GÁLICO EN LOS FRUTOS  
DE *COTONEASTER PANNOSUS* PROVENIENTE DE  
BOGOTÁ-COLOMBIA POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA.**

**Laura Stephanía Ballén Díaz**

**Oscar Alfonso Vargas Bautista**

**Universidad El Bosque  
Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica  
Bogotá DC. – Octubre 2022**

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE SEPARACIÓN Y  
CUANTIFICACIÓN PARA EL ÁCIDO GÁLICO EN LOS FRUTOS  
DE *COTONEASTER PANNOSUS* PROVENIENTE DE  
BOGOTÁ-COLOMBIA POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA.**

**Laura Stephanía Ballén Díaz**

**Oscar Alfonso Vargas Bautista**

**Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de:**

**Químico Farmacéutico**

**Modalidad de trabajo de grado**

**Investigación aplicada**

**Director(a): Emerson Eliecer León Ávila**

**Química aplicada**

**Universidad El Bosque**

**Facultad de Ciencias - Programa de Química Farmacéutica**

**Bogotá DC. – Octubre 2022**

## Hoja de identificación

<b>Título:</b>	Validación de un método de separación y cuantificación para el ácido gálico en los frutos de <i>Cotoneaster pannosus</i> provenientes de Bogotá-Colombia por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia.
<b>Grupo de investigación:</b>	INQA.
<b>Línea de Investigación:</b>	Fitoquímica.
<b>Institución (es) Participante (s):</b>	Universidad El Bosque.
<b>Tipo de Investigación:</b>	Investigación aplicada.
<b>Estudiantes:</b>	Laura Stephanía Ballén Díaz Oscar Alfonso Vargas Bautista
<b>Director:</b>	Emerson Eliecer León Ávila
<b>Codirector:</b>	NA
<b>Asesor:</b>	NA

## **Dedicatoria o lema**

Dedicamos este trabajo con amor y cariño:

A nuestras familias, quienes con su constante apoyo y amor nos dieron las fuerzas para persistir, continuar y dar siempre lo mejor de nosotros mismos.

A nuestros profesores, quienes con su disposición a enseñarnos nos dieron las bases y el conocimiento necesario para culminar este proceso.

A nuestros amigos, quienes también hicieron parte del proceso y nos sacaron una sonrisa para sobrellevar de mejor manera los días difíciles.

Y por último, a nosotros mismos, quienes conformamos un equipo con las características de un medicamento (eficiente, de calidad y seguro) desde el inicio, el cual se fue desarrollando en muchos momentos de aprendizaje y éxitos a través de nuestra carrera profesional.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, a nuestras familias, por brindarnos los medios para alcanzar nuestros sueños y depositar su confianza en nosotros.

A nuestros profesores, especialmente, a nuestro guía y tutor Emerson Eliecer León Ávila, quien además de apoyarnos, nos dio las herramientas necesarias para desarrollar este trabajo con un aprendizaje interdisciplinar, el cual es fundamental para nuestro crecimiento como futuros profesionales químicos farmacéuticos.

A la Universidad El Bosque, por prestarnos sus instalaciones y equipos, que nos permitieron realizar el trabajo de investigación con las mejores herramientas. De igual forma, a los auxiliares de laboratorio, por la paciencia y su buena disposición durante el trabajo práctico.

# Tabla de contenido

1. Introducción .....	14
2. Marco teórico .....	15
2.1 Validación.....	15
2.1.3 Linealidad: .....	15
2.1.4 Límite de cuantificación: .....	15
2.1.5 Límite de detección: .....	15
2.1.6 Robustez: .....	15
2.2 Métodos de calibración analítica .....	16
2.3 Cromatografía .....	16
2.3.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia .....	17
2.4 Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (equipo HPLC) .....	17
2.5 <i>Cotoneaster pannosus</i> (Holly liso).....	18
2.5.1 Composición química de los frutos del <i>Cotoneaster pannosus</i> .....	19
2.5 Extracciones.....	19
2.5.1 Extracción por calentamiento .....	19
2.5.2 Extracción por agitación.....	19
2.5.3 Extracción asistida por baño ultrasónico .....	19
2.6 Ácido gálico.....	20
3. Planteamiento del problema .....	22
4. Pregunta de investigación.....	23
5. Objetivos.....	24
5.1 Objetivo general del Anteproyecto.....	24
5.2 Objetivos específicos.....	24
6. Metodología .....	25
6.1 Recolección de los frutos .....	25
6.2 Extracciones.....	25
6.3 Reactivos .....	27
6.4 Preparación de la solución stock .....	27
6.5 Materiales y equipos utilizados.....	27
6.6 Condiciones cromatográficas .....	27
6.7 Linealidad.....	28
6.8 Robustez .....	28
6.9 Exactitud .....	28

6.10	Precisión .....	28
6.11	Límite de detección y cuantificación .....	28
7.	Resultados y análisis de resultados .....	29
7.1	Condiciones de separación .....	29
7.2	Extracciones.....	33
7.3	Validación.....	36
7.3.1	Linealidad .....	36
7.3.2	Límite de detección y límite de cuantificación (LDD-LDC).....	38
7.3.3	Precisión.....	40
7.3.2.1	Reproducibilidad.....	41
7.3.4	Exactitud (Porcentaje de recuperación) .....	43
7.3.5	Robustez .....	44
7.4	Cuantificación de ácido gálico en frutos de <i>Cotoneaster pannosus</i> por medio de adición estándar .....	47
7.5	Parámetros cromatográficos.....	49
7.5.1	Tiempo de retención y tiempo de retención corregido ( $t_r'$ ).....	49
7.5.2	Factor de capacidad ( $k'$ ) .....	50
7.5.3	Selectividad ( $\alpha$ ) .....	51
7.5.4	Resolución (R).....	51
7.5.5	Número de platos teóricos (N) y altura del plato (H).....	52
8.	Conclusiones .....	54
9.	Recomendaciones .....	55
11.	Referencias bibliográficas .....	56

## Listado de tablas

		<b>Pág.</b>
Tabla 1	Masa de frutos y proporción de la solución (etanol (75%) – agua) para la maceración.	25
Tabla 2	Condiciones de separación para el ácido gálico en los frutos de <i>Cotoneaster pannosus</i> .	29
Tabla 3	Propiedades fisicoquímicas del ácido gálico.	29
Tabla 4	Resultados obtenidos del análisis de linealidad. Volumen de extracto y estándar adicionado en los viales, concentración de estándar en el vial y sus respectivas áreas determinadas a partir del promedio de las dos curvas de calibración obtenidas.	36
Tabla 5	Datos de concentración y área para la curva de calibración de LDD y LDC.	38
Tabla 6	Estadísticas de la regresión lineal de la curva de calibración para la determinación de LDD y LDC. Los valores fueron calculados por el programa Microsoft Excel en la opción análisis de datos.	39
Tabla 7	Resultados de precisión. Tiempos de retención y áreas obtenidos en 5 diferentes ensayos.	40
Tabla 8	Resultados reproducibilidad según experimentador	41
Tabla 9	Datos y resultados de exactitud (porcentaje de recuperación).	43
Tabla 10	Datos y resultados (desviación estándar y coeficiente de variación) de robustez variando el pH de la fase móvil.	44
Tabla 11	Valores de tailing de los ensayos a comparar.	45
Tabla 12	Resultados de los parámetros cromatográficos.	49

## Listado de figuras

		<b>Pág.</b>
Figura 1	Representación esquemática de un sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia	18
Figura 2	Estructura del ácido gálico. Generada en el software ChemDraw.	20
Figura 3	Evidencia de la extracción de AG en frutos de Holly liso asistida por baño ultrasónico.	26
Figura 4	Evidencia tratamiento previo y final para las diferentes extracciones de AG en frutos de Holly liso.	27
Figura 5	Cromatograma del patrón de AG a 51 ppm con ácido fórmico al 0,1%.	31
Figura 6	Cromatograma del patrón de AG a 51 ppm con ácido fórmico al 0,5%.	32
Figura 7	Cromatograma obtenido de la inyección de extracto más 150 µL de Estándar de AG con las condiciones finales de separación.	33
Figura 8	Determinación de la mejor metodología de extracción. Cromatograma A: extracto más patrón de ácido gálico. Cromatograma B: extracto con solapamiento de los picos. Condiciones: ACN : Agua (98:2), flujo isocrático, flujo de 0,400 mL/ min y volumen de inyección de 10 µL.	34
Figura 9	Curva de calibración A obtenida en el programa LabSolutions. Curva de calibración B obtenida en el programa LabSolutions.	37
Figura 10	Curva de Calibración para la determinación de la linealidad. Obtenida mediante el promedio de la curva A y B.	37

Figura 11	Curva de calibración para la determinación del límite de cuantificación y el límite de detección.	39
Figura 12	Cromatograma obtenido con la inyección de 150 $\mu$ L de estándar de AG para evaluar el parámetro de precisión.	41
Figura 13	Áreas y tiempos de retención solapados de la curva de calibración A.	42
Figura 14	Cromatograma obtenido con la inyección de 50 $\mu$ L de estándar de AG para evaluar el parámetro de exactitud (porcentaje de recuperación).	44
Figura 15	Ionización del ácido gálico al aumentar el pH.	46
Figura 16	Cromatograma obtenido con agua acidificada (ácido fórmico 0,5%) para el estándar de 270 ppm de AG, para evaluar el parámetro de robustez.	47
Figura 17	Cromatograma obtenido con agua sin acidificar para el estándar de 270 ppm de AG, para evaluar el parámetro de robustez.	47
Figura 18	Cromatograma del extracto más patrón de AG a 17 ppm para la determinación de los parámetros cromatográficos.	49

## Lista de Símbolos y abreviaturas

**AINES** = Antiinflamatorio no esteroideo.

**AG** = Ácido gálico.

**COX-2**= Ciclooxigenasa 2.

**CV**= Coeficiente de variación.

**H**= Altura del plato teórico.

**HPLC**= Cromatografía líquida de alta eficiencia (por sus siglas en inglés).

**HPLC-UV-VIS**= Cromatografía líquida de alta eficiencia con detección ultravioleta visible (por sus siglas en inglés).

**K'**= Factor de capacidad.

**LDD** = Límite de detección.

**LDC** = Límite de cuantificación.

**N**= Número de platos teóricos.

**Nfr2**= Factor nuclear derivado de eritroide 2.

**R**= Resolución.

**RAM** = Reacción adversa a medicamentos.

**Tr**= Tiempo de retención.

**$\sigma$** = Desviación estándar.

**$\alpha$** = Selectividad.

## Resumen

*Cotoneaster pannosus* conocido también como Holly liso es un arbusto proveniente de China que abunda en las regiones de América, Australia y algunas zonas de Europa. Debido a su alta tasa de crecimiento y maduración se cataloga como una planta potencialmente invasora en diferentes regiones. Los frutos del Holly liso poseen gran variedad de compuestos bioactivos, entre ellos se destaca el ácido gálico, al cual se le atribuye una actividad antioxidante que le permite actuar como agente preventivo por sus propiedades hepatoprotectoras, neuroprotectoras, antifúngicas, entre otras.

Se propone un extracto proveniente de los frutos de Holly liso como fuente de ácido gálico para futuros usos medicinales. De modo que, en el presente trabajo se plantea la validación de un método de separación y cuantificación de ácido gálico en los frutos de *Cotoneaster Pannosus* por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia, con el objetivo de establecer las mejores condiciones de separación.

En el presente trabajo se plantearon diferentes metodologías de extracción con solventes de bajo impacto ambiental (etanol y agua), por medio de calentamiento, agitación y baño ultrasónico. Donde se resalta la extracción por ultrasonido (etanol: agua 40:60), debido a los resultados obtenidos por HPLC-UV-VIS. Lo anterior se logró gracias a la estandarización de las mejores condiciones cromatográficas, las cuales fueron: columna Phenomenex Gemini 5  $\mu\text{m}$  C18, 110  $\text{\AA}$ , (150 mm x 4,6 mm), temperatura de 30°C, flujo de 0,550 mL/ min en gradiente tipo escalonado o step, volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ , longitud de onda de 272 nm y una fase móvil compuesta por agua acidificada con ácido fórmico al 0,5% y acetonitrilo HPLC. A partir de la estandarización de las condiciones, se realizó la validación del método de separación determinando robustez, linealidad, precisión, reproducibilidad, exactitud, LDD y LDC.

Finalmente se obtuvo un método preciso, lineal, exacto, reproducible, con un límite de detección de 0,475 ppm y un límite de cuantificación de 1,44 ppm.

## Palabras Clave:

*Cotoneaster pannosus*, validación, cromatografía líquida, ácido gálico, Holly liso, HPLC.

## Abstract

*Cotoneaster pannosus* also known as Holly liso is a shrub from China that abounds in the regions of America, Australia and some areas of Europe. Due to its high growth and maturation rate, it is classified as a potentially invasive plant in different regions. The fruits of Holly liso have a great variety of bioactive compounds, among them gallic acid, which is attributed an antioxidant activity that allows it to act as a preventive agent for its hepatoprotective, neuroprotective, antifungal, and other properties.

An extract from the fruits of Holly liso is proposed as a source of gallic acid for future medicinal uses. Thus, the present work proposes the validation of a method for separation and quantification of gallic acid in *Cotoneaster pannosus* fruits by means of high performance liquid chromatography, with the objective of establishing the best separation conditions. In the present work, different extraction methodologies were proposed with low environmental impact solvents (ethanol and water), by means of heating, agitation and ultrasonic bath. The extraction by ultrasonic bath (ethanol: water 40:60) stands out, due to the results obtained by HPLC-UV-VIS. This was achieved through to the standardization of the best chromatographic conditions, which were: Phenomenex Gemini 5  $\mu\text{m}$  C18,110 Å column, (150 mm x 4.6 mm), temperature of 30°C, flow of 0.550 mL/min in step gradient, injection volume of 20  $\mu\text{L}$ , wavelength of 272 nm and a mobile phase composed of water acidified with 0.5% formic acid and HPLC acetonitrile. From the standardization of the conditions, validation of the separation method was performed by determining robustness, linearity, precision, reproducibility, accuracy, LOQ and LOD.

Finally, a precise, linear, accurate, reproducible method was obtained, with a detection limit of 0.475 ppm and a quantification limit of 1.44 ppm.

### Keywords:

*Cotoneaster pannosus*, validation, liquid chromatography, gallic acid, Holly liso, HPLC.

# 1. Introducción

El uso indiscriminado de antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y antibióticos ha generado una de las reacciones adversas a medicamentos (RAM) más frecuentes, como lo es la hepatotoxicidad. Uno de los retos en el área de la salud es prevenir este tipo de RAM debido a que su diagnóstico es difícil por la falta de marcadores fiables para su uso en la práctica clínica (Andrade et al., 2007). Asimismo, el tratamiento para este tipo de afecciones está basado en la retirada de los medicamentos o en el peor de los casos el trasplante hepático (Medscape, 2022). Dado al fácil acceso a este tipo de medicamentos y a la falta de educación en su uso adecuado, se debe buscar tratar las RAM asociadas a hepatotoxicidad. Es por ello, que en el presente estudio se plantea un extracto de ácido gálico (AG) como agente hepatoprotector, el cual proviene de un arbusto ubicado en la ciudad de Bogotá – Colombia.

Según literatura existen diferentes fuentes de ácido gálico, sin embargo, *Cotoneaster pannosus* es una alternativa de fácil acceso, debido a la facilidad de cultivo y su amplia proliferación. Además, teniendo en cuenta el bajo impacto ambiental que representa la recolecta de sus frutos debido a que no es una planta endémica de Colombia y su uso netamente ornamental, resulta en una opción viable para la extracción de dicha sustancia.

Para obtener el extracto de AG se plantearon diferentes metodologías basadas en el uso responsable de solventes y de algunas técnicas no convencionales, para posteriormente realizar la separación del analito de interés. Esta separación se lleva a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, la cual es ampliamente utilizada en el área de investigación y control de calidad de productos farmacéuticos (Ahuja y Dong, 2005). En este orden de ideas, se busca replicar y adecuar las distintas condiciones bajo un soporte estadístico que permita realizar la separación sin una varianza significativa en los resultados obtenidos (Torralvo, 2017). Es por ello, que se hace necesario realizar la estandarización y posterior validación del método analítico para la separación y cuantificación del AG.

El presente trabajo de investigación desarrolla un método analítico validado que permite la separación y cuantificación de AG por medio de HPLC – UV-VIS. Los resultados analíticos muestran que el método de separación es preciso, lineal, exacto, reproducible, con un límite de detección de 0,475 ppm y un límite de cuantificación de 1,44 ppm, por lo que puede ser utilizado en la separación de AG para sus futuras aplicaciones terapéuticas.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Validación

La validación de un método analítico varía según la fuente de información, sin embargo, todas las definiciones están enfocadas en demostrar y asegurar que los procedimientos analíticos son aptos conforme lo indicado. De modo que, según la USP 43-NF 38 (2020), define la validación como el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de funcionamiento del procedimiento cumplen los requisitos de las aplicaciones analíticas previstas. Por otro lado, según el informe 37 en su anexo 5, PAHO (2008) especifica que tiene como principal objetivo asegurar que el procedimiento analítico seleccionado dará resultados reproducibles y confiables que sean adecuados para el propósito previsto. Por consiguiente, se deben considerar las características típicas en la validación, entre ellas están la linealidad, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión, robustez, selectividad y la exactitud (USP 43-NF 38, 2020).

**2.1.1 Precisión:** Expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas. Puede considerarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (USP 43-NF 38, 2020).

**2.1.2 Exactitud:** Expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, y el valor encontrado obtenido al aplicar el procedimiento de análisis cierto número de veces (USP 43-NF 38, 2020).

**2.1.3 Linealidad:** Habilidad (dentro de un ámbito dado) del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra (USP 43-NF 38, 2020).

**2.1.4 Límite de cuantificación:** Cantidad más pequeña del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud aceptable (USP 43-NF 38, 2020).

**2.1.5 Límite de detección:** Cantidad más pequeña de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto (USP 43-NF 38, 2020).

**2.1.6 Robustez:** Medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y que provee una indicación de su fiabilidad en condiciones de uso normales (USP 43-NF 38, 2020).

## 2.2 Métodos de calibración analítica

Según Stauffer (2018) “En química analítica, la calibración se define como el proceso de evaluación y refinamiento de la exactitud y precisión de un método, y particularmente del equipo de medición asociado, empleado para la determinación cuantitativa de un analito buscado”. Es decir que la calibración de un método corresponde al proceso asociado con la cuantificación de un analito de interés por medio de una metodología específica. Las diferentes metodologías de calibración son:

**2.2.1 Adición estándar:** Este método de calibración es ampliamente utilizado en muestras complejas donde los componentes de la matriz interfieren en la señal de interés Stauffer, (2018). Consiste en adicionar cantidades conocidas de analito a una cantidad establecida de muestra problema generando una curva de calibración, por medio de la cual se realiza la extrapolación de los datos para obtener la concentración final del analito (Harris, 2020).

**2.2.2 Estándar interno:** Es una metodología de calibración utilizada para análisis en los que la cantidad de analito o la respuesta del método varían de un ensayo a otro. El estándar interno hace referencia a la adición de una cantidad conocida de un compuesto diferente al analito (con propiedades similares) a la muestra problema. La señal del analito se compara con la señal del patrón interno para determinar la concentración del compuesto de interés (Harris, 2020).

**2.2.3 Estándar externo:** Es el método de calibración más conocido debido a la facilidad de análisis. Consiste en la preparación de estándares de concentraciones crecientes para la construcción de una curva de calibración. Mediante regresión lineal se obtiene la ecuación de la recta, la cual posteriormente se utiliza para determinar la concentración del analito en una muestra problema (Stauffer, 2018).

## 2.3 Cromatografía

Según la IUPAC (2019), “es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida”. Por un lado, la fase móvil puede ser líquida o gaseosa, mientras que, la fase estacionaria puede ser líquida o sólida. Lo anterior contribuye a clasificar la cromatografía según la interacción entre el soluto y la fase estacionaria, entre los cuales se encuentra la cromatografía de adsorción (la superficie sólida de la fase estacionaria adsorbe el soluto), de partición (existencia de un equilibrio entre el soluto y la fase estacionaria (líquida) y la fase móvil (líquida o gaseosa)), de intercambio iónico (donde el soluto tiene una carga opuesta al de la fase estacionaria para que sea retenido), de exclusión molecular

(donde hay separación según el tamaño. Los solutos más grandes pasan más rápido) y de afinidad (en la que moléculas específicas están inmovilizadas en la fase estacionaria y tiene interacciones específicas con el soluto) (Harris, 2020). Debido al tipo de cromatografía usada en el presente trabajo, se resalta la cromatografía líquida de alta eficiencia, la cual usa el principio de adsorción, ya que posee una fase estacionaria sólida junto con una fase móvil líquida, donde allí el soluto se adsorbe en la superficie de las partículas de la fase estacionaria (Harris, 2020).

### *2.3.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia*

La cromatografía líquida de alta eficiencia es una técnica analítica que es utilizada para separar determinados compuestos en diferentes matrices (Mikeš, 1988). Esta técnica está fundamentada de acuerdo con la naturaleza y las propiedades fisicoquímicas del analito, ya que esta determinará el tipo de cromatografía líquida para el análisis (Mikeš, 1988). Del mismo modo, dicha técnica usa alta presión para dirigir la fase móvil (líquida) a través de columnas cerradas, las cuales contienen la fase estacionaria (generalmente sílice o sílice modificado) que da lugar a la separación de diferentes compuestos (Mikeš, 1988).

Entre estos tipos se encuentra la cromatografía líquida en fase reversa y en fase normal. La cromatografía en fase normal hace referencia a aquella técnica donde la fase estacionaria tiene mayor polaridad que la fase móvil, generalmente esta fase corresponde a sílice enlazado a residuos de compuestos orgánicos con grupos polares, donde la polaridad de estos grupos es la encargada de controlar la selectividad de la fase estacionaria y por lo tanto la retención de los analitos. Por otro lado, la cromatografía en fase reversa usa fases estacionarias de baja polaridad y fases móviles de mayor polaridad, esto con el fin de retener analitos de polaridad intermedia y/o baja (Gismera Et al., 2018). Ahora bien, entre los tipos de cromatografía líquida en fase reversa se encuentra la cromatografía regular o de partición simple, en donde la retención está dada por la hidrofobicidad del soluto e interacciones naturales del soluto, solventes y fase móvil. Por otro lado, está la cromatografía de supresión iónica o control de ionización, la cual consiste en el desplazamiento del equilibrio hacia especies no ionizadas mediante el cambio del pH. Por último, la cromatografía por apareamiento iónico consiste en el uso de contraiones que están dispuestos en la fase móvil, mediante el cual se puede formar una especie neutra con el analito ionizado (Quattrocchi et al., 1992).

### *2.4 Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (equipo HPLC)*

Un sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia consta de varios componentes, incluidas las bombas de suministro de disolvente, un inyector de muestra, una columna, un horno de columna, un detector, un reservorio para los desechos y un software para analizar datos

(evidenciados en la Figura 1) (Shimadzu, 2022). Además, se tiene en cuenta las tuberías de conexión, las cuales influyen en el rendimiento y la vida útil del sistema. A continuación, se especifica algunos de los elementos del sistema HPLC.

**2.4.1 Bomba:** Suministra la fase móvil a través del sistema, de forma controlada, exacta y precisa. La mayoría de las bombas usadas son de tipo pistón (Reuhs , 2017).

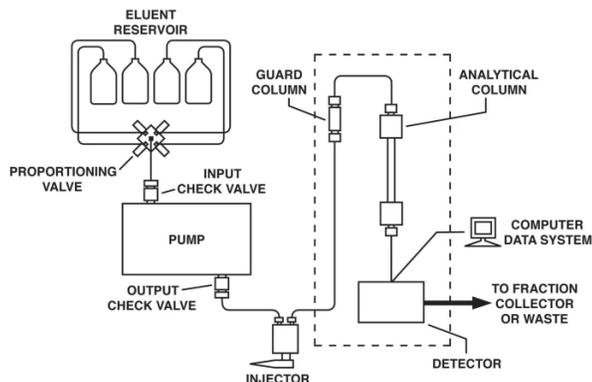
**2.4.2 Inyector:** Su función es colocar la muestra en la fase móvil que fluye para introducirla en la columna. El inyector de válvula es el más utilizado (Reuhs , 2017).

**2.4.3 Columna:** Su función es generar retención sobre el analito de interés mediante una fase estacionaria o material de relleno que también funciona como matriz de soporte (Reuhs , 2017).

**2.4.4 Detector:** Es aquel que traduce los cambios de concentración de la muestra en la columna de HPLC en señales eléctricas (Reuhs , 2017).

**2.4.5 Horno de columna:** Mantiene constante la temperatura de la columna (Reuhs , 2017).

**2.4.6 Software de análisis de datos:** Usualmente está en un computador, donde se muestran los cromatogramas y se integran las áreas de los picos (Reuhs , 2017).



**Figura 1.** Representación esquemática de un sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia (Reuhs , 2017).

## 2.5 *Cotoneaster pannosus* (Holly liso)

*Cotoneaster pannosus* es una popular planta ornamental que predomina en muchos lugares de Colombia, e incluso del mundo, la cual tiene gran facilidad de cultivo siendo una planta potencialmente invasora. En cuanto a su taxonomía, según InBuy (2011) “pertenece al reino Plantae, al filo Magnoliophyta, la clase Magnoliopsida, al orden de las Rosales y a la familia Rosaceae” (p.1). Dicha planta comúnmente se conoce como Holly liso, se describe como un arbusto con una altura entre los 3-4 m y puede presentar ramas elevadas o arqueadas. Sus hojas son simples, en forma de láminas elípticas, tienen un largo entre 2-3 cm, ápice mucronulado, color blanquecino en el revés y verde brillante por encima. Posee flores blancas y numerosos

frutos de forma globosa-elipsoide de 1 cm que poseen 2 semillas, las cuales son de color rojo. La planta florece en primavera y mantiene sus frutos hasta invierno (InBuy,2011; Starr et al., 2003). Entre otras características a resaltar de *Cotoneaster pannosus*, es que tiene buena resistencia a la sequía, pero poca tolerancia al exceso de humedad, su tiempo de maduración oscila entre 1-2 años, además, se ha reportado como planta invasora en Hawái, California, Australia y Bogotá, esto se debe principalmente a que la dispersión de la planta se da por parte de las aves, a través de procesos de endozoocoria y exozoocoria (Starr et al., 2003).

#### *2.5.1 Composición química de los frutos del Cotoneaster pannosus*

Los frutos de *Cotoneaster pannosus* están compuestos por diferentes metabolitos como lo son: compuestos fenólicos, tales como el ácido shikimico, ácido cinámico, quercitina, ácido gálico, naringina, ácido 5-O-cafeoilquínico, rutina, entre otros; del mismo modo, posee pigmentos hidrosolubles como las antocianinas, tales como: cianidina-3,5-rutinósido y pelargonidin-3-glucósido; igualmente posee micro y macronutrientes, entre los cuales se encuentra: proteínas, carbohidratos, fibra, grasas, ácidos grasos, ácido ascórbico y minerales como magnesio, sodio, potasio, calcio, cobre, zinc y hierro (Les et al., 2017).

### *2.5 Extracciones*

#### *2.5.1 Extracción por calentamiento*

La extracción con solventes asistida por calentamiento es una metodología de extracción tradicional, ampliamente utilizada para la separación de compuestos de matrices vegetales (Leblanc et al., 2011). Está fundamentada en la capacidad de liberar los compuestos de la matriz vegetal por medio de la descomposición de los constituyentes celulares, permitiendo de este modo la liberación de los metabolitos al medio (Zakaria, 2014).

#### *2.5.2 Extracción por agitación*

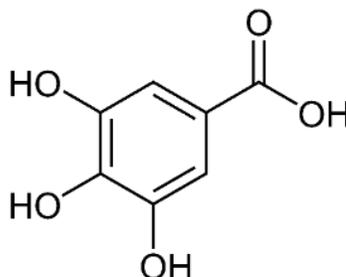
La extracción por agitación es una metodología de extracción tradicional, usada comúnmente para la extracción de metabolitos bioactivos ya que permite la destrucción de la pared celular por efecto de la agitación. Del mismo modo, permite la reducción del tamaño de partícula aumentando así el área superficial de la matriz que entra en contacto con el solvente, mejorando los procesos de disolución (Das y Eun, 2018).

#### *2.5.3 Extracción asistida por baño ultrasónico*

La extracción por ultrasonido es una metodología de extracción ecológica no convencional usada generalmente en la extracción de taninos en plantas. (Xuan et al., 2020) Este tipo de extracción está fundamentada bajo el fenómeno de cavitación, en el que las ondas ultrasónicas generan vibraciones que a su vez generan vacíos, estos vacíos transfieren energía a las partículas sólidas

presentes en el extracto. La energía suministrada a dichas partículas provoca el colapso de estos vacíos o burbujas, generando una ruptura de la pared celular de la matriz y permitiendo la transferencia de los compuestos deseados al medio. (Thilakarathna et al., 2022).

## 2.6 Ácido gálico



**Figura 2.** Estructura del ácido gálico. Generada en el software ChemDraw.

El ácido gálico o ácido 3,4,5 trihidroxibenzoico, evidenciado en la Figura 2, es considerado uno de los principales ácidos fenólicos, el cual pertenece al grupo de los taninos. Se encuentra como un sólido cristalino, con peso molecular de 170,119 g/mol y su fórmula molecular es  $C_7H_6O_5$ . Su punto de fusión es de 210 °C, su densidad de 1,69 kg/L, su pKa de 4,40 y el Log P de 0,70 (Fernandes y Salgado, 2016). Finalmente, es ligeramente soluble en agua con una solubilidad de 10 mg/mL (ILO y WHO, 2017).

El ácido gálico pertenece a los compuestos fenólicos, los cuales están formados por un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos, específicamente el ácido gálico pertenece a esa subclase denominada ácidos hidroxibenzoicos que tienen la forma C<sub>6</sub>-C. La biosíntesis de los ácidos fenólicos se produce a través de la ruta del ácido shikimico, donde el punto de partida son los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina y/o L-tirosina. (Al Jitan et al., 2018).

En la actualidad, se posee gran número de estudios acerca del ácido gálico que abordan diferentes actividades terapéuticas, convirtiendo así al ácido gálico en una sustancia promisoría en el ámbito farmacéutico. Una de las actividades principales es la capacidad hepatoprotectora, si bien no se ha descrito un mecanismo exacto por medio del cual se produzca el efecto hepatoprotector, se cree que está relacionado con la inducción de enzimas antioxidantes mediadas por el factor de transcripción Nrf2, el cual atenúa los mediadores de la inflamación COX-2 por medio de la vía de inhibición NF-κB (Latief et al., 2018). Se debe considerar que gran variedad de los medicamentos en el mercado causan hepatotoxicidad, siendo los antimicrobianos, cardiovasculares, reumatológicos, antineoplásicos y los fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central, los de mayor riesgo hepatotóxico (Hamilton, 2010). Del mismo

modo a los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y a los antibióticos se les atribuye efectos adversos hepatotóxicos tras su administración prolongada (Björnsson,2016).

Otra de las aplicaciones a destacar del ácido gálico es su capacidad antioxidante, ya que es capaz de retrasar o inhibir los procesos oxidativos, de este modo, inhibe o previene la carcinogénesis; no permite la oxidación de la dopamina (la cual genera especies reactivas de oxígeno) otorgando propiedades neuroprotectoras; altera la producción de peróxido de lípidos, los niveles de enzimas antioxidantes, la autooxidación de la glucosa, el metabolismo del glutatión, la formación de los productos finales de la glicación (AGE) para el control de la diabetes (Collins y Thompson, 2013; Uddin et al., 2020).

Según lo anteriormente mencionado, el ácido gálico tiene múltiples propiedades terapéuticas las cuales han sido ampliamente estudiadas, sin embargo, las extracciones para probar dichas actividades conllevan a significativas inversiones tanto económicas como de tiempo, debido a las condiciones requeridas por los cultivos. Para comprobar las condiciones de cultivo, se debe tener en cuenta que, en la naturaleza, el ácido gálico se encuentra principalmente en ciertos frutos rojos, rábano negro y cebollas. Otra fuente importante de ácido gálico son las hojas de té, las avellanas y en menor medida, también se presenta en semillas de lino, manzanas, lúpulo, nueces, vino y calabaza blanca (Daglia et al., 2014; Norwak et al., 2014; Baiano, 2013). Es el caso del cultivo de avellana, el cual no requiere una mayor inversión económica, sin embargo, se debe controlar el pH del suelo, ya que este tiene que estar entre 5,5 y 7,5. Por otro lado, el tiempo necesario para que madure la planta y obtener las avellanas ronda entre 3-5 años (Buckner, 2020). Otra de las fuentes más importantes es el té, no obstante, tienen una tasa de crecimiento lenta, se pueden demorar hasta 4 años en madurar (Norwak et al., 2014).

### 3. Planteamiento del problema

El *Cotoneaster pannosus* es un arbusto que crece en Colombia en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca y Nariño (Pereira,2020). En la actualidad se encuentra incluida en el catálogo de plantas invasoras de los humedales de Bogotá, en el cual se clasifica como una planta potencialmente invasiva (Díaz et al.,2020). Siendo su uso netamente ornamental, podría aprovecharse la propagación de la planta para fines investigativos.

Esta planta conocida comúnmente como Holly liso presenta múltiples componentes en su fruto, por lo que puede llegar a ser una fuente promisoría de metabolitos activos para el tratamiento de diferentes afecciones (Les et al., 2017). Asimismo, entre sus metabolitos se destaca el ácido gálico, al cual se le atribuye una actividad antioxidante que le permite actuar como agente preventivo por sus propiedades hepatoprotectoras, neuroprotectoras, antifúngicas, entre otras.

Del mismo modo, se debe tener en cuenta que uno de los grupos de medicamentos que conllevan a hepatotoxicidad son los AINES y los antibióticos. Debido al uso indiscriminado de estos grupos y a la difícil detección de esta RAM el AG se convierte en una posible sustancia para la prevención del daño hepático.

Por lo tanto, la problemática está enfocada en el desaprovechamiento de esta planta como fuente de abastecimiento de las diferentes sustancias sin alterar significativamente el medio ambiente, ya que no corresponde a una planta propia de la región. Debido a las grandes cantidades de frutos presentes alrededor de la ciudad de Bogotá, la tasa de crecimiento, la maduración de la planta, y su capacidad proliferativa, se puede hacer uso de los frutos del *Cotoneaster pannosus* con fines terapéuticos. Por otro lado, las principales fuentes de ácido gálico pueden tener procesos difíciles de extracción y altos costos por la adquisición del material vegetal (Norwak et al., 2014), (Buckner,2020).

Finalmente, teniendo en cuenta el potencial de la planta, no se encuentra un número significativo de estudios donde separen los diferentes metabolitos, de modo que, por medio de la estandarización y validación del método de separación, se pretende demostrar y asegurar que el procedimiento para la separación del AG en los frutos de Holly liso es apto para futuras investigaciones en el ámbito farmacéutico.

## 4. Pregunta de investigación

El *Cotoneaster pannosus* es una planta con gran cantidad de compuestos promisorios en el área farmacéutica, entre ellos destaca el ácido gálico. Teniendo en cuenta esto, se hace necesario contar con la información suficiente para avanzar en las investigaciones de los frutos del Holly liso para su aplicación terapéutica, esto se puede llevar a cabo por medio de los recursos presentes en la ciudad de Bogotá (material vegetal disponible). Una de las técnicas ideales para realizar este tipo de estudios es la cromatografía de alta eficiencia, debido a que permite separar el ácido gálico presente en los frutos estudiados, lo que lleva a plantear la siguiente pregunta: ¿Cuáles son las condiciones óptimas para la separación del ácido gálico en *Cotoneaster pannosus* por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia en extractos obtenidos por diferentes métodos?

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general del Anteproyecto

Validar un método de separación por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia, con las óptimas condiciones de separación para el ácido gálico en los frutos de *Cotoneaster pannosus*.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Realizar la extracción del ácido gálico en los frutos de *Cotoneaster pannosus* por medio de diferentes métodos de separación como, agitación asistida por calentamiento, agitación en presencia de ácido fórmico y extracción en baño ultrasónico.
2. Establecer las condiciones cromatográficas óptimas para la correcta separación del ácido gálico.
3. Separar y cuantificar la cantidad de ácido gálico presente en los frutos de *Cotoneaster pannosus*.
4. Desarrollar la validación del método de separación de ácido gálico por medio de los parámetros de: linealidad, exactitud, precisión, robustez, reproducibilidad, límite de cuantificación y límite de detección del método de separación para el ácido gálico.

## 6. Metodología

### 6.1 Recolección de los frutos

La recolección de los frutos se realizó en el mes de Junio del año 2022 en la ciudad de Bogotá Colombia. Específicamente en la localidad de Usaquén, en el parque Lisboa (Avenida carrera 9 #134A). Coordenadas: 4°42'53"N 74°01'58"W. Se realizó la recolección de 453,9664 g de frutos por medio de la metodología en cuadrante (se establece o se enmarca una determinada zona para realizar el muestreo. La zona no tiene dimensiones específicas y puede ser un cuadrado, un rectángulo o un círculo. Se determina que solo se puede muestrear en el área enmarcada. Normalmente, el cuadrante se enmarca según la topografía y las diferencias de especies que se evidencien) (Weaver, 1918; Baxter, s/f). Por lo que se delimitó un área específica en que estuviera el arbusto del Holly liso sin ninguna otra especie para realizar el muestreo. Para la recolección de los frutos se tuvo en cuenta las características de: las hojas del arbusto, elípticas hasta ser ovales, tienen un largo entre 2-3 cm, mucrón corto, color verde brillante en el haz y verde claro en el revés; las características de las flores, blancas, pequeñas y en racimos, con 5 pétalos redondeados; las ramas elevadas o arqueadas y finalmente frutos de 1 cm con color rojo brillante, los cuales poseen 2 semillas (InBuy,2011).

### 6.2 Extracciones

Se realizaron 3 extracciones por medio de diferentes metodologías, las que se denominaron: baño ultrasónico, agitación con adición de ácido fórmico y agitación asistida por calentamiento. La extracción con ácido fórmico se encontró en bibliografía como única referencia de extracción para compuestos fenólicos en *Cotoneaster pannosus*, realizada por Les et al. (2017). Por otro lado, se realizó la búsqueda de extracción de ácido gálico en diferentes matrices vegetales, siendo la extracción por calentamiento y la de ultrasonido las más usadas y con mejores rendimientos de extracción (Fernandes y Salgado, 2016; Thilakarathna et al., 2022). Para cada una de las extracciones se realizó un tratamiento previo (Figura 4A), el cual consistió en macerar los frutos de *Cotoneaster pannosus* con 20 mL de una solución etanol (75%): agua con las proporciones establecidas para cada metodología en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Masa de frutos y proporción de la solución (etanol (75%) – agua) para la maceración.

Extracción	Cantidad pesada de frutos (g)	Proporción de la solución (etanol (75%) - agua)
------------	----------------------------------	--

Agitación con adición de ácido fórmico	100,7072	7:3
Baño ultrasónico	100,5562	4:6
Agitación asistida por calentamiento	100,3740	4:6
Baño ultrasónico 2	453,9664	4:6

**Agitación con adición de ácido fórmico:** Se adicionaron 300 mL de solución etanol (75%): agua 7:3 a los frutos previamente macerados, posteriormente se adicionó 15 mL de ácido fórmico a la mezcla y se colocó bajo agitación magnética durante 60 min a temperatura ambiente.

**Baño ultrasónico:** Se adicionaron 200 mL de solución etanol (75%): agua 4:6 a los frutos previamente macerados, posteriormente se llevó a baño ultrasónico durante 50 min a una temperatura de 50 °C. Se dejó en reposo durante 24 h protegido de la luz y de la temperatura (Figura 3).

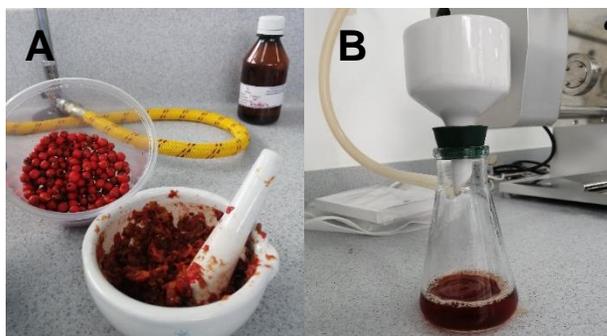


**Figura 3.** Evidencia de la extracción de AG en frutos de Holly liso asistida por baño ultrasónico.

**Agitación asistida por calentamiento:** Se adicionaron 200 mL de solución etanol: agua 4:6 a los frutos previamente macerados, posteriormente se colocó bajo calentamiento y agitación magnética a una temperatura de 60°C durante 30 min.

Según los resultados obtenidos, se procedió a realizar una segunda extracción por ultrasonido. La metodología fue la misma que la primera extracción, sin embargo, la masa inicial fue de 453,9664 g. Lo anterior se evidencia en la Tabla 1.

Finalmente, cada una de las extracciones se filtraron al vacío (Figura 4B) y se almacenaron durante todo trabajo metodológico (2 meses) en refrigeración (2 °C).



**Figura 4.** Evidencia tratamiento previo y final para las diferentes extracciones de AG en frutos de Holly liso.

### 6.3 Reactivos

Estándar Ácido Gálico 97,5-102,5% titration (SIGMA-ALDRICH LOTE: SLCL2739; N° CAS: 149-91-7), etanol al 75%, Agua destilada, Agua tipo I, Ácido fórmico > 99% y Acetonitrilo grado HPLC.

### 6.4 Preparación de la solución stock

Se tomó el estándar de ácido gálico adquirido de la marca SIGMA-ALDRICH y se llevó a una concentración de 270 ppm, la cual se utilizó para el desarrollo de la metodología y la validación.

### 6.5 Materiales y equipos utilizados

Los materiales usados fueron: beacker de 50 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL y 600 mL; balón aforado de 20 mL, agitador magnético, termómetro, pipeteador, pipeta aforada de 1 mL, pipeta graduada de 5 mL, micropipetas de 10  $\mu$ L-100  $\mu$ L y 100  $\mu$ L - 1000  $\mu$ L; microespátula.

Se utilizó un cromatógrafo líquido SHIMADZU LC-2030 con un detector UV-VIS, con una columna Phenomenex Gemini 5  $\mu$ m C18,110 Å, (150 mm x 4,6 mm). Así mismo, se utilizó un espectrofotómetro Thermo Scientific (Genesys 10S UV-VIS) para la determinación de la longitud de onda máxima. Además de plancha de calentamiento, equipo de agua Polco (StakPure®), balanza analítica y baño ultrasónico (Branson Ultrasonics).

### 6.6 Condiciones cromatográficas

Como fase estacionaria se utilizó una columna Phenomenex Gemini 5  $\mu$ m C18,110 Å, (150 mm x 4,6 mm), las corridas se realizaron a una temperatura de 30°C, flujo de 0,550 mL/ min, volumen de inyección de 20  $\mu$ L, longitud de onda de 272 nm y una fase móvil compuesta por agua acidificada con ácido fórmico al 0,5% (A) y acetonitrilo grado HPLC (B) trabajando con un gradiente tipo escalonado o step del siguiente modo: 0 min, 2% B, 0-9 min, 2% B;9-10 min, 50% B; 10-13 min, 50% B; 13-14 min, 2%B; 14-20, 2% B.

### *6.7 Linealidad*

Para la determinación de la linealidad se realizó una curva de calibración por el método de adición estándar. Se prepararon 10 viales de capacidad 1,5 mL con 400 µL extracto y cantidad patrón de ácido gálico ascendente, obteniendo 10 puntos con concentración conocida de AG de: 5,66 ppm, 11,30 ppm, 17,00 ppm, 22,60 ppm, 28,30 ppm, 34,00 ppm, 39,60 ppm, 45,30 ppm, 51,00 ppm y 56,60 ppm. Finalmente, se realizó la corrida cromatográfica de la curva de calibración para obtener la ecuación de la recta mediante regresión lineal y a su vez el coeficiente de determinación.

### *6.8 Robustez*

Para la determinación de la robustez se realizó la corrida cromatográfica de un patrón de 270 ppm a condiciones diferentes de pH. En el primer ensayo se corrió por triplicado el patrón con una fase móvil de agua: acetonitrilo (H<sub>2</sub>O:ACN) con el gradiente de concentración estipulado. Del mismo modo, el segundo ensayo se corrió por triplicado con agua acidificada con ácido fórmico al 0,5%. Para la evaluación de este parámetro se compararon los promedios de los tiempos de retención y las áreas obtenidas en cada uno de los ensayos.

### *6.9 Exactitud*

Se realizó en términos de porcentaje de recuperación, por lo que se tomó una curva de calibración realizada con patrones de AG de 1 a 5 ppm y se realizó la cuantificación de una muestra concentrada a 5,66 ppm. Finalmente se calculó el porcentaje de recuperación entre el dato teórico y el obtenido mediante la regresión lineal.

### *6.10 Precisión*

Se tomo un patrón de 270 ppm, el cual se corrió 5 veces en el cromatógrafo líquido de alta eficiencia, obteniendo 5 tiempos y 5 áreas diferentes. Finalmente se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación.

### *6.11 Límite de detección y cuantificación*

Se realizo una curva de calibración con patrones de AG de 1 a 5 ppm. Posteriormente, mediante Microsoft Excel se realizó un análisis de datos de la regresión, donde se calcula el error típico o la desviación estándar de la curva de calibración de todo el conjunto de datos, y la pendiente de la curva de calibración.

## 7. Resultados y análisis de resultados

Los resultados obtenidos en el presente estudio corresponden a la metodología de extracción y separación del ácido gálico por medio de cromatografía líquida de alta eficiencia, además de la correspondiente validación del método de separación, con el objetivo de realizar un aporte a futuras investigaciones de un compuesto bioactivo.

### 7.1 Condiciones de separación

En la siguiente tabla se observan las condiciones de separación obtenidas para el AG en el cromatógrafo líquido de alta eficiencia.

**Tabla 2.** Condiciones de separación para el ácido gálico en los frutos de *Cotoneaster pannosus*.

Condición	Valor o característica
Columna cromatográfica	Phenomenex Gemini 5 $\mu\text{m}$ C18, 110 Å, (150 mm x 4,6 mm)
Composición de fase móvil	Agua acidificada con ácido fórmico al 0,5% y acetonitrilo grado HPLC.
Velocidad de flujo	0,550 mL/ min
Tipo de flujo	Gradiente tipo escalonado o step
Temperatura	30°C
Volumen de inyección	20 $\mu\text{L}$
Detector y Longitud de onda	Espectroscopio ultravioleta visible - 272 nm

**Tabla 3.** Propiedades fisicoquímicas del ácido gálico.

Solubilidad (ILO y WHO, 2017)	10 mg/mL (Ligeramente soluble en agua)
Coefficiente de reparto (Log P) (Quattrocchi et al., 1992)	0,70

Inicialmente se buscaba replicar las condiciones cromatográficas mencionadas por Les et al. (2017) en el estudio para *Cotoneaster pannosus*. No obstante, no se contaba con una columna de la misma longitud, por lo que los resultados se vieron afectados en términos de la separación. Igualmente, es pertinente tener en cuenta que el estudio hecho por Les et al. (2017) no se limitaba a la separación de ácido gálico. De modo que, se optimizaron las condiciones cromatográficas de forma secuencial y lógica basada en la literatura.

Inicialmente, para la selección de la longitud de onda, se le realizó un barrido espectrofotométrico al patrón de AG donde la longitud de onda de mayor absorción fue de 212 nm, sin embargo, al realizar las corridas con esta longitud se observó un incremento significativo del ruido en la línea base. Lo anterior se debe al rango de absorción en el espectro ultravioleta del ácido fórmico (presente en la fase móvil), el cual corresponde al intervalo entre 190 -240 nm, con un valor máximo de 205 nm (Lee et al., 2013; Sugarman, 1943). De modo que, se realizó un cambio basado en la literatura a una longitud de onda de 272 nm en la cual se estabiliza la línea base y permite la integración del pico de interés. Por otro lado, la elección del detector se basó en la universalidad del detector UV-Vis y la disponibilidad del mismo. Puesto que el otro detector disponible correspondía al de refracción, el cual no permite el análisis en gradiente, ya que el cambio de la composición de la fase móvil conlleva a la inestabilidad de la línea base (Quattrocchi et al., 1992).

Ahora bien, la elección de la columna cromatográfica se basó en la estructura química del AG, su solubilidad y su valor de Log P. Como se muestra en la Figura 2, la estructura química cuenta con varios grupos funcionales que le otorgan propiedades hidrofílicas, sin embargo, al analizar el Log P se evidencia un comportamiento más apolar (Tabla 3). Lo anterior se debe al grupo aromático que compone al AG. Del mismo modo, en bibliografía se reporta solubilidad de 10 mg/mL, por lo que se considera ligeramente soluble en agua y más soluble en algunos solventes orgánicos como alcohol, éter etílico y glicerol (ILO y WHO, 2017; Fernandes y Salgado, 2016). Por tanto, se realizó la elección de una fase estacionaria apolar. Asimismo, se revisó en bibliografía la columna más usada para la separación del ácido gálico mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, donde la columna C18 es la más utilizada para el analito de interés (Fernandes y Salgado, 2016).

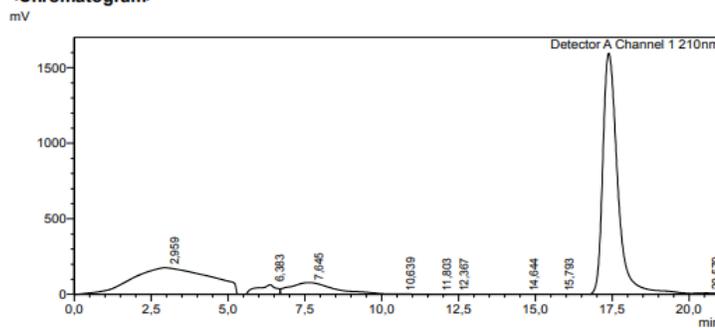
Por consiguiente, se definió la composición de la fase móvil, donde se tenía presente que el tipo de cromatografía en fase reversa a usar correspondía a la supresión iónica. Dicho tipo de cromatografía se debe a que el AG es un ácido débil. Los solutos que son ionizables dan picos con baja retención y fuerte asimetría, tal problema no se puede solucionar variando las proporciones de la fase móvil (Quattrocchi et al., 1992). Sin embargo, para la solución del problema, se debe tener en cuenta que, dependiendo de las condiciones, en una solución existirá la forma ionizada y la forma no ionizada de un compuesto con capacidad de ionizarse. La coexistencia de dichas especies va a depender del pKa de la molécula, de modo que, se puede cambiar el pH del medio para poder modificar la retención del analito (Quattrocchi et al., 1992). En caso del AG, se debe tener presente que su pKa es igual a 4,40, en donde dicho valor corresponderá al punto de equilibrio entre la especie ionizada y la no ionizada. De tal manera, se

debe manejar un valor menor a 4,40 para obtener una mayor cantidad de especie no ionizada y así mejorar la retención del analito (Fernandes y Salgado, 2016). En literatura se evidenciaba el uso de ácidos orgánicos como el ácido trifluoroacético y el ácido fosfórico, no obstante, el ácido fórmico fue el que más se utilizó en los diferentes estudios para desplazar el equilibrio hacia la especie no ionizada (Fernandes y Salgado, 2016). Según Les et al. (2017) la concentración de 0,1% de ácido fórmico en agua era suficiente para solucionar el problema de asimetría o tailing de los cromatogramas. Sin embargo, como se evidencia en la Figura 5, el ancho de base del pico es mayor a 2 minutos. Este ancho de base se debe a que el pH no está lo suficientemente ácido o está próximo al pKa del AG, de modo que, se ve afectado el parámetro de transferencia de masa. En otras palabras, las moléculas no ionizadas, se difunden más lento que las moléculas ionizadas, generando una falta de equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria. Esta falta de equilibrio genera que las moléculas ionizadas pasen por el detector en un tiempo menor que el de las molecular sin ionizar. De manera que, las moléculas con mayor retención harán que el ancho de base se extienda hasta que todas las moléculas retenidas salgan. En consecuencia, se aumenta el ácido fórmico a 0,5%, provocando una disminución en el ancho de base, una mejora en el parámetro de transferencia de masa y en la asimetría o tailing del pico. El cambio se realizó con base a la literatura (Fernandes y Salgado, 2016). La Figura 6 evidencia la mejora con el ácido fórmico al 0,5%.

<Sample Information>

Sample Name : Patrón 450 micro  
 Data Filename : Patrón 450 micro\_19.lcd  
 Method Filename : Metodo Acido Galico 30 DE JUNIO.lcm  
 Vial # : 1-18 Sample Type : Standard  
 Injection Volume : 20 uL Level : 9  
 Date Acquired : 08/07/2022 3:03:52 Acquired by : System Administrator  
 Date Processed : 08/07/2022 8:56:59 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



Peak#	Ret. Time	Area
1	2.947	57770557
2	6.383	14775862
3	7.641	43143956
4	10.650	11575044
5	11.804	4619854
6	12.362	15924561
7	14.575	4911107
8	14.673	9100755
9	17.390	86011197

Figura 5. Cromatograma del patrón de AG a 51 ppm con ácido fórmico al 0,1%.

<Sample Information>

Sample Name : Patrón AG 450 micro (7)  
Data Filename : Patrón AG 450 micro (7).lcd  
Method Filename : Metodo Acido Galico 30 DE JUNIO.lcm  
Vial # : 1-18 Sample Type : Unknown  
Injection Volume : 20 uL  
Date Acquired : 11/07/2022 10:32:16 Acquired by : System Administrator  
Date Processed : 11/07/2022 10:44:45 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>

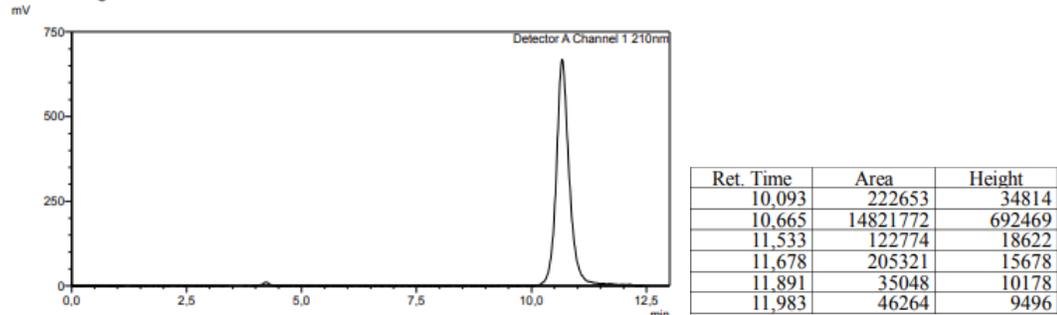


Figura 6. Cromatograma del patrón de AG a 51 ppm con ácido fórmico al 0,5%.

Ahora bien, teniendo en cuenta que el agua se considera el solvente universal y que se usó un aditivo como el ácido fórmico, se considera como uno de los componentes principales de la fase móvil. Además, en cromatografía en fase reversa se suele usar agua junto con algún solvente orgánico (Quattrocchi et al., 1992). Este solvente o modificador orgánico podría ser el metanol o el acetonitrilo. Sin embargo, el metanol (que es el modificador más usado en cromatografía en fase reversa) es un solvente de difícil acceso, esto debido al control que tiene. Asimismo, presenta una desventaja frente al acetonitrilo, ya que puede tener una mayor afinidad hacia el oxígeno. Teniendo en cuenta lo anterior, y que el acetonitrilo es el solvente de primera elección cuando no se trabaja con metanol, se decidió que el solvente orgánico a usar es el acetonitrilo.

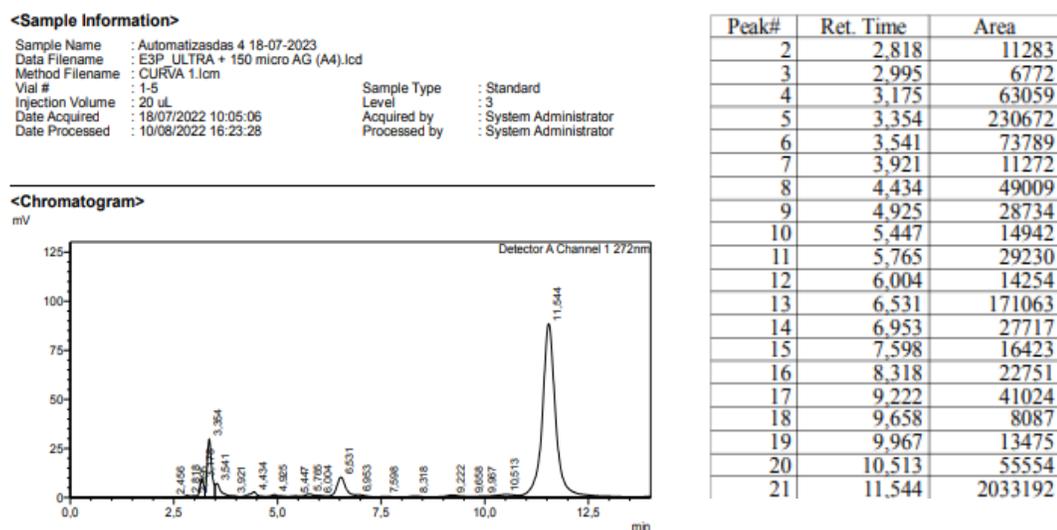
En otro orden de ideas, la temperatura establecida fue 30 °C, donde se buscaba asegurar la reproducibilidad del método. Se debe tener en cuenta que al realizar los ensayos a temperatura ambiente se aumentaba el tiempo de retención de todos los picos y por tanto del análisis.

Por otro lado, se utilizó un flujo en gradiente tipo escalonado o step a una velocidad de 0,550 mL/min (Bickler, 2019). Estas condiciones se determinaron a partir de los resultados obtenidos mediante un flujo isocrático, donde al variar diferentes condiciones cromatográficas (flujo, proporción de fase móvil, temperatura y volumen de inyección), no se logró obtener una adecuada separación del analito. No obstante, se tomaron los tiempos de retención obtenidos mediante esta metodología para el diseño de la rampa en gradiente. El resultado del gradiente fue la separación del pico de ácido gálico respecto a los picos adyacentes. Simultáneamente, se evaluó la velocidad de flujo para disminuir el ancho de base y el tiempo de análisis, sin afectar la resolución. Asimismo, la disminución del ancho de base se debe a los mecanismos de

ensanchamiento de banda. Se considera que cada mecanismo individual contribuye al ensanchamiento, en este caso el mecanismo de difusión longitudinal, ya que entre mayor sea el flujo lineal, menos tiempo pasa en la columna y no tiene suficiente tiempo para difundirse y ensanchar la banda (Ahuja y Dong, 2005).

Una vez establecido el tipo y la velocidad de flujo, se reevaluó el volumen de inyección establecido en el documento guía (10 µL), cambiándolo a 20 µL. Lo anterior se planteó a causa de la baja intensidad de los picos, entre ellos el pico de interés. Otra estrategia que se realizó fue rotaevaporar el extracto, esto con el objetivo de aumentar la intensidad de los picos, sin embargo, en los análisis de los extractos rota evaporados se observó que los diferentes compuestos del Holly liso se concentraron, disminuyendo así la visibilidad del pico de interés, asimismo, generó un solapamiento de los picos interfiriendo en la identificación del AG. De manera que, se utilizaron los extractos sin rotaevaporar AG para la posterior estandarización y validación del método de separación.

Teniendo en cuenta todo lo anterior las condiciones finales de separación se pueden observar en la Tabla 2, además, la Figura 7 muestra un cromatograma con las condiciones finales (cromatograma del extracto más estándar de AG).



**Figura 7.** Cromatograma obtenido de la inyección de extracto más 150 µL de Estándar de AG con las condiciones finales de separación.

## 7.2 Extracciones

Se realizaron las 3 extracciones descritas en el apartado de metodología. De estas se obtuvo que la extracción por medio de ultrasonido fue la única con una cantidad cuantificable de ácido gálico.

**<Sample Information>**

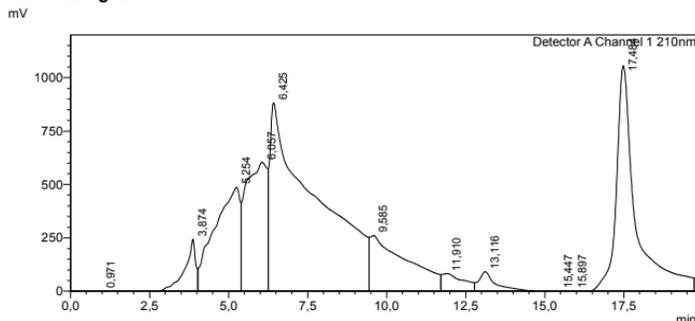
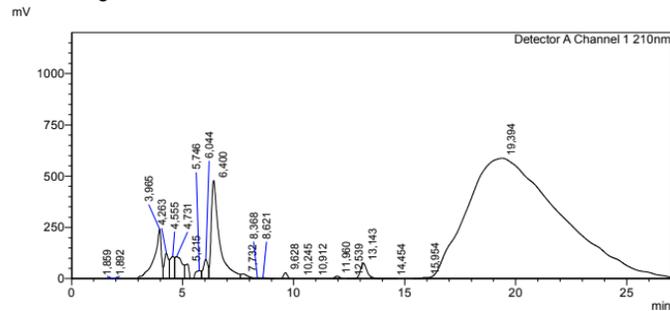
Sample Name : E2\_P\_(ULTRA+PATRÓN AG 590I) (1)  
 Data Filename : E2\_P\_(ULTRA+PATRÓN AG 590I) (1)\_5.lcd  
 Method Filename : Método Acido Galico 30 DE JUNIO.lcm  
 Vial # : 1-5  
 Injection Volume : 10 uL  
 Date Acquired : 30/06/2022 15:15:42  
 Date Processed : 30/06/2022 15:45:43

Sample Type : Standard  
 Level : 5  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

**A****<Sample Information>**

Sample Name : E2\_P\_(ULTRA)(1)  
 Data Filename : E2\_P\_(ULTRA)(1)\_2.lcd  
 Method Filename : Método Acido Galico 30 DE JUNIO.lcm  
 Vial # : 1-2  
 Injection Volume : 10 uL  
 Date Acquired : 30/06/2022 13:44:39  
 Date Processed : 30/06/2022 14:14:40

Sample Type : Standard  
 Level : 2  
 Acquired by : System Administrator  
 Processed by : System Administrator

**B****<Chromatogram>****<Chromatogram>**

**Figura 8.** Determinación de la mejor metodología de extracción. Cromatograma A: extracto más patrón de ácido gálico. Cromatograma B: extracto con solapamiento de los picos. Condiciones: ACN : Agua (98:2), flujo isocrático, flujo de 0,400 mL/ min y volumen de inyección de 10 µL.

Para determinar cuál fue la extracción más eficiente, se realizaron diferentes corridas cromatográficas. En esta se compararon las áreas obtenidas del compuesto de interés del crudo de extracción con el crudo más la adición de una cantidad conocida del patrón de AG.

La extracción por baño ultrasónico fue la más eficiente a comparación de las otras dos metodologías, ya que se obtuvo un pico de área cuantificable. Inicialmente se llevó a cabo una extracción por baño ultrasónico con una cantidad aproximada de 100 g tal como se muestra en la Tabla 1. De esta extracción se obtuvo un solapamiento de picos (Figura 8-B) en el tiempo de retención del patrón de AG. Por consiguiente, fue necesaria la adición de una cantidad conocida de estándar de 270 ppm para confirmar la presencia del analito de interés (AG), donde se obtuvo el cromatograma presentado en la Figura 8-A. Es pertinente mencionar que las condiciones utilizadas para esta determinación netamente cualitativa fueron diferentes a las finales. Ahora bien, para realizar el análisis cuantitativo se llevó a cabo la optimización de las condiciones de separación (Tabla 2), para así poder comparar las áreas de la muestra con adición de patrón (Figura 7) y la muestra sola en el mismo tiempo de retención, esta comparación se realizó a partir de la diferencia entre estas áreas, donde la resta correspondió a un valor positivo, confirmando la presencia de AG en los frutos de Holly liso. Una vez confirmada la presencia de AG en la matriz vegetal se llevó a cabo la misma extracción con una cantidad de 456,96 g de frutos para obtener un área mayor.

Tanto la extracción por calentamiento como la de ultrasonido hacen uso de los choques efectivos de las moléculas para transferir los compuestos de la matriz vegetal al solvente. No obstante, la extracción por ultrasonido, gracias a las frecuencias ultrasónicas, está basada en el fenómeno de cavitación u oscilación, el cual consiste en procesos físicos que permiten la creación de microburbujas de gases disueltos en el líquido, las cuales a su vez crecen y transfieren energía cerca de la matriz sólida y colapsan, esto genera la ruptura de la pared celular y la transferencia de los compuestos de interés al medio (solvente) (Thilakarathna et al., 2022). No obstante, las frecuencias utilizadas para este tipo de extracciones oscilan entre los 20 – 100 kHz, mientras que el equipo disponible para llevar a cabo el procedimiento cuenta con una frecuencia de 60 Hz. La baja frecuencia disponible, pudo generar la baja recuperación del AG en la matriz utilizada. Del mismo modo, se debe tener en cuenta que a nivel celular los compuestos fenólicos se encuentran en las vacuolas, las cuales están separadas por enzimas oxidativas, las que son susceptibles a desnaturalización por temperatura favoreciendo también la liberación de los constituyentes (Leblanc et al., 2011). Asimismo, se debe tener en cuenta que la extracción por ultrasonido es un método no convencional ecológico, el cual está en auge en la actualidad debido a su eficiencia, bajo impacto ambiental y facilidad de uso (Thilakarathna et al., 2022). Por consiguiente, fue una metodología óptima para el presente trabajo. Si bien la extracción por calentamiento sigue un principio similar al de ultrasonido, al realizar la corrida cromatográfica del extracto no se evidenció área correspondiente al AG, razón por la cual se descartó esta metodología de extracción. Del mismo modo sucedió con la extracción de ácido fórmico, esta corresponde a la encontrada en bibliografía para compuestos fenólicos en *Cotoneaster pannosus*, sin embargo, esta extracción tampoco tuvo una cantidad de AG cuantificable, ya que al realizar la corrida cromatográfica no se observó un valor de área en el tiempo de retención esperado.

Lo anterior puede estar relacionado con que hay diferentes condiciones de cultivo y no se conoce el estado de madurez de los frutos del estudio previamente mencionado. Para soportar lo anteriormente dicho, se debe tener en cuenta que las plantas pueden variar su cantidad de metabolitos secundarios según los factores bióticos y abióticos a los que está expuesta la planta. Según (Banothu y Uma , 2022), en un estudio del efecto del estrés biótico y abiótico en los niveles de polifenoles de las plantas, menciona que estas aumentan la concentración de los compuestos fenólicos como mecanismo de defensa. Lo anterior, se debe a que estos metabolitos secundarios tienen una alta actividad antioxidante que puede servir como mecanismo de defensa frente a condiciones como infección por patógenos, privación de agua, salinización, estrés por alta/baja temperatura, toxicidad por metales pesados, deficiencia de nutrientes, contaminación atmosférica e irradiación UV, entre otros. Asimismo, se menciona que los niveles pueden variar positiva o

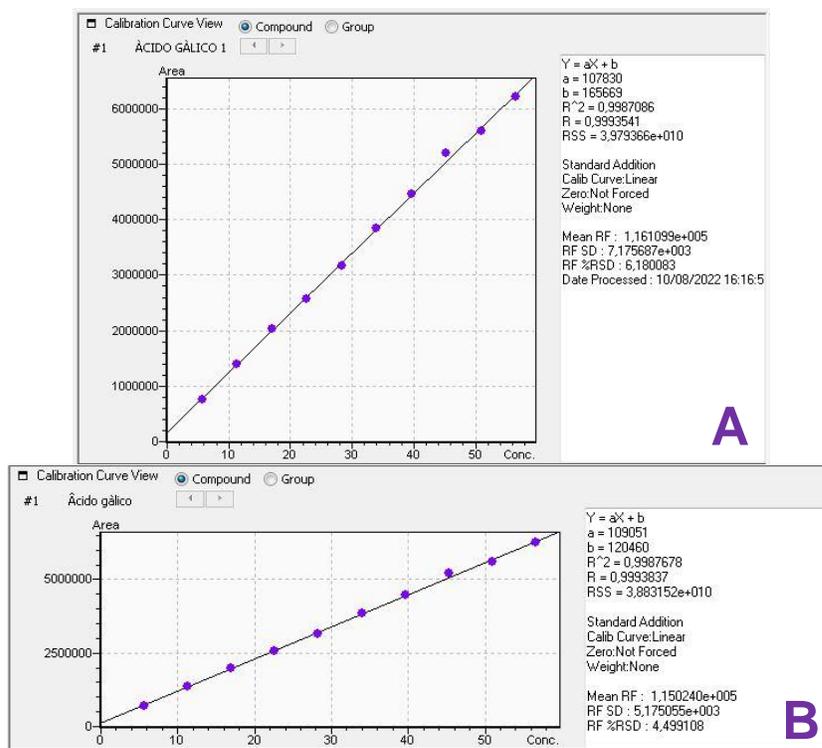
negativamente según el tipo de compuesto fenólico. Para este caso, el ácido gálico, corresponde a un ácido hidroxibenzoico, los cuales son inducidos en su biosíntesis frente a varios tipos de estrés (Yeshi et al., 2022 ; Akula y Ravishankar ,2011).

### 7.3 Validación

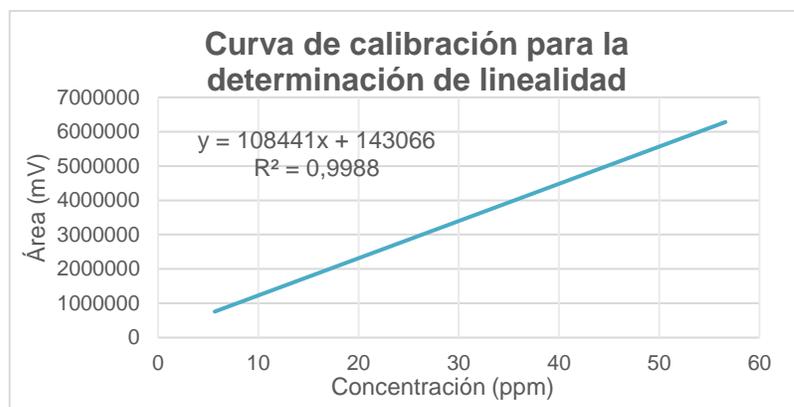
#### 7.3.1 Linealidad

**Tabla 4.** Resultados obtenidos del análisis de linealidad. Volumen de extracto y estándar adicionado en los viales, concentración de estándar en el vial y sus respectivas áreas determinadas a partir del promedio de las dos curvas de calibración obtenidas.

Volumen del extracto (µL)	Volumen del estándar (µL)	Concentración (mg/L)	Promedio de las áreas curva A y B (mV)
400	50	5,66	734125
400	100	11,30	1375557
400	150	17,00	2009973
400	200	22,60	2562727
400	250	28,30	3170279
400	300	34,30	3838170
400	350	39,60	4479323
400	400	45,30	5207725
400	450	51,00	5588643
400	500	56,60	6228181



**Figura 9.** Curva de calibración A obtenida en el programa LabSolutions. Curva de calibración B obtenida en el programa LabSolutions.



**Figura 10.** Curva de Calibración para la determinación de la linealidad. Obtenida mediante el promedio de la curva A y B.

Para los análisis por HPLC la linealidad es medida a partir de las concentraciones y las respuestas del equipo en términos de área o altura del pico. En el presente estudio la determinación de la linealidad se realizó por medio del análisis del promedio de las curvas de calibración obtenidas en la Figura 9 (A y B). Una vez obtenida la curva de calibración del promedio del duplicado del ensayo de linealidad, tal y como indica la (ICH Q2, 1996) se llevó a cabo un análisis visual del gráfico con el fin de determinar los puntos que presentaban una mayor desviación de la línea de

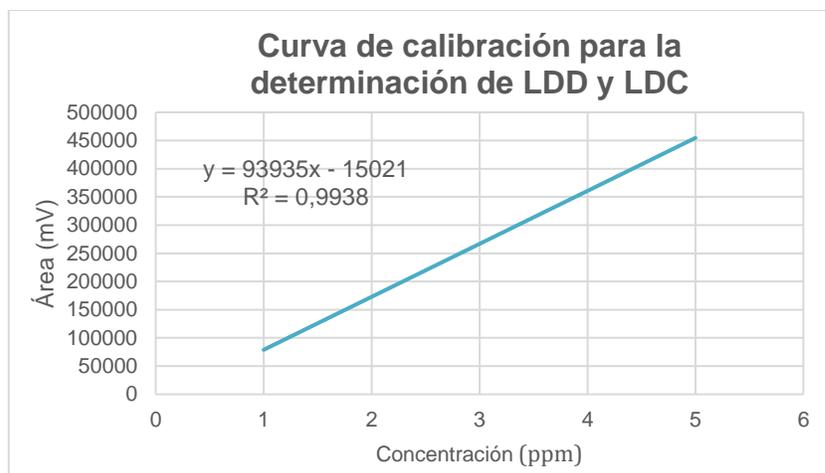
tendencia para hacer su respectivo descarte, sin embargo, no se evidenciaron puntos con desviación significativa, por tanto, se evaluó este parámetro con los 10 puntos (Tabla 4).

Ahora bien, para la determinación de la linealidad en una validación se debe tener en cuenta 3 factores: el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), la pendiente y el intercepto. La pendiente, también conocida como coeficiente de regresión, indica la sensibilidad del método, parámetro que está directamente relacionado con su linealidad, donde se obtuvo un valor de 108441 mV/ ppm. Del mismo modo, el intercepto está relacionado con la presencia de interferencias o errores sistemáticos, no obstante, estos errores se pueden analizar por métodos estadísticos tales como la prueba Q, sin embargo, en la inspección visual se observa linealidad del método por tanto no es necesario dicho análisis (Castillo y González, 1996). Finalmente, el coeficiente de determinación corresponde al cociente entre la variación explicada y la variación total, el cual tiene como objetivo explicar el ajuste del modelo a las variables evaluadas (Coefficient of determination, 2008). Según la guía de validación de métodos cromatográficos de la FDA (1994) para que un método se considere lineal su  $R^2$  debe ser mayor a 0,999, como se observa en la Figura 10 el  $R^2$  obtenido para el método fue de 0,9988, razón por la cual se considera un método lineal en el rango de 5,66 ppm a 56,60 ppm.

### 7.3.2 Límite de detección y límite de cuantificación (LDD-LDC)

**Tabla 5.** Datos de concentración y área para la curva de calibración de LDD y LDC.

Concentración (ppm)	Área (mV)
1	76935
2	171830
3	280995
4	343263
5	460891



**Figura 11.** Curva de calibración para la determinación del límite de cuantificación y el límite de detección.

**Tabla 6.** Estadísticas de la regresión lineal de la curva de calibración para la determinación de LDD y LDC. Los valores fueron calculados por el programa Microsoft Excel en la opción análisis de datos.

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,9969
Coeficiente de determinación ( $R^2$ )	0,9938
$R^2$ ajustado	0,9917
Error típico	13546,4561
Observaciones	5

Para la determinación del LDD y del LDC se tuvo en cuenta el enfoque basado en la desviación estándar ( $\sigma$ ) de la respuesta y la pendiente. En primer lugar, la estimación de la pendiente ( $m$ ) se puede realizar mediante la construcción de una curva de calibración (Figura 11) con los datos obtenidos en la Tabla 5. Por otro lado, la desviación estándar ( $\sigma$ ) se puede estimar mediante el análisis de un blanco, mediante la desviación estándar residual de la regresión lineal (Castillo y Gonzalez, 1996). El programa Microsoft Excel puede realizar un análisis de datos, específicamente una estadística de la regresión, donde Microsoft Excel calcula datos claves relacionados con la regresión lineal, entre ellos se destaca el error típico. En la Tabla 6 se puede evidenciar el error típico, el cual corresponde a la desviación estándar ( $\sigma$ ) sobre la curva de calibración o regresión lineal de todo el conjunto de datos. Con tal valor, y el valor de la pendiente (Figura 11), ya se puede realizar el cálculo de LDD y LDC de la siguiente manera.

$$LDD = \frac{3,3 * Error\ típico}{m}$$

$$LDD = \frac{3,3 * 13546,4561}{93935}$$

$$LDD = 0,475\ ppm$$

$$LDC = \frac{10 * Error\ típico}{m}$$

$$LDC = \frac{10 * 13546,4561}{93935}$$

$$LDC = 1,44\ ppm$$

Según indica los cálculos de LDD y LDC, se determina que el presente método no funciona con concentraciones menores a 1,44 ppm para cuantificar con precisión y exactitud aceptable. Además, no se detecta ninguna concentración menor a 0,47 ppm.

Para la determinación de LDD y LDC mediante detectores UV-VIS, se considera difícil asegurar la detección de compuestos a bajas concentraciones debido a pérdidas graduales del compuesto, pérdidas en la sensibilidad de la lámpara UV-VIS y aumento en el ruido por parte de este (FDA, 1994). Asimismo, una variación en la línea base, se puede dar por el uso de una columna que ya no sea apta, la variación de las proporciones de la fase móvil, las cuales afectarán la detección y cuantificación del analito (FDA, 1994) (Quattrocchi et al., 1992).

### 7.3.3 Precisión

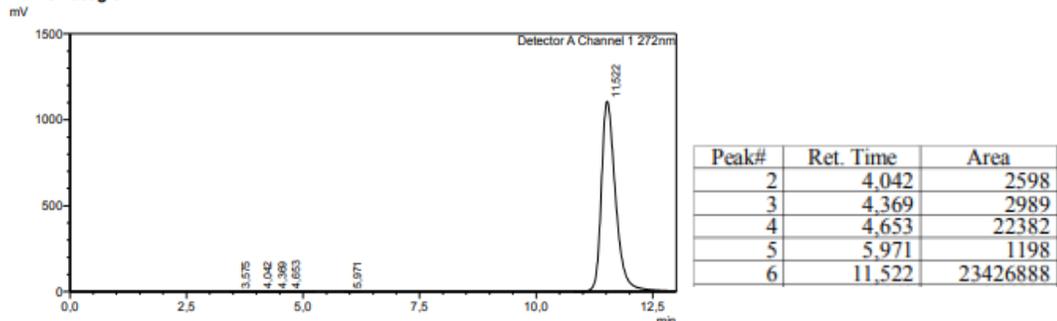
**Tabla 7.** Resultados de precisión. Tiempos de retención y áreas obtenidos en 5 diferentes ensayos.

Ensayo	Tiempo de retención (minutos)	Área (mV)
1	11,52	23426888
2	11,50	24532035
3	11,53	24899455
4	11,63	24934330
5	11,60	24888343
Promedio	11,55	24536210
$\sigma$	0,054	641298
CV %	0,47	2,61

<Sample Information>

Sample Name : PATRÓN AG 270 ppm (Precisión1.2)  
Data Filename : PATRÓN AG 270 ppm (Precisión1.2).lcl  
Method Filename : Metodo Acido Galico 30 DE JUNIO.lcm  
Vial # : 1-26  
Injection Volume : 20 uL  
Date Acquired : 15/07/2022 9:54:55  
Date Processed : 15/07/2022 10:19:56  
Sample Type : Unknown  
Acquired by : System Administrator  
Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



**Figura 12.** Cromatograma obtenido con la inyección de 150 µL de estándar de AG para evaluar el parámetro de precisión.

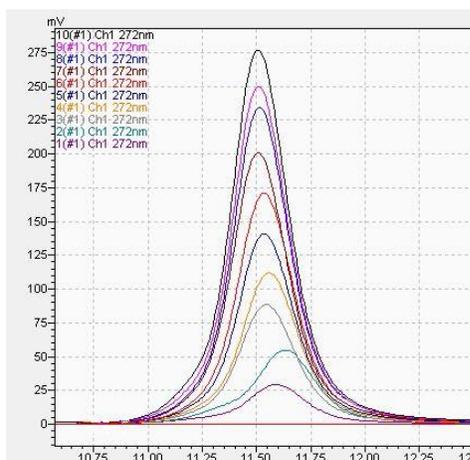
Para la evaluación de la precisión del método se evaluó la dispersión de los datos obtenidos al realizar 5 réplicas del mismo analito (Figura 12), este parámetro se expresó estadísticamente a través de la desviación estándar ( $\sigma$ ) y el coeficiente de variación. Si bien la desviación estándar es ampliamente utilizada para este tipo de análisis, estos valores generalmente aumentan o disminuyen conforme la medida aumenta o disminuye (Reed, 2002). por lo que es pertinente evaluar el valor del coeficiente de variación (CV), el cual elimina esta variación al dividir el valor de la desviación entre la media. El valor de aceptación para este parámetro según la guía de validación de métodos cromatográficos de la FDA (1994) debe ser menor a 1. No obstante, se puede observar en la Tabla 7 que si bien, los valores del tiempo de retención tienen un coeficiente de variación que garantiza la precisión del método, los valores del área tienen un coeficiente de 2,61 lo cual puede estar dado por las diferencias entre cada una de las mediciones, influenciadas por la sensibilidad del equipo, especialmente en el ensayo 1 en el que se observa una diferencia de aproximadamente 1'000.000 de mV respecto a los otros ensayos. Por consiguiente, se puede decir que el método es preciso en términos del tiempo de retención.

7.3.2.1 Reproducibilidad

**Tabla 8.** Resultados reproducibilidad según experimentador

n	Curva A	Curva B
	Tiempos de retención (Experimentador 1) (min)	Tiempos de retención (Experimentador 2) (min)
1	11,59	11,60
2	11,63	11,58

3	11,55	11,52
4	11,57	11,57
5	11,55	11,52
6	11,55	11,52
7	11,50	11,62
8	11,52	11,53
9	11,51	11,53
10	11,50	11,61
$\bar{x}$	11,54	11,56
$\sigma$	0,042	0,040
CV (%)	0,36	0,35



**Figura 13.** Áreas y tiempos de retención solapados de la curva de calibración A.

Según la ICH Q2 (1996), la reproducibilidad corresponde a uno de los niveles de la precisión. Por medio de este parámetro se evaluaron las variaciones en la respuesta del método como consecuencia al cambio de experimentador. Durante la evaluación de la repetibilidad cada uno de los experimentadores realizó 10 corridas correspondientes a una curva de calibración, de ello se comparó estadísticamente la variabilidad de la respuesta del método por medio del coeficiente de variación, de allí se obtuvo resultados menores a la unidad (Tabla 8), con una diferencia de 0,012 entre cada uno de los ensayos. En la Figura 13 se evidencia las 10 corridas del

experimentador A. Así mismo, en la Tabla 8, se evidencia que el experimentador B posee datos que están alejados al promedio. Los datos son: 11,60 min – 11,61 min y 11,62 min. De modo que se realizó una prueba Q para el dato 11,60 min y saber si es necesario realizar el descarte de dichos datos. A continuación, se evidencia la prueba Q realizada.

$$Q_{Exp} = \frac{|\text{resultado dudoso} - \text{Resultado más próximo}|}{\text{Resultado más alto} - \text{Resultado más bajo}}$$

$$Q_{Exp} = \frac{|11,60 - 11,58|}{11,62 - 11,52} = 0,2$$

$$Q_{Crit} \text{ (de 10 datos al 95\% de confianza)} = 0,466$$

Se obtiene que  $Q_{exp} < Q_{Crit}$ , por lo que no se realiza ningún descarte en los datos. Teniendo en cuenta lo anterior, y que la diferencia entre el CV de cada ensayo es de 0,012, se puede interpretar que es un método reproducible.

#### 7.3.4 Exactitud (Porcentaje de recuperación)

**Tabla 9.** Datos y resultados de exactitud (porcentaje de recuperación).

Ecuación de la recta	$Y = 93935 X - 15021$
Valor de Y (mV)	529032
Valor teórico de la concentración (ppm)	5,66
Porcentaje de recuperación	102,33%

$$Y = 93935 X - 15021$$

$$Y = 529032 \text{ mV}$$

$$X = \frac{529032 + 15021}{93935}$$

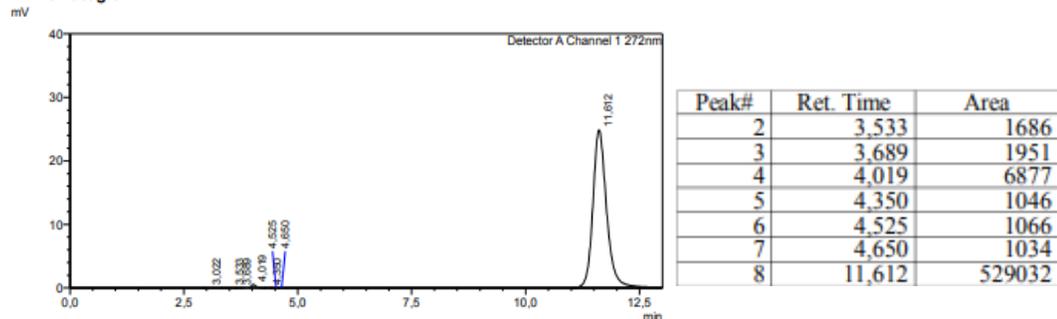
$$X = 5,79 \text{ ppm}$$

$$\frac{5,79}{5,66} * 100 = 102,33\%$$

<Sample Information>

Sample Name : PATRÓN AG 50 micro (A4)  
Data Filename : PATRÓN AG 50 micro (A4).lcd  
Method Filename : Metodo Acido Galico 30 DÉ JUNIO.lcm  
Vial # : 1-2 Sample Type : Unknown  
Injection Volume : 20 uL  
Date Acquired : 18/07/2022 8:12:54 Acquired by : System Administrator  
Date Processed : 18/07/2022 8:37:55 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>



**Figura 14.** Cromatograma obtenido con la inyección de 50 µL de estándar de AG para evaluar el parámetro de exactitud (porcentaje de recuperación).

En los métodos analíticos la exactitud es expresada a partir del porcentaje de recuperación, el cual hace referencia a la capacidad del método para determinar la cantidad de analito adicionada a una muestra. (Sabido, 2010). Teniendo en cuenta que se obtuvo un método lineal, el porcentaje de recuperación se evaluó a partir de la curva realizada para la determinación de los límites de cuantificación y detección (Figura 11), con el fin de realizar la cuantificación por medio de estándar externo. Se realizó la inyección de un patrón de 5,66 ppm (Figura 14) y por medio de la ecuación de la recta presentada en la Tabla 9, se realizó el despeje de la ecuación con el área obtenida del patrón para comparar el valor teórico con el experimental, obteniendo un porcentaje de recuperación del 102,33%. Este valor puede estar influenciado por la alta incertidumbre de las micropipetas utilizadas para el procedimiento o bien por contaminación o impurezas presentes en el vial, razones por las que pudo provocarse el aumento del valor estimado. No obstante, se obtuvo un valor de porcentaje de recuperación aceptado por la (A.O.A.C., 2005). Por tanto, se considera que este método es exacto.

### 7.3.5 Robustez

**Tabla 10.** Datos y resultados (desviación estándar y coeficiente de variación) de robustez variando el pH de la fase móvil.

n	Tiempo de retención ensayo agua acidificada (min)	Tiempo de retención ensayo agua normal (min)	Área ensayo agua acidificada (mV)	Área ensayo agua normal (mV)

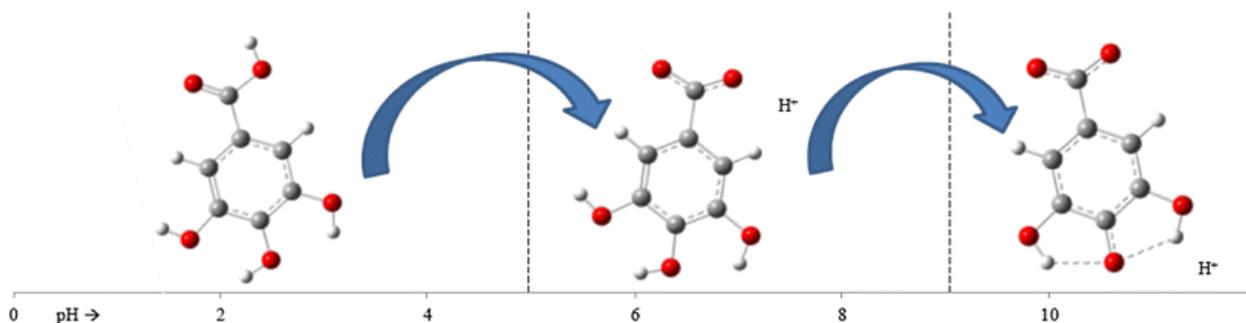
1	19,63	11,50	50729583	24532035
2	19,67	11,53	50206555	24899455
3	19,68	11,60	50200164	24888343
$\bar{x}$	19,66	11,54	50378767	24773277
$\sigma$	0,026	0,050	303832	208996
CV (%)	0,13	0,44	0,603	0,844

**Tabla 11.** Valores de tailing de los ensayos a comparar.

Tailing del pico en 11,53 (Figura 16)	1,048
Tailing del pico en 19,63 (Figura 17)	0,880

En la robustez se busca medir la capacidad de no afectar el método por variaciones en sus parámetros (FDA, 1994). Tales parámetros, se consideran que deben ser especificaciones idóneas para el sistema (FDA, 1994). En la determinación de la robustez, se determinó que el pH era una de las especificaciones idóneas para el sistema, donde se decidió realizar inyecciones con agua sin ácido fórmico para evaluar la robustez del método. En la Figura 16 se muestra el cromatograma bajo las condiciones establecidas, teniendo un tiempo de retención de 11,53 minutos y un área de 24899455 mV. No obstante, al realizar la inyección sin el ácido fórmico se evidenció un aumento en el tiempo de retención a 19 minutos. El anterior tiempo se puede evidenciar en la Tabla 10 por triplicado, además, en la Figura 17 se muestra un cromatograma relacionado con esta corrida cromatográfica. Los drásticos cambios en la separación eran de esperarse, ya que el pH ejerce una gran influencia en la retención del AG. Sin embargo, la forma en que cambiaron los resultados no eran los esperados, ya que, al no tener un pH ácido en la fase móvil, se tendrá al AG ionizado, el cual será más a fin a la fase estacionaria, generando una disminución en el tiempo de retención. Para la explicación de este resultado, Badhani y Kakkar (2017) estudian el comportamiento del AG a distintos rangos de pH, realizando un análisis según el pKa en donde se ve afectada la geometría de la molécula, las propiedades eléctricas y el estado de ionización. De allí, se concluye que el AG se puede presentar de 3 formas distintas según la variación del pH. En la Figura 15 se evidencia que el AG puede formar enlaces de hidrógeno intramolecularmente. Lo anterior se explica debido a una segunda ionización en el hidroxilo de la posición “para” respecto al ácido carboxílico, además de la redistribución de cargas negativas que se sitúan predominantemente en las moléculas de oxígeno, esto a su vez, provoca una disminución en la distancia entre los OH aumentando la posibilidad de la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares para su estabilización (Figura 15). De modo que, el AG no podrá

hacer los puentes de hidrógeno con la fase móvil, obteniendo un predominio en las interacciones con el grupo aromático y la fase apolar, aumentando el tiempo de retención.



**Figura 15.** Ionización del ácido gálico al aumentar el pH (Badhani y Kakkar, 2017).

Por otra parte, el programa LabSolutions ofrece los valores de tailing de los dos picos a comparar, donde este valor indica la simetría de cada uno de los picos (Quattrocchi et al., 1992). En la Tabla 11 se evidencia que el tailing bajo condiciones normales es de 1,048, por otro lado, el cromatograma que está sin un control del pH tiene un valor de tailing de 0,880. Lo anterior nos evidencia una afección en el pico con  $t_r = 19,63$  minutos, ya que, para considerar un pico simétrico, como el de la Figura 16, se recomiendan valores entre 1 y 1,05 (Peak tailing in HPLC, 2017). La Tabla 10, nos muestra los coeficientes de varianza de los tiempos de retención y las áreas de las dos condiciones evaluadas por triplicado. Cada uno de estos coeficientes son menores a 1, por lo que se puede decir que entre ensayos a las mismas condiciones no hay variaciones significativas en términos del área y del tiempo de retención.

Finalmente, se determina que el valor de pH es crítico para la separación del AG en cromatografía líquida de alta eficiencia. Además, para considerar un posible rango de pH, o un rango en que el método es robusto, se debe tener en cuenta el pKa del AG, el cual tiene un valor de 4,4. Según lo anterior, y teniendo en cuenta que se pretende dirigir el equilibrio hacia el compuesto no ionizado, se podría inferir que el rango de pH a utilizar ronda entre 1 y 4, ya que en el valor de pKa se tiene un 50 % de especie ionizada y otro 50% de la especie no ionizada.

<Sample Information>

Sample Name : PATRÓN AG 270 ppm (Precisión3  
Data Filename : PATRÓN AG 270 ppm (Precisión3\_28.lcd  
Method Filename : Metodo Acido Galico 30 DE JUNIO.lcm  
Vial # : 1-28 Sample Type : Unknown  
Injection Volume : 20 uL  
Date Acquired : 15/07/2022 2:36:58 Acquired by : System Administrator  
Date Processed : 15/07/2022 3:01:59 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>

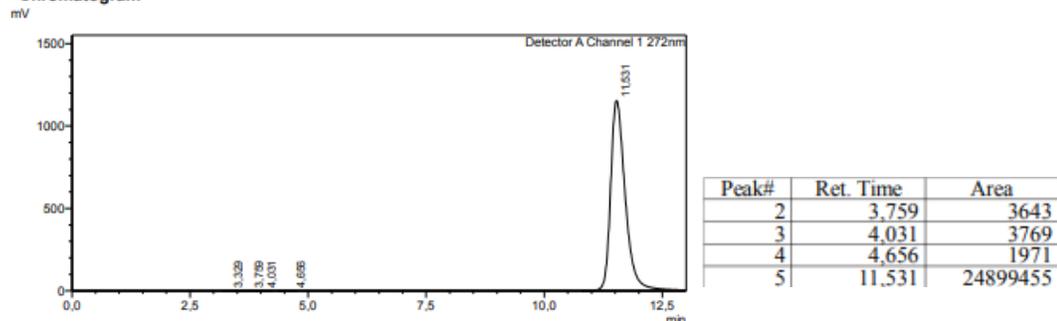


Figura 16. Cromatograma obtenido con agua acidificada (ácido fórmico 0,5%) para el estándar de 270 ppm de AG, para evaluar el parámetro de robustez.

<Sample Information>

Sample Name : Robustez pH Patrón AG 270 ppm 001  
Data Filename : Robustez pH Patrón AG 270 ppm 001\_1.lcd  
Method Filename : Metodo Acido Galico 30 DE JUNIO.lcm  
Vial # : 1-29 Sample Type : Unknown  
Injection Volume : 20 uL  
Date Acquired : 15/07/2022 11:14:06 Acquired by : System Administrator  
Date Processed : 15/07/2022 11:39:07 Processed by : System Administrator

<Chromatogram>

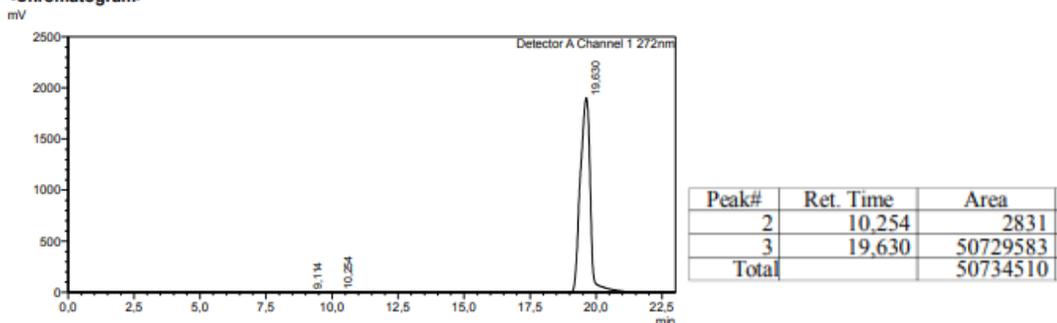


Figura 17. Cromatograma obtenido con agua sin acidificar para el estándar de 270 ppm de AG, para evaluar el parámetro de robustez.

#### 7.4 Cuantificación de ácido gálico en frutos de *Cotoneaster pannosus* por medio de adición estándar

Para realizar la cuantificación de AG en los frutos de *Cotoneaster pannosus*, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal obtenido a través del método de adición estándar de modo que, la adición de patrón a la muestra problema genera un incremento en la señal del analito de interés (AG) superando la señal causada por los interferentes y permitiendo la identificación del pico de interés (Stauffer, 2018).

Tomando como base la curva de calibración obtenida en el análisis de linealidad del método, se toma la ecuación de la recta obtenida en la Figura 9-A y se extrapola al valor de concentración obtenido en los frutos de Holly liso. Bajo el principio de la linealidad del método es posible la igualación de la variable Y a cero, debido que en adición estándar el cálculo de la concentración (variable independiente X) de la muestra problema se realiza asumiendo que no existe un área correspondiente a la adición del patrón, por tanto, la concentración determinada por medio de la ecuación de la recta corresponderá únicamente a la concentración de analito en la matriz. En otras palabras, la concentración del analito en la muestra problema corresponde al intercepto en el eje X cuando Y tiene un valor igual a cero. Lo anterior permite realizar la cuantificación de la siguiente forma:

$$Y = 107830 X + 165669$$

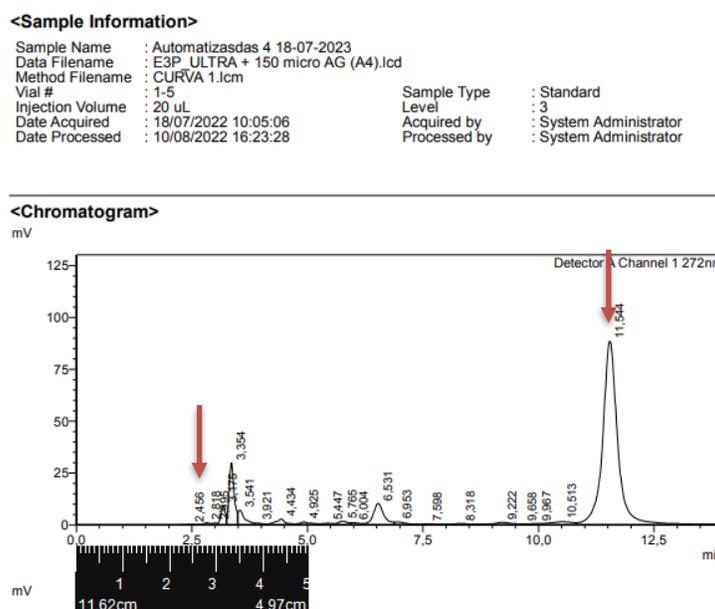
$$X = \frac{165669}{107830}$$

$$X = 1,536 \text{ ppm}$$

Teniendo en cuenta lo anterior, se obtuvo una concentración de 1,536 ppm de AG en 453,9664 g de frutos de *Cotoneaster pannosus*. Según bibliografía, se ha reportado la separación y cuantificación de AG en diferentes especies vegetales, donde se destacan aquellas obtenidas mediante HPLC, reportando concentraciones de 14,64 ppm para el té verde, 0,5 ppm y 127 ppm para las avellanas y 2,72 ppm para la calabaza blanca (Binti Ismail & Abdullah, 2015; Jakopic et al., 2011; Collins y Thompson, 2013; Zakaria, 2014). Se debe tener en cuenta que la concentración de AG depende en gran medida del método de extracción, por lo que se pudo tener bajos rendimientos debido a este. Como se mencionó en el apartado de marco teórico, una de las grandes fuentes de ácido gálico en la naturaleza son las hojas de té, sin embargo, se debe considerar que estas son cultivadas en climas tropicales cálidos y que se pueden demorar hasta 4 años en madurar (Norwak et al., 2014). Por otro lado, a pesar de que el cultivo de avellana no requiere una mayor inversión económica, se debe controlar el pH del suelo, ya que este tiene que estar entre 5,5 y 7,5. Además, el tiempo necesario para que madure la planta para obtener las avellanas ronda entre 3-5 años (Buckner, 2020). Teniendo en cuenta lo anterior, y las características del Holly liso, como lo son, la fácil proliferación, su alta tasa de crecimiento, el fácil acceso y el bajo impacto ambiental que representa la recolecta de sus frutos, se considera que los frutos de Holly liso son una fuente natural promisoría de AG.

## 7.5 Parámetros cromatográficos

Los parámetros cromatográficos permiten saber la calidad de la separación del analito, donde entre mayor sea la diferencia entre los tiempos de elución, se hablará de una mejor separación (Ahuja y Dong, 2005). Por otro lado, entre más amplios sean los picos, peor será su separación. De modo que, se considera que la retención, la selectividad y la eficacia nos describen la calidad de la separación (Harris, 2020). Sin embargo, para la determinación de dichos parámetros, se deben considerar algunos datos que se infieren de la Figura 18. De dicha figura se describe el tiempo muerto ( $t_m$ ) = 2,456 min, el tiempo de retención del AG = 11,544 min y el tiempo de retención del compuesto más cercano al AG = 10,513 min.



**Figura 18.** Cromatograma del extracto más patrón de AG a 17 ppm para la determinación de los parámetros cromatográficos.

**Tabla 12.** Resultados de los parámetros cromatográficos.

Parámetro	Valor de LabSolutions	Valor calculado
Número de platos teóricos	7606	5955
Valor de tailing	1,050	---
Resolución	0,94	1,72
Factor de capacidad	3,70	3,70

### 7.5.1 Tiempo de retención y tiempo de retención corregido ( $t_r'$ )

Tiempo de retención corregido:

$$t_r' = t_r - t_m$$

$$t_r' = 11,54 \text{ min} - 2,45 \text{ min} = 9,08 \text{ min}$$

Donde:

$t'_r$  = Tiempo de retención corregido

$t_r$  = Tiempo de retención

$t_m$  = Tiempo muerto

El tiempo de retención de una sustancia hace referencia al tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra hasta la aparición de la señal máxima del compuesto de interés (Nagy y Vékey , 2008). Está determinado por las condiciones de fase móvil que proponga el método de separación, ya que la fuerza y polaridad de esta fase permite que los compuestos puedan eluir o mantenerse retenidos por la fase estacionaria (Ahuja y Dong, 2005).

Para entender el tiempo de retención obtenido se debe tener en cuenta la estructura del AG previamente analizada. Como se mencionó anteriormente los grupos hidroxilos otorgan a la molécula cierta afinidad hacia los solventes acuosos, no obstante, el Log P nos indica un comportamiento apolar, el cual fue necesario para separar el pico de interés de las otras sustancias presentes en la matriz. El uso de una matriz compleja requiere que cada uno de los compuestos presentes posean diferencial de migración a través de la columna para lograr la separación, por ello se incrementó la proporción de agua en el inicio del gradiente con el fin de eluir las otras moléculas (más afines al solvente de mayor polaridad) presentes en el extracto. Una vez separadas las otras moléculas, se generó una rampa de concentración aumentando la proporción de acetonitrilo, de modo que la fase móvil presentara mayor afinidad hacia el AG, permitiendo de esta forma ajustar el tiempo de retención del AG justo después de salida de los otros componentes.

### 7.5.2 Factor de capacidad ( $k'$ )

$$k' = \frac{t'_r}{t_m} = \frac{9,08 \text{ min}}{2,45 \text{ min}} = 3,70$$

Donde:

$t'_r$  = Tiempo de retención corregido

$t_m$  = Tiempo muerto

Según Ahuja y Dong (2005), "el factor de capacidad ( $k'$ ) mide el número de veces en que el analito es retenido en relación con un componente no retenido", por lo que, un valor muy alto de  $k'$ , significa una alta interacción con la fase estacionaria y el componente compromete altos tiempos de retención. Se debe tener en cuenta que quienes tienen valores muy altos de ( $k'$ ) poseen tiempos largos de ensayo y un posible ensanchamiento de los picos en la columna.

En cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa, hay una gran influencia de la fase móvil, de modo que, al aumentar la proporción del acetonitrilo, en un posible cambio de condiciones, se disminuye la afinidad del AG por la fase estacionaria, y a su vez la retención o el

factor de capacidad. Ahora bien, según (Ahuja y Dong, 2005)., para obtener una retención adecuada, la mayoría de los analitos en los ensayos eluyen con valores de ( $k'$ ) entre 1 y 20. Como se evidencia en la Tabla 12, el resultado corresponde a 3,70, siendo un valor acertado para determinar que el AG tiene una adecuada interacción con la fase estacionaria y la fase móvil para lograr su separación. El programa LabSolutions ofrece un valor de ( $k'$ ) calculado, tal valor también es 3,70.

### 7.5.3 Selectividad ( $\alpha$ )

$$\alpha = \frac{(t_r - t_m)_2}{(t_r - t_m)_1} = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}}$$

$$\alpha = \frac{(10,51 \text{ min} - 2,45 \text{ min})_2}{(11,54 \text{ min} - 2,45 \text{ min})_1} = 1,13$$

Se refiere a la medida de la retención diferencial entre dos analitos (Ahuja y Dong, 2005). En este caso, se refiere al analito que es el AG y a su pico más próximo. Se debe resaltar que, la selectividad depende en mayor medida de la fase estacionaria y en menor medida por la fase móvil. Además, la selectividad o retención relativa es independiente al caudal, por lo que, en caso de tener cambios en la velocidad del flujo, se podrá identificar los picos que se han visto afectados por el cambio de esta condición (Sankar, 2020). Finalmente, se considera que la selectividad debe ser  $>1$  para la correcta separación entre los picos, de modo que, como se evidencia en el cálculo de selectividad, el valor es adecuado para mencionar una correcta elección de la fase estacionaria, y por tanto una buena separación.

### 7.5.4 Resolución ( $R$ )

$$R = \frac{1}{4} * \sqrt{N} * \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} * \frac{k'}{(k' + 1)} \right)$$

$$R = \frac{1}{4} * \sqrt{5955} * \left( \frac{(1,13 - 1)}{1,13} * \frac{3,70}{(3,70 + 1)} \right) = 1,72$$

Donde:

N=Número de platos teóricos

$\alpha$  = Selectividad

$k'$ = Factor de capacidad

La resolución está definida como el grado de separación de dos picos que son adyacentes entre sí (Ahuja y Dong, 2005). Se considera de suma importancia determinar la resolución, ya que, según su valor, se podrá determinar si hay una separación y una cuantificación sólida de cada uno de los picos evaluados. Para este caso, se determinó la resolución entre el pico de AG, con tr de 11,54 minutos y el pico adyacente a este, con tr de 10,51 minutos. Según Ahuja y Dong

(2005) el valor de resolución objetivo es  $> 2$ , sin embargo, entre otras guías como (Agilent Technologies, s.f.), menciona que valores  $> 1,7$  son los deseables para los métodos robustos. Además, considera que el valor de 1 es el mínimo para que se produzca una separación medible y que permita una separación adecuada (Agilent Technologies, s.f.). De modo que, al observar la resolución calculada y dispuesta en la Tabla 12, se observa un valor de 1,72, el cual indica una buena separación entre los picos mencionados. No obstante, el programa LabSolutions ofrece el valor de resolución con respecto al AG y su compuesto más cercano, dicho valor corresponde a 0,945. Al comparar este valor con los aceptados, se concluye que la separación no fue eficiente, sin embargo, en la Figura 18, se evidencia que el pico adyacente al del AG, alcanza a bajar hasta la línea base antes de la detección del AG, por lo que se considera que el valor acertado de resolución es el evidenciado en el cálculo de la resolución.

#### 7.5.5 Número de platos teóricos ( $N$ ) y altura del plato ( $H$ )

Número de platos teóricos

$$0,35 \text{ cm} * \frac{5 \text{ min}}{4,97 \text{ cm}} = 0,3521 \text{ min}$$

$$N = 5,55 * \frac{t_r^2}{W_{0,5}^2} = 5,55 * \frac{(11,54 \text{ min})^2}{(0,3521 \text{ min})^2} = 5955 \text{ platos teóricos}$$

Donde:

$W_{0,5}$  = Ancho a media altura

Altura del plato

$$H = \frac{L}{N}$$

$$H = \frac{150000 \mu\text{m}}{5955} = 25,189 \mu\text{m}$$

Donde:

H= Altura del plato

L= Longitud de la columna

N= Número de platos teóricos

El número de platos teóricos es una medida de la eficiencia de la columna, la cual está relacionada con el tiempo de retención del analito y el ancho del pico (Ahuja y Dong, 2005). Este modelo de platos teóricos permite determinar la eficiencia de la separación por medio de la relación inversamente proporcional con el ancho del pico. En este caso se realizó la determinación de los platos teóricos por medio del ancho a media altura del pico de AG, donde se obtuvo un valor de 5955 platos teóricos, valor que permite determinar que el método es eficiente según los lineamientos de la FDA en su guía de validación para métodos

cromatográficos (1994) donde el valor de aceptación es  $> 2000$  platos teóricos. No obstante, el software LabSolutions presentó valores de 7606 platos teóricos tal y como se muestra en la Tabla 12, esta variación pudo verse influenciada por los mecanismos de ensanchamiento de banda tales como: camino múltiple o difusión turbulenta, transferencia de masa y difusión longitudinal. Donde el principal mecanismo presente en este parámetro corresponde al de camino múltiple, ya que este hace referencia a las diferentes trayectorias que puede tomar la sustancia para finalmente eluir, siendo unas distancias mayores que otras, afectando de este modo el ancho del pico y por lo tanto influenciando negativamente el número de platos teóricos (Harris, 2020). Del mismo modo, es importante resaltar que la difusión turbulenta está correlacionada con el tamaño de partícula del relleno de la columna, donde partículas más pequeñas dificultarán el paso por diferentes sitios generando un flujo laminar que se podrá observar en la reducción del ancho del pico de interés.

## 8. Conclusiones

En el presente trabajo de investigación se validó la metodología de separación de AG en *Cotoneaster pannosus*, por medio de la obtención de las mejores condiciones de separación.

Para el desarrollo de la validación, se eligió la mejor metodología de extracción para el AG mediante cromatografía líquida de alta eficiencia, la cual corresponde a la asistida por baño ultrasónico. Dicha metodología se considera importante por su bajo impacto ambiental, facilidad de uso y su innovación al pertenecer a una técnica no convencional.

Por otro lado, la determinación de las óptimas condiciones de separación se llevó a cabo a partir de un análisis secuencial, experimental y lógico. El análisis se evidenció mediante los cromatogramas obtenidos con las siguientes condiciones de separación: columna Phenomenex Gemini 5  $\mu\text{m}$  C18, 110 Å, (150 mm x 4,6 mm), temperatura de 30°C, flujo de 0,550 mL/ min en gradiente, volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ , longitud de onda de 272 nm y una fase móvil compuesta por agua acidificada con ácido fórmico al 0,5% y acetonitrilo HPLC. Gracias a dichas condiciones de separación se obtuvo 1,536 ppm de AG en 453,9664 g de frutos de *Cotoneaster pannosus* mediante adición estándar, lo cual corresponde a una cantidad promisorio teniendo en cuenta sus características.

Finalmente, la validación de la metodología de separación obtuvo resultados lineales en el rango de 5,66 ppm a 56,60 ppm ( $R^2=0,9988$ ), reproducibles (CV1=0,363 % y CV2= 0,351%), exactos (% de recuperación = 102,33%) y con LDD y LDC de 0,475 ppm 1,44 ppm respectivamente. Asimismo, se considera que el método no es robusto en términos de pH, debido a la alta influencia que tiene el mismo en la retención del analito.

## 9. Recomendaciones

Para futuras investigaciones se debe tener en cuenta diferentes aspectos para mejorar los resultados obtenidos. En primera instancia, se puede considerar una columna de mayor longitud, debido a la complejidad de la matriz analizada, lo cual mejoraría algunos parámetros cromatográficos como la resolución. Asimismo, se recomienda el uso de un baño ultrasónico de mayores frecuencias ultrasónicas para mejorar el rendimiento de la extracción. Por otro lado, se debe tener en cuenta las condiciones de cultivo del arbusto, analizando el entorno para saber la influencia que tiene sobre la producción de AG.

En otro orden de ideas, se recomienda evaluar la robustez, modificando otro tipo de parámetros, tales como temperatura y proporción de fase móvil. Finalmente, se debe controlar estrictamente el pH, debido a la gran influencia que tiene en el rendimiento de la separación.

## 11. Referencias bibliográficas

- Ahuja, S., & Dong, M. (2005). Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC. Academic Press.
- Agilent Technologies. (s/f). The LC Handbook Guide to LC Columns and Method Development. Agilent.com. Recuperado el 17 de septiembre de 2022, de <https://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/LC-Handbook-Complete-2.pdf>
- Al Jitan, S., Alkhoori, S. A., & Yousef, L. F. (2018). Phenolic acids from plants: Extraction and application to human health. En *Studies in Natural Products Chemistry* (pp. 389–417). Elsevier.
- Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1720–1731. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Andrade, R.-J., Robles, M., Fernández-Castañer, A., López-Ortega, S., López-Vega, M.-C., & Lucena, M.-I. (2007). Assessment of drug-induced hepatotoxicity in clinical practice: a challenge for gastroenterologists. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 13(3), 329–340. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i3.329>
- A.O.A.C. (2005). Official methods of analysis. Arlington VA, USA. Association of Official Analytical Chemists. Official Method 931-01. Phosphorus in plants. Cap 3, pp. 21.
- Badhani, B., & Kakkar, R. (2017). DFT study of structural and electronic properties of gallic acid and its anions in gas phase and in aqueous solution. *Structural Chemistry*, 28(6), 1789–1802. <https://doi.org/10.1007/s11224-017-0958-3>
- Baiano, A. (2013). Gallic acid: Occurrence in plant foods and effects of agricultural practices, vegetative stage and processing. Researchgate.net. [https://www.researchgate.net/publication/285985866\\_Gallic\\_acid\\_Occurrence\\_in\\_plant\\_foods\\_and\\_effects\\_of\\_agricultural\\_practices\\_vegetative\\_stage\\_and\\_processing](https://www.researchgate.net/publication/285985866_Gallic_acid_Occurrence_in_plant_foods_and_effects_of_agricultural_practices_vegetative_stage_and_processing)
- Banothu, V., & Uma, A. (2022). Effect of biotic and abiotic stresses on plant metabolic pathways. En *Phenolic Compounds - Chemistry, Synthesis, Diversity, Non-Conventional Industrial, Pharmaceutical and Therapeutic Applications*. IntechOpen.
- Baxter, J. (s/f). Vegetation Sampling Using the Quadrat Method. *Methods in EEC (BIO 221B)*, 1–3. <https://www.researchgate.net/file.PostFileLoader.html?id=57c5b20adc332d2a054244ad&assetKey=AS%3A400818403594240%401472573962223#:~:text=A%20quadrat%20is%20a%20frame,be%20of%20any%20appropriate%20size.>
- Bickler, B. (2019). *What is a chromatography gradient?* Biotage.com. <https://selekt.biotage.com/blog/what-is-a-chromatography-gradient>

- Binti Ismail, N. N., & Sapina Abdullah, U. U. (2015). Determination of phenolic and antioxidant properties in tea and spent tea under various extraction method and determination of catechins, caffeine and Gallic acid by HPLC. *International journal on advanced science, engineering and information technology*, 5(3), 158. <https://doi.org/10.18517/ijaseit.5.3.520>
- Björnsson, E. S. (2016). Hepatotoxicity by drugs: The most common implicated agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 224. <https://doi.org/10.3390/ijms17020224>
- Buckner, H. (2020). How to grow hazelnut trees. *Gardenerspath.Com*. <https://gardenerspath.com/plants/nut-trees/grow-hazelnut/>
- Castillo Aguilar, B., & González Hernández, R. (1996). Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista cubana de farmacia*, 30(1), [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75151996000100009&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009&lng=es&tlng=es)
- Chapter 13 applications of high-performance liquid chromatographic methods in structural studies of biopolymers and biooligomers. (1988). En *Journal of Chromatography Library* (pp. B377–B467). Elsevier.
- Coefficient of Determination. (2008). En *The Concise Encyclopedia of Statistics* (pp. 88–91). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-0-387-32833-1\\_62](https://doi.org/10.1007/978-0-387-32833-1_62)
- Collins, P. B., & Thompson, M. A. (2013). *Handbook on Gallic Acid: Natural Occurrences, Antioxidant Properties and Health Implications*. Nova Science Publishers, Inc. David, S., y Hamilton, J. P. (2010). Drug-induced Liver Injury. *US gastroenterology & hepatology review*, 6, 73–80.
- Daglia, M., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., Talas, Z. S., & Nabavi, S. M. (2014). Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents <https://doi.org/10.2174/138920101504140825120737>
- Das, P. R., & Eun, J.-B. (2018). A comparative study of ultra-sonication and agitation extraction techniques on bioactive metabolites of green tea extract. *Food Chemistry*, 253, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.080>
- Díaz, A., Díaz, J., & Vargas, O. (2020). Catálogo de plantas invasoras de los humedales de bogotá. *ResearchGate*. Recuperado 4 de noviembre de 2021, de [https://www.researchgate.net/publication/259477965\\_CATALOGO\\_DE\\_PLANTAS\\_INVASORAS\\_DE\\_LOS\\_HUMEDALES\\_DE\\_BOGOTA](https://www.researchgate.net/publication/259477965_CATALOGO_DE_PLANTAS_INVASORAS_DE_LOS_HUMEDALES_DE_BOGOTA)
- FDA. (1994). Reviewer Guidance' Validation of Chromatographic Methods. *Fda.gov*. <https://www.fda.gov/media/75643/download>

- Fernandes, F. H. A., & Salgado, H. R. N. (2016). Gallic acid: Review of the methods of determination and quantification. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46(3), 257–265. <https://doi.org/10.1080/10408347.2015.1095064>
- Gismera, M. J., Quintana, M. C., & Da Silva, M. P. (2009). *INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN*. UAM Ediciones.
- Harris, D. C. (2020). *Quantitative Chemical Analysis* (10a ed.). W.H. Freeman.
- ICH Q2 HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. (1996). *VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)*. ICh.org. <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>
- ILO and WHO. (2017). *GALLIC ACID*. Ilo.org. [https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p\\_version=2&p\\_card\\_id=1174](https://www.ilo.org/dyn/icsc/showcard.display?p_version=2&p_card_id=1174)
- Inbuy. (2011). *Cotoneaster pannosus Franch.* Edu.uy. [http://inbuy.fcien.edu.uy/fichas\\_de\\_especies/DATAonline/DBASEonline/Cotoneaster\\_pannosus\\_w.pdf](http://inbuy.fcien.edu.uy/fichas_de_especies/DATAonline/DBASEonline/Cotoneaster_pannosus_w.pdf)
- IUPAC. (2019). *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
- Latief, U., Husain, H., Mukherjee, D., & Ahmad, R. (2016). Hepatoprotective efficacy of gallic acid during Nitrosodiethylamine-induced liver inflammation in Wistar rats. *Journal of Basic & Applied Zoology*, 76, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2016.07.002>
- Leblanc, J., Akbarzadeh, A., Andrews, J., Lu, H., & Golding, P. (2011). Heat extraction methods from salinity-gradient solar ponds and introduction of a novel system of heat extraction for improved efficiency. *Solar Energy (Phoenix, Ariz.)*, 85(12), 3103–3142. <https://doi.org/10.1016/j.solener.2010.06.005>
- Lee, S., Ju, H., Jeon, H., Machunda, R. L., Kim, D., Lee, J. K., & Lee, J. (2013). Electrocatalytic reduction of gas-phased CO<sub>2</sub> on nano-sized Sn electrode surface. *ECS Transactions*, 53(29), 41–47. <https://doi.org/10.1149/05329.0041ecst>
- Les, F., López, V., Caprioli, G., Iannarelli, R., Fiorini, D., Innocenti, M., Bellumori, M., & Maggi, F. (2017). Chemical constituents, radical scavenging activity and enzyme inhibitory capacity of fruits from *Cotoneaster pannosus* Franch. *Food & Function*, 8(5), 1775–1784. <https://doi.org/10.1039/c7fo00330g>
- Medscape. Drug-induced hepatotoxicity. (2022, julio 8). Medscape.com. <https://emedicine.medscape.com/article/169814-overview?reg=1>

- Nagy, K., & Vékey, K. (2008). Separation methods. En *Medical Applications of Mass Spectrometry* (pp. 61–92). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-044451980-1.50007-0>
- Nowak, R., Olech, M., & Nowacka, N. (2014). Plant Polyphenols as Chemopreventive Agents. En *Polyphenols in Human Health and Disease* (pp. 1289–1307). Elsevier.
- PAHO. (2002). VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS. Paho.org. [https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13\\_Modulo\\_VALIDACION\\_de\\_Metodos\\_Fisicoqcos.pdf](https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2008/13_Modulo_VALIDACION_de_Metodos_Fisicoqcos.pdf)
- Peak tailing in HPLC. (2017, septiembre 18). Crawfordscientific.com. <https://www.crawfordscientific.com/chromatography-blog/post/peak-tailing-in-hplc>
- Pereira, M. (2020). CATÁLOGO FLORÍSTICO Manual de árboles y arbustos representativos de la U.D.C.A. UDCA. <https://www.udca.edu.co/libros/catalogo-floristico/catalogo-floristico.pdf>
- Quattrocchi, O., Laba, R., & Andrizzi, S. (1992). *Introducción a la HPLC*. Artes gráficas Farro.
- Reed, G. F., Lynn, F., & Meade, B. D. (2002). Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(6), 1235–1239. <https://doi.org/10.1128/cdli.9.6.1235-1239.2002>
- Reuhs, B. L. (2017). High-Performance Liquid Chromatography. En *Food Science Text Series* (pp. 213–226). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45776-5_13)
- Sabido Couoh, C. R., Rosado Rubio, J. G., Castellanos Ruelas, A. F., Betanour Ancona, D. A., Chel Guerrero, L. A., & Acereto Escoffié, P. O. M. (2010). Adaptación de un micrométodo espectrofotométrico para determinación de fósforo en hueso. *Revista latinoamericana de química*, 38(2), 113–122. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0370-59432010000200005](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-59432010000200005).
- Sankar, R. (2020). Fundamental Chromatographic Parameters. Researchgate.net. [https://www.researchgate.net/publication/340849229\\_Fundamental\\_Chromatographic\\_Parameters](https://www.researchgate.net/publication/340849229_Fundamental_Chromatographic_Parameters)
- Shimadzu. Apparatus constituting HPLC. (s/f). Shimadzu.com. Recuperado el 17 de septiembre de 2022, de [https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/apparatus\\_constituting\\_hplc.html](https://www.ssi.shimadzu.com/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/apparatus_constituting_hplc.html).
- Starr, F., Starr, K., & Loope, L. (2003). *Cotoneaster pannosus*. Starrenvironmental.com. [http://www.starrenvironmental.com/publications/species\\_reports/pdf/cotoneaster\\_pannosus.pdf](http://www.starrenvironmental.com/publications/species_reports/pdf/cotoneaster_pannosus.pdf)

- Stauffer, M. T. (2018). Introductory chapter: The many faces of calibration and validation in analytical methodology in the present day. En *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*. InTech.
- Sugarman, B. (1943). The ultra-violet absorption spectrum of formic acid. *Proceedings of the Physical Society*, 55(5), 429–430. <https://doi.org/10.1088/0959-5309/55/5/314>
- Torralvo, J. (2017). VALIDACIÓN DE UN MÉTODO QUÍMICO ANALÍTICO DE HPLC EN R. repository.libertadores.edu.co. <https://repository.libertadores.edu.co/bitstream/handle/11371/1311/torralvojose2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Thilakarathna, R. C. N., Siow, L. F., Tang, T.-K., & Lee, Y. Y. (2022). A review on application of ultrasound and ultrasound assisted technology for seed oil extraction. *Journal of Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05359-7>
- Uddin, S. J., Afroz, M., Zihad, S. M. N. K., Rahman, M. S., Akter, S., Khan, I. N., Al-Rabbi, S. M. S., Rouf, R., Islam, M. T., Shilpi, J. A., Nahar, L., Tiralongo, E., & Sarker, S. D. (2022). A systematic review on anti-diabetic and cardioprotective potential of Gallic acid: A widespread dietary phytoconstituent. *Food Reviews International*, 38(4), 420–439. <https://doi.org/10.1080/87559129.2020.1734609>
- United States Pharmacopeial Convention & United States Pharmacopeial Convention. (2020). USP 43 NF 38. United States Pharmacopeial Convention.
- Weaver, J. E. (1918). The quadrat method in teaching ecology. *The Plant world*, 21(11), 267–283. <http://www.jstor.org/stable/43477708>
- Xuan Cuong, D., Xuan Hoan, N., Huu Dong, D., Thi Minh Thuy, L., & Xuan Chinh, D. (2020). Tannins: Extraction from Plants. En *Tannins - Structural Properties, Biological Properties and Current Knowledge*. IntechOpen. <https://www.intechopen.com/chapters/67043>
- Yeshi, K., Crayn, D., Ritmejeryté, E., & Wangchuk, P. (2022). Plant secondary metabolites produced in response to abiotic stresses has potential application in pharmaceutical product development. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(1), 313. <https://doi.org/10.3390/molecules27010313>
- Zakaria, F. (2014). Quantitative HPLC Analysis of Gallic Acid in *Benincasa hispida* Prepared with Different Extraction Techniques. *Sains Malaysiana*, 1181–1187. [https://www.researchgate.net/publication/286104260\\_Quantitative\\_HPLC\\_Analysis\\_of\\_Gallic\\_Acid\\_in\\_Benincasa\\_hispida\\_Prepared\\_with\\_Different\\_Extraction\\_Techniques](https://www.researchgate.net/publication/286104260_Quantitative_HPLC_Analysis_of_Gallic_Acid_in_Benincasa_hispida_Prepared_with_Different_Extraction_Techniques)