

# Optimización de un método analítico para la separación y cuantificación de flavonoides totales expresados en equivalentes de quercetina, en un extracto del hongo *Pleurotus ostreatus* mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Diego Nope <sup>1</sup>, Lina Ortiz <sup>2</sup> y Juliana Racines <sup>3, \*</sup>

<sup>1</sup> Universidad El Bosque; dnope@unbosque.edu.co

<sup>2</sup> Universidad El Bosque; lortizu@unbosque.edu.co

<sup>3</sup> Universidad El Bosque; jracles@unbosque.edu.co

**Resumen:** El consumo del hongo *Pleurotus ostreatus* ha aumentado debido a sus grandes beneficios para la salud y su elevado contenido de flavonoides, como la quercetina. Por ende, este estudio se centra en la obtención de un extracto etanólico a partir del material fúngico, con el propósito de establecer un método eficiente para la separación y cuantificación de flavonoides totales en términos de quercetina mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), optimizando las condiciones predefinidas en investigaciones previas. Se llevaron a cabo extracciones con diversos solventes, seguidas de una prueba de tricloruro de aluminio para determinar la cantidad de flavonoides y seleccionar el solvente óptimo para su análisis en HPLC. Las condiciones cromatográficas se establecieron con una fase móvil de acetonitrilo:agua (35:65), columna C8, temperatura de 25°C, flujo isocrático de 1,0mL/min, volumen de inyección de 3µL y longitud de onda de detección de 254nm. La cuantificación del analito se realizó mediante el método de adición estándar, obteniendo una concentración de 40,990ppm. Los parámetros de validación demostraron una exactitud del 99,824% y una resolución de 1,200, lo que confirma la optimización y validación adecuada del método.

**Palabras clave:** Quercetina, Validación, *Pleurotus ostreatus*.

## 1. Introducción.

El hongo *Pleurotus ostreatus* es un hongo basidiomiceto comestible, saprófito, también conocido como hongo ostra o Gírgola [1]; este hongo es originario de países asiáticos siendo el mayor productor China; sin embargo, también se cultiva en varias partes de Latinoamérica como México, Brasil y Colombia [2]. Además, actualmente gracias al amplio consumo del hongo *Pleurotus ostreatus* como sustituto de la carne de origen animal para los veganos, su alto contenido de flavonoides como la quercetina, su fácil adaptación a diversos sustratos, su potencial farmacéutico, y sus valores ecológicos y económicos, se ha evidenciado su enorme importancia [3], [4].

Por otro lado, los flavonoides se refieren a compuestos metabólicos secundarios de plantas, vegetales, algunas bebidas y hongos; que constan de una estructura fenólica y se caracterizan por poseer efectos bioquímicos y antioxidantes [5]. Así mismo, la quercetina, que hace parte de los flavonoides más estudiados y su consumo, ha sido asociado a diversos beneficios médicos, entre los cuales se incluye su actividad antioxidante, sus efectos antiinflamatorios y reducción de las enfermedades cardiovasculares [5].

41 Del mismo modo, por medio de este proyecto se busca realizar el planteamiento de la  
42 cantidad de flavonoides totales en el hongo *Pleurotus ostreatus* a través de un método  
43 analítico de separación y cuantificación de estos mismos en equivalentes de quercetina, los  
44 cuales son extraídos del hongo previamente mencionado, por medio de una extracción  
45 sólido-líquido y desarrollar una validación del método analítico por cromatografía líquida  
46 de alta resolución (HPLC) optimizando las condiciones preestablecidas en los estudios  
47 realizados por [6] y [7], con el fin de aportar a futuros estudios ya que esta es la materia  
48 prima para la investigación de un compuesto potencial en el tratamiento de las  
49 enfermedades inflamatorias. Ahora bien, es de gran relevancia mencionar que por la alta  
50 dificultad de la separación de la quercetina del total de flavonoides presentes en el hongo  
51 se plantea la cuantificación de flavonoides totales en equivalentes de quercetina según el  
52 método descrito por [6] y [7]. Así pues, se utilizó la quercetina como patrón de referencia  
53 para el presente análisis por su amplia presencia en la naturaleza y por su estructura  
54 química simple, la cual comparte con la mayoría de los flavonoides, caracterizada por un  
55 anillo heterocíclico de benzopirano que se conoce como anillo C, un anillo aromático  
56 (anillo A) fusionado con el anillo de benzopirano heterocíclico (anillo C) y unido a un resto  
57 fenilo (anillo B), así como ser conocidos por una estructura C6 – C3 – C6 de  
58 fenilbenzopirano, lo que permite la cuantificación de manera confiable de los flavonoides  
59 totales en términos de quercetina garantizando calidad y consistencia en los resultados [5].  
60

61 Finalmente, es importante el desarrollo de la validación del método de separación y  
62 cuantificación de flavonoides totales en equivalentes de quercetina por cromatografía  
63 líquida de alta resolución (HPLC), por medio de la evaluación de parámetros analíticos  
64 tales como exactitud, precisión, especificidad, selectividad, límite de detección, límite de  
65 cuantificación y robustez; en un extracto obtenido del hongo debido a que no se han  
66 encontrado estudios completos en torno a esta metodología [8], [9].

## 67 **2. Resultados.**

### 68 *2.1. Extracción con diferentes solventes*

69 La extracción de flavonoides totales en un extracto del hongo *Pleurotus ostreatus* fue llevada  
70 a cabo en diferentes solventes y volúmenes (Ver Tabla 1) por medio de agitación durante  
71 24 horas, en dicha extracción se evidenció que al terminar el tiempo, los solventes habían  
72 cambiado de incoloro a café claro, indicando que no solo se extrajeron flavonoides, sino  
73 otro tipo de metabolitos secundarios o incluso otros polifenoles, como los taninos los cuales  
74 son solubles en solventes polares como el etanol y son responsables de coloraciones  
75 marrones, por lo que es probable que el tiempo prolongado de extracción y la agitación  
76 constante hayan facilitado la solubilización de estos compuestos poliméricos [10].

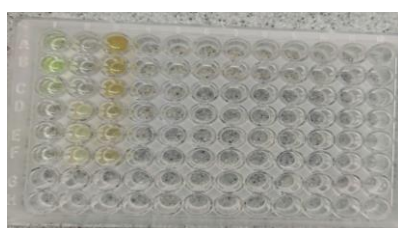
### 77 *2.2. Selección de extracto por prueba de Tricloruro de aluminio*

78 Para la determinación del mejor solvente el cual será empleado para la posterior  
79 optimización de las condiciones de separación y cuantificación, por cromatografía líquida  
80 de alta resolución (HPLC), se aplicó un método convencional diseñado para minimizar  
81 interferencias de otros compuestos fenólicos. Este método implicó la formación de  
82 complejos entre los hidroxilos vecinales de las estructuras base de los flavonoides difenil-  
83 piranos (C3-C6-C3) y el  $AlCl_3$  [11]. Por otro lado, la prueba con quercetina en la placa de  
84 96 pozos (ver Figura 1) y la medición espectrofotométrica a 420 nm confirmaron la  
85 presencia de flavonoides totales para su posterior cuantificación [12]. Además, la  
86 construcción de la curva de calibración mediante el método de estándar externo mostró un  
87 coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,9945, indicando una buena relación entre la

concentración del estándar y su respectiva señal, lo que permite cuantificar los flavonoides totales en los extractos del hongo de manera confiable.

**Tabla 1.** Resultados de concentración obtenidos de los extractos según solvente y volumen (mL).

Solvente	Volumen (mL)	Concentración promedio (ppm)
Agua	10	7,3
Agua	15	3,2
Agua	20	5,0
Etanol	10	44,5
Etanol	15	28,7
Etanol	20	14,0

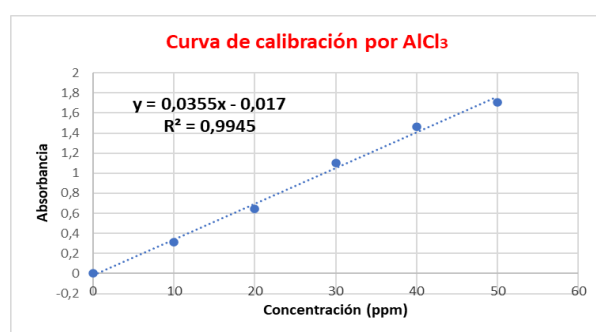


**Figura 1.** Placa de 96 pozos con prueba de AlCl<sub>3</sub>.

**Tabla 2.** Concentraciones y absorbancias de quercetina obtenidos en la prueba de AlCl<sub>3</sub>.

Punto de calibración	Concentración de Patrón (ppm)	Absorbancia
1	0	0
2	10	0,310
3	20	0,648
4	30	1,104
5	40	1,460
6	50	1,706

Con base en las absorbancias y las diferentes concentraciones del patrón de quercetina evidenciadas en la Tabla 2, se construyó una curva de calibración precisa (Ver Figura 2), y según su ecuación de la línea de regresión se determinó que el mejor solvente para la extracción de flavonoides totales fue etanol grado HPLC en un volumen de 10 mL, obteniendo una concentración de metabolitos de 44,5 ppm. Este enfoque permitió evaluar con precisión la concentración de los compuestos de interés, aprovechando las características espectrales resultantes de la interacción con AlCl<sub>3</sub> [11].



**Figura 2.** Curva de calibración resultante de la prueba de AlCl<sub>3</sub>.

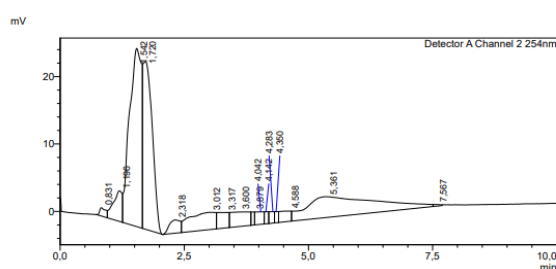
## 2.3 Validación de la metodología analítica

### 2.3.1. Definición de Condiciones

Para la definición de las condiciones en el método de separación y cuantificación de flavonoides totales expresados en equivalentes de quercetina, en un extracto del hongo *Pleurotus ostreatus* mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se realizó una optimización de los parámetros cromatográficos de dos métodos validados en los cuales su analito de interés son los flavonoides totales expresados en equivalentes de quercetina. Así pues, la optimización implicó un proceso iterativo de buscar ajustar una serie de variables clave para maximizar la resolución, repetibilidad y robustez del método.

Este proceso de optimización se basó en la experimentación sistemática, donde se modificaron variables como fase móvil, fase estacionaria, temperatura, flujo, volumen de inyección y longitud de onda. Con el fin de obtener los mejores resultados. Así pues, se tomaron como referencia para la optimización de las condiciones los trabajos previos desarrollados por [6] y [7], quienes validaron métodos similares para la separación y cuantificación de flavonoides totales.

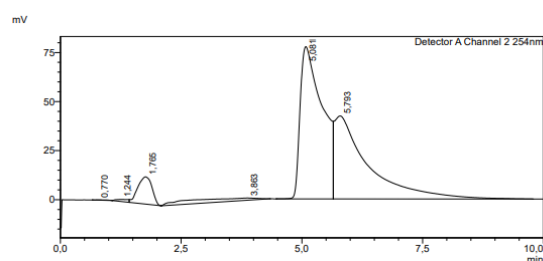
Siguiendo el enfoque propuesto por [7] en la validación de un método para la separación y cuantificación de flavonoides totales en la planta *Phytolacca octandra L* mediante HPLC, se inició el proceso estableciendo una fase móvil compuesta por una mezcla de acetonitrilo y agua en una proporción de 65:35, respectivamente. Se empleó una columna C18 de 150x4,6 mm, temperatura de 30°C, flujo isocrático de 0,5 mL/min, volumen de inyección de 10 µL y longitud de onda de detección de 254 nm. Sin embargo, al analizar el cromatograma resultante (ver Figura 3) de la matriz biológica bajo estas condiciones, se observó una superposición excesiva de picos, indicativa de una separación deficiente y una resolución insuficiente, lo cual compromete la precisión y la selectividad del método, sugiriendo que las condiciones cromatográficas establecidas no son adecuadas para la matriz biológica del hongo *Pleurotus ostreatus*.



**Figura 3.** Cromatograma con las condiciones usadas por González y Orozco [7].

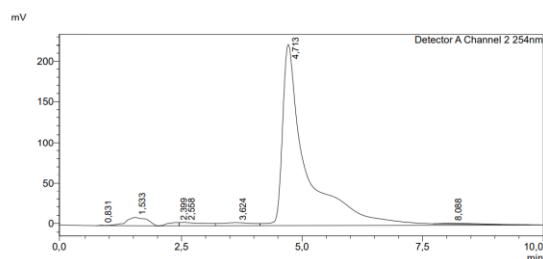
Por otro lado, los hallazgos de [6] en la validación de un método para la separación y cuantificación de flavonoides totales en la cáscara de mango Tommy Atkins '*Mangifera Indica. L*', se reporta que la fase estacionaria óptima era una columna Phenomenex Gemini 5 µm C18 (150 mm x 4,6 mm). Según sus resultados, se trabajó con un flujo de 1,0 mL/min, volumen de inyección de 0,5 µL, longitud de onda de detección de 254 nm y una fase móvil que consistió en una mezcla de acetonitrilo grado HPLC y agua tipo 1 (67:33), con un flujo isocrático durante corridas de 15 minutos, por lo que fueron usadas esas mismas condiciones y el cromatograma obtenido (ver Figura 4) mostró una mejora considerable en comparación con el anterior estudio, evidenciando una mayor resolución de los picos. Sin embargo, en este caso persistieron dos picos solapados, en donde se identificó que uno de ellos posiblemente podría corresponder a los flavonoides totales. Estos resultados indican que las condiciones reportadas por [6] ofrecen una base más sólida para la

optimización del método en la matriz específica del hongo *Pleurotus ostreatus* en comparación con los parámetros anteriores.



**Figura 4.** Cromatograma con las condiciones usadas por Rodriguez y Moya [6].

Considerando lo expuesto anteriormente, se procedió a ajustar los parámetros cromatográficos, incluyendo la fase móvil, la fase estacionaria, el flujo y el volumen de inyección, con el objetivo de optimizar las variables establecidas por [6]. En consecuencia, se establecieron las siguientes condiciones: se empleó una fase reversa compuesta por una mezcla de acetonitrilo: agua (35:65), ambas de grado HPLC, junto con una fase estacionaria de octilsilano monomérico C8 utilizando una columna Ultra RESTEK®. Esta columna presentaba un tamaño de partícula de 3  $\mu\text{m}$ , un tamaño de poro de 100  $\text{\AA}$  y dimensiones de 150 mm x 4,6 mm. La temperatura de la columna se fijó en 25  $^{\circ}\text{C}$ , con un flujo isocrático de 1,0 mL/min, volumen de inyección de 3  $\mu\text{L}$  y una longitud de onda de detección de 254 nm. Sin embargo, dado que se trata de una matriz biológica compleja, como lo es el extracto del hongo *Pleurotus ostreatus*, que puede contener diversos compuestos interferentes como proteínas, carbohidratos, lípidos y otros metabolitos secundarios, el pico presentaba un ligero tailing [13] (ver Figura 5), lo que podría afectar la resolución y la cuantificación precisa de los analitos. No obstante, la cuantificación se realizó mediante el método de adición estándar, el cual minimiza los efectos de los interferentes de la matriz biológica, ya que se construye una curva de calibración utilizando la propia muestra como disolvente, compensando así los posibles efectos de matriz y garantizando una cuantificación más precisa y confiable. Esta estrategia analítica robusta, respaldada por [14], asegura que el método no pierda fiabilidad y brinde resultados reproducibles y confiables en la determinación de flavonoides totales en el extracto del hongo *Pleurotus ostreatus*. Del mismo modo, estas condiciones fueron las óptimas para esta matriz tan compleja, equilibrando la resolución, la eficiencia y la separación adecuada de los flavonoides totales, minimizando los efectos indeseados como el tailing.



**Figura 5.** Cromatograma de la matriz biológica con las condiciones optimizadas.

Del mismo modo, al realizar la corrida cromatográfica con el estándar de quercetina y la matriz biológica con las condiciones optimizadas se obtuvo un cromatograma (ver Figura 6) con una excelente resolución cromatográfica, exhibiendo picos bien definidos y simétricos, lo cual se traduce en un alto grado de selectividad y especificidad del método

análítico, lo que genera una mayor confiabilidad en la posterior validación de separación y cuantificación de flavonoides totales en equivalentes de quercetina.

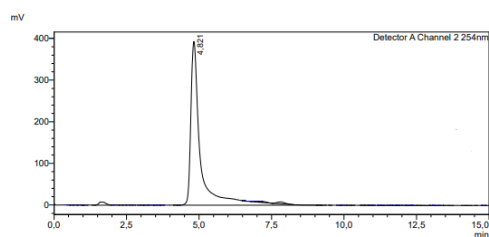


Figura 6. Cromatograma del estándar de quercetina.

### 2.3.2. Linealidad

Para la determinación de la linealidad del método establecido para la determinación de flavonoides totales en el extracto del hongo *Pleurotus ostreatus*, se elaboró una curva de calibración de 11 puntos por medio del método de adición estándar, dado a lo establecido en el capítulo <1225> de la USP 41 [15]. Adicionalmente, cabe destacar que la linealidad del método fue determinada mediante la evaluación del coeficiente de determinación. Posteriormente, se pasaron por el sistema cromatográfico cada uno de los sistemas preparados que se muestran en la Tabla 3 y se obtuvo la respectiva curva de calibración que se observa en la Figura 7 con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) de 0,9995, indicando una linealidad óptima del método para la determinación de flavonoides totales en el extracto del hongo *Pleurotus ostreatus*.

Tabla 3. Preparación y Resultados de Curva de Calibración por adición estándar para evaluación del método analítico.

Sistema	Vol Muestra ( $\mu\text{L}$ )	Vol de Solución Estándar ( $\mu\text{L}$ )	Vol Total ( $\mu\text{L}$ )	Concentración inicial de patrón (ppm)	Concentración nueva de patrón (ppm)	Área (mV)
1	600	0	1400	2000	0	299763
2	600	25	1400	2000	35,710	755072
3	600	50	1400	2000	71,430	1140764
4	600	100	1400	2000	142,860	2809677
5	600	200	1400	2000	285,710	5133861
6	600	300	1400	2000	428,570	7285172
7	600	400	1400	2000	571,430	9638136
8	600	500	1400	2000	714,290	11948138
9	600	600	1400	2000	857,140	14145963
10	600	700	1400	2000	1000	16456092
11	600	800	1400	2000	1142,860	18845330

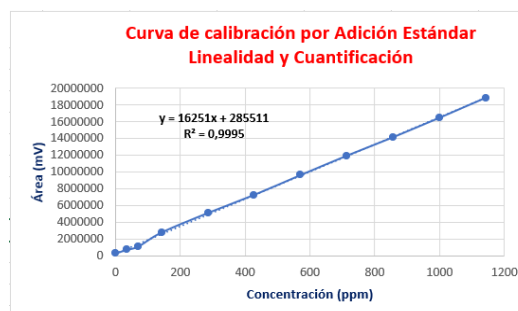


Figura 7. Curva de calibración para determinación de linealidad y cuantificación.

### 2.3.3. Cuantificación

La cuantificación de flavonoides totales en el extracto etanólico del hongo *Pleurotus ostreatus* se realizó mediante el método de adición estándar, utilizando un patrón de quercetina. La incorporación de este patrón provocó un incremento en la señal de los flavonoides, superando las señales generadas por interferentes y mejorando la identificación del pico de interés, siguiendo la metodología propuesta por [4]. La curva de calibración obtenida durante el análisis de linealidad, junto con su ecuación correspondiente, permitió determinar una concentración de 40,990 ppm del analito de interés en equivalentes de quercetina. Esta cuantificación se expresó mediante la siguiente ecuación:

$$C_x = (285511 \text{ mV}/16251 \text{ mV/ppm}) (1400 \text{ } \mu\text{L}/600 \text{ } \mu\text{L}) = 40,990 \text{ ppm.}$$

### 2.3.4. Precisión

Para la determinación de la precisión del método, se sigue lo establecido en la guía ICH Q2, en donde se menciona que deben tenerse en cuenta otros parámetros como la repetibilidad, puesto que los resultados obtenidos deben realizarse bajo los mismos factores de análisis, para poder evaluar cuál es la proximidad entre las mediciones [15]. Ahora bien, con el objetivo de analizar el parámetro analítico de precisión, se estudiaron 3 muestras con concentraciones conocidas y se analizaron 4 veces cada una. Posteriormente, se calculó la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (%CV) para cada grupo. Cabe destacar que se evaluaron estos dos parámetros estadísticos, puesto que dependen de la proporcionalidad y variabilidad de los resultados obtenidos, permitiendo así establecer la precisión del método [15]. Adicionalmente, cabe mencionar, que de acuerdo con lo establecido en la guía de validación de métodos cromatográficos de la FDA este valor debe ser igual o menor 1 para el caso de la desviación estándar [16] y para el caso del coeficiente de variación se determina óptimo un valor de  $\pm 1,3\%$ , de acuerdo con lo establecido en el libro de validación de métodos en análisis químico cuantitativo del Instituto Nacional de Metrología de Colombia [16].

**Tabla 4.** Resultados precisión del tiempo de retención y área del pico.

	Tiempo de Retención (min)					
	600 ppm		800 ppm		1000 ppm	
	Tiempo de Retención (min)	Área del Pico (mV)	Tiempo de Retención (min)	Área del Pico (mV)	Tiempo de Retención (min)	Área del Pico (mV)
	4,944	9692201	4,952	10974026	4,932	14907826
	4,953	9711604	4,959	12932458	4,933	14887176
	4,963	9729599	4,961	12994346	4,943	15953194
	4,969	9743364	4,972	12907826	4,948	15862545
Promedio	4,957	9719192	4,961	12452164	4,939	15402685,250
S	0,011	22201,220	0,0082	986097,260	0,0077	584570,020
%CV	0,222	0,228	0,167	7,919	0,157	3,795

Con base en lo anterior, en la Tabla 4 se muestran los valores de área de pico y tiempo de retención de cada uno de los ensayos realizados para el parámetro analítico de precisión, donde se evalúa el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada grupo de datos.

## 230 2.3.4.1. Análisis ANOVA

231 **Tabla 5.** Análisis ANOVA de Tiempos de Retención para precisión.

Análisis de Varianza						
Origen de las Variaciones	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Promedio de los Cuadrados	F	Probabilidad	Valor Crítico para F
Entre Grupos	0,001108	2	0,0005541	6,625	0,01703	4,256
Dentro de los Grupos	0,000752	9	8,3539 E-05			
Total	0,001861	11				

## 232 2.3.5 Reproducibilidad.

233 Para la evaluación de la reproducibilidad del método establecido para la separación de  
 234 flavonoides totales de un extracto del hongo *Pleurotus ostreatus* dos analistas realizaron las  
 235 respectivas inyecciones y posteriormente registraron los datos los cuales se recopilan en la  
 236 Tabla 6; en la cual se observa un valor de 0,07331% en el coeficiente de variación respecto  
 237 al tiempo de retención de los ensayos realizados por el analista 1 mientras que se obtuvo  
 238 un valor de 0,1919% por el analista 2. Por otro lado, para las áreas de los picos se obtuvo  
 239 un valor de 5,988% en el coeficiente de variación en los ensayos realizados por el analista  
 240 1, mientras que para los valores obtenidos por el analista 2 es de 0,8459%.

241 **Tabla 6.** Resultados de reproducibilidad para cada analista.

Experimento	Analista 1		Analista 2	
	Tiempo de retención (min)	Área del pico (mV)	Tiempo de retención (min)	Área del pico (mV)
1	4,794	8002292	4,944	2192201
2	4,791	8025995	4,953	2211604
3	4,787	8874825	4,963	2229599
4	4,783	8752767	4,969	2243364
5	4,781	8750964	4,972	3074026
Promedio	4,790	8301037,333	4,953	2211134,667
Desviación	0,00351	497056,006	0,00950	18703,416
CV (%)	0,07331	5,988	0,191	0,845

## 244 2.3.6. Exactitud

245 La determinación de este parámetro se realiza por medio del porcentaje de recuperación,  
 246 para lo cual se usa la ecuación de la recta previamente obtenida en la curva de calibración  
 247 de linealidad y cuantificación, junto con el promedio de área de los picos obtenidos en el  
 248 ensayo de precisión a las 3 concentraciones diferentes, se despejó y calculó la  
 249 concentración obtenida experimentalmente; con este último valor se obtuvieron los  
 250 porcentajes de rendimiento que se muestran en la Tabla 7. Por último, se realizó un  
 251 análisis estadístico con el cual se busca que el valor medio no difiera significativamente  
 252 del teórico por medio del uso del ensayo de t student realizada a un intervalo de confianza  
 253 de 90% con un t tabulado de 1,533 [18]. A continuación, se realiza la muestra de cálculo.

$$254 \quad Y = 16251x - 14252 \quad Y = 9719192$$

$$255 \quad X = (16251 + 9719192) / 14252 = 598,944 \text{ ppm}$$



$$\% \text{ Rendimiento: } (598,944 \text{ ppm} / 600 \text{ ppm}) \times 100 = 99,824 \%$$

$$t_{ob} = (|x_r - X|) / (s/\sqrt{n}) = (|230,433 \text{ ppm} - 600 \text{ ppm}|) / (22201,22/\sqrt{4})$$

$$t_{ob} = 0,0336$$

**Tabla 7.** Resultados de exactitud del área del pico a diferentes concentraciones.

	600 ppm	800 ppm	1000 ppm
	Área del Pico (mV)	Área del Pico (mV)	Área del Pico (mV)
Promedio	9719192	12452164	15402685
Concentración obtenida	598,944	767,116	948,676
% rendimiento	99,824	95,889	94,867
Tob	0,00832	0,00289	0,00068
T tabulada *	1,533	1,533	1,533

\*[18]

### 2.3.7. Límite de Detección y Límite de Cuantificación (LOD y LOQ)

Para la determinación de este parámetro cromatográfico, se partió de la curva de calibración establecida para el parámetro de linealidad y cuantificación. Es importante, mencionar que se realizó un ajuste en las áreas restando la señal de la matriz debido a que el análisis de dichos parámetros de validación fue llevado a cabo por el método de adición estándar.

A continuación, se calcularon las estadísticas de regresión con el objetivo de evaluar los resultados obtenidos mediante la curva de calibración, tales como: coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, pendiente, error típico, ecuación de la recta, entre otros; como se observa en la Tabla 8. Es importante resaltar que estos valores se obtuvieron mediante el uso de la herramienta graficadora Microsoft Excel. Además, esto se realizó para poder aplicar las fórmulas recomendadas en la ICH para calcular tanto el límite de detección como el límite de cuantificación del método.

**Tabla 8.** Estadísticas de la regresión para determinación de LOD y LOQ.

Estadísticas de la regresión	
Coefficiente de correlación	0,998
Coefficiente (R <sup>2</sup> )	0,9995
Pendiente	16251
Error Típico	60633,62
Ecuación de la recta	Y=16251x + 285511

Por último, se calcularon cada uno de los límites utilizando las fórmulas recomendadas por la ICH, así:

$$\text{LOD} = (3,3 * 60633,62/16251) = 12,312 \text{ ppm} \quad \text{LOQ} = (10 * 60633,62/16251) = 37,310 \text{ ppm}$$

### 2.3.8. Robustez

Para la determinación de la robustez del método establecido, para la separación de flavonoides totales de un extracto del hongo *Pleurotus ostreatus*. Se llevó a cabo por medio

del cambio del pH de la fase móvil a un valor de 2,61 con ácido fosfórico 0,1% en agua y acetonitrilo. Así mismo, con los resultados obtenidos en el ensayo de reproducibilidad (sin cambio de pH) y robustez (con cambio de pH) se elaboró la Tabla 9, en la cual se observa un aumento en el coeficiente de variación del área del pico, mientras que se identifica una disminución en el coeficiente de variación del tiempo de retención.

**Tabla 9.** Comparación entre resultados de resultados de reproducibilidad y robustez.

Ensayos	Tiempo de retención (min)		Área del pico (mV)	
	Condiciones preestablecidas	Cambio en pH de la fase móvil	Condiciones preestablecidas	Cambio en pH de la fase móvil
Resultados	4,794	4,821	8002292	9078288
	4,791	4,857	8002292	9179865
	4,787	4,853	8874825	9206106
	4,783	4,834	8752767	9334069
	4,781	4,856	8750964	9467816
Promedio	4,787	4,844	8476628	9253228,800
Desviación CV (%)	0,00540	0,0160	435908	150656,806
	0,112	0,330	5,142	1,628

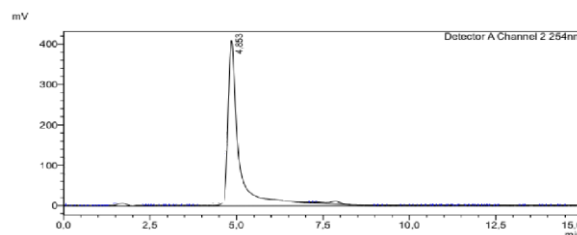
#### 2.4 Determinación de parámetros cromatográficos.

##### 2.4.1 Tiempo de retención corregido

De acuerdo con lo encontrado en la literatura, el tiempo de retención corregido es el tiempo máximo que transcurre entre la inyección contemplada como el tiempo cero o muerto, hasta la señal máxima o analizada dentro del cromatograma [16]. En el cromatograma evidenciado en la Figura 8, se puede observar que el tiempo de retención del pico de quercetina es de 4,853 min. Sin embargo, dentro de la corrida cromatográfica hay una fracción de tiempo en donde el analito pasa por la fase estacionaria, por lo cual debe calcularse el tiempo de retención corregido, mediante la diferencia entre el tiempo de retención ( $t_r$ ) y el tiempo muerto ( $t_m$ ) [17]. Este último es el tiempo que se requiere para que la fase móvil alcance el detector; cabe destacar que el tiempo muerto se obtuvo realizando una corrida cromatográfica bajo las condiciones establecidas, pasando sólo el solvente (etanol) en el que se encuentra la matriz, donde se obtuvo un tiempo muerto de 1,542 min. Finalmente, el tiempo de retención corregido, se calculó mediante la siguiente fórmula, así:

$$t'_r = t_r - t_m$$

$$t_r = 4,853 \text{ min} - 1,542 \text{ min} = 3,311 \text{ min}$$



**Figura 8.** Tiempo de retención del pico de quercetina.

#### 2.4.2 Factor de capacidad

La determinación del factor de capacidad permite conocer la velocidad a la cual los analitos migran en la columna y se puede calcular por medio del cociente entre la cantidad de soluto en la fase móvil y en la fase estacionaria [17]. El cálculo para este parámetro se realiza mediante el coeficiente entre el tiempo de retención corregido y el frente de solvente; de lo cual se pudo obtener 2,147 min, como se muestra en la ecuación a continuación:

$$k' = (t_n - t_0) / t_0$$

$$k' = (4,853 \text{ min} - 1,542 \text{ min}) / 1,542 \text{ min} = 2,147 \text{ min}$$

#### 2.4.3 Selectividad

Para determinar la selectividad, se evalúa el grado de separación entre aquellos compuestos que tienen un tiempo de retención cercano al analito [17]. Cabe destacar, que la selectividad es un factor que depende directamente de la naturaleza de la fase móvil, la columna y la muestra [17]. El cálculo de dicho parámetro cromatográfico se realiza mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$\alpha = ((t_n - t_0)_2 / (t_n - t_0)_1)$$

$$\alpha = ((4,853 \text{ min} - 1,542 \text{ min})_2 / (4,255 \text{ min} - 1,542 \text{ min})_1) = 1,220$$

#### 2.4.4 Número de platos teóricos y altura de plato.

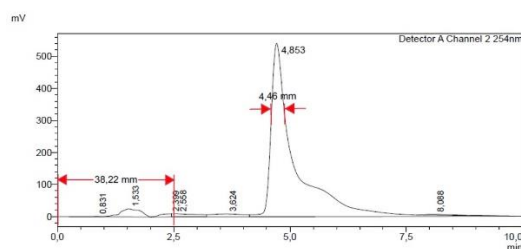
Con el número de platos teóricos se puede determinar la eficiencia de la separación por medio de la relación entre el tiempo de retención y el ancho a la altura media del pico del analito; en las diferentes etapas de separación de compuestos en la columna cromatográfica representando cada una de estas como un equilibrio entre la fase móvil y la estacionaria. Para el cálculo de este parámetro se emplea la ecuación que se muestra a continuación, en la que se multiplica 5,5 por el coeficiente entre el tiempo de retención y la mitad del ancho del pico correspondiente al analito ( $W_{0,5}$ ); el cálculo se realiza de esta manera, ya que no se puede determinar el ancho de la base del pico.

$$W_{0,5} = 4,46 \text{ mm} (2,5 \text{ min} / 38,22 \text{ mm}) = 0,292 \text{ min}$$

$$N = 5,5 (Tr / W_{0,5})^2$$

$$N = 5,5 (4,853 \text{ min} / 0,292 \text{ min})^2 = 1519,209 \text{ platos teóricos.}$$

Es importante mencionar que, para obtener los datos previamente usados, se midió con regla la distancia desde 0 hasta 2,5 minutos (ver Figura 9) y se hizo el factor de conversión de la medida del ancho del pico para obtener el tiempo correspondiente, del cual se obtuvo un valor de 0,292 min.



**Figura 9.** Cromatograma para determinación de número de platos teóricos.

Por otro lado, la altura del plato expresa la distancia en la que el soluto se mueve mientras que se lleva a cabo un reparto; para el cálculo de este parámetro se realiza la división entre la altura de la columna usada sobre el número de platos teóricos, como se muestra a continuación:

$$H = L/N = 150\text{mm}/1519,209 \text{ platos teóricos} = 0,0987 \text{ mm}$$

#### 2.4.5 Resolución

Por otro lado, la resolución también evalúa el grado de separación de los componentes de una mezcla en un sistema cromatográfico [18]. El principal objetivo del cálculo de la resolución es brindar una medida cuantitativa mediante la cual se pueda analizar que existe una cuantificación adecuada del compuesto de interés [18]. Para su cálculo se utilizó la siguiente ecuación:

$$R_s = 1/4 \sqrt{N}(\alpha - 1/\alpha)(K/K + 1)$$

$$R_s = 1/4 \sqrt{1519,209}(1,2204 - 1/1,2204)(2,147/2,147 + 1) = 1,200$$

### 3. Discusión

#### 3.1. Extracción y selección del mejor solvente

Los resultados de la extracción y posterior cuantificación con la prueba de Tricloruro de aluminio llevada a cabo para la evaluación de los solventes agua y etanol en diferentes volúmenes, con 0,5 gramos de hongo pulverizado, sugieren que el etanol grado HPLC con 10 mL es el mejor solvente para la extracción de flavonoides totales en el hongo *Pleurotus ostreatus*, lo que se debe a que el etanol es un solvente polar que puede interactuar con los grupos hidroxilo de los flavonoides, facilitando su solubilización. Por otro lado, se evidencia que al agregar una menor cantidad de etanol la concentración de los compuestos disueltos es mayor, debido a que el contenido de flavonoides del hongo se diluye en un volumen reducido; a diferencia de cuando se utiliza mayor cantidad de disolvente. Por lo tanto, esto no implica que el volumen usado genere una extracción más eficiente, sino simplemente una más concentrada [19]. Por otra parte, al comparar las concentraciones obtenidas con el solvente etanol y agua evidenciados en la Tabla 2, se observa que con este último la eficiencia de extracción es menor, ya que las concentraciones, son inferiores a diferencia de cuando se realiza con etanol, lo que sugiere que los flavonoides totales por sus grupos hidroxilo, interactúan más fácilmente con solventes orgánicos como el etanol [20].

Del mismo modo, la prueba de Tricloruro de aluminio permitió cuantificar los flavonoides totales en los extractos, donde la curva de calibración con quercetina mostró una alta linealidad, lo que indica una buena relación entre la concentración del estándar y su respectiva señal, lo que permite cuantificar el analito de manera confiable, que para el caso del extracto elegido de etanol grado HPLC fue de 44,5 ppm, siendo este usado para su

387 posterior análisis y optimización de las condiciones de separación por medio de  
388 cromatografía líquida de alta resolución, evitando así saturar la columna cromatográfica,  
389 y obteniendo resultados óptimos.

390  
391 Por otro lado, es importante mencionar que la preextracción es un paso esencial en el  
392 proceso de extracción de compuestos bioactivos, como los flavonoides, de matrices  
393 complejas como los hongos. Su importancia radica en la necesidad de preparar  
394 adecuadamente la muestra para el análisis posterior, maximizando la eficiencia de  
395 extracción y minimizando la interferencia de compuestos no deseados. Esta etapa se lleva  
396 a cabo para romper las estructuras celulares del hongo y permitir la liberación de los  
397 compuestos de interés, los cuales pueden estar presentes en forma insoluble o complejada  
398 dentro de la matriz. Sin embargo, en el presente estudio no se realizó lo que pudo acarrear  
399 diversas repercusiones negativas en el análisis posterior. Por un lado, los compuestos de  
400 interés pudieron quedar atrapados dentro de las células del hongo, lo que disminuiría la  
401 eficiencia de extracción y limitaría la cantidad de analito recuperado. Esto podría  
402 traducirse en concentraciones subóptimas de los compuestos en la muestra final, afectando  
403 la sensibilidad y precisión del análisis [10]. Además, la presencia de componentes celulares  
404 no deseados, como lípidos, proteínas o carbohidratos, pudo contaminar la muestra y  
405 afectar la selectividad y resolución de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC),  
406 especialmente al saturar la columna cromatográfica. Así pues, omitir la preextracción  
407 también puede tener implicaciones en la integridad de la columna cromatográfica durante  
408 el análisis por HPLC, donde la presencia de sustancias no deseadas en la muestra pudo  
409 ocasionar una sobrecarga en la columna, lo que disminuiría su capacidad para retener y  
410 separar los analitos de interés. Esta saturación podría resultar en una disminución de la  
411 resolución de los picos cromatográficos, un aumento en el tiempo de retención y una  
412 reducción en la vida útil de la columna, comprometiendo así la calidad y fiabilidad de los  
413 resultados analíticos [19].

### 414 3.2 Definición de Condiciones

415 Para definir las condiciones del método de separación de flavonoides totales en el extracto  
416 del hongo *Pleurotus ostreatus* mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se  
417 seleccionó el patrón de quercetina como referencia debido a su amplia presencia en la  
418 naturaleza y su estructura química relativamente simple, lo que lo convierte en un estándar  
419 comúnmente utilizado en el análisis de flavonoides. Esta elección se fundamentó en su  
420 condición de patrón de referencia USP, que garantiza calidad y consistencia en los  
421 resultados. Las condiciones iniciales se determinaron considerando que la separación de  
422 compuestos fenólicos se realiza comúnmente mediante cromatografía en fase reversa, que  
423 emplea disolventes polares para la fase móvil y fases estacionarias basadas en partículas  
424 sólidas recubiertas con componentes apolares, además de tener como condiciones iniciales  
425 lo reportado por [6] y [7].

426 Al realizar la corrida cromatográfica con lo reportado por [7] y analizar los cromatogramas  
427 resultantes, se observaron superposiciones excesivas de picos, lo que indicaba una  
428 separación deficiente y una resolución insuficiente. Tras ajustar los parámetros  
429 cromatográficos de acuerdo con los resultados obtenidos por [6], se logró una mejora  
430 significativa en la resolución de los picos. Sin embargo, persistieron algunos desafíos, como  
431 la presencia de picos solapados, que podrían afectar la cuantificación precisa de los  
432 flavonoides totales en el extracto del hongo *Pleurotus ostreatus*.

433 Por lo tanto, se optó por cambiar a una columna C8, la cual es más adecuada para la  
434 separación de flavonoides totales y quercetina debido a su mayor capacidad de retención  
435 y selectividad para compuestos fenólicos en comparación con las columnas C18  
436 convencionales. Las columnas C8 poseen una menor hidrofobicidad, lo que favorece la

interacción con compuestos polares como los flavonoides, mejorando así su separación. El uso de la columna C8 permitió una mayor resolución de los picos, pero presentaban mucho tailing o fronting, que generaba una cola en el pico hacia tiempos de retención mayores, o una deformación hacia tiempos de retención menores, estas anomalías podían generar problemas en la cuantificación precisa de los analitos y dificultar la integración de los picos. Con el objetivo de corregir el tailing o fronting, se decidió aumentar la proporción de agua y reducir la de acetonitrilo en la fase móvil en una proporción 50:50, lo que permitió mejorar la simetría de los picos, dado que, al aumentar la polaridad de la fase móvil, se favorece la interacción de los compuestos polares con la fase estacionaria medianamente apolar, lo que podría reducir el tailing o fronting. Sin embargo, a pesar de estos cambios, la separación continuaba siendo deficiente, por lo que se aumentó el flujo de 0,5 mL/min a 1 mL/min, este aumento en el flujo de la fase móvil generó un mayor arrastre de los analitos a través de la columna, lo que mejoró la resolución y redujo el ensanchamiento de los picos debido a la difusión, no obstante, aunque los picos mejoraban en términos de resolución, no presentaban una buena simetría ni resolución óptima. Por lo tanto, se aumentó nuevamente la proporción de agua en la fase móvil y se redujo la de acetonitrilo en una proporción 65:35, respectivamente, donde esta modificación incrementó aún más la polaridad de la fase móvil, lo que favoreció la interacción de los compuestos polares con la fase estacionaria medianamente apolar, mejorando su retención y separación. Además, se disminuyó el volumen de inyección a 3  $\mu$ L, lo que generó un cromatograma con picos más definidos, ya que un volumen de inyección menor reduce el ensanchamiento de los picos debido a la dispersión en el inyector y la columna, lo que mejora la resolución y simetría de los picos [21]. Es importante resaltar que esta composición de la fase móvil contribuye de manera significativa a lograr un equilibrio apropiado entre diversos factores, tales como efectos estéricos, formación de puentes de hidrógeno, hidrofobicidad, momento dipolar e ionización. Esto es crucial debido a que los flavonoides que no están ligados a unidades de glucosa muestran una baja solubilidad en agua, y cualquier cambio en esta propiedad estaría directamente relacionado con el pH del medio. Además, según la literatura, se ha observado que la polaridad aumenta principalmente con la presencia de hidroxilos en la cuarta posición, seguidos por aquellos en la segunda y tercera posición, donde la pérdida de grupos hidroxilo polares o la adición de grupos metoxi disminuyen la polaridad y, por ende, incrementan los tiempos de retención de manera significativa.

Por otra parte, es crucial destacar la elección de mantener una temperatura constante de 25°C durante el proceso analítico, donde ésta se seleccionó debido a su idoneidad para el análisis de flavonoides totales, ya que, a esta temperatura, se minimiza la posibilidad de degradación térmica de los compuestos de interés, lo que garantiza la integridad de las muestras y la precisión de los resultados. Además, se empleó un detector UV/VIS integrado a HPLC con una longitud de onda de 254 nm, la cual se determinó mediante un análisis por espectrofotometría UV-VIS, lo que resultó esencial para identificar la máxima absorción de la quercetina. La elección del detector es particularmente adecuada para este tipo de análisis debido a la capacidad de los flavonoides para absorber radiación en el rango ultravioleta-visible, donde esta técnica permite una detección precisa y sensible de los compuestos de interés, ya que se aprovecha la capacidad de los flavonoides para absorber energía en la región del espectro electromagnético en la que se sitúa la longitud de onda seleccionada.

### 3.3 Linealidad

Como se puede observar en la curva de calibración realizada, se identifica que la mayoría de los puntos se encuentran dentro de la línea de tendencia de la gráfica, lo cual confirma que el método presenta una linealidad óptima, por lo que es adecuada la proporcionalidad de señal emitida por el equipo de cromatografía y la concentración de flavonoides totales

expresados en términos de quercetina en la muestra, lo cual permite tener una alta confiabilidad en los resultados obtenidos. Además, lo anterior puede confirmarse mediante el coeficiente de determinación ( $R^2$  de 0,9995), ya que permite establecer la alta linealidad del método, dado que entre más sea su cercanía al valor de 1 es óptimo, de acuerdo con la guía de validación de métodos cromatográficos de la FDA [16]. No obstante, cabe destacar que se podrían aplicar otras pruebas para evaluar la linealidad del método como diferentes pruebas estadísticas para evaluar la pendiente de la curva y la convergencia al origen para dar soporte a los resultados de linealidad.

#### 3.4. Cuantificación

La cuantificación de flavonoides totales en el extracto etanólico del hongo *Pleurotus ostreatus* se realizó mediante el método de adición estándar, utilizando quercetina como patrón de referencia. El uso de este método permitió identificar y cuantificar de manera precisa y confiable el pico de interés correspondiente a los flavonoides totales en la muestra, incluso en presencia de posibles interferentes. La adición de cantidades conocidas de quercetina y la construcción de una curva de calibración posibilitaron determinar la concentración original de flavonoides totales en equivalentes de quercetina, obteniéndose un valor de 40,99 ppm. Al comparar estas concentraciones con los resultados del método espectrofotométrico por  $AlCl_3$ , empleado previamente para la selección del mejor solvente (44,5 ppm), se observó una consistencia y similitud en los valores obtenidos. Esta coherencia entre ambos métodos analíticos respalda la veracidad y robustez de los resultados, reforzando la certeza de la cuantificación realizada.

Por otro lado, al comparar la concentración obtenida de flavonoides totales en equivalentes de quercetina del extracto etanólico del hongo *Pleurotus ostreatus*, en la que se obtuvo un valor de 81,98 mg/100 g que relaciona los miligramos de analito por cada 100 g de material fúngico, como se evidencia en la ecuación presentada al final del apartado, con lo reportado en el artículo "Evaluation of Total Phenolic Content, HPLC Analysis, and Antioxidant Potential of Three Local Varieties of Mushroom: A Comparative Study" se observa una notable diferencia [19]. En dicho estudio, se especifica que el hongo *Calocybe indica* contiene 2917 mg/100 g, el hongo *Ganoderma tropicum* presenta 2931 mg/100 g, y el hongo *Ganoderma lucidum* tiene 2920 mg/100 g. Por lo tanto, es posible afirmar que la concentración de flavonoides totales en el hongo *Pleurotus ostreatus* es significativamente menor en comparación con las especies estudiadas en el artículo mencionado. Esto se puede deber a diferentes factores como las características genéticas de las especies de hongos, las condiciones de cultivo, el sustrato utilizado, el estado de madurez en el momento de la cosecha, así como los métodos de extracción y análisis empleados.

$$(((40,990 \text{ mg}/1000 \text{ mL}) (10 \text{ mL})) / (0,5 \text{ g}))100\% = 81,98 \text{ mg}/100 \text{ g}$$

#### 3.5 Precisión

Con base en los resultados obtenidos de precisión de los tiempos de retención, se observa que existe una desviación estándar de aproximadamente 0,0100 y un coeficiente de variación de aproximadamente 0,1823%; donde se puede evidenciar que ambos parámetros estadísticos cumplen con lo establecido en la guía de validaciones de la FDA y en las guías de la ICH; permitiendo establecer que el método presenta una alta precisión. Así mismo, al comparar los resultados se evidencia que sin importar el número de veces que se inyecte la muestra en el sistema cromatográfico, los tiempos de retención siempre son similares y cercanos a 4,953 minutos, lo que representa que no existe una dispersión entre los datos, dándole una alta confiabilidad a la precisión de los tiempos de retención para la determinación de flavonoides totales, expresados en términos de quercetina en el extracto del hongo *Pleurotus ostreatus*.

539  
540 Cabe mencionar, que se realizó la prueba estadística ANOVA con el objetivo de evaluar  
541 la variabilidad de los datos de tiempos de retención de precisión, tanto dentro de los  
542 grupos, como entre los grupos estudiados. Para lo cual, inicialmente se plantea un test de  
543 hipótesis, donde para la hipótesis nula ( $H_0$ ), se establece que las medias son iguales,  
544 mientras que la hipótesis alternativa ( $H_1$ ), establece que existe una diferencia o  
545 desigualdad de las medias. Ahora bien, para evaluar los resultados obtenidos mediante el  
546 análisis de varianza de un factor se aplica el Test F, realizando la comparación entre el  
547 valor de F y el valor crítico para F; donde se puede evidenciar que el valor de F es mayor  
548 que su valor crítico establecido en la Tabla 5, por lo que se debe rechazar la hipótesis nula.  
549 Así mismo, mediante el valor de probabilidad presente en la Tabla 5, que representa el  
550 menor nivel de significancia al que se rechazaría la hipótesis nula y al compararla con la  
551 significancia establecida para el análisis (0,05), se evidencia que al ser menor también  
552 establece que debe rechazarse. Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, se observa  
553 que, al aplicar un análisis estadístico más robusto, se evidencia que el método no es  
554 totalmente preciso para los tiempos de retención sino que existe una dispersión entre los  
555 datos, así se cumpla con los parámetros estadísticos evaluados y establecidos en los libros  
556 de validaciones consultados, destacando que las diferencias en las medias pudieron  
557 deberse a el efecto de la matriz, puesto que como se expuso anteriormente los hongos son  
558 sustancias ricas en muchos compuestos, por lo que las interferencias pudieron generar  
559 dichas diferencias.

### 560 3.6 Exactitud.

561 Según lo establecido en la USP 41 en el capítulo 37, con la exactitud se busca conocer la  
562 proximidad existente entre los resultados obtenidos experimentalmente y el valor teórico,  
563 por medio del cálculo del porcentaje de recuperación del analito contenido en la muestra.  
564 Por lo tanto, se puede decir que el método resulta exacto ya que según los valores  
565 observados en la Tabla 7 y los criterios encontrados en la USP 41, cuando se obtiene un  
566 porcentaje de recuperación entre 90 a 110%, se puede establecer que los resultados  
567 obtenidos experimentalmente se encuentran cercanos al valor teórico [22]. Así mismo, se  
568 puede identificar que el menor rendimiento fue de 94,867% en una concentración de 1000  
569 ppm, mientras que el mayor fue de 99,824% en una concentración de 600 ppm; esta  
570 diferencia, pudo deberse a errores por parte de los experimentadores en la preparación  
571 del estándar como la cantidad pesada, volúmenes de solvente añadidos y condiciones  
572 ambientales que pudieron generar una degradación del patrón utilizado [23].

573 Por otro lado, al realizar el tratamiento estadístico utilizando la t de student, se puede  
574 observar que no hay una diferencia estadística significativa entre los valores obtenidos  
575 experimentalmente y los teóricos, por lo cual se puede aceptar la hipótesis nula; ya que  
576 los valores obtenidos de la t calculada es menor que la t tabulada (1,533) [18], esta última  
577 se obtuvo a un nivel de significancia o confianza de 90% (0,1) y a n grados de libertad; lo  
578 cual demuestra que la media de la muestra es significativamente similar al valor teórico  
579 y, por lo tanto, se puede confirmar que el método de separación y cuantificación de  
580 flavonoides totales expresados en términos de quercetina resulta ser exacto [24].

### 581 3.7 Límite de detección y Límite de cuantificación

582 De acuerdo con los resultados obtenidos para el cálculo de LOD y LOQ, se observa que a  
583 través del método propuesto no se pueden cuantificar con precisión y exactitud aceptable  
584 los analitos que presenten una concentración menor a 37,310 ppm. Además, no se detecta  
585 ninguna señal cuando la muestra presenta una concentración menor a 12,312 ppm. No  
586 obstante, cabe destacar que cuando la muestra se encuentra por debajo del límite de  
587 cuantificación puede ser detectada por el equipo, pero no con una alta confiabilidad en el



588 resultado, causando confusiones a la hora de realizar la lectura de los cromatogramas. Sin  
589 embargo, en el apartado de cuantificación, se evidencia que la concentración de la muestra  
590 analizada es de 40,990 ppm, la cual se encuentra por encima de los valores obtenidos de  
591 LOD y LOQ, por lo que esto permite tener seguridad de que la muestra es detectable y  
592 cuantificable de manera confiable.

### 593 *3.8 Reproducibilidad.*

594 Por otro lado, se puede decir que el método tiene cierto grado de Reproducibilidad en  
595 cuanto al tiempo de retención, ya que al observar los valores obtenidos en el porcentaje  
596 de coeficiente de variación para el tiempo de retención, se evidencia una diferencia de  
597 0,12% entre los valores obtenidos por el analista 1 y el analista 2, lo anteriormente  
598 mencionado se puede deber a la estabilidad de los flavonoides, ya que según [26], en su  
599 estudio identificó que los flavonoides se degradan mayormente en refrigeración que  
600 siendo almacenados en condiciones ambientales. Sin embargo, es importante mencionar  
601 que el método no se considera reproducible en cuanto a las áreas de los picos ya que se  
602 evidencian coeficiente de variación muy alto al revisar las áreas obtenidas; lo  
603 anteriormente mencionado se puede deber a la saturación de la columna al realizar el  
604 análisis respectivo, con los diferentes compuestos presentes en la muestra; ya que no se  
605 realizó un pretratamiento de la muestra antes de realizar el proceso de extracción [16].

### 606 *3.9 Robustez.*

607 Según lo establecido en la guía ICH Q2 (R2) la robustez debe ser evaluada con el fin de  
608 medir la capacidad del método analítico para obtener los criterios de desempeño  
609 esperados en su uso cotidiano frente a diferentes cambios operativos como equipos,  
610 analistas, temperatura, cambios de la fase móvil, entre otros; además de representar la  
611 fiabilidad de un procedimiento analítico [27]. Al realizar una variación en el pH de la fase  
612 móvil, para la evaluación de este parámetro se compararon los resultados obtenidos de  
613 este ensayo y los arrojados en reproducibilidad, en donde se observa un cambio en el  
614 coeficiente de variación tanto en el área como en el tiempo de retención; en el caso de este  
615 último, se evidencia un aumento de 0,11% a 0,33%, mientras que en el área se puede  
616 identificar una disminución en el coeficiente de variación de 5,14% al realizar el ensayo  
617 bajo las condiciones preestablecidas a 1,63% al cambiar el pH de la fase móvil. A pesar del  
618 cambio generado en estos dos parámetros (área y tiempo de retención); el cambio de pH  
619 resultó en una disminución del tailing que presentaban los picos de los cromatogramas  
620 obtenidos durante el ensayo de reproducibilidad, lo que se puede deber a que los  
621 flavonoides son compuestos polifenólicos que contienen grupos hidroxilo (-OH), que  
622 pueden protonarse en condiciones ácidas como se reporta en el artículo [14], lo que afecta  
623 las interacciones de los flavonoides en la fase estacionaria y modifica su polaridad.  
624 Además, un pH ácido favorece la escisión de los compuestos fenólicos unidos a proteínas  
625 y polímeros de carbohidratos presentes en la matriz del hongo, generando picos más  
626 resueltos y disminuyendo el tailing presente. Por otro lado, es importante mencionar que  
627 los flavonoides son inestables en pH básico, ya que se desprotonan y sus características  
628 iónicas aumentan, por lo que el uso de ácido fosfórico puede estar relacionado con la  
629 estabilidad de estos compuestos durante el estudio [14].

### 630 *3.10 Determinación de parámetros cromatográficos.*

#### 631 *3.10.1 Tiempo de retención corregido*

632 Este parámetro cromatográfico permite realizar una corrección y establecer el tiempo de  
633 retención que presenta el analito, sin tener en cuenta su paso a través de la fase  
634 estacionaria [17], obteniendo de esta manera el tiempo de retención corregido de 3,311  
635 minutos. Adicionalmente, cabe destacar que en la literatura y en los referentes como la

USP 41 no existe un tiempo correcto, dado que este tiempo depende netamente del método y el analito bajo estudio.

### 3.10.2 Factor de capacidad

Para este parámetro cromatográfico se pudo obtener un valor de 2,147, considerándose adecuado debido a que según la bibliografía consultada cuando se obtiene un valor entre 1 y 10, entre más cercano a 1 sea el dato obtenido en este parámetro indica que la elución del analito es cercana al tiempo muerto; mientras que un valor cercano a 20 indica la saturación de la columna [28]. Así mismo, resulta de gran importancia mencionar que el factor de capacidad obtenido para el presente estudio es bajo, lo que puede ser causado por el carácter polar de la queretina debido a que esta no queda tanto tiempo retenida en la columna [29]. Sin embargo, el valor obtenido se puede haber visto afectado por otros factores como la generación de otros picos.

### 3.10.3 Selectividad

De acuerdo con el resultado obtenido para selectividad, se puede evidenciar que es de 1,2204, el cual es adecuado y garantiza que la fase estacionaria proporciona una buena separación, dado que, de acuerdo con lo establecido en la teoría, se refiere que un resultado adecuado de selectividad es un valor mayor a 1 [17], por lo que el resultado de 1,2204 sugiere una diferencia en la retención de los componentes presentes en la matriz y así mismo establece una adecuada separación de los picos.

### 3.10.4 Número de platos teóricos y altura de plato

De acuerdo con los cálculos realizados para el número de platos teóricos, se obtuvo un valor de 1519,209 platos teóricos considerado adecuado, ya que según lo establecido en la literatura un valor óptimo para este parámetro es igual o mayor a 1000 platos teóricos; sin embargo, es de gran importancia resaltar que la USP 41 no establece un límite específico para la aceptación o la validación de este parámetro, debido a que los criterios de aceptación para el número de platos teóricos dependen del análisis que se está realizando y este depende de varios factores como la naturaleza del analito, la columna seleccionada y las condiciones cromatográficas [22].

Por otro lado, al realizar los cálculos para la altura de platos teóricos se obtuvo un valor de 0,0987 mm, considerado adecuado, ya que indica una capacidad de separación alta y eficiente; así mismo, es importante mencionar que este valor pudo verse afectado debido a que es un parámetro que depende de las condiciones y parámetros cromatográficos establecidos para cada método [30].

### 3.10.5 Resolución

La resolución, como parámetro cromatográfico, establece la capacidad de la columna para separar los picos de interés y como se observa en la ecuación presentada, sobre este parámetro influyen la eficiencia (N), la selectividad ( $\alpha$ ) y la retención (k)[17]. Adicionalmente, se destaca que para tener una mejor resolución se debe lograr que los picos se alejen tanto como sea posible entre ellos y, además, que la base del pico no sea ancha [18]. Ahora bien, de acuerdo con lo encontrado en la literatura, se establece que se debe tener como mínimo un valor igual a 1 para que se produzca una separación medible y se pueda realizar una cuantificación adecuada [31]. No obstante, para el presente método se obtuvo un valor de resolución de 1,200, por lo cual se establece que la separación en el método optimizado fue eficiente.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Equipos Utilizados

Los equipos utilizados para el desarrollo del proyecto de investigación fueron: un Liofilizador Lyovapor L-200 BUCHI, un pulverizador de alimentos secos, balanzas analíticas OHAUS PX224e, un agitador orbital Neuation Technologies, una centrifugadora AFI Sirena Refrigerada, un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Shimadzu i-series modelo LC2050, con una columna Ultra RESTEK®, la cual es de Octilsilano monómero (C8) y cuenta con un tamaño de partícula de 3  $\mu\text{m}$ , tamaño de poro de 100 Å y dimensiones de 150 mm x 4,6 mm. Adicionalmente, se utilizó un lector de microplacas iMark™ BIORAD, para el desarrollo de la prueba colorimétrica del tricloruro de aluminio.

### 4.2. Reactivos Utilizados

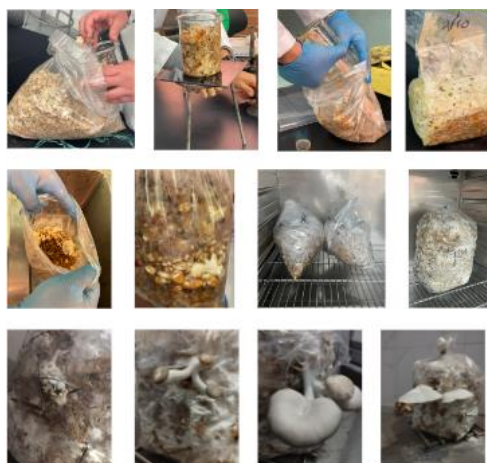
Los reactivos utilizados fueron: Etanol al 80%, Patrón de Quercetina Q4951-10G - SLCK5305 SIGMA = 95% (HPLC), Acetonitrilo HPLC, Agua, Tricloruro de aluminio, Etanol grado HPLC y Buffer de fosfatos (pH= 2,61).

### 4.3. Definición de condiciones cromatográficas

Para hallar las mejores condiciones de separación para la matriz biológica específica, se optimizaron según lo reportado [6] y [7] en las cuales se trabaja con flavonoides totales en diferentes matrices. Por otro lado, las muestras se inyectaron en un sistema cromatográfico de fase reversa compuesto por una fase móvil de acetonitrilo: agua (35:65) ambos grados HPLC y una fase estacionaria de octilsilano monomérico C8 (columna Ultra RESTEK®). Adicionalmente, se utilizó una temperatura de columna de 25°C, flujo isocrático de 1,0 mL/min, volumen de inyección de 3  $\mu\text{L}$  y longitud de onda de detección de 254 nm.

### 4.4. Cultivo del Hongo

Se llevó a cabo el cultivo propio de hongos *Pleurotus ostreatus* para garantizar condiciones óptimas y evitar interferentes químicos presentes en hongos comerciales [28]. Donde se adquirieron conocimientos básicos a través de un curso en la plataforma SENA SOFÍA PLUS sobre el cultivo casero de *Pleurotus ostreatus*. Del mismo modo, la semilla se obtuvo en el departamento de Micología de la Universidad Nacional de Colombia y se preparó un sustrato con residuos vegetales leñosos bajo las técnicas sanitaria [32]. Se destacó la importancia de asegurar la calidad del sustrato y se enfocó en factores como nutrientes, acidez, aireación y humedad [33]. Así como la siembra e inoculación se realizaron con condiciones específicas de humedad (75%), pH (6.5), temperatura (28 °C) y baja intensidad lumínica [34]. El proceso continuó en una incubadora, considerando factores físicos clave, como la temperatura (18-25 °C), humedad del sustrato (60-70%), humedad ambiental (80-90%), y luz tenue [32]. Posteriormente, en la postcosecha, se esperó que los hongos alcanzaran un tamaño de 5 a 20 cm con sombreros compactos y orillas de color café dirigidas hacia abajo y la recolección se realizó con un bisturí esterilizado para utilizar la materia prima en el estudio [35]; como se observa en la Figura 10. Este enfoque metódico asegura un control riguroso sobre el cultivo, desde la obtención de la semilla hasta la recolección de los cuerpos fructíferos, contribuyendo a la calidad y reproducibilidad de los resultados en la presente investigación.



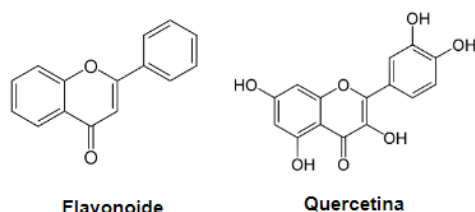
**Figura 10.** Cultivo hongo *Pleurotus ostreatus*. Fuente: Elaboración propia.

#### 4.5. Tratamiento de la muestra y extracción por solventes

Tras la postcosecha, se liofilizaron los cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*, bajo condiciones de  $-50.6^{\circ}\text{C}$  y  $0,100$  mbar durante 48 horas, utilizando un proceso de congelación para la deshidratación gradual y preservación del material fúngico. Al finalizar el proceso de liofilización, fueron llevadas las muestras a un pulverizador de alimentos secos. Posteriormente, según lo establecido por [36], se lleva a cabo la extracción con agua tipo 1, mientras que según [37], se emplea etanol grado HPLC. En este contexto, se evaluó la eficiencia de extracción de ambos solventes siguiendo los protocolos establecidos por los autores, ya que ambos trabajos previos reportaron el uso de esos solventes para extraer compuestos a partir de la misma matriz biológica (cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*). Por otro lado, se tomaron  $0,5$  gramos del hongo pulverizado y se mezclaron con diferentes volúmenes de cada solvente ( $10$  mL,  $15$  mL y  $20$  mL), la agitación se realizó en un agitador orbital a  $150$  rpm durante 24 horas, seguido de centrifugación a  $5000$  rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se pasó por un filtro de jeringa UNIFLO PTFE ( $0,2$   $\mu\text{m}$ ) para eliminar partículas del extracto, garantizando una extracción efectiva de los compuestos de interés.

#### 4.6. Prueba de Tricloruro de aluminio

Para desarrollar la prueba de tricloruro de aluminio, se agregaron  $50$   $\mu\text{L}$  de cada uno de los extractos resultantes con los diferentes solventes (agua en volúmenes de  $10$  mL,  $15$  mL y  $20$  mL, y etanol en volúmenes de  $10$  mL,  $15$  mL y  $20$  mL) a cada pozo en una microplaca de 96 pozos. Asimismo, se realizaron muestras con patrón de quercetina para la construcción de la curva de calibración, utilizando diferentes concentraciones, además de llevar a cabo controles negativos, que consistían en muestras de solo agua, y controles positivos que correspondían al estándar, para verificar la correcta ejecución de la prueba. Luego, se añadieron  $50$   $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{AlCl}_3$  preparada al 2% en etanol, donde después de dejar reposar durante 1 hora a temperatura ambiente, se leyeron los resultados en un lector de microplacas a una longitud de onda de  $420$  nm. Es importante destacar que se realizó el ensayo por triplicado para cada muestra, siguiendo el protocolo establecido por [38].



**Figura 11.** Estructura base de los flavonoides y quercetina. Fuente: Elaboración propia.

#### 4.7. Validación del método

##### 4.7.1 Linealidad

Para la determinación de la linealidad, inicialmente se preparó una curva de calibración mediante el método de adición estándar, para lo cual se prepararon 11 puntos de calibración, incluyendo un blanco, a los cuales se les agregó un mismo volumen de extracto (600  $\mu$ L) y se les añadió un volumen variable de patrón de quercetina. Donde se realizó la construcción de la curva de calibración, corriendo cada una de las muestras preparadas a través del sistema cromatográfico y a su vez, esto se realizó por triplicado. Finalmente, con los datos obtenidos se sacó el promedio de las 3 corridas y se construyó la curva de calibración; a partir de la cual se obtuvo la ecuación de la recta mediante una regresión lineal y también se obtuvo el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) el cual indica la linealidad del método [39].

##### 4.7.2 Cuantificación

Considerando la ecuación de la recta derivada del análisis de linealidad, se procedió a realizar la correlación pertinente para la cuantificación de flavonoides totales expresados en equivalentes de quercetina, teniendo en cuenta el método utilizado de adición estándar que relaciona la ecuación de la recta y los volúmenes de las muestras empleados, esto mediante la siguiente ecuación.

$$Cx=(b/m) (V_f / V_0)$$

Dónde:

- Cx= Concentración del analito - Vf= Volumen de aforo
- b= Punto de corte de la curva de calibración - Vo= Volumen de muestra
- m= Pendiente

##### 4.7.3 Precisión

Para la determinación de la precisión del método, se prepararon 3 patrones de concentración determinada, las cuales se encontraban dentro de las evaluadas en la curva de calibración realizada para determinar la linealidad. Por lo que se escogieron 600 ppm, 800 ppm y 1000 ppm. Posteriormente, se corrió cada una de las muestras 4 veces en el sistema cromatográfico. Finalmente, se compararon los tiempos de retención y se aplicó el tratamiento estadístico, para determinar su promedio, desviación estándar y coeficiente de variación [39].

#### 4.7.4 Reproducibilidad

Para evaluar la reproducibilidad del método, se llevó a cabo la inyección de una muestra estándar de quercetina cinco veces bajo las condiciones cromatográficas establecidas y una concentración de 800 ppm. Sin embargo, se estableció una variable al considerar distintos experimentadores; en donde cada investigador preparó de manera independiente soluciones de concentración conocida. Estas soluciones se inyectaron en diferentes horarios para reflejar la variabilidad temporal y fueron tratadas estadísticamente. La comparación de los resultados incluyó la medición del promedio, el coeficiente de variación y la desviación estándar, permitiendo una evaluación integral de la reproducibilidad del método [24]. Por otro lado, es importante mencionar que las muestras se mantuvieron bajo refrigeración después del procedimiento realizado por el analista 1, con el fin de conservar la integridad del analito presente en el extracto.

#### 4.7.5. Exactitud

Para determinar la exactitud del método se utilizaron los mismos patrones usados para el análisis de la precisión del método, por lo cual se tenían 3 patrones de concentraciones conocidas (600 ppm, 800 ppm y 1000 ppm), se inyectaron en el sistema cromatográfico, y se analizaron por triplicado [24]. Cabe destacar que este parámetro se determinó mediante el porcentaje de recuperación, que se basa en la comparación entre el valor teórico de concentración preparada de estándar y la real obtenida mediante la regresión lineal, teniendo en cuenta el promedio de las lecturas de cada estándar realizadas, así:

$$\% \text{ de recuperación} = (X_m / \mu) \times 100$$

Donde:

$X_m$  = Valor medio hallado

$\mu$  = Valor aceptado como verdadero [11]

#### 2.7.6 Límite de detección y cuantificación

Para la determinación del límite de detección y cuantificación, se partió de la curva de linealidad y cuantificación. Posteriormente, con los resultados obtenidos, se realizó el análisis de regresión lineal, obteniendo la ecuación de la recta, mediante la cual se obtuvo la pendiente y además se calculó el error típico [40]. Lo anterior se realiza para luego aplicar las siguientes ecuaciones con el fin de determinar el LOD y el LOQ:

$$\text{LOD} = (3,3 \times \text{Error Típico}) / m$$

$$\text{LOQ} = (10 \times \text{Error Típico}) / m$$

#### 4.7.7 Robustez

Para la determinación de la robustez se realizó la corrida cromatográfica cinco veces de un patrón de quercetina con una concentración de 600 ppm; sin embargo, se acidificó la fase móvil, quedando ácido fosfórico 0,1% vol/vol con un pH de 2,61 y acetonitrilo en una proporción de 65:35 respectivamente [41]. Por otro lado, se volvió a analizar el mismo estándar de quercetina, pero en esta ocasión bajo las mismas condiciones del estudio (acetonitrilo: agua (35:65)), con el fin de realizar la evaluación de este parámetro, donde lo anterior se realizó con el fin de comparar los resultados de robustez y reproducibilidad y relacionar los promedios de los tiempos de retención y las áreas obtenidas en cada uno de los ensayos [42].

## 5. Conclusiones

Se optimizó apropiadamente un método de extracción y separación de flavonoides totales en equivalentes de quercetina, de un extracto del hongo *Pleurotus ostreatus* mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Donde se exploraron diferentes condiciones iniciales y ajustes de parámetros cromatográficos, utilizando como base las investigaciones previas de [6] y [7], a través de un proceso iterativo, en el que se obtuvo una resolución adecuada de los picos cromatográficos, a pesar de la persistencia de algunos desafíos, como la superposición de picos y la presencia de tailing, como se evidencia en los cromatogramas presentes en el trabajo de investigación. Así mismo, se observa que el método es adecuado y que los tiempos de retención fueron consistentes, lo cual garantiza exactitud y fiabilidad de los resultados. No obstante, es relevante mencionar la importancia de realizar una preextracción de la muestra con el fin de evitar una sobrecarga en la columna y facilitar su análisis en el equipo. Por otro lado, se observó una separación satisfactoria de los picos de los analitos, indicando una adecuada selectividad y resolución cromatográfica, lo cual respalda la idoneidad y fortalece la validez y la confiabilidad de los resultados obtenidos. Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados, se evidencia que el método no fue reproducible en cuanto a las áreas de los picos, ni preciso en cuanto a los tiempos de retención y áreas del pico, por lo que se requieren otras investigaciones que apliquen diferentes herramientas estadísticas con el fin de realizar una validación óptima del método. Por lo tanto, la optimización del método específico para la separación y cuantificación de flavonoides totales en el hongo *Pleurotus ostreatus* no solo abordó la escasez de investigaciones en este campo, sino que también facilitó la generación de datos confiables para futuros estudios. Al establecer un enfoque que sentará las bases para investigaciones más profundas que exploren el potencial terapéutico de estos flavonoides, respaldando así el avance en el campo de la micología y la aplicación medicinal del hongo *Pleurotus ostreatus*.

**Agradecimientos:** Expresamos nuestros sinceros agradecimientos al profesor Emerson León, por su orientación, apoyo y dedicación a lo largo de este proceso. También a la Universidad El Bosque, por apoyarnos en nuestra formación profesional y por brindarnos los espacios para llevar a cabo el proceso experimental. Gracias a Dios y a nuestras familias por su amor incondicional, paciencia y apoyo emocional. Además, expresamos nuestro agradecimiento al profesor Wilson Moscoso, por su orientación y ayuda en el proceso de cultivo de la materia prima para nuestra tesis; así como a los docentes Darío Tinjacá y a Jaime Vargas por su tiempo, dedicación y criterio al leer el presente trabajo de investigación. Por último, agradecemos a nuestros amigos y seres queridos, por su aliento y motivación constante. Su apoyo ha sido fundamental para la realización de este proyecto.

## 6. Referencias bibliográficas.

- [1] M. C. Ciappini, M. B. Gatti, and M. L. López Zamora, "Pleurotus ostreatus, una opción en el menú: estudio sobre las gírgolas en la dieta diaria," *Invenio: Revista de investigación académica*, ISSN-e 0329-3475, No. 12, 2004, págs. 127-132, no. 12, pp. 127–132, 2004.
- [2] D. N. Ávila, M. V. Orozco, B. B. Amador, and A. M. M. Buelvas, "Pleurotus: Un hongo comestible con propiedades Nutricionales, Medicinales e Importancia Ambiental," *Microciencia*, vol. 10, pp. 134–148, 2021.
- [3] K. P. Pinos Coello, "Aprovechamiento de hongos (pleurotus ostreatus) en la degradación lignocelulósica de residuos de cosecha para la obtención de abono orgánico, en la zona de mocache.," 2020.
- [4] C. Sánchez, "Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms," *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 85, no. 5, pp. 1321–1337, 2010, doi: 10.1007/s00253-009-2343-7.
- [5] A. N. Panche, A. D. Diwan, and S. R. Chandra, "Flavonoids: An overview," *J Nutr Sci*, vol. 5, 2016, doi: 10.1017/jns.2016.41.

- [6] V. P. Rodriguez and C. A. Moya, "Validación de un método de separación y cuantificación de flavonoides totales expresados como Quercetina en la cáscara de mango Tommy Atkins 'Mangifera Indica. L' de Cundinamarca, Colombia mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia con detector UV-VIS," Universidad El Bosque , Bogotá , 2023.
- [7] D. X. González Cifuentes and S. A. Orozco Izquierdo, "Validación de un método de separación y cuantificación de flavonoides totales por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector UV/Vis en la planta *Phytolacca octandra* L," Universidad El Bosque , Bogotá, 2023.
- [8] J. Cilerdzic, M. Stajic, J. Vukojevic, I. Milovanovic, and N. Muzgonja, "Antioxidant and antifungal potential of *Pleurotus ostreatus* and *Agrocybe cylindracea* basidiocarps and mycelia," *Curr Pharm Biotechnol*, vol. 16, no. 2, pp. 179–186, Jan. 2015, doi: 10.2174/1389201015666141202152023.
- [9] V. Surendra and A. Q. Ruiz, "Critical values for six Dixon tests for outliers in normal samples up to sizes 100, and applications in science and engineering," *Rev. Mex. Ciencias Geol.*, vol. 23, no. 3, pp. 302–319, 2006.
- [10] E. Poma Gil and R. N. Saldaña Tarrillo, "Cuantificación de flavonoides y taninos en geles elaborados a base del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Cupressus sempervirens* L. "ciprés"; con efecto cicatrizante," *Univ. Priv. Antonio Guillermo Urrelo*, Jun. 2020.
- [11] F. Ianni et al., "Extraction optimization by experimental design of bioactives from *pleurotus ostreatus* and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities," *Processes*, vol. 9, no. 5, p. 743, May 2021, doi: 10.3390/PR9050743/S1.
- [12] R. Hilma and H. Almuradani, "Determination of Total Phenolic, Flavonoid Content Andfree Radical Scavenging Activity of Etanol Extract Sawo Stem Bark (*Manilkara Zapota* (L.)), " *Conf. Proc. CelSciTech-UMRI*, vol. 3, 2018.
- [13] E. E. León Ávila, "Desarrollo de un método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la separación y cuantificación de diosgenina en un extracto del fruto iguaraya de la planta cardón guajiro (*Stenocereus griseus*)," *Av. en Química*, ISSN-e 1856-5301, Vol. 18, No. 2, 2023, págs. 55-59, vol. 18, no. 2, pp. 55–59, 2023.
- [14] N. Nuengchamng, A. Hermans-Lokkerbol, and K. Ingkaninan, "Separation and Detection of the Antioxidant Flavonoids, Rutin and Quercetin, Using HPLC Coupled on-line With Colorimetric Detection of Antioxidant Activity," *Naresuan Univ. J.*, vol. 12, no. 2, pp. 25–37, 2004.
- [15] USP 41, "USP 41 <1225> VALIDACIÓN DE PROCEDIMIENTOS FARMACOPEICOS," 2017. [Online]. Available: [https://online.uspnf.com/uspnf/document/4\\_GUID-E2C6F9E8-EA71-4B72-A7BA-76ABD5E72964\\_4\\_es-ES](https://online.uspnf.com/uspnf/document/4_GUID-E2C6F9E8-EA71-4B72-A7BA-76ABD5E72964_4_es-ES)
- [16] Instituto Nacional de Metrología, Validación de Métodos en Análisis Química Cuantitativo. 2023. [Online]. Available: [www.inm.gov.co](http://www.inm.gov.co)
- [17] O. Quattrocchi, S. Andrezzi, and R. Laba, "Introduccion a la HPLC, Aplicacion y Practica," 1992. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/315771927>
- [18] D. A. Skoog et al., "Principios de análisis instrumental Revisión técnica," 2008.
- [19] A. T. Bristy, T. Islam, R. Ahmed, J. Hossain, H. M. Reza, and P. Jain, "Evaluation of Total Phenolic Content, HPLC Analysis, and Antioxidant Potential of Three Local Varieties of Mushroom: A Comparative Study," *Int. J. Food Sci.*, vol. 2022, 2022, doi: 10.1155/2022/3834936.
- [20] I. González-Palma et al., "Evaluation of the Antioxidant Activity of Aqueous and Methanol Extracts of *Pleurotus ostreatus* in Different Growth Stages," *Front. Microbiol.*, vol. 7, no. JUL, p. 1099, Jul. 2016, doi: 10.3389/FMICB.2016.01099.
- [21] S. G. Dmitrienko, V. A. Kudrinskaya, and V. V. Apyari, "Methods of extraction, preconcentration, and determination of quercetin," *J. Anal. Chem.* 2012 674, vol. 67, no. 4, pp. 299–311, Apr. 2012, doi: 10.1134/S106193481204003X.
- [22] USP, "<1225> Validación de procedimientos farmacopeicos," in *Farmacopea USP*, 2021, pp. 1–42.
- [23] T. Cheng et al., "Analysis of human errors in Human-autonomy collaboration in autonomous ships operations through shore control experimental data," *Reliab Eng Syst Saf*, p. 110080, 2024, doi: 10.1016/j.ress.2024.110080.
- [24] AEFI, "Validación de métodos analíticos." p. 315, 2001.
- [25] V. Vargas Franco, *Estadística descriptiva para ingeniería ambiental con SPSS*, vol. 81, no. 184. 2007.
- [26] C. López, C. G. Gallardo, M. J. Guerrero Ochoa, G. Mariño, B. Jácome, and E. B. Sinchiguano, "Estudio de la estabilidad de los antioxidantes del vino de flor de Jamaica (*Hibiscus saabdariffa* L) en el almacenamiento.," *Granja*, vol. 29, no. 1, pp. 105–118, 2019, doi: 10.17163/lgr.n29.2019.09.
- [27] ICH, "Validation of analytical procedures Q2(R2)," *International council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use*, vol. 6, no. November, p. 36, 2023.
- [28] Harvey David. *Modern Analytical Chemistry*. Ed. Mc Graw Hill. España. 2002
- [29] ICH, "Analytical procedure development Q14," *ICH Guidnace*, vol. 1, no. 1, pp. 1–29, 2023.



- [30] Agilent Technologies, "Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC): fundamentos y teoría," 2016.}
- [31] G. A. Obando, A. Vásquez García, D. E. Benavides Palacios, and H. F. Jojoa Martínez, "Producción de hongo orellana (*Pleurotus ostreatus*) sobre residuos agrícolas y pastos generados en la comunidad de Obonuco, Nariño," *Rev. Colomb. Investig. Agroindustriales*, vol. 9, no. 2, pp. 42–54, Sep. 2022, doi: 10.23850/24220582.4865.
- [32] J. E. Ortiz García, D. E. González Morales, Y. Mejía Agudelo, L. S. García-Alzate, and X. Cifuentes-Wchima, "Evaluación de la biomasa residual (cereza) de café como sustrato para el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*," *Rev. ION*, vol. 33, no. 1, Jun. 2020, doi: 10.18273/revion.v33n1-2020009.
- [33] Z. Girmay, W. Gorems, G. Birhanu, and S. Zewdie, "Growth and yield performance of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Fr.) Kumm (oyster mushroom) on different substrates," *AMB Express*, vol. 6, no. 1, p. 87, Dec. 2016, doi: 10.1186/s13568-016-0265-1
- [34] S. Sofia Plus, "Cultivo comercial de la orellana," 2023. [Online]. Available: <https://oferta.senasofiaplus.edu.co/sofia-oferta/detalle-oferta.html?fm=0&fc=y6vpILhsssQ>. [Accessed: 25-Mar-2024].
- [35] F. Fernández Rodríguez, M. B. Ruilova Cueva, and A. Hernández Monzón, "Programa para el diseño de mezclas de residuos agrícolas para el cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*," *Tecnol. Química*, vol. 34, no. 2, pp. 158–169, 2014.
- [36] L. A. Pascual-Pineda, A. Hernández-Marañón, M. Castillo-Morales, R. Uzárraga-Salazar, M. P. Rascón-Díaz, and E. Flores-Andrade, "Effect of water activity on the stability of freeze-dried oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) powder," *Dry. Technol.*, vol. 39, no. 8, pp. 989–1002, May 2021, doi: 10.1080/07373937.2020.1739064.
- [37] B. Goswami, S. Majumdar, A. Das, A. Barui, and J. Bhowal, "Evaluation of bioactive properties of *Pleurotus ostreatus* mushroom protein hydrolysate of different degree of hydrolysis," *LWT*, vol. 149, p. 111768, Sep. 2021, doi: 10.1016/j.lwt.2021.111768.
- [38] L. Amaya and C. Portillo, "Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio chaparras por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible.," San Salvador, Nov. 2013.
- [39] AEFI, "Validación de Métodos Analíticos," 2001.
- [40] ICH, "ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Step 5 NOTE FOR GUIDANCE ON VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY (CPMP/ICH/381/95) APPROVAL BY CPMP November 1994 DATE FOR COMING INTO OPERATION," 1995. [Online]. Available: <http://www.emea.eu.int>
- [41] E. León Ávila and J. Guevara Pulido, "Development of a RP-HPLC Method for Separating and Quantifying Muscimol in Different Developmental Stages of the Fungus *Amanita muscaria*," *J. Chem.*, vol. 2020, p. 8859998, Jan. 2020, doi: 10.1155/2020/8859998.
- [42] FDA, "Validation of Chromatographic Methods," 1994.