

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 Fernando Nope Páez^a, Lina María Ortiz Ulloa^b, Juliana Racines González^c & Emerson Eliecer León Ávila^{d*}

INQA Research Group, Facultad de Ciencias, Universidad El Bosque, Bogotá D. C., Colombia
leonemerson@unbosque.edu.co

Correos electrónicos: ^a dnope@unbosque.edu.co, ^b lortizu@unbosque.edu.co,
^c jrachines@unbosque.edu.co, ^d leonemerson@unbosque.edu.co

*Autor para correspondencia

Recibido: 11 de febrero de 2025

Corregido: 8 de julio de 2025

Aceptado: 11 de agosto de 2025

<https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n3.118793>

RESUMEN

Introducción: El hongo *Pleurotus ostreatus* es reconocido por su alto contenido de flavonoides, como la quercetina, compuestos con importantes intereses en el campo farmacológico, por sus propiedades antiinflamatorias y por su potente poder antioxidante que permite combatir el daño celular causado por los radicales libres. **Objetivo:** Por esto, este estudio se centra en determinar el aporte de flavonoides de este hongo, estableciendo un método eficiente y reproducible para la separación y cuantificación de flavonoides totales en términos de quercetina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). **Metodología:** Se llevaron a cabo extracciones con diversos solventes, seguidas de una prueba de tricloruro de aluminio mediante la medición espectrofotométrica a 420 nm para determinar la posible cantidad de flavonoides y seleccionar el solvente óptimo para su posterior análisis en HPLC. **Resultados:** Las condiciones cromatográficas establecidas fueron, una fase móvil de acetonitrilo:agua (35:65), una columna de cromatografía C8, una temperatura de 25°C, un flujo isocrático de 1,0 mL/min, volumen de inyección de 3 uL y longitud de onda de detección de 254 nm. La cuantificación de quercetina se realizó mediante el método de adición estándar, obteniendo una concentración de 40,990 ppm, lo que confirma que este hongo tiene gran aporte de flavonoides en términos de quercetina.

Palabras clave: Validación; quercetina; *Pleurotus ostreatus*; flavonoides.

SUMMARY

Optimization of an analytical method for the separation and quantification of total flavonoids expressed as quercetin equivalents in an extract of *Pleurotus ostreatus* mushroom by high performance liquid chromatography (HPLC)

Introduction: The fungus *Pleurotus ostreatus* is recognized for its high flavonoid content, such as quercetin, compounds with significant interest in the pharmacological field, due to their anti-inflammatory properties and their powerful antioxidant power that allows them to combat cellular damage caused by

free radicals. **Objective:** Therefore, this study focuses on determining the flavonoid content of this fungus, establishing an efficient and reproducible method for the separation and quantification of total flavonoids in terms of quercetin using high-performance liquid chromatography (HPLC). **Methodology:** Extractions with various solvents were carried out, followed by an aluminum chloride test using spectrophotometric measurement at 420 nm to determine the potential flavonoid content and select the optimal solvent for subsequent HPLC analysis. **Results:** The chromatographic conditions were established with a mobile phase of acetonitrile:water (35:65), a C8 column, a temperature of 25 °C, an isocratic flow of 1.0 mL/min, an injection volume of 3 µL, and a detection wavelength of 254 nm. The analyte quantification was performed using the standard addition method, obtaining a concentration of 40.990 ppm, which confirms that this mushroom has a high contribution of flavonoids in terms of quercetin.

Keywords: Validation; quercetin; *Pleurotus ostreatus*; flavonoids.

RESUMO

Otimização de um método analítico para a separação e quantificação de flavonoides totais expressos em equivalentes de quercetina em um extrato do cogumelo *Pleurotus ostreatus* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Introdução: O cogumelo *Pleurotus ostreatus* é reconhecido por seu alto teor de flavonoides, como a quercetina, compostos com significativo interesse farmacológico, por suas propriedades anti-inflamatórias e por seu potente poder antioxidante que combate os danos celulares causados por radicais livres. **Objetivo:** Portanto, este estudo se concentra na determinação do teor de flavonoides deste cogumelo, estabelecendo um método eficiente e reprodutível para a separação e quantificação de flavonoides totais em termos de quercetina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Metodologia:** As extrações foram realizadas com diversos solventes, seguidas de um ensaio com tricloreto de alumínio por espectrofotometria a 420 nm para determinar a quantidade potencial de flavonoides e selecionar o solvente ideal para posterior análise por CLAE. **Resultados:** As condições cromatográficas foram: fase móvel de acetonitrila:água (35:65), coluna cromatográfica C8, temperatura de 25 °C, vazão isocrática de 1,0 mL/min, volume de injeção de 3 uL e comprimento de onda de detecção de 254 nm. A quercetina foi quantificada pelo método de adição de padrões, obtendo-se uma concentração de 40,990 ppm, confirmando que este cogumelo possui alto teor de flavonoides em termos de quercetina.

Palavras-chave: Validação; quercetina; *Pleurotus ostreatus*; flavonoides.

1. INTRODUCCIÓN

El hongo *Pleurotus ostreatus*, también conocido como hongo ostra, es un basidiomiceto muy consumido actualmente por la población en general, de gran interés debido a su versatilidad nutricional y su capacidad de adaptación a diversos sustratos. Este es originario de Asia [1], su cultivo se ha expandido a distintas regiones de Latinoamérica, como México, Brasil y Colombia, impulsado por su creciente consumo como sustituto de la carne en dietas veganas y vegetarianas [2]. Además de su valor nutricional, este hongo ha captado la atención de la comunidad científica por su alto contenido de compuestos bioactivos, en particular flavonoides como la quercetina, los cuales poseen propiedades antioxidantes y farmacológicas con potencial para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades [3].

Los flavonoides son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en plantas, vegetales, algunas bebidas y hongos, cuya estructura fenólica les confiere importantes beneficios para la salud [4]. La quercetina, uno de los flavonoides más estudiados, ha demostrado efectos antioxidantes y antiinflamatorios, contribuyendo a la reducción del riesgo de enfermedades

cardiovasculares y otras condiciones asociadas al estrés oxidativo. Sin embargo, la cuantificación precisa de estos compuestos en matrices biológicas complejas, como los hongos, representa un desafío analítico debido a la diversidad estructural de los flavonoides y la presencia de otros metabolitos interferentes [5].

En este contexto, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se ha consolidado como una herramienta fundamental para la separación y cuantificación de flavonoides, proporcionando alta sensibilidad y especificidad. No obstante, la implementación de este método en extractos de *Pleurotus ostreatus* requiere una cuidadosa selección de las condiciones cromatográficas para garantizar resultados confiables y reproducibles. Son muy pocos los estudios que se han encontrado donde se aborde la validación de un método específico para la cuantificación de flavonoides totales en términos de equivalentes de quercetina en esta especie fúngica, lo que resalta la necesidad de desarrollar un enfoque analítico riguroso [6].

El presente estudio contribuye al conocimiento en el área mediante la optimización y validación de un método analítico robusto para la separación y cuantificación de flavonoides totales en términos de quercetina para extractos de *Pleurotus ostreatus*, estableciendo parámetros de validación como exactitud, precisión, especificidad, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación y robustez [7]. Este trabajo representa un avance significativo en la caracterización química de este hongo, proporcionando un método analítico confiable que puede ser utilizado en futuras investigaciones sobre su potencial farmacológico y nutracéutico.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Equipos utilizados

Los equipos utilizados para el desarrollo del proyecto de investigación fueron: un Liofilizador Lyovapor L-200 BUCHI, un pulverizador de alimentos secos, balanza analítica 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 μm , tamaño de poro de 100 Å y dimensiones de 150 mm \times 4,60 mm. Adicionalmente, se utilizó un lector de microplacas iMark™ BIORAD, para el desarrollo de la prueba colorimétrica del tricloruro de aluminio.

2.2. Reactivos

Los reactivos utilizados fueron: Etanol al 80%, Patrón de Quercetina Q4951-10G - SLCK5305 SIGMA = 95% (HPLC), Acetonitrilo HPLC, Agua con tratamiento, Tricloruro de aluminio, Etanol grado HPLC y Buffer de fosfatos (pH= 2,61); es importante mencionar que los reactivos previamente mencionados son de marca Merck provenientes de Estados Unidos.

2.3. Definición de condiciones cromatográficas

Con el objeto de determinar las condiciones cromatográficas de separación para la matriz biológica específica, se optimizaron las condiciones obtenidas después de una revisión bibliográfica, en las cuales se trabaja con flavonoides totales en diferentes matrices, donde se evidencia una mayor importancia en la composición de la fase móvil. Es por esto que se inició la optimización de las condiciones por medio de la inyección de un patrón de concentración conocida, y el extracto resultante del hongo en el sistema cromatográfico de fase reversa, con unas condiciones iniciales de una fase móvil de acetonitrilo: agua (50:50) ambos grados HPLC y una fase estacionaria de octilsilano monomérico C8 (columna Ultra RESTEK®). Adicionalmente, se utilizó una temperatura de columna de 25,0 °C, flujo isocrático de 1,00 mL/min, volumen

de inyección de 3,00 μ L y longitud de onda de detección de 254 nm. Esto con el objeto de analizar el comportamiento de las muestras a estas condiciones y poder realizar los ajustes necesarios para obtener un número de platos teóricos óptimo, con resolución y sensibilidad a la hora de la separación y cuantificación del analito.

2.4. Cultivo del Hongo

Con el objetivo de estandarizar y reconocer las condiciones exactas de crecimiento, se llevó a cabo el cultivo propio de hongos *Pleurotus ostreatus* garantizando condiciones óptimas y así evitar interferentes químicos presentes en hongos comerciales [8]. 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 sanitarias [9]. Se destacó la importancia de asegurar la calidad del sustrato y se enfocó en factores como nutrientes, acidez, aireación y humedad. Así, la siembra e inoculación se realizaron con condiciones específicas de humedad (75%), pH (6.5), temperatura (28 °C) y baja intensidad lumínica [10]. 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. 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 [11]; como se observa en la Figura 1. 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 1. Cultivo hongo *Pleurotus ostreatus*. Fuente: Elaboración propia.

2.5. Tratamiento de la muestra y extracción por solventes.

Tras la postcosecha, se liofilizaron los cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*, bajo condiciones de -50.60 °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. Tras la revisión bibliográfica realizada se opta por realizar la extracción con dos tipos de solventes, según lo

establecido por Pascual *et al.* [12], se lleva a cabo una extracción con agua, mientras que según Goswami *et al.* [13], se emplea etanol grado HPLC. En este contexto y con el objeto de evaluar la eficiencia de extracción de ambos solventes, se siguieron los protocolos establecidos por los autores, ya que ambos trabajos previos reportaron el uso de estos solventes para extraer compuestos a partir de la misma matriz biológica (cuerpos fructíferos de *Pleurotus ostreatus*). Se tomaron 0,500 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 (0,200 μ m) para eliminar partículas del extracto, garantizando una extracción efectiva de los compuestos de interés.

2.6. Prueba de Tricloruro de aluminio

Para desarrollar la prueba de tricloruro de aluminio, se agregaron 50 μ 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 μ L de una solución de $AlCl_3$ 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 Amaya *et al.* [14].

2.7. Validación del método cromatográfico

2.7.1. 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 μ 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 determinación (R^2) el cual indica la linealidad del método [15].

2.7.2. 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.

2.7.3. 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 [15].

2.7.4. 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 [15]. 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.

2.7.5. 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. 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.

2.7.6. Límite de detección y cuantificación

Para la determinación del límite de detección y cuantificación, se preparó una curva de calibración de 6 puntos mediante el método de adición estándar con concentraciones de 0, 2, 5, 15, 25 y 50 ppm, donde se corrió cada uno de estos en el sistema cromatográfico y se analizó por duplicado. Posteriormente, se construyó la curva de calibración con los resultados obtenidos y 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 [15].

2.7.7. 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% v/v con un pH de 2,61 y acetonitrilo en una proporción de 65:35 respectivamente [16]. Por otro lado, se analizó 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 [16].

3. RESULTADOS

3.1. Extracción con diferentes solventes

La extracción de flavonoides totales en un extracto del hongo *Pleurotus ostreatus* fue llevada a cabo en diferentes solventes y volúmenes (Ver Tabla 1) por medio de agitación durante 24

horas; en dicha extracción se evidenció que al terminar el tiempo, los solventes habían cambiado de incoloro a café claro, indicando que no solo se extrajeron flavonoides, sino otro tipo de metabolitos secundarios o incluso otros polifenoles, como los taninos los cuales son solubles en solventes polares como el etanol y son responsables de coloraciones marrones, por lo que es probable que el tiempo prolongado de extracción y la agitación constante hayan facilitado la solubilización de estos compuestos poliméricos [17].

3.2. Selección de extracto por prueba de Tricloruro de aluminio

Para la determinación del mejor solvente el cual sería empleado para la posterior optimización de las condiciones de separación y cuantificación, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se aplicó un método convencional diseñado para minimizar interferencias de otros compuestos fenólicos. Este método implicó la formación de complejos entre los hidroxilos vecinales de las estructuras base de los flavonoides difenil-piranos (C3-C6-C3) y el AlCl_3 [18]. La prueba con quercetina en la placa de 96 pozos (ver Figura 2) y la medición espectrofotométrica a 420 nm confirmaron la presencia de flavonoides totales para su posterior cuantificación [19]. Además, la construcción de la curva de calibración mediante el método de estándar externo mostró un 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 para determinación del mejor solvente de extracción para la matriz del hongo *Pleurotus ostreatus*, resultados concentración obtenidos (ppm) vs 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

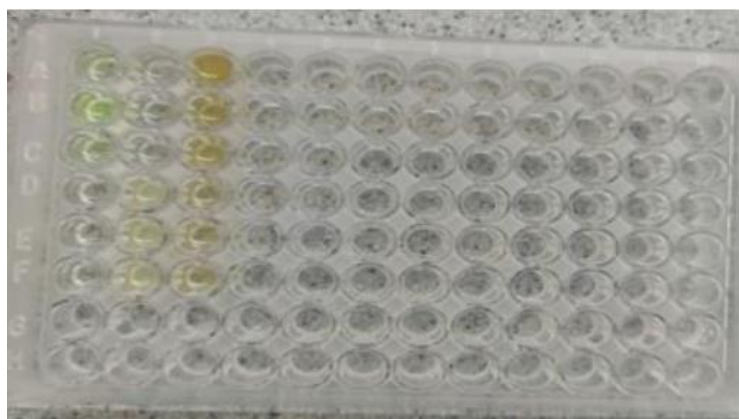


Figura 2. Placa de 96 pozos con prueba de tricloruro de aluminio (AlCl_3).

Tabla 2. Datos para construcción de curva de calibración realizada mediante la prueba de Tricloruro de Aluminio (AlCl_3) - Resultados de Concentración de Patrón (ppm) y Absorbancia obtenidos

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 3), 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 del analito con el Tricloruro de Aluminio (AlCl_3).

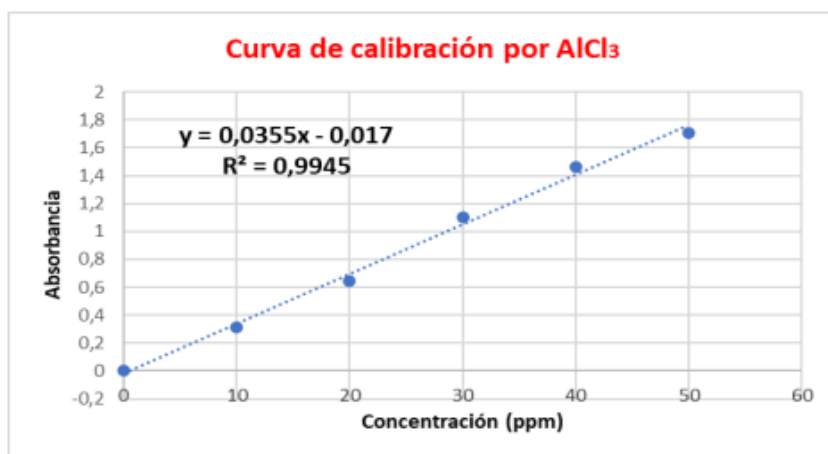


Figura 3. Curva de calibración resultante de la prueba de Tricloruro de Aluminio (AlCl_3)

3.3. Validación de la metodología analítica

3.3.1. Definición de Condiciones cromatográficas

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); Inicialmente se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva, realizando la búsqueda de artículos en los cuales se estudian métodos validados y cuyo analito de interés eran los flavonoides totales expresados en términos de quercetina, con el fin de establecer unas condiciones iniciales y poder optimizar dichos parámetros cromatográficos a la matriz del hongo *Pleurotus Ostreatus*. Cabe destacar, que la optimización implicó un proceso iterativo de buscar y 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. Posterior al ajuste de los parámetros cromatográficos, se establecieron las siguientes condiciones: fase móvil 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 μm , un tamaño de poro de 100 Å y dimensiones de 150 mm x 4,6 mm. La temperatura de la columna se fijó en 25 °C, con un flujo isocrático de 1,0 mL/min, volumen de inyección de 3 μL 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* [20] (ver Figura 4), 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 N. Nuengchamnong *et al.* [21], 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*.

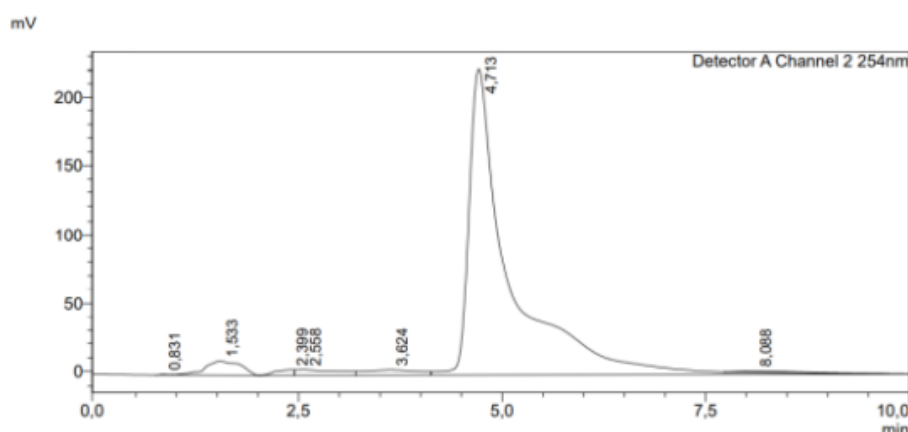


Figura 4. Cromatograma de la matriz biológica del hongo *Pleurotus ostreatus* con las condiciones cromatográficas.

Asimismo, al realizar la corrida cromatográfica con el estándar de quercetina y la matriz biológica con las condiciones optimizadas se obtuvo un cromatograma (ver Figura 5) 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 analítico, lo que genera una mayor confiabilidad en la posterior validación de separación y cuantificación de flavonoides totales en equivalentes de quercetina.

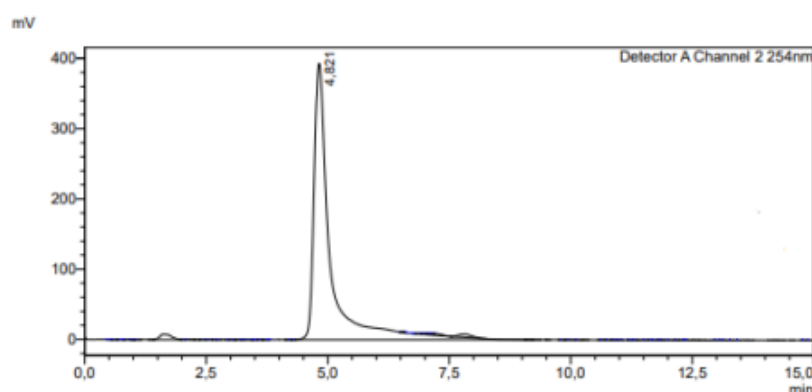


Figura 5. Cromatograma de la matriz biológica del hongo *Pleurotus ostreatus* y el estándar de quercetina con las condiciones cromatográficas optimizadas.

3.3.2. 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, de acuerdo con lo establecido en el capítulo <1225> de la USP 41 [22]. 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 6 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 (μL)	Vol de solución estándar (μL)	Vol total (μL)	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 6. Curva de calibración por adición estándar para la determinación de linealidad y cuantificación del método analítico.

3.3.3. 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. 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.

3.3.4. 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 [22]. 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 uno de los grupos. 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. 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 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 [23].

Tabla 4. Resultados y análisis estadístico de la 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)
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

S=Desviación Estándar; %CV= Coeficiente de variación porcentual

Con base en lo anterior, en la Tabla 4 se realiza el análisis estadístico de los resultados obtenidos, donde se evalúa el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada grupo de datos para los tiempos de retención (min) y el área de pico (mV) para diferentes valores de concentración.

3.3.5. Análisis ANOVA

Los resultados del análisis ANOVA se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Análisis ANOVA de Tiempos de Retención evaluados para el parámetro de 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 los 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				

3.3.6. Reproducibilidad

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

Tabla 6. Resultados y análisis estadístico del parámetro 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)
Promedio	4,790	8301037,333	4,953	2211134,667
S	0,00351	497056,006	0,00950	18703,416
CV%	0,07331	5,988	0,191	0,845

S=Desviación Estándar; %CV= Coeficiente de variación porcentual

3.3.7. Exactitud

La determinación de este parámetro se realizó por medio del porcentaje de recuperación, para lo cual se usa la ecuación de la recta previamente obtenida en la curva de calibración de linealidad y cuantificación, junto con el promedio de área de los picos obtenidos en el ensayo de precisión a las 3 concentraciones diferentes [24], se despejó y calculó la concentración obtenida experimentalmente; con este último valor se obtuvieron los porcentajes de rendimiento que se muestran en la Tabla 7. Así mismo, mediante el cálculo se obtuvo un porcentaje de rendimiento del 99,824%. Por último, se realizó un análisis estadístico con el cual se busca que el valor medio no difiera significativamente del teórico por medio del uso del ensayo de t-student realizada a un intervalo de confianza del 90% con un t tabulado de 1,533 [25] y un t obtenido de 0,0336.

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

	Área del Pico (mV)		
	600 ppm	800 ppm	1000 ppm
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

*[25]

3.3.8. 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. 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

(0,998), coeficiente de determinación (0,9995), pendiente (16251), error típico (60633,62) y ecuación de la recta ($Y=16251x + 285511$). Adicionalmente, 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 [26] para calcular tanto el límite de detección como el límite de cuantificación del método. Por último, se calcularon cada uno de los límites utilizando las fórmulas recomendadas por la ICH, así:

$$\text{LOD} = (3,3 * 60633,62/16251) = 12,312 \text{ ppm}$$

$$\text{LOQ} = (10 * 60633,62/16251) = 37,310 \text{ ppm}$$

3.3.9. 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 8, 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 8. Comparación entre resultados de resultados de evaluación de reproducibilidad y robustez del método analítico

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
Promedio	4,787	4,844	8476628	9253228,800
S	0,00540	0,0160	435908	150656,806
CV (%)	0,112	0,330	5,142	1,628

S=Desviación Estándar; %CV= Coeficiente de variación porcentual

4. DISCUSIÓN

4.1. 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 0,500 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; diferente al momento de utilizar mayor cantidad de disolvente. Por lo tanto, esto no implica que el volumen usado genere una extracción más eficiente, sino simplemente una más concentrada. 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 [27]. 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, esto permite cuantificar el analito de manera confiable, que para el caso del extracto elegido de etanol grado HPLC fue de 44,550 ppm, siendo este usado para su posterior análisis y optimización de las condiciones de separación por medio de cromatografía líquida de alta resolución, evitando así saturar la columna cromatográfica, y obteniendo resultados óptimos.

4.2. Definición de Condiciones

Para definir las condiciones del método de separación de flavonoides totales en el extracto del hongo *Pleurotus ostreatus* mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se seleccionó el patrón de quercetina como referencia debido a su amplia presencia en la naturaleza y su estructura química relativamente simple, lo que lo convierte en un estándar comúnmente utilizado en el análisis de flavonoides. Esta elección se fundamentó en su condición de patrón de referencia USP, que garantiza calidad y consistencia en los resultados. Las condiciones iniciales se determinaron considerando que la separación de compuestos fenólicos se realiza comúnmente mediante cromatografía en fase reversa, que emplea disolventes polares para la fase móvil y fases estacionarias basadas en partículas sólidas recubiertas con componentes apolares, además a partir del desarrollo de una revisión bibliográfica se tomaron en cuenta condiciones iniciales a las cuales se les realizó una optimización. Al realizar la corrida cromatográfica con lo reportado en dicha revisión y analizar los cromatogramas resultantes, se observaron superposiciones excesivas de picos, lo que indicaba una separación deficiente y una resolución insuficiente. Tras ajustar los parámetros cromatográficos de acuerdo con los resultados obtenidos de la revisión bibliográfica realizada, se logró una mejora significativa en la resolución de los picos. Sin embargo, persistieron algunos desafíos, como la presencia de picos solapados, que podrían afectar la cuantificación precisa de los flavonoides totales en el extracto del hongo *Pleurotus ostreatus*. Por lo tanto, se optó por cambiar a una columna C8, la cual es más adecuada para la separación de flavonoides totales y quercetina debido a su mayor capacidad de retención y selectividad para compuestos fenólicos en comparación con las columnas C18 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 podrían 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 mejoraron 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 μL , 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 [28]. 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.

4.3. 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 0,999), 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. Ahora bien, se realizó la prueba Q o Test de Dixon, como se observa en la Tabla 4 [29], para identificar si alguno de los datos analizados era atípico; donde, al analizar los resultados obtenidos, se observa que, tanto para máximos, como mínimos, la Q calculada se encuentra por debajo de la Q tabulada o registrada en la literatura, lo cual representa que no hay ningún dato atípico y por ende no deberían descartarse. Así mismo, sustenta la linealidad de los datos y el R^2 presentado en el gráfico de la Figura 7.

4.4. 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 40,990 ppm. Al comparar estas concentraciones con los resultados del método espectrofotométrico por AlCl_3 , empleado previamente para la selección del mejor solvente (44,500 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 81,980 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. 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.

4.5. Precisión

Con base en los resultados obtenidos de precisión de los tiempos de retención, se observa que existe una desviación estándar de aproximadamente 0,010 y un coeficiente de variación de aproximadamente 0,182%; 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*. Cabe mencionar, que se realizó la prueba estadística ANOVA con el objetivo de evaluar la variabilidad de los datos de tiempos de retención de precisión, tanto dentro de los grupos, como entre los grupos estudiados. Para lo cual, inicialmente se plantea un test de hipótesis, donde para la hipótesis nula (H_0), se establece que las medias son iguales, mientras que la hipótesis alternativa (H_1), establece que existe una diferencia o desigualdad de las medias. Ahora bien, para evaluar los resultados obtenidos mediante el análisis de varianza de un factor se aplica el Test F, realizando la comparación entre el valor de F y el valor crítico para F; donde se puede evidenciar que el valor de F es mayor que su valor crítico establecido en la Tabla 6, por lo que se debe rechazar la hipótesis nula. Así mismo, mediante el valor de probabilidad presente en la Tabla 6, que representa el menor nivel de significancia al que se rechazaría la hipótesis nula y al compararla con la significancia establecida para el análisis (0,050), se evidencia que al ser menor también establece que debe rechazarse. Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, se observa que, al aplicar un análisis estadístico más robusto, se evidencia que el método carece

de precisión. Sin embargo, dado al análisis anteriormente mencionado se observa que cumple con los parámetros estadísticos evaluados y establecidos en los libros de validaciones consultados, por lo que se puede garantizar que el método es preciso, pero que las diferencias en los hongos son sustancias ricas en muchos compuestos, por lo que ligeras interferencias pudieron generar dichas diferencias.

4.6. Exactitud

La exactitud se busca conocer la proximidad existente entre los resultados obtenidos experimentalmente y el valor teórico, por medio del cálculo del porcentaje de recuperación del analito contenido en la muestra. Por lo tanto, se puede decir que el método resulta exacto ya que según los valores observados en la Tabla 8 y los criterios encontrados en la USP 41, cuando se obtiene un porcentaje de recuperación entre 90 a 110%, se puede establecer que los resultados obtenidos experimentalmente se encuentran cercanos al valor teórico [30]. Así mismo, se puede identificar que el menor rendimiento fue de 94,867% en una concentración de 1000 ppm, mientras que el mayor fue de 99,824% en una concentración de 600 ppm; esta diferencia, pudo deberse a errores por parte de los experimentadores en la preparación del estándar como la cantidad pesada, volúmenes de solvente añadidos y condiciones ambientales que pudieron generar una degradación del patrón utilizado [31]. Por otro lado, al realizar el tratamiento estadístico utilizando la t-student, se puede observar que no hay una diferencia estadística significativa entre los valores obtenidos experimentalmente y los teóricos, por lo cual se puede aceptar la hipótesis nula; ya que los valores obtenidos de la t calculada es menor que la t tabulada (1,476), esta última se obtuvo a un nivel de significancia o confianza de 90% (0,100) y a n grados de libertad; lo cual demuestra que la media de la muestra es significativamente similar al valor teórico y, por lo tanto, se puede confirmar que el método de separación y cuantificación de flavonoides totales expresados en términos de quercetina resulta ser exacto [32].

4.7. Límite de detección y Límite de cuantificación

De acuerdo con los resultados obtenidos para el cálculo de LOD y LOQ, se observa que a través del método propuesto no se pueden cuantificar con precisión y exactitud aceptable los analitos que presenten una concentración menor a 11,327 ppm. Además, no se detecta ninguna señal cuando la muestra presenta una concentración menor a 3,738 ppm. No obstante, cabe destacar que cuando la muestra se encuentra por debajo del límite de cuantificación puede ser detectada por el equipo, pero no con una alta confiabilidad en el resultado, causando confusiones a la hora de realizar la lectura de los cromatogramas [33]. Sin embargo, en el apartado de cuantificación, se evidencia que la concentración de la muestra analizada es de 40,990 ppm, la cual se encuentra por encima de los valores obtenidos de LOD y LOQ, por lo que esto permite tener seguridad de que la muestra es detectable y cuantificable de manera confiable.

4.8. Reproducibilidad

Como se observa en la Tabla 7 se identifica una disminución en el coeficiente de variación del área de los picos, mientras que se observa un aumento en el tiempo de retención; sin embargo, tanto para el tiempo de retención como el área se pudo obtener una media representativa y datos relativamente homogéneos, puesto que al tener en cuenta los coeficientes de variación, ninguno de los valores obtenidos fue igual o superior al 30% [34]. Por otro lado, se puede decir que el método tiene cierto grado de reproducibilidad, ya que al observar los valores obtenidos en el porcentaje de coeficiente de variación para el tiempo de retención, se evidencia una diferencia de 0,120% entre los valores obtenidos por el analista 1 y el analista 2, lo anteriormente mencionado se puede deber a la estabilidad de los flavonoides, ya que según el estudio de C.

López *et al.* [34], identificó que los flavonoides se degradan mayormente en refrigeración que siendo almacenados en condiciones ambientales.

4.9. Robustez

Según lo establecido en la guía ICH Q2 (R2) la robustez debe ser evaluada con el fin de medir la capacidad del método analítico para obtener los criterios de desempeño esperados en su uso cotidiano frente a diferentes cambios operativos como equipos, analistas, temperatura, cambios de la fase móvil, entre otros; además de representar la fiabilidad de un procedimiento analítico [35]. Al realizar una variación en el pH de la fase móvil, para la evaluación de este parámetro se compararon los resultados obtenidos de este ensayo y los arrojados en reproducibilidad, en donde se observa un cambio en el coeficiente de variación tanto en el área como en el tiempo de retención; en el caso de este último, se evidencia un aumento de 0,110% a 0,330%, mientras que en el área se puede identificar una disminución en el coeficiente de variación de 5,140% al realizar el ensayo bajo las condiciones preestablecidas a 1,630% al cambiar el pH de la fase móvil. A pesar del cambio generado en estos dos parámetros (área y tiempo de retención); el cambio de pH resultó en una disminución del *tailing* que presentaban los picos de los cromatogramas obtenidos durante el ensayo de reproducibilidad, lo que se puede deber a que los flavonoides son compuestos polifenólicos que contienen grupos hidroxilo (-OH), que pueden protonarse en condiciones ácidas, lo que afecta las interacciones de los flavonoides en la fase estacionaria y modifica su polaridad. Además, un pH ácido favorece la escisión de los compuestos fenólicos unidos a proteínas y polímeros de carbohidratos presentes en la matriz del hongo, generando picos más resueltos y disminuyendo el *tailing* presente. Por otro lado, es importante mencionar que los flavonoides son inestables en pH básico, ya que se desprotonan y sus características iónicas aumentan, por lo que el uso de ácido fosfórico puede estar relacionado con la estabilidad de estos compuestos durante el estudio.

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, 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. 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 sólo 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*, lo cual permite demostrar que éste hongo al ser consumido puede presentar beneficios en cuanto a sustancias antioxidantes y a su vez aportar a mejorar la calidad de la salud de las personas que los consumen.

AGRADECIMIENTOS

Expresamos nuestros sinceros agradecimientos 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. 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.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no presentar ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. M.C. Ciappini, M.B. Gatti & M.L. López-Zamora. *Pleurotus ostreatus*, una opción en el menú: estudio sobre las gírgolas en la dieta diaria. *Invenio*, **7**(12), 127–132 (2004). URL: <https://www.redalyc.org/pdf/877/87701211.pdf>
2. D. Niño-Ávila, M. Villalba-Orozco, B. Barraza-Amador & A.M. Medina-Buelvas. *Pleurotus*: Un hongo comestible con propiedades nutricionales, medicinales e importancia ambiental. *Microciencia*, **10**, 134–148 (2021). URL: <https://repository.unilivre.edu.co/handle/10901/23785>
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*. Trabajo de Grado. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Mocache, Los Ríos, Ecuador, 2020; 64 p. URL: <https://repository.uteq.edu.ec/server/api/core/bitstreams/792c100c-fd64-4063-95d9-70f04bab6bf6/content>
4. C. Sánchez. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**(5), 1321–1337 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2343-7>
5. A. N. Panche, A.D. Diwan & S.R. Chandra. Flavonoids: An overview. *J. Nutr. Sci.*, **5**, e47 (2016). Doi: <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
6. J. Cilerdzic, M. Stajic, J. Vukojevic, I. Milovanovic & N. Muzgonja. Antioxidant and antifungal potential of *Pleurotus ostreatus* and *Agrocybe cylindracea* basidiocarps and mycelia. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **16**(2), 179–186 (2015). Doi: <https://doi.org/10.2174/1389201015666141202152023>
7. V. Surendra & A. Quiroz-Ruiz. Critical values for six Dixon tests for outliers in normal samples up to sizes 100, and applications in science and engineering. *Rev. Mex. Cienc. Geol.*, **23**(3), 302–319 (2006). URL: <https://www.redalyc.org/pdf/572/57230203.pdf>
8. D. Harvey. *Modern Analytical Chemistry*. Mc Graw Hill, Boston (MA), 2000; 832 p.
9. J.E. Ortiz-García, D.E. González-Morales, Y. Mejía-Agudelo, L.S. García-Alzate & X. Cifuentes-Wchima. Evaluación de la biomasa residual (cereza) de café como sustrato para el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. *Rev. Ion*, **33**(1), 93–102 (2020). Doi: <https://doi.org/10.18273/revion.v33n1-2020009>

10. Servicio Nacional de Aprendizaje – SENA. *Cultivo comercial de la orellana*. Plataforma SENA Sofia Plus, Bogotá, 2023. URL: <https://oferta.senasofiaplus.edu.co/sofia-oferta/detalle-oferta.html?fm=0&fc=y6vpILhsssQ>
11. F. Fernández-Rodríguez, M.B. Ruilova-Cueva & A. Hernández-Monzón. Programa para el diseño de mezclas de residuos agrícolas para el cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*. *Tecnología Química*, **34**(2), 158–169 (2014). URL: <http://scielo.sld.cu/pdf/rtq/v34n2/rtq05214.pdf>
12. L.A. Pascual-Pineda, A. Hernández-Marañón, M. Castillo-Morales, R. Uzárraga-Salazar, M.P. Rascón-Díaz & E. Flores-Andrade. Effect of water activity on the stability of freeze-dried oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) powder. *Drying Technol.*, **39**(8), 989–1002 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1739064>
13. B. Goswami, S. Majumdar, A. Das, A. Barui & J. Bhowal. Evaluation of bioactive properties of *Pleurotus ostreatus* mushroom protein hydrolysate of different degree of hydrolysis. *LWT*, **149**, 111768 (2021). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111768>
14. L.M. Amaya-Rodríguez & C.E. Portillo-Membreño. *Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio chaparras por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible*. Trabajo de Grado. Universidad de El Salvador, San Salvador, 2013; 130 p. URL: <https://repositorio.ues.edu.sv/server/api/core/bitstreams/b468c1f8-0672-4e52-88b1-3e393a394a3f/content>
15. L. Aguirre-Ortega, F.J. García-García, T. García-Juncá, M. Illera-Fontanet, M. Juncadella-Roca, M. Lizondo-Carbó, et al. *Validación de Métodos Analíticos*. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI), Barcelona, 2001; 315 p.
16. E. León-Ávila & 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.*, **2020**, 8859998 (2020). Doi: <https://doi.org/10.1155/2020/8859998>
17. E. Poma-Gil & 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*. Trabajo de Grado. Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo, Cajamarca, Perú, 2020
18. F. Ianni, F. Blasi, P. Angelini, S.C. Di Simone, G.A. Flores, L. Cossignani & R. Venanzoni. Extraction optimization by experimental design of bioactives from *Pleurotus ostreatus* and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. *Processes*, **9**(5), 743 (2021). Doi: <https://doi.org/10.3390/PR9050743>
19. R. Hilma, Herliani & H. Almurdani. Determination of total phenolic, flavonoid content and free radical scavenging activity of ethanol extract Sawo Stem Bark (*Manilkara zapota* (L.)). Conference Proceedings CelSciTech-UMRI 2018, vol. 3, 2018; 7 p. URL: <https://core.ac.uk/download/pdf/327217695.pdf>
20. E.E. Leon-Avila. Desarrollo de un método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la separación y cuantificación de diosgenina en extracto del fruto iguaraya de la planta cardón guajiro (*Sternocereus griseus*). *Avances en Química*, **18**(2), 55–59 (2023). Doi: <https://doi.org/10.53766/avanquim/2023.18.02.01>
21. N. Nuengchamnon, A. Hermans-Lokkerbol & 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.*, **12**(2), 25–37 (2004). URL: <https://ph03.tci-thaijo.org/index.php/ahstr/article/view/2446>
22. United States Pharmacopeia (USP). <1225> *Validación de procedimientos farmacopeicos*. En: *United States Pharmacopeia 41 – National Formulary 36*. United States Pharmacopeial Convention, Rockville (MD), 2017; pp. 8194–8206.
23. D.A. Ahumada, C. Paredes, J. Abella & I. González. *Validación de Métodos en Análisis Químico Cuantitativo*. Instituto Nacional de Metrología: Subdirección de Metrología Química y Biología, Bogotá, Colombia, 2023; 100 p. URL: https://inm.gov.co/wp-content/uploads/2023/05/Guia_ValidacionMetodosAnalisisQuimicoCuantitativo-16.pdf

24. A.T. Bristy, T. Islam, R. Ahmed, J. Hossain, H.M. Reza & 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.*, **2022**, 834936 (2022). Doi: <https://doi.org/10.1155/2022/3834936>
25. D.A. Skoog, F.J. Holler & S.R. Crouch. *Principios de Análisis Instrumental*. 6ta ed. Cengage Learning Editores, S.A. de C.V., México D.F., 2008; 1064 p.
26. European Medicines Agency. *ICH Q14 Guideline on Analytical Procedure Development*. Amsterdam, 2023; 44 p. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q14-guideline-analytical-procedure-development-step-5_en.pdf
27. I. González-Palma, H.B. Escalona-Buendía, E. Ponce-Alquicira, M. Téllez-Téllez, V.K. Gupta, G. Díaz-Godínez & J. Soriano-Santos. Evaluation of the antioxidant activity of aqueous and methanol extracts of *Pleurotus ostreatus* in different growth stages. *Front. Microbiol.*, **7**, 1099 (2016). Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01099>
28. S.G. Dmitrienko, V.A. Kudrinskaya & V.V. Apyari. Methods of extraction, preconcentration, and determination of quercetin. *J. Anal. Chem.*, **67**(4), 299–311 (2012). Doi: <https://doi.org/10.1134/S106193481204003X>
29. United States Pharmacopeia (USP). <1225> *Validation of Compendial Procedures*. En: *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 44–NF 39)*. United States Pharmacopeial Convention, Rockville (MD), 2021; pp. 1–42.
30. T. Cheng, E.A. Veitch, I.B. Utne, M.A. Ramos, A. Mosleh, O.A. Alsos & B. Wu. Analysis of human errors in Human-autonomy collaboration in autonomous ships operations through shore control experimental data. *Reliab. Eng. Syst. Saf.*, **246**, 110080 (2024). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ress.2024.110080>
31. C. López, C. González-Gallardo, M. J. Guerrero-Ochoa, G. Mariño, B. Jácome & E. Beltran-Sinchi-guano. Estudio de la estabilidad de los antioxidantes del vino de flor de Jamaica (*Hibiscus saabdariffa* L) en el almacenamiento. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, **29**(1), 105–118 (2019), URL: <http://scielo.senescyt.gob.ec/pdf/lgr/v29n1/1390-3799-lgr-29-01-000105.pdf>
32. Agilent Technologies. *Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC): fundamentos y teoría* (Presentación N.º 5991-5411ES). Agilent Technologies, Santa Clara (CA), 2016. URL: https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/5991-5411ES_Agilent_LC_Theory_Spanish.pdf
33. V. Vargas-Franco. *Estadística Descriptiva para Ingeniería Ambiental con SPSS*. Universidad Nacional de Colombia. Impresora Feriva S.A., Cali, Colombia, 2007; 312 p
34. C. López, C. González-Gallardo, M. J. Guerrero-Ochoa, G. Mariño, B. Jácome & E. Beltran-Sinchi-guano. Estudio de la estabilidad de los antioxidantes del vino de flor de Jamaica (*Hibiscus saabdariffa* L) en el almacenamiento. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, **29**(1), 105–118 (2019), URL: <http://scielo.senescyt.gob.ec/pdf/lgr/v29n1/1390-3799-lgr-29-01-000105.pdf>
35. European Medicines Agency. *ICH Q2(R2) Guideline on Validation of Analytical Procedures*. Amsterdam, 2023; 33 p. URL: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf

CÓMO CITAR ESTE ARTÍCULO

D.F. Nope-Páez, L.M. Ortiz-Ulloa, J. Racines-González & E.E. León-Ávila. 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). *Rev. Colomb. Cienc. Quim. Farm.*, **54**(3), 739–759 (2025). Doi: <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n3.118793>