

Obtención de extractos hidroalcohólicos de las especies *Scutellaria incarnata* Vent, *S. coccinea* y *S. ventenatii* Hook x *S. incarnata* para su fraccionamiento y determinación de sus propiedades antivirales y antioxidantes

Silvia Marcela PORRAS TRIANA
Química

Trabajo de investigación para optar al título de *Magíster* en Química

Directora:
Elena E. STASHENKO, Química, *Ph.D.*

Codirectores:
Jairo René MARTÍNEZ MORALES, Químico, *Ph.D.*
Lady Johanna SIERRA PRADA, Química, *Ph.D.*

Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL
Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS
Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Maestría en Química
Bucaramanga
2023

Agradecimientos

Tabla de contenido

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. OBJETIVOS	22
1.1 Objetivo general	22
1.2 Objetivos específicos	22
2. ESTADO DEL ARTE.....	23
2.1 <i>Scutellaria</i> spp.	23
2.2 Compuestos fenólicos	33
2.3 Actividad antioxidante de extractos de plantas.....	36
2.3.1 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	38
2.3.2 Capacidad de absorción de radicales oxígeno ORAC	40
2.3.3 Ensayo del β -caroteno.....	41
2.4 Actividad antiviral	42
2.4.1 Virus del dengue	43
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	44
3.1 Reactivos.....	44
3.2 Material vegetal	44
3.2.1 Recolección.....	44

3.2.2 Identificación botánica.....	45
3.3 Extracción con solvente del material vegetal.....	45
3.4 Análisis químico de extractos	46
3.4.1 Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas	46
3.4.2 Determinación de figuras analíticas de mérito por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS	48
3.4.2.1 Determinación de la reproducibilidad y la repetibilidad de los tiempos de retención y las áreas cromatográficas.....	49
3.4.2.2 Determinación de la linealidad y la sensibilidad del método cromatográfico	49
3.4.2.3 Determinación de los límites de detección y cuantificación del método cromatográfico	50
3.4.3 Análisis por prep-HPLC para obtener fracciones de extractos	51
3.5 Evaluación de la capacidad antioxidante <i>in vitro</i> de extractos de <i>Scutellaria</i> spp.	51
3.5.1 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺	51
3.5.2 Ensayo decoloración del catión-radical <i>on-line</i> HPLC-ABTS ⁺	52
3.5.3 Evaluación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno	55
3.5.4 Evaluación de la decoloración del β -caroteno	56
3.6 Evaluación de la actividad antiviral.....	57
3.6.1 Virus y células.....	57
3.6.2 Evaluación de la actividad citotóxica	57
3.6.3 Evaluación de la actividad antiviral.....	58
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
4.1 Identificación botánica.....	60
4.2 Evaluación de parámetros de extracción para las especies de <i>Scutellaria</i> spp.	60
.....	63

.....	64
4.3 Caracterización química y cuantificación de compuestos fenólicos, por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, en los extractos y fracciones de <i>Scutellaria</i> spp. estudiados	
.....	65
4.3.1 Figuras de mérito	65
4.3.2 Caracterización química por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de los extractos hidroalcohólicos de <i>Scutellaria</i> spp.....	69
4.3.3 Identificación y cuantificación de las fracciones aisladas, por prep-HPLC, de los extractos hidroalcohólicos de <i>Scutellaria</i> spp.	100
4.4 Estudio de la capacidad antioxidante de extractos y fracciones de <i>Scutellaria</i> spp.	116
4.5 Actividades citotóxica y antiviral de extractos y fracciones de <i>Scutellaria</i> spp.....	126
4.5.1 Actividad citotóxica	126
4.5.2 Actividad antiviral <i>in vitro</i>	130
5. CONCLUSIONES	139
6. AGRADECIMIENTOS	141
7. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS	142
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	143

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Propiedades biológicas identificadas para algunas especies de <i>Scutellaria</i> spp. Tomado con modificaciones de Shen <i>et al.</i>	27
Tabla 2. Técnicas de fraccionamiento y purificación de extractos de <i>Scutellaria</i> spp.	32
Tabla 3. Principales diferencias entre las cromatografías analítica y preparativa. Tomado con modificaciones de Subesta.....	36
Tabla 4. Clasificación de los ensayos más empleados para medir actividad antioxidante. Tomado con modificaciones de Zulueta <i>et al.</i>	38
Tabla 5. Matriz de experimentos y variables evaluadas para el diseño factorial 2 ³ para la extracción con solvente de plantas de <i>Scutellaria</i> spp. bajo estudio (<i>n</i> =3).	46
Tabla 6. Parámetros operacionales en el derivatizador acoplado <i>on-line</i> al HPLC.....	53
Tabla 7. Identificación botánica de las tres especies de <i>Scutellaria</i> spp. bajo estudio.	60
Tabla 8. Resultados del análisis de varianza para evaluar el efecto de las condiciones de extracción sobre el rendimiento y la actividad antioxidante de extractos hidroalcohólicos de las especies de <i>S. incarnata</i> , <i>S. coccinea</i> y <i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i>	61
Tabla 9. Mejores condiciones de extracción encontradas para las especies de <i>Scutellaria</i> spp. bajo estudio.	65
Tabla 10. Repetibilidad de tiempos de retención (<i>t_R</i>) y de áreas cromatográficas (corrientes iónicas extraídas) de sustancias-patrón, analizados por UHPLC/ESI-Q- <i>Orbitrap</i> -MS.....	67
Tabla 11. Linealidad y sensibilidad determinadas por UHPLC/ESI-Q- <i>Orbitrap</i> -MS para sustancias-pratrón.	68

Tabla 12. Masas exactas de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$ e iones-producto obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, de los compuestos fenólicos presentes en los extractos hidroalcohólicos de plantas de <i>Scutellaria</i> spp. estudiadas.	73
Tabla 13. Cantidad (mg/g) de compuestos fenólicos presentes en los extractos obtenidos de las tres plantas de <i>Scutellaria</i> spp. que crecen en Colombia.....	99
Tabla 14. Composición química por HPLC/DAD a $\lambda=290$ nm de las fracciones de los extractos de <i>Scutellaria</i> spp.....	103
Tabla 15. Masas exactas de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$, obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, de los compuestos presentes en las fracciones aisladas del extracto hidroalcohólico de <i>S. incarnata</i>	111
Tabla 16. Masas exactas de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$, obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, de los compuestos presentes en las fracciones aisladas del extracto hidroalcohólico de <i>S. coccinea</i>	112
Tabla 17. Masas exactas de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$, obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, de los compuestos presentes en las fracciones aisladas del extracto hidroalcohólico de <i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i>	113
Tabla 18. Parámetros cromatográficos empleados para la separación de los compuestos presentes en los extractos y fracciones de <i>Scutellaria</i> spp.	115
Tabla 19. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> de sustancias-patrón y de extractos de <i>Scutellaria</i> spp., estudiados en este trabajo.....	117
Tabla 20. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> de los compuestos presentes en los extractos de <i>Scutellaria</i> spp., medida por <i>on-line</i> HPLC-ABTS ⁺	121

Tabla 21. Actividad antioxidante <i>in vitro</i> medida por el ensayo ORAC, de sustancias-patrón y de fracciones de <i>Scutellaria</i> spp.	124
Tabla 22. Actividad citotóxica de los extractos y fracciones de <i>Scutellaria</i> spp.	127
Tabla 23. Actividad antiviral de extractos y fracciones de <i>Scutellaria</i> spp., evaluada en células Vero, durante la adsorción del virus DENV-1 y DENV-2, y calculada como la reducción del efecto citopático.	133

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Número de publicaciones sobre <i>Scutellaria</i> spp., registradas durante los años 2000-2023. La ecuación de búsqueda utilizada <i>TITTLE-ABS-KEY</i> (“ <i>Scutellaria and Flavonoids</i> ”). Fuente: <i>Scopus, Elsevier</i> . Periodo de observación 2000-2023. Fecha de consulta 20 de enero de 2023. .	25
Figura 2. Plantas de <i>Scutellaria</i> spp. nativas de Colombia, en etapa de florecimiento: A. <i>S. incarnata</i> ; B. <i>S. coccinea</i> y C. <i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i> . Fotografías tomadas por Silvia Marcela PORRAS TRIANA el 02 de diciembre de 2022 en el Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM.	31
Figura 3. Clasificación de flavonoides. Tomado con modificaciones de Panche <i>et al.</i> [48].	34
Figura 4. Reacción del radical ABTS ^{•+} en presencia de un antioxidante. Tomado con modificaciones de Vallejo <i>et al.</i> [71].	39
Figura 5. Posibles productos de oxidación de la fluoresceína en presencia del radical AAPH durante el ensayo ORAC. Tomado con modificaciones de Ou <i>et al.</i> [77].	41
Figura 6. Diagramas de Pareto estandarizados para los rendimientos de extracción de: A. <i>S. incarnata</i> ; B. <i>S. coccinea</i> y C. <i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i> .	62
Figura 7. Diagramas de Pareto estandarizados para las actividades antioxidantes de: A. <i>S. incarnata</i> ; B. <i>S. coccinea</i> y C. <i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i> .	63
Figura 8. Diagramas de Pareto estandarizados para las respuestas combinadas rendimiento-actividad antioxidante de: A. <i>S. incarnata</i> ; B. <i>S. coccinea</i> y C. <i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i> .	64
Figura 9. Estructuras químicas de los flavonoides identificados en los extractos hidroalcohólicos obtenidos de plantas secas de <i>S. incarnata</i> , <i>S. coccinea</i> y <i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i> . Glu:	

Glucósido, Ác. gluc: Ácido glucurónico. Arab: Arabinósido. Ram: Ramnósido..... ¡Error!

Marcador no definido.

Figura 10. Corrientes iónicas extraídas (EIC), obtenidas en modo *full scan* por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS, de moléculas protonadas $[M+H]^+$, detectadas en los extractos hidroalcohólicos de: **A.** *S. incarnata*; **B.** *S. coccinea* y **C.** *S. ventenatii* x *S. incarnata*. En la **Tabla 12** aparece la identificación de los picos..... 72

Figura 11. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS de **A.** Baicaleína $[M+H]^+$ m/z 271.05969, a 60 eV y **B.** Eriodictiol $[M+H]^+$ m/z 289.07066, a 40 eV. 77

Figura 12. Esquema general de fragmentación de las flavonas y sus derivados glicosilados. Glu: Glucósido, Ác. gluc: Ácido glucurónico. Arab: Arabinósido. Ram: Ramnósido..... 78

Figura 13. Esquema general de fragmentación de las flavanonas y sus derivados glicosilados. Glu: Glucósido, Ác. gluc: Ácido glucurónico. Arab: Arabinósido. Ram: Ramnósido..... 79

Figura 14. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS de baicalina. Véase la señal $[M+H]^+$ en m/z 447.09198, obtenida a **A.** 20 eV y **B.** 70 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. 81

Figura 15. Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS del eriodictiol-7-glucósido. Véase la señal $[M+H]^+$ en m/z 451.12348, a **A.** 10 eV y **B.** 50 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD. 82

Figura 16. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS de la umbeliferona-hexósido-pentósido. Se observa el ion $[M+H]^+$ en m/z 471.14954 a 10 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *S. incarnata*. 84

- Figura 17.** Esquema de fragmentación propuesto para la umbeliferona-hexósido-pentósido, para la formación del ion-producto $C_{15}H_{17}O_7$ en m/z 309.09671. Tomado con modificaciones de Han *et al.*..... 85
- Figura 18.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS de la apigenina-C-glucósido-C-arabinósido. Véase el ion $[M-H]^-$ en m/z 563.14191, a 30 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *S. incarnata*. 87
- Figura 19.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS del verbascósido. Véase el ion $[M-H]^-$ en m/z 623.19704, a 30 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *S. incarnata*. 88
- Figura 20.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS de la isoliquiritina. Véase ion $[M+H]^+$ en m/z 419.13366, a 10 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *S. coccinea*. 90
- Figura 21.** Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS de: **A.** Apigenina-7-glucurónido y **B.** Norwogonina-glucurónido. Véanse iones $[M+H]^+$ en m/z 447.09218, a 70 eV (HCD), de estas sustancias presentes en el extracto hidroalcohólico de *S. ventenatii* x *S. incarnata*. 91
- Figura 22.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS de la isocartamidina-glucurónido. Véase ion $[M+H]^+$ en m/z 465.13492, a 30 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *S. coccinea*..... 94
- Figura 23.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS de la dihidrobaicaleina-glucurónido. Véase ion $[M+H]^+$ en m/z 449.10689, a 30 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *S. incarnata*. 95

- Figura 24.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de la dihidrobaicaleína. Véase ion $[M+H]^+$ en m/z 273.07523, a 40 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *S. incarnata*. 96
- Figura 25.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS del compuesto con fórmula $C_{20}H_{25}O_4$. Véase ion $[M-H]^-$ en m/z 329.17587, a 50 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *S. incarnata*. 97
- Figura 26.** Perfiles cromatográficos obtenidos por prep-HPLC ($\lambda=270$ nm), de los extractos de **A.** *S. incarnata*, **B.** *S. coccinea* y **C.** *S. ventenatii* x *S. incarnata*. 102
- Figura 27.** Perfiles cromatográficos y espectros UV-Vis obtenidos por HPLC/DAD ($\lambda=290$ nm) de la **A.** Fracción cinco del extracto de *S. incarnata*; **B.** Fracción seis del extracto de *S. incarnata* y **C.** Fracción ocho del extracto de *S. ventenatii* x *S. incarnata*. 104
- Figura 28.** Perfil cromatográfico y espectros UV-Vis, obtenidos por HPLC/DAD ($\lambda=290$ nm), de la fracción tres del extracto de *S. incarnata*. 105
- Figura 29.** Perfil cromatográfico y espectros UV-Vis, obtenidos por HPLC/DAD ($\lambda=290$ nm), de la fracción tres del extracto de *S. coccinea*. 106
- Figura 30.** Perfil cromatográfico y espectros UV-Vis, obtenidos por HPLC/DAD ($\lambda=290$ nm), de la fracción dos del extracto de *S. ventenatii* x *S. incarnata*. 106
- Figura 31.** Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$, obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS en modo *full scan*, de sustancias presentes en las fracciones de los extractos de: **A.** *S. incarnata* (seis fracciones); **B.** *S. coccinea* (seis fracciones) y **C.** *S. ventenatii* x *S. incarnata* (ocho fracciones). La identificación de los picos aparece en las **Tablas 16 a 18**. . 108
- Figura 32.** Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS del isómero de la umbeliferona-hexósido-pentósido con $t_R = 5.29$ min. Véase ion $[M+H]^+$ en m/z 471.14954, a 10

eV (HCD), correspondiente a este compuesto detectado en la fracción cuatro del extracto hidroalcohólico de *S. ventenatii* x *S. incarnata*. 109

Figura 33. Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS del isómero de umbeliferona-hexósido-pentósido con $t_R = 6.13$ min. Véase ion $[M+H]^+$ en m/z 471.14954, a 10 eV (HCD), correspondiente a este compuesto detectado en la fracción cinco del extracto hidroalcohólico de *S. ventenatii* x *S. incarnata*. 110

Figura 34. Perfiles cromatográficos obtenidos por la técnica *on-line* HPLC-ABTS⁺⁺ de los extractos de **A.** *S. incarnata*; **B.** *S. coccinea* y **C.** *S. ventenatii* x *S. incarnata*, antes (DAD, $\lambda=290$ nm, línea azul) y después (MWD, $\lambda=734$ nm, línea roja) de su reacción con el catión-radical ABTS⁺⁺. Véase la identificación de los picos en la **Tabla 20**. 120

Figura 35. Viabilidad de células epiteliales de riñón de mono africano (células Vero, ATCC[®]CCL-81[™]), tratados con extractos de: **A.** *S. incarnata*, **B.** *S. coccinea*, **C.** *S. ventenatii* x *S. incarnata* y **C.** dimetilsulfóxido (control positivo). Fuente: Información suministrada por el Centro de Investigaciones CINTROP. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 36. Viabilidad de células epiteliales de riñón de mono africano (células Vero, ATCC[®]CCL-81[™]), tratados con fracciones de *Scutellaria* spp. Fuente: Información suministrada por el Centro de Investigaciones CINTROP. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 37. Porcentajes de reducción del efecto citopático en células Vero, tratadas con extractos de *Scutellaria* spp. o con antiviral de referencia (dextrán fulfato de sodio), durante la adsorción del serotipo uno del virus del dengue (DENV-1). Fuente: Datos suministrados por el Centro de Investigaciones CINTROP. **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 38. Porcentajes de reducción del efecto citopático en células Vero, tratadas con extractos de *Scutellaria* spp. o con antiviral de referencia (dextrán fulfato de sodio), durante la adsorción del

serotipo dos del virus del dengue (DENV-2). Fuente: Datos suministrados por el Centro de Investigaciones CINTROP..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 39. Porcentajes de reducción del efecto citopático en células Vero, tratadas con fracciones de *Scutellaria* spp. o con antiviral de referencia (dextrán sulfato de sodio), durante la adsorción del serotipo uno del virus del dengue (DENV-1). Fuente: Datos suministrados por el Centro de Investigaciones CINTROP..... 136

Figura 40. Porcentajes de reducción del efecto citopático en células Vero, tratadas con fracciones de *Scutellaria* spp. o con antiviral de referencia (dextrán sulfato de sodio), durante la adsorción del serotipo dos del virus del dengue (DENV-2). Fuente: Datos suministrados por el Centro de Investigaciones CINTROP..... 137

Abreviaturas, siglas y acrónimos

AAPH	Azocompuesto dihidrocloruro de 2,2'-azobis (2-amidinopropano).
ABTS ⁺	Catión-radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato).
ACN	Acetonitrilo.
ca.	<i>Circa</i> (Aproximadamente).
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas.
CINTROP	Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales.
DAD	<i>Diode-Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos).
D.I.	Diámetro interno.
DSS	Dodecil sulfato de sodio.
EAU	Extracción asistida con ultrasonido.
e.g.	<i>Exemple gratia</i> (Por ejemplo).
EI	<i>Electron Ionizaion</i> (Ionización con electrones).
EO	Estrés oxidativo.
ET	<i>Electron transfer</i> (Transferencia de electrones).
f.e.	Fase estacionaria.
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización de llama).
HAT	<i>Hydrogen Atom Transfer</i> (Transferencia de átomo de hidrógeno).
HCD	<i>Higher-Energy Collision Dissociation Cell</i> (Celda de colisiones activadas de alta energía).
HESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización).
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia).
HRS	<i>High-Resolution Screening</i> (Detección de alta resolución).

LC/MS	<i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas).
LPPC	<i>Low-Pressure Preparative Chromatography</i> (Cromatografía preparativa de presión reducida).
ORAC	<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i> (Capacidad de absorción de radicales de oxígeno).
Orbitrap-MS	<i>Orbitrap Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas <i>Orbitrap</i>).
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Buffer fosfato salino).
Prep-HPLC	<i>Preparative High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia preparativa).
RL	Radical(es) libre(es).
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Especies reactivas de oxígeno).
RSV	<i>Respiratory Syncytial Virus</i> (Virus respiratorio sincital).
SARS	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome</i> (Síndrome respiratorio agudo severo).
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
TOF	<i>Time-of-Flight</i> (Tiempo de vuelo).
t _R	Tiempo de retención.
UHPLC	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia).
UIS	Universidad Industrial de Santander.
UV-Vis	Ultravioleta-Visible.
VERO	Línea celular de riñón de mono.
VDEN	Virus del dengue.
VDEN 1	Serotipo uno del virus del dengue.
VDEN 2	Serotipo dos del virus del dengue.
VDEN 3	Serotipo tres del virus del dengue.
VDEN 4	Serotipo cuatro del virus del dengue.

Resumen

Título: Obtención de extractos hidroalcohólicos de las especies *Scutellaria incarnata* Vent, *S. coccinea* y *S. ventenatii* Hook x *S. incarnata* para su fraccionamiento y determinación de sus propiedades antivirales y antioxidantes*

Autora: Silvia Marcela PORRAS TRIANA**

Palabras Clave: *Scutellaria*, flavonoides, antioxidante, antiviral.

Descripción: Las plantas del género *Scutellaria* (Familia Lamiaceae) poseen una gran variedad de metabolitos secundarios bioactivos, con diversas propiedades biológicas, *e.g.*, antiinflamatorias, antialérgicas, antioxidantes, antivirales y antitumorales. En este estudio se recolectaron partes aéreas de tres especies de *Scutellaria* spp. (100 g), se secaron y molieron. Los extractos se obtuvieron por extracción con solvente asistida con ultrasonido. La caracterización química se realizó mediante UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS. Los extractos de *Scutellaria* spp. fueron fraccionados por prep-HPLC para obtener fracciones enriquecidas con compuestos bioactivos.

Las flavonas y flavanonas fueron los principales metabolitos secundarios identificados en los extractos de *Scutellaria* spp. Se aislaron seis fracciones de *S. incarnata*, seis de *S. coccinea* y ocho de *S. ventenatii* x *S. incarnata*. Se lograron aislar baicaleína, dihidrobaicaleína y wogonina de manera individual. El extracto de *S. coccinea* mostró las actividades antioxidante, y antiviral más altas (3830 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g extracto e índice de selectividad (IS) de 213, respectivamente), seguido del extracto de *S. incarnata* (2510 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g extracto e IS de 10, respectivamente) y *S. ventenatii* x *S. coccinea* (2900 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g extracto e IS de 7.6, respectivamente). La fracción de baicaleína mostró las actividades antioxidante y antiviral más altas (3775 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g compuesto e IS de 4.8, respectivamente), mientras que la fracción de wogonina, mostró las actividades más bajas (5060 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g extracto e IS de 0, respectivamente).

* Trabajo de investigación

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko, Química, *Ph.D.* Codirectores: Jairo René Martínez Morales, Químico, *Ph.D.*; Lady Johanna Sierra Prada, Química, *Ph.D.*

Anualmente, de una hectárea de un cultivo de plantas de *Scutellaria* spp. se podrá obtener alrededor de 4 kg de baicalina y 2 kg de dihidrobaicaleina-glucurónido, sustancias de interés comercial debido a su actividad biológica, por lo que las plantas de *Scutellaria* spp. estudiadas podrían usarse para obtener extractos y compuestos bioactivos individuales con potencial antioxidante y antiviral para el sector farmacéutico y fitoterapéutico.

Abstract

Title: Obtaining hydroalcoholic extracts from the species *Scutellaria incarnata* Vent, *S. coccinea* and *S. ventenatii* Hook x *S. incarnata* for their fractionation and determination of their antiviral and antioxidant properties*

Author: Silvia Marcela PORRAS TRIANA**

Key Words: *Scutellaria*, flavonoids, antioxidant, antiviral

Description: Plants of the genus *Scutellaria* (Family Lamiaceae) have a wide variety of bioactive secondary metabolites, with diverse biological properties, e.g., anti-inflammatory, antiallergenic, antioxidant, antiviral, and antitumor. In this study, aerial parts of three species of *Scutellaria* spp. (100 g), were dried and ground. Extracts were obtained by ultrasonically assisted solvent extraction. Chemical characterization was performed using UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS. The extracts of *Scutellaria* spp. were fractionated by prep-HPLC to obtain fractions enriched with bioactive compounds.

Flavones and flavanones were the main secondary metabolites identified in the extracts of *Scutellaria* spp. Six fractions from *S. incarnata*, six from *S. coccinea* and eight from *S. ventenatii* x *S. incarnata* were isolated. It was possible to isolate baicalein, dihydrobaicalein and wogonin individually. The *S. coccinea* extract showed the highest antioxidant and antiviral activities (3830 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extract and selectivity index (IS) of 213, respectively), followed by the *S. incarnata* extract (2510 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extract and IS of 10, respectively) and *S. ventenatii* x *S. coccinea* (2900 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extract and IS of 7.6, respectively). The baicalein fraction showed the highest antioxidant and antiviral activities (3775 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ compound and IS of 4.8, respectively), while the wogonin fraction showed the lowest activities (5060 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extract and IS of 0, respectively).

Annually, from one hectare of cultivation of *Scutellaria* spp. it will be possible to obtain around 4 kg of baicalin and 2 kg of dihydrobaicalein-glucuronide, substances of commercial interest due to their biological activity, so the *Scutellaria* spp. studied could be used to obtain extracts and

* Research Work

** Science Faculty. School of Chemistry. Director: Elena E. Stashenko, Chemist, *Ph.D.* Co-directors: Jairo René Martínez Morales, Chemist, *Ph.D.*; Lady Johanna Sierra Prada, Chemist, *Ph.D.*

individual bioactive compounds with antioxidant and antiviral potential for the pharmaceutical and phytotherapeutic sector.

Introducción

Las enfermedades infecciosas diversas prevalecen en los países tropicales, porque tienen ambientes propicios para la propagación de microorganismos y vectores biológicos (Tercero & Olalla, 2008). Las infecciones virales se encuentran entre las principales responsables de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, entre ellas, se destacan el ébola, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la gripe, dengue en regiones tropicales como Colombia, Brasil y Venezuela, y el síndrome respiratorio agudo severo (SARS) (Ben-Shabat *et al.*, 2019). La intervención farmacoterapéutica ha sido hasta el momento la única alternativa para tratar la mayoría de las infecciones virales debido a que aún no existen vacunas seguras y eficaces para su aplicación en humanos, ni tampoco medicamentos antivirales (Nováková *et al.*, 2018).

En Colombia, el dengue es una enfermedad infecciosa que afecta gran parte de la población; cada año se reportan *ca.* 100.000 casos (Hernández *et al.*, 2022). El dengue se transmite por el vector *Aedes aegypti* (Sarmiento, 2000), en menor grado, por *Aedes albopictus*, y sus síntomas son vómito, fiebre, dolor de cabeza y, en condiciones más graves, hemorragias. Las enfermedades infecciosas, entre ellas, el dengue, están relacionadas con el estrés oxidativo alto, que se produce cuando ocurre una alteración del equilibrio entre las especies reactivas del oxígeno (ROS) y los mecanismos de defensa antioxidante del organismo (Camini *et al.*, 2017). Soundravally *et al.* (Soundravally *et al.*, 2008) evaluaron la infección viral por dengue en diferentes etapas de contagio (tres, cinco y siete días) y encontraron un notorio aumento de los ROS, lo que podría favorecer la oxidación descontrolada de biomoléculas (lípidos y proteínas) y provocar complicaciones adicionales en la salud de los pacientes.

La búsqueda de compuestos (o mezclas) antioxidantes, preferiblemente, de origen natural, puede ser una de las alternativas para aliviar los síntomas de enfermedades infecciosas, entre ellas, el dengue. El género *Scutellaria* (Familia Lamiaceae) incluye alrededor de 460 especies distribuidas en todo el mundo, principalmente, en regiones templadas de Europa, América del Norte y Asia Oriental (Ranjbar & Mahmoudi, 2017). Las plantas de *Scutellaria* han sido utilizadas desde hace tiempo en las regiones asiáticas y europeas; hojas, tallos y raíces, se han usado para hacer infusiones y ungüentos para controlar diversas gripes, infecciones, asma, neumonía, entre otras (Shen *et al.*, 2021a). En Colombia, los indígenas Paéz del Cauca, conocen la *Scutellaria* con el nombre de “Alegría” debido a que la infusión de hojas es útil, también, para calmar algunos trastornos mentales, como la ansiedad y la depresión y enfermedades del sistema respiratorio (Benítez-Benítez *et al.*, 2020). Diversos estudios (Karimov & Botirov, 2017; Z. L. Wang *et al.*, 2018) indican que los extractos hidroetanólicos de diferentes especies del género *Scutellaria* spp. poseen una gran variedad de metabolitos secundarios bioactivos, con diversas propiedades biológicas, entre ellas, antiinflamatoria, antialérgica, antioxidante, antiviral y antitumoral (Joshee. *et al.*, 2019).

Colombia es un país megabiodiverso con altísima variedad de plantas, más de 2400 especies, de las cuales menos del 15% han sido fitoquímicamente estudiadas (Pabón *et al.*, 2017). Especies de *Scutellaria* spp., nativas de Colombia, tampoco tienen muchos estudios científicos. Según el Instituto Nacional de Salud (Salud, 2020), *A. aegypti* y *A. albopictus* actúa como un vector para las enfermedades del dengue, chikungunya y zika, siendo el dengue, al día de hoy, el responsable de más de 35.000 contagios en todo el país, de los cuales más del 2% se encuentran en estado de alarma y el 0.1% han conducido a la muerte (*Casos Reportados de Dengue En Las Américas*, 2022). La búsqueda de agentes antivirales naturales es muy actual e importante. El

objetivo de este trabajo fue determinar la composición química de los extractos hidroetanólicos de *S. incarnata*, *S. coccinea* y *S. ventenatii* x *S. incarnata* y sus fracciones, así como sus propiedades antioxidantes, para complementar el estudio de actividad antiviral contra el virus del dengue, que se lleva a cabo en el laboratorio de CINTROP de la UIS.

En la presente investigación, se realizó un diseño experimental para obtener las mejores condiciones de extracción para cada especie bajo estudio, se determinó la composición química de los extractos por cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC/DAD) y cromatografía de ultra-alta eficiencia acoplada a un espectrómetro de masas *Orbitrap* (UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS).

Se colectaron seis fracciones de extractos de *S. incarnata* y *S. coccinea* y ocho de *S. ventenatii* x *S. incarnata*, por cromatografía líquida preparativa (prep-HPLC). La actividad antioxidante de las fracciones y de los extractos, fue evaluada por los siguientes métodos: ensayo de decoloración de catión-radical ABTS⁺ y *on-line* HPLC-ABTS⁺, ensayo de capacidad de absorción de radicales de oxígeno ORAC y ensayo del β -caroteno. La actividad antiviral se evaluó en el grupo de Arbovirus del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, CINTROP, dirigido por la profesora Dra. Raquel OCAZIONEZ.

Entre los hallazgos más importantes de este trabajo figuran la información sobre la composición química, por primera vez reportada, de plantas del género *Scutellaria* spp., nativas de Colombia. El extracto de *S. coccinea* presentó las actividades antioxidante y antiviral más altas. La baicalina, dihidrobaicaleina-glucurónido y baicaleina fueron importantes contribuyentes a las actividades antioxidante y antiviral, lo que los hace candidatos seguros para continuar los estudios biológicos adicionales. Se encontró antagonismo en las propiedades biológicas evaluadas de algunos compuestos de extractos (mezclas), por lo que sería importante aislar un mayor número

de compuestos individuales. Debido al alto rendimiento de extracción de los extractos estudiados y a la actividad biológica alta de algunos de sus componentes, estos se podrían emplear como ingredientes naturales antioxidantes y antivirales en productos finales.

Los resultados parciales de esta investigación se publicaron en un manuscrito científico en la revista “*molecules*” y en memorias de eventos nacionales e internacionales: 16^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, AMIPRONAT; 34^o Congreso Latinoamericano de Química, CLAQ; XII *International Mass Spectrometry Conference on Petrochemistry, Environmental and Food Chemistry*, Petromass; 3^d *Iberoamerican Conference on Mass Spectrometry*, IBERO-2022. Los resultados obtenidos pueden ser de interés para las áreas de investigación en química analítica, productos naturales, actividades biológicas y, en especial, para los investigadores interesados en las áreas de química analítica y de estudios de actividades antioxidante y antiviral de extractos de plantas, para sus posibles usos en productos farmacéuticos.

Este trabajo hizo parte del proyecto N° 3 del Programa Bio-Reto XXI 15:50 financiado por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, el Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. La evaluación antiviral se llevó a cabo en cooperación con el grupo de Arbovirus del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, CINTROP, dirigido por la profesora Dra. Raquel OCAZONEZ. El permiso fue otorgado por el contrato N° 270, que otorga acceso a recursos genéticos y productos derivados con fines de bioprospección, suscrito por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Industrial de Santander.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Obtener y caracterizar por técnicas instrumentales los extractos hidroalcohólicos y fracciones enriquecidas de las especies *S. incarnata* Vent, *S. coccinea* y *S. ventenatii* Hook x *S. incarnata*, y determinar sus actividades antioxidante y antiviral contra el virus del dengue.

1.2 Objetivos específicos

Encontrar las mejores condiciones de extracción para las tres especies de *Scutellaria* spp. bajo estudio, evaluando variables como la temperatura, relación de solventes y tiempo de extracción en el proceso de extracción.

Identificar y cuantificar los metabolitos secundarios por cromatografía líquida UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS en los extractos de las especies bajo estudio.

Fraccionar los extractos obtenidos de las especies bajo estudio por la técnica de cromatografía líquida preparativa (prep-HPLC) y caracterizarlos químicamente por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS.

Determinar la actividad antioxidante mediante las técnicas ABTS⁺, *on-line* HPLC-ABTS⁺, ORAC y β -caroteno, de los extractos hidroalcohólicos, de plantas bajo estudio con más altos rendimientos y contenido de flavonoides.

2. Estado del arte

2.1 *Scutellaria* spp.

Las plantas del género *Scutellaria* spp. (Lamiaceae), popularmente llamadas “*Skullcaps*” o “casquetes”, por la similitud que poseen sus flores con un casco de la época medieval, albergan más de 400 especies distribuidas en regiones templadas y tropicales de todo el mundo (Ranjbar & Mahmoudi, 2017). Algunos estudios han mostrado que los extractos obtenidos de diferentes especies de este género poseen propiedades antitumorales (Chou *et al.*, 2003), hepatoprotectivas (Lin & Shieh, 1996), antioxidantes (B. O. Lim, 2003), antiinflamatorias (Sook Chi *et al.*, 2001) y antivirales (S. C. Ma *et al.*, 2002), lo cual se encuentra en relación con el empleo de estas especies en diferentes culturas para tratar diversos tipos de malestares.

La composición química de los extractos aislados de las especies de *Scutellaria* spp. se empezó a estudiar desde inicio de siglo XX, cuando en 1910, se aisló, por primera vez, escutelareína de *S. altissima* (Zeng & Chen, 1957). En los extractos, obtenidos de *Scutellaria* spp., se han detectado terpenos, alcaloides, fitoesteroles y flavonoides, como baicalina, baicaleina, wogonina y ganhuangenina (Shang *et al.*, 2010). La especie más abundante del género y, la más estudiada, es *S. baicalensis*, en la cual se han encontrado más de 130 compuestos, siendo el grupo más abundante los derivados de flavonas, seguido de flavanonas, flavonoles, isoflavonas, flavanonoles y chalconas (Karimov & Botirov, 2017).

En Colombia, las especies de *Scutellaria* nativas, no han sido estudiadas ni aprovechadas. Hasta la fecha, solo se ha encontrado un estudio de Benitez-Benitez *et al.* (Benítez-Benítez *et al.*, 2020), en el que reportaron algunos parámetros del método de extracción con solvente que

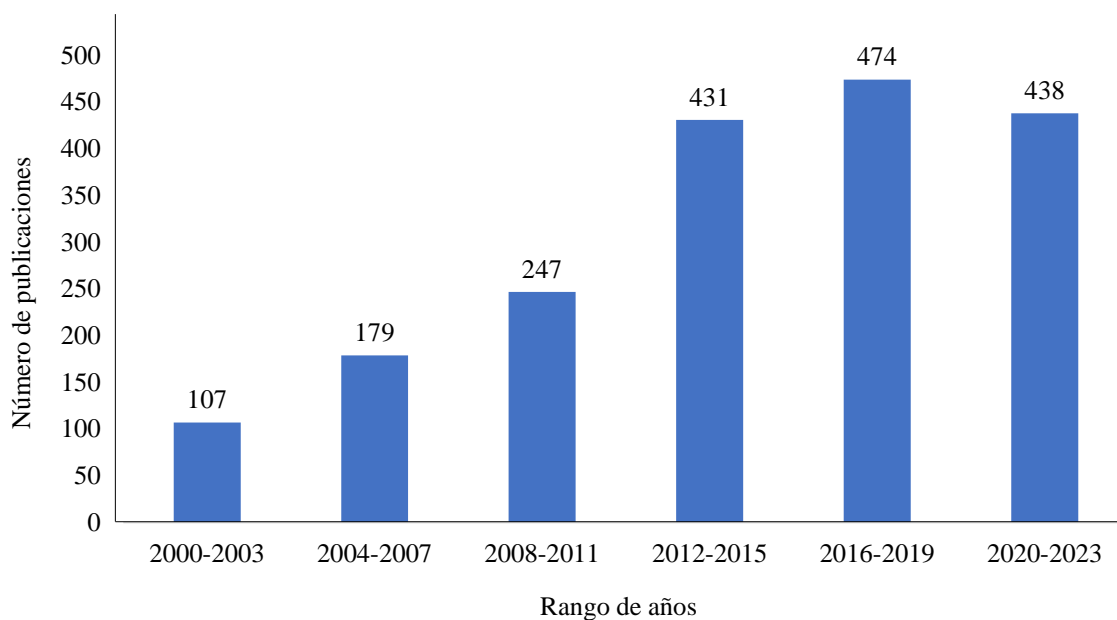
permitieron obtener extractos con rendimiento alto (35%); los autores (Benítez-Benítez *et al.*, 2020) no estudiaron la composición química de los extractos obtenidos.

Las actividades antioxidante (Grzegorzcyk-Karolak *et al.*, 2019) y antiinflamatoria (Kim *et al.*, 2018) de extractos de *Scutellaria* spp. están reportadas, sin embargo, aún se desconoce la contribución de los compuestos individuales a la actividad biológica del extracto. Por tanto, investigadores como Dong *et al.* (Shen *et al.*, 2021a) y Lim *et al.* (H. Lim *et al.*, 2020) han aislado compuestos fenólicos de extractos de algunas de estas plantas, usando cromatografía preparativa de baja presión (LPPC, por sus siglas en inglés) y cromatografía en columna con diferentes solventes de elución, para determinar sus propiedades antioxidante, antiviral y antitumoral. La wogonosida (C. Han *et al.*, 2018), baicaleína (Roy *et al.*, 2007), baicalina (Li-Weber, 2009), wogonina (Zhao *et al.*, 2018) y oroxilina A (H. Huang *et al.*, 2020), compuestos característicos presentes en *Scutellaria* spp., tienen propiedades antioxidantes, antivirales y antitumorales y modulan varias rutas biosintéticas relacionadas con la proliferación de células cancerígenas.

Con el fin de encontrar más estudios realizados sobre el género *Scutellaria* spp., se llevó a cabo una búsqueda sistemática en la base de datos *Scopus* (*Elsevier*), utilizando la ecuación de búsqueda: *TITTLE-ABS-KEY* (“*Scutellaria and Flavonoids*”). Se encontraron más de 1.600 documentos desde el año 2000 (**Figura 1**), lo que evidencia el interés que han tenido los investigadores en estudiar las especies del género *Scutellaria* durante los últimos años. En China, se ha reportado un número alto de publicaciones sobre *Scutellaria* spp., más alto (981), seguido de Corea del Sur (174), Estados Unidos (164) y Taiwán (79). Las áreas de estudio de mayor interés son farmacología (25 %), bioquímica (22 %), medicina (19 %) y química (12 %).

Figura 1.

Número de publicaciones sobre *Scutellaria* spp., registradas durante los años 2000-2023. La ecuación de búsqueda utilizada TITTLE-ABS-KEY (“*Scutellaria* and Flavonoids”). Fuente: Scopus, Elsevier. Periodo de observación 2000-2023. Fecha de consulta 20 de enero de 2023.



Los metabolitos presentes en *Scutellaria* spp. han sido de gran interés para los investigadores, porque muchos de ellos son compuestos con alta actividad biológica. La ecuación de búsqueda TITTLE-ABS-KEY (“*Scutellaria* and Metabolite”), permitió encontrar 438 documentos que, en su mayoría, hacen referencia a las propiedades biológicas que poseen estos compuestos, en especial, los flavonoides (**Tabla 1**). Uno de los estudios con mayor número de citas es de Kang *et al.* (Kang *et al.*, 2012) (56 citas), quienes evaluaron la capacidad que tienen algunas flavonas, *e.g.* la baicaleína, para inhibir las ROS, generadas por un exceso de

H₂O₂ en la proteína kinasa A. Bardaksi *et al.* (Bardakci *et al.*, 2015), encontraron que el extracto de *S. hastifolia* presentó actividades antioxidante y antiinflamatoria altas en estudios *in vitro*.

Tabla 1.

Propiedades biológicas identificadas para algunas especies de Scutellaria spp. Tomado con modificaciones de Shen et al. (Shen et al., 2021b).

Actividad	Componente activo / extracto	Dosis	Ensayo	Eficacia	Mecanismo
Antitumoral	Baicaleína	2-256 μ M 60 mg/kg	<i>In vitro</i> : líneas celulares humanas de cáncer de páncreas, PANC-1. <i>In vivo</i> : modelos de tumor de xenoinjerto en ratones hembra desnudos BALB/c.	IC ₅₀ = 37.27 μ M. Inhibición del tumor (38,3%).	Modulación de la vía de señalización <i>Hedgehog</i> .
	Baicalina	50-200 μ M 50 y 100 mg/kg	<i>In vitro</i> : células cancerígenas de colon, HT-29. <i>In vivo</i> : modelos de tumor de xenoinjerto en ratones desnudos.	IC ₅₀ = 165.5 μ M. Inhibición del tumor, P<0,05.	Supresión el gen c-Myc y ARN oncomir.
	Wogonina	0-40 μ M 20-80 mg/kg	<i>In vitro</i> : células cancerígenas humanas de colon, HCT116 (wt-p53), HT-29 (mt-p53), p53-null HCT116 (p53- null). <i>In vivo</i> : modelo de ratones hembra desnudos, BALB/c, atímicos de tumor trasplantado, A2780.	Dependiente de la dosis. Inhibición del tumor (60,8 %).	Inhibición de la glucólisis del cáncer.
	Wogonosida	0-1000 μ M	<i>In vitro</i> : células cancerígenas humanas de colon, LOVO.	IC ₅₀ = 31.25 μ M.	Inducción de autofagia mediada por mitocondrias a través de PI3K/AKT/mTOR/p70s6k.
	Oroxilina A	10 y 40 mg/kg	<i>In vivo</i> : modelo de tumorigénesis de piel de ratón carcinógeno (DMBA/TPA) inducido.	Previene de manera dependiente la carcinogénesis cutánea inducida por DMBA/TPA en ratones.	Inhibición de la inflamación por regulación de SHCBP1.

Tabla 1.
Continuación.

Actividad	Componente activo / extracto	Dosis	Ensayo	Eficacia	Mecanismo
Antiviral	Baicalina	50 µg/mL	<i>In vitro</i> : reducción de formación de unidades de focos del virus del dengue en células epiteliales de riñón de mono, Vero (ATCC®CCL81™).	Viabilidad > 90 %.	Inhibición completa de la formación de focos por virus.
	Wogonina	1- 10 µg/mL	<i>In vitro</i> : replicación del virus de la influenza A y B en células renales caninas, <i>Madin-Darby</i> , y células humanas epiteliales de riñón (A549).	Dependiente del tiempo, IC ₅₀ = 10 µg/mL.	Modulación de la ruta AMPK.
	Baicaleína	0,74 µg/mL	<i>In vitro</i> : replicación del virus del SARS-Cov en células epiteliales de riñón de mono, Vero ATCC®CCL81™).	50 µM inhibe 41 % de proteasa SARS-CoV-2 3CL.	Inhibición de la replicación del virus.
Antiinflamatoria	Extracto acuoso de <i>S. baicalensis</i>	100 mg/kg	<i>In vitro</i> : modelo de periodontitis en ratas.	Inhibición de la expresión inflamación de citoquina.	
	Extracto etanólico de <i>S. barbata</i>	50-200 mg/mL	<i>In vitro</i> : modelo celular RAW 264.7 de macrófagos murinos.	Dosis dependiente contra la inflamación.	Inhibición de la actividad NF-κB.
Antioxidante	Extracto etanólico de raíces y tallos de <i>S. altissima</i>	10 µg/mL	<i>In vitro</i> : ensayo MTT contra el daño oxidativo del ADN en linfocitos.	Supervivencia de linfocitos entre el 90,2 y el 98,7%.	-
	Extracto etanólico de <i>S. baicalensis</i>	40-200 µg/mL	<i>In vitro</i> : ensayos DPPH, ABTS ⁺ y CAA.	IC ₅₀ = 70.81, 35.34 y 33.27 µg/mL, respectivamente.	-

Tabla 1.*Continuación.*

Actividad	Componente activo / extracto	Dosis	Ensayo	Eficacia	Mecanismo
Antioxidante	Baicaleína	80 mg	<i>In vivo</i> : pacientes con nefritis tubular-intersticial (TIN).	Reducción de los niveles de expresión de IL-6, IL-10 y TNF- α en suero, SOD y GSH-PX disminuyen.	Activación de la vía de señalización Nrf2/HO-1.
		100 μ M	<i>In vitro</i> : modelo de células TIN inducidas por lipopolisacáridos (LPS) en células epiteliales tubulares proximales renales, ensayo MTT.		
	Baicalina	50 mg/kg	<i>In vivo</i> : modelo de rata con osteoartritis (OA).	Disminución dosis dependiente de los niveles de anión superóxido muscular y peroxinitrito.	Inhibición de la expresión derivada del eritroide del factor nuclear.

Los extractos obtenidos de las plantas son generalmente una mezcla muy compleja de metabolitos secundarios, por ello, para realizar la cromatografía analítica de estas mezclas, es conveniente, previamente, emplear técnicas de fraccionamiento y purificar algunos componentes para realizar ensayos biológicos posteriores (Waters, 1971). Las técnicas de separación clásicas como cromatografía en columna, cromatografía en capa fina, extracción líquido-líquido y la combinación entre ellas, han permitido obtener un número significativo de compuestos puros en distintas especies de *Scutellaria* spp. (**Tabla 2**). Sin embargo, técnicas más modernas como la cromatografía preparativa (prep-HPLC) permiten obtener las fracciones y los analitos en un menor tiempo, con resultados similares (E. Verette & Villiers-le-Bel, 2000).

Usando la ecuación de búsqueda *TITTLE-ABS-KEY* ("*Scutellaria incarnata*"), se encontraron 35 resultados, sin embargo, hacían referencia a otras especies del género *Scutellaria*. Para las especies *S. coccinea* y *S. ventenatii* x *S. incarnata*, tampoco se encontraron reportes, lo que evidencia una falta de estudios sobre las especies de *Scutellaria* spp., nativas de Colombia. En la **Figura 2** aparecen las imágenes de las especies estudiadas.

Figura 2.

Plantas de Scutellaria spp. nativas de Colombia, en etapa de florecimiento: A. S. incarnata; B. S. coccinea y C. S. ventenatii x S. incarnata. Fotografías tomadas por Silvia Marcela PORRAS TRIANA el 02 de diciembre de 2022 en el Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM.



Tabla 2.*Técnicas de fraccionamiento y purificación de extractos de Scutellaria spp.*

Especie	Parte de la planta estudiada	Método de fraccionamiento	Compuestos aislados (número)	Referencias
<i>S. hainanensis</i>	Hojas y tallos	Extracción líquido-líquido (agua, éter de petróleo y acetato de etilo), seguido de cromatografía en columna.	Flavonoides (11), fenilpropanoides (2), derivados de piridinio (1), ésteres (1), derivados fenólicos (1) y lignanoides (1).	(Bai <i>et al.</i> , 2019)
<i>S. prostrata</i>	Raíces	Cromatografía en columna empleando cloroformo y cloroformo-metanol en diferentes proporciones.	Escutelarina, baicalina, wogonosida, escutelaprostina, hispidulin-7- <i>O</i> - β -glucopiranosido, martinósida, ácido escutelárico 3- <i>O</i> - β -glucopiranosido, scutellapbiflavanone y scutellaprostina M.	(Bhat <i>et al.</i> , 2014)
<i>S. intermedia</i>	Hojas y tallos	Extracción líquido-líquido (éter de petróleo, acetato de etilo y butanol), seguido de cromatografía en columna.	Crisina, oroxilina A, 7- <i>O</i> -metilnorwogonina, 5,7,22-trihydroxiflavona, 5,7,22-trihydroxiflavanona, escutevulina, apigenina y baicaleína.	(Karimov <i>et al.</i> , 2017)
<i>S. baicalensis</i>	Raíces	Extracción líquido-líquido (hexano, acetato de etilo y butanol), seguido de cromatografía en columna y cromatografía líquida de presión media (MPLC, por sus siglas en inglés).	Wogonina, sculcapflavona II, oroxilina A, baicaleína, 2',5,6',7-tetrahydroflavanona, wogonosida, viscidulina III, baicalina y 2',3,5,6',7-pentahydroxiflavanona.	(Y. K. Han <i>et al.</i> , 2020)
<i>S. baicalensis</i>	Raíces	Extracción líquido-líquido (agua, acetato de etilo y butanol), seguido de cromatografía preparativa de baja presión (LPPC, por sus siglas en inglés).	Baicaleína y wogonina.	(Dong <i>et al.</i> , 2012)

2.2 Compuestos fenólicos

El metabolismo en las plantas es una serie de eventos físico-químicos ocasionados durante los procesos de fotosíntesis, respiración y degradación de compuestos orgánicos, que producen moléculas de partida que se emplean para la generación de ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, carbohidratos, ácidos orgánicos y lípidos (metabolitos primarios), fundamentales para que la planta crezca, se multiplique y viva (*Plant Metabolism*, 2018).

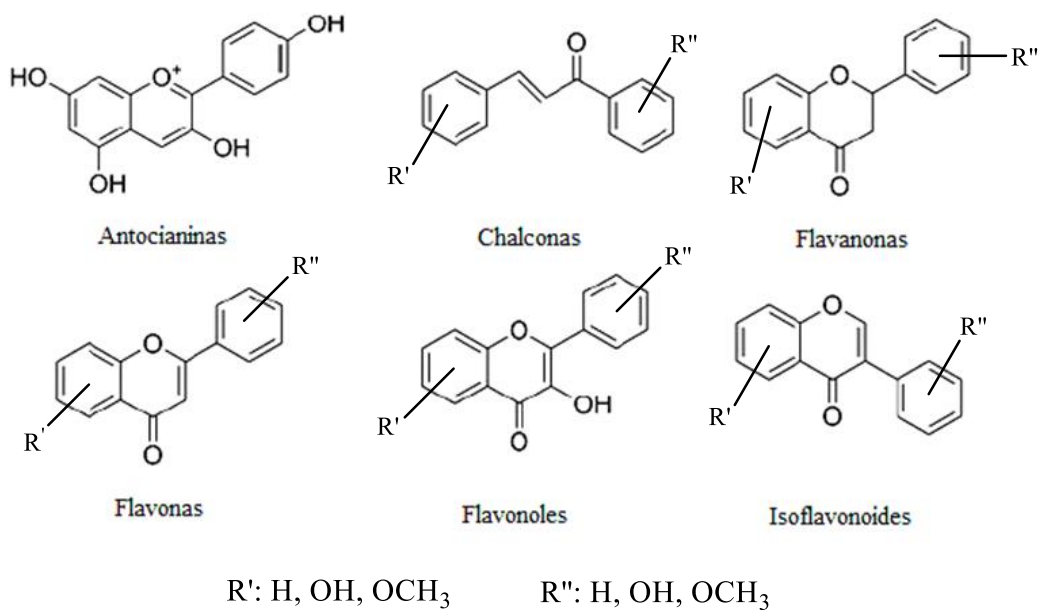
Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo y medio peso molecular que derivan sustancias de metabolismo primario de las plantas a través de diversas rutas biosintéticas, principalmente, la del ácido shikímico y la pentosa fosfato, dando lugar a más de 8000 compuestos (Stashenko, 2009). Los metabolitos secundarios cumplen varias funciones en la planta, entre ellas, la defensa contra diferentes tipos de virus y plagas, ejercen la repelencia de insectos y participan en la comunicación entre plantas para favorecer o limitar su crecimiento (Kabera *et al.*, 2014). Debido a que estructuralmente tienen uno o más grupos hidroxilo unidos a un anillo aromático (compuestos fenólicos), es posible encontrar desde moléculas simples, como ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y estilbenos, hasta llegar a sustancias altamente polimerizadas como los taninos (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2018).

Los flavonoides, con más de 4000 moléculas reportadas, son el grupo más abundante de compuestos fenólicos. Se encuentran, principalmente, en las vacuolas de las células vegetales y se caracterizan por ser solubles en agua y por hacer parte del 60% de la dieta humana (Minatel *et al.*, 2017). Poseen quince átomos de carbono con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres átomos de carbono y suelen presentar diversos sustituyentes, entre ellos se destacan los grupos hidroxilo.

Los primeros flavonoides se identificaron por el bioquímico húngaro Albert Szent-Györgyi, quien ganó el Premio Nobel por demostrar que estos compuestos aumentan el efecto antioxidante de la vitamina C (Días Sanchez *et al.*, 2017). Algunas de las funciones de los compuestos fenólicos consisten en otorgar color a los tejidos vegetales y frutos, absorber la radiación UV y participar en el proceso de fijación de nitrógeno (Panche *et al.*, 2016). Los compuestos fenólicos poseen varias propiedades biológicas, entre ellas, antialérgica, anticancerígena, antioxidante, antiviral y antiinflamatoria, y pueden brindar efectos beneficiosos para la salud de las personas (Kabera *et al.*, 2014). Los flavonoides se clasifican, según la posición y número de sustituyentes en su estructura química, así: flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonoides, antocianinas y chalconas (Cartaya & Reynaldo, 2001a) (**Figura 3**).

Figura 3.

Clasificación de flavonoides. Tomado con modificaciones de Panche et al. (Panche et al., 2016).



La extracción de los compuestos fenólicos suele realizarse usando solventes de polaridad media o alta (agua, metanol, etanol, acetona, acetato de etilo y sus combinaciones) (J. Dai & Mumper, 2010). La extracción asistida con ultrasonido es una técnica muy utilizada debido a la facilidad de su uso, eficiencia de extracción y amplio rango de aplicaciones (Gharaati Jahromi, 2019). Las ondas de ultrasonido tienen frecuencias entre 20 y 2000 kHz y permiten aumentar el contacto superficial entre los disolventes y los analitos, facilitando, de esta manera, su extracción (NN., 2015; Q. W. Zhang *et al.*, 2018).

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) es la técnica analítica preferida por los investigadores para la separación de compuestos fenólicos, así como para su identificación tentativa cuando se usa acoplada a diversos detectores, especialmente, el detector de arreglo de diodos (DAD) y el espectrómetro de masas (MS) (Naczka & Shahidi, 2004). En general, se emplean columnas en fase reversa (C₁₈) y fases móviles polares, siendo el acetonitrilo y el metanol, los solventes más comunes (Ignat *et al.*, 2011; Zarena & Sankar, 2012).

La cromatografía líquida acoplada a un detector de espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés), dependiendo de la resolución del detector, puede brindar análisis muy sensibles que permiten determinar masas exactas, fórmulas moleculares, composición elemental, patrones de fragmentación y relaciones isotópicas (Bianco *et al.*, 2006), para elucidar las estructuras químicas de los compuestos, especialmente, cuando se trabaja con sistemas *tándem* y MS de alta resolución (Sasidharan *et al.*, 2011). Desde hace más de diez años, se destaca el analizador de masas *Orbitrap*, por su alta sensibilidad y resolución (Motilva *et al.*, 2013).

La cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) y cromatografía en columna se han usado para aislar compuestos de extractos de plantas (Rasul, 2018), pero la cromatografía preparativa (prep-HPLC) se utiliza para aislar compuestos de interés de manera versátil y rápida

(Latif & Sarker, 2006). Esta técnica se diferencia de la cromatografía analítica, porque usa columnas con un diámetro interno considerablemente más grande (10-70 mm vs 4.6 mm), lo que permite trabajar con cantidades de muestra grandes. En la **Tabla 3** se observan algunas de las principales diferencias entre las cromatografías preparativa y analítica.

Tabla 3.

Principales diferencias entre las cromatografías analítica y preparativa. Tomado con modificaciones de Subesta (Subesta, 2003).

Parámetros	Cromatografía	
	Analítica	Preparativa
Tamaño de partícula, μm	1-3	3 - 10
ID de columna, mm	4.6	10 - 70
Capacidad de carga	1-8 mg	< 10 g
Flujo, mL/min	0.9	25

2.3 Actividad antioxidante de extractos de plantas

Halliwell (Halliwell, 1990) define a un antioxidante como cualquier sustancia que, al estar presente en concentraciones bajas en comparación con las de un sustrato oxidante, retrasa o previene significativamente la oxidación de ese sustrato. Un sustrato oxidable puede ser proteína, lípido, carbohidrato o el ADN. La ruta bioquímica, que suelen seguir este tipo de compuestos, es la interacción con un radical libre (RL), al cual le ceden un electrón oxidándose y transformándose en una especie molecular relativamente estable, débil, generalmente no tóxica y que, en algunos casos, puede regenerarse a su forma reducida por la acción de otros antioxidantes (Gil *et al.*, 2002).

Los antioxidantes se encargan de la regulación metabólica, por ejemplo, de activar e inactivar biomoléculas, de permitir la obtención de energía, de la activación celular, entre muchas otras (Gulcin, 2020). Sin embargo, cuando ocurre un desequilibrio por el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS), o una disminución de antioxidantes presentes, se genera el llamado estrés oxidativo (EO) (Lizette Gil del Valle, 2015), que puede estar relacionado con diferentes enfermedades, principalmente, virales. Por esta razón, encontrar fuentes naturales de antioxidantes, que permitan controlar los desbalances que pueden ocurrir en el organismo, es esencial.

La capacidad antioxidante puede determinarse a través de diferentes ensayos o *test* que, dependiendo de su mecanismo de acción, brindarán resultados específicos. Los mecanismos de acción de los antioxidantes pueden ocurrir a través de transferencia de electrones, transferencia de átomos de hidrógeno, quelación de iones metálicos, entre otros. Emplear varios ensayos para medir la actividad antioxidante, otorga una mayor información sobre el mecanismo de acción de la sustancia o extracto evaluado (D. Huang *et al.*, 2005; Lizette Gil del Valle, 2015). En la **Tabla 4** se muestran algunos ensayos empleados, su clasificación, según el modo de acción, para medir la actividad antioxidante de una sustancia o mezcla.

Tabla 4.

Clasificación de los ensayos más empleados para medir actividad antioxidante. Tomado con modificaciones de Zulueta et al. (Zulueta et al., 2009).

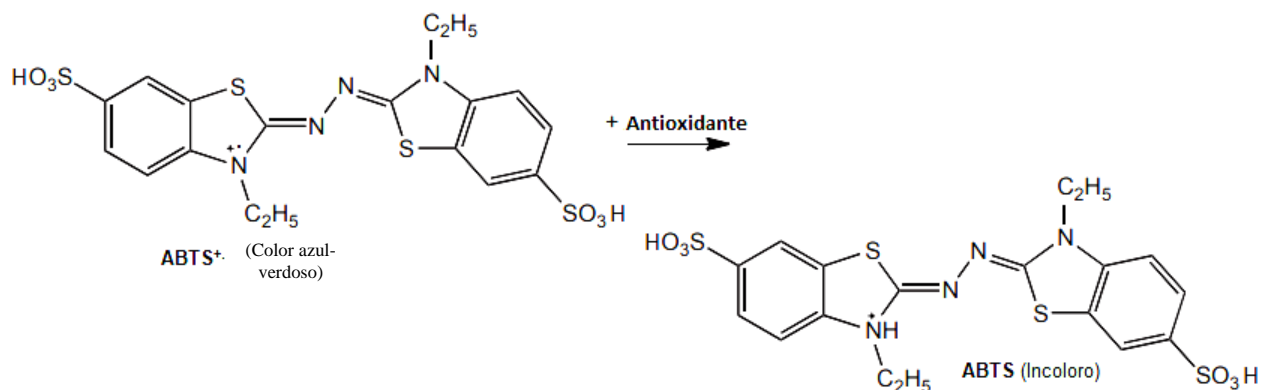
Ensayo		Mecanismo de acción	
Sigla	Nombre	Sigla	Nombre
ORAC	Capacidad de absorción de radicales de oxígeno		
TRAP	Parámetro antioxidante de captura total de radicales	HAT	Transferencia de un átomo de hidrógeno
IOU	Inhibición de absorción de oxígeno		
βC	Ensayo de blanqueo de β-caroteno		
TEAC	Capacidad antioxidante de equivalente Trolox		
FRAP	Parámetro antioxidante reductor de iones férricos	ET	Transferencia de electrones
ABTS ⁺	Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS ⁺		

2.3.1 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺

Este método fue propuesto por Miller *et al.* (Miller *et al.*, 1993) en 1993 y también se conoce como capacidad antioxidante de equivalente al Trolox[®]. El método espectrofotométrico se basa en la inhibición por parte de los antioxidantes de la absorbancia del catión-radical ABTS⁺ [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)], debido a su reducción por los compuestos donadores de electrones presentes en la muestra de interés (**Figura 4**). El radical es un cromóforo azul-verde, estable, y tiene un espectro de absorción de longitud de onda característico ($\lambda=734$ nm), posee solubilidad en medios polares y apolares y no es afectado por la fuerza iónica de solución, por lo tanto, evalúa antioxidantes tanto hidrofílicos, como lipofílicos de extractos de plantas o fluidos biológicos (Huet-Breña, 2017; Zulueta *et al.*, 2009).

Figura 4.

Reacción del radical $ABTS^{+\bullet}$ en presencia de un antioxidante. Tomado con modificaciones de Vallejo et al. (Vallejo et al., 2016).



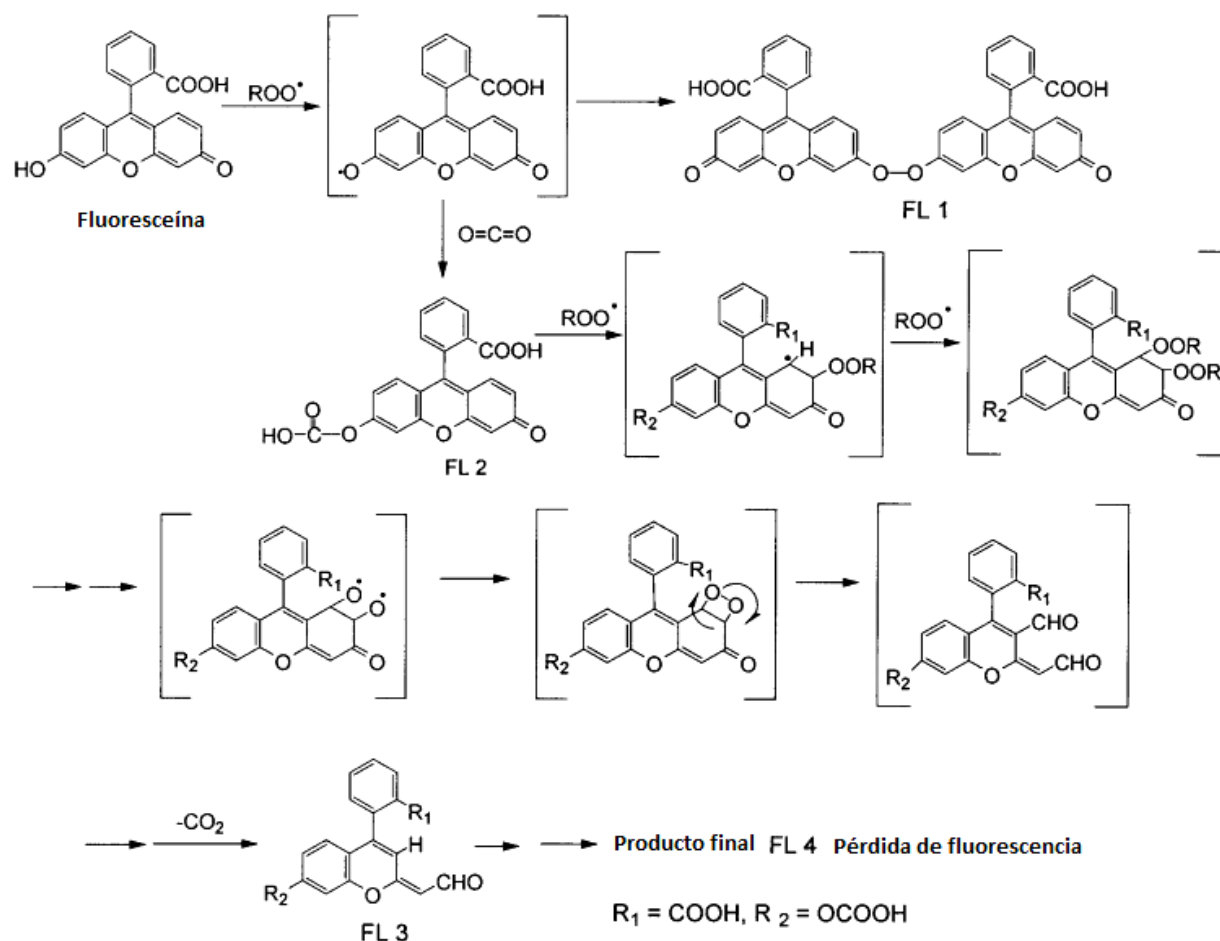
Diversos investigadores han empleado ensayos antioxidantes usando un paso previo de cromatografía líquida, con el fin de obtener una respuesta en función de cada pico del compuesto de la mezcla obtenido; lo que se conoce como métodos de detección de alta resolución (HRS, por sus siglas en inglés) (Schenk et al., 2003). En estos sistemas, una vez separados los compuestos por HPLC, cada uno de ellos se mezcla con un radical que se encuentra en una bomba auxiliar y, posteriormente, se transfiere a una bobina de reacción y un detector. La respuesta se observa como una señal negativa debido a que los radicales se neutralizan con los electrones donados por los antioxidantes, disminuyendo así su respuesta (absorbancia) (Niederländer et al., 2008). En este trabajo se determinó cuál de los compuestos, presentes en el extracto, contribuyó en mayor grado a la capacidad antioxidante de la mezcla (extracto), empleando el ensayo de decoloración del catión-radical *on-line* HPLC- $ABTS^{+\bullet}$ (Shi et al., 2009).

2.3.2 Capacidad de absorción de radicales oxígeno ORAC

El método de capacidad de absorción de radicales oxígeno fue desarrollado por Cao, Alessio y Cutler en 1993 (Cao *et al.*, 1993) y consiste en la medición del decaimiento en la fluorescencia de la fluoresceína, que sufre un daño oxidativo por radicales peroxilo (ROO[•]). En este ensayo, los compuestos antioxidantes protegen la fluoresceína del daño generado a través de la donación de uno de sus átomos de hidrógeno, lo que permite medir el grado de su “efectividad”. Usualmente, se emplean compuestos *azo* (moléculas que poseen un enlace N=N), como el AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropano) diclorhidrato], para generar los radicales peroxilo por descomposición térmica, que oxidan a la fluoresceína y causan una disminución de su fluorescencia (**Figura 5**) (Lopez Mendez, 2015; Zulueta *et al.*, 2009).

Figura 5.

Posibles productos de oxidación de la fluoresceína en presencia del radical AAPH durante el ensayo ORAC. Tomado con modificaciones de Ou et al. (Ou et al., 2001).



2.3.3 Ensayo del β -caroteno

El ensayo del β -caroteno es el método más antiguo para medir la peroxidación de lípidos en emulsiones de aceite en agua, e involucra el mecanismo de acción de transferencia de átomos de hidrógeno. Es un método rápido y relativamente sencillo en el cual se oxida el ácido linoleico, un ácido graso insaturado, debido a las ROS que se producen por el agua oxigenada. El principio del método se basa en el cambio de color de una solución de β -caroteno, de amarillo a incoloro,

ello, debido a la ruptura de la conjugación π del β -caroteno por la presencia de radicales peroxilo-lipídicos ($\text{LOO}\cdot$). Cuando se añade el antioxidante a la solución, la decoloración se retarda gracias a la reacción competitiva entre el β -caroteno y el antioxidante con los radicales peroxilo-lipídicos del medio (Gulcin, 2020; Ueno *et al.*, 2014).

2.4 Actividad antiviral

Los compuestos con actividad antiviral son medicamentos que se usan en el tratamiento de algunas enfermedades víricas. Ellos no eliminan los virus, pero consiguen impedir su replicación o alivian los síntomas propios de la enfermedad (Prieto, 2021). Los virus son agentes infecciosos microscópicos acelulares cuya replicación depende principalmente de los procesos biosintéticos de la célula hospedadora. Una sustancia antiviral, para que sea eficaz, debe impedir la entrada o salida del virus a (o de) la célula, se activa dentro de ella, o bloquea la acción de enzimas importantes en la replicación del virus (Katzung *et al.*, 2011). Los agentes antivirales se dividen en: (1) virusidas, que inactivan directamente el virus; (2) antivirales, que inhiben la replicación viral e (3) inmunomoduladores, que aumentan o modifican la respuesta del huésped a la infección viral (González *et al.*, 2014).

Estudios realizados por Cuadros *et al.* (Martínez & Ocazonez, 2019), en el grupo de Arbovirus del Centro de Investigaciones CINTROP, bajo la dirección de la doctora Raquel OCAZONEZ, han demostrado la efectividad que poseen los extractos obtenidos, de diversas plantas, para inhibir la replicación de los serotipos uno y dos del virus dengue. Se encontró que el extracto de *Ageratina aff popayanensis*, presentó el mayor grado de inhibición para el VDEN-1, cuando fue evaluado en células de hepatocitos humanos, seguido del extracto de *Aristolochia anguicida*, que redujo la

infección por VDEN-1 y VDEN-2 en células de riñón de mono, así como su replicación en células de hepatocitos humanos.

2.4.1 Virus del dengue

El dengue es una enfermedad que se transmite a los humanos por los mosquitos *Aedes aegypti* y, en menor proporción, por *A. albopictus*, que va desde leve (dengue), hasta grave (dengue hemorrágico). Existen cuatro clasificaciones (serotipos) de virus dengue, según los antígenos que presentan en su superficie celular, así: VDEN-1, VDEN-2, VDEN-3 y VDEN-4; los más comunes en Colombia son los primeros tres serotipos que son los más agresivos. Dentro de las enfermedades humanas generadas por arbovirus, el dengue es el principal responsable de las sintomatologías y muertes que se presentan, con alrededor de 20000 a 25000 muertes de los 50 y 100 millones de infecciones que ocurren cada año en áreas urbanas tropicales de todo el mundo (Ocazionez *et al.*, 2010).

Existen reportes científicos que indican una actividad antiviral alta, contra VDEN-2, que poseen la flavona glicosilada baicalina (Moghaddam *et al.*, 2014) y su respectiva aglicona baicaleína (Zandi *et al.*, 2012), presentes en el extracto de *S. baicalensis*; hasta la fecha, el estudio de éstos y otros metabolitos presentes en los extractos, no se ha hecho para otros serotipos del dengue.

3. Desarrollo experimental

3.1 Reactivos

Para el desarrollo de este trabajo, se utilizaron ácido 2,2'-azino-bis-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS) ($\geq 98\%$), ácidos gálico ($\geq 97\%$) y linoleico ($\geq 99\%$), β -caroteno ($\geq 93\%$), cloroformo ($\geq 99\%$), baicaleína ($\geq 95\%$), apigenina ($\geq 95\%$) y Trolox[®] ($\geq 97\%$), todos adquiridos en *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EE.UU.). Salvigenina ($\geq 98\%$), escutelarina ($\geq 98\%$), escutelareína ($\geq 98\%$), baicalina ($\geq 98\%$), apigenina-7-glucurónido ($\geq 98\%$), wogonina ($\geq 98\%$), wogonosida ($\geq 98\%$), eriodictiol-7-glucósido ($\geq 98\%$) y norwogonina ($\geq 98\%$) se obtuvieron de *Chemfaces* (Wuhan, Ubei, China). Galangina ($\geq 95\%$), kaempferol-3-*O*-rutinósido ($> 98\%$) y vitexina ($> 98\%$) se compraron a *Phytolab GmbH* (Vestenbergsgreuth, Baviera, Alemania). Acetonitrilo, grado HPLC; ácido fórmico, grado HPLC; isopropanol (98%), formiato de amonio ($\geq 99\%$), metanol, grado LC/MS; persulfato de potasio ($\geq 98\%$) y agua Tipo I (sistema de purificación *Millipore Direct-QTM*) provinieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

3.2 Material vegetal

3.2.1 Recolección

El material vegetal de *Scutellaria* spp. pertenece al estado colombiano, según reza el contrato de acceso a recursos genéticos y productos derivados N° 270 entre el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y la Universidad Industrial de Santander. Las partes aéreas de plantas de *S. incarnata* (número *voucher* UIS219783), *S. coccinea* (número *voucher* UIS219784) y *S. ventenatii* x *S. incarnata* (híbrido, número *voucher* UIS219785) se recolectaron en el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM (Bucaramanga, Santander, Colombia). El material vegetal se secó en un liofilizador de bandejas

VirTis Advantage Plus (Gardiner, New York, EE. UU.) y se almacenó a temperatura ambiente (24 °C), en ausencia de luz.

3.2.2 Identificación botánica

La identificación botánica de las especies de *Scutellaria* spp. se llevó a cabo en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Industrial de Santander. *Exsiccatae* (contramuestras) de las plantas estudiadas se depositaron en el Herbario con el respectivo número de *voucher*.

3.3 Extracción con solvente del material vegetal

Para las tres especies de *Scutellaria* spp. se desarrolló un diseño experimental 2^3 con punto central para determinar las mejores condiciones de extracción, según la metodología desarrollada por Liu *et al.* (Y. Liu *et al.*, 2015), con algunas modificaciones. El procedimiento se llevó a cabo con la técnica de extracción con solvente (SE) asistida con ultrasonido, cada punto se midió por triplicado, mientras que el punto central, por quintuplicado. Los siguientes fueron los factores modificados: temperatura (A), relación etanol:agua (B) y tiempo (C). La respuesta combinada se determinó normalizando los datos tanto rendimiento, como de actividad antioxidante (medida por la técnica *on-line* HPLC-ABTS⁺) y sumando sus valores. Los datos se procesaron con el *software Statgraphics centurión XVI*, versión 16.1.

Los extractos hidroalcohólicos de las especies de *Scutellaria* spp. se obtuvieron, según las condiciones descritas en la **Tabla 5**. Tallos y hojas secas y molidas (1 g) se mezclaron con una solución de EtOH:H₂O (20 mL), la mezcla se sometió a ultrasonido (*Elmasonic S15H*, Singen, Alemania) (35kHz). El extracto se filtró (papel filtro *Whatman* N° 1) y el residuo se extrajo una vez más. Los extractos obtenidos se rotoevaporaron en el equipo *Heidolph (Hei-VAP, Advantage*

HL, Chicago, IL, EE. UU.), se secaron en un liofilizador de bandejas *VirTis AdVantage Plus* (*SP Scientific*, Gardiner, New York, EE. UU.) y se almacenaron (4 °C) en ausencia de luz.

Tabla 5.

Matriz de experimentos y variables evaluadas para el diseño factorial 2³ para la extracción con solvente de plantas de Scutellaria spp. bajo estudio (n=3).

N° de experimentos	A (Temperatura, °C)	B (EtOH:H ₂ O %)	C (Tiempo, min)
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
Factores	Niveles		
	-1	0	1
(A) Temperatura, °C	30	40	50
(B) EtOH-H ₂ O, %	40	50	70
(C) Tiempo, min	5	10	15

3.4 Análisis químico de extractos

3.4.1 Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Las muestras se pesaron (0.5 mg) y se disolvieron en fase móvil (1 mL) metanol-agua 50:50 (0.1 % de ácido fórmico y 5 mM de formiato de amonio), para una concentración final de 500 mg/L. Los patrones de referencia (baicalina, baicaleína, wogonina, wogonosida, escutelarina,

escutelareína y norwogonina) se pesaron (1 mg), se disolvieron con la misma fase móvil, y se tomó una alícuota (2 μ L) con una concentración final de 2 mg/L para el análisis LC/MS.

Los compuestos fenólicos se analizaron en un cromatografo líquido de ultra-alta eficiencia *VanquishTM* (*Thermo Scientific*, Waltham, MA, EE. UU.), equipado con un compartimento de columna controlado termostáticamente (40 °C). La separación cromatográfica se realizó en una columna *Zorbax Eclipse XDB C₁₈* 50 mm L x 2.1 mm de D.I., tamaño de partícula de 1.8 μ m (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, EE. UU.). El caudal de la fase móvil fue de 300 μ L/min y contenía (A) agua (0.1 % ácido fórmico + 5 mM formiato de amonio) y (B) MeOH (0.1% ácido fórmico + 5 mM formiato de amonio). La condición de gradiente inicial fue 100 % A, que cambió linealmente a 100 % B en 8 min, se mantuvo durante 4 min, volvió a 100 % A en 1 min, y así permaneció durante 3 min. El volumen de inyección fue de 2 μ L. El cromatógrafo líquido fue conectado a un espectrómetro de masas *Q-Exactive Plus Orbitrap* (*Thermo Scientific*, Bremen, Alemania) con una fuente de ionización por electronebulización con calentamiento (HESI-II). El voltaje de capilar fue 3.5 kV. La temperatura del nebulizador se fijó en 350 °C y la temperatura del capilar en 320 °C. El gas de secado y el gas auxiliar (N₂) se ajustaron a 40 y 10 unidades arbitrarias, respectivamente. El nitrógeno (pureza >99 %) se obtuvo de un generador (NM32LA, *Peak Scientific*, Escocia, Reino Unido). Los iones inyectados a la celda HCD (*Higher-Energy Collision Dissociation Cell*), después de su almacenamiento en *C-trap*, se fragmentaron con energías de colisión normalizadas por pasos de 10 eV a 70 eV. El rango de masas escaneado en el espectrómetro de masas fue *m/z* 80-1000. Los datos se obtuvieron y analizaron con el *software Thermo ScientificTM DionexTM ChromeleonTM Chromatography Data System* (CDS), versión 7.2, y el *software Thermo Xcalibur 3.1* (*Thermo Scientific*, San José, CA, EE. UU.), respectivamente. La identificación de los compuestos se llevó a cabo comparando sus tiempos de retención (*t_R*), espectros de masas,

relaciones isotópicas y fórmulas moleculares exactas con los de las sustancias-patrón y los de las bases de datos. Los datos MS fueron adquiridos en los modos de ionización de iones positivos y negativos.

La cuantificación se realizó usando el método de estándar externo, en modo de adquisición de iones seleccionados (SIM), con sustancias patrón de baicalina, baicaleína, wogonina, wogonosida, escutelarina, escutelareína, vitexina, eriodictiol-7-glucósido, ácido-1,3-dicafeoilquínico, escopoletina y ácido rosmarínico.

3.4.2 Determinación de figuras analíticas de mérito por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS

La precisión, determinada como la repetibilidad y la reproducibilidad de tiempos de retención y áreas cromatográficas, la linealidad, la sensibilidad y los niveles mínimos de detección (LOD, por sus siglas en inglés) y cuantificación (LOQ, por sus siglas en inglés), se determinaron, usando sustancias de referencia de baicalina, baicaleína, wogonina, wogonosida, escutelarina, escutelareína, vitexina, eriodictiol-7-glucósido, ácido-1,3-dicafeoilquínico, escopoletina y ácido rosmarínico, a través de las curvas de calibración obtenidas usando el método de estándar externo, en modo de adquisición de iones seleccionados (SIM). Cada compuesto se pesó (1 mg), se aforó con metanol, grado LC-MS (1 mL), y se realizaron diluciones en un rango de concentración de 0.01-10 µg/mL (Véase **Tabla 11**).

3.4.2.1 Determinación de la reproducibilidad y la repetibilidad de los tiempos de retención y las áreas cromatográficas

La repetibilidad y la reproducibilidad de los tiempos de retención (t_R) y áreas cromatográficas, se calculó mediante sus promedios (**Ecuación 1**), desviación estándar (**Ecuación 2**) y coeficiente de variación (**Ecuación 3**). Los valores se determinaron por triplicado ($n=3$).

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n X_i \quad \text{Ecuación 1}$$

$$S = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n |X_i - \bar{X}|^2} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$CV, \% = \frac{\bar{X}}{S} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde: \bar{X} = promedio de los datos, X_i = datos, n = número de datos, S = desviación estándar de los datos, CV = coeficiente de variación de los datos.

3.4.2.2 Determinación de la linealidad y la sensibilidad del método cromatográfico

La linealidad y la sensibilidad del método cromatográfico se determinaron a partir de la curva de calibración de las sustancias de referencia mencionadas en la **Sección 3.4.1**. El coeficiente de determinación (R^2) de las curvas de calibración se utilizó como indicador de linealidad del método, para cada compuesto. La sensibilidad se determinó con base en la pendiente de la recta con un nivel de confianza de 95%. En la **Ecuación 4** se observa una recta ajustada, donde A es la ordenada de origen y B la pendiente. Los valores de A y B se determinaron, según Miller y Miller (Miller, J, Miller, 2002) (**Ecuaciones 5 y 6**), así:

$$y = A + BX \quad \text{Ecuación 4}$$

$$A = \bar{y} - B\bar{X} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$B = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}} = \frac{\sum_{i=1}^m (X_i - \bar{X})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^m (X_i - \bar{X})^2} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde: \bar{X} = promedio de los datos, X_i = datos, \bar{y} = respuesta en cada punto, y_i = promedio de respuesta de patrones.

Para A y B la incertidumbre se calculó, según Miller y Miller (Miller, J, Miller, 2002) (Ecuaciones 7-9), de esta manera:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (y_i - \bar{y})^2}{m-2}} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$S_A = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{\bar{X}^2}{Q_{xx}}} \quad \text{Ecuación 8}$$

$$S_B = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{Q_{xx}}} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde: \bar{y} = respuesta estimada en cada punto, y_i = respuesta experimental de cada sustancia-patrón, m = número total de puntos en la curva de calibración, $S_{y/x}$ = desviación estándar de residuos de la regresión lineal, S_A = incertidumbre de A, S_B = incertidumbre de B.

3.4.2.3 Determinación de los límites de detección y cuantificación del método cromatográfico

Los LOD y LOQ de la técnica cromatográfica se determinaron, usando las Ecuaciones 10 y 11, respectivamente:

$$\text{LOD} = 3 \frac{S_{y/x}}{B} \quad \text{Ecuación 10}$$

$$\text{LOQ} = 10 \frac{S_{y/x}}{B} \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde: $S_{y/x}$ = desviación estándar de residuos de la regresión lineal, B = pendiente de la curva.

3.4.3 Análisis por prep-HPLC para obtener fracciones de extractos

El análisis prep-HPLC cromatográfico se realizó, según Kumar *et al.* (Kumar *et al.*, 2016) y Abu-Lafi *et al.* (Akkawi, 2018), con algunas modificaciones. Se usó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia *Prominence* (*Shimadzu*, Kyoto, Japón), con columna cromatográfica *Shim-Pack* GIST C₁₈ de 250 mm L x 20 mm I.D. x 5 µm de tamaño de partícula (*Shimadzu*, Kyoto, Japón), detector de arreglo de diodos SPD-M20A, bomba cuaternaria LC-20AP, inyector automático SIL-10AP, válvula de reciclaje FCV-12AH y fraccionador FRC-10^a, todos de *Shimadzu* (Kyoto, Japón).

Los extractos hidroalcohólicos de *Scutellaria* spp. se prepararon a una concentración de 40 g/L y se inyectaron 5 mL de cada muestra. Se empleó un flujo de fase móvil de 15 mL/min con gradiente de elución binario (A) agua Tipo I y (B) metanol grado HPLC, programado así: 30 % B (0 min) - 30 % - 100 % B (0-30 min) - 100 % B (30-35 min). La detección de los compuestos se realizó, usando las siguiente longitudes onda: $\lambda=240, 270, 290, 310, 330$ y 350 nm.

Las fracciones obtenidas se rotoevaporaron en un equipo *Heidolph* (*Hei-VAP, Advantage HL*, Chicago, IL, EE. UU.), hasta eliminar el exceso de fase móvil, se reconstituyeron y se trasvasaron a viales de 4 mL, en donde se llevaron hasta sequedad con corriente de nitrógeno y se liofilizaron durante 48 h. El procesamiento de los datos se realizó en el *software LabSolutionsTM* versión 5.97.

3.5 Evaluación de la capacidad antioxidante *in vitro* de extractos de *Scutellaria* spp.

3.5.1 Ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+}

El ensayo de decoloración del catión-radical ABTS^{•+} se determinó, según Re *et al.* (Re *et al.*, 1999), con algunas modificaciones. La prueba se realizó en un lector de microplacas *Modulus[®]*

II (*Turner Biosystems Inc.*, Sunnyvale, CA, EE. UU.). El ABTS (7 mM en *buffer* de acetato) y persulfato de potasio (2.45 mM) se mezclaron con sonicación (30 min) y se almacenaron a 4 °C (24 h), en ausencia de luz, para obtener una solución de ABTS⁺⁺ estable. Después, se tomó el ABTS⁺⁺ (900 µL) y se diluyó en *buffer* de acetato hasta obtener una absorbancia de 0.71 ± 0.02 a $\lambda=750$ nm, y se almacenó a 4 °C (30 min) antes de su uso.

Cada extracto (2 mg) se disolvió en metanol (2 mL) y se diluyó en *buffer* de acetato (20 mM, pH 4.5). El extracto diluido (10 µL) y la solución de ABTS⁺⁺ (190 µL) se depositaron en cada pozo de la placa y la absorbancia se midió durante 60 min. La capacidad antioxidante se determinó a partir de una curva de calibración con Trolox[®] (50-560 µM). Para cada concentración de la curva se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la **Ecuación 12**. Las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como valor promedio \pm desviación estándar de µmol Trolox[®]/g de extracto.

$$\text{Inhibición, \%} = 0.1292(\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}) - 2.399$$

Ecuación 12

3.5.2 *Ensayo decoloración del catión-radical on-line HPLC-ABTS⁺⁺*

El extracto se analizó en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia, HPLC 1200 Infinity (*AT*, Palo Alto, CA, EE. UU.), acoplado a un derivatizador post-columna *Pinnacle PCX* (*Pickering Laboratories*, Mountain View, CA, EE. UU.) para determinar su capacidad de decolorar el catión-radical ABTS⁺⁺. El análisis cromatográfico se realizó empleando el método establecido por Sierra *et al.* (Sierra Prada *et al.*, 2020) en un cromatógrafo líquido con una columna cromatográfica *GEMINI C₁₈* de 100 mm longitud x 4.6 mm D.I. x 5 µm tamaño de partícula (*Phenomenex*, Torrance, CA, EE. UU.), detector de arreglo de diodos AT G1315D, bomba cuaternaria AT

G1311C e inyector automático AT G1329B (todos de AT, Palo Alto, CA, EE. UU.). Se inyectaron a la columna 10 μ L de cada extracto (10 g/L). La temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C. Como fase móvil se empleó una solución acuosa de ácido fórmico al 0.5 % (v/v) (A) y acetonitrilo grado HPLC (B), con un flujo de 1 mL/min y gradiente de elución programado de 98 % A (0 min), 88 % A (15 min), 88 % A (15-23 min), 60 % A (46 min), 10 % A (71 min), 10 % A (71-75 min), 98 % A (80 min) a 98% A (80-85). El detector de arreglo de diodos (DAD) se ajustó a las siguientes longitudes de onda: λ =245, 270, 290 425 y 515 nm. La identificación de los compuestos se llevó a cabo comparando sus tiempos de retención (t_R) y los espectros UV-Vis con los de las sustancias-patrón. El procesamiento de los datos se realizó usando el *software AT ChemStation for LC & LC/MS Systems* (Versión B.04.02-SP1).

La solución del catión-radical ABTS^{•+} se preparó mediante la reducción del ABTS con persulfato de potasio en agua, en relación 2,9:1 y se dejó reaccionar en la oscuridad a temperatura ambiente (17 h) hasta obtener un catión-radical estable. Seguidamente, esta solución se almacenó bajo oscuridad (17 h) antes de su uso. En la **Tabla 6** se observan los parámetros de operación para el derivatizador acoplado *on-line* al HPLC.

Tabla 6.

Parámetros operacionales en el derivatizador acoplado on-line al HPLC.

Parámetro	Especificación
Tiempo de corrida	Igual al del HPLC, 90 min
Tiempo de equilibrio	2 min
Temperatura de la columna	30 °C
Temperatura del reactor	130 °C
Volumen del reactor	1.4 mL
Flujo de bomba	0.5 mL/min
Reactivo	ABTS ^{•+} (79 μ M)

Los tiempos de corrida en el HPLC y el derivatizador fueron iguales (90 min), se estableció un tiempo de equilibrio (2 min), después de cada corrida, para cargar la bomba con el volumen necesario de ABTS⁺. El reactor tiene un volumen estándar (1.4 mL). El flujo de la bomba fue de 0.5 mL/min, esto permitió un tiempo de reacción entre el ABTS⁺ y el eluato de 56 s. Cano *et al.* (Cano *et al.*, 2002) establecieron que ese tiempo garantizaba la reacción de todos los compuestos con el catión-radical ABTS⁺.

Una solución diluida de ABTS⁺ (79 μ M, en agua Tipo I) se depositó en un reservorio del equipo. Teniendo en cuenta los flujos del HPLC y del derivatizador, la concentración de catión-radical en el reactor fue de 79 μ M, con ella, se logró una absorbancia (0.71 ± 0.02) igual a la establecida en el ensayo de decoloración del catión-radical ABTS⁺, realizado en el lector de microplacas.

Los extractos se pesaron (10 mg), se disolvieron en una solución de metanol (1 mL, 50% v/v, en agua Tipo I) y se pasaron por un filtro PVDF (0.22 μ m). El ácido gálico (10 ppm) se utilizó como estándar interno. Los extractos se diluyeron (50, 100, 250 y 500 veces), para no saturar el detector de longitud de onda múltiple MWD, operado a $\lambda=734$ nm.

Los datos se procesaron con el *software* AT *ChemStation*, Versión B.0.03-SR1. La identificación de los compuestos se realizó por comparación de sus tiempos de retención y de sus espectros UV-Vis, con los de sustancias-patrón (ácido gálico, baicalina, baicaleína, escutelarina, escutelareína, wogonina y quercetina). La capacidad antioxidante se determinó usando una curva de calibración con Trolox[®] (12-400 μ M). Para cada concentración de la curva se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la **Ecuación 13**. Las mediciones se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como valor promedio \pm desviación estándar de μ mol Trolox[®]/g de extracto.

$$\text{Inhibición, \%} = 16.105(\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}) + 226.01$$

Ecuación 13

3.5.3 Evaluación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno

La capacidad de absorción de radicales de oxígeno (método ORAC) se determinó, según Huang *et al.* (D. Huang *et al.*, 2002), con algunas modificaciones. Se utilizó un espectrofotómetro *Varioskan LUX VL0000D0* (*Thermo Scientific*, República de Singapur, Asia) equipado con microplacas negras de poli(estireno) de 96 pozos de 200 μL , usando el módulo de fluorescencia. El extracto (1 mg) se disolvió en metanol (1 mL) y se diluyó en *buffer* de fosfato (75 mM, pH 7.4); en cada pozo de la placa se depositaron el extracto diluido (25 μL) y la solución de fluoresceína (150 μL , 0.0838 mM en *buffer* fosfato) luego, la mezcla se incubó a 37 °C (20 min), posterior a esto, una solución de 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) (25 μL , 78 mM, en *buffer* de fosfato) se adicionó a la solución. La fluorescencia se midió (37 °C, 90 min) empleando longitudes de onda de excitación $\lambda=490$ nm y de emisión $\lambda=510$ nm. La protección antioxidante se determinó a partir de la diferencia entre el área bajo la curva (ABC) de fluorescencia, de cada muestra y el blanco (25 μL de *buffer* de fosfato). La capacidad antioxidante se determinó por una curva de calibración con Trolox[®] (8-140 μM). Para cada concentración de la curva se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la **Ecuación 14**. Las mediciones se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como valor promedio \pm desviación estándar de $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ de extracto.

$$\text{Inhibición, \%} = 0.1682(\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}) + 0.6835$$

Ecuación 14

3.5.4 Evaluación de la decoloración del β -caroteno

La actividad antioxidante se evaluó siguiendo la metodología descrita por Panovska *et al.* (Panovska *et al.*, 2005), con algunas modificaciones. Los extractos (2 mg) se disolvieron en metanol (2 mL) y se diluyeron de uno a diez veces. De cada solución, se tomaron 10 μ L, se depositaron en una microplaca y se aforaron con 190 μ L de una emulsión de β -caroteno que se preparó así: se pesó β -caroteno (2 mg) y se disolvió en cloroformo (200 μ L). Se tomaron 12 μ L de esta solución y se depositaron en un cónico que contenía Tween[®] 40 (100 mg) y ácido linoleico (10 mg), la mezcla se agitó a 3.000 rpm durante 30 s. El cloroformo se evaporó con flujo de nitrógeno (3 min) a temperatura ambiente. A la mezcla evaporada se le adicionó agua Tipo I (1 mL) y se agitó por 1 min a 3.000 rpm. La emulsión formada se depositó en un balón de 25 mL. Posteriormente, una solución de persulfato de potasio al 1% (3 mL) se agregó como agente co-oxidante, y se aforó con agua Tipo I.

La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de $\lambda=450$ nm a 45 °C, en un lector de microplacas de 96 pozos *ModulosTM II Microplate Multimode Reader* (Turner Biosystems *inc.*, Sunnyvale, CA., EE. UU.). La capacidad antioxidante se determinó por una curva de calibración con Trolox[®] (10-50 μ M). Para cada concentración de la curva se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la **Ecuación 15**. Las mediciones se realizaron por duplicado y los resultados se expresaron como valor promedio \pm desviación estándar de μ mol Trolox[®]/g de extracto.

$$\text{Inhibición, \%} = 1.848(\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}) - 4.621$$

Ecuación 15

3.6 Evaluación de la actividad antiviral

Las actividades citotóxica y antiviral de los extractos y fracciones de las especies de *Scutellaria* spp. bajo estudio, se midieron usando las metodologías implementadas en el Laboratorio de Arbovirus del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP), de la Universidad Industrial de Santander, dirigido por la profesora Dra. Raquel OCAZIOEZ.

3.6.1 Virus y células

Se utilizaron virus del dengue tipo uno [DENV-1, cepa US/Hawaii/1944] y virus del dengue tipo dos [DENV-2, cepa C de Nueva Guinea (NGC)]. Los virus se propagaron en células C6/36 de *Aedes albopictus* (Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, La Habana, Cuba) y se recolectaron en el séptimo día de post-infección. La reserva de virus se cuantificó en células BHK-21 (ATCC®CCL-10™), empleando el método de placa, y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Las células (ATCC®CCL-81™) epiteliales derivadas de riñón de mono africano, células Vero, en medio mínimo esencial (MEM) que contenía suero bovino fetal (10 %) (SBF, Gibco, Grand Island, NY, EE. UU.), se emplearon a 37 °C, en presencia de CO₂ al 5 %.

3.6.2 Evaluación de la actividad citotóxica

El ensayo de cristal violeta se utilizó para evaluar la citotoxicidad de los extractos y fracciones de *Scutellaria* spp. contra las células Vero.

Las células Vero (10.000 células/pozo) se sembraron en placas de 96 pozos y se dejaron adherir (24 h) a 37 °C y 5 % de CO₂. Para el tratamiento, el medio se reemplazó por medio que contenía la muestra (extracto) a diferentes concentraciones (512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 y 4 µg/mL) y se incubaron (72 h) a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células no tratadas y las células tratadas con dimetilsulfóxido se corrieron en paralelo como controles negativo y positivo, respectivamente.

Después de lavar con PBS, una solución de cristal violeta (100 μ l) al 0.05 % en etanol al 20 % se añadió, dejando que las células se tiñan (20 min) a temperatura ambiente. Después de seis lavados con agua destilada, las placas se aspiraron, se dejaron secar al aire a temperatura ambiente, se agregó metanol (200 μ L) a cada pozo y se agitó (20 min). La intensidad del color de la reacción se midió por espectrofotometría a $\lambda=570$ nm y el valor de densidad óptica (O.D.) se consideró proporcional a la viabilidad del cultivo celular. Cada muestra se analizó en tres ensayos independientes por triplicado. Se utilizó el *software Graph Pad Prism 8* (*GraphPad Software*, San Diego, CA, EE. UU.). Para cada muestra se comparó el promedio de los pozos tratados y no tratados. El efecto del tratamiento se evaluó mediante la citotoxicidad y se expresó como la concentración máxima no tóxica (CMNT) y concentración citotóxica 50 (CC₅₀).

Para las fracciones de *Scutellaria* spp., se siguió el mismo protocolo, evaluando las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1 y 1.6 μ g/mL de cada fracción.

3.6.3 Evaluación de la actividad antiviral

El ensayo de inhibición del efecto citopático se utilizó para determinar la actividad antiviral de los extractos y fracciones de *Scutellaria* spp.

La replicación del virus dengue serotipos uno y dos se evaluó en las etapas de entrada del virus y el bloqueo de la unión viral y la penetración celular. Las células Vero se sembraron (10000 células/pozo) en placas de 96 pozos en medio MEM (10 % SBF) a 37 °C y 5 % de CO₂ por 24 h. Posteriormente, el virus se expuso a diferentes concentraciones (50, 25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.6 y 1.6 μ g/mL) de los extractos y se agregó a la célula para permitir la adsorción del DENV-1 en las células (1.5 h a 37 °C). El virus no adsorbido se descartó, se lavó y se agregó luego medio de mantenimiento (2% SBF). El mismo procedimiento se llevó a cabo para DENV-2. Las células no tratadas infectadas con DENV y no tratadas no infectadas, se procesaron en paralelo; como

controles positivos se incluyeron células infectadas con DENV tratadas con dodecil sulfato de sodio (DSS) (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MO, EE. UU.), antiviral de referencia. El software *Graph Pad Prism 8* (*GraphPad Software*, San Diego, California) se utilizó para el análisis de datos.

Para las fracciones de *Scutellaria* spp., se siguió el mismo protocolo, evaluando a las siguientes concentraciones: 30, 15, 7.5, 3.7, 1.9 y 0.93 $\mu\text{g/mL}$ para las fracciones FR-2 y FR-4 de *S. incarnata*, FR-2 de *S. coccinea* y FR-8 de *S. ventenatii* x *S. incarnata*; 100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.12 $\mu\text{g/mL}$ para las fracciones FR-5 y FR-6 de *S. incarnata* y FR-4 de *S. ventenatii* x *S. incarnata*; 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12 y 1.6 $\mu\text{g/mL}$ para la fracción FR-3 de *S. incarnata*.

4. Resultados y discusión

4.1 Identificación botánica

La identificación botánica de *S. incarnata*, *S. coccinea* y *S. ventenatii* x *S. incarnata* se llevó a cabo en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Industrial de Santander (UIS). El doctor Andrés Felipe CASTAÑO, botánico y profesor de la Escuela de Biología de la UIS, realizó la identificación taxonómica de las especies (**Tabla 7**). El híbrido fue creado e identificado por el doctor Robert Tulio GONZÁLES, botánico y profesor cátedra de la Universidad Nacional de Colombia (sede Palmira), adscrito como investigador al Centro de investigaciones CENIVAM-UIS.

Tabla 7.

Identificación botánica de las tres especies de Scutellaria spp. bajo estudio.

Espece	Familia	N° Voucher
<i>S. incarnata</i>		219783
<i>S. coccinea</i>	Lamiaceae	219784
<i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i>		219785

4.2 Evaluación de parámetros de extracción para las especies de *Scutellaria* spp.

La evaluación del diseño experimental para obtener los extractos de las tres especies de *Scutellaria* spp. se llevó a cabo usando un análisis de varianza (ANOVA), para determinar la significancia del tiempo, temperatura y porcentaje de etanol sobre el rendimiento y la actividad antioxidante del extracto obtenido.

En los extractos estudiados de *S. coccinea* y *S. ventenatii* x *S. incarnata*, todas las variables independientes tuvieron efecto sobre su actividad antioxidante, medida por el método *on-line* HPLC-ABTS⁺, en cambio, para el extracto de *S. incarnata*, el tiempo de extracción no generó

modificaciones en la actividad antioxidante. La temperatura fue la variable con un efecto alto sobre la actividad antioxidante de los extractos de *S. incarnata* y *S. coccinea*, mientras que la interacción entre la temperatura y el porcentaje de etanol fue la más importante para la extracción de *S. ventenatii* x *S. incarnata* (**Figura 6**).

En el caso del rendimiento de extracción, para los extractos de *S. incarnata*, la variable con efecto más alto fue la temperatura, mientras que para el extracto de *S. coccinea*, el porcentaje de etanol (**Figura 7**). Los resultados indican la importancia de evaluar los factores de temperatura, relación etanol:agua y el tiempo, para los extractos de cada planta estudiada, por ejemplo, la temperatura fue el único factor con efecto significativo sobre el rendimiento de extracción de *S. incarnata*.

Tabla 8.

Resultados del análisis de varianza para evaluar el efecto de las condiciones de extracción sobre el rendimiento y la actividad antioxidante de extractos hidroalcohólicos de las especies de S. incarnata, S. coccinea y S. ventenatii x S. incarnata.

Especie	<i>S. incarnata</i>				<i>S. coccinea</i>				<i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i>			
	Rendimiento		AA		Rendimiento		AA		Rendimiento		AA	
Fuente	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p	Valor F	Valor p
A:												
Temperatura	20.59	0.001*	61.26	0*	4.22	0.064	24.65	0.001*	17.61	0.001*	368.69	0*
B:												
Solvente	0.15	0.709	60.39	0*	131.89	0.000*	22.09	0.001*	12.23	0.005*	2589.6	0*
C:												
Tiempo	0.64	0.441	2.89	0.117	35.09	0.001	18.52	0.001*	0.49	0.499	3300.1	0*
AB	0.2	0.663	28.9	0.002*	1.06	0.326	7.85	0.017*	20.35	0.001*	6680.8	0*
AC	9.22	0.011	0.65	0.436	16.40	0.002*	25.54	0.001*	0.28	0.61	5.57	0.042*
BC	4.31	0.062	30.72	0.001*	5.00	0.050	8.10	0.016*	15.61	0.002*	67.84	0*

Valor $p < 0.05$ indica que es significativamente diferente de cero, con un nivel de confianza del 95 %.

AA: Actividad antioxidante.

*Valores significativos.

Figura 6.

Diagramas de Pareto estandarizados para los rendimientos de extracción de: **A.** *S. incarnata;*

B. *S. coccinea* y **C.** *S. ventenatii* x *S. incarnata*.

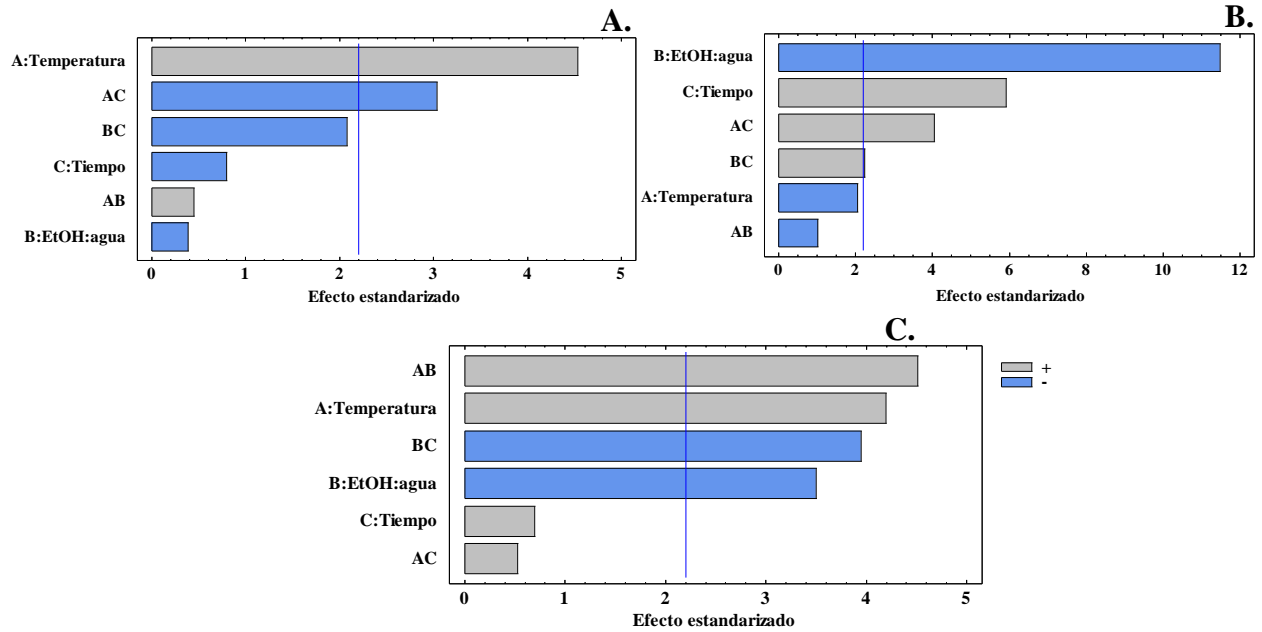
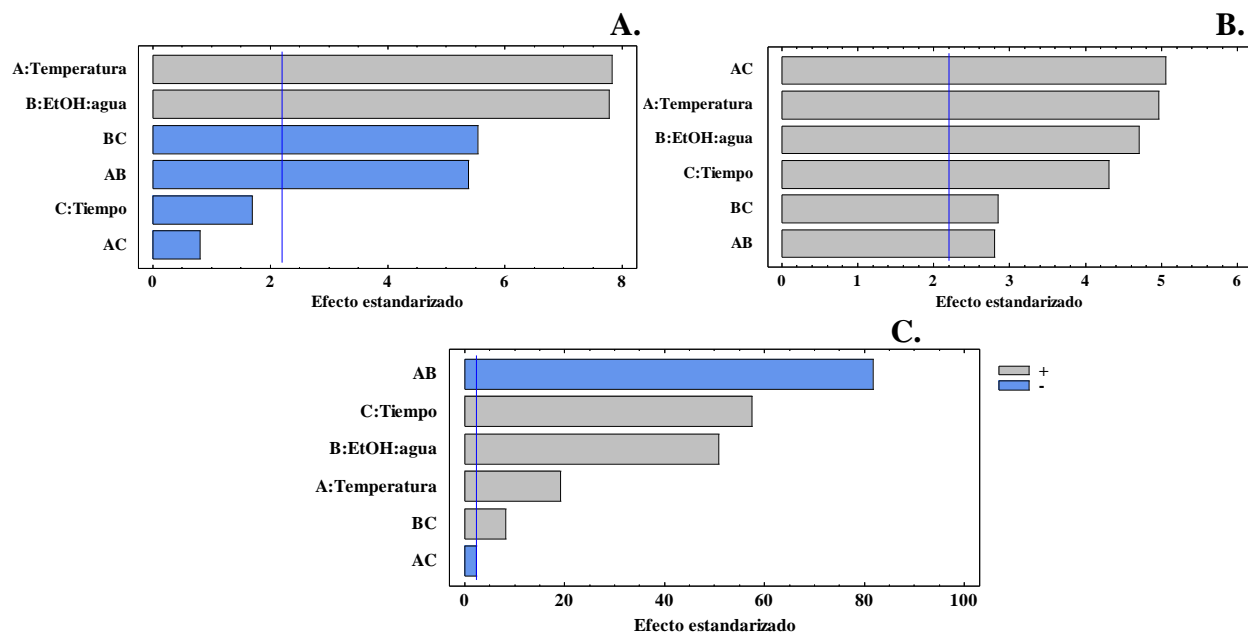


Figura 7.

Diagramas de Pareto estandarizados para las actividades antioxidantes de: **A.** *S. incarnata*; **B.** *S. coccinea* y **C.** *S. ventenatii* x *S. incarnata*.



Se ha encontrado (Lizette Gil del Valle, 2015) que el exceso de los ROS en el organismo acompaña las enfermedades virales, por lo cual, en el diseño experimental, para obtener extractos, se evaluó la respuesta combinada tanto de rendimiento como de actividad antioxidante altas. En la **Tabla 9** se muestran las variables evaluadas que permitieron obtener extractos de *Scutellaria* spp. con rendimientos y actividades antioxidantes altas. Para todos los extractos, se observó que el efecto de las variables puede cambiar en la respuesta combinada: por ejemplo, el rendimiento del extracto de la especie *S. incarnata* no aumentó con el incremento del porcentaje de etanol o con el tiempo, pero la actividad antioxidante resultó ser más alta, por lo que su combinación fue significativa (**Figura 8**). Resultados similares reportaron Lee *et al.* (Lee et al., 2014) para extracción de *S. baicalensis*.

Las tres especies de *Scutellaria* spp. estudiadas pertenecen al mismo género, pero con los mismos valores de temperatura, relación etanol:agua y tiempo no se obtuvo el mismo rendimiento y la actividad antioxidante altos. De esto, se concluye la importancia de evaluar las variables independientes y su combinación, para cada especie individual.

Figura 8.

Diagramas de Pareto estandarizados para las respuestas combinadas rendimiento-actividad antioxidante de: A. S. incarnata; B. S. coccinea y C. S. ventenatii x S. incarnata.

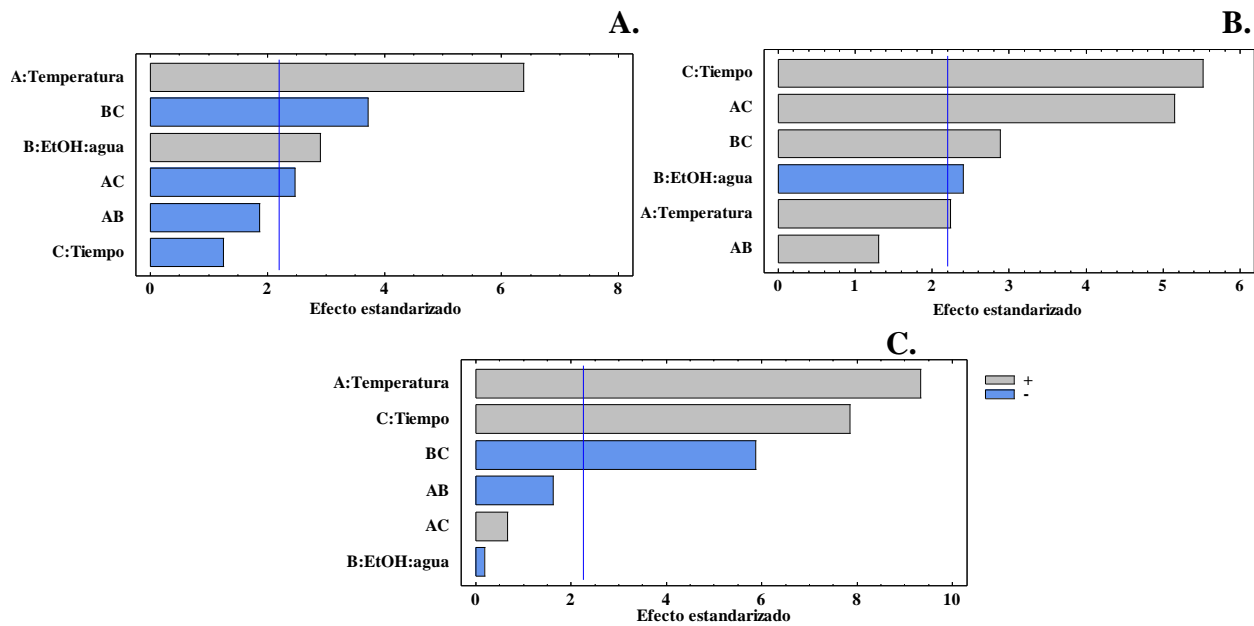


Tabla 9.

Mejores condiciones de extracción encontradas para las especies de Scutellaria spp. bajo estudio.

Especie	Variables de extracción			Respuesta combinada	
	Temperatura, °C	Relación EtOH:H ₂ O	Tiempo, min	Rendimiento, % ± s (n = 3)	µmol Trolox [®] /g extract ± s (n = 3)*
<i>S. incarnata</i>	50	70:30	5	26.0 ± 0.6	870 ± 3.5
<i>S. coccinea</i>	50	70:30	15	22.1 ± 0.4	920 ± 4.9
<i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i>	50	40:60	15	19.4 ± 0.2	500 ± 2.1

* Sumatoria de los µmol Trolox[®]/g extracto que cada compuesto en el extracto contribuyó a la actividad antioxidante total de la muestra, medida por *on-line* HPLC-ABTS⁺.

4.3 Caracterización química y cuantificación de compuestos fenólicos, por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, en los extractos y fracciones de *Scutellaria* spp. estudiados

4.3.1 Figuras de mérito

En la **Tabla 10** se muestran los resultados de las figuras analíticas de mérito del método LC/MS, para tiempos de retención (t_R) y áreas cromatográficas de las sustancias de referencia empleadas, obtenidos por UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS. Los coeficientes de variación para los t_R estuvieron entre 0.1% y 0.3% y para las áreas cromatográficas entre 0.8 y 8.2%.

En la **Tabla 11** se muestran los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) del método LC/MS para cuantificar los compuestos fenólicos, usando UHPLC/ESI-Q-*Orbitrap*-MS. Los coeficientes de determinación $R^2 = 0.9880-0.9973$ permitieron concluir que el método fue lineal en el rango de concentraciones evaluadas (0.01-8.0 mg/L). Los límites de detección (LOD = 0.04 - 0.87 mg/L) y cuantificación (LOQ = 0.15-2.90 mg/L) fueron bajos. Estos parámetros estuvieron dentro de los rangos aceptados de las Buenas Prácticas de Laboratorio, en

donde se establecen que los coeficientes máximos de variación para los tiempos de retención sean menores del 2 % y para las áreas cromatográficas, del 10 % (International Organization for Standardization, 1990).

Tabla 10.

Repetibilidad de tiempos de retención (t_R) y de áreas cromatográficas (corrientes iónicas extraídas) de sustancias-patrón, analizados por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS.

Compuesto ^a	Fórmula	Masa experimental		$t_R \pm S$, min ($n=3$)	CV, %	Área $\pm S$, cuentas $\times 10^{-6}$ ($n=3$)	CV, %
		[M+H] ⁺	[M-H] ⁻				
Baicalina	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	447.09056	-	5.79 \pm 0.02	0.3	14 \pm 208.8	1.5
Baicaleína	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.05969	-	6.90 \pm 0.01	0.1	25 \pm 998.3	3.9
Escutelarina	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	463.09691	-	5.15 \pm 0.02	0.3	4. \pm 33.8	0.8
Escutelareína	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	287.05444	-	6.10 \pm 0.01	0.1	28 \pm 1023.3	3.7
Wogonosida	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	461.17773	-	6.29 \pm 0.01	0.2	34 \pm 813.7	2.4
Wogonina	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	285.07575	-	7.32 \pm 0.02	0.2	47 \pm 589.4	1.2
Norwogonina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	271.05969	-	6.61 \pm 0.01	0.15	56 \pm 11.	2.1
Eriodictiol-7-glucósido	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	451.12348	-	4.91 \pm 0.01	0.2	16 \pm 273.3	1.7
Vitexina	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	-	431.09727	5.09 \pm 0.01	0.2	20 \pm 518.5	2.6
Ácido-1,3-dicafeoilquínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	-	515.11840	5.15 \pm 0.01	0.1	14 \pm 508.2	3.5
Escopoletina	C ₁₀ H ₈ O ₄	193.04953	-	4.77 \pm 0.01	0.01	1006 \pm 82729	8.2
Ácido rosmarínico	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	361,09179	-	5.46 \pm 0.01	0.1	0.291 \pm 0.006	2.1

^a Sustancias-patrón, analizadas a una concentración de 2 mg/L.

CV: Coeficiente de variación.

Tabla 11.*Linealidad y sensibilidad determinadas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS para sustancias-pratrón.*

Especie	Fórmula	Ecuación	Rango dinámico lineal, mg/g	R ²	S _B	mg/g	
						LOD	LOQ
Baicaleína	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	y = 54306552x - 1771997	0.01 – 0.55	0.9880	494757	0.06	0.23
Baicalina	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	y = 17768317x - 8126211	0.92 – 9.15	0.9915	2389473	0.80	2.65
Wogonina	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	y = 102573687x + 1716401	0.01 – 0.55	0.9916	914428	0.06	0.20
Wogonosida	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	y = 47342443x + 97160	0.01 – 0.73	0.9944	333617	0.05	0.19
Escutelareína	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	y = 36066876x + 1116868	0.07 – 5.49	0.9967	2130678	0.34	1.23
Escutelarina	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	y = 46389443x - 17799122	0.07 – 7.32	0.9929	5237506	0.70	2.34
Norwogonina	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	y = 28702911x + 1443545	0.05 – 9.15	0.9930	4685934	0.96	3.20
Apigenina-7-glucurónido	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	y = 28671963x - 298155	0.01 – 0.73	0.9966	158344	0.04	0.15
Eriodictiol-7-glucósido ^a	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	y = 6370387x - 1741	0.02 – 0.73	0.9972	32505	0.04	0.14
Vitexina ^a	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	y = 29898689x - 258264	0.01 - 0.73	0.9973	212828	0.05	0.14
Ácido-1,3-dicafeoilquínico ^a	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	y = 18125664x - 3558341	0.02 – 0.3	0.9909	3062384	0.05	0.15
Escopoletina ^a	C ₁₀ H ₈ O ₄	y = 474737412x + 883086	0.02 – 0.73	0.9954	3062384	0.05	0.18
Ácido rosmarínico ^a	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	y = 31520430x - 1206359	0.07 – 0.73	0.9913	455926	0.07	0.26

^a Compuestos homólogos usados para la cuantificación de isocartamidina-7-glucurónido, apigenina-C-glucósido-C-arabinósido, verbascósido, umbeliferona-hexósido-pentósido e isoliquiritina, respectivamente.

S_B: Desviación de la pendiente.

LOD: Límite de detección.

LOQ: Límite de cuantificación.

4.3.2 Caracterización química por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de los extractos hidroalcohólicos de *Scutellaria* spp.

Diversos estudios (Joshee. *et al.*, 2012; Shang *et al.*, 2010) Se encontraron sobre la composición química de especies del género *Scutellaria* spp., pero hasta el momento, sobre las especies nativas de Colombia no hubo reportes. El análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de los metabolitos presentes en los extractos hidroalcohólicos de tres plantas de *Scutellaria* spp., se llevó a cabo en el modo de adquisición dual de iones positivos y negativos. En la corriente iónica total, los compuestos se detectaron usando las masas exactas de moléculas protonadas o deprotonadas, medidas con Δ ppm < 2. El patrón isotópico de moléculas protonadas o deprotonadas fue concordante con el calculado por el *software Thermo Xcalibur 93*. 3.1. El patrón de fragmentación de iones $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$ se estudió, usando diferentes energías de colisión (10, 20, 30, 40, 50, 60 o 70 eV) en una celda de colisiones activadas HCD; se seleccionó aquella energía que haya permitido observar iones-producto junto con la señal de $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$.

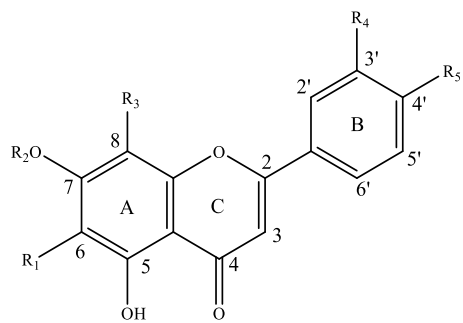
Un total de 17 compuestos fueron identificados, ocho de ellos, de manera confirmatoria, usando sustancias-patrón (baicalina, baicaleina, norwogonina, wogonina, wogonosida, apigenina-7-glucurónido, escutelareina y escutelarina), y nueve, de manera tentativa (**Tabla 12**), mediante la comparación con los espectros reportados en la literatura (J. Han *et al.*, 2007a; He *et al.*, 2016; Lefebvre *et al.*, 2021; G. Liu *et al.*, 2009, 2011; Seo *et al.*, 2013; Zengin *et al.*, 2019), presentes en bases de datos espectrales (*The NIST Mass Spectral Search Program*, 2017; Wishart *et al.*, 2009), y estudiando el patrón de fragmentación, masas exactas y relación isotópica de moléculas protonadas o deprotonadas. Los compuestos fenólicos se clasificaron, según sus características estructurales en flavonas, flavanonas y flavonoles (**Figura 9**).

Las flavonas prevalecieron en los extractos, seguidas de flavanonas, flavonoles y derivados de ácidos hidroxicinámicos. Las corrientes iónicas extraídas de las moléculas protonadas de compuestos fenólicos presentes en los tres extractos de *Scutellaria* spp. estudiados, se muestran en la **Figura 10**.

Figura 9.

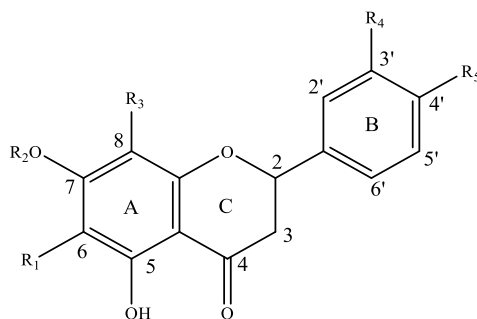
Estructuras químicas de los flavonoides identificados en los extractos hidroalcohólicos obtenidos de plantas secas de *S. incarnata*,

S. coccinea y *S. ventenatii* x *S. incarnata*. Glu: Glucósido, Ác. gluc: Ácido glucurónico. Arab: Arabinósido. Ram: Ramnósido.



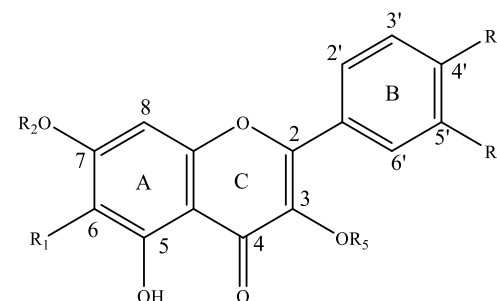
Flavona

N° compuesto Tabla 12	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
2	Glu.	H	Arab.	H	OH
5	OH	Ác. gluc.	H	H	OH
6	H	Ác. gluc.	H	H	OH
9	OH	Ác. gluc.	H	H	H
10	OH	H	H	H	OH
11	H	Ác. gluc.	OCH ₃	H	H
12	H	Ác. gluc.	OH	H	H
14	H	H	OH	H	H
15	OH	H	H	H	H
16	H	H	OCH ₃	H	H



Flavanona

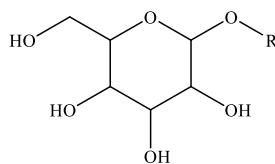
N° compuesto Tabla 12	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	H	H	Ác. gluc.	H	OH
8	OH	Ác. gluc.	H	H	H
13	OH	H	H	H	H



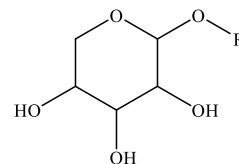
Flavonol

N° compuesto Tabla 12	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
3	H	Glu.	OH	OCH ₃	Ram.

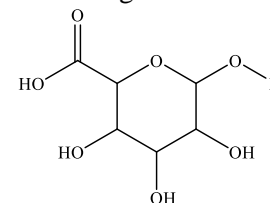
Glucósido



Arabinósido



Ácido glucurónico



Ramnósido

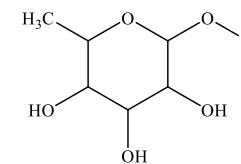


Figura 10.

Corrientes iónicas extraídas (EIC), obtenidas en modo full scan por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, de moléculas protonadas $[M+H]^+$, detectadas en los extractos hidroalcohólicos de: **A.** *S. incarnata*; **B.** *S. coccinea* y **C.** *S. ventenatii* x *S. incarnata*. En la **Tabla 12** aparece la identificación de los picos.

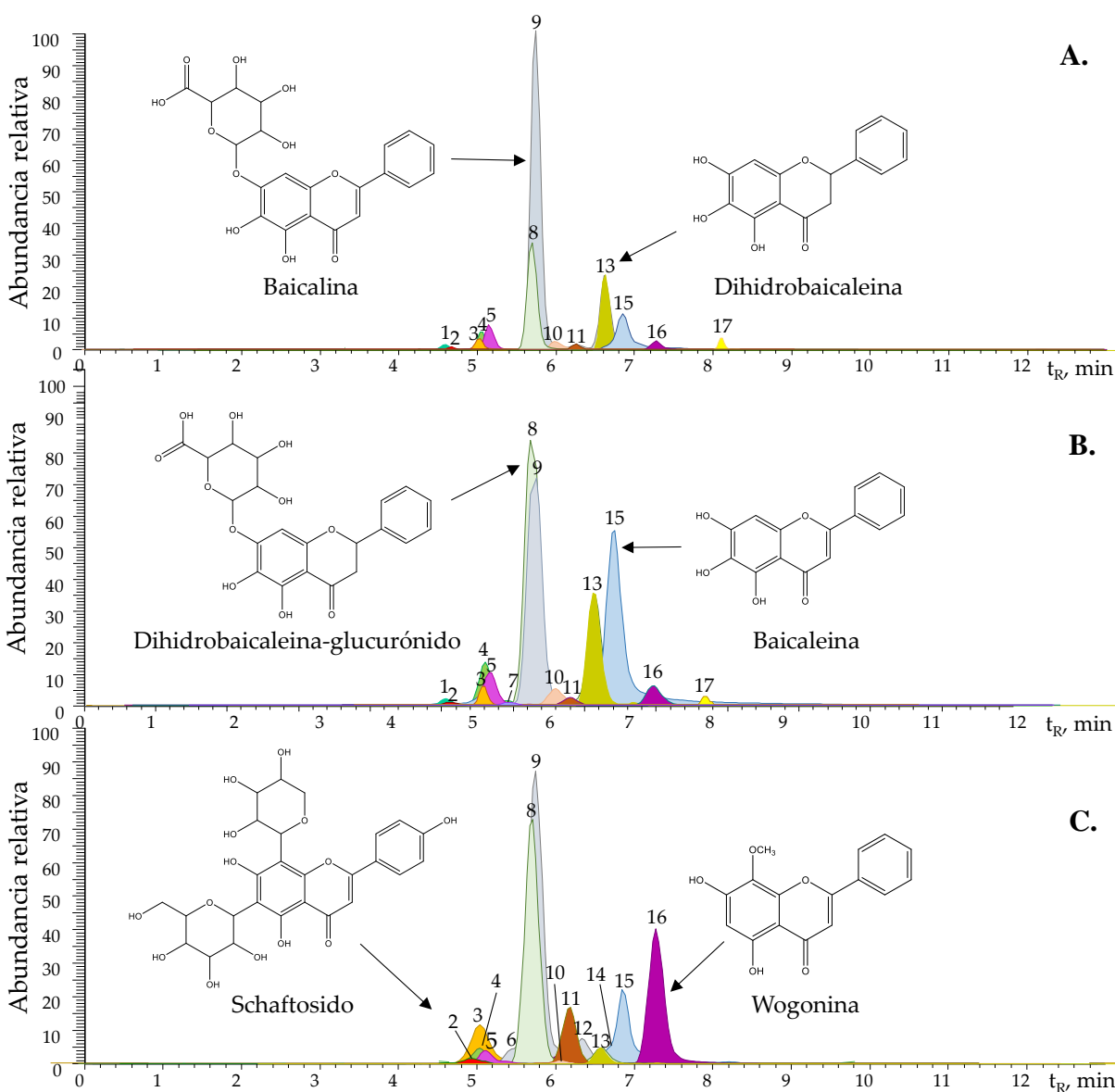


Tabla 12.

Masas exactas de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$ e iones-producto obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, de los compuestos fenólicos presentes en los extractos hidroalcohólicos de plantas de *Scutellaria* spp. estudiadas.

N° pico Fig. 10	Compuesto	Fórmula	Masas experimentales, <i>m/z</i> (I, %)	Δ ppm	HCD, eV	Iones-producto	Fórmula	<i>m/z</i> (I, %)
1	Isocartamidina-glucurónido ^{a,b}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M+H] ⁺ 465.13580 (2 %)	0.45	20	[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺	C ₁₅ H ₁₃ O ₆	289.07043 (100 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆ -C ₈ H ₈ O] ⁺	C ₈ H ₈ O	169.01312 (15 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆ -H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271.06006 (1 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆ -H ₂ O-C ₆ H ₄ O ₃] ⁺	C ₉ H ₇ O ₂	147.04401 (6 %)
2	Apigenina-C-glucósido-C-arabinósido (Schaftosido) ^{a,b}	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻ 563.14191 (75 %)	1.13	30	[(M-H)-C ₂ H ₄ O ₂] ⁻	C ₂₄ H ₂₃ O ₁₂	503.12198 (5 %)
						[(M-H)-C ₃ H ₆ O ₃] ⁻	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₁	473.10934 (64 %)
						[(M-H)-C ₄ H ₈ O ₄] ⁻	C ₂₂ H ₁₇ O ₁₀	443.09860 (70 %)
						[(M-H)-C ₅ H ₁₀ O ₅] ⁻	C ₂₁ H ₁₇ O ₉	413.08817 (13 %)
						[(M-H)-C ₂ H ₄ O ₂ -C ₄ H ₈ O ₄] ⁻	C ₂₀ H ₁₅ O ₈	383.07773 (68 %)
						[(M-H)-C ₂ H ₄ O ₂ -C ₃ H ₁₀ O ₅] ⁻	C ₁₉ H ₁₃ O ₇	353.06668 (100 %)
3	Verbascósido ^{a,b}	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻ 623.19704 (7 %)	1.13	30	[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₃] ⁻	C ₂₀ H ₂₉ O ₁₂	461.16672 (14 %)
						[(M-H)-C ₉ H ₆ O ₃ -C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁻	C ₁₄ H ₁₉ O ₈	315.10852 (3 %)
						[(M-H)-C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂] ⁻	C ₉ H ₅ O ₃	161.02365 (100 %)
4	Umbeliferona-hexósido-pentósido ^a	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₂	[M+H] ⁺ 471.14954 (20 %)	1.00	10	[(M+H)-2H ₂ O] ⁺	C ₂₁ H ₂₃ O ₁₀	435.12823 (5 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ O ₈	325.09261 (100 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₁₅ H ₁₇ O ₇	309.09671 (10 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₉ H ₇ O ₃	163.03836 (17 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₄ -C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺	C ₉ H ₅ O ₂	145.07590 (13 %)
5	Escutelarina ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	[M+H] ⁺ 463.09691 (40 %)	0.42	10	[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆	287.05537 (49 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆ -C ₆ H ₄ O ₃] ⁺	C ₉ H ₇ O ₃	163.03885 (9 %)
6	Apigenina-7-glucurónido ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺ 447.09056 (12 %)	0.54	20	[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271.06033 (100 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆ -C ₈ H ₇ O] ⁺	C ₇ H ₅ O ₅	153.01824 (1 %)
7	Isoliquiritina ^a	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	[M+H] ⁺ 419.13366 (22 %)	1.07	10	[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	C ₁₅ H ₁₃ O ₄	257.08044 (100 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅ -H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	239.06585 (7 %)

Tabla 12.
Continuación.

N° pico Fig. 10	Compuesto	Fórmula	Masas experimentales, <i>m/z</i> (I, %)	Δ ppm	HCD, eV	Iones-producto	Fórmula	<i>m/z</i> (I, %)
8	Dihidrobaicaleina -glucurónido ^{a,b}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺ 449.10602 (3 %)	0.44	10	[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	273.07538 (100 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆ -C ₈ H ₈] ⁺	C ₇ H ₅ O ₅	169.01341 (82 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆ -C ₆ H ₆ O ₄] ⁺	C ₉ H ₇ O	131.04932 (25 %)
9	Baicalina ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺ 447.09056 (5 %)	0.33	20	[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271.06033 (100 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆ -C ₈ H ₆] ⁺	C ₇ H ₅ O ₅	169.01256 (1 %)
10	Escutelareina ^{a,b,c}	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺ 287.05444 (100 %)	0.57	60	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₉ O ₅	269.04416 (16 %)
						[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₄ H ₉ O ₄	241.04912 (8 %)
						[(M+H)-C ₈ H ₆ O] ⁺	C ₇ H ₅ O ₅	169.01280 (24 %)
						[(M+H)-C ₈ H ₆ -CO] ⁺	C ₆ H ₅ O ₄	141.01810 (10 %)
						[(M+H)-C ₈ H ₆ O-CO-H ₂ O] ⁺	C ₆ H ₃ O ₃	123.00771 (56 %)
[(M+H)-C ₇ H ₅ O ₅] ⁺	C ₈ H ₇ O	119.04921 (32 %)						
11	Wogonosida ^{a,b,c}	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺ 461.17773 (61 %)	0.47	20	[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺	C ₁₆ H ₁₃ O ₅	285.07535 (100 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆ -CH ₃] ⁺ *	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.05164 (2 %)
12	Norwogonina- glucurónido ^{a,b}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺ 447.20953 (52 %)	0.24	20	[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271.06003 (100 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₈ O ₆ -C ₈ H ₆] ⁺	C ₇ H ₅ O ₅	169.01256 (1 %)
13	Dihidrobaicaleina _{a,b}	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺ 273.07617 (28 %)	0.41	40	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₄	255.06465 (2 %)
						[(M+H)-C ₂ H ₂ O] ⁺	C ₁₃ H ₁₁ O ₄	231.06482 (1 %)
						[(M+H)-C ₈ H ₈] ⁺	C ₇ H ₅ O ₅	169.01292 (100 %)
						[(M+H)-C ₆ H ₆ O ₄] ⁺	C ₉ H ₇ O	131.04906 (34 %)
						[(M+H)-C ₇ H ₅ O ₅] ⁺	C ₈ H ₇	103.05447 (4 %)
14	Norwogonina ^{a,b,c}	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺ 271.05969 (100 %)	0.31	60	[(M+H)-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₉ O ₄	253.04919 (2 %)
						[(M+H)-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₄ H ₉ O ₃	225.05435 (4 %)
						[(M+H)-C ₈ H ₈] ⁺	C ₇ H ₅ O ₅	169.01305 (28 %)
						[(M+H)-C ₈ H ₈ -CO] ⁺	C ₆ H ₅ O ₄	141.01811 (5 %)
						[(M+H)-C ₈ H ₈ -CO-H ₂ O] ⁺	C ₆ H ₃ O ₃	123.00773 (6 %)
[(M+H)-C ₇ H ₅ O ₅] ⁺	C ₈ H ₇	103.04451 (16 %)						

Tabla 12.

Continuación.

N° pico Fig. 10	Compuesto	Fórmula	Masas experimentales, <i>m/z</i> (I, %)	Δ ppm	HCD, eV	Iones-producto	Fórmula	<i>m/z</i> (I, %)
15	Baicaleína ^{a,b,c}	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺ 271.05969 (100 %)	1.50	60	[M+H]-H ₂ O] ⁺	C ₁₅ H ₉ O ₄	253.04919 (1 %)
						[M+H]-H ₂ O-CO] ⁺	C ₁₄ H ₉ O ₃	225.05435 (7 %)
						[M+H]-C ₈ H ₆] ⁺	C ₇ H ₅ O ₅	169.01305 (16 %)
						[M+H]-C ₈ H ₆ -CO] ⁺	C ₆ H ₅ O ₄	141.01811 (11 %)
						[M+H]-C ₈ H ₆ -CO-H ₂ O] ⁺	C ₆ H ₃ O ₃	123.00773 (63 %)
						[M+H]-C ₇ H ₄ O ₅] ⁺	C ₈ H ₇	103.04451 (10 %)
16	Wogonina ^{a,b,c}	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺ 285.07575 (1 %)	0.49	60	[M+H]-CH ₃] ⁺	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.05176 (100 %)
						[M+H]-CH ₃ -CO] ⁺	C ₁₄ H ₁₀ O ₄	242.05701 (5 %)
						[M+H]-CH ₃ -C ₈ H ₇] ⁺	C ₇ H ₄ O ₅	168.07658 (3 %)
						[M+H]-CH ₃ -C ₇ H ₄ O ₅] ⁺	C ₈ H ₇	103.05444 (2 %)
17	Diterpeno fenólico ^a	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	[M-H] ⁻ 329.17474 (15 %)	0.92	40	[M-H]-CH ₃] ⁻	C ₁₉ H ₂₂ O ₄	314.15262 (100 %)
						[M-H]-2CH ₃] ⁻	C ₁₈ H ₁₉ O ₄	299.12906 (0.1 %)
						[M-H]-C ₃ H ₈] ⁻	C ₁₇ H ₁₇ O ₄	285.11313 (0.2 %)
						[M-H]-C ₄ H ₁₀] ⁻	C ₁₆ H ₁₅ O ₄	271.09641 (0.3 %)

^a Identificación tentativa basada en la medición de masas exactas y relaciones isotópicas del átomo de C.

^b Identificación tentativa basada en la información obtenida de la literatura científica sobre metabolitos secundarios de plantas de *Scutellaria* spp. (J. Han *et al.*, 2007a; He *et al.*, 2016; Lefebvre *et al.*, 2021; G. Liu *et al.*, 2009, 2011; Seo *et al.*, 2013; Zengin *et al.*, 2019).

^c Identificación confirmatoria basada en la comparación de *t_R* y espectros de masas con los de sustancias-patrón. HCD-*Higher-Energy Collision Dissociation Cell*, por sus siglas en inglés.

La mayoría de los compuestos identificados en los extractos eran flavonas y flavanonas, se realizó estudio de sus patrones de fragmentación usando baicaleína (flavona) y eriodictiol (flavanona) como ejemplos. Eriodictiol no se detectó en los extractos, pero se estudió como sustancia-patrón. Los espectros de masas de estas sustancias (**Figura 11**) permitieron determinar sus iones-producto característicos, que fueron comunes en los espectros MS de todos los compuestos de la misma familia (**Figuras 12 y 13**).

Figura 11.

Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de **A. Baicaleína** $[M+H]^+$ m/z 271.05969, a 60 eV y **B. Eriodictiol** $[M+H]^+$ m/z 289.07066, a 40 eV.

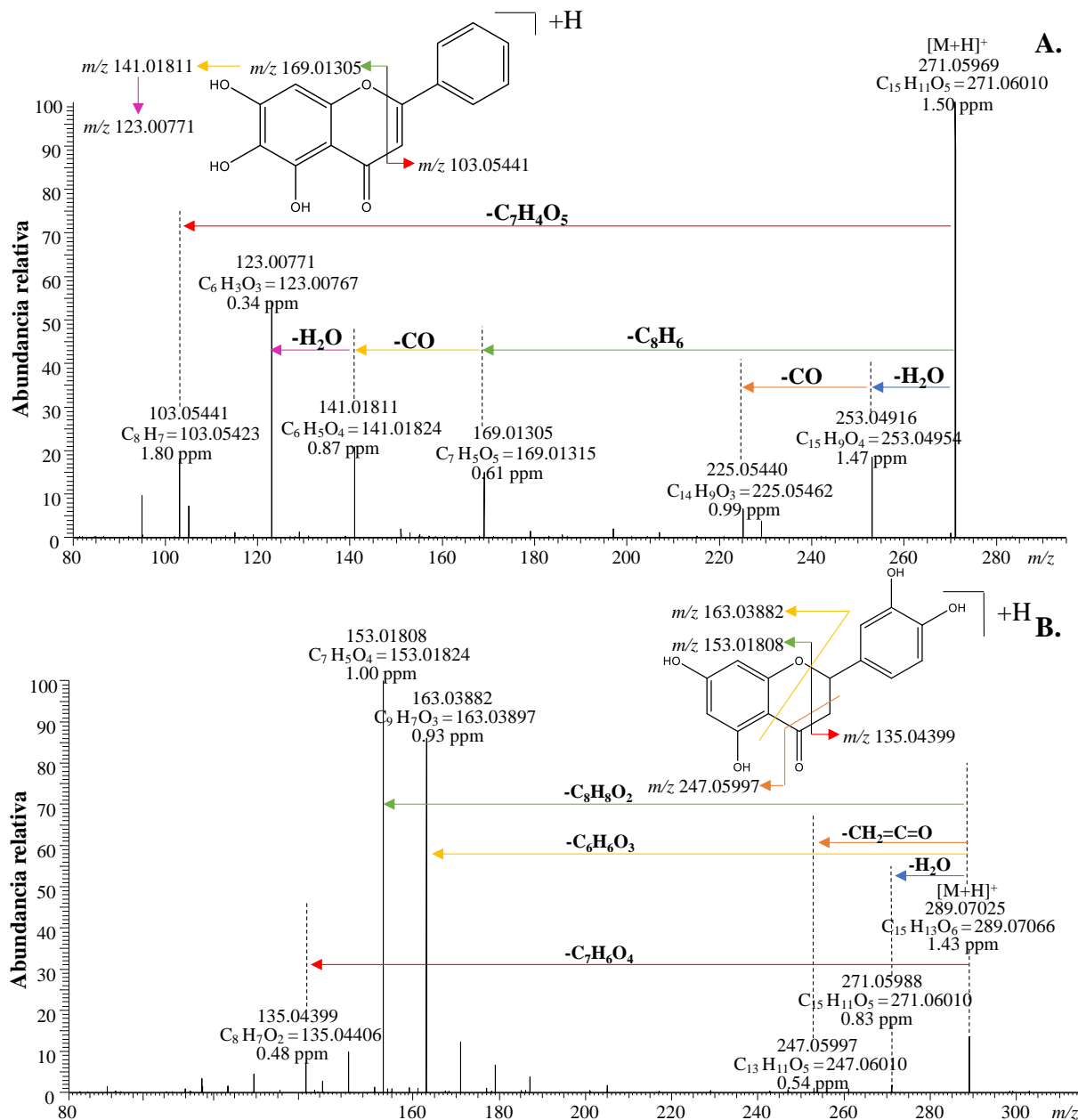
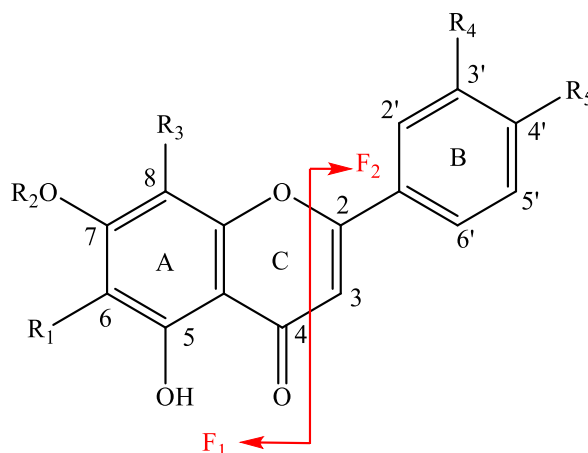


Figura 12.

Esquema general de fragmentación de las flavonas y sus derivados glicosilados. Glu: Glucósido, Ác. gluc: Ácido glucurónico. Arab: Arabinósido. Ram: Ramnósido.

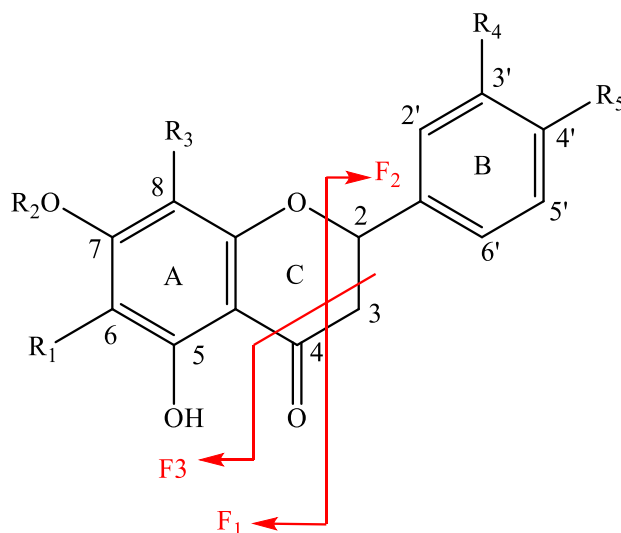


Compuesto	Sustituyentes					Masas exactas, <i>m/z</i>		
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Glicósido	F ₁	F ₂
Escutelarina	OH	Ác. gluc.	H	H	OH	287.05537	169.01280	119.04921
Baicalina	OH	Ác. gluc.	H	H	H	271.06033	169.01256	103.04451
Norwogonina- glucurónido	H	Ác. gluc.	OH	H	H	271.06003	169.01230	103.04425
Apigenina- glucurónido	H	Ác. gluc.	H	H	OH	271.06033	153.01824	119.04914
Escutelareina	OH	H	H	H	OH	-	169.01280	113.04921
Baicaleína	OH	H	H	H	H	-	169.01305	103.05441
Norowognina	H	H	OH	H	H	-	169.01305	103.05517

Figura 13.

Esquema general de fragmentación de las flavanonas y sus derivados glicosilados.

Glu: Glucósido, Ác. gluc: Ácido glucurónico. Arab: Arabinósido. Ram: Ramnósido.



Compuesto	Sustituyentes					Masas exactas, <i>m/z</i>			
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Glicósido	F ₁	F ₂	F ₃
Isocartamidina-glucurónido	H	H	O-Gluc.	H	OH	289.07043	169.01312	119.04926	247.06036
Dihidrobaicaleína-glucurónido	OH	Ác. gluc.	H	H	H	273.07538	169.01341	103.05569	231.06398
Dihidrobaicaleína	OH	H	H	H	H	273.07617	169.01292	103.05447	231.06482

En los espectros MS de la molécula protonada de baicaleína, el ion $[M+H]^+$ pierde una molécula de agua, generando producto $[(M+H)-H_2O]^+$ en *m/z* 253.04919, que decae con pérdida de CO y formando $[(M+H)-H_2O-CO]^+$ en *m/z* 225.05435. El ion $[(M+H)-C_8H_6]^+$ en *m/z* 169.01305 fue producto de un reordenamiento en la molécula protonada, que favoreció el rompimiento del enlace en ²C y ³C del anillo C del flavonoide (**Figura 9**), su ion complementario $[(M+H)-C_7H_6O_5]^+$ en *m/z* 103.04451, también se registró. A su vez, a partir de $[(M+H)-C_8H_6]^+$ se generaron los iones

$[(M+H)-C_8H_6-CO]^+$ en m/z 141.01811 y $[(M+H)-C_8H_6-CO-H_2O]^+$ en m/z 123.00773, por respectivas pérdidas de $-CO$ y $-H_2O$.

En el espectro de masas de eriodictiol $[M+H]^+$, el ion eliminó una molécula de agua y dio origen al fragmento $[(M+H)-H_2O]^+$ en m/z 271.05988. El ion-producto $[(M+H)-C_6H_6O_3]^+$ en m/z 163.03882 fue por pérdida de $C_6H_6O_3$. Los iones $[(M+H)-C_2H_2O]^+$ y $[(M+H)-C_8H_8O_2]$ en m/z 247.05997 y en m/z 153.01808, fueron productos respectivos de una pérdida de $CH_2=C=O$ y de la ruptura retro Diels-Alder en los carbonos 2C y 3C en el anillo C de eriodictiol (**Figura 9**), típica para flavanonas (Fabre *et al.*, 2001).

En los espectros de masas de los compuestos *O*-glicosilados se registraron las agliconas protonadas o deprotonadas como iones-producto característicos. La pérdida del fragmento glicosilado se generó a energías de colisión bajas (10 - 20 eV), mientras que la fragmentación de la aglicona protonada o deprotonada sucedió a energías mucho más altas (50 - 70 eV) (**Figuras 14 y 15**), cuando las moléculas protonadas o deprotonadas ya no se registran en el espectro.

Figura 14.

Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de baicalina. Véase la señal $[M+H]^+$ en m/z 447.09198, obtenida a **A.** 20 eV y **B.** 70 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD.

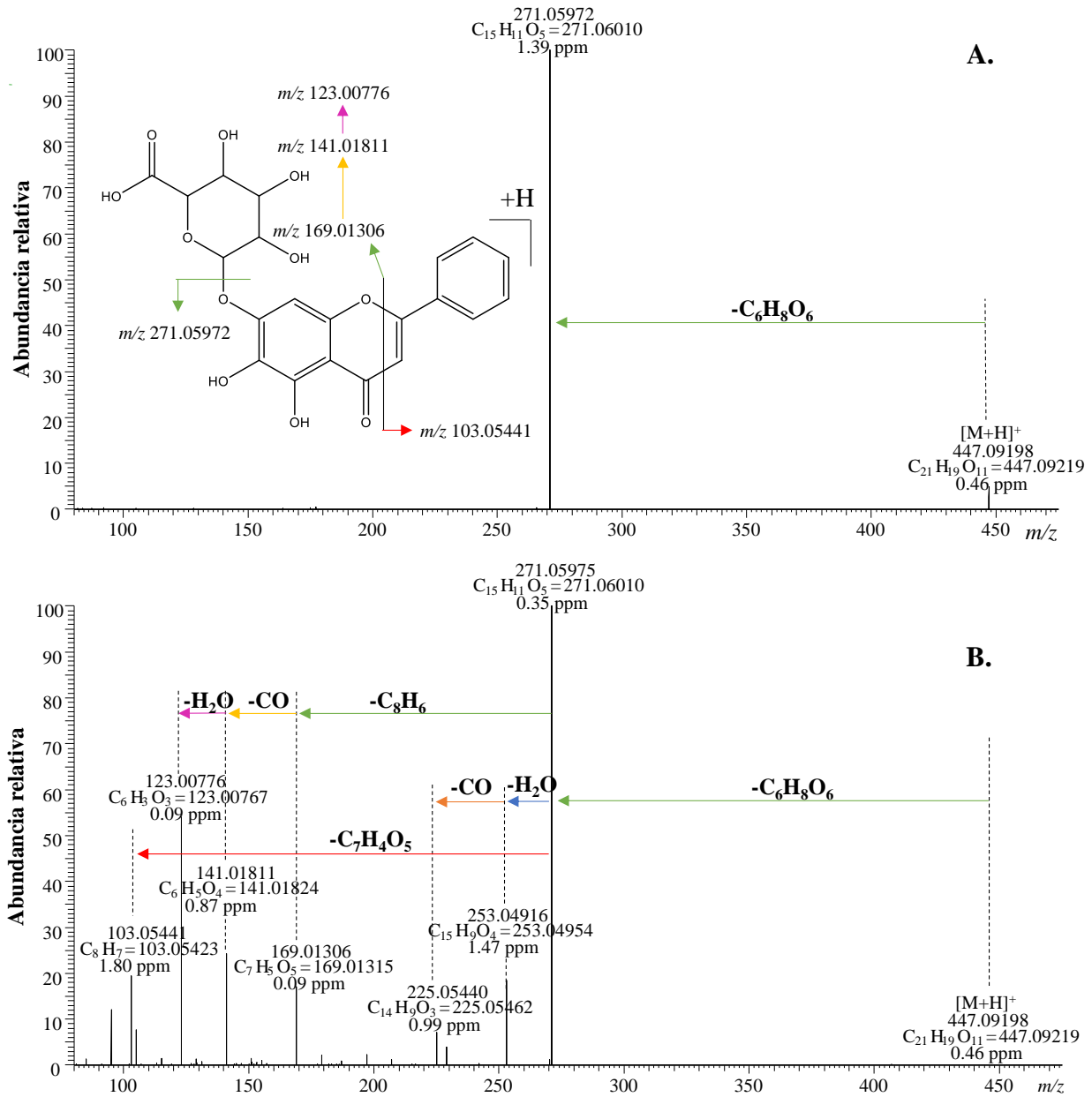
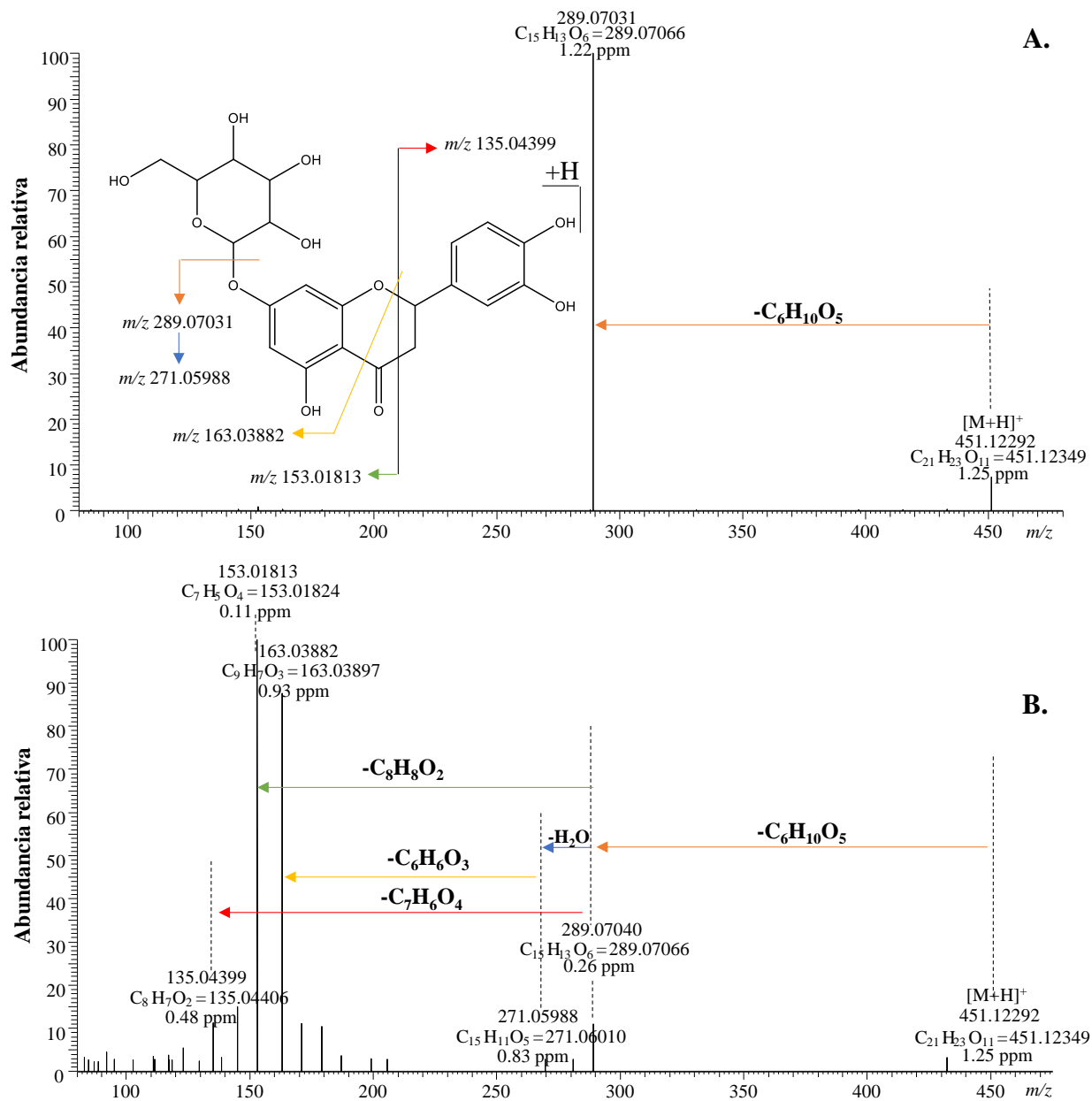


Figura 15.

*Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS del eriodictiol-7-glucósido. Véase la señal $[M+H]^+$ en m/z 451.12348, a **A.** 10 eV y **B.** 50 eV de la energía de colisiones activadas en la celda HCD.*



En los extractos, se encontró la umbeliferona-hexósido-pentósido, hasta donde sabemos, por primera vez. En su espectro de masas aparece el ion $[M+H]^+$ en m/z 471.14970, correspondiente a la fórmula elemental de esta sustancia $C_{21}H_{27}O_{12}$. El ion $[M+H]^+$ se disocia generando el ion-producto $[(M+H)-2H_2O]^+$ en m/z 435.12823 por pérdida consecutiva de dos moléculas de agua. La eliminación de una molécula de ramnosa $[(M+H)-C_6H_{10}O_4]^+$ generó el ion-producto en m/z 325.09137, que perdió una glucosa formando el ion-producto $[(M+H)-C_6H_{10}O_4-C_6H_{10}O_5]^+$ en m/z 163.03882. Este ion eliminó agua formando el ion-producto $[(M+H)-C_6H_{10}O_4-C_6H_{10}O_5-H_2O]^+$ en m/z 145.07590. La molécula protonada $[M+H]^+$ de umbelliferona-hexósido-pentósido experimentó la expulsión de una molécula de glucosa $[(M+H)-C_6H_{10}O_5]^+$ y generó el ion-producto en m/z 309.09671 (**Figura 16**).

Este patrón de fragmentación fue reportado por primera vez por McNeil en 1983 (McNeil, 1983), pero la propuesta de un esquema general para flavonoides glicosilados, se dio años más tarde por Li y Claeys (Q. M. Li & Claeys, 1994) y Ma *et al.* (Y. L. Ma *et al.*, 2000) (**Figura 17**). Según los autores ((McNeil, 1983, Q. M. Li & Claeys, 1994, Y. L. Ma *et al.*, 2000), un protón de la aglicona migra hacia el glicósido terminal (ramnosa), en donde pueden ocurrir procesos inducidos por carga que conducen a la pérdida de glucosa, dando lugar al ion-producto en m/z 309.09671. Los autores (Q. M. Li & Claeys, 1994, Y. L. Ma *et al.*, 2000) comprobaron estos hechos mediante deuteración de analitos y cálculos computacionales.

Figura 16.

Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de la umbeliferona-hexósido-pentósido. Se observa el ion $[M+H]^+$ en m/z 471.14954 a 10 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *S. incarnata*.

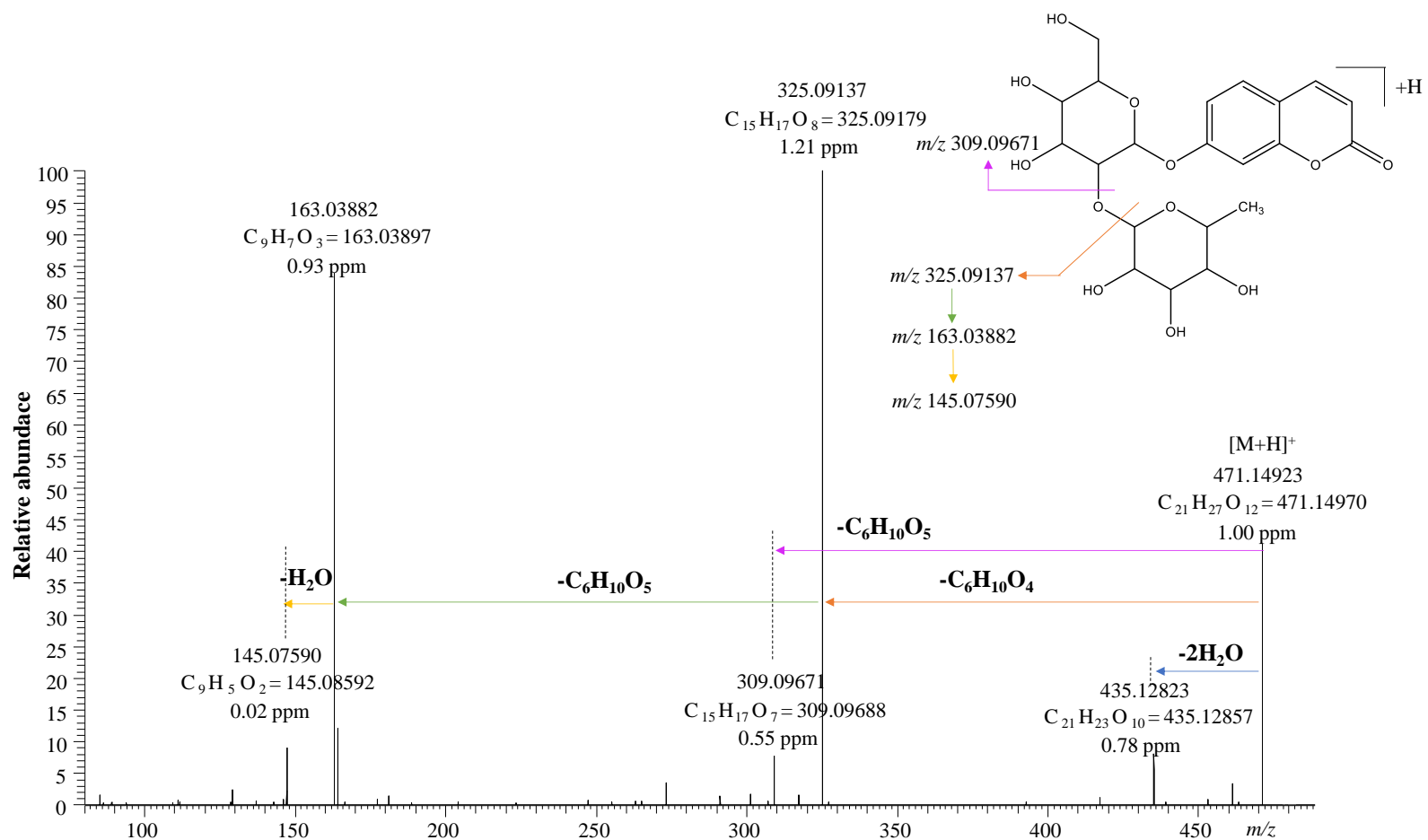
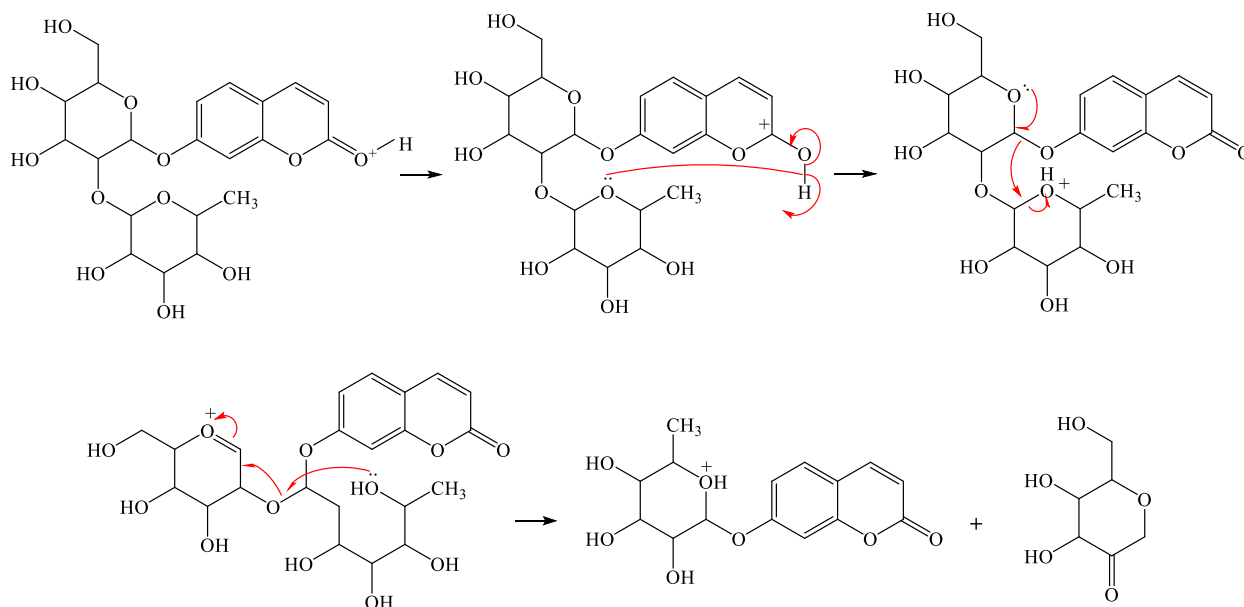


Figura 17.

Esquema de fragmentación propuesto para la umbeliferona-hexósido-pentósido, para la formación del ion-producto $C_{15}H_{17}O_7$ en m/z 309.09671. Tomado con modificaciones de (Y. L. Ma *et al.*, 2000).



La apigenina-*C*-glucósido-*C*-arabinósido (*schaftoside*) fue reportada por Liu *et al.* (G. Liu *et al.*, 2011) y Han *et al.* (J. Han *et al.*, 2007b) en otras especies de *Scutellaria* spp. En su espectro de masas (ESI/MS), a partir de la molécula deprotonada $[M-H]^-$ en m/z 563.13953 se observan pérdidas de 60, 90 y 120 unidades que generan los iones-producto en m/z 503.12198, 473.10934 y 443.09860, respectivamente. Según Becchi y Fraisse (Becchi & Fraisse, 1989) y Wu *et al.* (Wu *et al.*, 2004), estos son iones-producto típicos de rupturas de enlaces *C*-glicosídicos. El ion-producto en m/z 413.08817 se generó por el rompimiento de la hexosa $[(M-H)-C_5H_{10}O_5]^-$, que no involucró la ruptura del enlace $^1C-^6C$ entre la aglicona y el glicósido (**Figura 18**). El ion-producto en m/z 383.07773 corresponde a la pérdida sucesiva de 60 ($-C_2H_4O_2$) y 120 unidades ($-C_4H_8O_4$) en los

azúcares; al igual que el ion-producto en m/z 353.06668, que se forma a partir de las pérdidas sucesivas de 60 y 150 unidades ($-C_5H_{10}O_5$).

En el espectro de masas del verbascósido, se registra la molécula deprotonada $[M-H]^-$ en m/z 623.19704, que se disocia con eliminación del ácido cafeico y una ramnosa, con formación de los iones $[(M-H)-C_9H_6O_3]^-$ y $[(M-H)-C_9H_6O_3-C_6H_{10}O_4]^-$ en m/z 461.16681 y m/z 315.10886, respectivamente (**Figura 19**). El ion-producto $C_9H_5O_3$ en m/z 161.02367 es un ion complementario del ácido cafeico. La presencia del verbascósido fue reportado previamente en *S. orientalis*, *S. salviifolia* (Zengin *et al.*, 2019) y *S. hainanensis*.

Figura 18.

Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de la apigenina-C-glucósido-C-arabinósido. Véase el ion [M-H]⁻ en m/z 563.14191, a 30 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de S. incarnata.

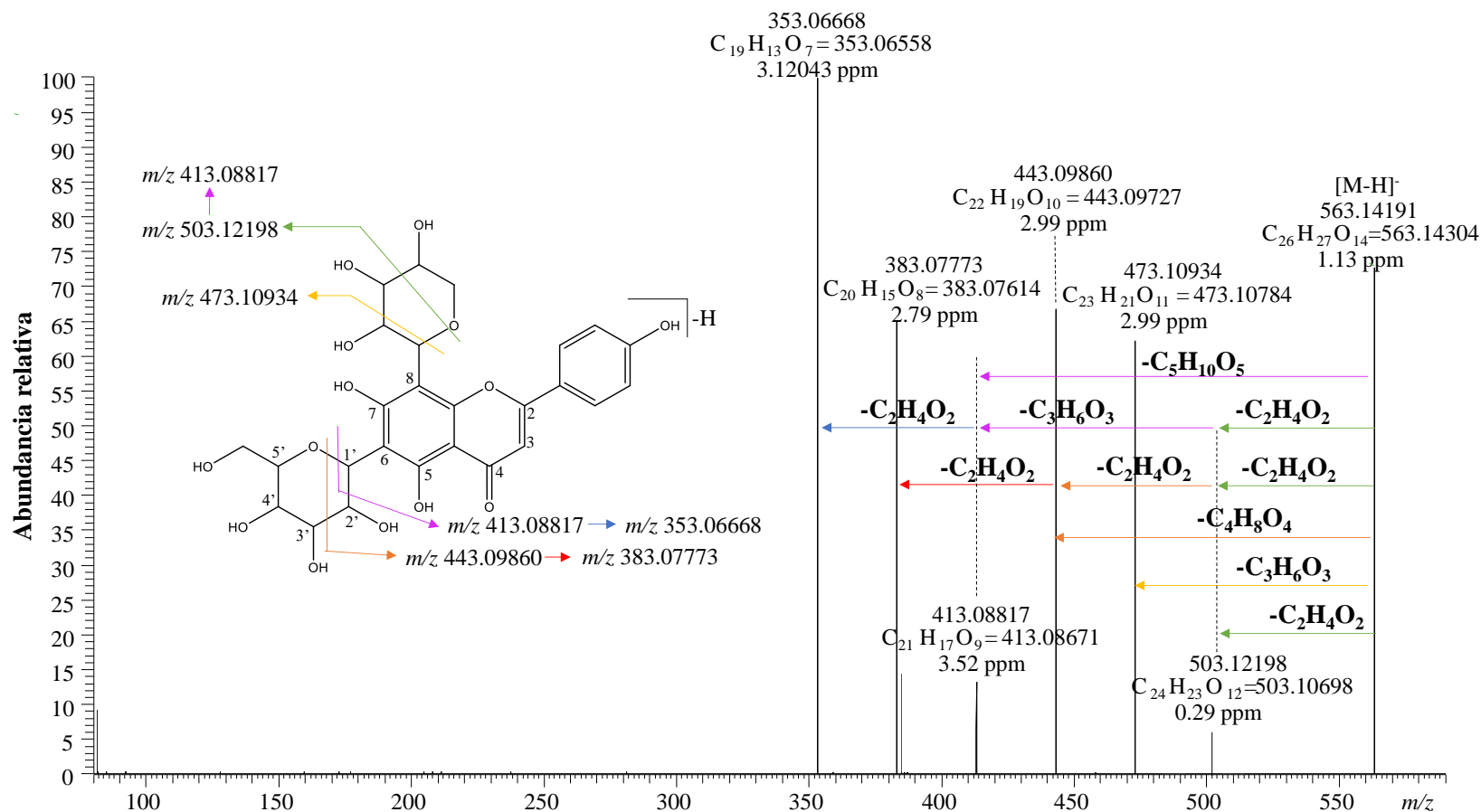
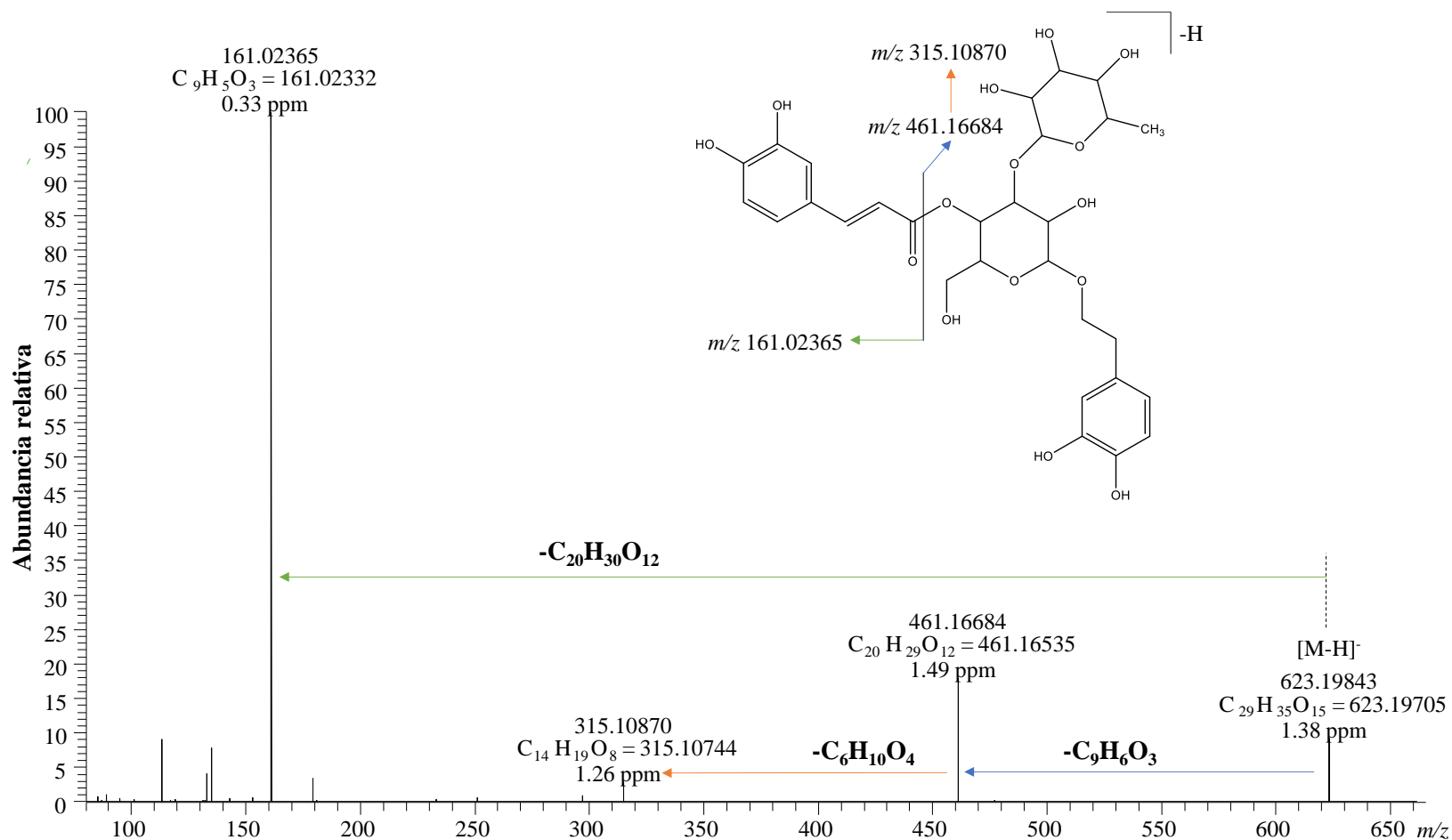


Figura 19.

Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS del verbascósido. Véase el ion [M-H]⁻ en m/z 623.19704, a 30 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de S. incarnata.



Isoliquiritina solo se encontró en el extracto de *S. coccinea*, pero no se ha reportado en otras especies de *Scutellaria* spp. La molécula protonada $[M+H]^+$ en m/z 419.13366, corresponde a su fórmula elemental ($C_{21}H_{23}O_9$), y se fragmenta por la pérdida de una molécula de glucosa, dando origen al ion $[(M+H)-C_6H_{10}O_5]^+$ en m/z 257.08044, que pierde, a su vez, una molécula de agua $[(M+H)-C_6H_{10}O_5-H_2O]^+$ para generar el ion-producto en m/z 239.06585 (**Figura 20**).

Las moléculas protonadas $[M+H]^+$ en m/z 447.09618, apigenina-7-glucurónido y norwogonina-glucurónido, se encontraron únicamente en el extracto de *S. ventenatii* x *S. incarnata*. Para ambos compuestos, en sus espectros de masas, a partir de la molécula protonada se observó la pérdida del ácido glucurónido, para generar la aglicona protonada $[(M+H)-C_6H_8O_6]^+$ en m/z 271.06033. En el espectro de masas de la apigenina-glucurónido, se observa en la aglicona protonada, la ruptura del anillo central $[(M+H)-C_6H_8O_6-C_8H_6O]^+$ y aparición del ion-producto en m/z 153.01824. En el espectro de masas de norwogonina-glucurónido, ocurre este mismo rompimiento en la aglicona protonada pero con la pérdida del fragmento C_8H_6 y generación del ion-producto $[(M+H)-C_6H_8O_6-C_8H_6]^+$ en m/z 169.01256 (**Figura 21**). Las dos moléculas son isómeros y la posición de los grupos hidroxilo en los anillos A y B es diferente (**Figura 21**), por eso se presentan diferencias en sus espectros de masas.

Figura 20.

*Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de la isoliquiritina. Véase ion $[M+H]^+$ en m/z 419.13366, a 10 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *S. coccinea*.*

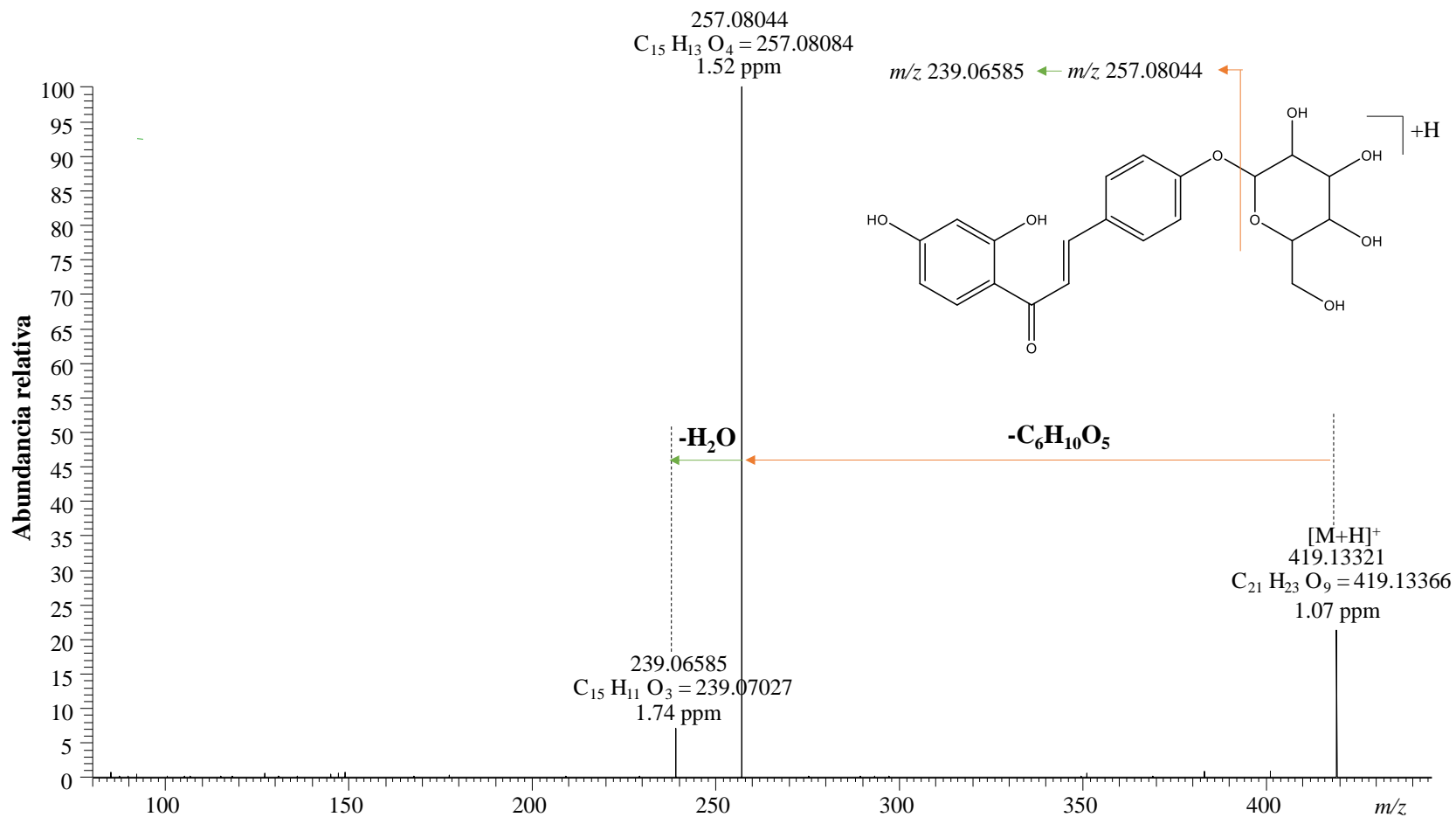
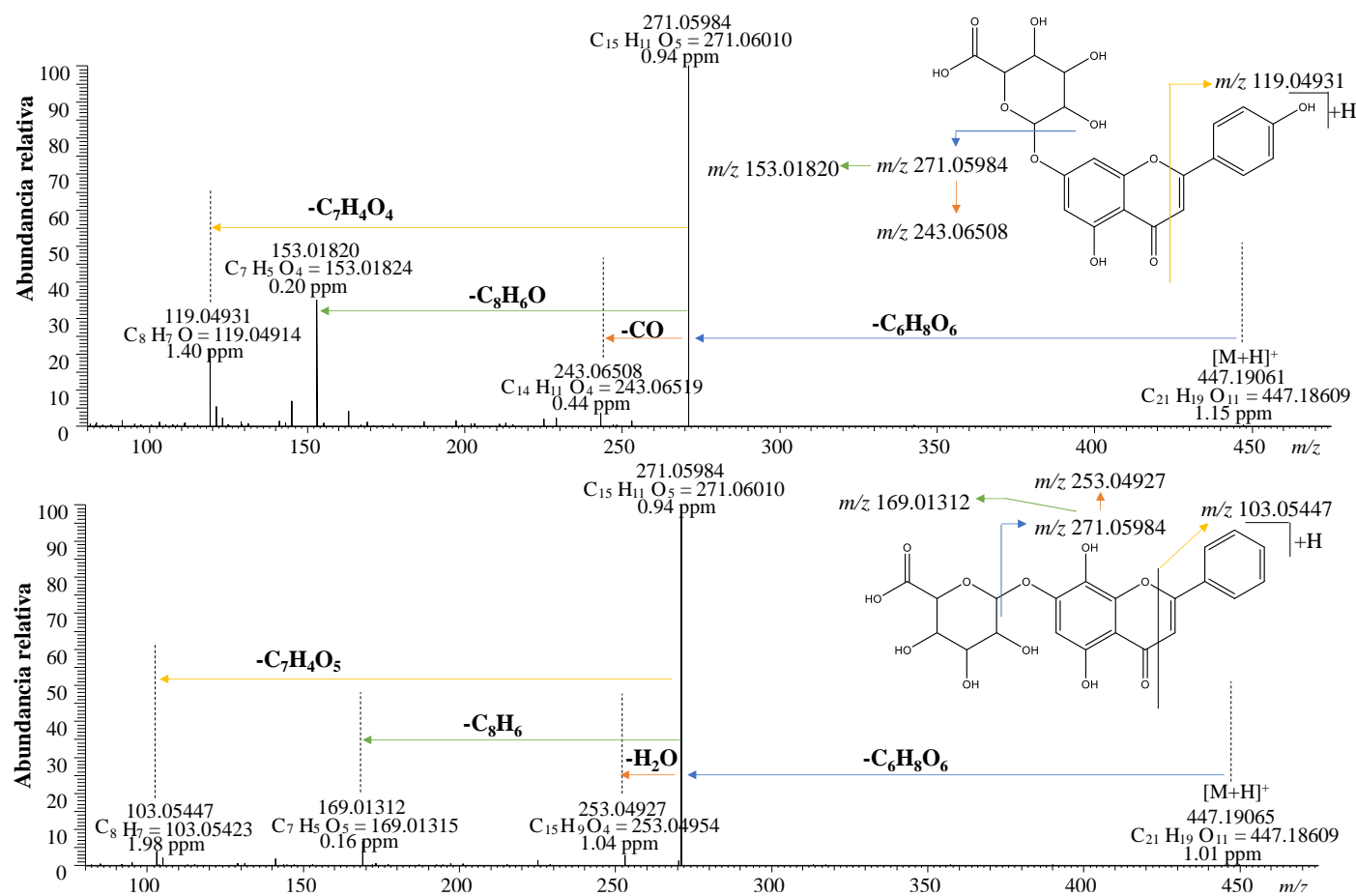


Figura 21.

*Espectros de masas obtenidos por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de: A. Apigenina-7-glucurónido y B. Norwogonina-glucurónido. Véanse iones $[M+H]^+$ en m/z 447.09218, a 70 eV (HCD), de estas sustancias presentes en el extracto hidroalcohólico de *S. ventenatii* x *S. incarnata*.*



A.

B.

La molécula protonada de isocartamidina-glucurónido $[M+H]^+$, registrada en m/z 465.10275, a través de la ruptura del enlace glucosídico, se disocia con formación de la aglicona protonada de isocartamidina $[(M+H)-C_6H_8O_6]^+$, en m/z 289.07031 que luego, por ruptura retro Diels-Alder, genera el ion $[(M+H)-C_6H_8O_6-C_8H_8O]^+$ en m/z 169.01312. La aglicona protonada, a su vez, pierde agua $[(M+H)-C_6H_8O_6-H_2O]^+$ y forma el ion-producto en m/z 271.06006, que se fragmenta para formar el ion $[(M+H)-C_6H_8O_6-H_2O-C_6H_4O_3]^+$ en m/z 147.0441 (**Figura 22**).

La dihidrobaicaleina-glucurónido y su aglicona, la dihidrobaicaleina, se han detectado previamente en bajas concentraciones en extractos de *Scutellaria* (J. Han *et al.*, 2007b; G. Liu *et al.*, 2009, 2011). En esta investigación, se estudiaron sus patrones de fragmentación (**Figuras 23 y 24**). La molécula protonada de dihidrobaicaleina-glucurónido $[M+H]^+$, registrada en m/z 449.10783, genera, por ruptura del enlace glucosídico, el ion-producto $[M+H-C_6H_8O_6]^+$ en m/z 273.07575, que decae con formación del ion-producto $[(M+H)-C_6H_8O_6-C_8H_8]^+$ en m/z 169.01292, por ruptura retro Diels-Alder que sufre la aglicona. Esta última pérdida ha sido reportada como característica en flavanonas (Fabre *et al.*, 2001)(Fabre *et al.*, 2001). El ion en m/z 131.04906 con fórmula elemental C_9H_7O , es producto de la ruptura del anillo C de la aglicona, que genera el ion-producto $[(M+H)-C_6H_8O_6-C_6H_6O_4]^+$. Esta pérdida ha sido reportada por Hughes *et al.* (Hughes *et al.*, 2001) en la naringenina.

Un compuesto, correspondiente a una molécula deprotonada $[M-H]^-$ en m/z 329.17474 ($C_{20}H_{26}O_4$) no se identificó positivamente. La estructura para esta sustancia se propone en la **Figura 25**. La molécula deprotonada $[M-H]^-$ experimenta la pérdida del radical metilo con formación del producto $[(M-H)-CH_3]^-$ en m/z 314.15262, que expulsa, luego, otro radical metílico y genera el fragmento $[(M-H)-CH_3-CH_3]^-$ en m/z 299.12906. Los iones-producto en m/z 285.11313

y en m/z 271.09641 corresponden a las pérdidas de propano (C_3H_8) y de butano (C_4H_{10}), respectivamente.

En extractos de *Scutellaria* spp. han sido reportados diterpenos (S. J. Dai *et al.*, 2006; Esquivel *et al.*, 1995; Maleki *et al.*, 2022), que, en sus espectros de masas, tienen este tipo de iones-producto, originados de las pérdidas de radicales alquilo CH_3^{\bullet} , $C_3H_7^{\bullet}$, $C_5H_{11}^{\bullet}$, pero ningún diterpeno corresponde al identificado en este estudio. Danuello *et al.* (Danuello *et al.*, 2020) reportaron pérdidas de moléculas neutras (C_3H_7 , C_4H_{10}) correspondientes a la escisión del grupo éster en compuestos derivados de la casearina. Da Cunha Pinto *et al.* (Da Cunha Pinto *et al.*, 2016) realizaron estudios computacionales de algunos diterpenos oxigenados y encontraron que las pérdidas de agua y ácido fórmico son características para este tipo de compuestos. Teniendo en cuenta que el compuesto (**Figura 22**) no mostró la pérdida del ácido fórmico, y que la pérdida de agua ocurre con la formación de un ion de intensidad muy baja (0.15 %), se propuso una estructura química para la fórmula molecular $C_{20}H_{25}O_4$.

Figura 22.

*Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de la isocartamidina-glucurónico. Véase ion $[M+H]^+$ en m/z 465.13492, a 30 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *S. coccinea*.*

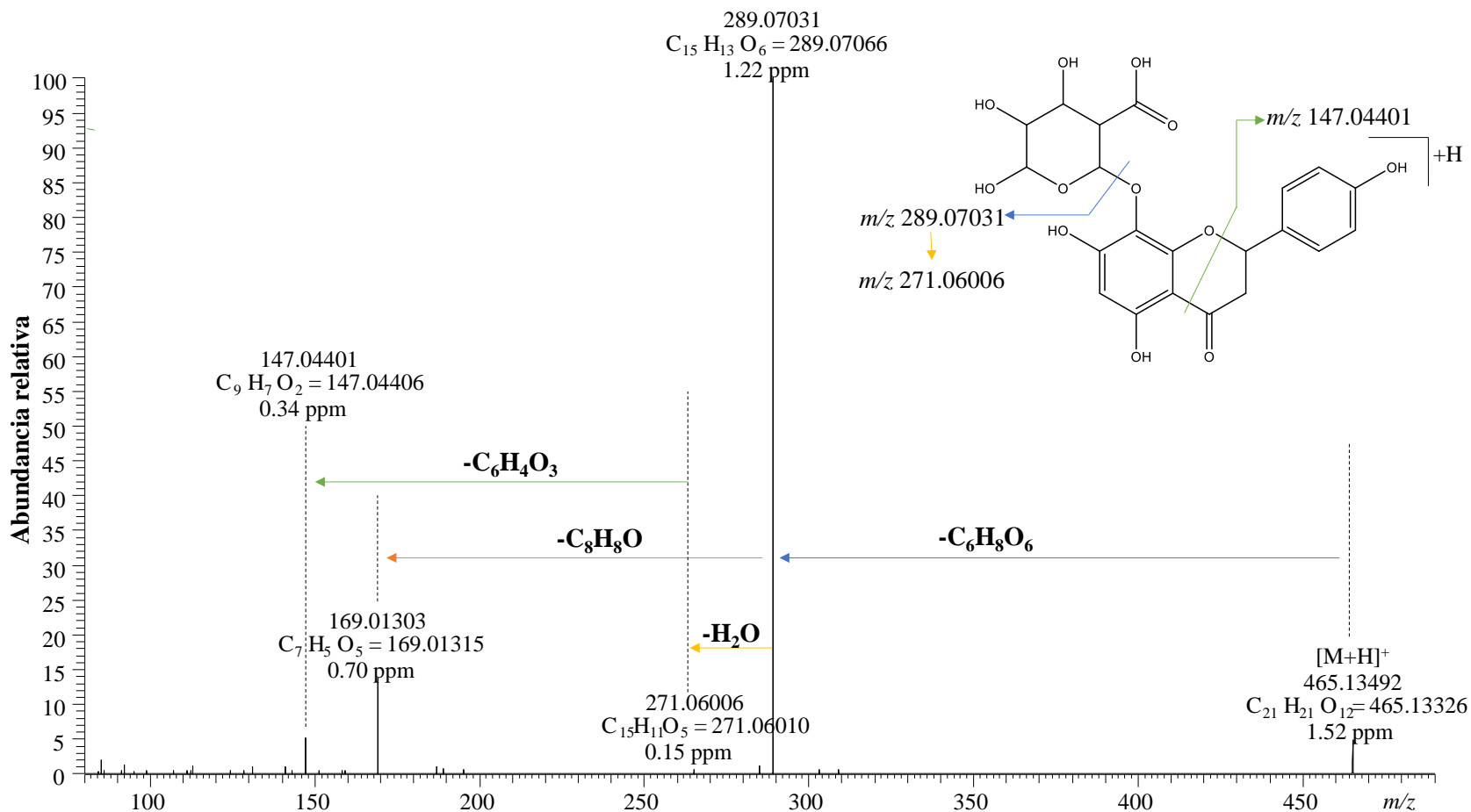


Figura 23.

Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de la dihidrobaicaleína-glucurónido. Véase ion $[M+H]^+$ en m/z 449.10689, a 30 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *S. incarnata*.

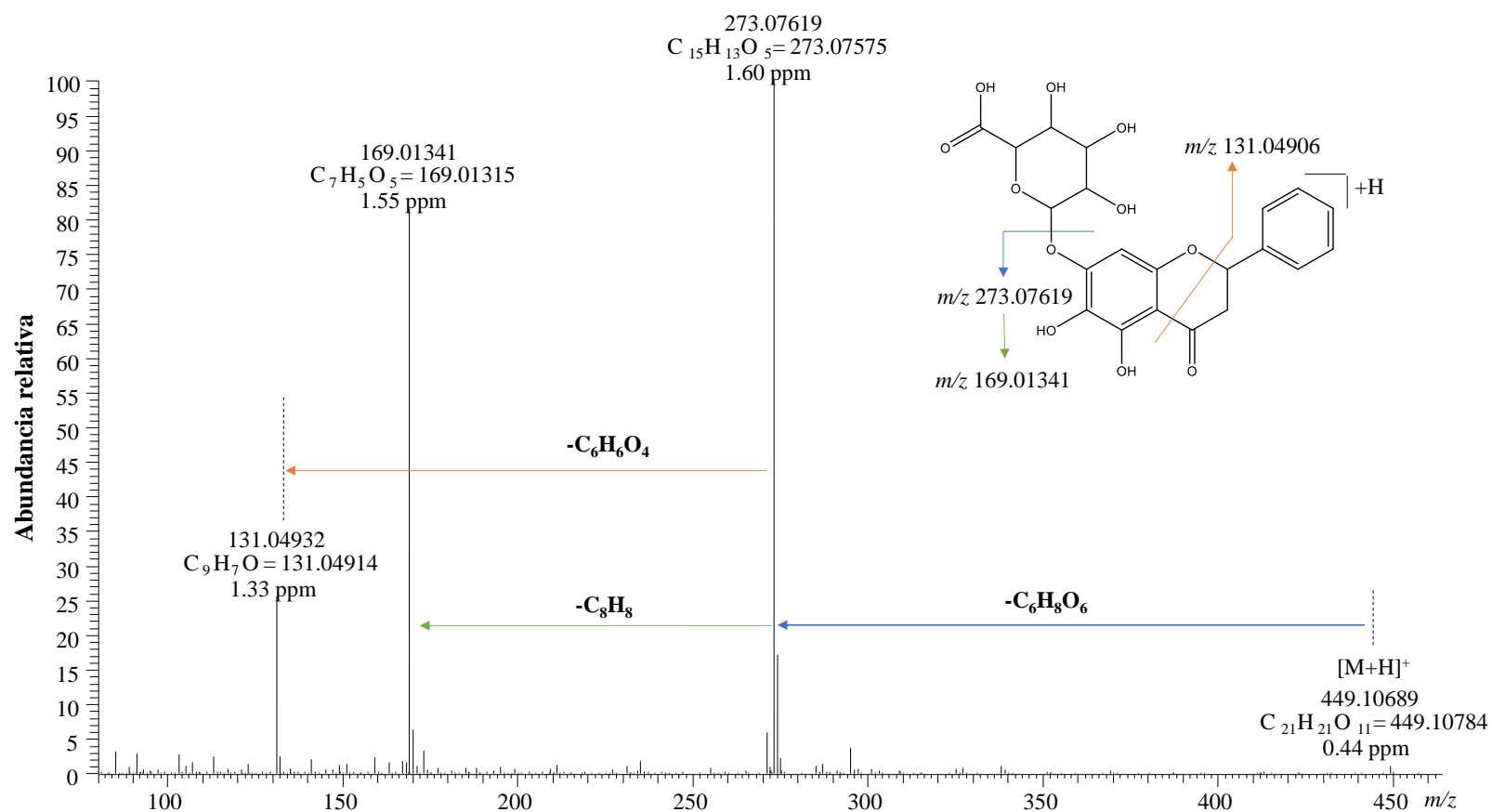


Figura 24.

Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de la dihidrobaicaleína. Véase ion $[M+H]^+$ en m/z 273.07523, a 40 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *S. incarnata*.

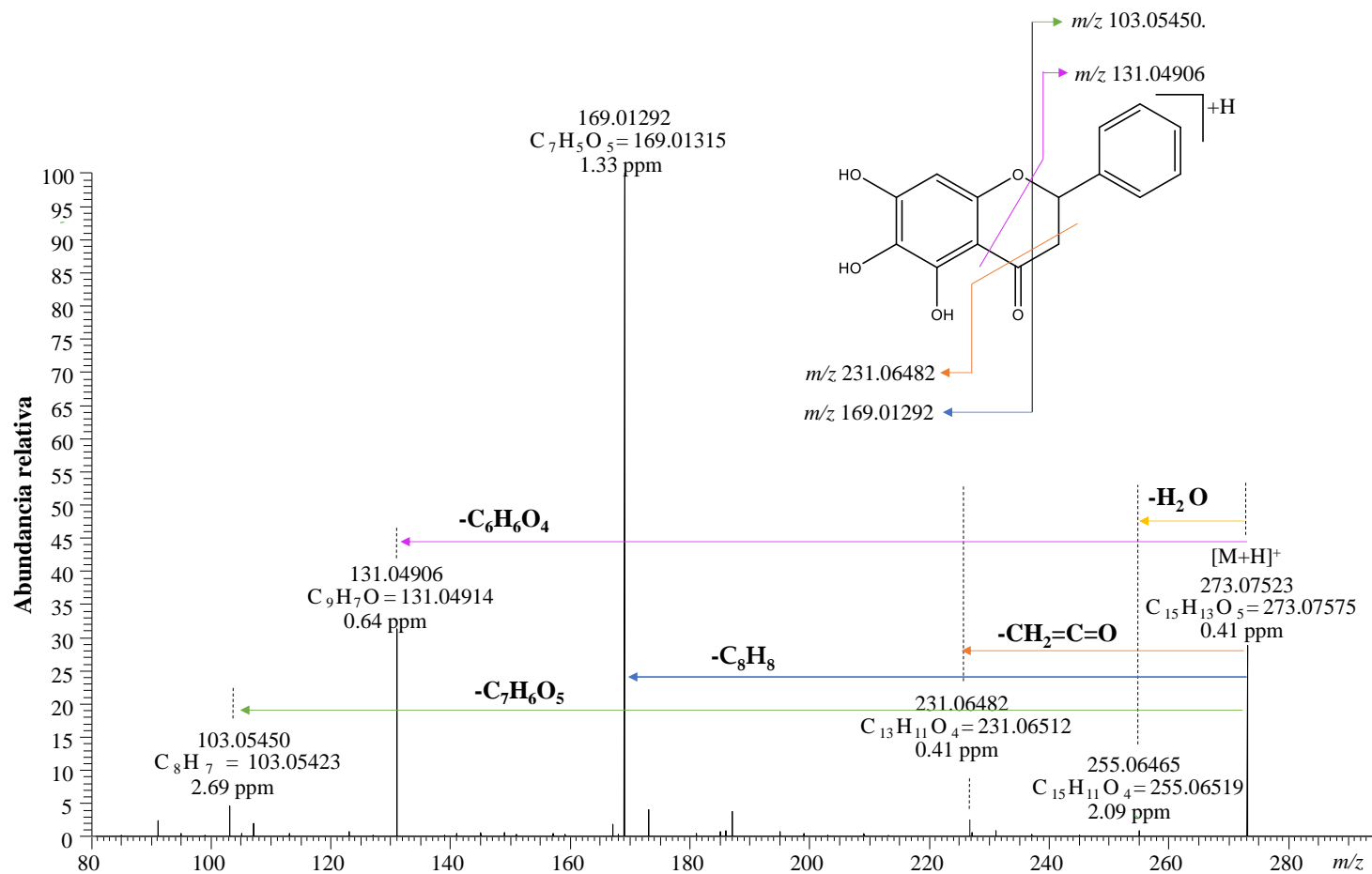
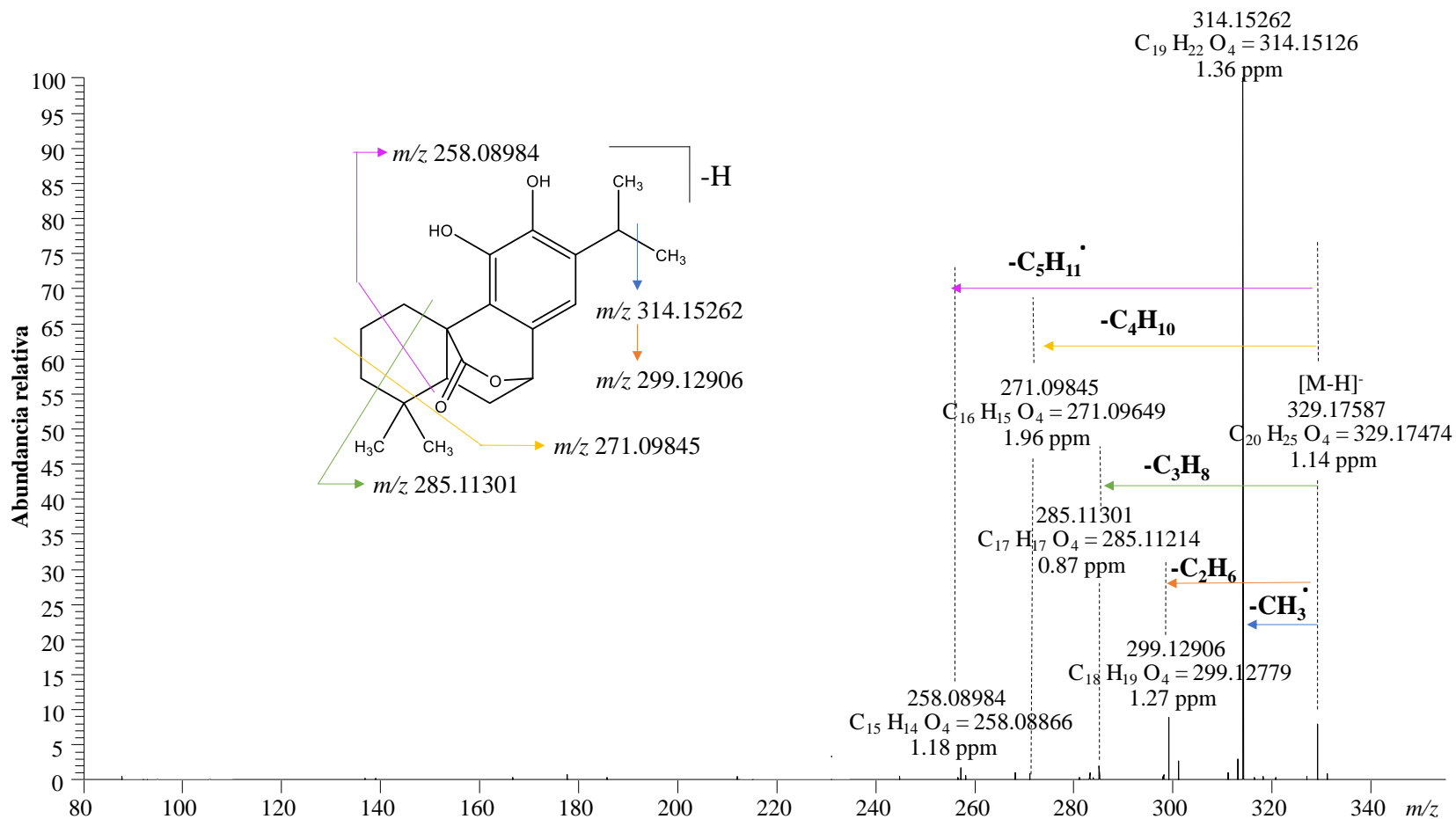


Figura 25.

Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS del compuesto con fórmula $C_{20}H_{25}O_4$. Véase ion $[M-H]^-$ en m/z 329.17587, a 50 eV (HCD), del compuesto presente en el extracto hidroalcohólico de *S. incarnata*.



La cuantificación de los compuestos se realizó mediante la técnica de estandarización externa empleando el modo de monitoreo de iones $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$ seleccionados (SIM) para cada compuesto de interés. En el caso de los iones extraídos de la corriente iónica total, para los cuales no se contaba con su sustancia de referencia, se realizó la cuantificación usando la curva de calibración obtenida para una sustancia-patrón estructuralmente parecida al compuesto presente en el extracto (**Tabla 11**). En los tres extractos, baicalina fue el compuesto mayoritario (**Tabla 13**), esto coincide con lo encontrado en extractos de otras especies, *e.g.*, *S. baicalensis* (Horvath *et al.*, 2005; Shen *et al.*, 2021b) y *S. lateriflora* (Awad *et al.*, 2003).

Baicalina se encontró en un gran número de especies del género *Scutellaria* (Shang *et al.*, 2010), ha sido objeto de interés de diferentes estudios biológicos, mostró su efectividad *in vitro* para inhibir la infección con VIH (B. Q. Li *et al.*, 2000), disminuir el estrés oxidativo producido por la citotoxicidad generada por H_2O_2 en las células HK-2 (Gong & Zhu, 2018), para inducir y potenciar la apoptosis en las células HT-29 de forma dosis-dependiente (Tao *et al.*, 2018) e inhibir la replicación de enfermedades virales como el serotipo dos del dengue (Moghaddam *et al.*, 2014). La flavanona dihidrobaicaleina-glucurónido fue el segundo compuesto más abundante en los extractos estudiados, sin embargo, no se han encontrado reportes en la literatura científica sobre sus propiedades biológicas.

Tabla 13.

Cantidad (mg/g) de compuestos fenólicos presentes en los extractos obtenidos de las tres plantas de Scutellaria spp. que crecen en Colombia.

Compuesto	mg compuesto/g extracto seco, valor \pm s (n=3)		
	<i>S. incarnata</i>	<i>S. coccinea</i>	<i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i>
Baicaleína	16.37 \pm 0.01	18.55 \pm 0.04	12.80 \pm 0.01
Baicalina	278.127 \pm 0.005	158.3 \pm 0.3	186.87 \pm 0.01
Wogonina	0.159 \pm 0.004	0.7 \pm 0.3	14.883 \pm 0.006
Wogonosida	1.25 \pm 0.06	1.241 \pm 0.007	11.84 \pm 0.04
Escutelareína	2 \pm 1	3.79 \pm 0.01	0.60 \pm 0.02
Escutelarina	33.77 \pm 0.02	21.400 \pm 0.007	20.09 \pm 0.03
Norwogonina	<LOD	<LOD	4.24 \pm 0.04
Dihidrobaicaleína ^a	7.295 \pm 0.009	8.843 \pm 0.006	2.21 \pm 0.07
Dihidrobaicaleína-glucurónido^b	140.18 \pm 0.07	51.20 \pm 0.02	44.89 \pm 0.06
Norwogonina-glucurónido ^c	<LOD	<LOD	29.79 \pm 0.04
Isocartamidina-glucurónido ^d	13.117 \pm 0.005	11.419 \pm 0.007	<LOD
Apigenina-C-glucósido-C-arabinósido (<i>Schaftosido</i>) ^e	0.83 \pm 0.02	0.84 \pm 0.02	0.43 \pm 0.03
Verbascósido ^f	33.72 \pm 0.04	32.17 \pm 0.06	41.54 \pm 0.03
Umbeliferona-hexósido-pentósido ^g	0.423 \pm 0.008	0.60 \pm 0.05	0.395 \pm 0.003
Apigenina-7-glucurónido ^b	<LOD	<LOD	9.24 \pm 0.03
Isoliquiritina ^h	<LOD	1.56 \pm 0.05	<LOD

^a Cuantificación realizada en equivalentes de baicaleína

^b Cuantificación realizada en equivalentes de baicalina.

^c Cuantificación realizada en equivalentes de wogonosida.

^d Cuantificación realizada en equivalentes de eriodictiol-7-glucósido.

^e Cuantificación realizada en equivalentes de vitexina.

^f Cuantificación realizada en equivalentes de ácido-1,3-dicafeoilquínico.

^g Cuantificación realizada en equivalentes de escopoletina.

^h Cuantificación realizada en equivalentes de ácido rosmarínico.

LOD: Límite de detección.

La composición química de los extractos de las tres especies de *Scutellaria* spp. fue muy parecida, sin embargo, la cantidad y la relación de los compuestos fueron diferentes en cada extracto, lo que permite distinguir químicamente cada una de las especies estudiadas.

En todos los extractos, se encontraron los compuestos glicosilados, junto con sus respectivas agliconas. Su aislamiento se explica por el tipo de solvente empleado (etanol-agua), que permitió extraer tanto moléculas muy polares (glicósidos), medianamente polares (agliconas) y otros compuestos con varios grupos -OH presentes en sus estructuras (Cartaya & Reynaldo, 2001b; María Tránsito López Luengo, 2002).

4.3.3 Identificación y cuantificación de las fracciones aisladas, por prep-HPLC, de los extractos hidroalcohólicos de Scutellaria spp.

Debido a que la composición química de los extractos mostró que hay compuestos mayoritarios de interés biológico (**Sección 4.3.2**), se realizó un proceso de su fraccionamiento por prep-HPLC para obtener estos analitos puros o en una matriz menos compleja. En las **Figuras 26 A-C**, se muestran los perfiles cromatográficos obtenidos por prep-HPLC para las tres especies de *Scutellaria* spp., en donde se encuentran sombreadas las fracciones recolectadas para cada extracto.

Los perfiles cromatográficos de los extractos de *S. incarnata* y *S. coccinea* fueron muy similares, en ambos, se encontraron seis fracciones de interés, en donde, de manera cualitativa, solo cambiaron las intensidades de las señales. En cambio, en el perfil cromatográfico del híbrido *S. ventenatii* x *S. incarnata* se registraron ocho señales. Cada fracción fue recolectada (**Sección 3.4.3**) y analizada por HPLC-DAD para determinar el número mínimo de sus compuestos

presentes. En la **Tabla 14** se encuentra la identificación preliminar, por HPLC/DAD, de los compuestos en las fracciones de extractos de *Scutellaria* spp.

De los tres extractos se obtuvieron fracciones como una mezcla concentrada de sustancias, sin embargo, en las fracciones cinco y seis de los extractos de *S. incarnata* y *S. coccinea*, se observó una sola señal, correspondiente a dihidrobaicaleína y baicaleína, respectivamente. El mismo comportamiento se observó para las fracciones siete y ocho del extracto del híbrido *S. ventenatii* x *S. incarnata*, donde solo se encontró baicaleína y wogonina, respectivamente (**Figura 27**). A pesar de observar solo una señal en el perfil cromatográfico de estas fracciones, estas no fueron clasificadas como puras, ya que es posible que existan compuestos que no absorban en el rango de longitudes de onda utilizadas $\lambda=380 - 780$ nm, pero que sí están presentes en la fracción.

Figura 26.

Perfiles cromatográficos obtenidos por prep-HPLC ($\lambda=270$ nm), de los extractos de

A. *S. incarnata*, **B.** *S. coccinea* y **C.** *S. ventenatii* x *S. incarnata*.

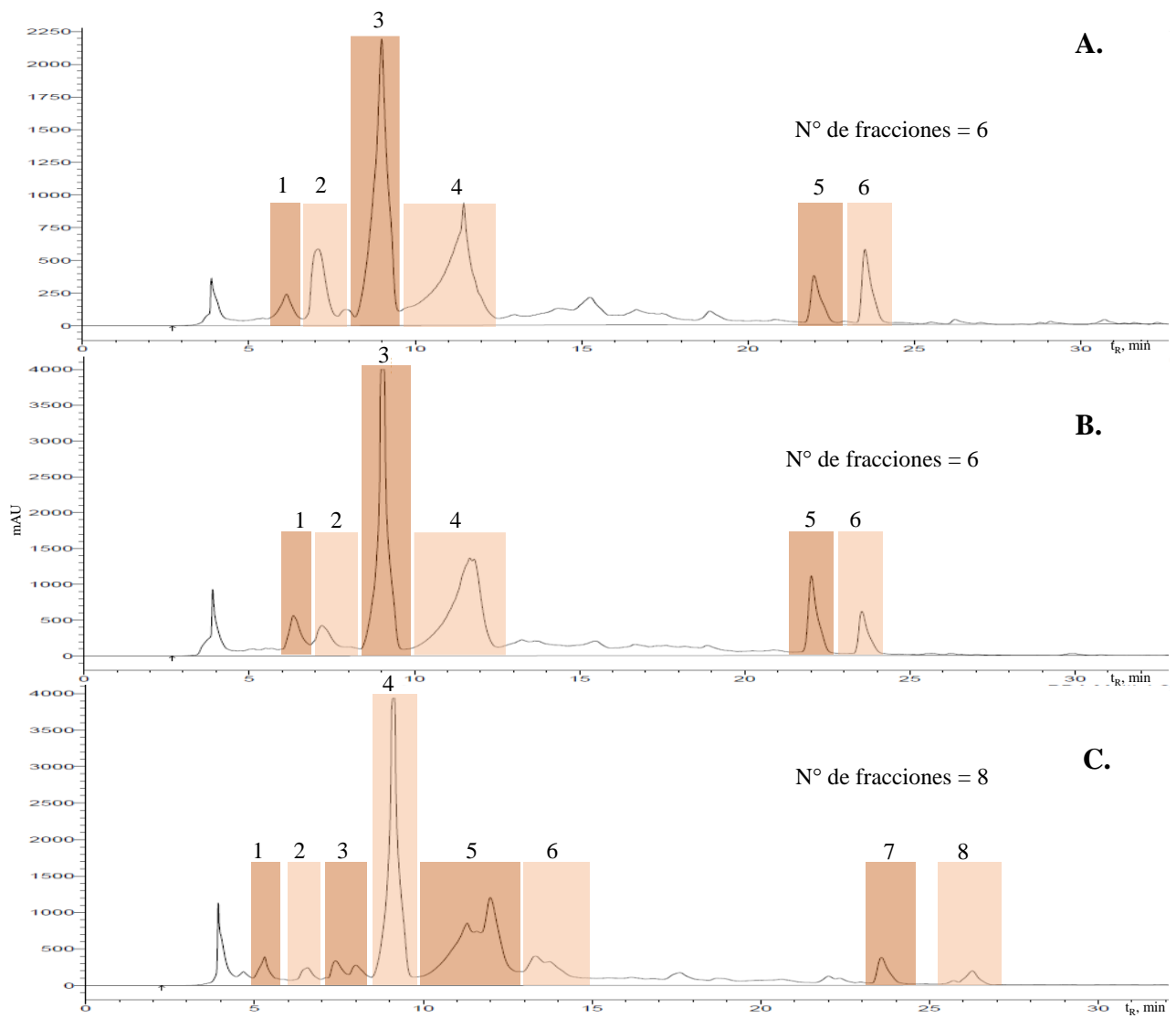


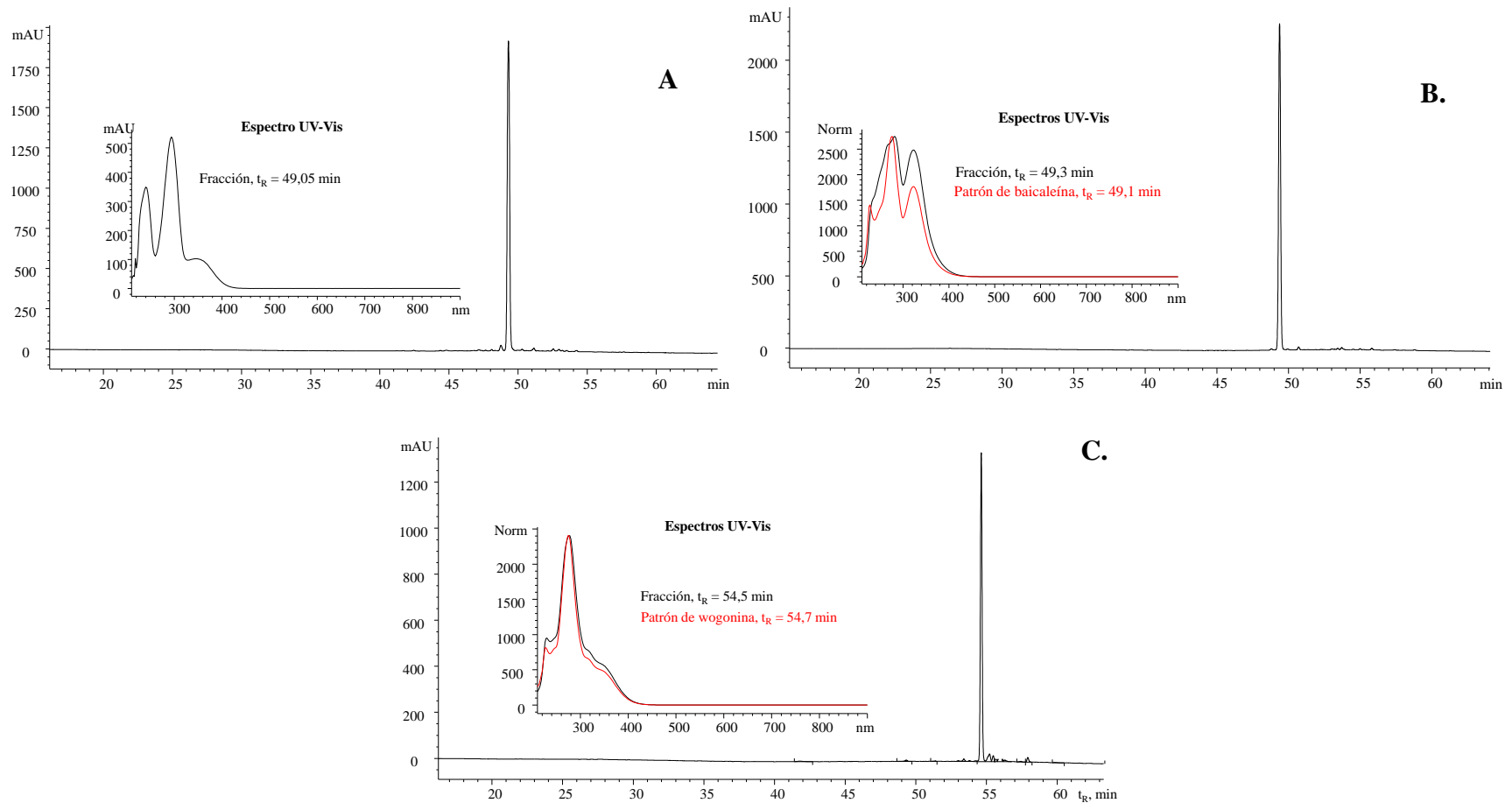
Tabla 14.

Composición química por HPLC/DAD a λ=290 nm de las fracciones de los extractos de Scutellaria spp.

N° frac ció n	<i>S. incarnata</i>			<i>S. coccinea</i>			<i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i>		
	t _R , min	Rendimiento de fracción, % (n=4)	Compuesto	t _R , min	Rendimiento de fracción, % (n=4)	Compuesto	t _R , min	Rendimiento de fracción, % (n=4)	Compuesto
1	6.60- 7.50	1.5 ± 0.7	Isocartamidina- glucurónido + escutelarina	6.00- 6.90	2 ± 1	Isocartamidina- glucurónido + Escutelarina	7.20- 8.50	1.5 ± 0.2	Norwogonina-glucurónido + escutelarina + apigenina-C- glucósido-C-arabinósido
2	7.57- 8.56	2.6 ± 0.9	Escutelarina + apigenina-C- glucósido-C- arabinósido	7.02- 8.30	3 ± 1	Escutelarina + apigenina-C- glucósido-C- arabinósido + isoliquiritina	8.60- 9.80	6 ± 1	Dihidrobaicaleína-glucurónido + baicalina + norwogonina- glucurónido + apigenina-7- glucurónido
3	9.00- 10.0	8 ± 1	Dihidrobaicaleína -glucurónido + baicalina	8.40- 9.60	7.3 ± 0.6	Dihidrobaicaleín a-glucurónido + baicalina	10.0- 12.9	9.1 ± 0.5	Verbascósido + umbeliferona- hexósido-pentósido + dihidrobaicaleína-glucurónido + baicalina + norwogonina- glucurónido + escutelareína
4	11.0- 14.0	9 ± 1	Verbascósido + umbeliferona- hexósido- pentósido + dihidrobaicaleína- glucurónido + baicalina	10.0- 13.0	13 ± 2	Verbascósido + Umbeliferona- hexósido- pentósido + dihidrobaicaleín a-glucurónido + baicalina	13.0- 15.0	2.9 ± 0.9	Wogonosida + umbeliferona- hexósido-pentósido + isómero uno umbelifeorna + escutelareína
5	22.3- 23.5	2.5 ± 0.1	Dihidrobaicaleina	21.7- 23.0	2.1 ± 0.6	Dihidrobaicalein a	17.4- 18.7	1.0 ± 0.1	Wogonosida + umbeliferona- hexósido-pentósido + isómero dos umbelifeorna + escutelareína
6	23.8- 25.0	1.0 ± 0.5	Baicaleína	23.3- 25.0	1.2 ± 0.4	Baicaleína	21.8- 23.1	0.4 ± 0.3	Dihidrobaicaleína + norwogonina
7		-			-		23.5- 24.6	0.7 ± 0.5	Baicaleína
8		-			-		25.4- 28.0	1.1 ± 0.6	Wogonina

Figura 27.

Perfiles cromatográficos y espectros UV-Vis obtenidos por HPLC/DAD ($\lambda=290$ nm) de la A. Fracción cinco del extracto de S. incarnata; B. Fracción seis del extracto de S. incarnata y C. Fracción ocho del extracto de S. ventenatii x S. incarnata.



Baicalina y dihidrobaicaleína-glucurónico, compuestos mayoritarios en los extractos de las tres especies de *Scutellaria* spp., no se separaron por prep-HPLC, debido, posiblemente, a sus estructuras químicas similares, pero sí se detectaron por HPLC/DAD en la misma fracción. En la **Figura 28** se muestran el cromatograma y los espectros UV-Vis de las dos señales encontradas de la fracción tres del extracto de *S. incarnata*. En las fracciones tres y dos de *S. coccinea* y *S. ventenatii* x *S. incarnata*, también, se observaron dos picos cromatográficos correspondientes a baicalina y dihidrobaicaleína-glucurónico (**Figuras 29 y 30**).

Figura 28.

Perfil cromatográfico y espectros UV-Vis, obtenidos por HPLC/DAD ($\lambda=290$ nm), de la fracción tres del extracto de *S. incarnata*.

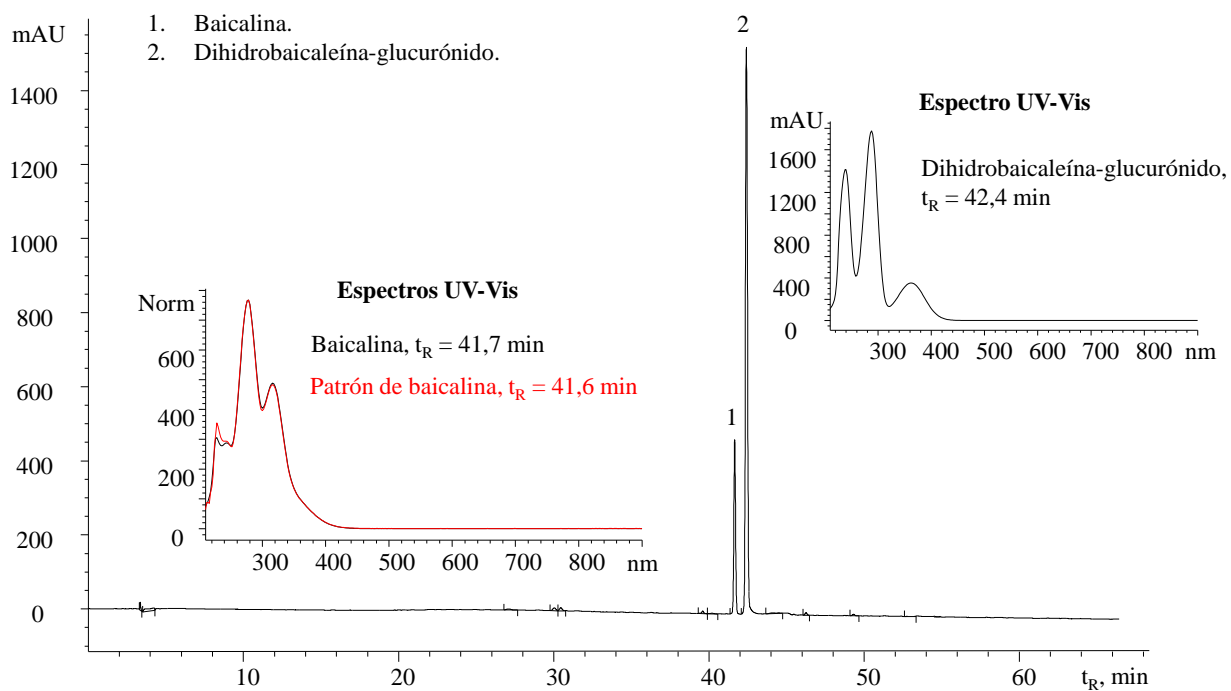


Figura 29.

Perfil cromatográfico y espectros UV-Vis, obtenidos por HPLC/DAD ($\lambda=290$ nm), de la fracción tres del extracto de *S. coccinea*.

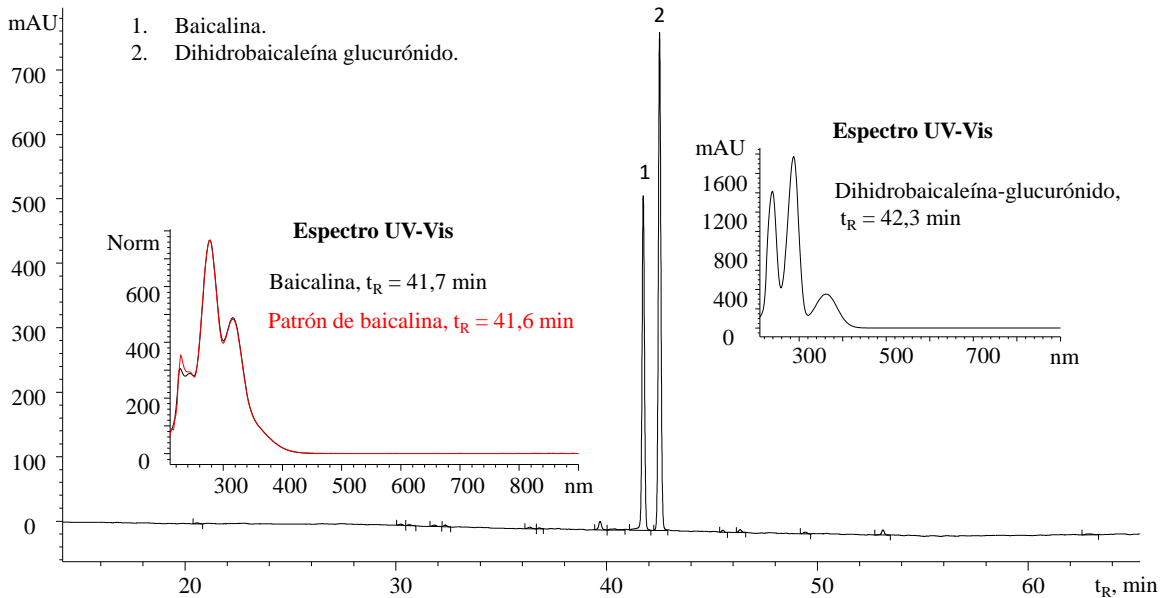
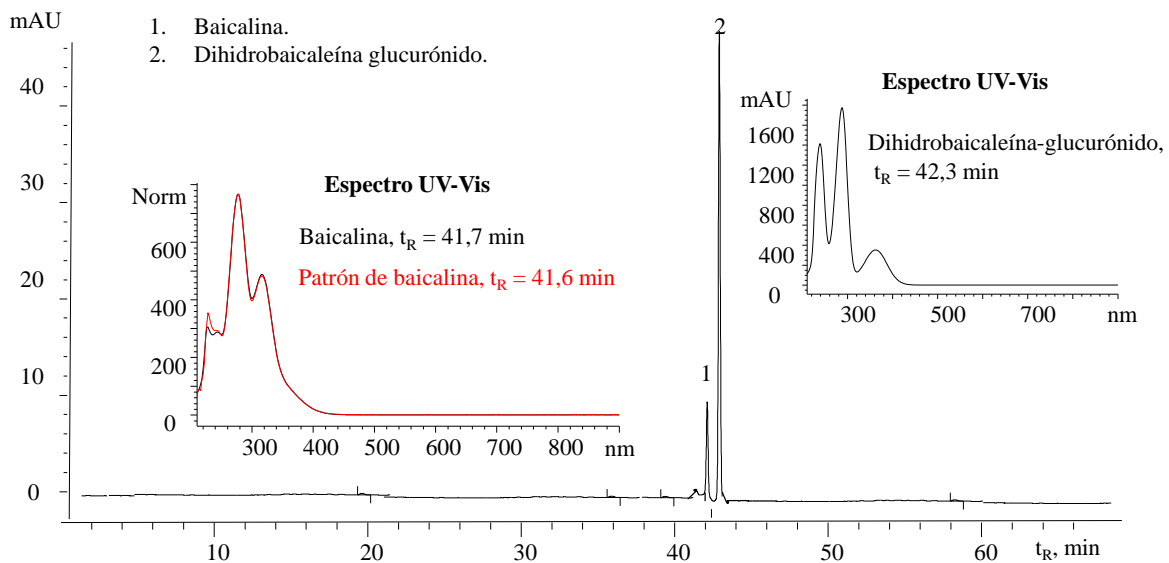


Figura 30.

Perfil cromatográfico y espectros UV-Vis, obtenidos por HPLC/DAD ($\lambda=290$ nm), de la fracción dos del extracto de *S. ventenatii* x *S. incarnata*.



El análisis por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de todas las fracciones de los extractos de *Scutellaria* spp. se realizó, bajo condiciones descritas en las **Secciones 3.4.2** y **3.4.4**. En la **Figura 31** se muestran las corrientes iónicas extraídas de los iones $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$ en m/z 465.13580, m/z 563.14191, m/z 463.09691, m/z 449.10602, m/z 447.09056, m/z 623.19704, m/z 471.14954, m/z 461.17773, m/z 273.07617, m/z 271.05969, y m/z 287.05444, extraídos de las fracciones de los extractos de *Scutellaria* spp. La identificación de los compuestos y su cuantificación se encuentran en las **Tablas 15** a **17**.

Los compuestos detectados por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS en los extractos de *Scutellaria* spp., también se identificaron en las fracciones obtenidas para cada especie (**Sección 4.3.2**). En la composición química de algunas fracciones se registraron trazas de compuestos identificados en otras fracciones, por ejemplo, la dihidrobaicaleína-glucurónido y la baicalina se detectaron en la fracción tres y, también, en la fracción cuatro del extracto de *S. incarnata*.

En las fracciones cuatro y cinco de *S. ventenatii* x *S. incarnata*, se encontraron dos isómeros de umbeliferona-hexósido-pentósido, que no se hallaron durante el análisis de los extractos (**Figuras 32** y **33**). El estudio de los patrones de su fragmentación mostró los iones-producto de la misma composición con intensidades diferentes en sus espectros de masas, lo que puede estar relacionado con la posición del grupo hidroxilo en la aglicona (umbeliferona). Wang *et al.* (B. Wang *et al.*, 2015), reportaron que los isómeros angelol A e isoangelol (derivados de cumarinas), presentaban espectros de masas idénticos pero algunos iones-producto en el espectro de masas de angelol tenían las abundancias mayores. Esto se debe a que su grupo hidroxilo se encontraba en el carbono nueve, mientras que, en el isoangelol, en el carbono diez, lo que hace poco probable la formación de algunos iones-producto, debido al impedimento estérico.

Figura 31.

Corrientes iónicas extraídas (EIC) de moléculas protonadas $[M+H]^+$, obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS en modo full scan, de sustancias presentes en las fracciones de los extractos de: **A.** *S. incarnata* (seis fracciones); **B.** *S. coccinea* (seis fracciones) y **C.** *S. ventenatii* x *S. incarnata* (ocho fracciones). La identificación de los picos aparece en las **Tablas 16 a 18**.

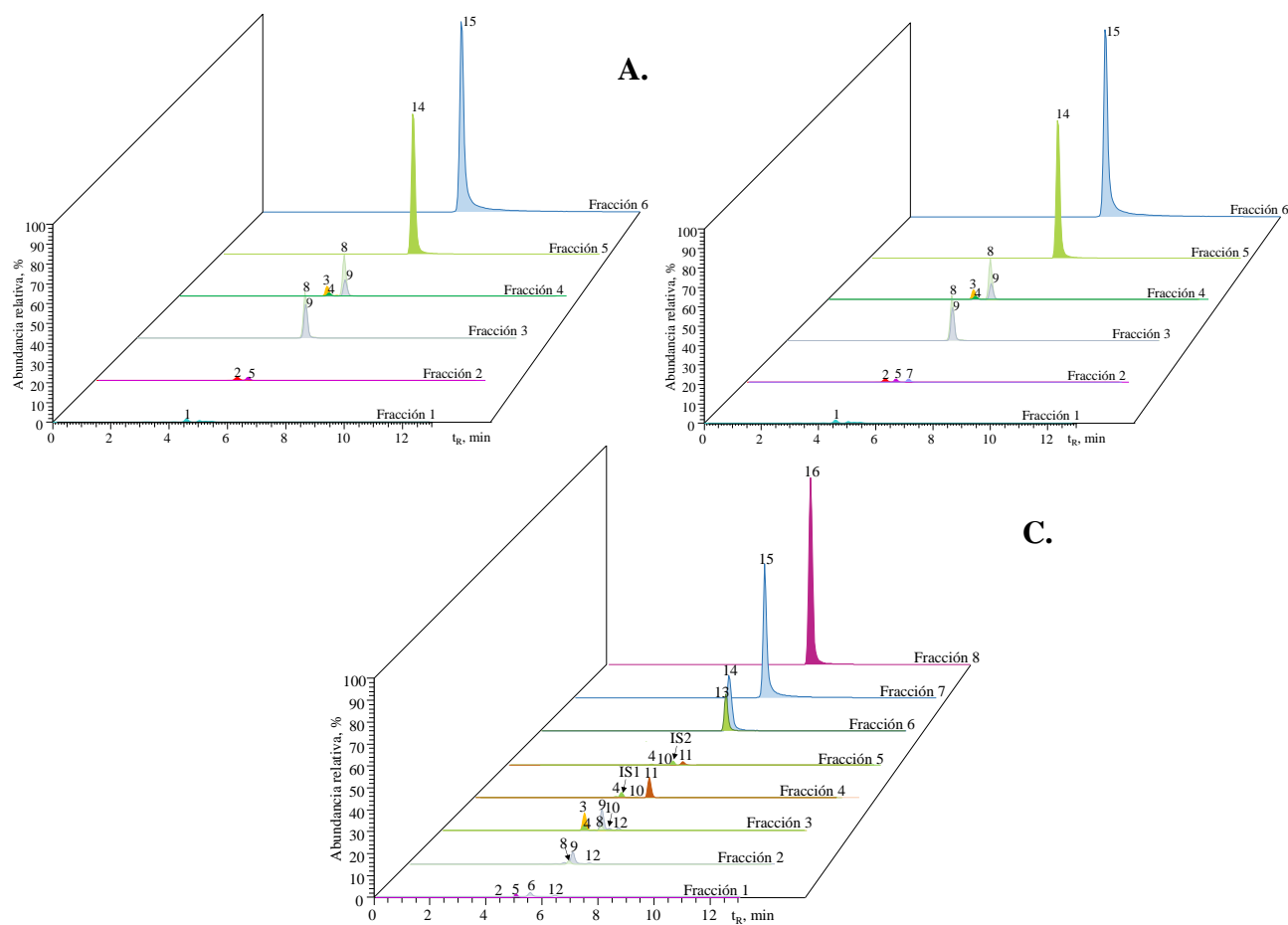


Figura 32.

*Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS del isómero de la umbeliferona-hexósido-pentósido con $t_R = 5.29$ min. Véase ion $[M+H]^+$ en m/z 471.14954, a 10 eV (HCD), correspondiente a este compuesto detectado en la fracción cuatro del extracto hidroalcohólico de *S. ventenatii* x *S. incarnata*.*

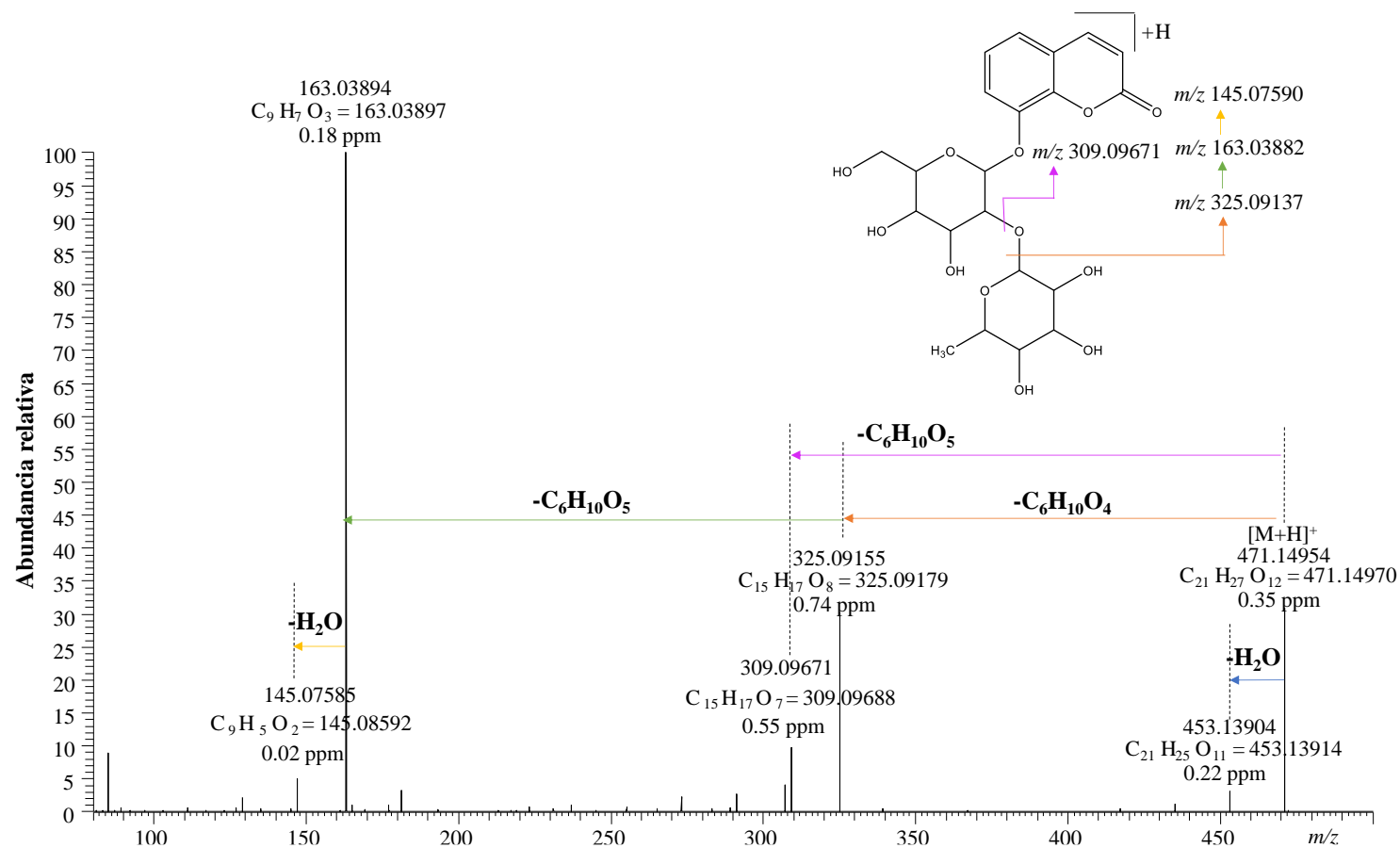


Figura 33.

Espectro de masas obtenido por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS del isómero de umbeliferona-hexósido-pentósido con $t_R = 6.13$ min. Véase ion $[M+H]^+$ en m/z 471.14954, a 10 eV (HCD), correspondiente a este compuesto detectado en la fracción cinco del extracto hidroalcohólico de *S. ventenatii* x *S. incarnata*.

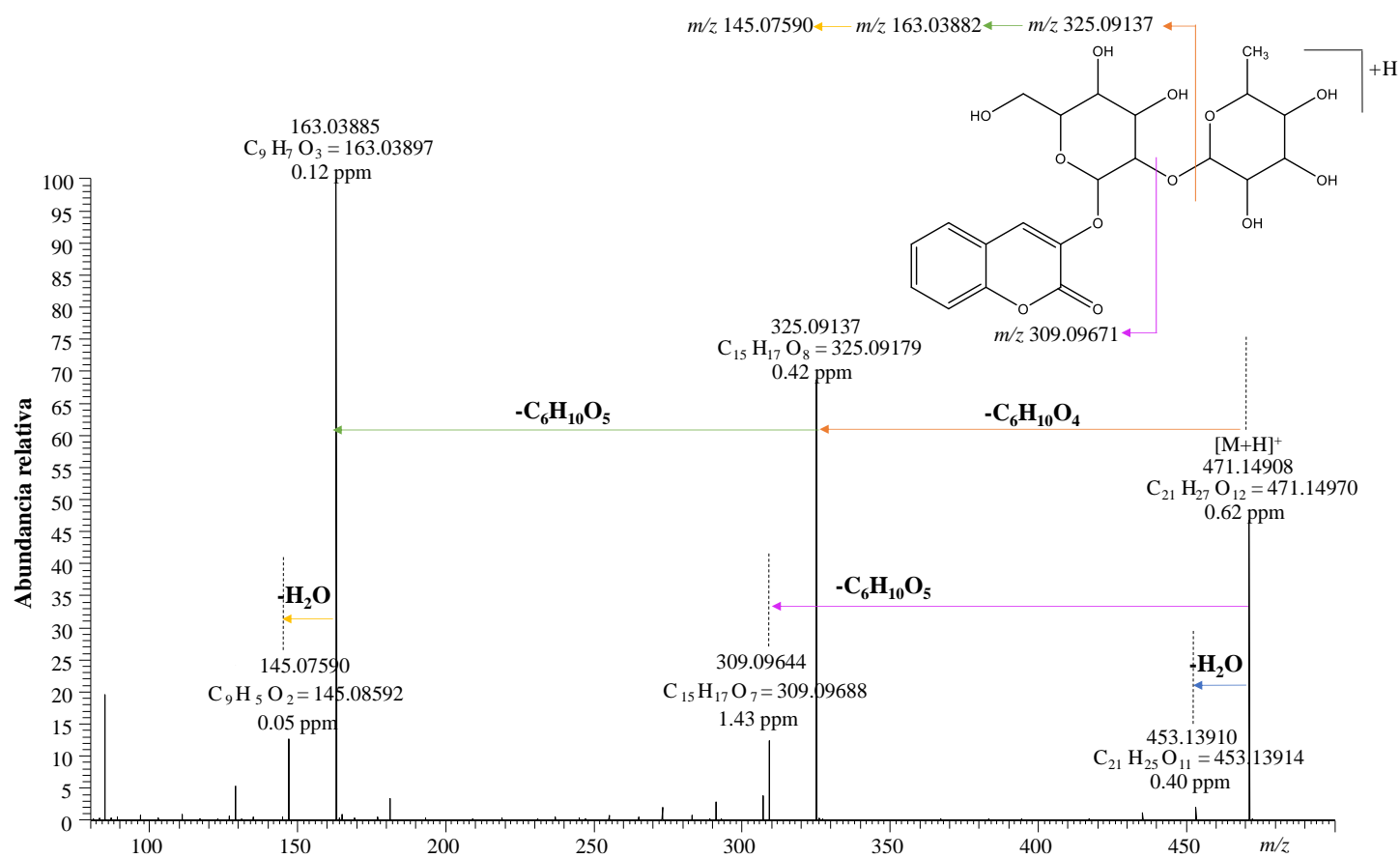


Tabla 15.

Masas exactas de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$, obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, de los compuestos presentes en las fracciones aisladas del extracto hidroalcohólico de *S. incarnata*.

N° pico Fig. 31,A	N° fracción	Compuesto	Fórmula	Masas experimentales, m/z (I, %)	Δ ppm	HCD, eV	mg compuesto/g fracción seca, valor \pm s (n=3)	mg compuesto/g fracción seca total, valor	Fracción total recogida, mg
1	1	Isocartamidina-glucurónido ^{a,b}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	$[M+H]^+$ 465.13580 (2 %)	0.45	20	2.999 \pm 0.007	2.99	20.10
2	2	Apigenina-C-glucósido-C-arabinósido (<i>Schaftosido</i>) ^{a,b}	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	$[M-H]^-$ 563.14191 (75 %)	1.13	30	0.76 \pm 0.01	0.78	24.30
5		Escutelarina ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	$[M+H]^+$ 463.09691 (40 %)	0.42	10	0.02 \pm 0.04		
8	3	Dihidrobaicaleina-glucurónido ^{a,b}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	$[M+H]^+$ 449.10602 (3 %)	0.44	10	9.06 \pm 0.02	89.28	119.0
9		Baicalina ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	$[M+H]^+$ 447.09056 (5 %)	0.33	20	80 \pm 1		
3	4	Verbascósido ^{a,b}	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	$[M-H]^-$ 623.19704 (7 %)	1.13	30	46.55 \pm 0.01	108.25	146.90
4		Umbeliferona-hexósido-pentósido ^a	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₂	$[M+H]^+$ 471.14954 (20 %)	1.00	10	0.15 \pm 0.03		
8		Dihidrobaicaleina-glucurónido ^{a,b}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	$[M+H]^+$ 449.10602 (3 %)	0.44	10	33.23 \pm 0.05		
9		Baicalina ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	$[M+H]^+$ 447.09056 (5 %)	0.33	20	28.31 \pm 0.02		
14	5	Dihidrobaicaleina ^{a,b}	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	$[M+H]^+$ 273.07617 (28 %)	0.41	40	5.21 \pm 0.03	5.21	22.00
15	6	Baicaleína ^{a,b,c}	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	$[M+H]^+$ 271.05969 (100 %)	0.41	60	2.30 \pm 0.01	2.30	7.10

^a Identificación tentativa basada en la medición de masas exactas y relaciones isotópicas del átomo de C.

^b Identificación tentativa basada en la información de la literatura científica sobre metabolitos secundarios de plantas de *Scutellaria* spp. (J. Han *et al.*, 2007a; He *et al.*, 2016; Lefebvre *et al.*, 2021; G. Liu *et al.*, 2009, 2011; Seo *et al.*, 2013; Zengin *et al.*, 2019).

^c Identificación confirmatoria basada en la comparación de t_R y espectros de masas con los de las sustancias-patrón.

HCD *Higher-Energy Collision Dissociation Cell*, por sus siglas en inglés.

Tabla 16.

Masas exactas de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$, obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, de los compuestos presentes en las fracciones aisladas del extracto hidroalcohólico de *S. coccinea*.

N° pico Fig. 31,B	N° fracción	Compuesto	Fórmula	Masas experimentales, m/z (I, %)	Δ ppm	HCD, eV	mg compuesto/g fracción seca, valor \pm s (n=3)	mg compuesto/g fracción seca total, valor	Fracción total recogida, mg
1	1	Isocartamidina-glucurónido ^{a,b}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	$[M+H]^+$ 465.13580 (2 %)	0.45	20	3.66 \pm 0.01	3.66	15.10
2		Apigenina-C-glucósido-C-arabinósido (<i>Schaftosido</i>) ^{a,b}	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	$[M-H]^-$ 563.14191 (75 %)	1.13	30	0.16 \pm 0.02		
5	2	Escutelarina ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	$[M+H]^+$ 463.09691 (40 %)	0.42	10	0.54 \pm 0.03	0.84	16.60
7		Isoliquiritina ^a	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	$[M+H]^+$ 419.13366 (22 %)	1.07	10	0.13 \pm 0.01		
8	3	Dihidrobaicaleína-glucurónido ^{a,b}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	$[M+H]^+$ 449.10602 (3 %)	0.44	10	13.57 \pm 0.06	33.19	68.40
9		Baicalina ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	$[M+H]^+$ 447.09056 (5 %)	0.33	20	19.62 \pm 0.02		
3		Verbascósido ^{a,b}	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	$[M-H]^-$ 623.19704 (7 %)	1.13	30	58.65 \pm 0.03		
4	4	Umbeliferona-hexósido-pentósido ^a	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₂	$[M+H]^+$ 471.14954 (20 %)	1.00	10	0.18 \pm 0.01	109.85	109.80
8		Dihidrobaicaleína-glucurónido ^{a,b}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	$[M+H]^+$ 449.10602 (3 %)	0.44	10	19.54 \pm 0.01		
9		Baicalina ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	$[M+H]^+$ 447.09056 (5 %)	0.33	20	29.51 \pm 0.02		
14	5	Dihidrobaicaleína ^{a,b}	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	$[M+H]^+$ 273.07617 (28 %)	0.41	40	3.45 \pm 0.02	3.45	14.50
15	6	Baicaleína ^{a,b,c}	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	$[M+H]^+$ 271.05969 (100 %)	0.41	60	4.23 \pm 0.01	4.23	13.90

^a Identificación tentativa basada en la medición de masas exactas y relaciones isotópicas del átomo de C.

^b Identificación tentativa basada en la información de la literatura científica sobre metabolitos secundarios de plantas de *Scutellaria* spp. (J. Han *et al.*, 2007a; He *et al.*, 2016; Lefebvre *et al.*, 2021; G. Liu *et al.*, 2009, 2011; Seo *et al.*, 2013; Zengin *et al.*, 2019).

^c Identificación confirmatoria basada en la comparación de t_R y espectros de masas con los de las sustancias-patrón.

HCD *Higher-Energy Collision Dissociation Cell*, por sus siglas en inglés.

Tabla 17.

Masas exactas de moléculas protonadas $[M+H]^+$ y deprotonadas $[M-H]^-$, obtenidas por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS, de los compuestos presentes en las fracciones aisladas del extracto hidroalcohólico de *S. ventenatii* x *S. incarnata*.

N° pico Fig. 31,C	N° fracción	Compuesto	Fórmula	Masas experimentales, m/z (I, %)	Δ ppm	HCD, eV	mg compuesto/g fracción seca, valor \pm s (n=3)	mg compuesto/g fracción seca total, valor	Fracción total recogida, mg
2	1	Apigenina-C-glucósido-C-arabinósido (<i>Schaftosido</i>) ^{a,b}	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	[M-H] ⁻ 563.14191 (75 %)	1.13	30	0.16 \pm 0.02	5.00	13.30
5		Escutelarina ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	[M+H] ⁺ 463.09691 (40 %)	0.42	10	2.13 \pm 0.02		
12		Norwogonina-glucurónido ^{a,b}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺ 447.20953 (52 %)	0.24	20	0.43 \pm 0.02		
6		Apigenina-7-glucurónido ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺ 447.09056 (12 %)	0.54	20	1.24 \pm 0.01		
8	2	Dihidrobaicaleina-glucurónido ^{a,b}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺ 449.10602 (3 %)	0.44	10	9.51 \pm 0.02	28.70	59.40
9		Baicalina ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺ 447.09056 (5 %)	0.33	20	18.62 \pm 0.03		
12		Norwogonina-glucurónido ^{a,b}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺ 447.20953 (52 %)	0.24	20	0.58 \pm 0.04		
3	3	Verbascósido ^{a,b}	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M-H] ⁻ 623.19704 (7 %)	1.13	30	45.43 \pm 0.03	86.57	90.50
4		Umbeliferona-hexósido-pentósido ^a	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₂	[M+H] ⁺ 471.14954 (20 %)	1.00	10	0.22 \pm 0.02		
8		Dihidrobaicaleina-glucurónido ^{a,b}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺ 449.10602 (3 %)	0.44	10	3.48 \pm 0.06		
9		Baicalina ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺ 447.09056 (5 %)	0.33	20	29.80 \pm 0.04		
12		Norwogonina-glucurónido ^{a,b}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺ 447.20953 (52 %)	0.24	20	5.951 \pm 0.008		
10		Escutelareina ^{a,b,c}	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺ 287.05444 (100 %)	0.57	60	1.68 \pm 0.03		

Tabla 17.

Continuación.

N° pico Fig. 31,C	N° fracción	Compuesto	Fórmula	Masas experimentales, m/z (I, %)	Δ ppm	HCD, eV	mg compuesto/g fracción seca, valor ± s (n=3)	mg compuesto/g fracción seca total, valor	Fracción total recogida, mg
4	4	Umbeliferona-hexósido- pentósido ^a	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₂	[M+H] ⁺ 471.14954 (20 %)	1.00	10	0.01 ± 0.02	3.16	21.20
11		Wogonosida ^{a,b,c}	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺ 461.17773 (61 %)	0.47	20	3.148 ± 0.05		
IS1		Isómero uno umbeliferona	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₂	[M+H] ⁺ 471.14954 (30 %)	0.35	10	0.33 ± 0.02		
10		Escutelareína ^{a,b,c}	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺ 287.05444 (100 %)	0.57	60	0.01 ± 0.02		
4	5	Umbeliferona-hexósido- pentósido ^a	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₂	[M+H] ⁺ 471.14954 (20 %)	1.00	10	0.01 ± 0.02	0.24	8.30
11		Wogonosida ^{a,b,c}	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺ 461.17773 (61 %)	0.47	20	0.24 ± 0.03		
IS2		Isómero dos umbeliferona	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₂	[M+H] ⁺ 471.14954 (45 %)	0.62	10	0.23 ± 0.02		
10		Escutelareína ^{a,b,c}	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺ 287.05444 (100 %)	0.57	60	0.01 ± 0.06		
13	6	Dihidrobaicaleína ^{a,b,c}	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	[M+H] ⁺ 625.21269 (1 %)	1.13	30	0.087 ± 0.007	0.42	6.80
14		Norwogonina ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₂₇ O ₁₂	[M+H] ⁺ 471.14954 (20 %)	1.00	10	0.34 ± 0.01		
15	7	Baicaleína ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M+H] ⁺ 449.10602 (3 %)	0.44	10	3.1 ± 0.8	3.10	8.00
16	8	Wogonina ^{a,b,c}	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	[M+H] ⁺ 447.09056 (5 %)	0.33	20	3.2 ± 0.8	3.18	7.70

^a Identificación tentativa basada en la medición de masas exactas y relaciones isotópicas del átomo de C.

^b Identificación tentativa basada en la información de la literatura científica de metabolitos secundarios de plantas de *Scutellaria* spp. (J. Han *et al.*, 2007a; He *et al.*, 2016; Lefebvre *et al.*, 2021; G. Liu *et al.*, 2009, 2011; Seo *et al.*, 2013; Zengin *et al.*, 2019).

^c Identificación confirmatoria basada en la comparación de t_R y espectros de masas con los de sustancias de referencia.

HCD *Higher-Energy Collision Dissociation Cell*, por sus siglas en inglés.

IS: Isómero.

La “aparición” de estos dos compuestos, puede deberse a las diferencias cromatográficas empleadas en cada técnica (**Tabla 18**), ya que la solubilidad de la umbeliferona en metanol es mayor en comparación con acetonitrilo o éter de petróleo (K Trideva Sastri, 2019). Es importante tener en cuenta que, en prep-HPLC, las fracciones se analizan a concentraciones de 40 mg/L, mucho más altas que las utilizadas para HPLC/DAD (10 mg/L).

Tabla 18.

Parámetros cromatográficos empleados para la separación de los compuestos presentes en los extractos y fracciones de Scutellaria spp.

Parámetros	Técnica analítica	
	HPLC/DAD ¹	Prep-HPLC ²
Fase móvil	Acetonitrilo-Agua	Metanol-Agua
Flujo, mL/min	1	15
Tiempo de análisis, min	90	30
Concentración de la muestra, mg/L	10	40

¹ Técnica empleada para el análisis de los extractos.

² Técnica empleada para obtener las fracciones.

En las **Tablas 15 a 17** se muestran los pesos de cada fracción obtenida de los extractos de *Scutellaria* spp. y las cantidades de cada componente identificado en cada fracción.

En las fracciones tres y cuatro de *S. incarnata*, la sumatoria de las cantidades de cada compuesto detectado (89.28 mg/g) corresponde al 75 % del peso total de la fracción (119.0 mg). En las fracciones cuatro de *S. coccinea* y tres de *S. ventenatii* x *S. incarnata*, la sumatoria de las cantidades de cada compuesto detectado representa el 100 % y el 96 % del peso total de cada fracción. Este resultado no se evidenció para las otras fracciones de *Scutellaria* spp., ya que la sumatoria de la cantidad de cada componente fue menor que el peso de la fracción. Tal vez en las

fracciones de *Scutellaria* spp. están presentes algunos otros componentes como ácidos grasos, clorofilas, carotenoides, entre otros, que no se detectaron y cuantificaron bajo las condiciones experimentales cromatográficas usadas en esta investigación.

En la literatura no se encontraron muchos reportes sobre el fraccionamiento de extractos de *Scutellaria* spp., empleando prep-HPLC. Wang *et al.* (Y. Wang *et al.*, 2008) emplearon prep-HPLC para aislar, del extracto hidroetanólico de *S. barbata*, 12 compuestos fenólicos, entre ellos, figuran la escutelarina, apigenina y luteolina, entre algunos otros.

Liu *et al.* (G. Liu *et al.*, 2009) emplearon esta misma técnica para el extracto metanólico de raíces de *S. baicalensis*, y aislaron once compuestos, entre ellos, baicaleina, oroxilina A, skullcap flavona I y wogonina. Los autores utilizaron diclorometano antes del análisis por prep-HPLC para realizar una “limpieza” previa al extracto. También fraccionaron del extracto obtenido de partes aéreas de *S. baicalensis*, y aislaron dos isómeros de flavanona-7-glucurónido y dos isómeros de isocartamidina-7-glucurónido (G. Liu *et al.*, 2011).

4.4 Estudio de la capacidad antioxidante de extractos y fracciones de *Scutellaria* spp.

La actividad antioxidante, medida por una sola técnica, refleja la respuesta de la muestra al mecanismo de acción utilizado para este ensayo, por ello, es importante evaluar la actividad antioxidante de una muestra en ensayos con distintos mecanismos de acción, por ejemplo, en ORAC y β -caroteno ocurren donaciones de átomos de hidrógeno, mientras que en ABTS⁺, de electrones (D. Huang *et al.*, 2005).

En la **Tabla 19** se muestran los valores de la capacidad antioxidante, obtenidos por los ensayos ORAC, ABTS⁺, *on-line* HPLC-ABTS⁺ y β -caroteno, de los extractos bajo estudio, sustancias-patrón, y el compuesto-control, la quercetina.

Tabla 19.

Actividad antioxidante in vitro de sustancias-patrón y de extractos de Scutellaria spp., estudiados en este trabajo.

Extractos / Patrones	Ensayos de actividad antioxidante			
	ORAC, $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g extracto} \pm \text{s}, (n=3)$	ABTS ⁺ , $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g extracto} \pm \text{s}, (n=3)$	<i>On-line</i> HPLC-ABTS ⁺ , $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g extracto} \pm \text{s}, (n=2)^*$	β -Caroteno, $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g extracto} \pm \text{s}, (n=3)$
<i>S. coccinea</i>	3830 \pm 3	750 \pm 1	931 \pm 3	74.3 \pm 0.8
<i>S. incarnata</i>	2510 \pm 2	680 \pm 1	844 \pm 2	70 \pm 1
<i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i>	2900 \pm 2	420 \pm 1	503 \pm 2	34 \pm 1
Baicaleína	7150 \pm 1	11920.3 \pm 0.3	11560 \pm 1	N.D.
Baicalina	4736.0 \pm 0.9	2570 \pm 1	3522.12 \pm 0.06	N.D.
Escutelareína	22830 \pm 1	11090 \pm 1	12124.9 \pm 0.3	N.D.
Escutelarina	12004.9 \pm 0.8	1744.5 \pm 0.7	640 \pm 1	N.D.
Wogonina	9060 \pm 1	5503.4 \pm 0.5	90 \pm 3	N.D.
Wogonosida	3710 \pm 1	1120 \pm 2	N.D.	N.D.
Apigenina	29420 \pm 3	4100 \pm 1	N.D.	N.D.
Apigenina-glucurónido	10670 \pm 3	520 \pm 1	N.D.	N.D.
Norwogonina	6100 \pm 3	6323.4 \pm 0.6	N.D.	N.D.
Quercetina	25691.2 \pm 0.6	11100 \pm 1	9228.3 \pm 0.4	100 \pm 1
Quercetina [91, 130]	35550 \pm 1	10000 \pm 1	13900 \pm 99	-

* Suma total de $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g extracto}$ que cada compuesto en el extracto contribuyó a la actividad antioxidante total de la muestra.

N.D. Actividad antioxidante no evaluada para estos compuestos.

El extracto de *S. coccinea* presentó los valores de actividad antioxidante más altos.

En el método ORAC, el valor de $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g extracto}$ del extracto de *S. coccinea* fue más alto que el del extracto de *S. incarnata*, a pesar de que este último tiene las cantidades más

altas de baicalina y dihidrobaicaleína-glucurónido (**Tabla 13**), por tanto, es posible que otros compuestos como la isoliquiritina, detectada únicamente en *S. coccinea*, ejerza un efecto aditivo con los demás flavonoides identificados en la muestra, y aumente la actividad antioxidante. En la literatura (Sun *et al.*, 2010; X. H. Zhang *et al.*, 2021) se ha reportado la actividad antioxidante de la isoliquiritina y su acción como modulador de enzimas superóxido dismutasa y catalasa, relacionadas con el desarrollo de enfermedades como el cáncer y la isquemia cerebral. Delerue *et al.* (Delerue *et al.*, 2021) y Olszowy-Tomczyk (Olszowy-Tomczyk, 2020) encontraron resultados similares para los extractos de *S. baicalensis*.

La actividad antioxidante de la quercetina fue más alta que la de los extractos de *Scutellaria* spp., pero comparable con las de las sustancias-patrón de apigenina y escutelareína. Algunos compuestos presentes en los extractos de *Scutellaria* spp. pueden tener tanto efectos aditivos como antagonicos sobre la respuesta antioxidante.

En el método ORAC, Freeman *et al.* (Freeman *et al.*, 2010) determinaron la actividad antioxidante de sustancias-patrón de la mezcla miricetina:naringenina para concluir que la combinación de flavonoides que poseen catecol en su estructura química con los que no la tienen, suelen tener actividad antioxidante más baja, en comparación con la combinación de sustancias que tienen el grupo catecol, como es el caso de la mezcla miricetina:quercetina, que tiene la respuesta antioxidante similar a la de sus compuestos individuales.

Según el análisis por *on-line* HPLC-ABTS⁺, la baicalina y dihidrobaicaleína-glucurónido contribuyeron principalmente a la actividad antioxidante total de los extractos de *Scutellaria* spp. Hasta la fecha, el único reporte de actividad antioxidante medida por *on-line* HPLC-ABTS⁺ de extractos de *Scutellaria* spp. lo realizaron Lee *et al.* (Lee *et al.*, 2014); los autores determinaron

que baicalina y baicaleina fueron los mayores contribuyentes a la actividad antioxidante del extracto de *S. baicalensis*.

En el ensayo de decoloración del β -caroteno se determinaron los valores de actividad antioxidante de los extractos de *Scutellaria* spp. hasta 50 veces (34 – 74 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g extracto) menores que los obtenidos usando el método ORAC (2510 – 2830 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g extracto). Ambos métodos emplean el mismo mecanismo de donación de átomos de hidrógeno (HAT). Miraliakbari *et al.* (Miraliakbari & Shahidi, 2008) reportaron que el método de decoloración del β -caroteno, funciona mejor con antioxidantes hidrofóbicos debido a su mejor solubilización en la fase lipídica. Teniendo en cuenta que los flavonoides (moléculas de interés) tienen características hidrofílicas, su afinidad en este sistema, principalmente lipofílico, será menor, por lo que su interacción con los radicales peroxilo es poco eficiente, lo cual explicaría los valores más bajos de actividad antioxidante, cuando se usa este método. Finotti y Di Majo (Finotti & Di Majo, 2003) lograron demostrar que, bajo ambientes hidrofóbicos, algunas flavanonas podrían, incluso, actuar como pro-oxidantes. Sin embargo, hasta la fecha no se han encontrado estudios sobre la capacidad antioxidante de plantas del género *Scutellaria* spp., medida por el ensayo del β -caroteno.

Figura 34.

Perfiles cromatográficos obtenidos por la técnica on-line HPLC-ABTS^{•+} de los extractos de **A.** *S. incarnata*; **B.** *S. coccinea* y **C.** *S. ventenatii* x *S. incarnata*, antes (DAD, $\lambda=290$ nm, línea azul) y después (MWD, $\lambda=734$ nm, línea roja) de su reacción con el catión-radical ABTS^{•+}. Véase la identificación de los picos en la **Tabla 20**.

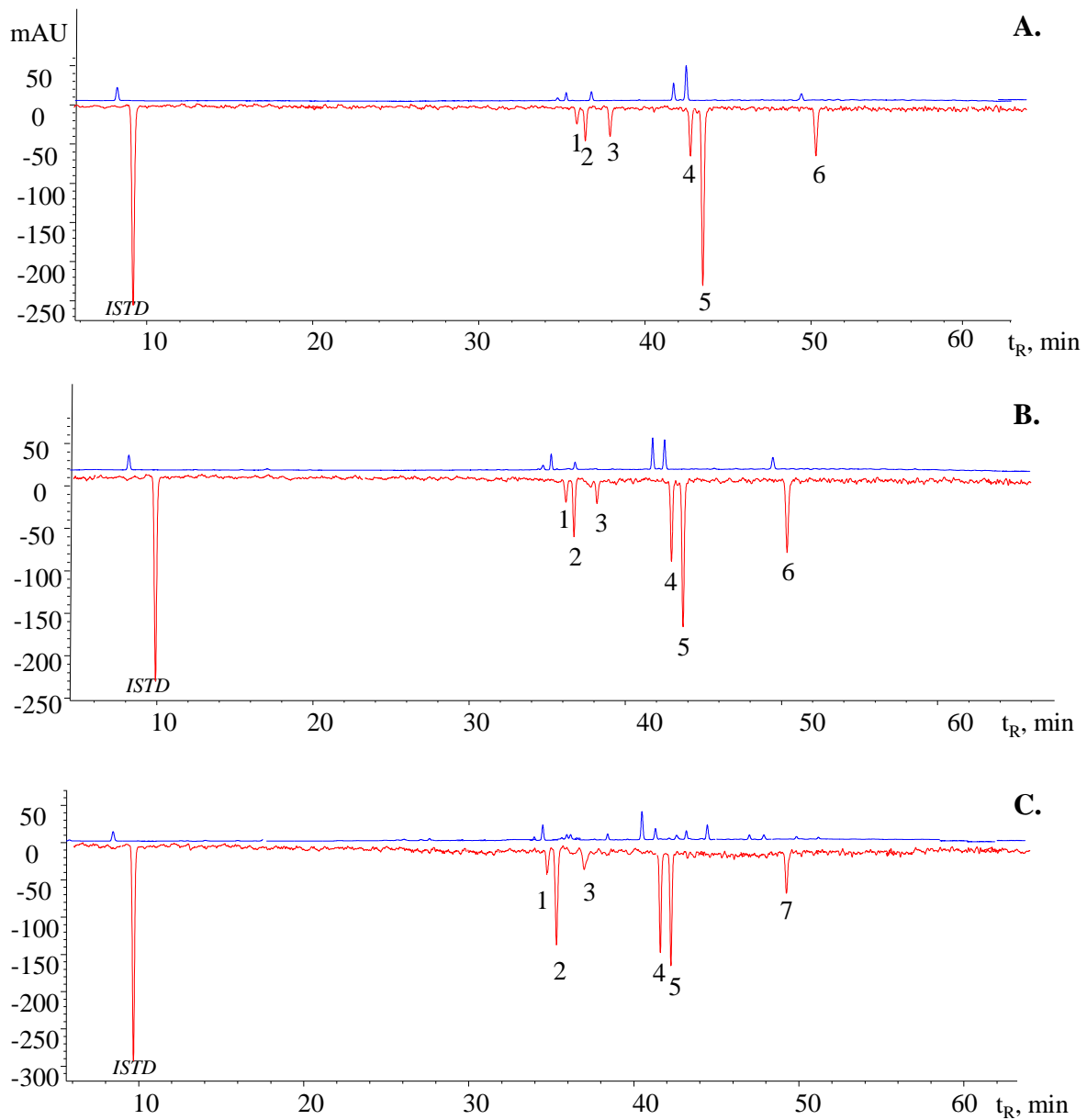


Tabla 20.

Actividad antioxidante in vitro de los compuestos presentes en los extractos de Scutellaria spp., medida por on-line HPLC-ABTS⁺.

N° pico Fig. 34 A- C	Compuestos	Absorbancia, nm	<i>S. incarnata</i>		<i>S. coccinea</i>		<i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i>		Refs.
			µmol Trolox®/g extracto ¹	Antioxi- -dante, %	µmol Trolox®/g extracto ¹	Antioxi- -dante, %	µmol Trolox®/g extracto ¹	Antioxi- -dante, %	
1	Isocartamidina-glucurónico	290 ^{max} , 340 ^h , 225	16.8 ± 0.9	2 %	19.1 ± 0.6	2 %	11.36 ± 0.09	2 %	(He <i>et al.</i> , 2016)
2	Verbascósido	330 ^{max} , 295, 230	65 ± 1	8 %	102.7 ± 0.6	11 %	119 ± 1	24 %	(Cardinali <i>et al.</i> , 2011)
3	Escutelarina	345 ^{max} , 290, 225	52 ± 2	6 %	48 ± 1	5 %	21.7 ± 0.3	4 %	(Hu <i>et al.</i> , 2008)
4	Baicalina	280 ^{max} , 320 ^h , 225	110 ± 1	13 %	189.1 ± 0.2	20 %	137 ± 2	27 %	(R. A. N. Liang <i>et al.</i> , 2009)
5	Dihidrobaicaleína-glucurónico	280 ^{max} , 242, 363	497 ± 1	59 %	382 ± 1	41 %	163 ± 3	32 %	(G. Liu <i>et al.</i> , 2009)
6	Dihidrobaicaleína y baicaleína	285 ^{max} , 360 ^h , 225 300 ^{max} , 340 ^h , 230	101.9 ± 0.4	12 %	189.6 ± 0.6	20 %	-	-	-
7	Baicaleína	300 ^{max} , 340 ^h , 230	-	-	-	-	51 ± 2	10 %	(Oh <i>et al.</i> , 2016)

¹ Valor promedio ± desviación estándar, n=2. ^{max} Máximo. ^h Hombro.

^a Identificación tentativa basada en espectro UV-Vis y por comparación con señales típicas λ (nm) para compuestos fenólicos.

^b Identificación tentativa basada en espectro UV-Vis y por comparación con espectro UV- Vis reportado en artículos científicos (He *et al.*, 2016, Cardinali *et al.*, 2011, Hu *et al.*, 2008, R. A. N. Liang *et al.*, 2009, G. Liu *et al.*, 2009, Oh *et al.*, 2016).

^c Identificación confirmatoria basada en espectro UV- Vis y por comparación con espectro UV- Vis y t_R de sustancias-patrón.

La actividad antioxidante de los compuestos depende de su estructura. El número y posición de grupos hidroxilo y glicósido contribuyen a la respuesta antioxidante relacionada con la donación de átomos de hidrógeno o de electrones, para formar intermediarios más estables (Riebel *et al.*, 2017).

Algunos estudios sobre estructura-actividad (SAR) de flavonoides, han demostrado que el potencial antioxidante aumenta con la presencia de: 1) grupos -OH en las posiciones 3' y 4' del anillo B; 2) grupos -OH en el anillo A y una función 4-oxo en el anillo C, y 3) un doble enlace en las posiciones ²C y ³C del anillo C (**Figura 9**) (Ferreira *et al.*, 2015).

En este estudio, se observó que la flavanona dihidrobaicaleina-glucurónido, molécula sin doble enlace en la posición ²C y ³C del anillo C, presentó el mayor porcentaje de inhibición del catión-radical ABTS^{•+}, medida por la técnica *on-line* HPLC-ABTS^{•+} (351 ± 4 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto en *S. incarnata*, 189 ± 4 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto en *S. coccinea* y 163 ± 3 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto en *S. ventenatii* x *S. incarnata*). Estos resultados coinciden con lo reportado por Mejía *et al.* (Mejía *et al.*, 2022), quienes encontraron que el compuesto que aportaba la mayor actividad antioxidante, en el extracto de *Lippia origanoides*, era el eriodictiol (flavanona).

La baicalina, a pesar de contar con un doble enlace en el anillo C (posición 2-3), y de ser el compuesto más abundante en los extractos, fue el segundo contribuyente a la actividad antioxidante (70 ± 2 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto en *S. incarnata*, 24 ± 4 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto en *S. coccinea* y 137 ± 2 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto en *S. ventenatii* x *S. incarnata*). Cotelle (Cotelle, 2005) ha atribuido esto a la ausencia de grupos -OH en el anillo B de la molécula, que pueden “debilitar” la acción del enlace doble en el anillo central. Sin embargo, Ishimoto *et al.* (Ishimoto *et al.*, 2012) han demostrado que el cumplimiento de las tres condiciones mencionadas no es el factor único que determina el potencial antioxidante de una molécula. A pesar de que un aumento

en el número de grupos hidroxilo en el anillo B de un flavonol se ha relacionado con un aumento en su capacidad antioxidante, medida por el método ORAC, el kaempferol (con un grupo hidroxilo en el anillo B) posee 1.5 veces más alta actividad antioxidante que la quercetina y la miricetina (con dos y tres grupos hidroxilo en sus respectivos anillos B). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en nuestro estudio.

La actividad antioxidante de las agliconas, medida por varios métodos, fue mayor que la de sus derivados glicosilados, esto también reportaron Xie *et al.* (Xie *et al.*, 2022) y Plumb *et al.* (Plumb *et al.*, 1999). Los derivados glicosilados de los flavonoides son más estables y solubles en solventes polares que las agliconas, a pesar de tener una actividad antioxidante más baja (Ji *et al.*, 2020), pero al ser ingeridos, pueden incrementar su actividad gracias al rompimiento del enlace *O*-glicosídico, mientras que las agliconas pueden degradarse, lo que reduce su actividad biológica (S. Liang *et al.*, 2020; Xiao, 2017).

En la literatura no se han encontrado reportes sobre la actividad antioxidante de dihidrobaicaleína-glucurónido, ni de su aglicona, pero sí, de la baicalina y baicaleína. Diversos estudios (Jian & Xun, 1997; Sarkar *et al.*, 2019; Tian *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2020) destacan el potencial de estas sustancias fenólicas para inhibir los ROS, tanto en experimentos *in vitro*, como *in vivo*, y lo relacionan con su efectividad como sustancias con propiedades antiinflamatorias (Paudel & Kim, 2020). Debido a que en los extractos estudiados se detectó una gran cantidad de compuestos glicosilados, éstos podrían aprovecharse como ingredientes naturales en productos fitoterapéuticos con propiedades antioxidantes.

En los extractos de *Scutellaria* spp., analizados por *on-line* HPLC-ABTS⁺, se evidenció que un aumento en la cantidad de dihidrobaicaleína-glucurónido incrementó la contribución a la actividad antioxidante total de extracto de *S. incarnata* (con 140.18 ± 0.07 mg/g extracto y

497 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g extracto), seguido de *S. coccinea* (con 51.20 ± 0.02 mg/g extracto y 382 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g extracto) y de *S. ventenatii* x *S. incarnata* (con 44.89 ± 0.06 mg/g extracto y 163 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g extracto) (**Tablas 13 y 20**). Esto indica que la respuesta antioxidante es dosis-dependiente, lo cual coincide con lo reportado por Seo *et al.* (Seo *et al.*, 2013) para los extractos metanólicos de *S. baicalensis*, analizados por *on-line* HPLC-ABTS⁺.

La actividad antioxidante de las fracciones de *Scutellaria* spp., se realizó únicamente mediante el ensayo ORAC, debido a que, en el mecanismo HAT, los radicales utilizados son peroxilo, que predominan en los alimentos y en sistemas biológicos (Prior *et al.*, 2005), por lo que este método se asemeja más a sistemas reales. En la **Tabla 21** se observan los valores de $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ de extractos y fracciones y sustancias-patrón de baicaleína y wogonina.

Tabla 21.

Actividad antioxidante in vitro medida por el ensayo ORAC, de sustancias-patrón y de fracciones de Scutellaria spp.

Fracción/ Extracto	ORAC, $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g compuesto		
	<i>S. incarnata</i>	<i>S. coccinea</i>	<i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i>
Extracto	2510 \pm 2	3830 \pm 3	2900 \pm 2
Fracción 1	5895 \pm 1	7572.2 \pm 0.5	7359.6 \pm 0.9
Fracción 2	7078 \pm 4	8841.1 \pm 0.9	2921 \pm 3
Fracción 3	5911 \pm 2	3154.8 \pm 0.7	9344.9 \pm 0.8
Fracción 4	2503 \pm 7	7575.1 \pm 0.9	6868 \pm 1
Fracción 5 (Dihidrobaleína)	4934 \pm 3	5134 \pm 2	6714 \pm 1
Fracción 6 (Baicaleína)	3775.2 \pm 0.9	4835 \pm 2	2802.2 \pm 0.5
Fracción 7 (Baicaleína)	-	-	2565 \pm 2

Tabla 21.

Continuación.

Fracción/ Extracto	ORAC, $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ /g compuesto					
	<i>S. incarnata</i>		<i>S. coccinea</i>		<i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i>	
Fracción 8 (Wogonina)	-		-		5060	\pm 4
Sustancia-patrón de baicaleína	7149	\pm 2	7149	\pm 2	7149	\pm 2
Sustancia-patrón de wogonina	9059	\pm 1	9059	\pm 1	9059	\pm 1

Los valores de $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ de las fracciones fueron similares o mayores que los de sus respectivos extractos, a pesar de que las cantidades de cada componente en la fracción fueron menores que las determinadas en los extractos de *Scutellaria* spp. Por tanto, se evidencia el potencial antioxidante que poseen las fracciones, y sería de interés realizar un estudio detallado de parámetros en el prep-HPLC con el fin de reducir pérdidas de muestra durante el fraccionamiento.

En la **Tabla 21**, se muestra que la actividad antioxidante de algunas fracciones, compuestas por varias sustancias (schaftósido, escutelarina e isoliquiritina en la fracción dos de *S. coccinea*), es mayor que aquellas que tienen solo un compuesto (baicaleína en la fracción seis de *S. coccinea*), lo que demuestra el efecto positivo que pueden ejercer ciertas moléculas, sobre una actividad antioxidante alta, cuando se encuentran en mezcla; como lo han reportado autores en la literatura (Hajimehdipoor *et al.*, 2014; Hidalgo *et al.*, 2010).

En las fracciones que se encontró solo baicaleína, dihidrobaicaleína (fracciones cinco y seis de *S. incarnata* y *S. coccinea*) o wogonina (fracción ocho de *S. ventenatii* x *S. incarnata*), se determinó que el valor de $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ fue menor que el de la misma sustancia fenólica comercial,

debido a que la fracción no contiene el mismo porcentaje de pureza que la sustancia-patrón (ca. 30 % en estas fracciones vs. 98 % en su respectiva sustancia-patrón).

Las fracciones de extractos de *Scutellaria* spp. con valores de actividad antioxidante altos, pueden ser buenos candidatos para su uso como ingredientes naturales en productos farmacéuticos y cosméticos. En el cultivo de *Scutellaria* spp. crecen aproximadamente 50000 plantas/ha que se pueden cosechar cuatro veces al año y obtener ca. 250 kg de material vegetal por año.

La cantidad anual de extracto seco de *Scutellaria* spp., considerando un porcentaje de humedad del material vegetal de ca. 80 %, será de 51.3 kg (rendimiento de 27 %), con cantidades altas de baicalina (ca. 4 kg/ha/año) y de dihidrobaicaleína-glucurónido (ca. 2 kg/ha/año). Estas sustancias se lograron aislar del extracto por prep-HPLC, y podrían ser de interés comercial en productos fitofarmacéuticos por su actividad biológica.

4.5 Actividades citotóxica y antiviral de extractos y fracciones de *Scutellaria* spp.

4.5.1 Actividad citotóxica

Los resultados de las actividades citotóxica y antiviral de extractos y fracciones de *Scutellaria* spp. fueron suministrados por la profesora Dra. Raquel OCAZIONEZ, directora del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales, CINTROP y hacen parte de la tesis doctoral de la bacterióloga M.Sc. Sindi Alejandra VELANDIA.

La citotoxicidad de extractos y fracciones de *Scutellaria* spp. se evaluó para determinar la concentración a la cual se podrían realizar los ensayos antivirales, usando como modelo de estudio las células epiteliales de riñón de mono (Vero ATCC®CCL-81™).

El efecto citotóxico de los extractos y fracciones de *Scutellaria* spp., sobre la viabilidad de células Vero (ATCC®CCL-81™), se evaluó mediante el ensayo de cristal violeta. En las **Figuras 35**

y **36** se presenta la disminución de la viabilidad celular con el aumento en la concentración de los extractos y fracciones de *Scutellaria* spp. bajo estudio. La citotoxicidad se expresó como la concentración citotóxica media (CC₅₀) en la cual el extracto y la fracción de *Scutellaria* spp. causaron la muerte del 50 % de la población de células. En la **Tabla 22** se muestran los valores CC₅₀ de los extractos y fracciones de *Scutellaria* spp. y la concentración máxima de cada muestra que no generó un efecto negativo (tóxico) sobre la viabilidad celular (80 %). Los valores CC₅₀ < 100 µg/mL se consideran tóxicos. Para el extracto de *S. coccinea* se registró citotoxicidad baja (CC₅₀=213 µg/mL) y para las fracciones cinco (CC₅₀=345 µg/mL) y seis de *S. incarnata* (CC₅₀>512 µg/mL) se registraron los valores de citotoxicidad bajos.

Tabla 22.
Actividad citotóxica de los extractos y fracciones de Scutellaria spp.

Especie	Muestra	Composición	CC ₅₀ , µg/mL	Concentración máxima no tóxica, µg/mL	
<i>S. incarnata</i>	Extracto	Véase Tabla 12	50 ± 1	28 ± 1	1
	FR-2	Schaftosido, escutelarina	47 ± 1	32 ± 1	1
	FR-3	Dihidrobaicaleina-glucurónido, baicalina	64 ± 1	64 ± 1	1
	FR-4	Verbascósido, umbeliferona-hexósido-pentósido, dihidrobaicaleina-glucurónido, baicalina	72 ± 1	32 ± 1	1
	FR-5	Dihidrobaicaleina	345 ± 1	256 ± 1	1
	FR-6	Baicaleína	> 512	512 ± 1	1
<i>S. coccinea</i>	Extracto	Véase Tabla 12	213 ± 1	95 ± 1	1
	FR-2	Schaftosido, escutelarina, isoliquiritina	84 ± 1	32 ± 1	1
<i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i>	Extracto	Véase Tabla 12	46 ± 1	4.00 ± 0.01	
	FR-4	Umbeliferona-hexósido-pentósido, wogonosida, isómero uno de umbeliferona, escutelareína	145 ± 1	128 ± 1	1
	FR-8	Wogonina	29 ± 1	N.D.	

Las células de cultivaron con la muestra en medio de cultivo durante 72 h hasta determinar la viabilidad celular mediante el ensayo de cristal violeta. Valores promedio calculados para tres ensayos independientes por triplicado.

N.D. Valor no determinado, ninguna concentración evaluada muestra diferencias significativas respecto al no tratado.

Figura 35.

Viabilidad de células epiteliales de riñón de mono africano (células Vero, ATCC®CCL-81™), tratados con extractos de: **A.** *S. incarnata*, **B.** *S. coccinea*, **C.** *S. ventenatii* x *S. incarnata* y **D.** Dimetilsulfóxido (control positivo). Fuente: Información suministrada por el Centro de Investigaciones CINTROP.

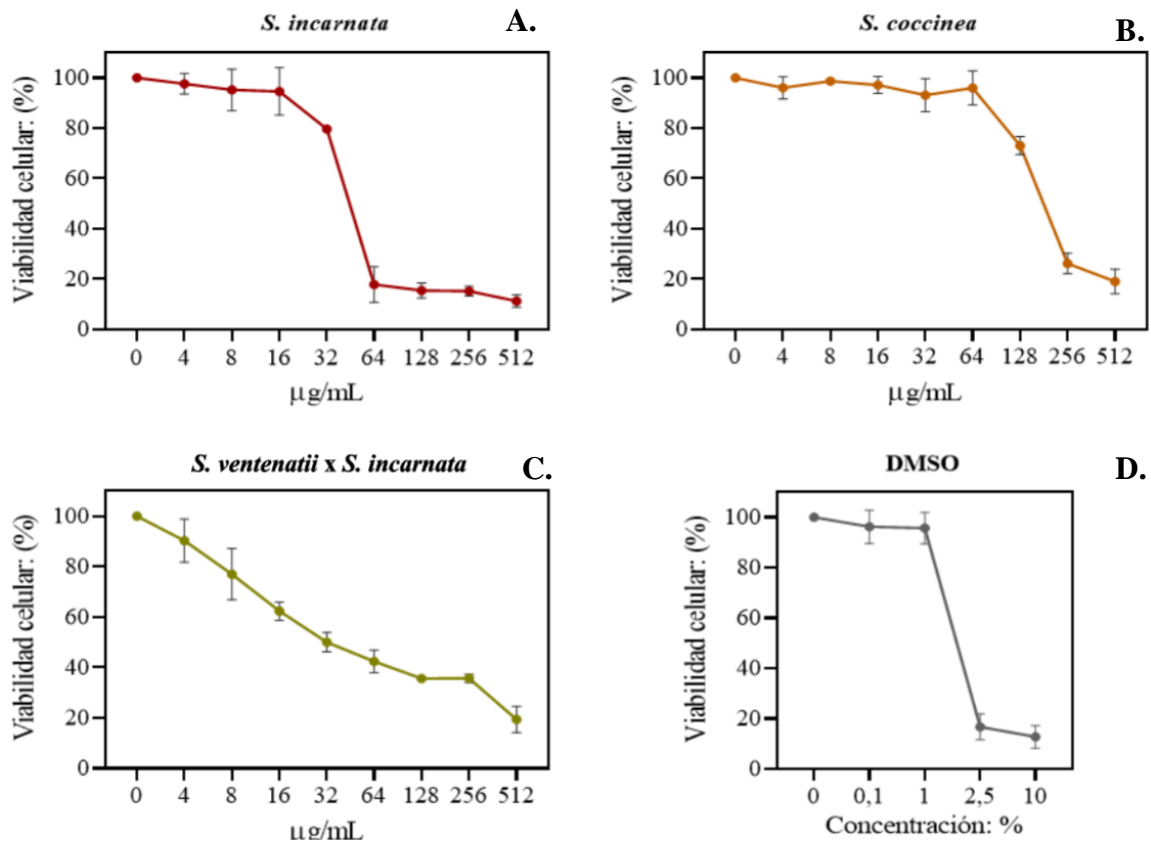
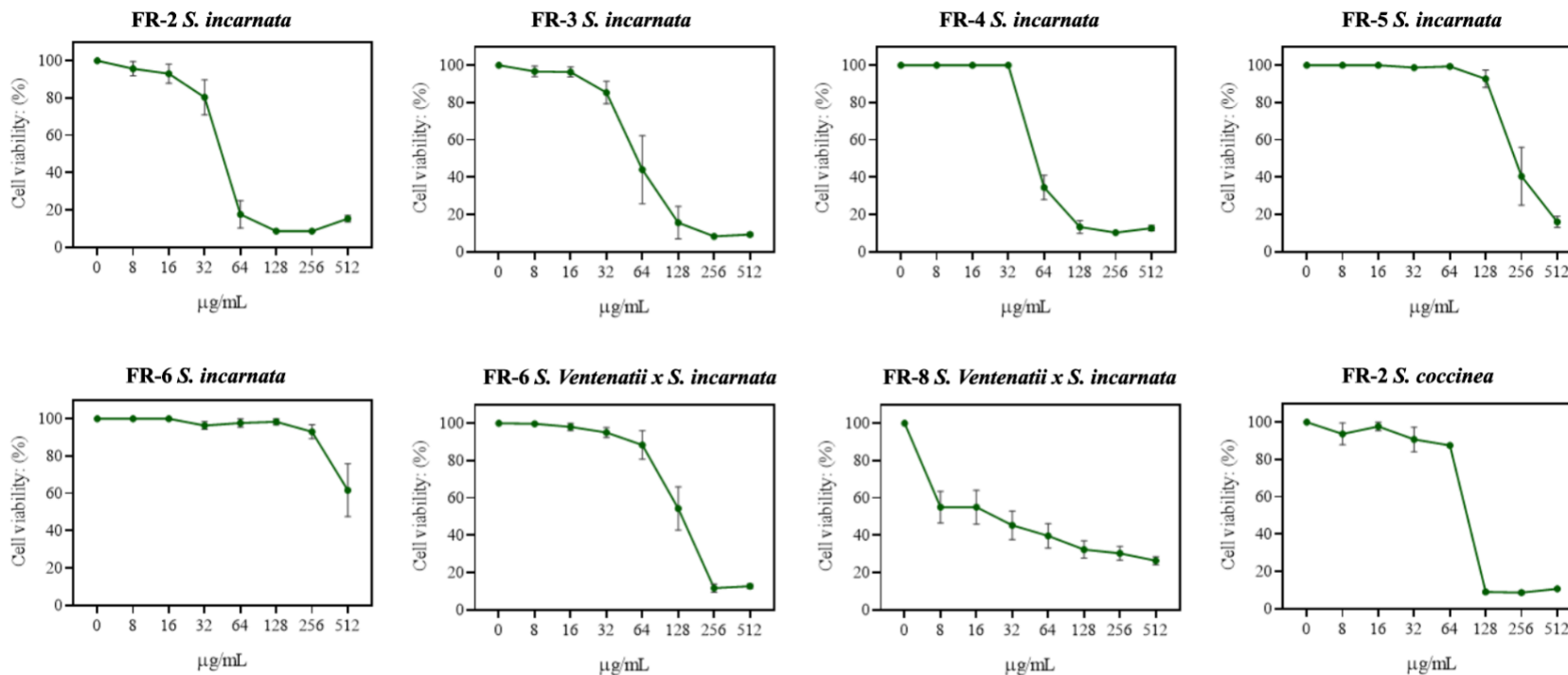


Figura 36.

Viabilidad de células epiteliales de riñón de mono africano (células Vero, ATCC®CCL-81™), tratados con fracciones de *Scutellaria* spp. Fuente: Información suministrada por el Centro de Investigaciones CINTROP.



La actividad citotóxica del extracto de *S. baicalensis* ($CC_{50}=375 \mu\text{g/mL}$), usando el ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), fue registrada por Zandi *et al.* (Zandi *et al.*, 2013), y en esta investigación, se destaca el extracto de *S. coccinea*, porque fue el único con citotoxicidad baja ($CC_{50}=213 \mu\text{g/mL}$), de los tres extractos de *Scutellaria* spp. evaluados.

En la literatura Zandi *et al.* (Zandi *et al.*, 2012) y Moghammed *et al.* (Moghaddam *et al.*, 2014) han reportado la citotoxicidad baja de la baicaleína ($CC_{50}=109 \mu\text{g/mL}$) y baicalina ($CC_{50}=290.9 \mu\text{g/mL}$) en células Vero, respectivamente, usando el método MTT. En este estudio se registró una citotoxicidad muy baja para la fracción seis de *S. incarnata*, compuesta por baicaleína ($CC_{50}>512 \mu\text{g/mL}$), al igual que lo reportado por Zandi *et al.* (Zandi *et al.*, 2012), quienes determinaron que la CC_{50} del patrón comercial de baicaleína fue de $109 \mu\text{g/mL}$.

En ninguna de las fracciones obtenidas de extractos de *Scutellaria* spp. se logró aislar como único compuesto a la baicalina, usando las condiciones de prep-HPLC mostradas en la **Sección 3.4.3**. Las fracciones tres y cuatro de *S. incarnata* tienen en su composición química baicalina, junto con otras sustancias fenólicas, y los valores CC_{50} determinados para estas fracciones indican una citotoxicidad más alta ($CC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$), por tanto, la mezcla de compuestos fenólicos con baicalina, no produce el mismo resultado de citotoxicidad baja reportada por Moghad *et al.* (Moghaddam *et al.*, 2014) para la baicalina pura ($CC_{50} = 290.09 \mu\text{g/mL}$).

4.5.2 Actividad antiviral in vitro

Para determinar la actividad antiviral *in vitro* de extractos y fracciones de *Scutellaria* spp. se examinó el efecto de la infección viral (DENV-1 y DENV-2) sobre el cultivo de células Vero; esto se conoce como efecto citopático y consiste en evaluar los cambios bioquímicos, moleculares, morfológicos y de viabilidad celular, durante la adsorción del virus en las células (Silva-Trujillo *et al.*, 2022).

El efecto citopático se expresó como la concentración inhibitoria media (CI₅₀) en la cual el extracto o la fracción de *Scutellaria* spp. redujo el 50 % de los cambios en el cultivo celular (Vero, ATCC®CCL-81™) inducidos por los serotipos uno y dos del virus del dengue (DENV-1 y DENV-2).

En la **Tabla 23** se muestran los valores CI₅₀ e índice de selectividad (IS) de los extractos y las fracciones de *Scutellaria* spp. En las **Figuras 37 a 40** se presentan los porcentajes de reducción del efecto citopático en células Vero durante la adsorción de DENV-1 o DENV-2 en presencia de extractos de *Scutellaria* spp. Los datos fueron suministrados por la profesora Dra. Raquel OCAZIOINEZ, del Centro de Investigaciones CINTROP.

La actividad antiviral fue mayor en el extracto de *S. coccinea*, seguida de *S. incarnata* y de *S. ventenatii* x *S. incarnata*. Según Butterwerk *et al.* (Butterweck & Nahrstedt, 2012) y Cos *et al.* (Cos *et al.*, 2006); los resultados obtenidos fueron buenos porque para las muestras se determinaron valores de CI₅₀ < 50 µg/mL y de IS > 3, según lo reportado para antivirales de referencia.

La capacidad de los extractos de *Scutellaria* spp. para reducir los efectos negativos causados en células Vero por el serotipo dos (DENV-2) fue mayor que la observada para el serotipo uno (DENV-1). Este resultado está asociado con una posible reducción de las interacciones proteicas que ocurren durante el proceso de adsorción entre la membrana celular y el virus (Nasar *et al.*, 2020), causada por los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Scutellaria* spp.

La reducción del efecto citopático en las células Vero tratadas con las fracciones de *Scutellaria* spp. fue mayor cuando estuvieron expuestas al serotipo uno (DENV-1) en comparación con el serotipo dos (DENV-2) (Véase **Tabla 23**). La inhibición antiviral de algunas fracciones de *S. incarnata* (FR-3, FR-5 y FR-6) y las de *S. ventenatii* x *S. incarnata*, fue baja o indeterminada

para el rango de concentraciones evaluado. Se destacan los resultados obtenidos para el extracto de *S. coccinea* [$CI_{50}=28 \pm 1$ (DENV-1) y 1.0 ± 0.4 (DENV-2) $\mu\text{g/mL}$] y su fracción dos [$CI_{50}=17 \pm 1$ (DENV-1) y 30 ± 2.8 (DENV-2) $\mu\text{g/mL}$], ya que es posible que los compuestos schaftosido, escutelarina e isoliquiritina en esta fracción, impidan la adsorción del virus a la membrana celular.

Tabla 23.

Actividad antiviral de extractos y fracciones de Scutellaria spp., evaluada en células Vero, durante la adsorción del virus DENV-1 y DENV-2, y calculada como la reducción del efecto citopático.

Extracto	Muestra	Composición	CC ₅₀ , µg/mL	DENV-1		DENV-2		
				CI ₅₀ , µg/mL	IS	CI ₅₀ , µg/mL	IS	
<i>S. incarnata</i>	Extracto	Véase Tabla 12	50 ± 1	32 ± 1	1.5	5 ± 1	10	
	FR-2	Schaftosido, escutelarina	47 ± 1	25 ± 1	1.9	30 ± 1	1.6	
	FR-3	Dihidrobaicaleína-glucurónido, baicalina	64 ± 1	*		*		
	FR-4	Verbascósido, umbeliferona-hexósido-pentósido, dihidrobaicaleína-glucurónido, baicalina	72 ± 1	22 ± 1	3.2		*	
	FR-5	Dihidrobaicaleína	345 ± 1		*		*	
	FR-6	Baicaleína	> 512		*	105.0 ± 0.9	4.8	
<i>S. coccinea</i>	Extracto	Véase Tabla 12	213 ± 1	28 ± 1	7.6	1 ± 0.4	213	
	FR-2	Schaftosido, escutelarina, isoliquiritina	84 ± 1	17 ± 1	4.9	30 ± 1	2.8	
<i>S. ventenatii</i> x <i>S. incarnata</i>	Extracto	Véase Tabla 12	46 ± 1	37 ± 1	1.2	6	1	7.6
	FR-4	Umbeliferona-hexósido-pentósido, wogonosida, isómero uno de umbeliferona, escutelareína	145 ± 1		*	85.3 ± 1	1.7	
	FR-8	Wogonina	29 ± 1		*		*	

Datos de CI₅₀ derivados de curvas dosis-respuesta expresada en µg/mL. Los resultados son promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

* CI₅₀ no calculada por no reducción > 50 % del ECP.

Fuente: Datos suministrados por el Centro de Investigaciones CINTROP.

Figura 37.

Porcentajes de reducción del efecto citopático en células Vero, tratadas con extractos de *Scutellaria* spp. o con antiviral de referencia (dextrán sulfato de sodio), durante la adsorción del serotipo uno del virus del dengue (DENV-1). Fuente: Datos suministrados por el Centro de Investigaciones CINTROP.

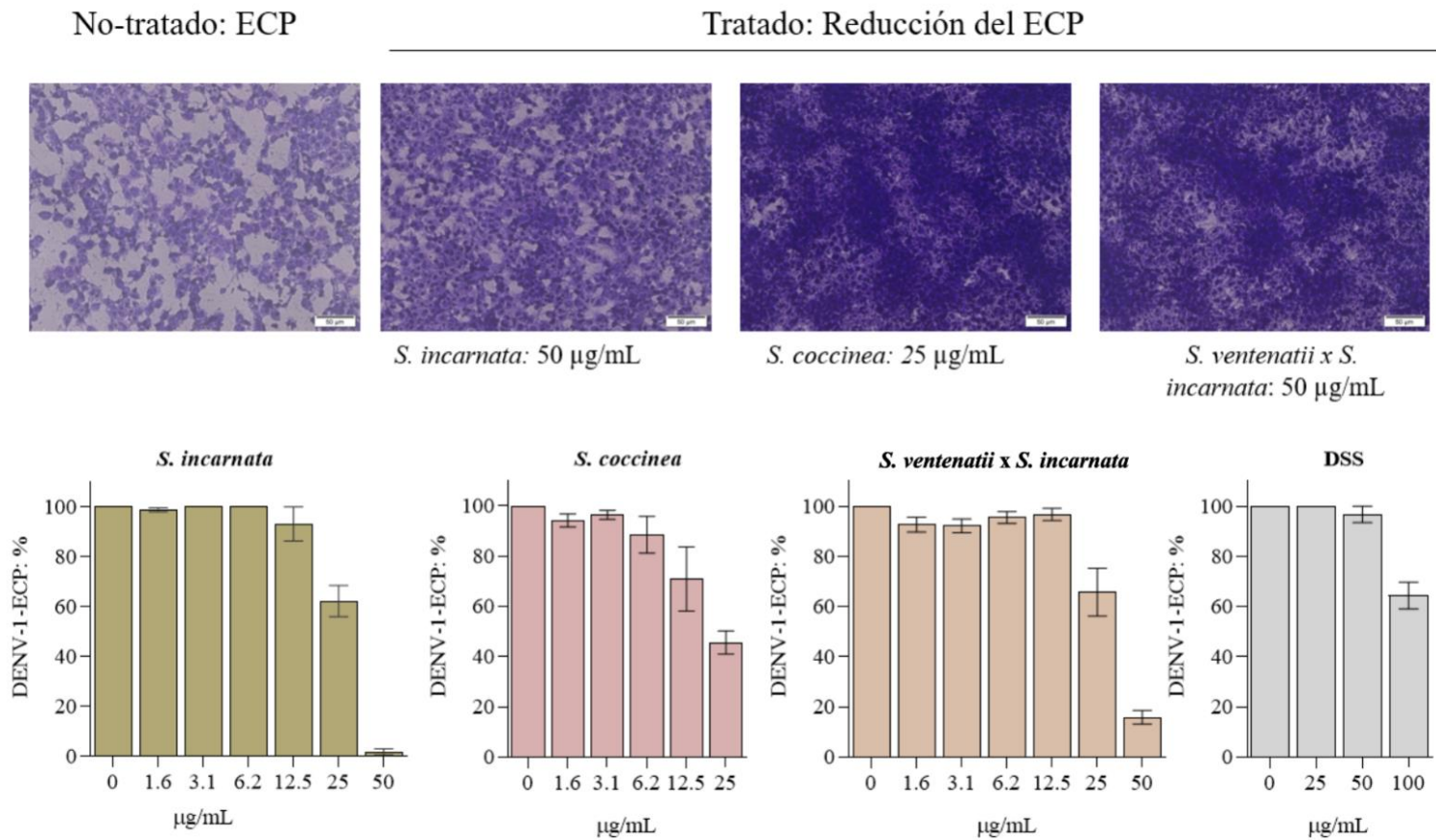


Figura 38.

Porcentajes de reducción del efecto citopático en células Vero, tratadas con extractos de *Scutellaria* spp. o con antiviral de referencia (dextrán sulfato de sodio), durante la adsorción del serotipo dos del virus del dengue (DENV-2). Fuente: Datos suministrados por el Centro de Investigaciones CINTROP

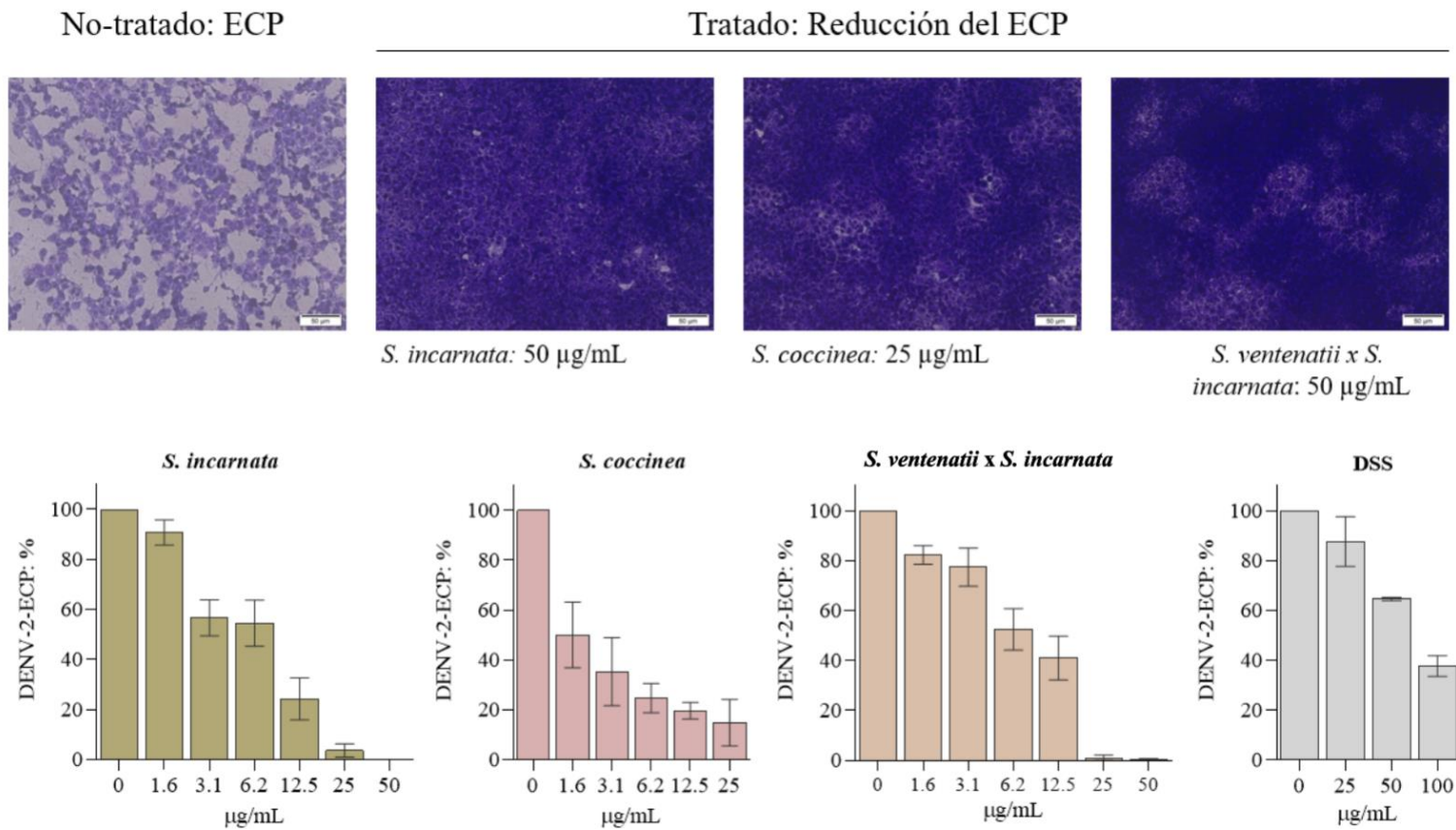


Figura 39.

Porcentajes de reducción del efecto citopático en células Vero, tratadas con fracciones de *Scutellaria* spp. o con antiviral de referencia (dextrán sulfato de sodio), durante la adsorción del serotipo uno del virus del dengue (DENV-1). Fuente: Datos suministrados por el Centro de Investigaciones CINTROP.

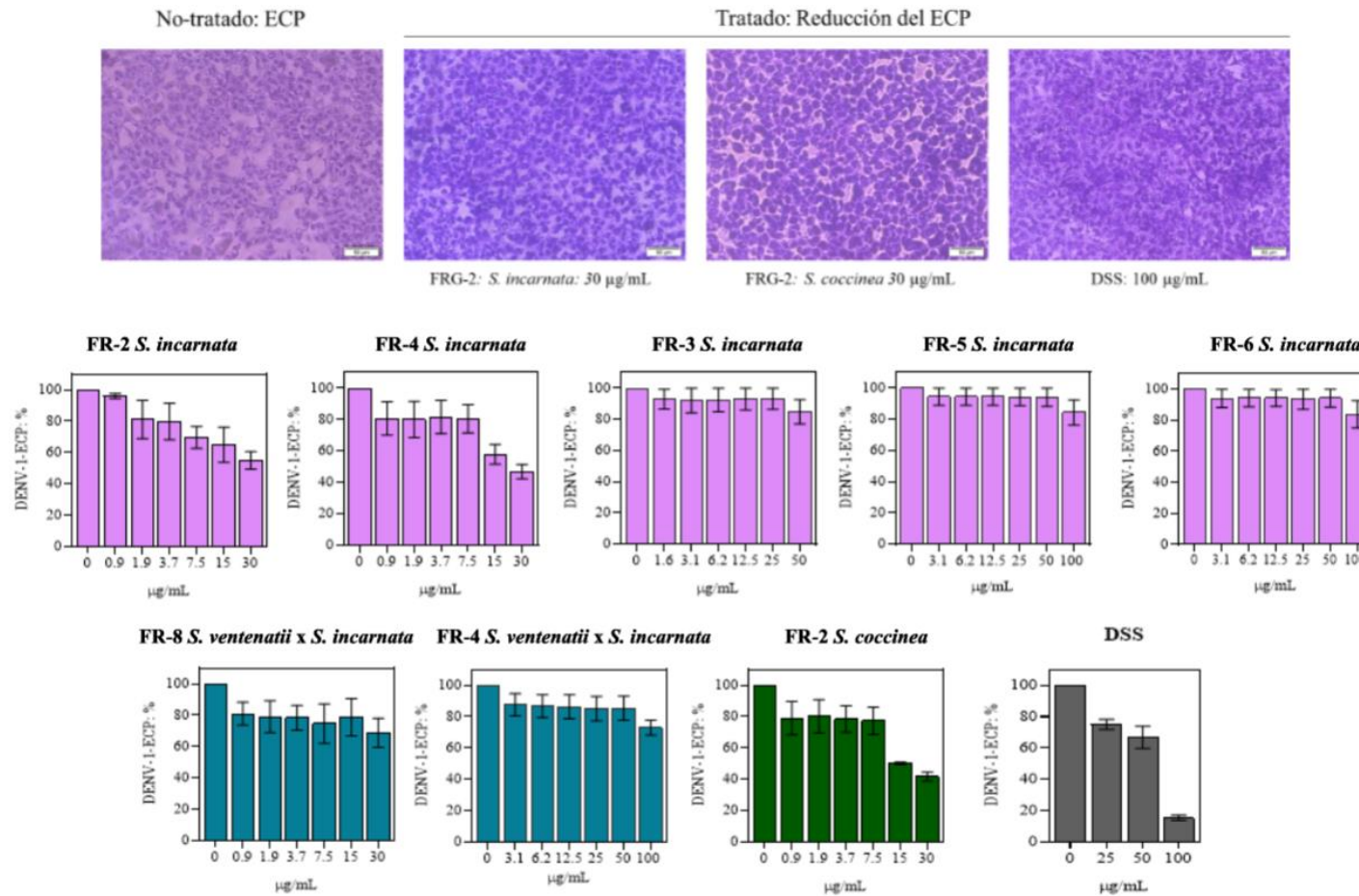
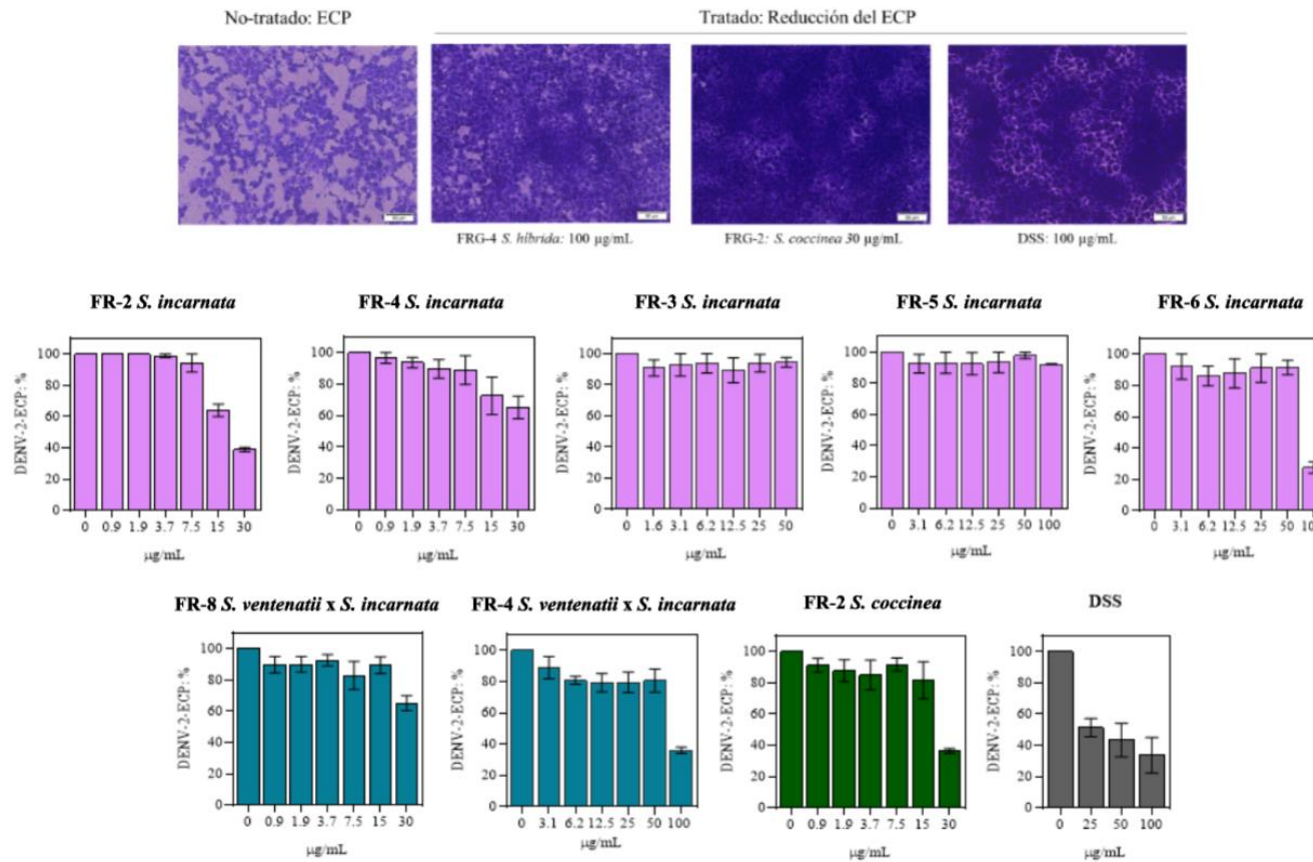


Figura 40.

Porcentajes de reducción del efecto citopático en células Vero, tratadas con fracciones de *Scutellaria* spp. o con antiviral de referencia (dextrán sulfato de sodio), durante la adsorción del serotipo dos del virus del dengue (DENV-2). Fuente: Datos suministrados por el Centro de Investigaciones CINTROP.



Moghaddam *et al.* (Moghaddam et al., 2014) reportaron que baicalina es considerada como un potente agente antiviral ($CI_{50}=13.5 \mu\text{g/mL}$ y $IS:21.5$, en DENV-2). En esta investigación, las fracciones tres y cuatro de *S. incarnata* contienen cantidades bajas de baicalina en su composición ($80 \pm 1 \text{ mg/g}$ de FR-3 y 28.31 ± 0.02 de FR-4), luego, es posible que, al no tratarse de una sustancia pura, los resultados obtenidos fueran más bajos que los obtenidos por Moghaddam *et al.* (Moghaddam et al., 2014).

La actividad antiviral de la fracción seis de *S. incarnata* ($CI_{50}=105 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$ e $IS: 4.8$), compuesta por baicaleína ($2.30 \pm 0.01 \text{ mg/g}$ de FR-6) y otras sustancias en cantidades menores, fue más baja que la de la sustancia-patrón evaluada por Zandhi *et al.* (Zandi *et al.*, 2012) ($CI_{50}=7.14 \pm 0.01$ e $IS:16.1$). Las diferencias se pueden deber a su pureza (*ca.* 30 %) y a que la concentración de baicaleína en la fracción fue más baja.

Los resultados obtenidos hasta la fecha, sobre la actividad antiviral de extractos y fracciones de *Scutellaria* spp., permiten destacar al extracto de *S. coccinea* y su fracción como candidatos para realizar el estudio de los mecanismos bioquímicos que describen la actividad antiviral, ello, con miras de viabilizar su uso como ingredientes naturales en productos fitoterapéuticos.

5. Conclusiones

El diseño experimental realizado para la extracción de compuestos fenólicos de tres especies de *Scutellaria* permitió establecer que, a pesar de que las plantas estudiadas pertenecen al mismo género, es necesario evaluar los parámetros de extracción de cada especie. Para *S. incarnata* se encontraron valores de temperatura (A) de 50 °C, relación etanol:agua (B) de 70:30 y tiempo (C) de 5 min; mientras que para *S. coccinea* y *S. ventenatii* x *S. incarnata* estos valores fueron de 50 °C, 70:30 y 40:60 y 15 min, respectivamente.

El análisis por UHPLC/ESI-Q-Orbitrap-MS de extractos hidroalcohólicos de *Scutellaria* spp., permitió identificar 17 compuestos fenólicos. Entre los más abundantes figuran baicalina, dihidrobaicaleina-glucurónido y escutelarina en *S. incarnata* (287.127 ± 0.005 mg/g, 140.18 ± 0.07 mg/g y 33.77 ± 0.02 mg/g), en *S. coccinea* (158.3 ± 0.34 mg/g, 51.20 ± 0.02 mg/g y 21.400 ± 0.007 mg/g) y en *S. ventenatii* x *S. incarnata* (186.87 ± 0.01 mg/g, 44.89 ± 0.06 mg/g y 20.09 ± 0.03 mg/g).

Mediante el estudio de los espectros de masas de alta resolución (*Orbitrap*) y el análisis de las rutas de fragmentación, en el extracto de *S. ventenatii* x *S. incarnata*, se detectaron dos isómeros de baicalina, con el ion $[M+H]^+$ en m/z 447.09618 (norwogonina-glucurónido y apigenina-7-glucurónido), que no fueron identificados en los extractos de otras especies de *Scutellaria* spp. Las cantidades de wogonina (14.883 ± 0.006 mg/g) y wogonosida (11.84 ± 0.04 mg/g) en el híbrido, fueron más altas que las de los extractos de *S. incarnata* y *S. coccinea*. También se identificó, de manera tentativa, umbeliferona-hexósido-pentósido e isoliquiritina, compuestos que no se habían reportado antes en el género *Scutellaria* spp.

La actividad antioxidante más alta, medida por diferentes técnicas, se encontró en el extracto de *S. coccinea* (ORAC, 3828 ± 3.0 μ mol Trolox[®]/g extracto).

La actividad antioxidante más alta, medida por diferentes técnicas, se encontró para el extracto de *S. coccinea* (ORAC, 3828 ± 3.0 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto). El método *on-line* HPLC-ABTS⁺ permitió identificar la dihidrobaicaleína-glucurónido y la baicalina como los mayores contribuyentes a la actividad antioxidante de los extractos de *S. incarnata* (59% y 13%), *S. coccinea* (41 % y 20 %) y *S. ventenatii* x *S. incarnata* (32 % y 27 %).

Mediante prep-HPLC se lograron obtener fracciones de *S. incarnata* (seis), *S. coccinea* (seis) y *S. ventenatii* x *S. incarnata* (ocho). La actividad antioxidante de las fracciones fue igual (2503 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto en FR-4 y 2510 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto en *S. incarnata*) o superior (7078 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto en FR-2 y 2510 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto en *S. incarnata*) a la determinada para los extractos.

Entre las tres especies estudiadas, se destaca principalmente *S. coccinea* porque tuvo actividades biológicas más altas e interesantes: mayor actividad antioxidante (ORAC, 3828 ± 3.0 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}/\text{g}$ extracto), menor citotoxicidad ($\text{CC}_{50}=213 \pm 1$ $\mu\text{g}/\text{mL}$) y mayor actividad antiviral ($\text{CI}_{50} = 28 \pm 1$ en DENV-1 y $\text{CI}_{50} = 1 \pm 1$ en DENV-2).

Las plantas de *S. coccinea* y *S. incarnata* son especies promisorias que podrían ser usadas para obtener extractos antioxidantes y antivirales o como fuente de ingredientes naturales en productos de la industria farmacéutica. Anualmente, en una hectárea de cultivo se podrán obtener alrededor de 4 kg de baicalina y 2 kg de dihidrobaicaleína-glucurónido, sustancias de interés comercial debido a su actividad biológica

6. Agradecimientos

A mi familia y a Cristian por siempre apoyarme en todos los pasos que doy, por animarme y siempre creer en mis capacidades.

A los profesores Elena E. STASHENKO y Jairo René MARTÍNEZ por sus enseñanzas, recomendaciones y vivencias compartidas en el desarrollo del proyecto.

A Lady SIERRA por todos sus aportes y conocimientos otorgados en la realización de este trabajo. A Katherine, Sheila y Felipe por el apoyo y risas compartidas.

A la Universidad Industrial de Santander, la Escuela de Química y al grupo de Investigación CIBIMOL por permitirme realizar esta Investigación.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, Ministerio de Educación Nacional, Ministerio de Industria, Comercio y Turismo e ICETEX. Convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica. Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018 y al Fondo para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación - FCTel del Sistema General de Regalías – SGR [BPIN-2018000100044] por la financiación otorgada.

Al Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, Centro de Cromatografía y Espectrometría de Masas, CROM-MASS, y Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM por los recursos en consumibles y mantenimiento de equipos cromatográficos, indispensables para el desarrollo de esta Investigación.

7. Divulgación de resultados

Durante el Trabajo de Investigación de Maestría, los resultados parciales del trabajo se publicaron en un manuscrito científico en la revista “*molecules*” y en memorias de cuatro eventos nacionales e internacionales en modalidad oral y póster.

Manuscrito:

“Chemical characterization and determination of the antioxidant properties of phenolic compounds in three species of *Scutellaria* spp. plants grown in Colombia”.

Eventos nacionales e internacionales:

16^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, AMIPRONAT. Modalidad póster.

34^o Congreso Latinoamericano de Química, CLAQ. Modalidad oral y póster.

XII International Mass Spectrometry Conference on Petrochemistry, Environmental and Food Chemistry, Petromass. Modalidad póster.

3^d *Iberoamerican Conference on Mass Spectrometry, IBERO-2022.* Modalidad póster.

Referencias bibliográficas

- Akkawi, M. (2018). Pure Isolates and Preparative HPLC Fractions or Crude Extract of *Inula viscosa*: Effect on β -hematin Inhibition in vitro. *Pharmacy & Pharmacology International Journal*, 6(1), 1–5.
- Awad, R., Arnason, J. T., Trudeau, V., Bergeron, C., Budzinski, J. W., Foster, B. C., & Merali, Z. (2003). Phytochemical and biological analysis of Skullcap (*Scutellaria lateriflora* L.): A medicinal plant with anxiolytic properties. *Phytomedicine*, 10(8), 640–649.
- Bai, M., Zheng, C. J., Wu, S. Y., Chen, G. Y., Song, X. P., & Han, C. R. (2019). Chemical constituents from *Scutellaria hainanensis* C. Y. Wu. *Biochemical Systematics and Ecology*, 82(1), 1–12.
- Bardakci, H., Skaltsa, H., Milosevic-Ifantis, T., Lazari, D., Hadjipavlou-Litina, D., Yeşilada, E., & Kirmizibekmez, H. (2015). Antioxidant activities of several *Scutellaria* taxa and bioactive phytoconstituents from *Scutellaria hastifolia* L. *Industrial Crops and Products*, 77, 196–203.
- Becchi, M., & Fraisse, D. (1989). Fast atom bombardment and fast atom bombardment collision-activated dissociation/mass-analysed ion kinetic energy analysis of C-glycosidic flavonoids. *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry*, 18(2), 122–130.
- Ben-Shabat, S., Yarmolinsky, L., Porat, D., & Dahan, A. (2019). Antiviral effect of phytochemicals from medicinal plants: Applications and drug delivery strategies. *Drug Delivery and Translational Research*, 10(2), 354–367.
- Benítez-Benítez, R., Sarria-Villa, R. A., Gallo-Corredor, J. A., Pérez Pacheco, N. O., Álvarez Sandoval, J. H., & Giraldo Aristizabal, C. I. (2020). Obtención y rendimiento del extracto etanólico de dos plantas medicinales. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 15(1), 31–40.
- Bhat, G., Ganai, B. A., & Shawl, A. S. (2014). New phenolics from the root of *Scutellaria prostrata*

- JACQ. ex BENTH. *Natural Product Research*, 28(20), 1685–1690.
- Bianco, A., Buiarelli, F., Cartoni, G., Coccioli, F., Muzzalupo, I., Polidori, A., Buiarelli, F., Coccioli, F., Muzzalupo, I., Polidori, A., & Uccella, N. (2006). Analysis by HPLC-MS/MS of biophenolic components in oil. *Analytical Letters*, 6(1), 1033–1051.
- Butterweck, V., & Nahrstedt, A. (2012). What is the best strategy for preclinical testing of botanicals? A critical perspective. *Planta Medica*, 78(8), 747–754.
- Camini, F. C., da Silva Caetano, C. C., Almeida, L. T., & de Brito Magalhães, C. L. (2017). Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. *Archives of Virology*, 162(4), 907–917.
- Cano, A., Alcaraz, O., Acosta, M., & Arnao, M. B. (2002). *On-line* antioxidant activity determination: Comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS^{•+} assay. *Redox Report*, 7(2), 103–109.
- Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), 303–311.
- Cardinali, A., Linsalata, V., Lattanzio, V., & Ferruzzi, M. G. (2011). Verbascosides from olive mill waste water: Assessment of their bioaccessibility and intestinal uptake using an *in vitro* digestion/caco-2 model system. *Journal of Food Science*, 76(2), 48–54.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001a). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5–14.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001b). Reseña bibliográfica flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5–14.
- Casos reportados de dengue en las Américas*. (2022). Organización Mundial de La Salud- Organización Panamericana de Salud. <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-nacional/9->

dengue-pais-ano.html

- Chou, C. C., Pan, S. L., Teng, C. M., & Guh, J. H. (2003). Pharmacological evaluation of several major ingredients of Chinese herbal medicines in human hepatoma Hep3B cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *19*(5), 403–412.
- Cos, P., Vlietinck, A. J., Berghe, D. Vanden, & Maes, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* “proof-of-concept.” *Journal of Ethnopharmacology*, *106*(3), 290–302.
- Cotelle, N. (2005). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *1*(6), 569–590.
- Da Cunha Pinto, A., Vessecchi, R., Da Silva, C. G., Amorim, A. C. L., Dos Santos Júnior, H. M., Rezende, M. J. C., Gates, P. J., Rezende, C. M., & Lopes, N. P. (2016). Electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of isopimarane diterpenes from Velloziaceae. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *30*(1), 61–68.
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: Extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, *15*(10), 7313–7352.
- Dai, S. J., Tao, J. Y., Liu, K., Jiang, Y. T., & Shen, L. (2006). neo-Clerodane diterpenoids from *Scutellaria barbata* with cytotoxic activities. *Phytochemistry*, *67*(13), 1326–1330.
- Danuello, A., de Castro, R. C., Pilon, A. C., Bueno, P. C. P., Pivatto, M., Vieira Júnior, G. M., Carvalho, F. A., Oda, F. B., Perez, C. J., Lopes, N. P., Dos Santos, A. G., Ifa, D. R., & Cavalheiro, A. J. (2020). Fragmentation study of clerodane diterpenes from *Casearia* species by tandem mass spectrometry (quadrupole time-of-flight and ion trap). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *34*(S3), 0–2.
- Delerue, T., Fátima Barroso, M., Dias-Teixeira, M., Figueiredo-González, M., Delerue-Matos, C.,

- & Grosso, C. (2021). Interactions between *Ginkgo biloba* L. and *Scutellaria baicalensis* Georgi in multicomponent mixtures towards cholinesterase inhibition and ROS scavenging. *Food Research International*, 140(November 2020), 1–17.
- Días Sanchez, L. M., Stashenko, E. E., Martinez, J. R., & Mejía, J. J. (2017). *Identificación por GC-MS y LC-MS de metabolitos secundarios aislados de Medinilla myriantha (Melastomataceae) y evaluación de su actividad antioxidante*. Universidad Industrial de Santander.
- Dong, L. L., Fu, Y. J., Zu, Y. G., Luo, M., Wang, W., Li, C. Y., & Mu, P. S. (2012). An enhanced preparation and purification of the major antioxidants baicalein and wogonin from *Scutellaria radix*. *Food Chemistry*, 133(2), 430–436.
- E. Verette, G., & Villiers-le-Bel. (2000). *Chromatography* (pp. 343–352). Automation.
- Esquivel, B., Flores, E., Hernández-Ortega, S., & Toscano, R. A. (1995). Neo-clerodane diterpenoids from *Scutellaria drummondii*. *Phytochemistry*, 38(1), 175–179.
- Fabre, N., Rustan, I., Hoffman, E., & Quetin-Leclercq, J. (2001). Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *American Society for Mass Spectrometry*, 50(1), 707–715.
- Ferreira, R. D. Q., Greco, S. J., Delarmelina, M., & Weber, K. C. (2015). Electrochemical quantification of the structure/antioxidant activity relationship of flavonoids. *Electrochimica Acta*, 163(1), 161–166.
- Finotti, E., & Di Majo, D. (2003). Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids. *Nahrung - Food*, 47(3), 186–187.
- Freeman, B. L., Eggett, D. L., & Parker, T. L. (2010). Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges. *Journal of Food Science*, 75(6), 570–576.

- Gharaati Jahromi, S. (2019). Extraction Techniques of Phenolic Compounds from Plants. *Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*.
- Gil, L., Valle, D. E. L., Reyes, A. T., Mart, G., Sonia, O., Kourí, I. P., & Novia, A. (2002). Terapia antioxidante en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *GilActa Farm. Bonaerense*, 21(4), 301–308.
- Gong, L., & Zhu, J. (2018). Baicalin alleviates oxidative stress damage in trabecular meshwork cells *in vitro*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 391(1), 51–58.
- González, M. A., Lopera, W. D., & Arango, Á. (2014). *Fundamentos de medicina. Manual de terapeutica* (CIB (Ed.); 16th ed.).
- Grzegorzczak-Karolak, I., Kontek, B., Kontek, R., Wysokińska, H., & Olas, B. (2019). Evaluation of antioxidant activity of extracts from the roots and shoots of *Scutellaria alpina* L. and *S. Altissima* L. and selected blood cells. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 28(4), 453–460.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*, 94(3), 651–715.
- Hajimehdipoor, H., Shahrestani, R., & Shekarchi, M. (2014). Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds. *Research Journal of Pharmacognosy*, 1(3), 35–40.
- Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad. Res. Comms.*, 9(1), 1–32.
- Han, C., Xing, G., Zhang, M., Zhong, M., Han, Z., He, C., & Liu, X. (2018). Wogonoside inhibits cell growth and induces mitochondrial-mediated autophagy-related apoptosis in human colon cancer cells through the PI3K/AKT/mTOR/p70S6K signaling pathway. *Oncology Letters*,

15(4), 4463–4470.

Han, J., Ye, M., Xu, M., Sun, J., Wang, B., & Guo, D. (2007a). Characterization of flavonoids in the traditional Chinese herbal medicine-Huangqin by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 848(2), 355–362.

Han, J., Ye, M., Xu, M., Sun, J., Wang, B., & Guo, D. (2007b). Characterization of flavonoids in the traditional Chinese herbal medicine-Huangqin by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 848(2), 355–362.

Han, Y. K., Kim, H., Shin, H., Song, J., Lee, M. K., Park, B., & Lee, K. Y. (2020). Characterization of anti-inflammatory and antioxidant constituents from *Scutellaria baicalensis* using LC-MS coupled with a bioassay method. *Molecules*, 25(16), 1–12.

He, L., Zhang, Z., Lu, L., Liu, Y., Li, S., Wang, J., Song, Z., Yan, Z., & Miao, J. (2016). Rapid identification and quantitative analysis of the chemical constituents in *Scutellaria indica* L. by UHPLC-QTOF-MS and UHPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 117, 125–139.

Hernández-Rodríguez, P., Baquero, L. P., & Larrota, H. R. (2018). Flavonoids: Potential therapeutic agents by their antioxidant capacity. In *Bioactive Compounds: Health Benefits and Potential Applications*. Elsevier Inc.

Hernández, C. del P. Z., Martínez, M. L. O., & Alvarado, F. E. P. (2022). *Protocolo de vigilancia de dengue*.

Hidalgo, M., Sánchez-Moreno, C., & de Pascual-Teresa, S. (2010). Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121(3), 691–696.

- Horvath, C. R., Martos, P. A., & Saxena, P. K. (2005). Identification and quantification of eight flavones in root and shoot tissues of the medicinal plant Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) using high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, *1062*(2), 199–207.
- Hu, X., You, J., Bao, C., Zhang, H., Meng, X., Xiao, T., Zhang, K., Wang, Y., Wang, H., Zhang, H., & Yu, A. (2008). Determination of total flavonoids in *Scutellaria barbata* D. Don by dynamic ultrasonic extraction coupled with on-line spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, *610*(2), 217–223.
- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(16), 4437–4444.
- Huang, H., Cai, H., Zhang, L., Hua, Z., Shi, J., & Wei, Y. (2020). Oroxylin A inhibits carcinogen-induced skin tumorigenesis through inhibition of inflammation by regulating SHCBP1 in mice. *International Immunopharmacology*, *80*(August 2019), 106123.
- Huet-Breña, C. (2017). *Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas*. Universidad Complutense, facultad de farmacia.
- Hughes, R. J., Croley, T. R., Metcalfe, C. D., & March, R. E. (2001). A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. *International Journal of Mass Spectrometry*, *210–211*(1), 371–385.

- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821–1835.
- International Organization for Standardization. (1990). *Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Pt. 1: Statistical evaluation of the linear calibration function*. (6th ed.). Analytical Letters.
- Ishimoto, H., Tai, A., Yoshimura, M., Amakura, Y., Yoshida, T., Hatano, T., & Ito, H. (2012). Antioxidative properties of functional polyphenols and their metabolites assessed by an ORAC assay. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 76(2), 395–399.
- Ji, Y., Li, B., Qiao, M., Li, J., Xu, H., Zhang, L., & Zhang, X. (2020). Advances on the *in vivo* and *in vitro* glycosylations of flavonoids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(15), 6587–6600.
- Jian, Z., & Xun, S. (1997). Antioxidant activities of baicalin, green tea polyphenols and alizarin *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Nutritional and Environmental Medicine*, 7(2), 79–90.
- Joshee., N., Dhekney., S. A., & Parajuli, P. (2019). Medicinal Plants. From farm to pharmacy. In *Tropical Horticulture (Springer, pp. 449–632)*.
- Joshee., N., Parajuli., P., Medina-Bolivar., F., & Shannon, D. (2012). *Scutellaria*: Biotechnology, phytochemistry and its potencial as a commercial medicinal crop. In *Biotechnology for Medicinal Plants: Micropropagation and Improvement* (Vol. 9783642299, Issue June 2015).
- K Trideva Sastri. (2019). Bioactive Umbelliferone and its derivatives: An update. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(1), 59–66.
- Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant secondary metabolites: Biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(January), 377–392.

- Kang, K. A., Zhang, R., Piao, M. J., Chae, S., Kim, H. S., Park, J. H., Jung, K. S., & Hyun, J. W. (2012). Baicalein inhibits oxidative stress-induced cellular damage via antioxidant effects. *Toxicology and Industrial Health*, 28(5), 412–421.
- Karimov, A. M., & Botirov, E. K. (2017). Structural diversity and state of knowledge of flavonoids of the *Scutellaria* L. genus. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 43(7), 691–711.
- Karimov, A. M., Slobodyanyuk, T. N., & Botirov, E. K. (2017). Flavonoids from the aerial part of *Scutellaria intermedia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 53(4), 745–746.
- Katzung, B. G., Masters, S. B., & Trevor, A. J. (2011). *Farmacología básica y clínica* (Lange (Ed.); 12th ed.).
- Kim, M. H., Lee, H., Choi, Y. Y., Lee, D. H., & Yang, W. M. (2018). *Scutellaria baicalensis* ameliorates the destruction of periodontal ligament via inhibition of inflammatory cytokine expression. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(2), 141–146.
- Kumar, V., Sood, H., & Chauhan, R. S. (2016). Optimization of a preparative RP-HPLC method for isolation and purification of picrosides in *Picrorhiza kurroa*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 25(2), 208–214.
- Latif, Z., & Sarker, S. D. (2006). Isolation of natural products by preparative high performance liquid chromatography (Prep-HPLC). In *Natural Products Isolation* (Vol. 864, pp. 1–25).
- Lee, K. J., Jung, P. M., Oh, Y. C., Song, N. Y., Kim, T., & Ma, J. Y. (2014). Extraction and bioactivity analysis of major flavones compounds from *Scutellaria baicalensis* using *in vitro* assay and *on-line* screening HPLC-ABTS system. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2014(1), 1–9.
- Lefebvre, T., Destandau, E., & Lesellier, E. (2021). Sequential extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and pigments (carotenoids and chlorophylls) from Rosemary by *on-line*

- supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1639(1), 461709.
- Li-Weber, M. (2009). New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents wogonin, baicalein and baicalin. *Cancer Treatment Reviews*, 35(1), 57–68.
- Li, B. Q., Fu, T., Dongyan, Y., Mikovits, J. A., Ruscetti, F. W., & Wang, J. M. (2000). Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276(2), 534–538.
- Li, Q. M., & Claeys, M. (1994). Characterization and differentiation of diglycosyl flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. *Biological Mass Spectrometry*, 23(7), 406–416.
- Liang, R. A. N., Rui-Min, H. A. N., Li-Min, F. U., Xi-Cheng, A. I., Zhang, J. P., & Skibsted, L. H. (2009). Baicalin in radical scavenging and its synergistic effect with β -carotene in antilipoxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(15), 7118–7124.
- Liang, S., Xu, Z., Ruan, Y., Niu, T., Guo, W., Jiang, W., & Hou, J. (2020). Isoquercitrin attenuates renal ischemia/reperfusion injury through antioxidation, anti-inflammation, and antiapoptosis in mice. *Transplantation Proceedings*, 52(3), 1014–1019.
- Lim, B. O. (2003). Effects of wogonin, wogonoside, and 3,5,7,2',6'-pentahydroxyflavone on chemical mediator production in peritoneal exudate cells and immunoglobulin E of rat mesenteric lymph node lymphocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(1), 23–29.
- Lim, H., Kwon, Y. S., Kim, D., Lee, J., & Kim, H. P. (2020). Flavonoids from *Scutellaria baicalensis* inhibit senescence-associated secretory phenotype production by interrupting I κ B ζ /C/EBP β pathway: Inhibition of age-related inflammation. *Phytomedicine*, 76(May),

153255.

- Lin, C. C., & Shieh, D. E. (1996). *In vivo* hepatoprotective effect of baicalein, baicalin and wogonin from *Scutellaria rivularis*. *Phytotherapy Research*, 10(8), 651–654.
- Liu, G., Ma, J., Chen, Y., Tian, Q., Shen, Y., Wang, X., chen, B., & Yao, S. (2009). Investigation of flavonoid profile of *Scutellaria baicalensis* Georgi by high performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(23), 4809–4814.
- Liu, G., Rajesh, N., Wang, X., Zhang, M., Wu, Q., Li, S., Chen, B., & Yao, S. (2011). Identification of flavonoids in the stems and leaves of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(13–14), 1023–1028.
- Liu, Y., Wang, H., & Cai, X. (2015). Optimization of the extraction of total flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi using the response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 2336–2343.
- Lizette Gil del Valle, R. G. H. (2015). El estrés oxidativo como cofactor de algunas enfermedades infecciosas. *Boletín Epidemiológico Semanal, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí*, 27(2), 17–24.
- Lopez Mendez, P. (2015). *Determinación de la capacidad antioxidante de Sambucus ebulus L. utilizando el método ORAC*. Universidad Complutense, facultad de farmacia.
- Ma, S. C., Du, J., But, P. P. H., Deng, X. L., Zhang, Y. W., Ooi, V. E. C., Xu, H. X., Lee, S. H. S., & Lee, S. F. (2002). Antiviral Chinese medicinal herbs against respiratory syncytial virus. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 205–211.
- Ma, Y. L., Vedernikova, I., Van Den Heuvel, H., & Claeys, M. (2000). Internal glucose residue

- loss in protonated *O*-diglycosyl flavonoids upon low-energy collision-induced dissociation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *11*(2), 136–144.
- Maleki, S., Akaberi, T., Emami, S. A., & Akaberi, M. (2022). Diterpenes of *Scutellaria* spp.: Phytochemistry and pharmacology. *Phytochemistry*, *201*(February), 113–285.
- Maria Tránsito López Luengo. (2002). Flavonoides. *Offarm*, *21*(4), 108–114.
- Martínez, A. J. C., & Ocazonez, R. E. (2019). *Estudio de la Actividad Citotóxica y Antiviral sobre el Virus del Dengue de Extractos de algunas Especies de Plantas de Colombia* (Vol. 8, Issue 2) [Universidad Industrial de Santander, departamento de ciencias básicas].
- Masek, A., & Chrzescijanska, E. (2015). Effect of UV-A irradiation and temperature on the antioxidant activity of quercetin studied using ABTS, DPPH and electrochemistry methods. *International Journal of Electrochemical Science*, *10*(7), 5276–5290.
- McNeil, M. (1983). Elimination of internal glycosyl residues during chemical ionization-mass spectrometry of per-*O*-alkylated oligosaccharide-alditols. *Carbohydrate Research*, *123*(1), 31–40.
- Mejía, J. J., Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2022). Estudio de la composición química y evaluación del potencial antioxidante, citotóxico y sensibilizante de extractos de *Hibiscus rosa-sinensis* (Malváceas) y de la biomasa residual de *Lippia organoides* (Verbenáceas) como posibles ingredientes en productos. In *Universidad Industrial de Santander* (Issue 8.5.2017).
- Miller, J., Miller, J. P. C. de M. (2002). *Química-Y-Quimiometría*. In *Prentice Hall*.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, *84*(4), 407–412.

- Minatel, I. O., Borges, C. V., Ferreira, M. I., Gomez, H. A. G., Chen, C.-Y. O., & Lima, G. P. P. (2017). Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. in *Phenolic Compounds - Biological Activity*.
- Miraliakbari, H., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry*, *111*(2), 421–427.
- Moghaddam, E., Teoh, B. T., Sam, S. S., Lani, R., Hassandarvish, P., Chik, Z., Yueh, A., Abubakar, S., & Zandi, K. (2014). Baicalin, a metabolite of baicalein with antiviral activity against dengue virus. *Scientific Reports*, *4*, 1–8.
- Motilva, M. J., Serra, A., & Macià, A. (2013). Analysis of food polyphenols by ultra high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry: An overview. *Journal of Chromatography A*, *1292*(1), 66–82.
- Naczka, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, *1054*(1–2), 95–111.
- Nasar, S., Rashid, N., & Iftikhar, S. (2020). Dengue proteins with their role in pathogenesis, and strategies for developing an effective anti-dengue treatment: A review. *Journal of Medical Virology*, *92*(8), 941–955.
- Niederländer, H. A. G., van Beek, T. A., Bartasiute, A., & Koleva, I. I. (2008). Antioxidant activity assays *on-line* with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1210*(2), 121–134.
- NN., A. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, *04*(03), 3–8.
- Nováková, L., Pavlík, J., Chrenková, L., Martinec, O., & Červený, L. (2018). Current antiviral drugs and their analysis in biological materials—Part I: Antivirals against respiratory and

- herpes viruses. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 400–416.
- Ocazonez, R. E., Meneses, R., Torres, F. Á., & Stashenko, E. (2010). Virucidal activity of Colombian *Lippia essential* oils on dengue virus replication *in vitro*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(3), 304–309.
- Oh, M. C., Piao, M. J., Fernando, P. M. D. J., Han, X., Hewage, S. R. K. M., Park, J. E., Ko, M. S., Jung, U., Kim, I. G., & Hyun, J. W. (2016). Baicalein protects human skin cells against ultraviolet B-induced oxidative stress. *Biomolecules and Therapeutics*, 24(6), 616–622.
- Olszowy-Tomczyk, M. (2020). Synergistic, antagonistic and additive antioxidant effects in the binary mixtures. In *Phytochemistry Reviews* (Vol. 19, Issue 1). Springer Netherlands.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 4629–4626.
- Pabón, L. C., Rodríguez, M. F., & Hernández-Rodríguez, P. (2017). Plantas medicinales que se comercializan en Bogotá (Colombia) para el tratamiento de enfermedades infecciosas. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 16(6), 529–546.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5.
- Panovska, T. K., Kulevanova, S., & Stefova, M. (2005). *In vitro* antioxidant activity of some Teucrium species (Lamiaceae). *Acta Pharmaceutica*, 55(2), 207–214.
- Paudel, K. R., & Kim, D. W. (2020). Microparticles-mediated vascular inflammation and its amelioration by antioxidant activity of baicalin. *Antioxidants*, 9(9), 1–23.
- Plant metabolism*. (2018). *Journal of Plant Physiology & Pathology* .
<https://www.scitechnol.com/plant/plant-metabolism.php>

- Plumb, G. W., Price, K. R., & Williamson, G. (1999). Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea. *Redox Report*, 4(1–2), 13–16.
- Prieto, P. B. (2021). *Antivirales, ¿Qué son y cómo funcionan?* Médico Plus. <https://medicoplus.com/medicina-general/antivirales>
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- Ranjbar, M., & Mahmoudi, C. (2017). A taxonomic revision of *Scutellaria* sect. *Lupulinaria* subsect. *Lupulinaria* (Lamiaceae) in Iran. *Feddes Repertorium*, 128(3–4), 63–101.
- Rasul, M. (2018). Extraction, isolation and characterization of natural products from medicinal plants. *International Journal of Basic Sciences and Applied Computing*, 2(6), 1–6.
- Re, R., Pellergrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9), 1231–1237.
- Riebel, M., Sabel, A., Claus, H., Xia, N., Li, H., König, H., Decker, H., & Fronk, P. (2017). Antioxidant capacity of phenolic compounds on human cell lines as affected by grape-tyrosinase and botrytis-laccase oxidation. *Food Chemistry*, 229, 779–789.
- Roy, M. K., Nakahara, K., Na Thalang, V., Trakoontivakorn, G., Takenaka, M., Isobe, S., & Tsushida, T. (2007). Baicalein, a flavonoid extracted from a methanolic extract of *Oroxylum indicum* inhibits proliferation of a cancer cell line *in vitro* via induction of apoptosis. *Pharmazie*, 62(2), 149–153.
- Salud, I. N. de. (2020). *Qué debe saber del dengue*. Instituto Nacional de Salud. https://www.ins.gov.co/buscador/noticias/ETV_jun_2016_multimedia/index.html

- Sarkar, P., Nath, K., & Banu, S. (2019). Modulatory effect of baicalein on gene expression and activity of antioxidant enzymes in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55(1), 1–11.
- Sarmiento, M. C. (2000). Enfermedades transmisibles en Colombia: cambios ambivalentes. *Rev. Salud Pública*, 2(1), 82–93.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Yoga Latha, L. (2011). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 8(1), 1–10.
- Schenk, T., Breel, G. J., Koevoets, P., Van Den Berg, S., Hogenboom, A. C., Irth, H., Tjaden, U. R., & Van Der Greef, J. (2003). Screening of natural products extracts for the presence of phosphodiesterase inhibitors using liquid chromatography coupled *on-line* to parallel biochemical detection and chemical characterization. *Journal of Biomolecular Screening*, 8(4), 421–429.
- Seo, O. N., Kim, G. S., Kim, Y. H., Park, S., Jeong, S. W., Lee, S. J., Jin, J. S., & Shin, S. C. (2013). Determination of polyphenol components of Korean *Scutellaria baicalensis* Georgi using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Contribution to overall antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1741–1750.
- Shang, X., He, X., He, X., Li, M., Zhang, R., Fan, P., Zhang, Q., & Jia, Z. (2010). The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(2), 279–313.
- Shen, J., Li, P., Liu, S., Liu, Q., Li, Y., Sun, Y., He, C., & Xiao, P. (2021a). Traditional uses, clinical studies, and ten-years research progress on phytochemistry and pharmacology, and clinical studies of the genus *Scutellaria*. *Journal of Ethnopharmacology*, 265(1), 113198.

- Shen, J., Li, P., Liu, S., Liu, Q., Li, Y., Sun, Y., He, C., & Xiao, P. (2021b). Traditional uses, ten-years research progress on phytochemistry and pharmacology, and clinical studies of the genus *Scutellaria*. *Journal of Ethnopharmacology*, 265(July 2020), 113198.
- Shi, S. Y., Zhang, Y. P., Jiang, X. Y., Chen, X. Q., Huang, K. L., Zhou, H. H., & Jiang, X. Y. (2009). Coupling HPLC to *on-line*, post-column (bio)chemical assays for high-resolution screening of bioactive compounds from complex mixtures. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 28(7), 865–877.
- Sierra Prada, L. J., Stashenko, E. E., & Martínez Morales, J. R. (2020). *Estudio de la composición química y evaluación de las actividades antioxidante y fotoprotectora de extractos de flores de plantas tropicales cultivadas en Colombia*. Universidad Industrial de Santander.
- Silva-Trujillo, L., Quintero-Rueda, E., Stashenko, E. E., Conde-Ocazonez, S., Rondón-Villarreal, P., & Ocazonez, R. E. (2022). Essential oils from Colombian plants: Antiviral potential against dengue virus based on chemical composition, *in vitro* and *in silico* analyses. *Molecules*, 27(20), 1–22.
- Sook Chi, Y., Sun Cheon, B., & Pyo Kim, H. (2001). Effect of wogonin, a plant flavone from *scutellaria radix*, on the suppression of cyclooxygenase-2 and the induction of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Biochemical Pharmacology*, 61(10), 1195–1203.
- Soundravally, R., Sankar, P., Bobby, Z., & Hoti, S. L. (2008). Oxidative stress in severe dengue viral infection: Association of thrombocytopenia with lipid peroxidation. *Platelets*, 19(6), 447–454.
- Stashenko, E. E. (2009). Aceites Esenciales. In *División de Publicaciones UIS* (División d).
- Subesta, D. E. (2003). *Preparative LC columns* (pp. 5–15). Waters.

<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/lcPrep.pdf>

- Sun, Y. X., Tang, Y., Wu, A. L., Liu, T., Dai, X. L., Zheng, Q. S., & Wang, Z. Bin. (2010). Neuroprotective effect of liquiritin against focal cerebral ischemia/reperfusion in mice via its antioxidant and antiapoptosis properties. *Journal of Asian Natural Products Research*, 12(12), 1051–1060.
- Tao, Y., Zhan, S., Wang, Y., Zhou, G., Liang, H., Chen, X., & Shen, H. (2018). Baicalin, the major component of traditional Chinese medicine *Scutellaria baicalensis* induces colon cancer cell apoptosis through inhibition of oncomiRNAs. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11.
- Tercero, M., & Olalla, R. (2008). Enfermedades tropicales transmitidas por vectores. Medidas preventivas y profilaxis. *Offarm*, 27(6), 78–87.
- The NIST mass spectral search program* (2.3). (2017). Standard reference data program of the national institute of standards and technology.
- Tian, Y., Li, X., Xie, H., Wang, X., Xie, Y., Chen, C., & Chen, D. (2018). Protective mechanism of the antioxidant baicalein toward hydroxyl radical-treated bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Molecules*, 23(1), 1–12.
- Ueno, H., Yamakura, S., Arastoo, R. S., Oshima, T., & Kokubo, K. (2014). Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullerenols using β -Carotene bleaching assay. *Journal of Nanomaterials*, 2014(Figure 1).
- Vallejo, W. A., Diaz Uribe, C. D., Oliveros, G., & Muñoz, A. (2016). Study of scavenging capacity of naringin extracted from *Citrus aurantium* peel against free radicals. *Prospectiva*, 14(2), 31.
- Wang, B., Liu, X., Zhou, A., Meng, M., & Li, Q. (2015). Simultaneous analysis of coumarin derivatives in extracts of *Radix Angelicae pubescentis* (Duhuo) by HPLC-DAD-ESI-MSn technique. *The Royal Society of Chemistry*, 3(1), 10715–10722.

- Wang, Y., Xue, X., Xiao, Y., Zhang, F., Xu, Q., & Liang, X. (2008). Purification and preparation of compounds from an extract of *Scutellaria barbata* D. Don using preparative parallel high performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, *31*(10), 1669–1676.
- Wang, Z. L., Wang, S., Kuang, Y., Hu, Z. M., Qiao, X., & Ye, M. (2018). A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis*. *Pharmaceutical Biology*, *56*(1), 465–484.
- Waters, J. L. (1971). Preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, *9*(7), 428–431.
- Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Eisner, R., Young, N., Gautam, B., Hau, D. D., Psychogios, N., Dong, E., Bouatra, S., Mandal, R., Sinelnikov, I., Xia, J., Jia, L., Cruz, J. A., Lim, E., Sobsey, C. A., Shrivastava, S., Huang, P., Forsythe, I. (2009). *The human metabolome database*. Nucleic Acids Res. <https://hmdb.ca/>
- Wu, W., Yan, C., Li, L., Liu, Z., & Liu, S. (2004). Studies on the flavones using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1047*(2), 213–220.
- Xiao, J. (2017). Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(9), 1874–1905.
- Xie, L., Deng, Z., Zhang, J., Dong, H., Wang, W., Xing, B., & Liu, X. (2022). Comparison of flavonoid *O*-Glycoside, *C*-Glycoside and their aglycones on antioxidant capacity and metabolism during *in vitro* digestion and *in vivo*. *Foods*, *11*(882), 1–17.
- Zandi, K., Lim, T. H., Rahim, N. A., Shu, M. H., Teoh, B. T., Sam, S. S., Danlami, M. B., Tan, K. K., & Abubakar, S. (2013). Extract of *Scutellaria baicalensis* inhibits dengue virus replication. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *13*(91).

- Zandi, K., Teoh, B. T., Sam, S. S., Wong, P. F., Mustafa, M. R., & AbuBakar, S. (2012). Novel antiviral activity of baicalein against dengue virus. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *12*.
- Zarena, A. S., & Sankar, K. U. (2012). Phenolic acids, flavonoid profile and antioxidant activity in mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) pericarp. *Journal of Food Biochemistry*, *36*(5), 627–633.
- Zeng, G. F., & Chen, Z. L. (1957). Studies on the flavonoids of the Chinese traditional medicine V: the chemical compounds of the genus *Scutellaria*. *Yao Xue Xue Bao*, *1*(1), 47.
- Zengin, G., Llorent-Martínez, E. J., Molina-García, L., Fernández-de Córdova, M. L., Aktumsek, A., Uysal, S., Rengasamy, K. R. R., Aumeeruddy, M. Z., Bahadori, M. B., & Mahomoodally, M. F. (2019). Chemical profile, antioxidant, and enzyme inhibitory properties of two *Scutellaria* species: *S. orientalis* L. and *S. salviifolia* Benth. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *71*(2), 270–280.
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, *13*(1), 1–26.
- Zhang, X. H., Zhou, C. C., Li, C. Y., Hua, Y., Li, K., Wei, P., & He, M. F. (2021). Isoliquiritin exert protective effect on telencephalon infarction injury by regulating multi-pathways in zebrafish model of ischemic stroke. *Phytomedicine*, *83*(December 2020), 153469.
- Zhao, Y., Zhang, L., Wu, Y., Dai, Q., Zhou, Y., Li, Z., Yang, L., Guo, Q., & Lu, N. (2018). Selective anti-tumor activity of wogonin targeting the Warburg effect through stabilizing p53. *Pharmacological Research*, *135*(June), 49–59.
- Zhu, C., Zhao, Y., Wu, X., Qiang, C., Liu, J., Shi, J., Gou, J., Pei, D., & Li, A. (2020). The therapeutic role of baicalein in combating experimental periodontitis with diabetes via Nrf2

antioxidant signaling pathway. *Journal of Periodontal Research*, 55(3), 381–391.

Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310–316.