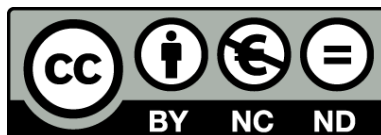




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**Fitocaracterización y actividad biológica
de extractos de helechos de las familias *Polypodiaceae*
y *Aspleniaceae* procedentes de las montañas
de Prades (Tarragona)**

Adrià Farràs Martínez



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0. Spain License.**



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

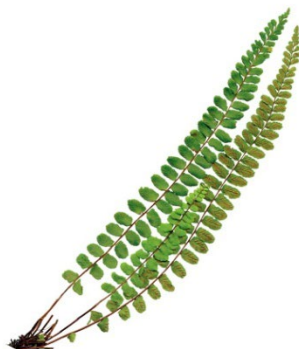
Fitocaracterización y actividad biológica de extractos de helechos de las familias *Polypodiaceae* y *Aspleniaceae* procedentes de las montañas de Prades (Tarragona)



Polypodium vulgare L.



Asplenium adiantum-nigrum L.



Asplenium trichomanes L.



Ceterach officinarum Willd.

Adrià Farràs Martínez

2022



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ
Departament de Bioquímica i Fisiologia

PROGRAMA DE DOCTORAT:
Recerca, Desenvolupament i Control de Medicaments

Fitocaracterización y actividad biológica de extractos de helechos de las familias *Polypodiaceae* y *Aspleniaceae* procedentes de las montañas de Prades (Tarragona)

Memoria presentada por Adrià Farràs Martínez para optar al título de Doctor por la Universitat de Barcelona

Directores

Dra. Montse Mitjans Arnal

Dr. Víctor López Ramos

Doctorando

Adrià Farràs Martínez

Adrià Farràs Martínez

2022

Dedicatorias y agradecimientos

“No hi ha herba ni herbona, que no tingui virtut bona”

- Joan Bellmunt Figueres.

A todas las personas que han compartido este viaje en el mundo de las pteridófitas.

Índice

"Siempre que enseñes, enseña a la vez a dudar de lo que enseñas"

- José Ortega Grasset.

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN	XVII
INTRODUCCIÓN	1
1. MONTAÑAS DE PRADES, UN PULMÓN DE BIODIVERSIDAD VEGETAL EN TARRAGONA	3
1.1. Montañas de Prades	3
1.2. Principales helechos de las montañas de Prades	4
1.3. Usos tradicionales de los cuatro principales helechos de las montañas de Prades y en el resto de España	9
2. IMPORTANCIA DE LA CONSERVACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD	10
3. ASPECTOS FITOQUÍMICOS EN PLANTAS	17
4. POLIFENOLES, LOS PRINCIPALES FITOQUÍMICOS	19
4.1. Ácidos fenólicos	20
4.2. Flavonoides	20
4.3. Actividad reductora de los polifenoles	21
4.3.1. Biodisponibilidad de los polifenoles	23
4.3.2. Efecto prooxidante de los polifenoles	23
5. SISTEMAS ANTIOXIDANTES	24
5.1. Definición de antioxidante	24
5.2. Sistemas antioxidantes	24
5.2.1. Antioxidantes enzimáticos	25
5.2.1.1. Antioxidantes enzimáticos primarios	25
5.2.1.2. Antioxidantes enzimáticos secundarios	26
5.2.2. Antioxidantes no enzimáticos	27
5.2.2.1. Antioxidantes no enzimáticos endógenos	27
5.2.2.2. Antioxidantes no enzimáticos exógenos	27
6. ESTRÉS OXIDATIVO	28
7. MEDICINA REDOX Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN FISIOPATOLOGÍA	32
8. CÁNCER DE PIEL, UN CÁNCER EN EXPANSIÓN A NIVEL MUNDIAL	33
8.1. Estrecha relación de los procesos cancerosos con las ERO	33
8.2. Cáncer de piel	34
8.2.1. Luz ultravioleta, un potencial desencadenante del cáncer de piel	34
8.3. Estrategias de protección frente el cáncer de piel	35
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
PUBLICACIONES	41
PUBLICACIÓN 1 → EVALUATION OF ANTI-TYROSINASE AND ANTIOXIDANT PROPERTIES OF FOUR FERN SPECIES FOR POTENTIAL COSMETIC APPLICATIONS	43
PUBLICACIÓN 2 → <i>POLYPODIUM VULGARE</i> L. (<i>POLYPODIACEAE</i>) AS A SOURCE OF BIOACTIVE COMPOUNDS: POLYPHENOLIC PROFILE, CYTOTOXICITY AND CYTOPROTECTIVE PROPERTIES IN DIFFERENT CELL LINES	59
PUBLICACIÓN 3 → CHEMICAL COMPOSITION AND CYTOPROTECTIVE ACTIVITIES OF METHANOLIC EXTRACT OF <i>ASPLENIUM ADIANTUM-NIGRUM</i> L. (<i>ASPLENIACEAE</i>)	77
PUBLICACIÓN 4 → EXPLORING WILD <i>ASPLENIACEAE</i> FERNS AS SAFETY SOURCES OF POLYPHENOLS: THE CASE OF <i>ASPLENIUM TRICHOMANES</i> L. AND <i>CETERACH OFFICINARUM</i> WILLD.	99
DISCUSIÓN GLOBAL DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS	119

CONCLUSIONES	135
BIBLIOGRAFÍA	139
APÉNDICES	153
APÉNDICE 1.....	155
APÉNDICE 2.....	157
APÉNDICE 3.....	161
PERMISOS DE USO DEL MATERIAL GRÁFICO	163
PERMISO DE USO DEL MATERIAL GRÁFICO FIGURAS 11, 12 Y 13	165
PERMISO DE USO DEL MATERIAL GRÁFICO FIGURA 19	167
PERMISO DE USO DEL MATERIAL GRÁFICO FIGURA 21	169
PERMISO DE USO DEL MATERIAL GRÁFICO FIGURA 23	171

Índice de figuras

“Cada detall compleix un propòsit i en el conjunt resulta la creació perfecte”

- Carles Mampel Juncosa.

FIGURA 1: LOCALIZACIÓN DE LAS MONTAÑAS DE PRADES (FIGURA 1.A) Y FÓSIL DEL PEZ ALCOVERIA BREVIS (FIGURA 1.B). CEDIDAS GENTILMENTE POR “AJUNTAMENT D’ALCOVER” Y “MUSEU D’ALCOVER”, RESPECTIVAMENTE.	4
FIGURA 2: DISTRIBUCIÓN DE LOS PRINCIPALES HELECHOS EN LAS MONTAÑAS DE PRADES OBTENIDA A PARTIR DE UN ESTUDIO DE LOS HELECHOS EN LA PENÍNSULA IBÉRICA Y EN EL ARCHIPIÉLAGO BALEAR: POLYPODIUM VULGARE (A), ASPLENIUM ADIANTUM-NIGRUM (B), ASPLENIUM TRICHOMANES TRICHOMANES EQUIVALENTE A ASPLENIUM TRICHOMANES (C) Y CETERACH OFFICINARUM EQUIVALENTE A ASPLENIUM CETERACH (D) (RAMOS-GUTIÉRREZ ET AL., 2021).	5
FIGURA 3: FRONDES FRESCAS DE POLYPODIUM VULGARE (A), ASPLENIUM ADIANTUM-NIGRUM (B), ASPLENIUM TRICHOMANES (C) Y CETERACH OFFICINARUM (D).	7
FIGURA 4: REPRODUCCIÓN SEXUAL DE LOS HELECHOS (CAMPBELL, REECE, TAYLOR, SIMON, & DICKEY, 2009).	10
FIGURA 5: ESTRUCTURA DEL ESPORÓFITO DE LOS HELECHOS (VASCO, MORAN, & AMBROSE, 2013).	11
FIGURA 6: DIVISIONES DE LAS CRIPTÓGAMAS VASCULARES CLASIFICADAS ENTRE PRIMITIVAS Y DESARROLLADAS.	12
FIGURA 7: CLASES Y ÓRDENES DE LA DIVISIÓN PTERIDOPHYTA.	14
FIGURA 8: FRONDE JOVEN EN DESARROLLO CIRCADIANO (A) Y TALLO TRANSVERSAL HELECHOS EUPOLIPOIDES Y NO EUPOLIPOIDES (B) (VASCO ET AL., 2013). LOS HELECHOS DE LA FIGURA 8.B SON: (A) EUPODIUM LAEVE (MARATTIACEAE), (B) DICKSONIA SELLOWIANA (DICKSONIACEAE), (C) SACCOLOMA CHARTACEUM (SACCOLOMATACEAE), (D) ACROSTICHUM DANAEIFOLIUM (PTERIDACEAE), (E) DIPLAZIUM HIANIS (EUPOLIPOIDE II, ATHYRIACEAE) Y (F) POLYSTICHUM CONCINNUM (EUPOLIPOIDE I, DRYOPTERIDACEAE).	15
FIGURA 9: FAMILIAS DE LOS HELECHOS LEPTOSPORANGIADOS DE LA TERCERA RADIACIÓN (ORDEN POLYPODIALES).	16
FIGURA 10: CLASIFICACIÓN DE LOS FITOQUÍMICOS.	18
FIGURA 11: ESTRUCTURA DE LOS ÁCIDOS FENÓLICOS. FIGURA MODIFICADA A PARTIR DE LEOPOLDINI ET AL. 2011 (LEOPOLDINI ET AL., 2011).	20
FIGURA 12: ESTRUCTURA DE LOS FLAVONOIDES. FIGURA MODIFICADA A PARTIR DE LEOPOLDINI ET AL. 2011 (LEOPOLDINI ET AL., 2011).	21
FIGURA 13: PRINCIPALES MECANISMOS DE LA ACCIÓN ANTIOXIDANTE DE LOS POLIFENOLES: 1 TRANSFERENCIA DE UN ÁTOMO DE HIDRÓGENO (TAH) O “HIDROGEN ATOM TRANSFER (HAT)”, 2 TRANSFERENCIA DE UN ELECTRÓN (TUE) O “SINGLE ELECTRON TRANSFER (SET)” Y QUELACIÓN DE METALES DE TRANSICIÓN (QMT) O “TRANSITION METALS CHELATION (TMC)” (LEOPOLDINI ET AL., 2011).	21
FIGURA 14: BIODISPONIBILIDAD DE LOS POLIFENOLES (WILLIAMSON, 2017).	23
FIGURA 15: CLASIFICACIÓN ENZIMÁTICA DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE.	25
FIGURA 16: REACCIONES DE LOS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS PRIMARIOS. FIGURA MODIFICADA A PARTIR DE SHARIFI-RAD ET AL. 2020 (SHARIFI-RAD ET AL., 2020).	26
FIGURA 17: ACTUACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS SECUNDARIOS GLUCOSA REDUCTASA (GR) Y GLUCOSA-6-FOSFATODESHIDROGENASA (G-6-PDG) EN LA REGENERACIÓN DE LA ENZIMA PRIMARIA GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX) (SHARIFI-RAD ET AL., 2020).	27
FIGURA 18: REACCIONES DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ERO).	30
FIGURA 19: EQUILIBRIO ENTRE LAS “REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS)” (EQUIVALENTE A ERO EN CASTELLANO), EL SISTEMA ANTIOXIDANTE DE DEFENSA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO. SITUACIÓN (A): CONDICIÓN INICIAL HOMEOSTÁTICA, LOS NIVELES DE ROS Y ANTIOXIDANTES (AO) SON BAJOS, CON DEFENSAS ADECUADAS PARA EQUILIBRAR LA PRODUCCIÓN DE ROS DE MANERA QUE NO HAYA ESTRÉS OXIDATIVO. SITUACIÓN (B): UN AUMENTO EN LA PRODUCCIÓN DE ROS PUEDE EXCEDER INICIALMENTE LA CAPACIDAD DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE, DANDO LUGAR A UN PERÍODO DE ESTRÉS OXIDATIVO. SITUACIÓN (C): SI EL AUMENTO DE ROS ES PEQUEÑO, PUEDE IR ACOMPAÑADO DE UN MAYOR DESPLIEGUE DE ANTIOXIDANTES, EVITANDO UN MAYOR ESTRÉS OXIDATIVO. SI LA ELEVACIÓN DE ROS ES SOLO TEMPORAL, HABRÁ UN RETORNO A (A), LA POSICIÓN HOMEOSTÁTICA. SITUACIÓN (D): LA EXPOSICIÓN PROLONGADA A UN AUMENTO DE ROS PUEDE INDUCIR AL ORGANISMO A AUMENTAR PERMANENTEMENTE SUS NIVELES DE ANTIOXIDANTES, LO QUE LO HACE MÁS CAPAZ DE HACER FRENTE A FUTUROS SUCESOS OXIDATIVOS (MONAGHAN ET AL., 2009).	31
FIGURA 20: EVOLUCIÓN DEL CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO DEL AÑO 1985 AL AÑO 2007.	32
FIGURA 21: PLEIOTROPÍA DE LA SEÑAL REDOX EN LA BIOLOGÍA REDOX. EN AMARILLO CLARO ESTÁN REPRESENTADOS LOS EXPOSOMAS Y EN AZUL OSCURO LAS DIANAS TERAPÉUTICAS (SIES ET AL., 2020).	33
FIGURA 22: TIPOS DE CÁNCER DE PIEL.	34
FIGURA 23: PODER DE PENETRACIÓN DE LA LUZ ULTRAVIOLETA A, B Y C EN LAS CAPAS DE LA PIEL (MAVERAKIS, MIYAMURA, BOWEN, CORREA, ONO, & GOODARZI, 2010).	35

Índice de tablas

“Caminante no hay camino, se hace camino al andar”

- Antonio Machado Ruiz.

TABLA 1: RASGOS MORFOLÓGICOS DE LA GENERACIÓN ESPOROFÍTICA DE LAS FAMILIAS POLYPODIACEAE Y ASPLENIACEAE.	6
TABLA 2: FRONDES DESECADAS DE LOS PRINCIPALES HELECHOS DE LAS MONTAÑAS DE PRADES CON EL NOMBRE VULGAR.	8
TABLA 3: PRINCIPALES ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ERO) EN FORMA NO RADICALARIA Y RADICALARIA. *A MENUDO SE INCLUYEN COMO ERO, PERO TAMBIÉN SE PUEDEN CLASIFICAR COMO ERN.	29
TABLA 4: PRINCIPALES ESPECIES REACTIVAS DEL NITRÓGENO (ERN) EN FORMA NO RADICALARIA Y RADICALARIA. *A MENUDO SE INCLUYEN COMO ERO, PERO TAMBIÉN SE PUEDEN CLASIFICAR COMO ERN.	30

Abreviaturas

“L’estudi etnobotànic popular, és especialment urgent, perquè els canvis d’estructura, tan ràpids, de la nostra societat fan que es dilueixin ràpidament les idees que posseïa el poble i la manera d’expressar-les”

- Oriol de Bolòs Capdevila.

- AA → *Asplenium adiantum-nigrum* L.
- AAH → Extracto hexánico de las frondes de *Asplenium adiantum-nigrum* L.
- AAM → Extracto metanólico de las frondes de *Asplenium adiantum-nigrum* L.
- ADN → Ácido desoxirribonucleico
- AT → *Asplenium trichomanes* L.
- ATH → Extracto hexánico de las frondes de *Asplenium trichomanes* L.
- ATM → Extracto metanólico de las frondes de *Asplenium trichomanes* L.
- A549 → *Human Caucasian lung carcinoma*
- CAT → Catalasa
- CBC → Carcinoma basocelular
- CEC → Carcinoma espinocelular
- Cl⁻ → Cloro
- CO → *Ceterach officinarum* Willd.
- COH → Extracto hexánico de las frondes de *Ceterach officinarum* Willd.
- COM → Extracto metanólico de las frondes de *Ceterach officinarum* Willd.
- CPM → Cáncer de piel tipo melanoma
- CPNM → Cáncer de piel tipo no melanoma
- CPZ → Clorpromazina
- DCF → *2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate*
- DMEM → *Dulbecco's modified eagle's medium*
- DPPH → *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*
- ECACC → *European collection of authenticated cell cultures*
- EDE → Energía disociación del enlace
- EMA → *European medicines agency*
- ERN → Especies reactivas del nitrógeno
- ERO → Especies reactivas del oxígeno
- FDA → *Food and drug administration*
- FI → *Fluorence intensity*
- GAE → *Gallic acid equivalents*
- GPx → Glutación peroxidasa
- GR → Glutación reductasa
- GSH → Glutación
- GSSG → Glutación oxidado
- G-6-PDG → Glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa
- HaCaT → *Spontaneously immortalized human keratinocyte cell line*
- HeLa → *Human cervix epitheloid carcinoma*
- HepG2 → *Human Caucasian hepatocyte carcinoma*
- HOCl → Ácido hipocloroso
- HPLC-DAD → *High performance liquid chromatography by diode array detection*
- HPLC-MS/MS → *High performance liquid chromatography by tandem mass spectrometry*
- H₂O₂ → Peróxido de hidrógeno
- MCF-7 → *Human Caucasian breast adenocarcinoma*
- MPO → Mieloperoxidasa
- MTC → Medicina tradicional y complementaria
- MTT → *2,5-diphenyl-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) tetrazolium bromide*

- NBT → *Nitrotetrazolium blue chloride*
- NF-κB → Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- NO[•] → Óxido nítrico
- OH[•] → Radical hidroxilo
- OECD → *Organisation for economic cooperation and development*
- OMS → Organización mundial para la salud
- ONOO⁻ → Anión peroxinitrito
- ORAC → *Oxygen radical absorbance capacity*
- O₂ → Oxígeno
- O₂^{•-} → Anión/Radical superóxido
- PI → Potencial de ionización
- PL → *Polypodium leucotomos*
- PLE → Extracto acuoso de las frondes de *Polypodium leucotomos*
- PRDX → Peroxirredoxina
- PV → *Polypodium vulgare* L.
- PVH → Extracto hexánico de las frondes de *Polypodium vulgare* L.
- PVM → Extracto metanólico de las frondes de *Polypodium vulgare* L.
- QMT → Quelación de metales de transición
- RNS → *Reactive nitrogen species*
- ROS → *Reactive oxygen species*
- RO₂[•] → Radical peroxilo
- SOD → Superóxido dismutasa
- TAH → Transferencia de un átomo de hidrógeno
- TE → *Trolox equivalents*
- TLC → *Thin layer chromatography*
- TPC → *Total phenolic content*
- Trx → Tiorredoxina
- TUE → Transferencia de un electrón
- UV → Ultravioleta
- X/XO → *Xanthine/xanthine oxidase*
- 3T3 → NIH 3T3, *mouse embryo fibroblast*

Resumen

“Las tierras pertenecen a sus dueños, pero el paisaje solo a aquellos que saben vivir en él”

- Upton Sinclair.

Desde tiempos prehistóricos los humanos han empleado sustancias provenientes de la naturaleza para la prevención y tratamiento de enfermedades. Estos recursos con actividad biológica pueden obtenerse de fuentes diversas, pero la mayoría de ellos son de origen vegetal. Actualmente muchas de las principales medicinas tradicionales, especialmente las orientales, han descrito el uso de determinadas especies de helechos para el tratamiento de enfermedades de distinta etiología. Aunque existen pocos trabajos de investigación que relacionen la actividad biológica de los helechos con sus usos medicinales en comparación con otras especies vegetales, las principales actividades biológicas documentadas incluyen actividad antioxidante, anticancerígena, quimiopreventiva, antidiabética, antiviral, antiinflamatoria, antimicrobiana, cicatrizante y protectora frente enfermedades neurodegenerativas. No obstante, los helechos son un taxón todavía poco estudiado desde la etnobotánica y la bioprospección. Este hecho posiciona los extractos de helechos como una nueva fuente de inspiración y aislamiento de nuevos fitoquímicos con un potencial terapéutico aún por determinar.

La abundante flora de la región de los Pirineos Aragoneses y Catalanes ha permitido multitud de investigaciones etnobotánicas que describen una diversidad de especies de helechos. Por ello, la zona de las montañas de Prades es en la actualidad un potencial reservorio para la realización de estudios etnobotánicos y de bioprospección.

En la presente investigación se ha realizado una primera bioprospección de extractos metanólicos y hexánicos de las frondes de los cuatro principales helechos de las montañas de Prades que son: *Polypodium vulgare* L., *Asplenium adiantum-nigrum* L., *Asplenium trichomanes* L. y *Ceterach officinarum* Willd. Se ha determinado e identificado estos cuatro principales helechos en la zona de las montañas de Prades, se han recolectado para obtener el correspondiente extracto metanólico y hexánico de sus frondes. Posteriormente se ha realizado la fitocaracterización por cromatografía en capa fina (CCF, del inglés *thin layer chromatography (TLC)*) con la paralela evaluación de la actividad antioxidante y anti-tirosinasa *in chemico*. De ello se ha concluido que la extracción metanólica presenta mejor rendimiento y que los extractos metanólicos son los que presentan mayor capacidad antioxidante y anti-tirosinasa.

Los correspondientes extractos metanólicos han sido fitocaracterizados por cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a un detector de diodos (CLAE-DD, del inglés *high performance liquid chromatography by diode array detection (HPLC-DAD)*) y también acoplado a un detector de espectrometría de masas en tándem (CLAE-EM, del inglés *high performance liquid chromatography by tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)*). Así se ha determinado que *P. vulgare* y *C. officinarum* son ricos en ácidos fenólicos y que su actividad antioxidante se podría asociar al ácido clorogénico. Mientras que *A. adiantum-nigrum* es el que presenta menor cantidad de polifenoles y *A. trichomanes* es la única especie en la cual los flavonoides representan la mayoría de los fitoquímicos determinados.

Finalmente se ha evaluado su citotoxicidad, fototoxicidad y actividad protectora *in vitro* frente la agresión oxidativa en las líneas celulares 3T3 y HaCaT. En paralelo, se determinó la capacidad antiproliferativa de estos extractos metanólicos mediante la evaluación de la citotoxicidad en líneas tumorales humanas como las HeLa, HepG2, MCF-7 y A549. Los extractos, en general, presentan poca actividad tóxica en los ensayos realizados en las células no tumorales y se intuye capacidad de reparación celular en 3T3, sobre todo en el caso de *A. adiantum-nigrum* que además induce un incremento de la producción de ROS.

Una vez determinado el perfil fitoquímico de los extractos de las frondes de las cuatro principales especies de helechos de las montañas de Prades hay una relación de la composición que justifica las actividades *in chemico* e *in vitro* determinadas.

Sin embargo, quedan todavía aspectos a clarificar sobre la actividad de los extractos de estos helechos, como la potencial capacidad de reparación celular y el posible aumento de la biogénesis mitocondrial observada para *A. adiantum-nigrum* o el uso tradicional como cicatrizante de *P. vulgare* y su directa relación con su composición. Por todo ello, hay que continuar investigando otras actividades biológicas de los extractos, así como acabar de perfilar su composición fitoquímica y aportar la base científica de sus usos tradicionales en medicina y veterinaria.

Introducción

“Nature made ferns for pure leaves to show what she could do in that line”

- Henry David Thoreau.

1. Montañas de Prades, un pulmón de biodiversidad vegetal en Tarragona

1.1. Montañas de Prades

Frente a la zona del *Camp de Tarragona*, una comarca natural formada por las actuales comarcas *Alt Camp*, *Baix Camp* y *Tarragonès*, emerge el principal sistema montañoso con orientación en dirección NE-SW del Sistema Prelitoral Catalán conocido como los *Catalànids*. La población de Prades situada en el corazón de este sistema montañoso otorga la denominación de esta zona como las montañas de Prades (coordenadas: 41°17'34"N 1°02'42"E). Este conjunto orográfico se divide en tres grandes subunidades por la acción erosiva de sus ríos donde emerge una orografía con una altimetría superior a los 1.000 metros limitados en la zona norte-este por el *Tossal de la Baltasana* (1.201 metros), que es el punto más elevado de estas montañas, en el sur con el *Puig de la Mussara* (1.054 metros) y por el norte-oeste por los *Plans de la Guàrdia* (1.140 metros) (Batet, Cartanyà, Castells, Piñas, & Salat, 2011b). Estas montañas presentan una superficie de alrededor de 260 km² que administrativamente engloba las comarcas: *Alt Camp* (vertiente meridional oriental), *Baix Camp* (vertiente meridional occidental), *Conca de Barberà* (el núcleo y la vertiente septentrional) y *Priorat* (vertiente occidental) como se observa en la **Figura 1.a**.

Según el origen del nacimiento de los ríos localizamos el Brugent, el Montsant y el Siurana que nacen en el centro del conjunto orográfico, mientras que el Francolí y el Glorieta nacen en el término municipal de las poblaciones de Vilanova de Prades y Mont-ral, respectivamente.

Geológicamente la zona presenta terrenos del Siluriano y el Carbonífero del Paleozoico y por el Triásico y el Jurásico del Mesozoico. La primera es una zona con poco accidente orográfico mientras que el segundo presenta un elevado accidente orográfico como es la zona del estrecho de la Ribera. En los *Plans de la Guàrdia* se encuentra el *Muschelkalk*, zona donde se extrae la dolomía tabulada de Alcover (piedra de Alcover) y donde se encuentran fósiles de gran valor como el pez *Alcoveria brevis* (**Figura 1.b**) y el *Cosesaurus aviceps* que es un ancestro de las aves actuales (Domingo & Borau, 1998).

El clima predominante es el mediterráneo con inviernos suaves y veranos calurosos. No obstante, en los puntos más elevados el clima se considera ligeramente continental. La combinación de una altura elevada con la proximidad de la *Costa Daurada* junto con una amplia cuenca hidrográfica, conllevan a una gran biodiversidad y cantidad vegetal propia del ecosistema característico del sistema pre-Pirineo Catalán. Debido a la baja presión humana, consecuencia de la decreciente densidad de población junto con la menguante actividad agrícola e industrial, la vegetación está bien conservada. De ello deriva que en la actualidad se encuentre una robleda de roble rebollo (*roure de reboll*) *Quercus pyrenaica* Willd. situada en la zona norte el macizo en el *Tossal de la Baltasana*. Los robles juntamente con las encinas son los árboles predominantes siendo el máximo exponente la encina *Quercus ilex* L. Pero también cabe destacar la presencia de *Castanea sativa* Mill., nombre científico del castaño, y pinedas representadas principalmente por *Pinus halepensis* Mill. y en menor presencia de *Pinus nigra* J.F.Arnold, *Pinus pinaster* Aiton y *Pinus pinea* L. En las zonas umbrías encontramos gran diversidad de arbustos y hierbas destacando *Taxus baccata* L. y *Ilex aquifolium* L. (Domingo et al., 1998).

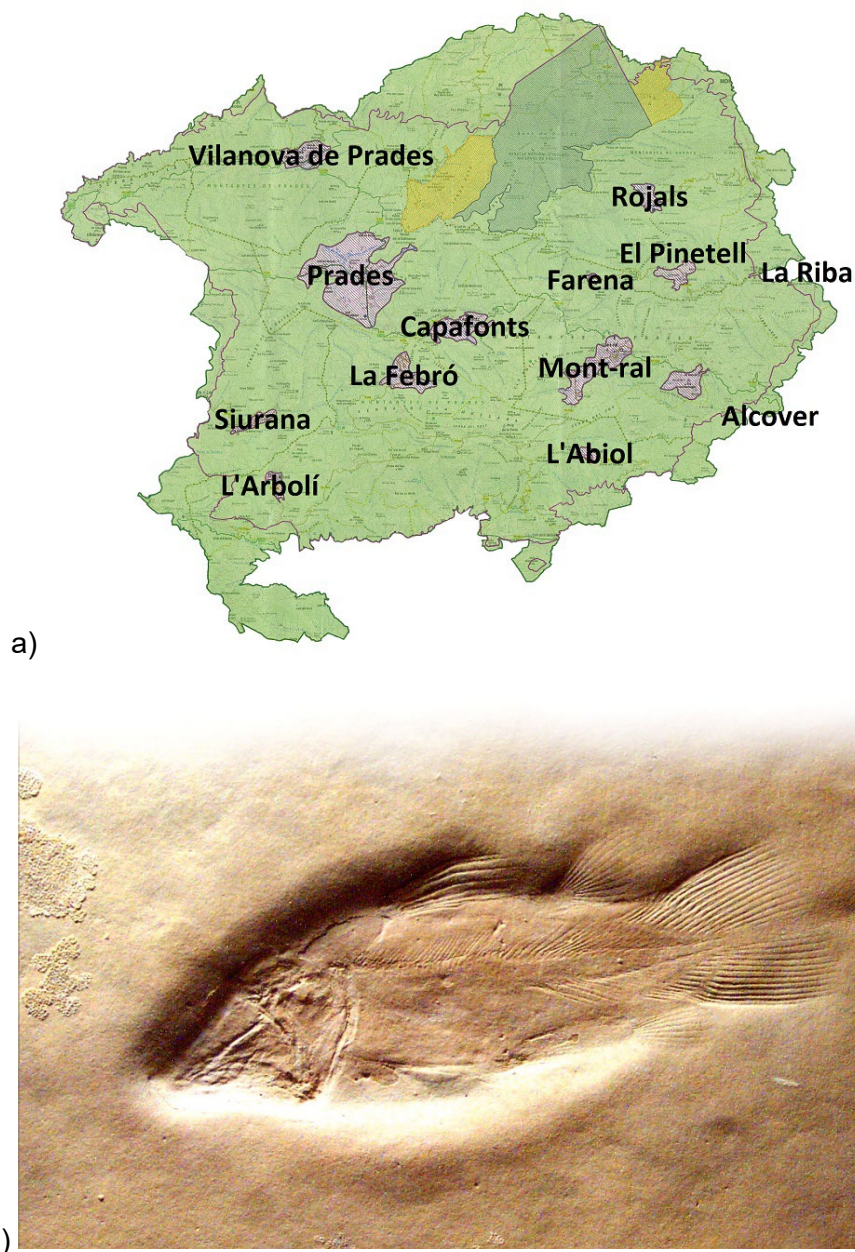


Figura 1: Localización de las montañas de Prades (Figura 1.a) y fósil del pez *Alcoveria brevis* (Figura 1.b). Cedidas gentilmente por "Ajuntament d'Alcover" y "Museu d'Alcover", respectivamente.

Las nieblas del atardecer, principalmente en los meses de verano debido a la inversión térmica, es un factor meteorológico fundamental para el mantenimiento de la elevada humedad que requieren las especies *Pteridophyta*.

1.2. Principales helechos de las montañas de Prades

Según las fuentes del Banco de Datos de Biodiversidad de Cataluña (BDBC) (Font Castell, de Càceres, Quadrada, Moreno, & Martí, 2015) y el *Atlas of the vascular flora of the Iberian Peninsula biodiversity hotspot* (AFLIBER) (Ramos-Gutiérrez et al., 2021), las principales especies de *Pteridophyta* de las montañas de Prades son: *Polypodium vulgare* L., *Asplenium adiantum-nigrum* L., *Asplenium trichomanes* L. y *Ceterach officinarum* Willd. Identificadas con las abreviaciones PV, AA, AT y CO respectivamente. Estos nombres científicos están validados por el organismo de validación taxonómica internacional, antes The Plant List (ThePlantList, 2021) y actualmente The World Flora

Online (TheWorldFloraOnline, 2022). Entre los cuales, *Asplenium trichomanes* igualmente se reconoce como *Asplenium trichomanes trichomanes* y *Ceterach officinarum* también se acepta como *Asplenium ceterach*. En la **Figura 2** se observa la distribución de estos helechos en la península Ibérica y en el archipiélago Balear. Observándose el siguiente orden creciente de distribución de los helechos en las montañas de Prades: *Asplenium trichomanes* < *Asplenium adiantum-nigrum* < *Polypodium vulgare* < *Ceterach officinarum*.

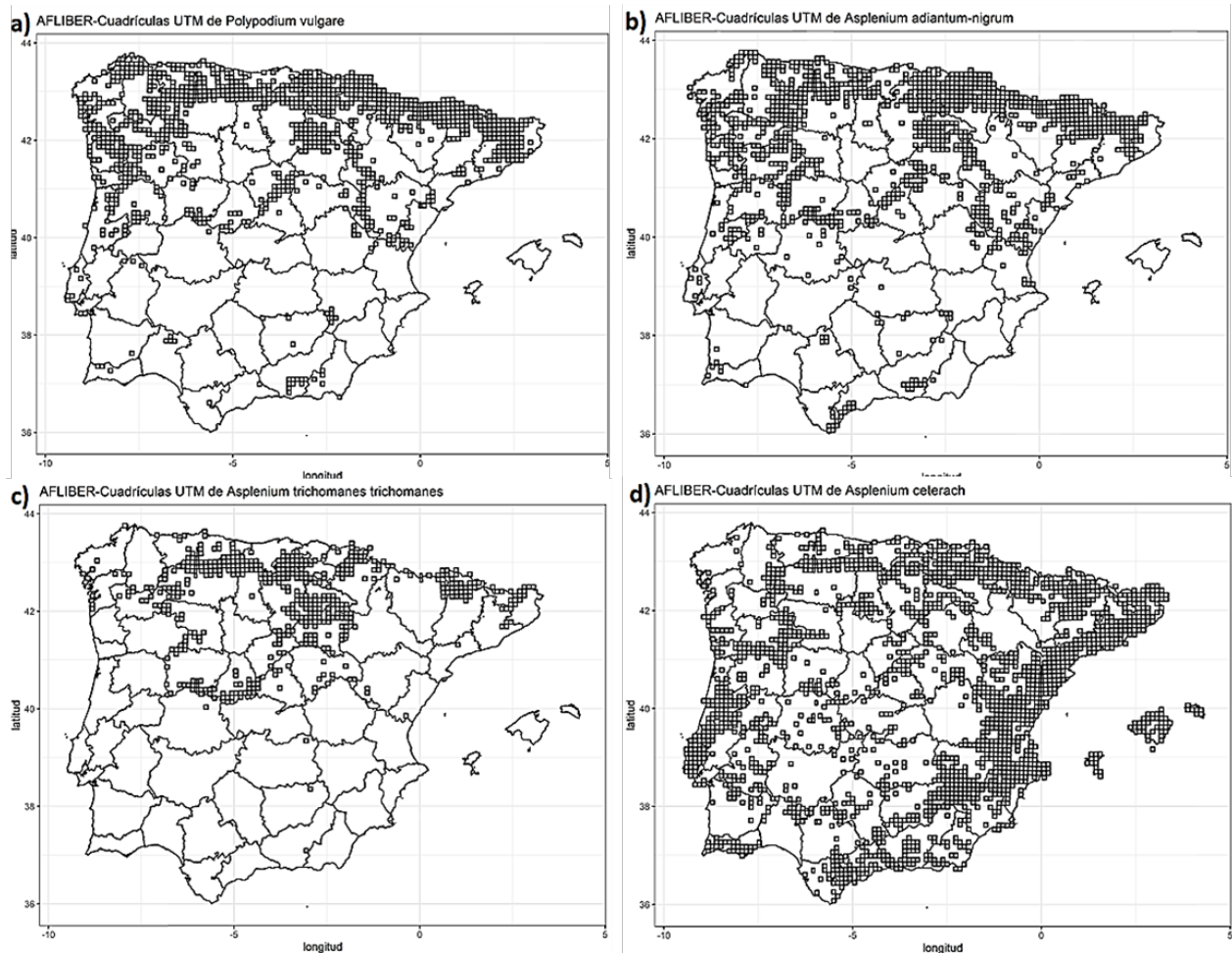


Figura 2: Distribución de los principales helechos en las montañas de Prades obtenida a partir de un estudio de los helechos en la península Ibérica y en el archipiélago Balear: *Polypodium vulgare* (a), *Asplenium adiantum-nigrum* (b), *Asplenium trichomanes trichomanes* equivalente a *Asplenium trichomanes* (c) y *Ceterach officinarum* equivalente a *Asplenium ceterach* (d) (Ramos-Gutiérrez et al., 2021).

Estas cuatro especies forman parte del grupo Eupolipoides de los cuales *Polypodium vulgare* L. es el único representante del suborden *Polypodiineae* (Eupolipoide I) dentro de la familia *Polypodiaceae*. Las tres especies restantes forman parte del suborden *Aspleniineae* (Eupolipoide II) dentro de la familia *Aspleniaceae*. Los rasgos morfológicos de la generación esporofítica (la fronde) de las familias *Polypodiaceae* y *Aspleniaceae* están resumidos en la **Tabla 1** (Smith, Pryer, Schuettpelz, Korall, Schneider, & Wolf, 2006).

Tabla 1: Rasgos morfológicos de la generación esporofítica de las familias *Polypodiaceae* y *Aspleniaceae*.

Rasgos morfológicos de la generación esporofítica		
Caracteres helecho	Familia <i>Polypodiaceae</i>	Familia <i>Aspleniaceae</i>
Rizoma	De largo a corto, dictiostela con presencia de vasos conductores menores, con escamas; la abscisión de los pecíolos es limpia cerca de su base o no.	Rastreros, dictiostela con ausencia de vasos conductores menores, ascendentes o suberectos, con escamas de clatrato en los ápices y bases de los pecíolos (a veces en otros ejes).
Láminas foliares	Monomórficas o dimórficas, en su mayoría simples a pinnatífidas o 1-pinnadas (rara vez más divididas). En ausencia de indumentos o de pelos y/o escamas en la fronde.	Monomórficas, generalmente sin pelos aciculares en los ejes o láminas. A menudo con pelos claviformes microscópicos.
Nerviación	A menudo anastomosadas o reticuladas, a veces con venas incluidas, o venas libres. Indumentos varios: de escamas, pelos o glándulas.	Pinnadas o bifurcadas, generalmente libres, con poca frecuencia reticuladas y luego sin vetillas incluidas.
Soro	Abaxial (raramente marginal), redondo a oblongo o elíptico, ocasionalmente alargado, o el esporangio acróstico, a veces profundamente incrustado. Sin cubierta, es exindusio.	Alargados (lineales) a lo largo de las venas, generalmente no adosados en la misma vena, generalmente con indusio lineal adherida lateralmente.
Esporangios	Con tallos generalmente largos de 1 a 3 hileras	Esporádicos largos, de 1 hilera.
Esporas	Hialinas a amarillentas, reniformes monolete o verdosas con globoso-tetraédrica trilete.	Reniformes monolete.

Visualmente a ojo humano las discrepancias principales son en la estructura de la fronde como se observa en la **Figura 3**. Así, la disposición y forma del soro son los caracteres más significativos en la identificación de especies en clave taxonómica, en donde el soro de las especies de la familia *Polypodiaceae* está desprovisto de indusio (un tejido membranoso que cubre el soro), y las de *Aspleniaceae* sí lo presentan. Las claves taxonómicas empleadas en el presente trabajo para la identificación de la fronde, fueron las descritas en *Claves para la determinación de plantas vasculares* (Bonnier & De Layens, 2002) en las cuales:

- *Polypodium vulgare* L.: presenta fronde verde con pinnas enteras con limbo oval unidos entre sí por su base con el raquis. Esporas agrupadas en soros desprovistos de indusio con forma redondeada de color amarillo en el envés de la fronde. Los soros se distribuyen en dos filas paralelas por cada pinna. Rizoma rastrero soterrado de forma proximal a la superficie terrestre.

- *Asplenium adiantum-nigrum* L.: luce frondes con pinnas de división principal hasta la base con el raquis (no enteras) en ausencia de escamas pardas o amarillentas. Pecíolo y raquis completamente pardo-negruzco. Fronde brillante no muy translúcida con terminación distal en

forma de larga punta de color verde oscuro en el haz. Soros con indusio en forma de cortas hileras en el envés de la fronde.

- *Asplenium trichomanes* L.: exhibe frondes con pinnas de división principal separadas hasta la base con el raquis (no enteras) en ausencia de escamas pardas o amarillentas. Cada fronde es de menos de un centímetro con lóbulos redondeados en su extremo, regulares en la base y nerviación no engrosada en sus extremos. Pecíolo y raquis por un lado verde o amarillento y por el otro lado pardo-negruzco. Soros con indusio en forma de cortas hileras en el envés de la fronde.

- *Ceterach officinarum* Willd.: posee frondes con pinnas enteras que se estrechan progresivamente hasta su base. Donde se unen las pinnas vecinas entre sí con el raquis. Presencia de escamas rojizas y brillantes en el envés de la fronde, mientras que en el haz que es de color verde está desprovisto de escamas. Soros alargados con indusio difícilmente observable a ojo humano en el envés de la fronde.

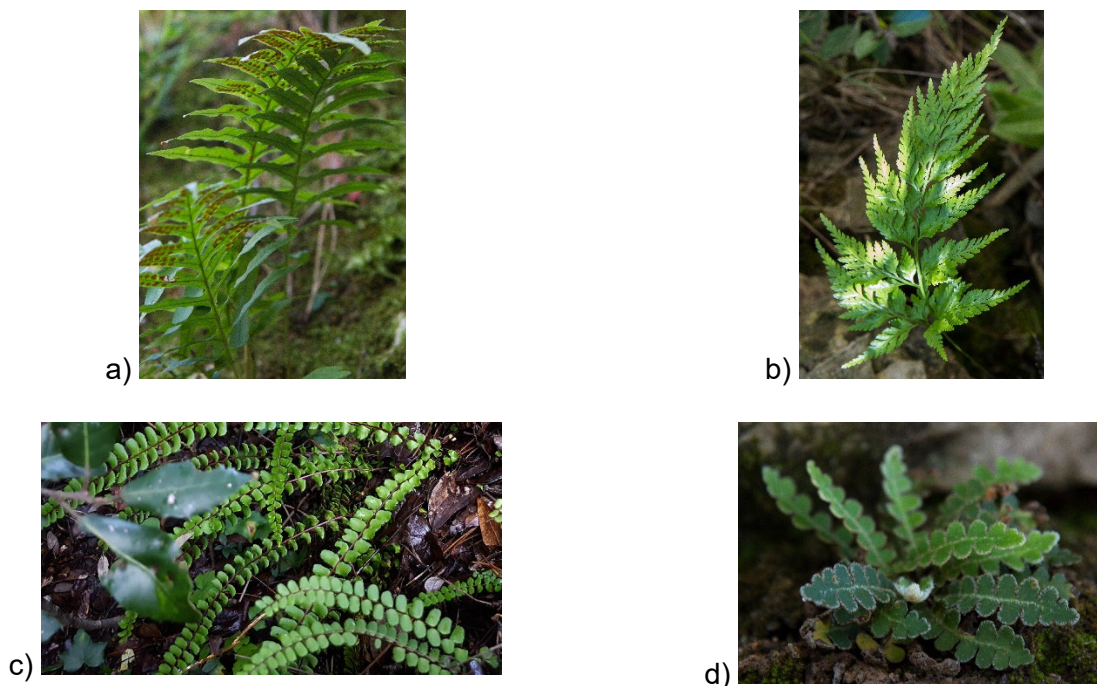






Figura 3: Frondes frescas de *Polypodium vulgare* (a), *Asplenium adiantum-nigrum* (b), *Asplenium trichomanes* (c) y *Ceterach officinarum* (d).

Una vez recolectadas las frondes frescas en noviembre del año 2016 se desecaron a temperatura ambiente al abrigo de luz entre papel de periódico. El tiempo de desecación se prolongó hasta que el material absorbente de desecación permaneciera seco durante un mínimo de un día una vez en contacto con el helecho. Una vez secas, los ejemplares fueron confirmados botánicamente mediante inspección visual por el Dr. J.A. Vicente Orellana de la Universidad San Pablo CEU (**Tabla 2**).

Tabla 2: Frondes desecadas de los principales helechos de las montañas de Prades con el nombre vulgar.

FRONDE DESECADA EN EL HERBARIO DE LA UNIVERSIDAD SAN JORGE	NOMBRE VULGAR
 <p data-bbox="252 656 691 741"><i>Polypodium vulgare</i> L. (Código herbario USJ: 003-2016)</p>	<ul data-bbox="810 371 1428 456" style="list-style-type: none"> • En castellano: polipodio, filipodio. • En catalán: daurada, herba pigotera, polipodi.
 <p data-bbox="252 1070 691 1155"><i>Asplenium adiantum-nigrum</i> L. (Código herbario USJ: 004-2016)</p>	<ul data-bbox="810 786 1428 902" style="list-style-type: none"> • En castellano: culantrillo negro, fainta. • En catalán: falzilla negre, falzia negre, herba felera.
 <p data-bbox="252 1473 691 1559"><i>Asplenium trichomanes</i> L. (Código herbario USJ: 005-2016)</p>	<ul data-bbox="810 1193 1428 1346" style="list-style-type: none"> • En castellano: culantrillo rojo, culantrillo bastardo, culantrillo menor, adianto rojo. • En catalán: falzia de pou, falzia roja, falzia vermella.
 <p data-bbox="252 1886 691 1971"><i>Ceterach officinarum</i> Willd. (Código herbario USJ: 006-2016)</p>	<ul data-bbox="810 1601 1428 1718" style="list-style-type: none"> • En castellano: doradilla, hierba dorada. • En catalán: dauradella, dauradeta, herba de sang.

1.3. Usos tradicionales de los cuatro principales helechos de las montañas de Prades y en el resto de España

El libro *Etnobotànica a les muntanyes de Prades* (Batet et al., 2011b), es actualmente de los últimos trabajos publicados sobre los usos tradicionales de las plantas de la zona de las montañas de Prades. En él se describen los usos tradicionales de extractos de las frondes de *Polypodium vulgare* L., *Asplenium adiantum-nigrum* L. y *Ceterach officinarum* Willd. para el tratamiento de la viruela en los niños (*la pigota borda de la canalla*), el mal de hiel (*el mal de fel*) y las calenturas (*les panses*), respectivamente. Cabe destacar que también se describe el uso de otras pteridófitas como *Adiantum capillus-veneris* L. (nombre vulgar en catalán: *fluruncul*), *Asplenium fontanum* (L.) Bernh. (nombre vulgar en catalán: *te de cingle*) y *Asplenium septentrionale* (L.) Hoffm. (nombre vulgar en catalán: *herba prima*) hecho que exalta la importancia de los helechos en la cultura popular de la zona. Este libro es un compendio sistematizado de información oral de la etnobotánica proporcionada por residentes de las montañas de Prades en el que los entrevistados emplean nombres vulgares a veces exclusivamente empleados en una pequeña zona geográfica. Razón por la cual puede dar lugar a incertidumbre a la especie correspondiente. Y especialmente en el caso de las pteridófitas: consecuencia de ser plantas sin flor, pues es un factor que dificulta el grado de identificación. Por ejemplo, en numerosas ocasiones se refiere a las pteridófitas con el nombre vulgar compuesto de “hierba” seguido de un “sustantivo”. Como es el caso del nombre vulgar catalán del helecho *herba felera* que corresponde al nombre científico de *A. adiantum-nigrum*. Otro factor determinante es la contextualización de la información aportada por los informantes. Es el caso de la entrevista nº10 de *Etnobotànica a les muntanyes de Prades* (Batet, Cartanyà, Castells, Piñas, & Salat, 2011a), en la cual se describe “*l’herba pigotera: fa unes fulles amb unes floretes amb unes berrugues grogues a sota*”. Inicialmente al referirse a florecitas ya se descartó la posibilidad de referirse a un helecho. Sin embargo, este componente amarillo realmente no son florecitas, sino que son los soros de *P. vulgare*. En el territorio de las montañas de Prades se conoce vulgarmente este helecho con el nombre catalán de *herba pigotera*, facilitando la verificación del nombre científico de la especie a la cual hacía referencia la persona en cuestión. A nivel de Cataluña, *P. vulgare* se ha empleado tradicionalmente para el tratamiento de la ictericia en animales (M. Àngels Bonet & Vallès, 2007).

La fuerte tradición de los nombres vulgares en el reino *Plantae* es una fuente de posibles errores si no se mantiene una fuente fiable como es el caso descrito de los usos tradicionales de *A. trichomanes* en Mallorca (Fiorin, Saez, & Malgosa, 2019).

También encontramos el trabajo de *Contribution à la connaissance ethnobotanique des ptéridophytes dans les Pyrénées*, en el cual se describen los usos tradicionales en los Pirineos de los cuatro helechos objeto de estudio de la presente tesis, además de usos tradicionales de otros helechos y afines (Maria Àngels Bonet, Agelet, Vallès, & Villar Pérez, 2001). De entre las propiedades atribuidas destaca el poder hepatoprotector de *P. vulgare*, acción antiparasitaria de *A. adiantum-nigrum*, el tratamiento de la alopecia con *A. trichomanes* y el tratamiento de estados febriles con *C. officinarum*.

En el *Inventario Español de los Conocimientos Tradicionales relativos a la Biodiversidad Segunda Fase Tomo I* del año 2018 (Pardo de Santayana, Morales, Tardío, & Molina, 2018) y en el *Plantas Medicinales, El Dioscórides Renovado* del año 2016 (Quer, 2016) se describen los usos tradicionales de estos cuatro helechos. De la información recopilada se desprende que para un mismo helecho hay distintos usos según la región donde se recolectó. Por esta razón y con el objetivo de validar los posibles usos medicinales de los mismos, se hacen necesarios estudios de farmacognosia y farmacología.

La diversidad de usos tradicionales de estos helechos en nuestro entorno, requiere de más estudios para poder considerar estos helechos como plantas medicinales (Heinrich, 2015). En el caso de validar los usos tradicionales de los helechos de las montañas de Prades, la relevancia de la biodiversidad vegetal de esta zona con las correspondientes posibles nuevas oportunidades quedaría demostrada (Booker, Johnston, & Heinrich, 2012). Por este motivo, la etnobotánica puede ser una herramienta importante en la revalorización de los territorios despoblados, a la vez de ser un reclamo para potenciar el interés medioambiental, ya que los helechos son considerados como indicadores ambientales ecológicos por ser sensibles a las modificaciones medioambientales (Silva, Mehlreter, & Schmitt, 2018). Un ejemplo es el caso de Sicilia, donde ya tienen actualizada una base de datos sobre la flora de pteridófitas y afines (Rizzo, 2021). Así, con el objetivo de potenciar el interés de la población por la biodiversidad de los helechos de las montañas de Prades sería mejor realizar un estudio con el máximo número posible de especies representativas de la zona; es decir, realizar un estudio de bioprospección en lugar de centrarse específicamente en validar los usos tradicionales de una única especie de helecho.

2. Importancia de la conservación de la biodiversidad

Las criptógamas (plantas sin semilla) son uno de los taxones del reino *Plantae* menos estudiado por la etnobotánica. Ello es en parte debido a la ausencia de elementos llamativos como sí tienen las fanerógamas (plantas con semilla), entre las que encontramos las gimnospermas (plantas con semillas no encerradas en cavidades) y las angiospermas (plantas con semillas encerradas en cavidades llamadas frutos) (Gartmann, 2015).

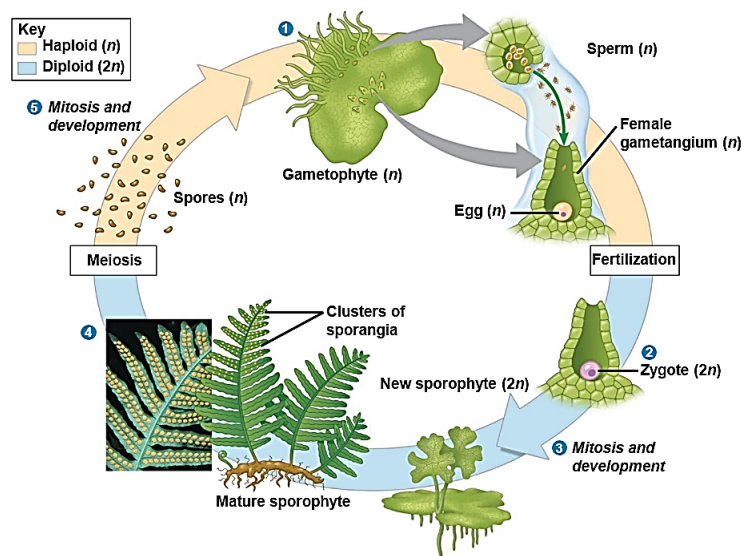


Figura 4: Reproducción sexual de los helechos (Campbell, Reece, Taylor, Simon, & Dickey, 2009).

En los inicios del estudio y clasificación sistemática de las especies vegetales no se incidía en la diferencia de los briófitos (división *Bryophyta*) respecto los helechos y grupos afines (Sessa, 2018). Estos grupos presentan un ciclo de vida digenético heteromórfico diplohaplofásico con gametófito (protalo) y esporófito, es decir en donde se alterna entre dos fases morfológicamente distintas e independientes. Ambos grupos difieren en la generación dominante: en los briófitos es la gametofítica y en los helechos y afines es la esporofítica. En la reproducción sexual de los helechos representada en la **Figura 4** una vez las esporas son diseminadas de la estructura esporofítica son dispersadas por agentes medioambientales como el viento. En condiciones favorables para la germinación de la

espora, básicamente requiere una elevada humedad ambiental, se desarrolla el protalo. Una estructura gametofítica (generación haploide) en la cual se generan los órganos masculinos (anteridios) y los femeninos (arquegonios). Según la especie de helecho, los gametangios de distinta sexualidad se ubican en un mismo protalo o en distintos protalos. La fecundación, mediante la cual se genera el cigoto, se produce en cuando los gametos masculinos (anterozoides) se liberan de los anteridios para fecundar el gameto femenino (oosfera) ubicada en el arquegonio. La posterior mitosis del cigoto origina una estructura vegetal llamada plántula que una vez es independiente del protalo es la estructura esporofítica (generación diploide), correspondiente a la estructura dominante de los helechos. Estructura responsable de la generación de las esporas, mediante la cual se finaliza el ciclo de la reproducción sexual (Campbell et al., 2009). En caso de condiciones desfavorables para la reproducción sexual, el helecho puede reproducirse de forma vegetativa, llamada también reproducción asexual. Mediante la cual se generan especies sin variabilidad genética e idénticas al progenitor.

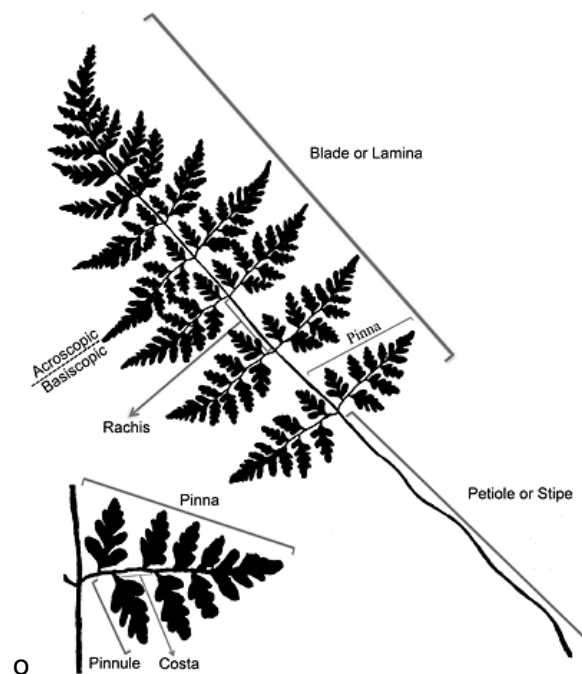


Figura 5: Estructura del esporófito de los helechos (Vasco, Moran, & Ambrose, 2013).

Durante la colonización de la tierra firme por las especies vegetales, periodo del Ordovícico y los albores del Silúrico medio, participaron las criptógamas vasculares como son los helechos y grupos afines (Clarke, Warnock, & Donoghue, 2011). Como consecuencia de sus características específicas diferenciadoras de los briófitos, por un dominio de la generación esporofítica o como constituido por un cuerpo vegetativo estructurado en raíces, tallo y hojas (**Figura 5**), se permitió la constitución de unos vasos conductores internos (Sokoloff & Remizown, 2021). Estos vasos estaban destinados a la conducción del agua y del resto de sustancias y nutrientes mediante el xilema y floema (Fukuda, 1997). Por esta razón este taxón también recibe el nombre de criptógamas del tipo traqueófitos.

En función del nivel de desarrollo del cormo (raíces, tallo y hojas) del esporófito se diferencian las criptógamas vasculares primitivas (cormo primitivo) de las desarrolladas (cormo verdadero) (Vasco et al., 2013). En la **Figura 6** se clasifican las divisiones de las criptógamas vasculares clasificadas entre primitivas y desarrolladas.

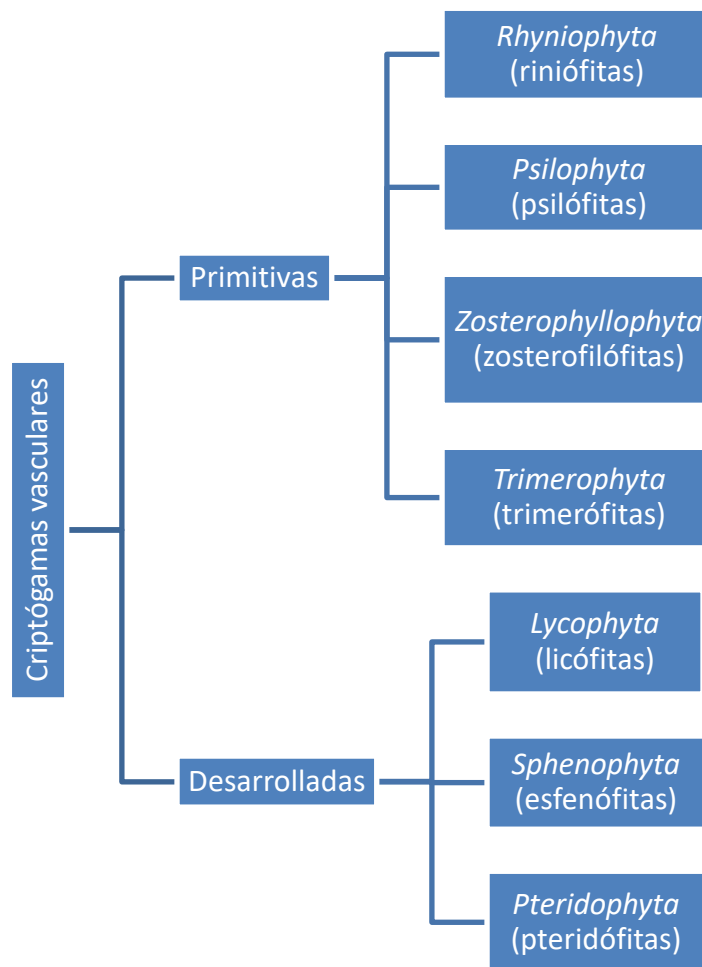


Figura 6: Divisiones de las criptógamas vasculares clasificadas entre primitivas y desarrolladas.

Las criptógamas vasculares primitivas (cormofitas primitivas) se dividen en cuatro divisiones: *Rhyniophyta* (riniófitas), *Psilophyta* (psilófitas), *Zosterophyllophyta* (zosterofilófitas) y *Trimerophyta* (trimerófitas). Se caracterizan por presentar un corno simplificado donde las raíces son protostelas. El grupo de las criptógamas vasculares más evolucionadas, las criptógamas vasculares desarrolladas (cormofitas desarrolladas), está constituido por las tres divisiones *Lycophyta* (licófitas), *Sphenophyta* (esfenófitas) y *Pteridophyta* (pteridófitas) (Díaz González, Fernández-Carvajal Álvarez, & Fernández Prieto, 2004; Plackett, Di Stilio, & Langdale, 2015; Wickett et al., 2014). En donde el esporófito presenta unas raíces verdaderas junto con el tallo y las hojas (criptógamas vasculares completas). El carácter morfológico de las esporas (isospóreas y heterospóreas) no es un carácter definitorio de estos dos grupos de criptógamas vasculares. Estas especies presentan el tallo en forma de rizoma.

Actualmente de las criptógamas vasculares primitivas únicamente existen ejemplares vivientes de la división *Psilophyta* con los géneros *Psilotum* y *Tmesipteris*. Las cuatro divisiones de las criptógamas vasculares primitivas se diferencian entre ellas por la estructura del tallo y las hojas de la estructura esporofítica. La división *Psilophyta* presenta microfilos con esporangios soldados en sinangios.

Las criptógamas vasculares desarrolladas se caracterizan por un corno verdadero de la generación esporofítica, todas presentan raíces verdaderas. En donde las tres divisiones (*Lycophyta*, *Sphenophyta* y *Pteridophyta*) únicamente se diferencian básicamente a nivel de tallo y de las hojas.

Las licófitas (división *Lycophyta*), representado por los órdenes *Lycopodiales*, *Selaginellales* e *Isoetales* todos ellos con representantes vivientes, se caracterizan por presentar hojas simplificadas llamadas microfilos (hojas de pequeño tamaño) sin ramificaciones donde el único orden con hoja desprovista de lígula (apéndice membranoso del microfilo) es el *Lycopodiales*. Los órdenes restantes de la división licófitas, que son *Selaginellales* e *Isoetales*, el microfilo presenta lígula (Tomescu, 2009). Para diferenciar cada uno de estos órdenes se basa en el tipo de esporas que no indagaremos debido a la diversidad de clasificaciones que se disputan actualmente. Las esfenófitas (división *Sphenophyta*) o colas de caballo están representados actualmente únicamente por el género *Equisetum* (familia *Equisetaceae*). Su esporófito se diferencia del de las licófitas por presentar un gran número de ramificaciones preferentemente con ramificación verticilada. Las esfenófitas ya extinguidas juntamente con especies extinguidas de licófitas tuvieron una gran presencia en los grandes bosques del Carbonífero. Con los estudios actuales de características fisiológicas como son las mitocondrias, las esfenófitas se consideran el linaje anterior a los helechos verdaderos (Guillon, 2007). Las pteridófitas (división *Pteridophyta*), conocidos popularmente como los helechos verdaderos, son las únicas criptógamas vasculares que presentan unas hojas plenamente desarrolladas llamadas megáfilos o frondes. De este hecho, las pteridófitas reciben el nombre de eufilofitas (del griego *eu* = verdaderas; *filofitas* = hojas). Para poder albergar las frondes los helechos verdaderos desarrollaron un incremento del nivel de desarrollo del tallo respecto el existente en las colas de caballo hasta alcanzar la estructura del rizoma en la mayoría de las especies distribuidas en la zona temperada en disposición horizontal-subterráneo (helechos herbáceos), exceptuando los helechos arborescentes que mayoritariamente se encuentran en las zonas tropicales (Jin, Zhou, Schneider, Wei, Wei, & Yan, 2020). Estos rizomas de los helechos herbáceos contienen las páleas que son unas escamas para favorecer la recogida del agua. Sin embargo, la clave taxonómica para la caracterización-identificación de los helechos verdaderos es la estructura-morfología de la fronde (nerviación, disposición y divisiones) como el tipo de esporangio que albergan (Vasco et al., 2013).

En la **Figura 7** se representan las clases de la división *Pteridophyta* (Díaz González et al., 2004; Sessa, 2018). Se han descrito tres clases de pteridófitas: *Ophioglossopsida*, *Marattiopsida* y *Filicopsida* o *Polypodiopsida*. Entre ellas se diferencian por el tipo de la pared del esporangio consecuencia del desarrollo y estructura de este órgano reproductor por esporas mediante meiosis obteniéndose eusporangios (pteridófitas eusporangiadas) y leptosporangios (pteridófitas leptosporangiadas) que presentan una pared pluristrata (pared gruesa) o con un solo estrato de células (pared delgada), respectivamente. El eusporangio surge de varias células epidérmicas iniciales y produce un número grande y variable de esporas, mientras que el leptosporangio surge inicialmente de una única célula y produce un número fijo de esporas (64 esporas) durante la meiosis típica en un esporófito diploide. Los esporangios de los helechos leptosporangiados presentan un mecanismo de dehiscencia (dispersión de las esporas) mediante un anillo mecánico. En la maduración de las esporas, en el cual aumentan su tamaño, se acompaña de la deshidratación de las células del anillo que al perder su estructura se transforman en el estomio del esporangio. Momento en el cual se inicia la dispersión de las esporas. Los helechos eusporangiados, representados por las clases *Ophioglossopsida* y *Marattiopsida*, no presentan mecanismo diferenciado de dehiscencia. Entre estas dos clases, la diferencia principal es el tipo de fronde y la disposición de los eusporangios.

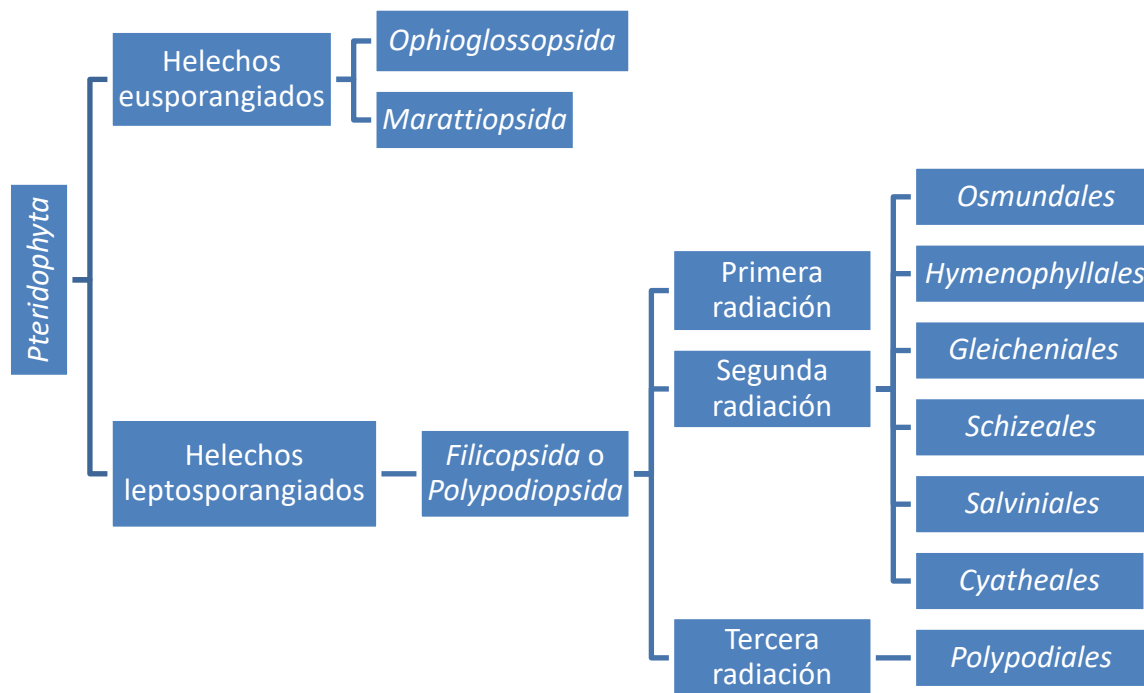


Figura 7: Clases y órdenes de la división Pteridophyta.

En la clase *Ophioglossopsida*, representada por el orden *Ophioglossales* con los géneros principales *Ophioglossum* y *Butrychium*, presentan frondes espiciformes pequeñas de las cuales se diferencian los trofolios (frondes energéticas que contienen la clorofila) y esporofolios (frondes fértiles productoras de esporas). Los esporangios están dispuestos en espigas o panículas separadas de la lámina estéril y dispersan heterosporas.

La otra clase de pteridófitas eusporangiadas que es la *Marattiopsida*, representada principalmente por el género *Marattia*, presentan frondes multipinnadas con estípulas en la base del peciolo grandes del tipo trofoesporófilos (fronde con función energética y reproductora). Los esporangios se distribuyen en el envés de la lámina foliar donde las isosporas se encuentran en los eusporangiados agrupados (soros) o aislados (sinangios). Estos helechos se distribuyen principalmente en las zonas tropicales debido a la alta humedad ambiental que requieren.

La clase *Filicopsida* (también llamada *Polypodiopsida* o leptosporangiada) juntamente con la clase *Marattiopsida* son las únicas pteridófitas que presentan un desarrollo circadiano (en forma de punta de violín) de la fronde como se observa en la **Figura 8.a**.

Actualmente la clase *Filicopsida* es el taxón que reúne la mayor parte de especies vivientes de las pteridófitas y se caracterizan por ser helechos leptosporangiados mayoritariamente terrestres, a pesar de existir una pequeña porción de acuáticas con características excepcionales representada por el orden *Salviniales*. La clase *Filicopsida* presenta trofoesporófilos e isosporas a excepción de las especies del orden *Salviniales*, helechos leptosporangiados acuáticos, que son heterospóreas. La generación esporofítica de las especies de *Filicopsida* terrestres presenta helechos herbáceos distribuidos mayoritariamente en zonas templadas como es el *Polypodium vulgare* L. hasta helechos arborescentes distribuidos mayoritariamente en la zona tropical. Por ejemplo, en las islas Canarias y en el Noreste de la península Ibérica se encuentra uno de los pocos helechos arborescentes europeos, el *Dryopteris guanchica* Gibby & Jermy (*Dryopteridaceae*) el cual es un alotetraploide derivado de *Dryopteris aemula* (Aiton) Kuntze (*Dryopteridaceae*) y *Dryopteris intermedia* (Muhl. ex Willd.) A. Gray (*Dryopteridaceae*) (Juslen, Vare, & Wikstrom, 2011). Los estudios filogenéticos han

certificado la existencia de tres taxones de helechos leptosporangiados que se difieren por las sucesivas radiaciones que ha sufrido esta clase. Actualmente de estos tres taxones únicamente sobreviven especies de la segunda y tercera generación de helechos leptosporangiados. Los helechos leptosporangiados de 1ª radiación (son la primera generación de helechos leptosporangiados) aparecieron a inicios del Carbonífero y existieron hasta finales del Paleozoico. Actualmente aún se están realizando estudios filogenéticos para determinar la relación entre los seis órdenes que constituyen los helechos leptosporangiados de la 2ª radiación (son la segunda generación de helechos leptosporangiados) que son: *Osmundales*, *Hymenophyllales*, *Gleicheniales*, *Schizeales*, *Salviniales* y *Cyatheaales*. Estos presentan un anillo completo de dehiscencia sin la estructura del estomio.

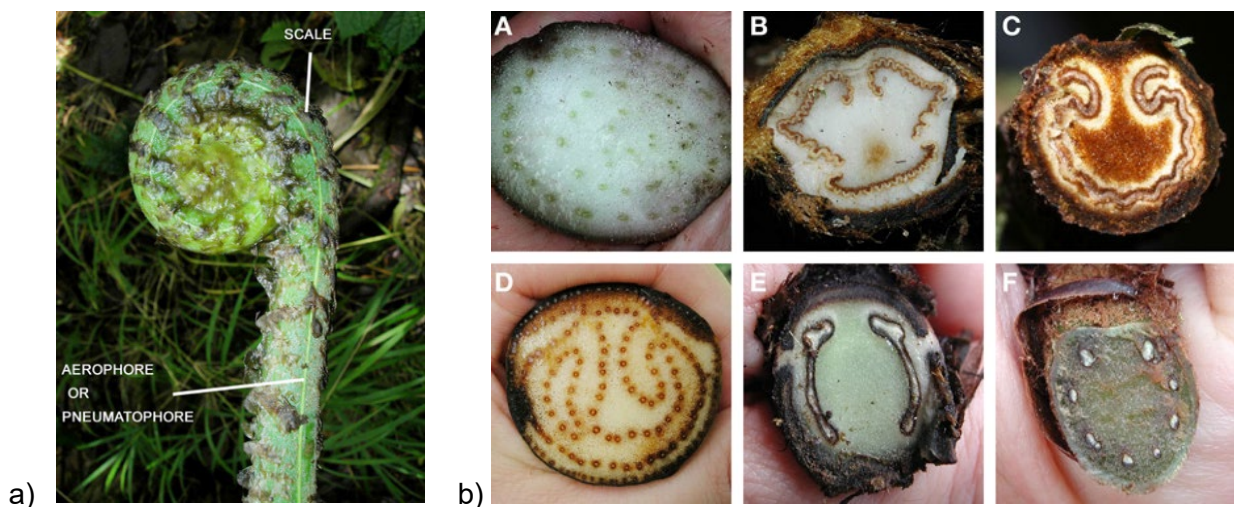


Figura 8: Fronde joven en desarrollo circadiano (a) y tallo transversal helechos Eupolipoides y No Eupolipoides (b) (Vasco et al., 2013). Los helechos de la Figura 8.b son: (A) *Eupodium laeve* (Marattiaceae), (B) *Dicksonia sellowiana* (Dicksoniaceae), (C) *Saccoloma chartaceum* (Saccolomataceae), (D) *Acrostichum danaeifolium* (Pteridaceae), (E) *Diplazium hians* (Eupolipoide II, Athyriaceae) y (F) *Polystichum concinnum* (Eupolipoide I, Dryopteridaceae).

Los helechos de la 3ª radiación de los leptosporangiados, o también llamados polivaina o polipodios (en inglés *Polypods*) (del griego multibrazo), que son la tercera generación de helechos leptosporangiados, están constituidos por un único orden, el orden *Polypodiales*. Surgieron a inicios del Cretáceo y presentan un anillo incompleto de dehiscencia de las esporas que recibe el nombre de estomio. Se clasifican en seis subórdenes: *Polypodiineae*, *Aspleniineae*, *Dennstaedtiineae*, *Pteridineae*, *Lindsaeineae* y *Saccolomatineae*. Aunque no hay una nítida clasificación aceptada por los organismos taxonómicos a partir de las familias de estos subórdenes, debido a las pocas similitudes entre estos táxones. Actualmente, gracias a los estudios moleculares, se distinguen los Eupolipoides de los No Eupolipoides (Jin et al., 2020) como se observa en la **Figura 8.b**.

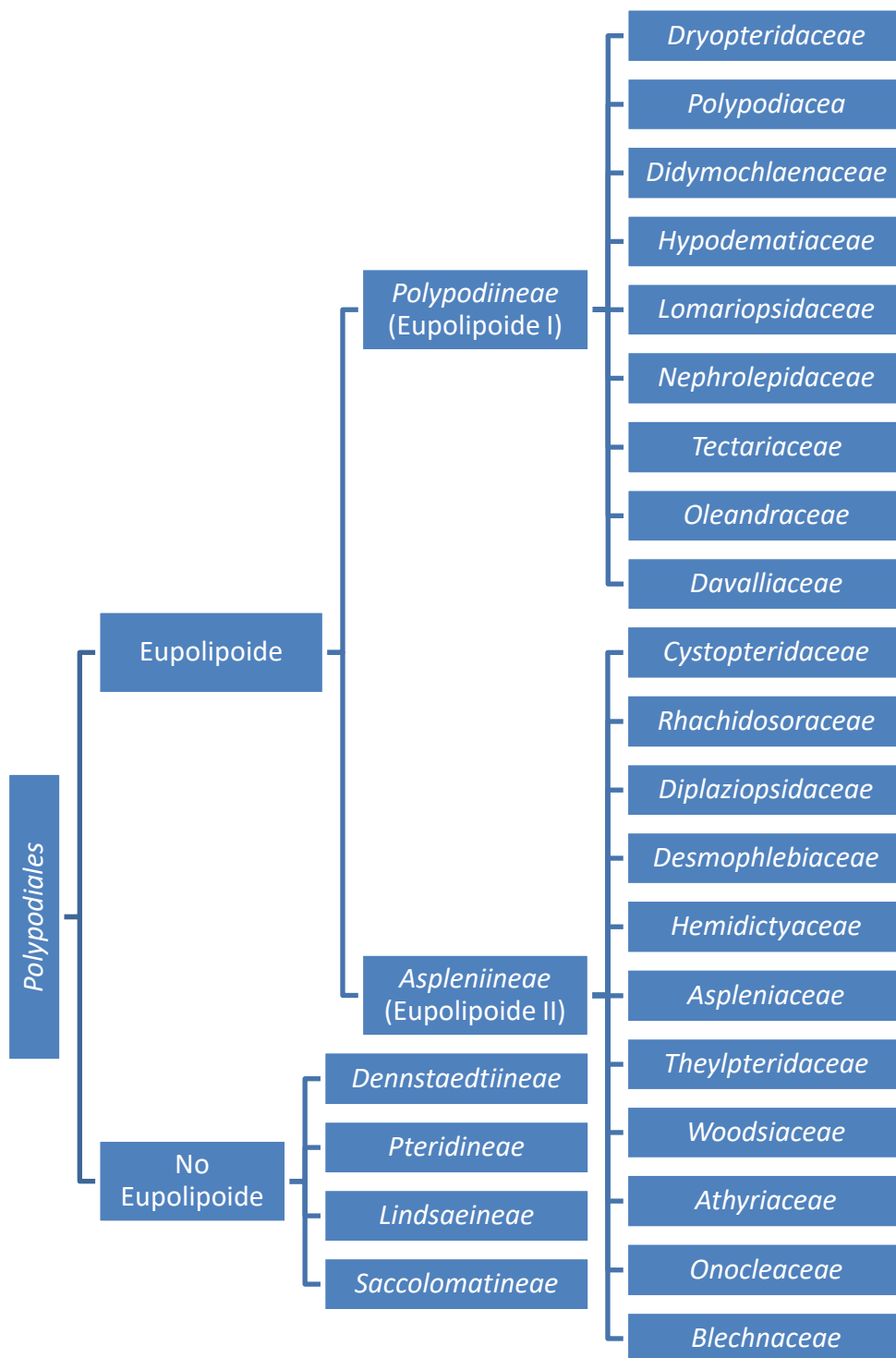


Figura 9: Familias de los helechos leptosporangiados de la tercera radiación (orden Polypodiales).

Los No Eupolipoides únicamente presentan un haz vascular y están constituidos por los subórdenes *Dennstaedtiineae*, *Pteridineae*, *Lindsaeineae* y *Saccolomatineae*. Dentro de este grupo aún hay una gran diversidad de criterios. El grupo de los Eupolipoides se caracterizan por presentar dictiostela, es decir un mínimo de dos grandes haces vasculares en su rizoma (Pittermann et al., 2015). Este grupo está constituido por los subórdenes *Polypodiineae* o Eupolipoide I y *Aspleniineae* o Eupolipoide II. Entre ellos se diferencian por la presencia y ausencia de vasos conductores menores (sin llegar a constituir haces vasculares claramente definidos), respectivamente. La familia

Blechnaceae a pesar de pertenecer al grupo Eupolipoide II por razones filogenéticas, no presenta la estructura propia de los haces vasculares de este grupo. La diferenciación entre los Eupolipoide I y los Eupolipoide II fue consecuencia de una antigua rápida radiación que proporcionó unos entrenudos cortos en el eje central del esporófito característicos en los Eupolipoide II. En el presente documento nos basamos en la clasificación de Sessa (Sessa, 2018) donde en la **Figura 9** observamos la clasificación de las familias de los helechos leptosporangiados de la tercera radiación.

El suborden *Polypodiineae* (Eupolipoide I) conforma un total de nueve familias (*Dryopteridaceae*, *Polypodiaceae*, *Didymochlaenaceae*, *Hypodematiaceae*, *Lomariopsidaceae*, *Nephrolepidaceae*, *Tectariaceae*, *Oleandraceae* y *Davalliaceae*). Mientras que el suborden *Aspleniineae* (Eupolipoide II) agrupa un total de once familias (*Cystopteridaceae*, *Rhachidosoraceae*, *Diplaziopsidaceae*, *Desmophlebiaceae*, *Hemidictyaceae*, *Aspleniaceae*, *Thelypteridaceae*, *Woodsiaceae*, *Athyriaceae*, *Onocleaceae* y *Blechnaceae*).

3. Aspectos fitoquímicos en plantas

Las plantas, como también es el caso de otros reinos como el *Fungi*, presentan un metabolismo primario y otro de secundario. El primario genera los metabolitos comunes en todas las especies del reino *Plantae* representado por las principales biomoléculas que son los carbohidratos, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. Sin embargo, es mediante el metabolismo secundario que se generan metabolitos de una elevada complejidad estructural como consecuencia de las propias características de las vías biosintéticas de cada taxón vegetal. Estos fitoquímicos (del griego *fito* que es planta y *químico* que es química), correspondientes mayoritariamente a los metabolitos secundarios de los vegetales, antiguamente se consideraban sustancias de desecho de las plantas (de la Rosa, Omar Moreno-Escamilla, Rodrigo-García, & Álvarez-Parrilla, 2019). Pero actualmente, independientemente de su complejidad estructural debido a la presencia de grupos funcionales específicos, se ha determinado que permiten la relación de la planta con su ecosistema, donde la función principal recae en la protección de la planta de las agresiones externas, así como en la alelopatía positiva (Guerriero et al., 2018). El concepto fitoquímico incluye los compuestos presentes en plantas distintos de los carbohidratos, lípidos y proteínas con interés para la salud. Entre ellos se engloban compuestos como organosulfurados y betalaínas (Efferth & Koch, 2011). El estrés al cual están expuestas las plantas puede ser derivado de la actividad de seres vivos, estrés biótico (del griego *bios* que es vida y *-tico* que es relativo a), o derivado de factores no vinculados a los seres vivos o abiótico, que a la vez se puede clasificar en factores químicos o físicos. En consecuencia, los metabolitos secundarios son bioindicadores de la interacción del vegetal con su entorno.

Determinadas especies vegetales presentan reservorios de acumulación de sustancias con actividad antimicrobiana (fitoalexinas) como son determinados compuestos fenólicos (Beckman, 2000) en respuesta al estrés biótico. Por ejemplo, se ha determinado actividad antimicrobiana en el rizoma de *P. vulgare* (Glensk, Tichaczek-Goska, Sroda-Pomianek, Włodarczyk, Wesolowski, & Wojnicz, 2019) y en determinadas especies de helechos del género *Asplenium*, como es el caso de *A. adiantum-nigrum*, donde encontramos fitoalexinas (Zivkovic et al., 2020). Actualmente se ha descrito que determinados helechos son potenciales reservorios de polifenoles justificando los estudios de etnofarmacológicos y de bioprospección en la investigación en el campo de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. Un ejemplo es el caso del helecho *Tectaria gemmifera* (Fée) Alston (*Tectariaceae*), sinónimo de *Tectaria coadunata* J. Smith (*Tectariaceae*), del Nepal (Shrestha et al., 2019).

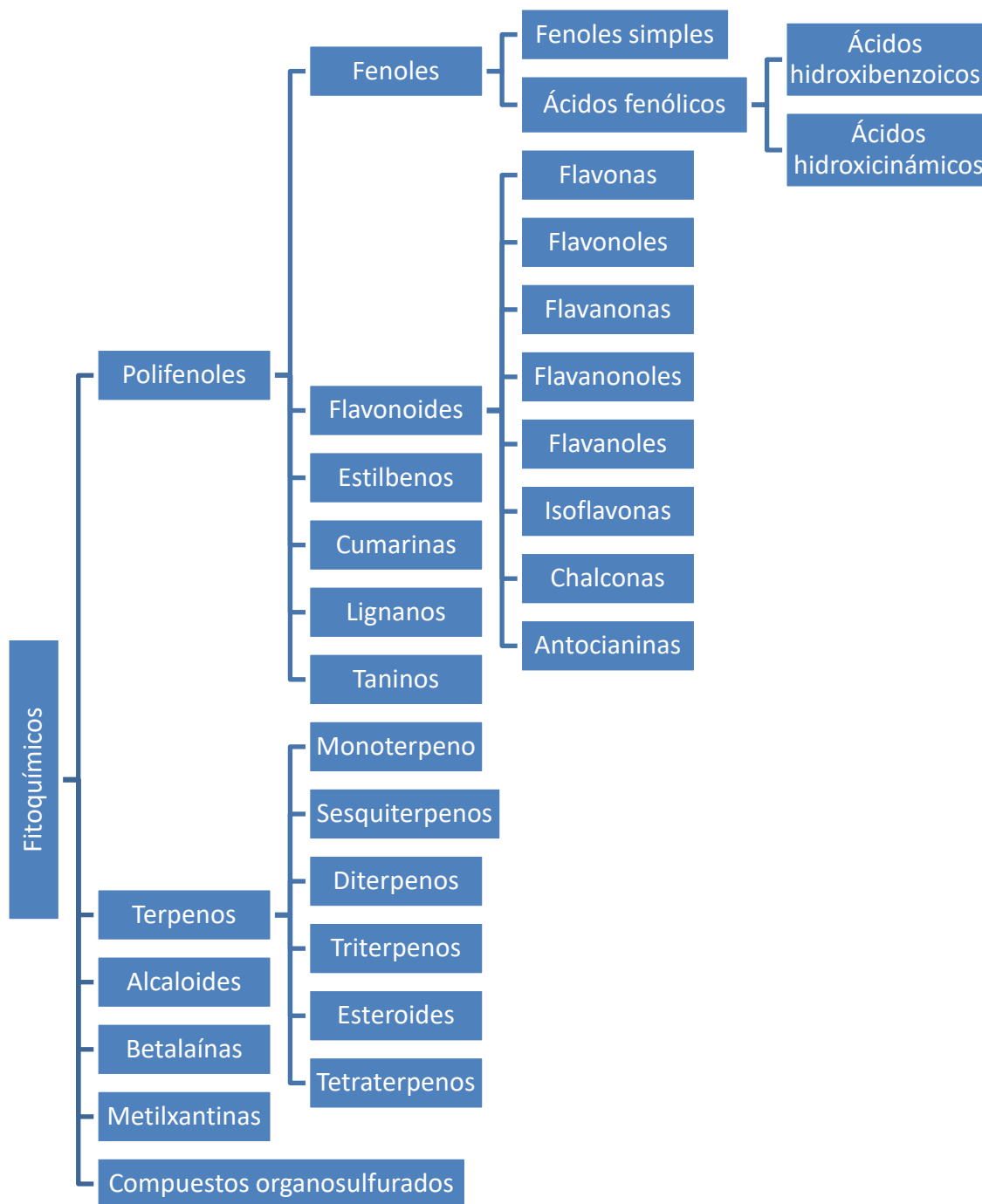


Figura 10: Clasificación de los fitoquímicos.

La radiación ultravioleta es una agresión abiótica para los vegetales que conlleva que estos respondan con el incremento de sustancias con actividad antioxidante como son los polifenoles. Se ha reportado que una exposición prolongada a UVB aumenta la transcripción de los genes de biosíntesis de polifenoles como los flavonoides. Así, entre otros mecanismos de defensa, los helechos actuales han sobrevivido a las radiaciones de eras anteriores debido, probablemente, a la capacidad de sintetizar flavonoides presentes en muchas de las especies. Estos fitoquímicos otorgan un poder adaptativo frente a agresiones abióticas como son la sequía, la deficiencia de nitrógeno del suelo, además de las radiaciones ultravioletas (Wen, Alseekh, & Fernie, 2020).

La distribución de los compuestos fenólicos en las plantas no es uniforme. Generalmente estos metabolitos secundarios se encuentran en una zona delimitada de la planta. Derivado de ello, es de especial interés focalizar la droga vegetal empleada al referirnos a las propiedades de los fitoquímicos de las plantas.

A lo largo de la historia se han descrito distintos criterios en la clasificación de los fitoquímicos como son la estructura química, los efectos que generan al administrarse en el ser humano o por la ruta biológica mediante la cual las plantas los generan. Como la estructura de los fitoquímicos es la responsable de su actividad además de establecerse quimiotaxonomía, la clasificación más adecuada en el campo de la etnobotánica-bioprospección es la estructural. En esta clasificación los fitoquímicos se agrupan en: polifenoles, terpenos, alcaloides, betalainas, metilxantinas y compuestos organosulfurados (Bruneton, 2001; Leopoldini, Russo, & Toscano, 2011). En la **Figura 10** se especifican los subtipos dentro de cada grupo principal de fitoquímicos (Rudrapal et al., 2022).

Los metabolitos secundarios en las plantas pueden encontrarse unidos a alguna molécula de azúcar; en tal caso se denomina heterósido a la forma unida a moléculas glucídicas, mientras que la parte no glucídica recibe el nombre de aglicona o genina. Las formas agliconas son potencialmente más activas que los correspondientes heterósidos, debido que únicamente presentan la parte funcional de la correspondiente glicona, es decir la aglicona (Pandey & Rizvi, 2009). Independientemente de las cantidades de polifenoles respecto las principales drogas vegetales de los helechos (frondes y rizoma), Durdevic et al. (Durdevic et al., 2007) han determinado que para *A. adiantum-nigrum*, *A. trichomanes* y *C. officinarum* los polifenoles en las frondes están en una mayor cantidad en su forma aglicona respecto la correspondiente forma azucarada, mientras que en el rizoma están en una mayor presencia en su forma glucídica.

4. Polifenoles, los principales fitoquímicos

Los polifenoles, representados mayoritariamente por los fenoles simples, los ácidos fenólicos y los flavonoides, son fitoquímicos resultantes del metabolismo secundario ampliamente distribuidos en las plantas. Fenol es cualquier componente que presenta un grupo hidroxilo (-OH) unido a un anillo de benceno. Debido que la mayoría de ellos presentan más de un grupo hidroxilo unido a varios anillos de benceno se suele emplear el término polifenoles, aunque estrictamente muchos fenoles simples y ácidos fenólicos no son polifenoles desde un punto de vista estructural.

Actualmente más de 8.000 estructuras polifenólicas han estado identificadas en distintas especies vegetales ampliamente estudiadas por su poder antioxidante. A raíz de la teoría de la "Paradoja Francesa" (Leopoldini et al., 2011), la cual vincula el consumo de polifenoles contenidos en el vino (especialmente flavonoides) con una disminución de la incidencia de la enfermedad cardiovascular, se incrementaron los estudios en base al poder antioxidante de los polifenoles. Actualmente, los polifenoles de los vegetales se emplean en el campo sanitario y alimentario como potentes agentes terapéuticos o ingredientes funcionales capaces de reducir la incidencia de alteraciones metabólicas, como son las cardiovasculares, el cáncer, la diabetes, el envejecimiento de la piel o enfermedades neurodegenerativas, entre otras. Todo ello está relacionado con el poder reductor de estas estructuras fitoquímicas frente al estrés oxidativo, ya que son reconocidos como agentes antioxidantes polivalentes (Pandey et al., 2009). Con multitud de aplicaciones, entre las cuales destacan su empleo como quimiopreventivos en determinados cánceres como los de piel, además de ser agentes coadyuvantes de fotoprotectores de la piel (Evans & Johnson, 2010). Actualmente, el potencial uso de polifenoles no se centra únicamente en el campo de la salud y en sus usos terapéuticos, sino que también se estudia su potencial uso en la industria alimentaria. Sin embargo, el uso de polifenoles sintéticos como conservantes alimenticios está estrictamente

regulado debido a que algunos estudios experimentales han descrito efectos graves para la salud como lesiones hepáticas a dosis elevadas. Por esta razón, es recomendable el empleo de polifenoles de origen natural en la conservación de los alimentos (Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Igual sucede en el campo de los colorantes alimentarios, donde en los últimos años se ha incrementado el uso de colorantes de origen natural. Por ejemplo, actualmente la Comisión Europea acepta las antocianinas, un tipo de flavonoide, como colorante alimentario. También, aparte de la tecnología alimentaria, se está investigando el uso de polifenoles como potentes prebióticos para favorecer la acción de los probióticos. Finalmente, en el campo de los productos sanitarios, y debido al poder antiséptico de estos fitoquímicos, estos ya se incorporan como parte de la formulación de determinados geles hidroalcohólicos destinados a la antisepsia (de Araujo, Farias, Neri-Numa, & Pastore, 2021).

Algunos polifenoles se han descrito como agentes antiinflamatorios y analgésicos por medio de la inhibición de las enzimas ciclooxigenasa 1 (COX-1) y ciclooxigenasa 2 (COX-2), respectivamente. Además, debido a su poder antiséptico se consideran antimicrobianos con un poder inversamente proporcional a la carga del pK_a (incrementa su poder antimicrobiano con el poder alcalino del medio), como es el caso de la hidroquinona (Kumar & Goel, 2019). En el caso de determinados flavonoides a parte de la acción inhibitoria de las enzimas COX-1 y COX-2 también se han descrito como agentes con poder antiestrogénico como es la genisteína (Halliwell & Gutteridge, 2015b; Leopoldini et al., 2011).

4.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se clasifican en derivados del ácido benzoico (ácidos hidroxibenzoico) y los derivados del ácido cinámico (ácidos hidroxicinámicos). Los derivados de estos ácidos difieren en los grupos de hidroxilación y metoxilación en su anillo aromático central como se observa en la **Figura 11**. Los ácidos p-hidroxibenzoico, vanílico y protocatéquico son los principales derivados del ácido benzoico, mientras que el ácido cafeico, ácido p-cumárico y el ácido ferúlico son los principales derivados del ácido cinámico. De forma generalizada estos dos grupos se consideran ácidos fenólicos, pero en sentido estricto, únicamente los derivados del ácido benzoico son ácidos fenólicos, mientras que los derivados del ácido cinámico son fenilpropanoides (Shahidi et al., 2015).

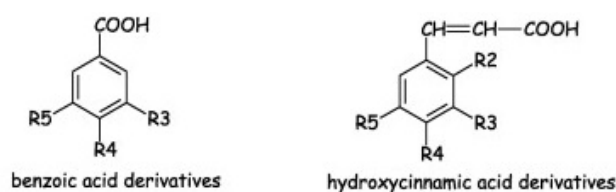


Figura 11: Estructura de los ácidos fenólicos. Figura modificada a partir de Leopoldini et al. 2011 (Leopoldini et al., 2011).

4.2. Flavonoides

Los flavonoides son los polifenoles derivados de la condensación de un fenol simple con un derivado de fenilpropano generando los tres anillos característicos del grupo (anillo A, B y C) donde la estructura común es la 2-fenilbenzopirona. La modificación de esta estructura genera los distintos tipos de flavonoides que siempre mantienen la estructura $C_6-C_3-C_6$. Según el grado de oxidación del anillo central C, el patrón de hidroxilación del núcleo y el sustituyente en el carbono 3, los flavonoides se pueden clasificar en (**Figura 12**): flavonoles (grupo 3-hidroxi piran-4-ona en el anillo C), flavanonas juntamente con flavanonoles (ambos presentan un enlace carbono-carbono insaturado en el anillo C), flavanoles (en el anillo C presencia de un grupo 3-hidroxi y ausencia de la estructura 4-carbonilo),

flavonas (carecen de un grupo hidroxilo en la posición 3 del anillo C), isoflavonas (el anillo B está unido al anillo C en la posición 3, en lugar de la posición 2 como es el caso de los otros flavonoides), chalconas (anillo C abierto) y antocianinas (presencia de un ion oxonio en el anillo C) (Shahidi et al., 2015).

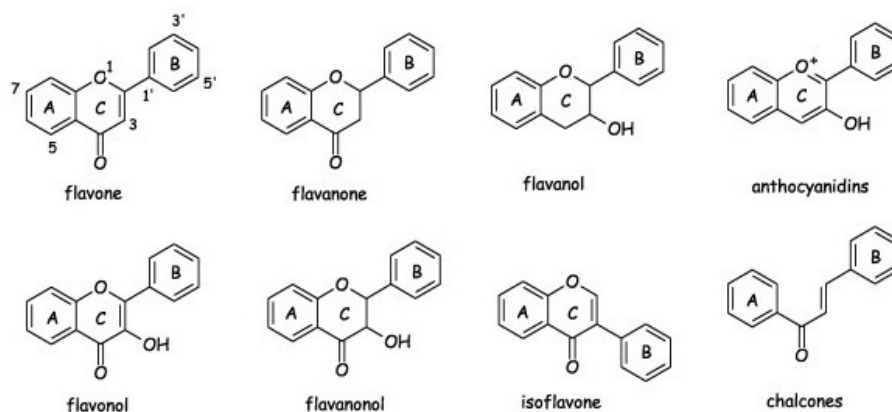


Figura 12: Estructura de los flavonoides. Figura modificada a partir de Leopoldini et al. 2011 (Leopoldini et al., 2011).

4.3. Actividad reductora de los polifenoles

La transferencia de un átomo de hidrógeno (TAH), transferencia de un electrón (TUE) y quelación de metales de transición (QMT) son los tres mecanismos antioxidantes “químicos” (capacidad reductora) mediante los cuales actúan los polifenoles, como se observa en la **Figura 13**.

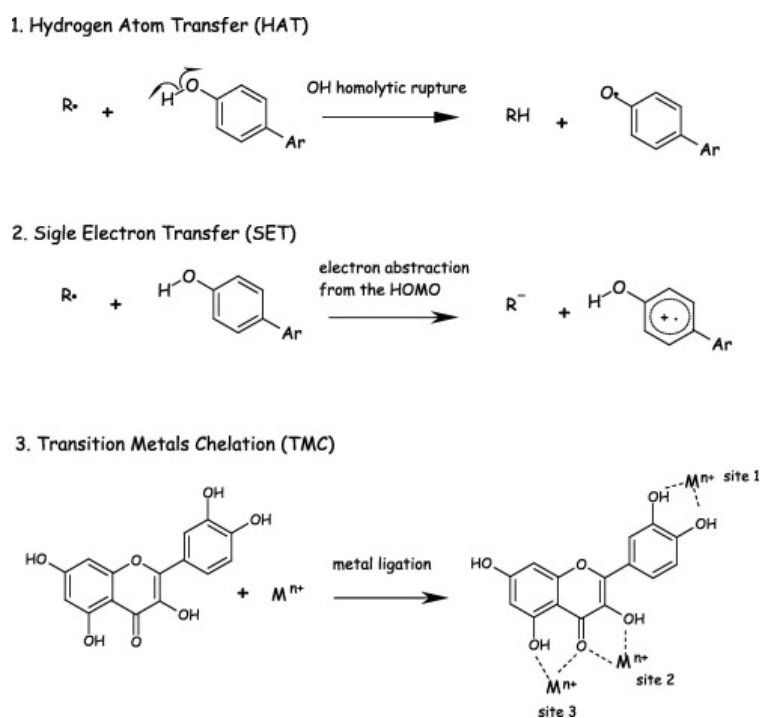


Figura 13: Principales mecanismos de la acción antioxidante de los polifenoles: 1 transferencia de un átomo de hidrógeno (TAH) o “hidrogen atom transfer (HAT)”, 2 transferencia de un electrón (TUE) o “single electron transfer (SET)” y quelación de metales de transición (QMT) o “transition metals chelation (TMC)” (Leopoldini et al., 2011).

En el TAH el radical libre (R^{\cdot}) consigue reducirse gracias a la captación del átomo de hidrógeno con el correspondiente electrón. En la TUE, el agente antioxidante ($ArOH$) puede dar un electrón al radical libre (R^{\cdot}), que termina convirtiéndose en un radical catiónico ($ArOH^{+\cdot}$). En ambos mecanismos el agente antioxidante termina con un electrón impar y al ser una estructura aromática este electrón puede difundir por la molécula en estado oxidado. El parámetro clave en TAH es la energía de disociación del enlace (EDE), mientras que en el caso de TUE es el potencial de ionización (PI). Una menor EDE de los enlaces oxígeno con hidrógeno (O–H), conduce a una más favorable realización de la reacción de inactivación del radical libre mediante TAH con lo que mayor será la acción antioxidante. Un menor PI, conlleva una mayor facilidad para la abstracción del electrón por parte del agente oxidado equivalente a un mayor poder antioxidante.

Los polifenoles se han descrito como sustancias capaces de inhibir la actividad de distintos metales de transición mediante la quelación de sus iones produciendo la alteración de su potencial redox hasta desactivarlos. Este es el tercer mecanismo antioxidante mediante el cual los polifenoles pueden desempeñar su poder antioxidante, que es el QMT. De forma que los metales quedan acomplejados con el polifenol formando un complejo metal-polifenol, incapacitando la participación del metal en las reacciones involucradas en la producción de especies de radicales libres. La acidez es un factor clave en este mecanismo antioxidante de forma que una mayor acidez comporta una menor energía necesaria para la desprotonación del grupo hidroxilo del polifenol, facilitando la quelación de los metales de transición de las reacciones redox. Entre estos metales, normalmente en bajo estado de reducción, encontramos el Fe^{2+} de la reacción de Fenton.

La determinación de los grupos funcionales junto con las características conformacionales, electrónicas y geométricas de los polifenoles es básica para comprender la relación de su estructura con la actividad antioxidante. La eficacia en la captación de radicales por parte de los polifenoles se basa en estas cuatro premisas estructurales:

- Múltiples grupos hidroxilos (-OH) unidos al anillo aromático. Su contribución antioxidante mejora si su disposición es en conformación *orto*-dihidroxi. La hidrofilia se incrementa al aumentar el número de hidroxilos, manteniendo el núcleo del polifenol en la cavidad hidrofóbica, lo que puede constituir una conexión con el sitio activo de relevancia enzimática.
- Estructura plana de los polifenoles. Permite la conjugación y deslocalización electrónica, así como los efectos de resonancia.
- Presencia de grupos funcionales adicionales, como el doble enlace del carbono con carbono (C=C) y del grupo carbonilo (C=O). Esto aumenta significativamente la actividad antioxidante, ya que proporciona planicidad, expansión de electrones y desplazamiento entre anillos adyacentes. La presencia de $C_2=C_3$ y $C_4=O$ comporta una distribución de los electrones por efectos de resonancia, hecho que influye en la constante de disociación de los grupos hidroxilos con la correspondiente estabilidad de los radicales.
- Forma glicona o aglicona del polifenol. Este es un parámetro determinante en el efecto antioxidante. La glicona presenta una menor capacidad antioxidante respecto la correspondiente aglicona debido que la parte azucarada disminuye el potencial antioxidante de la aglicona.

Es notable el mayor poder antioxidante de los flavonoides respecto los ácidos polifenólicos. Ello es debido a que los flavonoides pueden presentar poder antioxidante mediante los mecanismos TAH, TUE y QMT, mientras que los ácidos fenólicos de forma predominante únicamente presentan el TAH (Leopoldini et al., 2011). De este hecho también deriva que en ciertas condiciones se haya descrito un comportamiento prooxidante de los flavonoides (Shahidi et al., 2015).

4.3.1. Biodisponibilidad de los polifenoles

Los polifenoles pueden hidrolizarse en el intestino delgado mediante enzimas glucosidasas. Los polifenoles no absorbidos en el intestino delgado pasan al colon donde entran en contacto con el metabolismo de la microbiota intestinal y, una parte reducida de estos, entran en la circulación sanguínea por proceso de metilación. La biodisponibilidad de los polifenoles también depende del hígado que cataliza la sulfatación de los polifenoles. De forma general, la concentración de los polifenoles en sangre postprandial normalmente es inferior a 1 μM . Se ha descrito un distinto nivel de absorción de los polifenoles según su estructura, pero no cabe menospreciar otras variables como son el contenido con que se ingieren estos polifenoles. Algunos autores han llegado a considerar los polifenoles como micronutrientes, donde también se clasifican las vitaminas y los minerales; a diferencia de estos dos tipos de micronutrientes que sí se acumulan en el organismo, los polifenoles al no acumularse en el organismo requieren una dosis suficiente efectiva a lo largo del tiempo (Williamson, 2017). En la **Figura 14** se observa parte del metabolismo de los polifenoles del cual se deriva su biodisponibilidad.

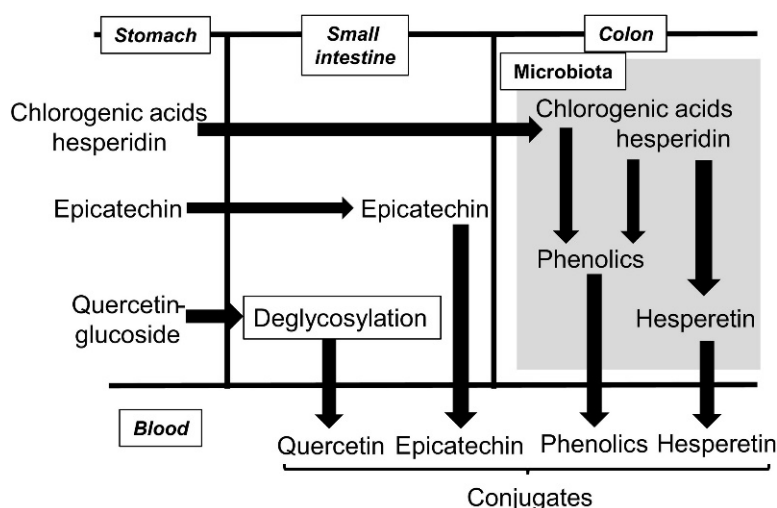


Figura 14: Biodisponibilidad de los polifenoles (Williamson, 2017).

La menor diferencia de actividad antioxidante de los polifenoles *in vivo* respecto los correspondientes *in vitro* recae en el proceso de metabolización de estos en los organismos vivos (Prochazkova, Bousova, & Wilhelmova, 2011). Debido al bloqueo de los grupos hidroxilos por la metilación, sulfatación o glucuronidación sufridos en el metabolismo. Pero los polifenoles no solo presentan actividad antioxidante a nivel nutritivo, sino que también se han descrito como inhibidores enzimáticos de las enzimas ciclooxigenasa (COX) y lipoxigenasa (LOX) entre otras enzimas.

4.3.2. Efecto prooxidante de los polifenoles

En algunos polifenoles se han descrito propiedades prooxidantes a determinadas concentraciones y según las características del medio. Actualmente se ha relacionado que una mayor actividad antioxidante comporta una mayor probabilidad que el polifenol desencadene finalmente actividad prooxidante (Santos et al., 2018). Por esta razón, se explica una mayor actividad prooxidante en los flavonoides que en los ácidos fenólicos debido a la mayor capacidad antioxidante de los flavonoides sobre los ácidos fenólicos. Por ejemplo, los flavonoles con un grupo catecol en el anillo B son potencialmente generadores de O-semiquinona, molécula con potencial para dañar las principales moléculas del organismo como son las proteínas y el ADN, que puede terminar en una

cascada de retroalimentación positiva. Consecuencia de la generación de radicales libres que incrementan el estado oxidativo. Además, el mecanismo antioxidante de quelación de los metales de transición que realizan los flavonoides en determinadas ocasiones puede desencadenar también un efecto prooxidante. Consecuencia que los iones libres de estos metales están involucrados en procesos de oxidación, generando radicales iniciadores del estrés oxidativo.

El efecto prooxidante de los flavonoides no debe considerarse siempre como una actividad perjudicial en los seres vivos. Sino que requiere la valoración de su efecto global, ya que en determinadas situaciones presenta un efecto beneficioso. Por ejemplo, el efecto prooxidante se ha vinculado con un mecanismo de señalización celular en el cual los flavonoides serían los xenobióticos responsables de mantener una óptima activación de los antioxidantes endógenos. Por otro lado, mientras un leve incremento del estrés oxidativo inducido por los flavonoides puede ser beneficioso para un correcto mantenimiento de la función antioxidante endógena, un aumento severo puede ser aprovechado en determinados estadios iniciales de procesos mutagénicos y cancerígenos como quimiopreventivo (Prochazkova et al., 2011).

5. Sistemas antioxidantes

5.1. Definición de antioxidante

Actualmente, el término antioxidante se utiliza ampliamente. Sin embargo, debido a su multitud de aplicaciones es un término complejo de definir. Por ejemplo, desde el punto de vista químico, un antioxidante es un compuesto con capacidad reductora que evita la oxidación de otras moléculas oxidándose él mismo mediante la cesión de un electrón. En cambio, en la industria alimentaria se emplea el término antioxidante para referirse a aquella sustancia capaz de prolongar las condiciones de consumo óptimo de los productos evitando el enranciamiento y la oxidación de los alimentos. En el ámbito de la biología, el término antioxidante ha ido evolucionando y actualmente se emplea para referirse a aquellas sustancias capaces de neutralizar las especies reactivas que generan un desequilibrio en el estado redox de los organismos vivos, bien directamente o bien a través de los sistemas de antioxidantes endógenos de la propia célula. Los organismos aerobios sobreviven a la presencia de oxígeno gracias al sistema antioxidante que los protege de las especies reactivas del oxígeno que se generan en la respiración mitocondrial. Así, un antioxidante es cualquier sustancia que retrase, prevenga o elimine el daño oxidativo a una molécula diana (*“any substance that delays, prevents, or removes oxidative damage to a target molecule”*). Es decir, el término antioxidante es independiente de la concentración, origen o mecanismo por el cual una determinada sustancia es potencialmente antioxidante en los seres vivos (Halliwell & Gutteridge, 2015a).

5.2. Sistemas antioxidantes

Los sistemas antioxidantes se clasifican según si la acción desempeñada del antioxidante es enzimática o no enzimática (**Figura 15**), a pesar de que en disciplinas como en la nutrición prevalezca la clasificación por el origen de su obtención, diferenciándose entre los antioxidantes endógenos y los exógenos. Los endógenos los genera el propio organismo y se clasifican a su vez en enzimáticos y no enzimáticos, representando la mayoría y la minoría, respectivamente. Determinados antioxidantes no se pueden sintetizar por el propio organismo y, por ello, los seres vivos los obtienen del medio externo, principalmente provenientes de la nutrición. Los antioxidantes exógenos son todos no enzimáticos (Sharifi-Rad et al., 2020).

La polaridad de la sustancia antioxidante, diferenciando entre antioxidantes hidrofílicos (hidrosoluble) e hidrofóbicos (liposoluble), es otro parámetro fundamental para la clasificación de los

antioxidantes exógenos. En los alimentos y productos vegetales con una composición básicamente acuosa, los antioxidantes aislados son del tipo hidrofílico. En el caso opuesto, el de los alimentos con una composición rica en grasa, encontramos antioxidantes de una naturaleza hidrofóbica (Fernández-Ochoa, Cádiz-Gurrea, Fernández-Moreno, Rojas-García, Arraez-Roman, & Segura-Carretero, 2022). Teniendo en cuenta el proceso LADME (liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción), los antioxidantes hidrofílicos presentan una velocidad de absorción y eliminación superior que los respectivos antioxidantes hidrofóbicos. Estos últimos en determinadas situaciones pueden acumularse un largo periodo de tiempo excediendo el tiempo deseado de almacenaje en el propio organismo.

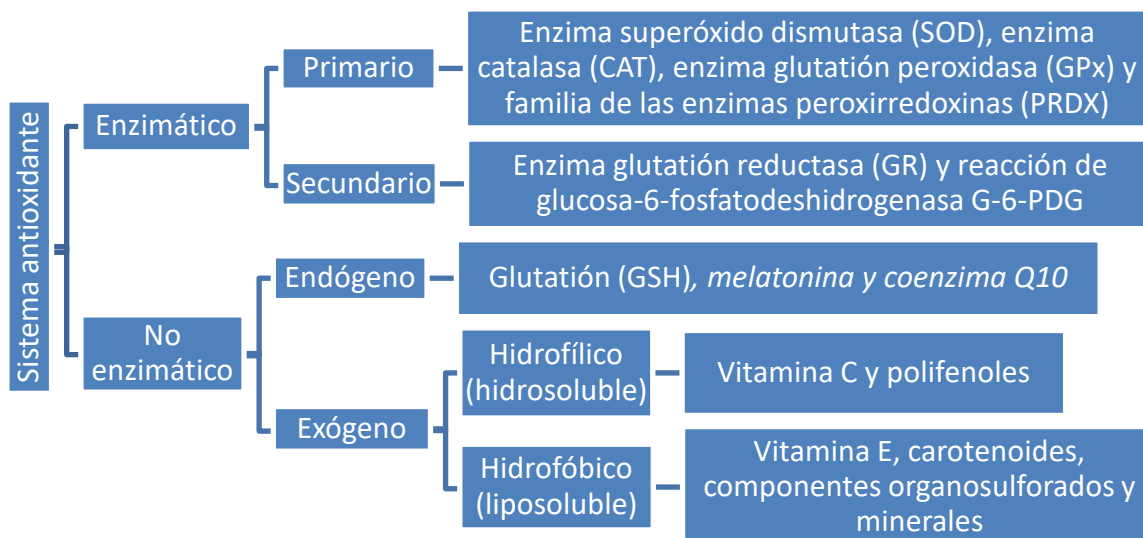


Figura 15: Clasificación enzimática del sistema antioxidante.

5.2.1. Antioxidantes enzimáticos

Los antioxidantes enzimáticos, también conocidos como antioxidantes de alto peso molecular, pueden actuar directamente en la neutralización de las especies reactivas de oxígeno (ERO) o actuar de manera indirecta mediante el respaldo de otros antioxidantes como puede ser mediante la regeneración de estados reducidos de coenzimas. Estos antioxidantes enzimáticos se clasifican como antioxidantes enzimáticos primarios y secundarios, respectivamente.

Todos los antioxidantes enzimáticos son endógenos, hecho que al ser producidos por el propio organismo su presencia sea responsable de los estímulos recibidos e independientes de las aportaciones de la dieta.

5.2.1.1. Antioxidantes enzimáticos primarios

Las especies reactivas del oxígeno surgidas de la reducción incompleta del oxígeno (O_2) en forma del anión/radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son la diana de actuación de los antioxidantes enzimáticos directos. Entre ellos encontramos la enzima superóxido dismutasa (SOD), la enzima catalasa (CAT), la enzima glutatión peroxidasa (GPx) y la enzima peroxirredoxina (PRDX).

La enzima SOD se encarga de neutralizar el radical superóxido en peróxido de hidrógeno según la **reacción 1 (Figura 16)**. El peróxido de hidrógeno al ser una sustancia aun con potencial oxidante, el sistema antioxidante lo puede neutralizar por las enzimas primarias como la CAT y la GPx. La SOD es una metaloenzima con distintas isoformas: la SOD-cobre-zinc (distribución en los cloroplastos y en el citosol y el espacio extracelular de los humanos); la SOD-hierro (distribución en el citosol de las plantas y en las células microbianas) y la SOD-manganeso (distribución mitocondrial). De forma minoritaria la SOD también compite por el óxido nítrico (NO[•]) mediante la **reacción 2 (Figura 16)**.

La enzima CAT se encarga de la neutralización del peróxido de hidrógeno mediante la **reacción 3 (Figura 16)** que se subdivide en dos subreacciones que son la **reacción 4 y 5 (Figura 16)**. La CAT se localiza principalmente en los peroxisomas, principalmente del hígado y en los glóbulos rojos.

La enzima GPx neutraliza el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) **reacción 6 (Figura 16)** o el hidroperóxido (ROOH) **reacción 7 (Figura 16)** juntamente con GSH. Consiste en una oxidoreductasa dependiente de selenio en humanos. GPx presenta distintas isoformas (8 isoformas): las isoformas 1, 2, 3 y 4 incorporan selenocisteína, la isoforma 6 contiene selenio en la especie humana, pero no en los roedores, mientras que las isoformas 5, 7 y 8 son independientes del selenio que en su lugar presentan cisteína.

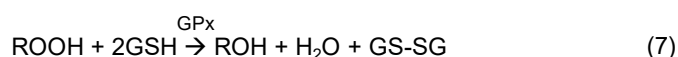
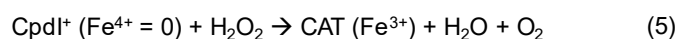
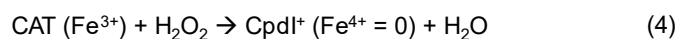


Figura 16: Reacciones de los antioxidantes enzimáticos primarios. Figura modificada a partir de Sharifi-Rad et al. 2020 (Sharifi-Rad et al., 2020).

La enzima PRDX se encarga de la neutralización del peróxido de hidrógeno mediante la **reacción 8 (Figura 16)**. Esta enzima regenera su estado oxidado mediante la enzima tiorredoxina (Trx) a través de la **reacción 9 (Figura 16)**. Actualmente se han descrito hasta 6 isoformas distintas de la enzima PRDX.

5.2.1.2. Antioxidantes enzimáticos secundarios

Los antioxidantes enzimáticos secundarios son enzimas regeneradoras del estado oxidado de las enzimas primarias, como la enzima GPx que requiere de la regeneración del glutatión oxidado (GSSG) al glutatión reducido en forma de GSH. Esta reacción de reducción la cataliza la enzima secundaria glutatión reductasa (GR), que a la vez transforma el NADPH en NADP⁺, con lo que la

regeneración del cofactor NADPH depende de la viabilidad de la actividad metabólica de la reacción de la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (G-6-PDG) encargada de metabolizar el paso de glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona (**Figura 17**).

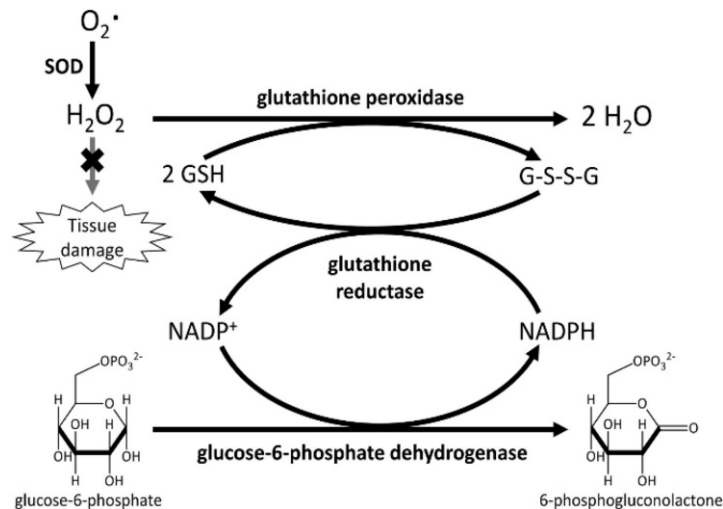


Figura 17: Actuación de los antioxidantes enzimáticos secundarios glucosa reductasa (GR) y glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (G-6-PDG) en la regeneración de la enzima primaria glutatión peroxidasa (GPx) (Sharifi-Rad et al., 2020).

También encontramos la enzima Trx en la regeneración de la enzima PRDX **reacción 9 (Figura 16)**.

5.2.2. Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos, también conocidos como antioxidantes de bajo peso molecular, se diferencian según su origen entre endógenos, que son la minoría, y exógenos que son la mayoría. Estos antioxidantes son moléculas con función no catalítica.

5.2.2.1. Antioxidantes no enzimáticos endógenos

Entre los principales antioxidantes no enzimáticos endógenos encontramos el glutatión (GSH) que procede de la hidrólisis de ATP mediante la condensación de glutamato y cisteína, el ácido α -lipoico procedente de un proceso redox, la melatonina que es una neurohormona derivada del aminoácido triptófano y la coenzima Q10 que interviene en la cadena electrónica del transporte mitocondrial.

5.2.2.2. Antioxidantes no enzimáticos exógenos

Los antioxidantes no enzimáticos exógenos son primordiales en la cooperación con los antioxidantes endógenos para eliminar posibles excesos de radicales libres. Debido que los antioxidantes no enzimáticos exógenos ejercen su actividad antioxidante a determinadas concentraciones y no los sintetiza el propio organismo humano, estos deben aportarse de forma periódica al organismo. La alimentación es la fuente principal de este tipo de antioxidantes debido que la mayoría de ellos se encuentran en forma hidrosoluble y donde predominan la vitamina C (ácido ascórbico) y los polifenoles provenientes de distintas especies de vegetales. Pero encontramos también otros en forma liposoluble como son la vitamina E y los carotenoides, que se clasifican en carotenos y xantofilas de los cuales los primeros no están oxigenados y los últimos presentan forma

oxigenada. El principal carotenoide es la vitamina A. En menor relevancia encontramos los compuestos organosulfurados como es el sulfuro de dialilo, aislado en el ajo, y algunos minerales como el selenio y el zinc. Estos últimos son considerados desde un punto nutricional como micronutrientes que deben ser ingeridos por la importancia que presentan en el correcto funcionamiento de distintas vías enzimáticas antioxidantes.

Actualmente, ya se ha consolidado la tendencia de la bioprospección en el campo del reino *Plantae* para el aislamiento de nuevas moléculas con poder antioxidante, principalmente polifenoles. Como resultado, se han descubierto un gran abanico de fitoquímicos obtenidos de los extractos de distintas especies vegetales.

6. Estrés oxidativo

En España, en el periodo de 1940 a 1960, ya se realizaron investigaciones sobre la implicación de los radicales libres en la vida humana. Ya en la década de 1940 los doctores Pere Puig Muset y Jaime Miquel investigaron la biología de los radicales libres de oxígeno y los mecanismos del estrés oxidativo mitocondrial, respectivamente. El trabajo de estos pioneros fueron los primeros pasos para la creación en 1991 del Grupo Español de Radicales Libres (GERLI), vinculado a la *Society for Free Radical Research-Europe (SFRR-Europe)* (del Río Legazpi, 2016). Sin embargo, el concepto de estrés oxidativo fue descrito mundialmente por primera vez en 1985 por Sies como “*an imbalance between the production and manifestation of reactive oxygen species (ROS) and a biological system’s ability to readily detoxify the reactive intermediates or to repair the resulting damage*” (Preiser, 2012). Posteriormente, en 1986 Sies modificó la definición como “*the imbalance between oxidants and antioxidants potentially leading to damage*”. De ambas definiciones sobre el estrés oxidativo se deriva que se producen especies reactivas de oxígeno (ERO) con una toxicidad potencial y los correspondientes mecanismos desintoxicantes.

La célula no emplea el oxígeno si no se activa como ERO, el orgánulo responsable del cual es la mitocondria. Las mitocondrias fueron clásicamente clasificadas como los orgánulos celulares energéticos por excelencia ya que a través de la fosforilación oxidativa que realizan, la célula obtiene ATP. Posteriormente se determinó que la mitocondria también era un orgánulo focalizado en la generación de moléculas de señalización del estado redox celular, del cual depende la regulación del ciclo celular. La principal molécula del estado redox mitocondrial es el anión superóxido. Este radical se genera como producto de los distintos complejos implicados en la cadena respiratoria mitocondrial destinados a la obtención energética del ATP (Murphy, 2009). Sin embargo, la producción del radical superóxido en el organismo no es exclusivo de la respiración mitocondrial.

El término de especies reactivas de oxígeno (ERO), en inglés *reactive oxygen species (ROS)*, incluye las especies de oxígeno tanto en forma radicalaria como no radicalaria. Algunas ERO no radicalarias al ser agentes oxidantes pueden llegar a convertirse fácilmente en radicales, con lo cual, todos los radicales de oxígeno son ERO, pero no todas las ERO son potencialmente radicales de oxígeno. En la **Tabla 3** se representan las principales ERO que se pueden encontrar en forma de radical o no radical. De las cuales, en el metabolismo redox, destacan principalmente el anión superóxido también llamado radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y el radical peroxilo (RO_2^{\cdot}) (Halliwell, 2006).

Tabla 3: Principales especies reactivas del oxígeno (ERO) en forma no radicalaria y radicalaria. *a menudo se incluyen como ERO, pero también se pueden clasificar como ERN.

ERO en forma no radicalaria	ERO en forma radicalaria
<ul style="list-style-type: none"> • Peróxido de hidrógeno, H₂O₂ • Ácido hipobromoso, HOBr • Ácido hipocloroso, HOCl • Ozono, O₃ • Singlete de oxígeno, O₂^{1Δg} • Peróxidos orgánicos, ROOH • Peroxinitrito, ONOO^{-*} • Peroxinitrato, O₂NOO^{-*} • Ácido peroxinitroso, ONOOH[*] • Peroxomonocarbonato, HOOCO₂⁻ • Nitrosoperoxicarbonato, ONOOCO₂⁻ 	<ul style="list-style-type: none"> • Superóxido, O₂^{-•} • Hidroxilo, OH[•] • Hidroperoxilo, HO₂[•] (protonado superóxido) • Carbonato, CO₃^{-•} • Peroxilo, RO₂[•] • Alcoxilo, RO[•] • Radical dióxido de carbono, CO₂^{-•} • Singlete de oxígeno, O₂^{1Σg⁺}

Las ERO se consideran biomarcadores del estrés oxidativo ya que suelen derivar del daño oxidativo. De entre las ERO generadas por el propio organismo, el O₂^{-•} se considera la ERO primaria, mientras que el H₂O₂ (una reducción de la molécula de oxígeno) es la molécula central de todas las ERO. Ello es debido a su producción endógena por los peroxisomas bajo condiciones aeróbicas, a su facilidad de difusión a través de las distintas membranas celulares mediante los canales peroxoporinas (un tipo de acuaporinas), a su importancia como molécula referente en la señalización del estado redox y a su variedad de destinos celulares (Frijhoff et al., 2015). Entre los diversos destinos, el H₂O₂ puede ser detoxificado en H₂O y O₂ (mediante la enzima GPx en las mitocondrias o mediante la enzima CAT en los peroxisomas) o puede actuar como precursor de más ERO como el HO[•] mediante la reacción de Haber-Weiss (**reacción 1, Figura 18**). Esta reacción depende de un conjunto de reacciones englobadas bajo la reacción de Fenton (**reacción 2, Figura 18**) (Sies, 2017). Además, el H₂O₂ también tiene la opción de convertirse en ácido hipocloroso (HOCl) por medio de la reacción catalizada por la enzima mieloperoxidasa (MPO) con el cloro (Cl⁻) (**reacción 3, Figura 18**). Esta reacción se realiza fundamentalmente en los neutrófilos ya que contiene la MPO en elevadas cantidades y con menor frecuencia también en los monocitos y los eosinófilos (Bansal & Kaushal, 2014).

En los últimos años se siguen descubriendo a nivel celular nuevas vías productoras de ERO.

Es importante ser consciente que no todas las ERO presentan el mismo grado de reactividad, Por ejemplo, las ERO H₂O₂, NO[•] y O₂ reaccionan con pocas moléculas, mientras que HO[•] reacciona rápidamente con facilidad en el organismo.

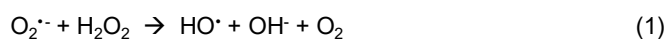


Figura 18: Reacciones de las especies reactivas de oxígeno (ERO).

A pesar de no ser un factor determinante del estrés oxidativo, no se debe subestimar (o descartar) el papel de las especies reactivas del nitrógeno (ERN), en inglés *reactive nitrogen species (RNS)*. Las ERN, como se describe en la **Tabla 4**, se distinguen entre especies no radicalarias y radicalarias.

Las ERN desencadenan el estrés nitrosativo del cual sus moléculas centrales son el radical óxido nítrico (NO^{\cdot}) y el anión peroxinitrito (ONOO^-).

También hay que tener presente que el organismo está expuesto a agentes inductores que generan una gran cantidad de ERO, como es el caso de determinadas radiaciones ultravioletas (Sies & Jones, 2020). Este hecho puede desencadenar el paso del estrés fisiológico, llamado eustrés oxidativo (del griego *eu-* significa “bueno, positivo”), al desafío oxidativo suprafisiológico o angustia oxidativa, llamado distrés oxidativo (del griego *dis-* significa “malo, negativo”).

Tabla 4: Principales especies reactivas del nitrógeno (ERN) en forma no radicalaria y radicalaria. *a menudo se incluyen como ERO, pero también se pueden clasificar como ERN.

ERN en forma no radicalaria	ERN en forma radicalaria
<ul style="list-style-type: none"> • Ácido nitroso, HNO_2 • Cation nitrosilo, NO^+ • Anión nitroxilo, NO^- • Tetróxido de dinitrógeno, N_2O_4 • Trióxido de dinitrógeno, N_2O_3 • Anión peroxinitrito, ONOO^* • Peroxinitrato, O_2NOO^* • Ácido peroxinitroso, ONOOH^* • Cation de nitronio, NO_2^+ • Peroxinitritos de alquilo, ROONO • Peroxinitratos de alquilo, RO_2ONO • Cloruro de nitrilo, NO_2Cl • Nitrato de peroxiacetilo, $\text{CH}_3\text{C}(\text{O})\text{OONO}_2$ 	<ul style="list-style-type: none"> • Óxido nítrico, NO^{\cdot} • Dióxido de nitrógeno, NO_2^{\cdot} • Nitrato, NO_3^{\cdot}

Actualmente todavía se emplea el concepto de estrés oxidativo definido por Sies y Jones del año 2007 y que se describe como “*an imbalance between oxidants and antioxidants in favor of the oxidants, leading to a disruption of redox signalling and control and/or molecular damage*” (Halliwell

& Gutteridge, 2015c). Esta definición engloba el concepto del desequilibrio de la homeostasis (del griego *homos* que significa semejante y *stasis* que significa estabilidad) redox a favor de los oxidantes siguiendo los principios de la señalización redox descrito en el código redox (Jones & Sies, 2015; Sies, 2015).

El estrés oxidativo surge cuando el sistema antioxidante (el enzimático y el no enzimático) no es capaz de mantener las ERO a los niveles adecuados de la homeostasis redox, ya que las ERO son moléculas con capacidad de señalización celular. En la **Figura 19** se representan las posibles situaciones de equilibrio entre las ERO y el sistema antioxidante (Monaghan, Metcalfe, & Torres, 2009). Así, para comprender el sistema de la homeostasis redox hay valorar el global de ERO con el sistema antioxidante, pues la valoración únicamente de ERO o del sistema antioxidante puede conducir a conclusiones erróneas. Por ejemplo, niveles altos de ERO pueden dar lugar a un estrés oxidativo (**situación “b”, Figura 19**) o no (**situación “c”, Figura 19**), en función de los niveles de defensas antioxidantes. En el momento en que el aumento de ERO no puede ser controlado por el sistema antioxidante, es cuando el estrés oxidativo desencadena el daño oxidativo lo que conlleva alteraciones en lípidos, proteínas y ADN, factores potencialmente desencadenantes de enfermedades metabólicas.

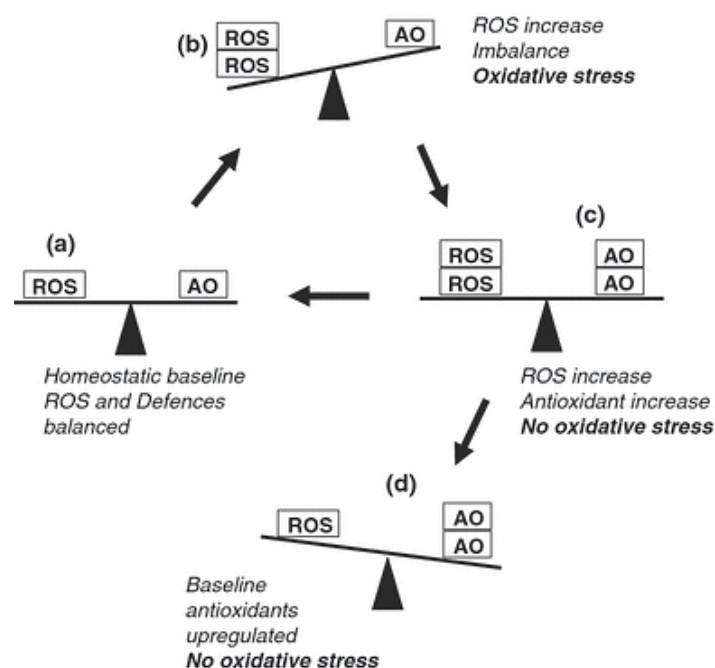


Figura 19: Equilibrio entre las “reactive oxygen species (ROS)” (equivalente a ERO en castellano), el sistema antioxidante de defensa y el estrés oxidativo. Situación (a): condición inicial homeostática, los niveles de ROS y antioxidantes (AO) son bajos, con defensas adecuadas para equilibrar la producción de ROS de manera que no haya estrés oxidativo. Situación (b): un aumento en la producción de ROS puede exceder inicialmente la capacidad del sistema antioxidante, dando lugar a un período de estrés oxidativo. Situación (c): si el aumento de ROS es pequeño, puede ir acompañado de un mayor despliegue de antioxidantes, evitando un mayor estrés oxidativo. Si la elevación de ROS es solo temporal, habrá un retorno a (a), la posición homeostática. Situación (d): la exposición prolongada a un aumento de ROS puede inducir al organismo a aumentar permanentemente sus niveles de antioxidantes, lo que lo hace más capaz de hacer frente a futuros sucesos oxidativos (Monaghan et al., 2009).

En la **Figura 20** se observa la evolución de las características del concepto de estrés oxidativo descrito por Sies del año 1985 y por Sies y Jones del año 2007.

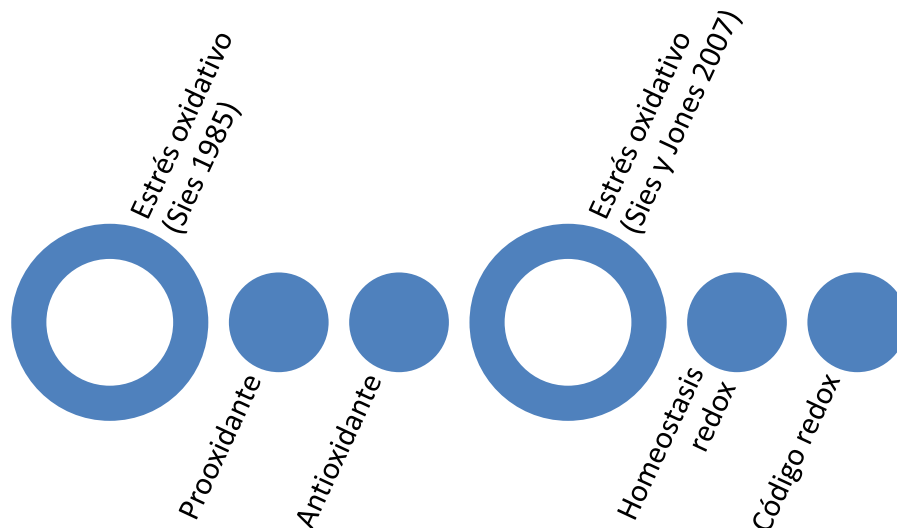


Figura 20: Evolución del concepto de estrés oxidativo del año 1985 al año 2007.

7. Medicina redox y el estrés oxidativo en fisiopatología

El exposoma, es decir la totalidad de las exposiciones a las cuales está expuesto el organismo es un factor determinante en el estado del nivel redox del organismo (balance entre las especies oxidantes y antioxidantes). Consecuencia de la elevada cantidad de ERO producidas en la cadena respiratoria mitocondrial para la generación de energía en los organismos aerobios, las ERO provenientes de la cadena mitocondrial de estos organismos determinan un factor clave del total de especies reactivas en el estado redox del organismo. Las principales ERO son H_2O_2 y $O_2^{\cdot-}$ pues participan en las distintas vías de señalización redox. Sin embargo, es el H_2O_2 la molécula pleiotrópica (del griego *pleion* que significa “más” y *tropos* que significa “camino”) por excelencia ya que es la moneda de cambio en el mecanismo de señalización redox, tal y como se observa en la **Figura 21**.

El distrés oxidativo aparece a partir de concentraciones suprafisiológicas (ejemplo ≥ 100 nM H_2O_2), provocando el daño oxidativo de macromoléculas que facilitaría el desencadenamiento de distintos mecanismos fisiopatológicos que podrían concluir en el desarrollo de procesos morbosos como el cáncer. Por esta razón, es deseable tener bajo control los niveles excesivos de oxidantes y prevenir su toxicidad. En este contexto, surge la medicina redox como la disciplina encargada de modular los niveles oxidantes como estrategia terapéutica (Sies et al., 2020). Entre los métodos para alcanzar la homeostasis redox que se plantea en la medicina redox, existe la administración de agentes antioxidantes exógenos mediante la dieta o fármacos a través de distintos alimentos o extractos vegetales (Rudrapal et al., 2022). En situaciones en las cuales no es posible alcanzar la homeostasis redox mediante la administración de agentes antioxidantes, como en determinados estadios del cáncer, la medicina redox induce un distrés oxidativo (mediante el aumento de ERO) con el fin de eliminar las células malignas.

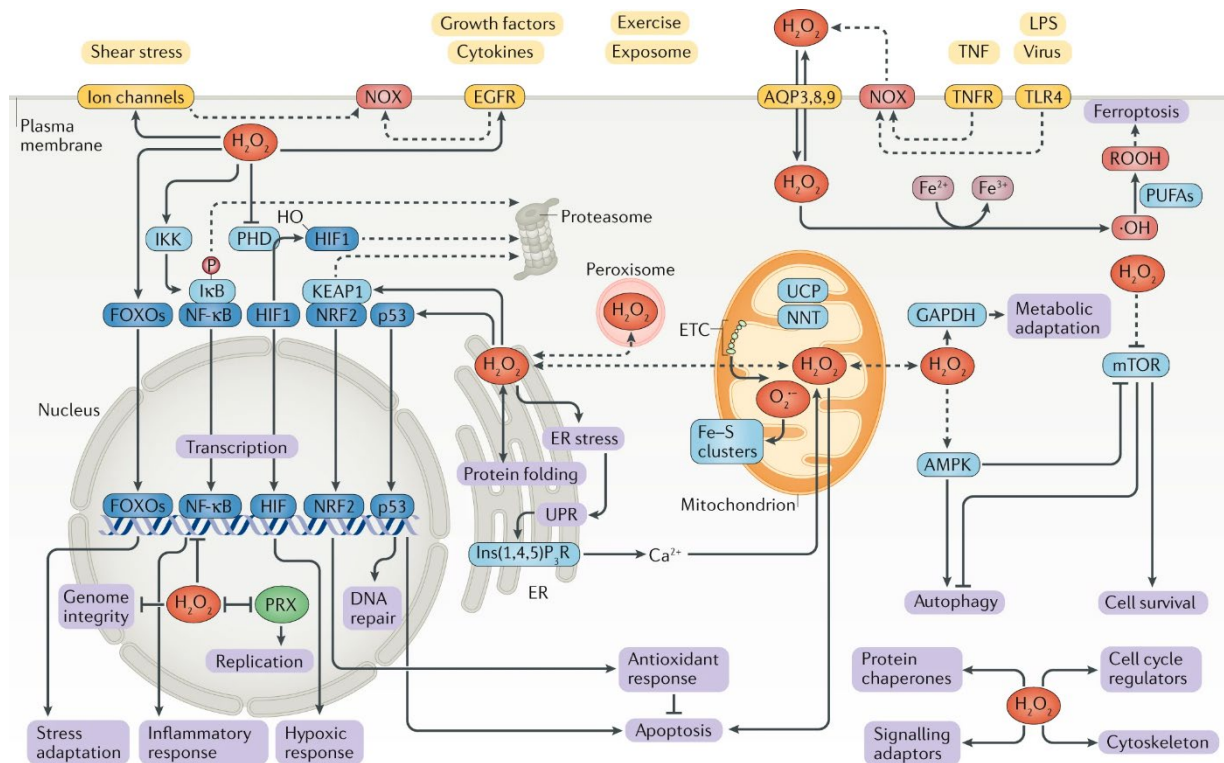


Figura 21: Pleiotropía de la señal redox en la biología redox. En amarillo claro están representados los exposomas y en azul oscuro las dianas terapéuticas (Sies et al., 2020).

8. Cáncer de piel, un cáncer en expansión a nivel mundial

8.1. Estrecha relación de los procesos cancerosos con las ERO

El cáncer es una enfermedad multicausal con una tendencia en aumento por el envejecimiento de la población en los países desarrollados. La medicina redox ha establecido que las ERO tienen un papel primordial en las etapas iniciales de establecimiento de la carcinogénesis. Por otro lado, la Organización Mundial para la Salud (OMS) ha definido los biomarcadores como agentes medibles y clave para predecir la incidencia de las enfermedades (Frijhoff et al., 2015). En el caso del estrés oxidativo algunos marcadores cumplen con los requisitos, como el factor de transcripción Nrf2 o factor nuclear eritroide similar al factor 2 que permite el pronóstico de determinados cánceres como el de colon o pulmón.

La carcinogénesis se establece en el organismo por medio de las tres fases siguientes: iniciación, promoción y progresión (He, He, Farrar, Ji, Liu, & Ma, 2017). Las ERO, a través de la lesión del ADN pueden iniciar un proceso tumoral, pero también pueden favorecer la fase de promoción por ataque continuo.

En esta fase es fundamental la acción del sistema inmunitario para impedir que las células pre-tumorales lleguen a la última fase del desarrollo tumoral. El principal gen proapoptótico es el gen p53 que al eliminar las bases oxidadas del ADN juega un papel primordial en la conservación de su integridad. El estrés oxidativo inactiva este gen y por lo tanto inactiva una de las principales vías de iniciación de la apoptosis. Sin embargo, las ERO no únicamente alteran genes proapoptóticos, sino que también activan genes antiapoptóticos como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) de manera que se favorece la proliferación celular. De ahí la importancia de la mitocondria ya que es la estructura celular primordial en la producción y acumulación de ERO a nivel celular.

Finalmente, en la etapa de progresión las modificaciones oxidantes inducidas por las ERO, dan lugar a células genéticamente inestables y promueven distintos mecanismos fundamentales en la metástasis como es la inhibición de las proteasas y la estimulación de las metaloproteinasas de la matriz celular. Es el momento en que se establece la capacidad de invasión de otras localizaciones del organismo estableciéndose el proceso de carcinogénesis.

8.2. Cáncer de piel

La piel, el órgano más extenso del organismo, tiene múltiples funciones de entre las cuales destaca la de barrera entre el medio externo del interno. Aunque la piel está sometida constantemente a exposomas, se mantiene en situación de homeostasis redox gracias al propio sistema antioxidante. Sin embargo, independientemente de los condicionantes modificables de estos exposomas como es la exposición solar, la piel es un tejido con una elevada renovación celular que es de por sí un factor de riesgo para el inicio de procesos cancerígenos. Así, la miríada de factores que convergen en este tejido hace que actualmente el principal cáncer a nivel mundial sea el de piel, el cual se diferencia como se observa en la **Figura 22** entre el cáncer de piel tipo melanoma (CPM) y el tipo no melanoma (CPNM) (Rubió-Casadevall et al., 2016).

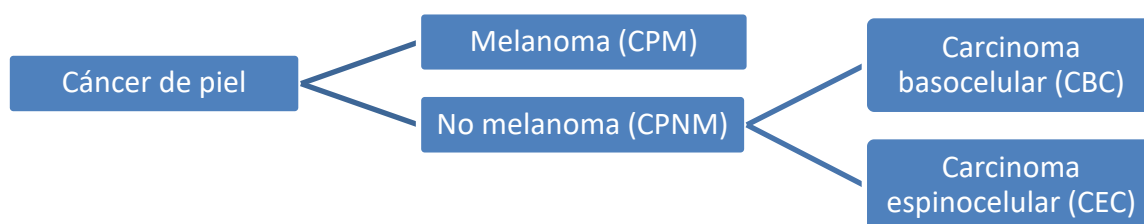


Figura 22: Tipos de cáncer de piel.

8.2.1. Luz ultravioleta, un potencial desencadenante del cáncer de piel

La mayor fuente de radiación ultravioleta a la cual están expuestos los seres humanos es la luz solar. La luz ultravioleta se clasifica en tres bandas principales que ordenadas en orden creciente de longitud de onda son: la UVC ($\lambda = 200$ a 290 nm), la UVB ($\lambda = 290$ a 320 nm) y la UVA ($\lambda = 320$ a 400 nm) (Elsner et al., 2007). Como se observa en la **Figura 23**, una menor longitud de onda comporta menos penetración en la piel. Así, la radiación UVB penetra la epidermis e incluso una parte de la dermis mientras que la UVA, alcanza las capas más profundas de la piel hasta llegar al tejido subcutáneo. Sin embargo, a nivel fisiológico es determinante la cantidad de energía efectiva transmitida en la piel. De ahí que cuanto más energética es una radiación ultravioleta (una menor λ), menor poder de penetración en la piel presenta. Además, las radiaciones UVB y la UVC son filtradas selectivamente por la atmosfera terrestre de manera parcial o total respectivamente, así que el 95% de la luz UV que llega a superficie terrestre es básicamente UVA. Por lo tanto, las radiaciones potencialmente modificadoras de estructuras biológicas de la piel por inducción de daño oxidativo son la UVA y la UVB. La radiación UVB daña directamente el ADN, mientras la radiación UVA está involucrada en la fotosensibilización (Sander, Hamm, Elsner, & Thiele, 2003).

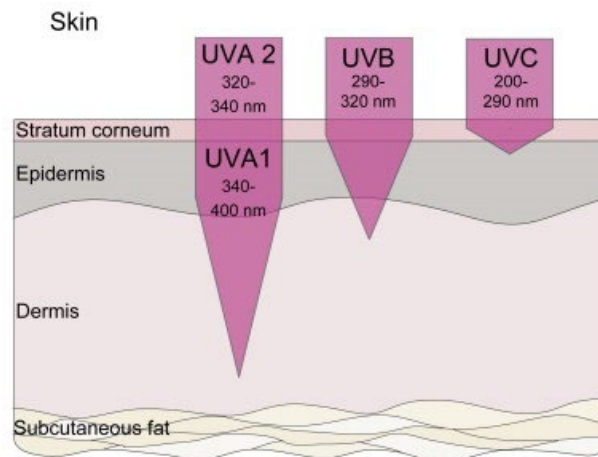


Figura 23: Poder de penetración de la luz ultravioleta A, B y C en las capas de la piel (Maverakis, Miyamura, Bowen, Correa, Ono, & Goodarzi, 2010).

8.3. Estrategias de protección frente el cáncer de piel

Las predicciones sobre la incidencia del cáncer de piel proyectada en los próximos años sugieren la tendencia al alza a nivel mundial (Rundle, Militello, Barber, Presley, Rietcheck, & Dellavalle, 2020). Uno de los desencadenantes de esta enfermedad se atribuye a la falta de concienciación sobre el peligro de la exposición solar de nuestra piel (Rubió-Casadevall et al., 2016). Por otro lado, iniciativas en salud pública, como campañas de protección solar para la población general y en programas escolares en Australia, han demostrado una reducción en la incidencia. Así, dos objetivos primordiales para reducir la incidencia del cáncer de piel a nivel mundial serían la implantación de programas de concienciación entre la población junto con una homogenización en el sistema de detección precoz.

Una manera de reducir la exposición es la utilización de estrategias de fotoprotección, bien de tipo físico o tópico, o bien de tipo sistémico u oral (Krutmann et al., 2020; Taylor & Rosen, 2020). La primera se basa en el uso de elementos físicos y agentes tópicos para protegernos de la radiación ultravioleta, mientras que la segunda, que debe ser complementaria a la primera, se basa en la ingesta de componentes potencialmente protectores contra la radiación ultravioleta. Entre estos agentes predominan algunas vitaminas o compuestos fitoquímicos, en forma aislada o complejos, que por medio de su capacidad antioxidante contribuyen a la homeostasis redox. En este sentido, los helechos, al ser un reservorio de obtención de fitoquímicos (especialmente de polifenoles), son potenciales candidatos a la obtención de compuestos o productos con capacidad fotoprotectora a nivel sistémico (Evans et al., 2010). Hasta el momento, el extracto acuoso de las frondes de *Polypodium leucotomos* (*Polypodiaceae*) es el extracto de helecho con mayor evidencia científica en el tratamiento de alteraciones de la piel humana derivadas de la exposición a los rayos ultravioleta (Aguilera, Vicente-Manzanares, de Gálvez, Herrera-Ceballos, Rodríguez-Luna, & González, 2021; Parrado, Mascaraque, Gilaberte, Juarranz, & Gonzalez, 2016; Parrado, Nicolas, Juarranz, & Gonzalez, 2020).

Hipótesis y objetivos

“L’originalitat consisteix en tornar a l’origen, i aquest origen és la Natura”

- Antoni Gaudí Cornet.

La combinación de las disciplinas de la etnobotánica y la bioprospección en los estudios de farmacognosia son dos cauces que permiten la exploración de los fitoquímicos con los correspondientes usos tradicionales de las especies del reino *Plantae* o nuevas aplicaciones y bioactividades. De esta manera, se aporta a la sociedad un saber sobre la biodiversidad vegetal de una determinada región que, además, contribuye a la conservación de ésta y otorga nuevos conocimientos que pueden ser fundamentales para la mejora constante del bienestar de la sociedad y, por tanto, de la calidad de vida.

A partir de esta premisa, la hipótesis del estudio es que los extractos de distinta polaridad de los principales helechos de las montañas de Prades pueden presentar capacidad antioxidante, debido a la presencia de compuestos fitoquímicos de interés farmacéutico.

Así, nos formulamos como objetivo general del estudio, determinar el perfil fitoquímico en relación con la potencial actividad antioxidante de los extractos de las frondes de las cuatro principales especies de helechos de las montañas de Prades.

Como objetivos específicos se plantean los siguientes:

- Identificar y obtener los extractos metanólicos y hexánicos de los cuatro principales helechos recolectados en las montañas de las Prades: *Polypodium vulgare* L., *Asplenium adiantum-nigrum* L., *Asplenium trichomanes* L. y *Ceterach officinarum* Willd.
- Estudiar las propiedades antioxidantes y anti-tirosinasa de los extractos metanólicos y hexánicos de los distintos helechos mediante métodos *in chemico*.
- Identificar compuestos bioactivos polares de referencia de los extractos metanólicos.
- Determinar las propiedades citotóxicas y fototóxicas de los extractos metanólicos en líneas celulares no tumorales de fibroblastos murinos (3T3) y queratinocitos humanos (HaCaT).
- Evaluar las propiedades citoprotectoras y citoreparadoras de los extractos metanólicos en las líneas celulares no tumorales.
- Examinar las propiedades antiproliferativas *in vitro* de los extractos metanólicos en diferentes líneas celulares tumorales (HeLa, HepG2, MCF-7 y A549).

Publicaciones

“Antioxidants are compounds already in your body, but you need more than what the body produces”

- Joe Vinson.

Publicación 1 → Evaluation of Anti-Tyrosinase and Antioxidant Properties of Four Fern Species for Potential Cosmetic Applications

DOI

10.3390/f10020179

Resumen

Desde una perspectiva farmacéutica los helechos son especies poco exploradas en comparación con otras plantas terrestres. Así, en este trabajo se evaluó la actividad antioxidante e inhibidora de la tirosinasa juntamente con el contenido total de compuestos fenólicos de los extractos hidrofílicos y lipofílicos de cuatro helechos recolectados en las montañas de Prades (*Polypodium vulgare* L., *Asplenium adiantum-nigrum* L., *Asplenium trichomanes* L. y *Ceterach officinarum* Willd.), con el fin de explorar posibles aplicaciones cosméticas. La actividad antioxidante se evaluó utilizando los ensayos de radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) y xantina/xantina oxidasa (X/XO). Se ensayó el potencial de los extractos para prevenir la hiperpigmentación de la piel mediante la inhibición de la enzima tirosinasa, ya que esta provoca la síntesis de melanina en la epidermis. Todos los helechos confirmaron su capacidad antioxidante y anti-tirosinasa, pero curiosamente los extractos hidrofílicos (obtenidos con metanol) de las frondes fueron más potentes y efectivos en comparación con los correspondientes extractos lipofílicos (obtenidos con hexano). Los extractos metanólicos de las frondes de *Polypodium vulgare*, *Asplenium adiantum-nigrum* y *Ceterach officinarum* mostraron mejor capacidad antioxidante. El extracto metanólico de las frondes de *Polypodium vulgare* también presentó la mayor actividad como inhibidor de la tirosinasa.

Resumen gráfico

Polypodium vulgare L.



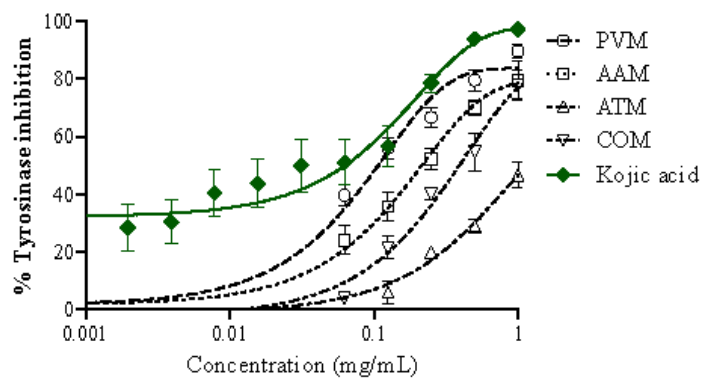
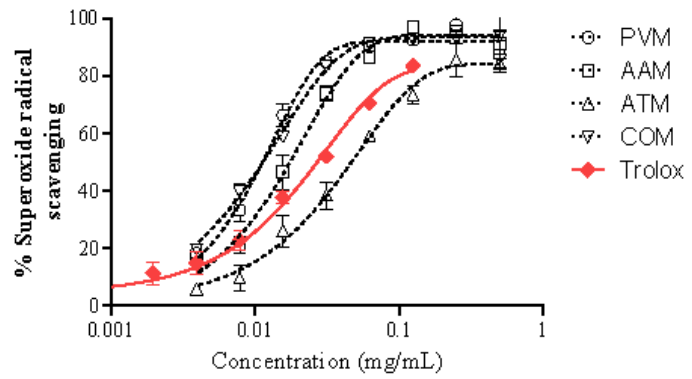
Asplenium adiantum-nigrum L.



Asplenium trichomanes L.






Ceterach officinarum Willd.



Article

Evaluation of Anti-Tyrosinase and Antioxidant Properties of Four Fern Species for Potential Cosmetic Applications

Adrià Farràs ^{1,2} , Guillermo Cásedas ¹, Francisco Les ^{1,3} , Eva María Terrado ¹,
Montserrat Mitjans ² and Víctor López ^{1,3,*} 

¹ Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Universidad San Jorge, 50830 Villanueva de Gállego (Zaragoza), Spain; afarrama7@alumnes.usj.es (A.F.); gcasedas@usj.es (G.C.); fles@usj.es (F.L.); emterrado@usj.es (E.M.T.)

² Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; montsemitjans@ub.edu

³ Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, CITA-Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain

* Correspondence: ilopez@usj.es; Tel.: +34-976-060-100

Received: 4 January 2019; Accepted: 11 February 2019; Published: 19 February 2019



Abstract: Ferns are poorly explored species from a pharmaceutical perspective compared to other terrestrial plants. In this work, the antioxidant and tyrosinase inhibitory activities of hydrophilic and lipophilic extracts, together with total polyphenol content, were evaluated in order to explore the potential cosmetic applications of four Spanish ferns collected in the Prades Mountains (*Polypodium vulgare* L., *Asplenium adiantum-nigrum* L., *Asplenium trichomanes* L., and *Ceterach officinarum* Willd). The antioxidant activity was evaluated using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical, oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and xanthine/xanthine oxidase (X/XO) assays. The potential to avoid skin hyperpigmentation was tested by inhibiting the tyrosinase enzyme, as this causes melanin synthesis in the epidermis. All ferns were confirmed as antioxidant and anti-tyrosinase agents, but interestingly hydrophilic extracts (obtained with methanol) were more potent and effective compared to lipophilic extracts (obtained with hexane). *Polypodium vulgare*, *Asplenium adiantum-nigrum*, and *Ceterach officinarum* methanolic extracts performed the best as antioxidants. *Polypodium vulgare* methanolic extract also showed the highest activity as a tyrosinase inhibitor.

Keywords: pteridophytes; ferns; antioxidant; tyrosinase inhibition; cosmetics; Polypodiopsida

1. Introduction

The incidence of cutaneous disorders and melanoma has increased worldwide [1]; in fact, non-melanoma skin cancer has become the principal skin cancer among fair-skinned people [2]. Sun radiation is known to accelerate photodamage of the skin, and ultraviolet radiation is one of the main factors that causes skin hyperpigmentation and skin aging [3].

Melanin, which is obtained by irreversible tyrosine catalyzed reactions, is an important epidermal agent that blocks ultraviolet radiation [4]. It has been noted that melanocyte cultures from black skin-types increase melanogenesis and melanosis more than in fair skin-types [5]. Consequently, lighter and thinner skin is 6–33 times more susceptible to developing minimal perceptible erythema than darker and thicker skin [6,7]. Ectopic dermal melanocytes, a result of successive erythemas, are shown to be directly dependent on increased melanin in the epidermis (hypermelanosis), which can trigger sun spots [8].

Primary photoprotection, also called non-systemic photoprotection, has traditionally been considered the main strategy against the harmful effects of sun radiation [9]. This method is based

on having healthy habits towards sun exposure and the use of physical photoprotective agents; however, some disadvantages have been described [10]. Antioxidant oral supplements from secondary metabolites of plants are an adjunctive to primary photoprotection [11]. This most recent strategy on photoprotection is known as secondary photoprotection, or systemic photoprotection [12,13], in which standardized aqueous extract from the fronds of *Polypodium leucotomos* L., which is marketed under the trade name Fernblock[®] (Cantabria Labs, Santander, Spain), has been one of the most popular systemic and topical photoprotective oral agents in cosmetic science [14,15]. The effectiveness and safety of the use of this fern is a consequence of its multiple pathways of action described by Palomino et al. [16].

Ferns (Polypodiopsida), formerly considered pteridophytes, have been reported as one of the least understood classes of tracheophyte plants from a phylogenetic perspective [17,18]. Recent reviews of the *Polypodium* genus have been published since the commercialization of Fernblock[®], as shown in Berman et al. [19]. Other authors have recently published updated reviews on the phytochemistry and ethnopharmacology of ferns, highlighting the presence of polyphenols (particularly flavonoids), terpenoids, steroids, and alkaloids [20,21]. Most of these bioactive compounds are described as natural enzyme inhibitors in biomedical research drug discovery due to anticancer, antidiabetic, and antiaging properties [22–24]. The selected ferns in this study (*Polypodium vulgare* L., *Asplenium adiantum-nigrum* L., *Asplenium trichomanes* L., and *Ceterach officinarum* Willd) are some of the most common leptosporangiate ferns reported on the Prades Mountains (Spain, 41°18'43" N 1°05'09" E) [25].

Considering Fernblock[®] as a reference in skin photoprotection [26,27], the potential anti-aging and skin-whitening properties of four Spanish ferns collected in the Prades Mountains have been studied. In vitro antioxidant activities against different free radicals (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl—DPPH, oxygen radical absorbance capacity—ORAC, and xanthine/xanthine oxidase—X/XO methods) and in vitro inhibition of the tyrosinase enzyme were evaluated.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

All reagents used were of analytical grade. Methanol, hexane, tyrosinase, and L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) were acquired through Vidrafoc[®] (Barcelona, Spain). Dimethyl sulfoxide (DMSO) was obtained from Fisher Scientific[®] (Madrid, Spain). The provider of 5-hydroxy-2-(hydroxymethyl) pyran-4-one (kojic acid) was Alfa Aesar[®] (Karlsruhe, Germany). The reagents used to determine the antioxidant activity such as 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH radical), 2,6-dihydroxypurine (xanthine), xanthine oxidase, and (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (trolox) were supplied by Sigma-Aldrich[®] (Madrid, Spain). Sodium carbonate anhydrous (Na₂CO₃) and nitrotetrazolium blue chloride (NBT) were purchased from Laboaragon[®] (Cartuja Baja, Spain) and Sumalsa[®] (Zaragoza, Spain), respectively. All aqueous solutions were prepared with ultra-pure water.

2.2. Plant Material

It was checked that the subject species had been described in The Plant List [28] and by Banco de Datos de Biodiversidad de Cataluña [29].

The whole fresh fronds of selected fern species were identified and collected from the Prades Mountains, in the province of Tarragona (Spain), in November 2016 by Adrià Farràs and Josep M^à Farràs using botanical keys [30]. The samples were dried in the shade at room temperature.

A dried voucher specimen has been deposited at the Herbarium of Universidad San Jorge, Zaragoza, Spain (*Polypodium vulgare*: voucher no. 003-2016; *Asplenium adiantum-nigrum*: voucher no. 004-2016; *Asplenium trichomanes*: voucher no. 005-2016; *Ceterach officinarum* voucher no. 006-2016). These examples were authenticated by Dr. J.A. Vicente Orellana from Universidad CEU San Pablo (Madrid, Spain).

2.3. Extracts Preparation

Hydrophilic (= polar) and lipophilic (= non polar) extracts were prepared using methanol or hexane, respectively. Dried fronds of the four species were powdered mechanically until obtaining 40 mg of each. The powdered fronds of each species were split equally into two erlenmeyers of 500 mL. Each 20 mg of fern powder was macerated with 250 mL of solvent (hexane or methanol) at room laboratory temperature for 24 h. The extract was filtered using Whatman N°4 filter paper, and the solvent was evaporated using rotatory evaporator with a thermostatic bath at 30 °C. This process was completed two more times until exhaustion of plant material; extracts were stored at −20 °C until further experiments. Yields were calculated in percentages from the dry weight of fronds used and the quantity of dry mass obtained by extraction.

2.4. Phytochemical Screening by Thin Layer Chromatography (TLC) and Total Phenolic Content (TPC)

Silica gel TLC plates coated with fluorescent indicator F254 were used in order to detect phenolic compounds (flavonoids and phenolic acids) in the samples. 10 µL of hexane and methanolic extracts of the samples at concentrations of 10 mg/mL were run on the plates with EtOAc/MeOH/H₂O (65:15:5, v:v:v) as mobile phase. After eluting the samples, plates were dried, sprayed with the Natural Products polyethylene glycol (PEG) reagent, observed at 365 nm and retention factors (R_f) calculated [31].

TPC was quantified by the Folin Method as previously described using gallic acid for the standard calibration curve [32].

2.5. Determination of Antioxidant Activities

Antioxidant capacity was assessed by three complementary methods that were DPPH, ORAC, and superoxide radicals generated by X/XO.

2.5.1. DPPH Radical Scavenging Activity

The neutralization of DPPH radicals as antioxidant method was reported the first time by Blois et al. [33]. In this case, the assay was carried out according to the modifications described by Casedas et al. [34]. In 96-well microplates, each well contained 150 µL of extract and 150 µL of DPPH (0.04 mg/mL methanol solution). Antioxidant activity was determined measuring absorbance (Abs) at 515 nm after 30 min of dark incubation. Blank and control wells were also considered. The highest concentration of extracts tested was 1 mg/mL. Trolox, a water soluble derivate of vitamin E, was used as positive standard. Background interferences from solvents and samples were deducted from the activities prior to calculating radical scavenging capacity (RSC) as follows: $RSC (\%) = [(Abs_{control} - Abs_{sample}) / Abs_{control}] \times 100$.

2.5.2. ORAC Assay

ORAC assay was carried out to measure the capacity of extracts to scavenge peroxy radicals. Samples and trolox were dissolved in PBS and methanol (50:50, v:v). Samples were incubated with fluorescein (0.07 µM) in 96-well plates for 10 min at 37 °C. Afterwards, AAPH (0.012 M) was supplemented and fluorescence was measured for 98 min at 485 nm of excitation and 520 nm of emission, in a FLUOstar Optima fluorimeter (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) [35]. Results were expressed as µmol trolox equivalents (TE)/mg sample.

2.5.3. Superoxide Radicals Generated by Xanthine/Xanthine Oxidase (X/XO)

Xanthine oxidase and xanthine as substrate are responsible for the production of superoxide radicals [36]. The effects of fern extracts on superoxide radicals generated by X/XO were evaluated by measuring the formation of the NBT (nitrotetrazolium blue chloride)-radical superoxide complex [37] using a described procedure [34]. The reaction mixture was prepared every day as a consequence of reduced stability. This mixture was composed of 90 µM xanthine, 16 mM Na₂CO₃, and 22.8 µM NBT

in phosphate buffer (pH 7.0). 240 μ L of the reaction mixture in each well with 30 μ L of extract solution and XO was incubated in the dark for 2 min at 37 °C and absorbance read at 560 nm. Blank and control wells were also considered, and background interferences from solvents and samples were also deducted from the activities previous to calculating the RSC (%). The reference substance (trolox) was the same used in DPPH and ORAC assays.

2.6. Inhibition of Tyrosinase Activity

The inhibition of tyrosinase was performed following a previous method [38]. Samples were mixed with 40 μ L L-DOPA and 80 μ L potassium phosphate buffer (pH 6.8). Finally, 40 μ L of tyrosinase (200 U/mL) was added in the wells. L-DOPA and tyrosinase were solved in buffer. The inhibition of tyrosinase was determined at 475 nm. Methanolic extracts were dissolved in methanol, and hexane extracts were dissolved in DMSO. Kojic acid was the reference inhibitor substance. Background interferences from solvents and samples were previously deducted from the activities to calculate the percentage of enzymatic inhibition (compared to control activity). Control wells had the same mix except the sample/inhibitor, which was replaced by the solvents of these.

2.7. Statistical Analysis

All samples were analyzed in triplicates ($n = 3$), at least, on different days. Statistical significance was analyzed by using GraphPad Prism version 6, San Diego, CA, USA. Data are presented as mean \pm standard error. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) values were obtained by non-linear regression. Activities have been compared using a one-way analysis of variance (ANOVA). Statistical differences were considered as follows: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), and $p \leq 0.001$ (***). Correlations were performed between TPC and ORAC values, and TPC and tyrosinase IC_{50} values; Pearson values were also obtained using GraphPad Prism version 6.

3. Results

3.1. Plant Material and Yields

Table 1 shows the scientific names and Spanish common names of the collected samples as well as yields of extraction in each case. The hydrophilic extracts obtained with methanol have higher yields (ranging from 16.27% to 29.55%) than lipophilic extracts obtained with hexane (ranging from 1.49% to 2.34%).

3.2. Polyphenol Content by Thin Layer Chromatography (TLC) and Folin Method

TLC plates sprayed with Natural Products-PEG reagent revealed the presence of flavonoids in methanolic samples obtained from *Asplenium trichomanes* (ATM, $R_f = 0.97, 0.92, 0.86$) and *Ceterach officinarum* (COM, $R_f = 0.66, 0.5$). Spots corresponding to phenolic acids were also detected with similar retention factor (R_f) values in the methanolic samples from *Polypodium vulgare* (PVM, $R_f = 0.81$), *Asplenium adiantum-nigrum* (AAM, $R_f = 0.81$), *Ceterach officinarum* (COM, $R_f = 0.81$), and hexane extract of *Ceterach officinarum* (COH, $R_f = 0.81$). An image of the TLC plate sprayed with Natural Products-PEG reagent can be downloaded from Supplementary Materials (Figure S1). Total Phenolic Content (TPC) was quantified using the Folin–Ciocalteu reagent; as observed in Table 1, methanolic extracts contained higher amounts of polyphenols, with PVM and COM showing the highest values. As predicted, methanol seems to be a better solvent to extract polyphenols.

Table 1. Fern samples, botanical names, yields of extraction, and total polyphenol content (TPC).

Species	Spanish Common Name	Methanol Extract			Hexane Extract		
		Code	Yield (%) ^a	TPC (μGAE/mg)	Code	Yield (%) ^a	TPC (μGAE/mg)
<i>Polypodium vulgare</i> L. (Polypodiaceae)	"Polipodio"	PVM	23.53	172.8 ± 3.8	PVH	1.49	74.7 ± 5.8
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i> L. (Aspleniaceae)	"Culantrillo negro"	AAM	16.27	113.5 ± 5.8	AAH	1.57	96.0 ± 3.8
<i>Asplenium trichomanes</i> L. (Aspleniaceae)	"Culantrillo rojo"	ATM	29.55	100.4 ± 0.7	ATH	2.01	70.3 ± 6.2
<i>Ceterach officinarum</i> Willd (Aspleniaceae)	"Doradilla"	COM	28.04	193.2 ± 3.8	COH	2.34	70.3 ± 7.6

^a The yield is a relation between the weight of the dried extract and the weight of dried plant material expressed as percentage (%). GAE: gallic acid equivalents; PVM: *P. vulgare* methanol extract; AAM: *A. adiantum-nigrum* methanol extract; ATM: *A. trichomanes* methanol extract; COM: *C. officinarum* methanol extract; PVH: *P. vulgare* hexane extract; AAH: *A. adiantum-nigrum* hexane extract; ATH: *A. trichomanes* hexane extract; and COH: *C. officinarum* hexane extract.

3.3. Antioxidant Activity

3.3.1. DPPH Radical Scavenging Activity

As seen in Figure 1, methanolic extracts had a more powerful capacity for DPPH reduction than hexane extract for each fern. Methanolic extracts had a very similar profile of antiradical activity reaching 100% of radical inhibition at concentrations between 0.01 and 0.1 mg/mL. PVM and COM had the lowest IC_{50} values and can therefore be considered as the best antioxidants. Extracts obtained with hexane were also antioxidants, but the concentrations needed to scavenge 100% of DPPH radicals were superior compared to samples extracted with methanol as solvent.

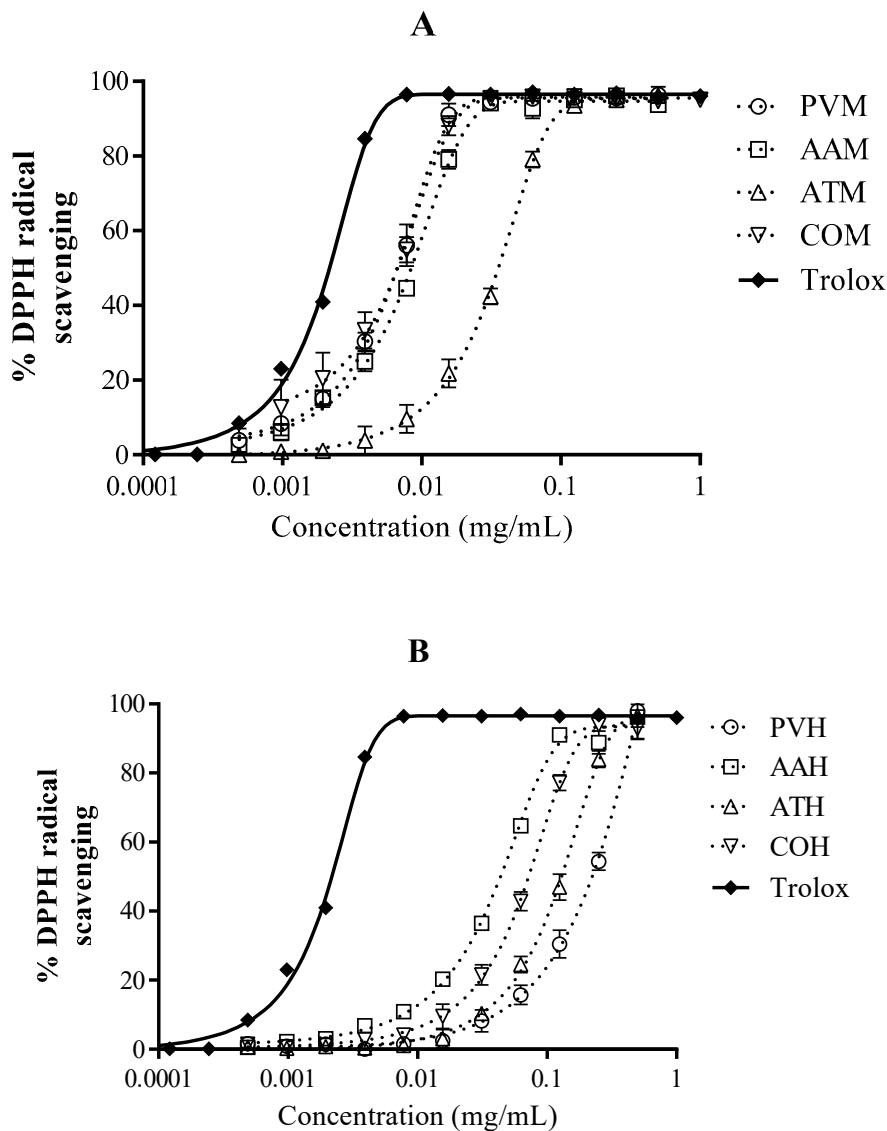


Figure 1. Antioxidant activity against DPPH radicals of methanol extracts (A) and hexane extracts (B) using trolox as a reference.

3.3.2. ORAC Assay

The ORAC assay is an internationally recognized method to measure antioxidant capacity. In Table 2, the ORAC values were also higher for methanolic extracts, particularly for PVM and COM, which is in accordance with data obtained in the DPPH assay. In Figure 2A, there is a positive correlation between ORAC values and TPC, which seems to indicate that the antioxidant activity may be mediated by polyphenols.

Table 2. ORAC values of methanolic and hexane extracts of fern species.

Ferns	ORAC ($\mu\text{mol Trolox Equivalents/mg Sample}$)	
	Methanolic Extract	Hexane Extract
<i>Polypodium vulgare</i> (PV)	2.34 \pm 0.04	0.38 \pm 0.02
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i> (AA)	2.25 \pm 0.03	0.34 \pm 0.11
<i>Asplenium trichomanes</i> (AT)	2.25 \pm 0.14	0.44 \pm 0.01
<i>Ceterach officinarum</i> (CO)	2.93 \pm 0.23 *	0.84 \pm 0.06 #

* $p < 0.05$ versus PV, AA, and AT methanolic extracts. # $p < 0.05$ versus PV, AA, and AT hexane extracts. Data analyzed using a one-way ANOVA and Tukey post-hoc test.

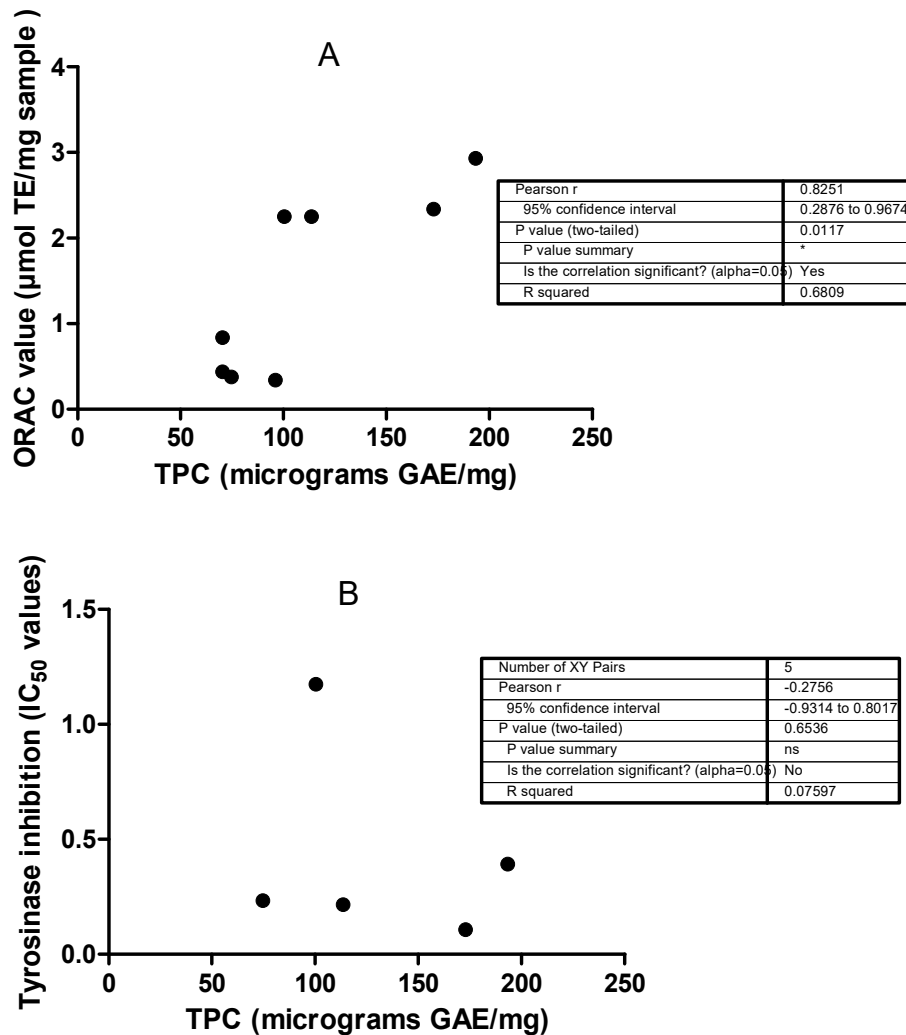


Figure 2. Correlation studies between polyphenol content and antioxidant activity (A) and between polyphenol content and tyrosinase inhibition (B). Pearson r values confirm that there is a correlation between polyphenol content and antioxidant activity measured by the ORAC method, whereas no correlation exists between polyphenol content and the inhibition of the tyrosinase enzyme.

3.3.3. Superoxide Radicals Generated by Xanthine/Xanthine Oxidase (X/XO)

In order to determine if the extracts were able to scavenge physiological radicals like superoxide anion (O_2^-) generated by X/XO, the extracts were tested using this methodology at various concentrations [15]. There were significant differences between methanolic and hexane extracts (Figure 3), but surprisingly, the activity of certain methanolic extracts was superior to the reference compound trolox (Figure 3A). Table 3 reveals that PVM, AAM, and COM showed lower IC_{50} values than trolox, which confirms their potential as antiradical agents.

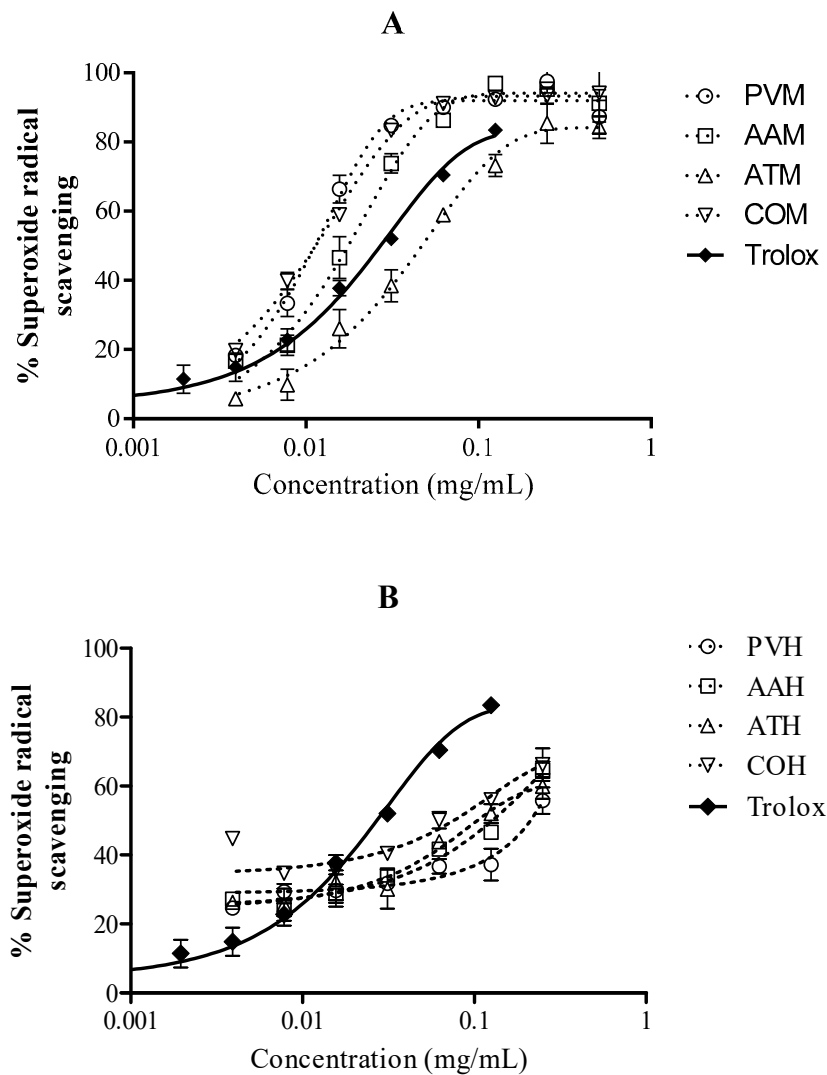


Figure 3. Antioxidant activity of fern methanolic (A) and hexane (B) extracts against superoxide radicals generated by xanthine/xanthine oxidase using trolox as a reference. *** $p < 0.001$ versus the hexane extract in the same species.

Table 3. Summary of IC_{50} values of methanolic and hexane extracts in the DPPH, xanthine/xanthine oxidase, and tyrosinase assays.

Species	IC_{50} (mg/mL) ^a					
	DPPH Radical		O_2^- Radical		Tyrosinase Inhibition	
	Methanol Extract	Hexane Extract	Methanol Extract	Hexane Extract	Methanol Extract	Hexane Extract
<i>Polypodium vulgare</i> (PV)	0.007	0.233	0.011	0.201	0.107	0.233
<i>Asplenium adiantum-nigrum</i> (AA)	0.008	0.044	0.011	0.128	0.216	ND
<i>Asplenium trichomanes</i> (AT)	0.036	0.129	0.047	0.090	1.175	ND
<i>Ceterach officinarum</i> (CO)	0.007	0.072	0.012	0.073	0.392	ND
Kojic acid	-	-	-	-	0.063	
Trolox	0.002		0.026		-	

^a Each value is expressed as the mean of at least three independent measurements. ND: Not determined at assayed concentration (consequence of low activity). IC_{50} value is defined as the effective concentration of extract at which 50% DPPH radicals, 50% of superoxide radicals generated by xanthine/xanthine oxidase, or 50% of the tyrosinase enzyme are inactivated. IC_{50} value was obtained by interpolation from non-linear regression analysis using GraphPad Prism version 6.

3.4. Tyrosinase Inhibition

Figure 4 shows that methanolic extracts were also better than hexane extracts as anti-tyrosinase agents. All methanolic samples presented IC_{50} values between 0.107 mg/mL and 1.175 mg/mL, whereas in the case of hexane samples, only PVH was able to reach the IC_{50} value (Table 3). According to the lowest IC_{50} values, PVM was the best sample as tyrosinase inhibitor, followed by AAM. In this case, tyrosinase inhibition was not correlated with total phenolic content (Figure 2B).

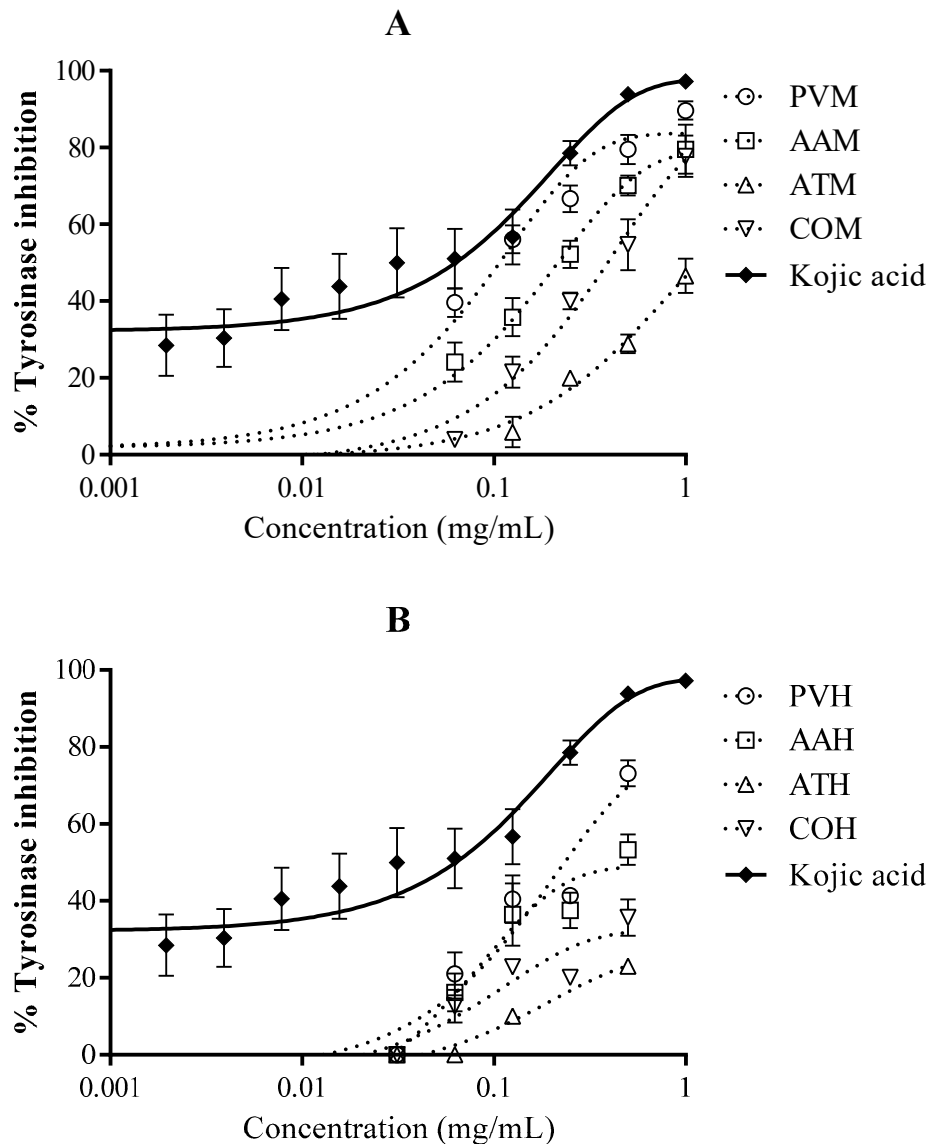


Figure 4. Inhibition of tyrosinase by methanolic (A) and hexane (B) extracts. Kojic acid was used as reference.

4. Discussion

Ferns have been used in traditional medicine in Central and South America. In fact, two of the selected species (*P. vulgare* and *A. adiantum-nigrum*) are known to possess anti-inflammatory and expectorant properties and are used in traditional medicine for colds [39]. In 2008, the European Medicines Agency (EMA) also approved the monograph of *Polypodium vulgare* rhizome for the treatment of cough and colds [40].

The antioxidant properties of ferns are not new; in fact, extracts of some ferns, such as *Pityrogramma calomelanos* and *Polypodium leucotomos*, were recently reported as antioxidants due to the presence of

polyphenols and flavonoids [21,41]. Different types of flavonoids have been described on selected Aspleniaceae ferns [42] and in ferns of the *Dryopteris* genus [43]. It has also been described that the antioxidant mechanisms of flavonoids can be based on hydrogen atom transfer (HAT), single electron transfer (SET), and transition metals chelation (TMC) [44]; however, the antioxidant mechanisms for phenolic acids are predominantly HAT rather than SET [45]. The differing nature of the antioxidant methods tested in this article allows us to determine and characterize the antiradical activity [46,47].

All methanolic samples gave strong positive results in the three tested antioxidant methods. This fact suggests the presence of phenolic acids and flavonoids with hydroxyl groups in the B-ring in the samples [48]. However, the corresponding hexane extracts displayed higher IC₅₀ values and weaker antioxidant properties in the DPPH, ORAC, and X/XO assays. The lower antioxidant activity of hexane extracts could be due to the lower polarity of the solvent system, indicating that the majority of phenol and flavonoid compounds are present in the methanolic extracts as determined by Folin and TLC analysis. Additionally, all methanolic extracts showed higher extraction yields compared to the corresponding hexane extract, indicating that the majority of phytoconstituents are hydrophilic molecules. ORAC is a method for antioxidant activity widely used in food sciences, but it is not the first time that certain ferns have also been evaluated using this methodology. The main advantage of this methodology is that the use of fluorescence in the ORAC assay avoids interference with the colored samples [49].

In the superoxide method, superoxide radicals are reduced by receiving one electron (SET mechanism). Flavonoids are known to possess antiradical activity by SET mechanisms; for this reason, the reported activity in this method may be due to flavonoids [50]. The successful results with IC₅₀ values better than trolox demonstrate an exploitable antioxidant activity in line with previous results for *Polypodium leucotomos* [51].

The isolation of some phytoecdysteroids in certain ferns has been the focus for certain medicinal applications [52]. For example, phytoecdysteroids have already been isolated in *Polypodium vulgare* [53]. The antioxidative properties by singlet oxygen quenching (SET) and the promotion of differentiation of human keratinocytes of these components may be the reason for obtaining certain bioactivities in hexane extracts [54,55]. Contrary to expectation, all hexane extracts exerted antioxidant properties in the different tested methods. The content of terpenoids in ferns could be responsible for these results in relation to the antioxidant activity of the hydrophobic (hexane) extracts [43,56]. Additionally, carotenoids, which are tetraterpenoids, have been reported in a number of fern species [57].

According to tyrosinase inhibition, *Selaginella tamariscina* and *Stenoloma chusanum* are the only ferns that have been described as anti-tyrosinase agents, with flavonoids involved in this activity [42,58,59]. In our study, methanolic extracts also displayed the lowest IC₅₀ values, displaying better anti-tyrosinase activity than hexane extracts. This might ascribe the activity to phenolic compounds; nevertheless, the Pearson values dismiss the positive correlation between IC₅₀ values in the tyrosinase assay and TPC. Due to the fact that flavonoids have been described in certain species of the *Polypodiaceae* family [60,61], we might assume that anti-tyrosinase activity of methanolic and hexane extracts could be due to flavonoids; however, this is not completely in agreement with our results, and other authors have found that the inhibition of tyrosinase could be also due to cycloartanes derivatives isolated in PV [62–64].

5. Conclusions

Regarding the results obtained, particularly for the methanolic extracts, antioxidant and potential depigmenting activity has been reinforced for the species *Polypodium vulgare*, *Asplenium adiantum-nigrum*, *Asplenium trichomanes*, and *Ceterach officinarum*. Hydrophilic extracts of these species could be of interest to develop pharmaceutical or cosmetic products, but further studies are needed to better understand the properties and safety aspects of these species.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1999-4907/10/2/179/s1>, Figure S1: TLC analysis of methanol and hexane extracts of the four fern samples.

Author Contributions: Conceptualization, V.L. and A.F.; Methodology, V.L. and A.F.; Software, V.L. and F.L.; Validation, V.L. and F.L.; Formal Analysis, V.L.; Investigation, A.F., G.C. and F.L.; Resources, V.L. and E.M.T.; Data Curation, A.F., F.L. and V.L.; Writing—Original Draft Preparation, A.F.; Writing—Review & Editing, V.L.; Visualization, V.L.; Supervision, V.L., E.M.T. and M.M.; Project Administration, V.L.; Funding Acquisition, V.L. and E.M.T.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: We acknowledge Universidad San Jorge for technical assistance and laboratory facilities.

Conflicts of Interest: The authors declare that they do not have any conflict of interest.

Abbreviations

AA	<i>Asplenium adiantum-nigum</i>
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
AT	<i>Asplenium trichomanes</i>
CO	<i>Ceterach officinarum</i>
DMSO	dimethyl sulfoxide
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
GAE	gallic acid equivalents
NBT	nitrotetrazolium blue chloride
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
PV	<i>Polypodium vulgare</i>
TE	trolox equivalents
TLC	thin layer chromatography
TPC	total phenolic content
X/XO	xanthine/xanthine oxidase

References

1. Leiter, U.; Keim, U.; Eigentler, T.; Katalinic, A.; Holleczek, B.; Martus, P.; Garbe, C. Incidence, Mortality, and Trends of Nonmelanoma Skin Cancer in Germany. *J. Investig. Dermatol.* **2017**, *137*, 1860–1867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Tran, T.N.T.; Schulman, J.; Fisher, D.E. UV and pigmentation: Molecular mechanisms and social controversies. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2008**, *21*, 509–516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Kimlin, M.G.; Guo, Y.M. Assessing the impacts of lifetime sun exposure on skin damage and skin aging using a non-invasive method. *Sci. Total Environ.* **2012**, *425*, 35–41. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Jansen, R.; Wang, S.Q.; Burnett, M.; Osterwalder, U.; Lim, H.W. Photoprotection Part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agents. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2013**, *69*, 12.
5. Smit, N.P.M.; Kolb, R.M.; Lentjes, E.; Noz, K.C.; van der Meulen, H.; Koerten, H.K.; Vermeer, B.J.; Pavel, S. Variations in melanin formation by cultured melanocytes from different skin types. *Arch. Dermatol. Res.* **1998**, *290*, 342–349. [[CrossRef](#)]
6. Gloster, H.M.; Neal, K. Skin cancer in skin of color. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2006**, *55*, 741–760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Sklar, L.R.; Almutawa, F.; Lim, H.W.; Hamzavi, I. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: A review. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2013**, *12*, 54–64. [[CrossRef](#)]
8. Ortonne, J.P.; Passeron, T. Melanin pigmentary disorders: Treatment update. *Dermatol. Clin.* **2005**, *23*, 209–226. [[CrossRef](#)]
9. Gonzalez, S.; Fernandez-Lorente, M.; Gilaberte-Calzada, Y. The latest on skin photoprotection. *Clin. Dermatol.* **2008**, *26*, 614–626. [[CrossRef](#)]
10. Jansen, R.; Osterwalder, U.; Wang, S.Q.; Burnett, M.; Lim, H.W. Photoprotection Part II. Sunscreen: Development, efficacy, and controversies. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2013**, *69*, 14.
11. Chen, A.C.; Halliday, G.M.; Damian, D.L. Non-melanoma skin cancer: Carcinogenesis and chemoprevention. *Pathology* **2013**, *45*, 331–341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Saewan, N.; Jimtaisong, A. Natural products as photoprotection. *J. Cosmet. Dermatol.* **2015**, *14*, 47–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Nichols, J.A.; Katiyar, S.K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. *Arch. Dermatol. Res.* **2010**, *302*, 71–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Del Rosso, J.Q. Use of *Polypodium leucotomas* Extract in Clinical Practice: A Primer for the Clinician. *J. Clin. Aestheti. Dermatol.* **2016**, *9*, 37–42.
15. Murbach, T.S.; Beres, E.; Vertesi, A.; Glavits, R.; Hirka, G.; Endres, J.R.; Clewell, A.E.; Szakonyine, I.P. A comprehensive toxicological safety assessment of an aqueous extract of *Polypodium leucotomos*, Fernblock, R)). *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *86*, 328–341. [[CrossRef](#)]
16. Palomino, O.M. Current knowledge in *Polypodium leucotomos* effect on skin protection. *Arch. Dermatol. Res.* **2015**, *307*, 199–209. [[CrossRef](#)]
17. Wolf, P.G.; Pryer, K.M.; Smith, A.R.; Hasebe, M. Phylogenetic studies of extant pteridophytes. In *Molecular Systematics of Plants, II: DNA Sequencing*; Soltis, D.E., Soltis, P.S., Doyle, J.J., Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1998; pp. 541–556.
18. Christenhusz, M.J.M.; Chase, M. Trends and concepts in fern classification. *Ann. Bot.* **2014**, *113*, 571–594. [[CrossRef](#)]
19. Berman, B.; Ellis, C.; Elmets, C. *Polypodium Leucotomos*—An Overview of Basic Investigative Findings. *J. Drugs Dermatol.* **2016**, *15*, 224–228.
20. Cao, H.; Chai, T.T.; Wang, X.; Morais-Braga, M.F.B.; Yang, J.H.; Wong, F.C.; Wang, R.B.; Yao, H.K.; Cao, J.G.; Cornara, L.; et al. Phytochemicals from fern species: Potential for medicine applications. *Phytochem. Rev.* **2017**, *16*, 379–440. [[CrossRef](#)]
21. Amoroso, V.B.M.; Rainear, A.; Villalobos, A.P. Bringing back the lost value of Philippine edible ferns: Their antioxidant, proteins and utilization. *Int. J. Adv. Res.* **2017**, *5*, 757–770. [[CrossRef](#)]
22. Tomsik, P. Ferns and Lycopods—A Potential Treasury of Anticancer Agents but Also a Carcinogenic Hazard. *Phytother. Res.* **2014**, *28*, 798–810. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Nguyen, P.H.; Zhao, B.T.; Ali, M.Y.; Choi, J.S.; Rhyu, D.Y.; Min, B.S.; Woo, M.H. Insulin-Mimetic Selaginellins from *Selaginella tamariscina* with Protein Tyrosine Phosphatase 1B, PTP1B, Inhibitory Activity. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 34–42. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Zheng, X.K.; Wang, W.W.; Zhang, L.; Su, C.F.; Wu, Y.Y.; Ke, Y.Y.; Hou, Q.W.; Liu, Z.Y.; Gao, A.S.; Feng, W.S. Antihyperlipidaemic and antioxidant effect of the total flavonoids in *Selaginella tamariscina*, Beauv., Spring in diabetic mice. *J. Pharm. Pharmacol.* **2013**, *65*, 757–766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Saiz, J.C.M.; Pataro, L.; Sotomayor, S.P. Atlas of the pteridophytes of the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Acta Bot. Malacit.* **2015**, *40*, 5–55.
26. Do, Q.T.; Bernard, P. Reverse pharmacognosy: A new concept for accelerating natural drug discovery. In *Lead Molecules from Natural Products: Discovery and New Trends*; Khan, M.T.H., Ather, A., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2006; pp. 1–20.
27. Tanew, A.; Radakovic, S.; Gonzalez, S.; Venturini, M.; Calzavara-Pinton, P. Oral administration of a hydrophilic extract of *Polypodium leucotomos* for the prevention of polymorphic light eruption. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2012**, *66*, 58–62. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. The Plant List. Available online: <http://www.theplantlist.org/> (accessed on 16 November 2016).
29. Banco de Datos de Biodiversidad de Cataluña, Generalidad de Cataluña. Available online: <http://biodiver.bio.ub.es/biocat/index.jsp> (accessed on 16 November 2016).
30. Bonnier, G.; de Layens, G. *Claves Para la determinación de Plantas Vasculares*, 1st ed.; Ediciones Omega, S.L.: Barcelona, Spain, 1988.
31. Wagner, H.; Bladt, S. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, 2nd ed.; Springer: Berlin, Germany, 1996.
32. Singleton, V.L. Citation classic—Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Curr. Contents Agric. Biol. Environ. Sci.* **1985**, *48*, 18.
33. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200. [[CrossRef](#)]
34. Cásedas, G.; Les, F.; Gómez-Serranillos, M.P.; Smith, C.; López, V. Bioactive and functional properties of sour cherry juice (*Prunus cerasus*). *Food Funct.* **2016**, *7*, 4675–4682. [[CrossRef](#)]
35. Davalos, A.; Gomez-Cordoves, C.; Bartolome, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein, assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 48–54. [[CrossRef](#)]

36. Fridovich, I. Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 4053–4057.
37. Thayer, W.S. Superoxide-Dependent and Superoxide-Independent Pathways for Reduction of Nitroblue Tetrazolium in Isolated Rat Cardiac Myocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1990**, *276*, 139–145. [[CrossRef](#)]
38. Senol, F.S.; Orhan, I.E.; Ozgen, U.; Renda, G.; Bulut, G.; Guven, L.; Karaoglan, E.S.; Sevindik, H.G.; Skalicka-Wozniak, K.; Caliskan, U.K.; et al. Memory-vitalizing effect of twenty-five medicinal and edible plants and their isolated compounds. *S. Afr. J. Bot.* **2016**, *102*, 102–109. [[CrossRef](#)]
39. Ho, R.; Teai, T.; Bianchini, J.P.; Lafont, R.; Raharivelomanana, P. *Ferns: From Traditional Uses to Pharmaceutical Development, Chemical Identification of Active Principles, Working with Ferns: Issues and Applications*; Springer: New York, NY, USA, 2010; pp. 321–346.
40. European Medicines Agency (EMA). *Assessment Report on Polypodiumvulgare L.*; Rizoma European Medicines Agency: London, UK, 2008; p. 22.
41. Garcia, F.; Pivel, J.P.; Guerrero, A.; Brieva, A.; Martinez-Alcazar, M.; Caamano-Somoza, M.; Gonzalez, S. Phenolic components and antioxidant activity of Fernblock (R), an aqueous extract of the aerial parts of the fern *Polypodium leucotomos*. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **2006**, *28*, 157–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Iwashina, T.; Matsumoto, S. *Flavonoid Properties of Six Asplenium Species in Vanuatu and New Caledonia, and Distribution of Flavonoid and Related Compounds in Asplenium*, *Bulletin of the National Museum of Nature and Science*; Series B; Botany/National Museum of Nature and Science: Tokyo, Japan, 2011; p. 13.
43. Zhang, M.; Cao, J.G.; Dai, X.L.; Chen, X.F.; Wang, Q.X. Flavonoid Contents and Free Radical Scavenging Activity of Extracts from Leaves, Stems, Rachis and Roots of *Dryopteris erythrosora*. *Iran. J. Pharm. Res.* **2012**, *11*, 991–997.
44. Prochazkova, D.; Bousova, I.; Wilhelmova, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 513–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Robbins, R.J. Phenolic acids in foods: An overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2866–2887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Carocho, M.; Ferreira, I. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *51*, 15–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Karadag, A.; Ozelcik, B.; Saner, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods* **2009**, *2*, 41–60. [[CrossRef](#)]
48. Roginsky, V.; Lissi, E.A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem.* **2005**, *92*, 235–254. [[CrossRef](#)]
49. Kamisan, F.H.; Yahya, F.; Mamat, S.S.; Kamarolzaman, M.F.F.; Mohtarrudin, N.; Kek, T.L.; Salleh, M.Z.; Hussain, M.K.; Zakaria, Z.A. Effect of methanol extract of *Dicranopteris linearis* against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. *BMC Complement. Altern. Med.* **2014**, *14*, 10. [[CrossRef](#)]
50. Robak, J.; Gryglewski, R.J. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 837–841. [[CrossRef](#)]
51. Gomes, A.J.; Lunardi, C.N.; Gonzalez, S.; Tedesco, A.C. The antioxidant action of *Polypodium leucotomos* extract and kojic acid: Reactions with reactive oxygen species. *Braz. J. Med Biol. Res.* **2001**, *34*, 1487–1494. [[CrossRef](#)]
52. Thiem, B.; Kikowska, M.; Malinski, M.P.; Kruszka, D.; Napierala, M.; Florek, E. Ecdysteroids: Production in plant in vitro cultures. *Phytochem. Rev.* **2017**, *16*, 603–622. [[CrossRef](#)]
53. Arai, Y.; Shiojima, K.; Ageta, H. Fern constituents: Cyclopodmenyl acetate, a cycloartanoid having a new 33-carbon skeleton, isolated from *Polypodium vulgare*. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, *37*, 560–562. [[CrossRef](#)]
54. Lafont, R.; Dinan, L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: And update. *J. Insect Sci.* **2003**, *3*, 30. [[CrossRef](#)]
55. Mamadalieva, N.Z. Phytoecdysteroids from *Silene* plants: Distribution, diversity and biological (antitumour, antibacterial and antioxidant, activities. *Bol. Latinoam. Y Del Caribe De Plantas Med. Y Aromat.* **2012**, *11*, 474–497.
56. Graßmann, J. *Terpenoids as Plant Antioxidants*; Gerald, L., Ed.; *Vitamins & Hormones*, Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2005; pp. 505–535.
57. Takaichi, S. Tetraterpenes: Carotenoids. In *Natural Products*; Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M., Eds.; Springer: Berlin, Germany, 2013; pp. 3251–3283.

58. Nguyen, P.H.; Ji, D.J.; Han, Y.R.; Choi, J.S.; Rhyu, D.Y.; Min, B.S.; Woo, M.H. Selaginellin and biflavonoids as protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors from *Selaginella tamariscina* and their glucose uptake stimulatory effects. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 3730–3737. [[CrossRef](#)]
59. Wu, S.Q.; Li, J.; Wang, Q.X.; Cao, J.G.; Yu, H.; Cao, H.; Xiao, J.B. Chemical composition, antioxidant and anti-tyrosinase activities of fractions from *Stenoloma chusanum*. *Ind. Crop. Prod.* **2017**, *107*, 539–545. [[CrossRef](#)]
60. Su, W.; Li, P.Y.; Huo, L.N.; Wu, C.Y.; Guo, N.N.; Liu, L.Q. Phenolic content and antioxidant activity of *Phymatopteris hastate*. *J. Serb. Chem. Soc.* **2011**, *76*, 1485–1496. [[CrossRef](#)]
61. Chai, T.T.; Quah, Y.; Ooh, K.F.; Ismail, N.I.M.; Ang, Y.V.; Elamparuthi, S.; Yeoh, L.Y.; Ong, H.C.; Wong, F.C. Anti-Proliferative, Antioxidant and Iron-Chelating Properties of the Tropical Highland Fern, *Phymatopteris triloba* (Houtt, Pichi Serm (Family Polypodiaceae). *Trop. J. Pharm. Res.* **2013**, *12*, 747–753. [[CrossRef](#)]
62. Ageta, H.; Arai, Y. Chemotaxonomy of ferns 3. triterpenoids from *Polypodium-polypodioides*. *J. Nat. Prod.* **1990**, *53*, 325–332. [[CrossRef](#)]
63. Arai, Y.; Yamaide, M.; Yamazaki, S.; Ageta, H. Fern constituents—Triterpenoids isolated from *Polypodium-vulgare*, *Polypodium-fauriei* and *Polypodium-virginianum*. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3369–3377. [[CrossRef](#)]
64. Khan, M.T.H.; Khan, S.B.; Ather, A. Tyrosinase inhibitory cycloartane type triterpenoids from the methanol extract of the whole plant of *Amberboa ramosa* Jafri and their structure-activity relationship. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 938–943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Publicación 2 → *Polypodium vulgare* L. (*Polypodiaceae*) as a Source of Bioactive Compounds: Polyphenolic Profile, Cytotoxicity and Cytoprotective Properties in Different Cell Lines

DOI

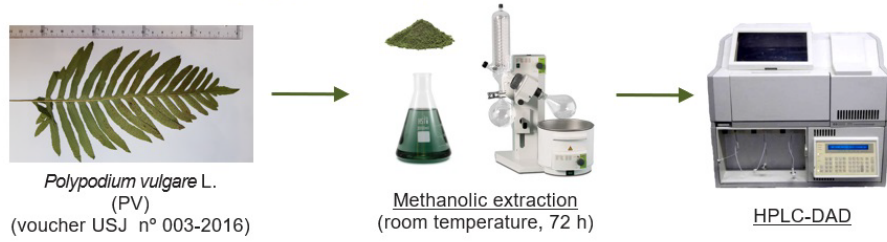
10.3389/fphar.2021.727528

Resumen

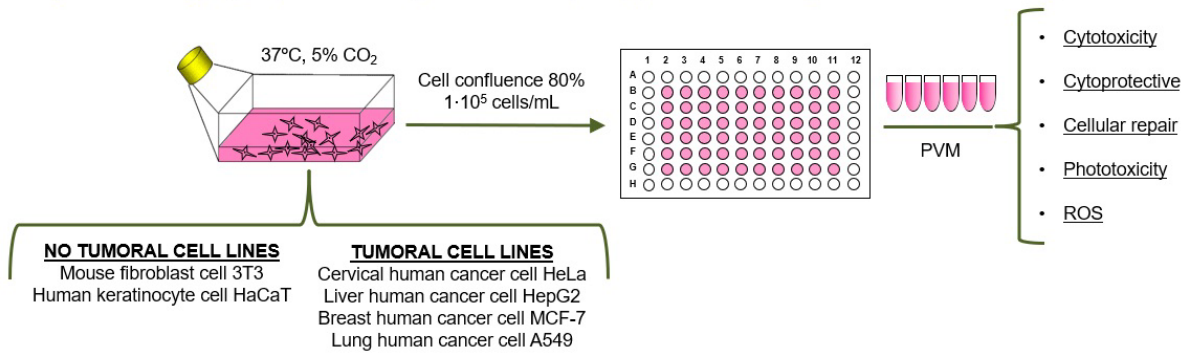
Las pteridófitas, representadas por los helechos y afines, son un puente fitogenético importante entre las plantas inferiores y superiores. Los helechos han evolucionado independientemente de cualquier otra especie del reino vegetal siendo su metabolismo secundario un reservorio de fitoquímicos característicos de este taxón. El estudio de los usos potenciales de *Polypodium vulgare* L. (*Polypodiaceae*) como planta medicinal se ha incrementado en los últimos años particularmente cuando en el año 2008 la Agencia Europea del Medicamento publicó una monografía sobre el rizoma de esta especie. Nuestro objetivo es aportar conocimiento científico sobre los fitoquímicos polares extraídos de las frondes de *P. vulgare*, uno de los principales helechos de distribución Europea, para contribuir a la validación de determinados usos tradicionales. Específicamente, hemos caracterizado el extracto metanólico de las frondes de *P. vulgare* (PVM) por HPLC-DAD e investigado su potencial citotoxicidad, fototoxicidad, producción de ROS y efectos protectores contra el estrés oxidativo utilizando métodos *in vitro*. Así, para evaluar el posible comportamiento citotóxico de PVM se utilizaron las líneas celulares 3T3, HaCaT, HeLa, HepG2, MCF-7 y A549. Por otro lado, se utilizó el HPLC-DAD para validar el perfil polifenólico del extracto. El estrés oxidativo se indujo en las líneas celulares 3T3 y HaCaT con H₂O₂ y UVA y la actividad antioxidante de PVM se evaluó mediante el ensayo ROS. Nuestros resultados demuestran que PVM contiene cantidades significativas de ácido síquico junto con derivados del ácido cafeoilquínico y flavonoides como la epicatequina y la catequina. A concentraciones fisiológicas el PVM no es citotóxico en las diferentes líneas celulares estudiadas, mostrando actividad citoprotectora y de reparación celular en los fibroblastos 3T3. Esta actividad biológica podría atribuirse al alto contenido de compuestos fenólicos. Las frondes de *P. vulgare* son una fuente de compuestos fenólicos, que pueden ser responsables de ciertos usos tradicionales como la capacidad de cicatrización de heridas. Los resultados del presente trabajo indican que las frondes del polipodio común son posibles candidatas para aplicaciones farmacéuticas, en base a los usos tradicionales como plantas medicinales, pero también como posibles ingredientes alimentarios debido a la falta de toxicidad a concentraciones fisiológicas.

Resumen gráfico

Methanolic extraction and polyphenolic profile



Cytotoxicity, cytoprotective, cellular repair, phototoxicity and ROS activity





Polypodium vulgare L. (*Polypodiaceae*) as a Source of Bioactive Compounds: Polyphenolic Profile, Cytotoxicity and Cytoprotective Properties in Different Cell Lines

Adrià Farràs^{1,2}, Montserrat Mitjans^{1*}, Filippo Maggi³, Giovanni Caprioli³,
María Pilar Vinardell¹ and Víctor López^{2,4*}

¹Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ²Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Universidad San Jorge, Zaragoza, Spain, ³School of Pharmacy, Università di Camerino, Camerino, Italy, ⁴Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, CITA-Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Gokhan Zengin,
Selcuk University, Turkey

Reviewed by:

Sengul Uysal,
Erciyes University, Turkey
Paula C. Castilho,
Universidade da Madeira, Portugal

*Correspondence:

Montserrat Mitjans
montsemitjans@ub.edu
Víctor López
ilopez@usj.es

Specialty section:

This article was submitted to
Ethnopharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 18 June 2021

Accepted: 26 August 2021

Published: 16 September 2021

Citation:

Farràs A, Mitjans M, Maggi F,
Caprioli G, Vinardell MP and López V
(2021) *Polypodium vulgare* L.
(*Polypodiaceae*) as a Source of
Bioactive Compounds: Polyphenolic
Profile, Cytotoxicity and Cytoprotective
Properties in Different Cell Lines.
Front. Pharmacol. 12:727528.
doi: 10.3389/fphar.2021.727528

Pteridophytes, represented by ferns and allies, are an important phylogenetic bridge between lower and higher plants. Ferns have evolved independently of any other species in the plant kingdom being its secondary metabolism a reservoir of phytochemicals characteristic of this taxon. The study of the potential uses of *Polypodium vulgare* L. (*Polypodiaceae*) as medicinal plant has increased in recent years particularly when in 2008 the European Medicines Agency published a monograph about the rhizome of this species. Our objective is to provide scientific knowledge on the polar constituents extracted from the fronds of *P. vulgare*, one of the main ferns of European distribution, to contribute to the validation of certain traditional uses. Specifically, we have characterized the methanolic extract of *P. vulgare* fronds (PVM) by HPLC-DAD and investigated its potential cytotoxicity, phototoxicity, ROS production and protective effects against oxidative stress by using *in vitro* methods. The 3T3, HaCaT, HeLa, HepG2, MCF-7 and A549 were the cell lines used to evaluate the possible cytotoxic behaviour of the PVM. HPLC-DAD was utilized to validate the polyphenolic profile of the extract. H₂O₂ and UVA were the prooxidant agents to induce oxidative stress by different conditions in 3T3 and HaCaT cell lines. Antioxidant activity of *in vitro* PVM in 3T3 and HaCaT cell lines was evaluated by ROS assay. Our results demonstrate that PVM contains significant amounts of shikimic acid together with caffeoylquinic acid derivatives and flavonoids such as epicatechin and catechin; PVM is not cytotoxic at physiological concentrations against the different cell lines, showing cytoprotective and cellular repair activity in 3T3 fibroblast cells. This biological activity could be attributed to the high content of polyphenolic compounds. The fronds of the *P. vulgare* are a source of polyphenolic compounds, which can be responsible for certain traditional uses like wound healing properties. In the present work, fronds of the common polypody are positioned as a candidate for

pharmaceutical applications based on traditional medicine uses but also as potential food ingredients due to lack of toxicity at physiological concentrations.

Keywords: cytoprotection, cytotoxicity, polyphenols, polypody, ferns, medicinal plants

INTRODUCTION

Oxidative stress is characterized by an imbalance between pro-oxidant agents and the antioxidant defence system. According to its origin, this antioxidant system is classified as endogenous or exogenous (Addor, 2017). The inability to maintain an adequate redox state, either due to excess production of free radicals or an alteration of the antioxidant system, triggers oxidative damage that affects fundamental biological structures (Willcox et al., 2004). In this sense, studies have associated oxidative stress with the development of different metabolic diseases (Cásedas et al., 2016; He et al., 2017). Nowadays, antioxidant is defined as “any substance that delays, prevents, or removes oxidative damage to a target molecule” (Burton and Ingold, 2015).

Numerous investigations have also established the link between sun exposure and skin alterations (Evans and Johnson, 2010; Kimlin and Guo, 2012). Today it is well documented that ultraviolet radiation affects animals in different causes, among which oxidative stress, inflammation, erythema, breakdown of the extracellular matrix, wrinkling and skin cancer. But the main effect of this ultraviolet irradiation is the increase in oxidative stress caused by the increase in ROS, which can lead to an imbalance in the endogenous antioxidant system (Gegotek et al., 2020). Ultraviolet irradiation is also the main etiologic factor in the development of skin cancers (Rundle et al., 2020). Phytochemicals can modulate the behaviour of tumour cells by acting on different pathways of molecular signalling such as exogenous antioxidant system. As examples of these pathways are the topoisomerase inhibition (genistein), kinase inhibition (apigenin) and modulation of multidrug resistance (2',4',6'-triOH-chalcone), among others (Ren et al., 2003). The doxorubicin, paclitaxel, vinblastine, etoposide, irinotecan, gemcitabine, and methotrexate are medically successful in anticancer therapy, for their security and efficacy, which are part of the list of anticancer agents provided or inspired by nature in recent years (Newman and Cragg, 2012; Silva et al., 2019). In addition, polyphenols, as flavonoids for their safety and accessibility, can also be key dietary molecules for cancer treatment and prevention respectively (Asensi et al., 2011; Shukla et al., 2014; Alvarado-Sansininea et al., 2018).

Ethnopharmacological investigations on traditional Chinese medicine have reported the therapeutic uses of ferns in current medicine. For that purpose, different bioassays were performed as for example antioxidant (*Dryoathyrium boryanum* (Willd.) Ching (*Athyriaceae* family) (Cao et al., 2013)), acetylcholinesterase inhibition (*Stenochlaena palustres* (Burm. f.) Bedd. (*Blechnaceae* family) (Chear et al., 2016)), tyrosinase inhibition (*Asplenium adiantum-nigrum* L. (*Aspleniaceae* family) (Farràs et al., 2019)) and anti-tumour activity (*Davallia cylindrica* Ching (*Davalliaceae* family) (Cao et al., 2014)) attributed to some ferns.

On the other hand, investigations of ferns in recent years have put forward the idea of these species as a potential source of bioactive compounds with food interest. In certain Eastern cultures of the European continent fronds of ferns are used as a food source (Langhansova et al., 2021). The young fronds of ferns (named fiddleheads), which generally exhibit a higher total phenol content than the corresponding mature fronds, are a source of nutrients and phytochemicals with a high potential to reduce oxidative stress of diseases associated with ageing (Dvorakova et al., 2021).

Polypodium vulgare L. (The Plant List, 2021), commonly known as polypody in English or as *polipodio* in Spain for the shape of its fronds as feet (*poly*: many and *podos*: foot), as represented in **Image 1**, is a fern of the leptosporangiate class belonging to the *Polypodiaceae* family (Bolòs and Vigo, 1984; Khare, 2007; Quer, 2016). *P. vulgare* has been used as medicinal plant in Europe since ancient times. As example, in the middle of the last century the use of *P. vulgare* rhizome infusion as expectorant or diuretic in traditional Polish medicine is reported (Glensk et al., 2019b). Moreover, the fronds of *P. vulgare* have an ethnoveterinary use for treatment variolous, jaundice and parasitic diseases in Spain (Bonet and Vallès, 2007). The use of *P. vulgare* as food is restricted as sweetener in the case of its rhizome (Glensk et al., 2019a). Since 2008, the rhizome of *P. vulgare* has been accepted by European Medicines Agency (EMA) for its use as expectorant herbal medicine in cough and cold and in cases of occasional constipation (EMA, 2008).

In the present study we want to highlight the insufficient number of studies dealing with ferns in comparison with angiosperms to support their potential uses (Chen and Kong, 2005; Cao et al., 2014). Hopefully, these studies will be a turning point for the promotion of traditional and local uses of ferns in Europe and particularly in Spain (Villar and Bonet, 2018).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents Equations

All reagents were of analytical grade. Trypan blue (0.4%) dye, hydrogen peroxide (H₂O₂) 30% w/w, 2,5-diphenyl-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) tetrazolium bromide (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF) and chlorpromazine hydrochloride (CPZ, CAS No. 69-09-0) were supplied from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with and without phenol red, fetal bovine serum (FBS), phosphate buffered saline (PBS), L-glutamine solution (200 mM), trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution (170,000 U/L trypsin and 0.2 g/L EDTA) and penicillin-streptomycin solution (10,000 U/mL penicillin and 10 mg/mL streptomycin) were acquired from Lonza (Verviers, Belgium). All analytical

standards used for liquid chromatography analysis shikimic acid, gallic acid, 5-O-caffeoylquinic acid, 3-O-caffeoylquinic acid, (+)-catechin hydrate, (-)-epicatechin, rutin, hyperoside, naringin, quercitrin, 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, rosmarinic acid, cinnamic acid, eugenol and *trans*-cinnamaldehyde were purchased from Sigma-Aldrich (Milan, Italy). The 75 cm² culture flasks and 96-well plates were obtained from TPP (Trasadingen, Switzerland). HyClone fetal bovine serum (FBS) was purchased from Thermo Scientific (Northumberland, United Kingdom).

Plant Material

The fronds of *Polypodium vulgare* L. were collected from the Prades mountains 41°17'34"N 1°02'42"E geographical coordinates (Tarragona, Spain). Previously we verified that this species was reported in the selected area by *Banco de Datos de Biodiversidad de Cataluña* (BDBC, 2015). When the fronds were dried, a sample voucher was stored at Herbarium of Universidad San Jorge (Zaragoza, Spain), *Polypodium vulgare* L.: voucher no. 003-2016.

Preparation of Methanolic Extract With the Fronds of *Polypodium vulgare* L.

Powdered fronds of the plant material were macerated with methanol for 24 h. After this, the methanolic extract was filtered using a Whatman no. 4 filter paper and to evaporate the solvent, a rotatory evaporator with a thermostatic bath at 30°C was used. This process was repeated three times to obtain the correspondence exhaustion extract as described by ourselves (Farràs et al., 2019). Finally, extracts were conserved at -20°C until we need. Homogenization of the plant extract with the corresponding culture medium was obtained by sonication.

Phytochemical Characterization by Liquid Chromatography With Diode-Array Detection (HPLC-DAD)

HPLC-DAD studies were performed using a Hewlett-Packard HP-1090 Series II (Palo Alto, CA, United States), equipped with a vacuum degasser, a binary pump, an autosampler and a model 1046A HP photodiode array detector (DAD) following a previous developed method with some modifications (Caprioli et al., 2016). The chromatographic separation was accomplished on a Synergi Polar-RP C18 (4.6 mm × 250 mm, 4 μm) analytical column from Phenomenex (Cheshire, United Kingdom). The column was preceded by a security cartridge. The mobile phase for HPLC-DAD (diode array detector) analyses was a mixture of (A) water with 0.1% formic acid (v/v) and (B) acetonitrile with 0.1% formic acid, flowing at 0.8 mL/min in gradient conditions: 0 min, 20% B; 0–15 min, 60% B; 15–20 min, 60% B; 20–25 min, 20% B, 25–30 min, 20% B. The column temperature was set at 30°C and the injection volume was 5 μL. UV spectra were recorded in the range 230–350 nm, where 230 nm was used for quantification of shikimic acid, 256 nm for rutin and hyperoside, 272 nm for gallic acid, 280 nm for (+)-catechin hydrate and (-)-epicatechin, 325 nm for 3-O-

caffeoylquinic acid, 5-O-caffeoylquinic acid and 3,5-di-O-caffeoylquinic acid.

Calibration curves of the analysed compounds (**Supplementary Material S1**) were constructed injecting standard solutions at six different concentrations, i.e., 0.5, 1, 5, 10, 50 and 100 mg/mL, in HPLC-DAD. All the calibration curves of the analysed compounds showed a correlation coefficient greater than 0.9930. The limits of detection and the limits of quantification of the analyzed compounds, expressed in μg/mL were estimated on the basis of 3:1 and 10:1 S/Ns (signal to noise ratio). LODs and LOQs were in the range of 0.03–0.15 and 0.1–0.5 μg/mL, respectively. Retention time stability was utilized to demonstrate the specificity of the method. Reproducibility of the chromatographic retention time for each compound in was examined five times per day over a 5-day period (*n* = 25). The retention times using this method were stable with a percent RSD value of ≤1.33%.

Cell Culture

The mouse fibroblast cell line, NIH 3T3, and the spontaneously immortalized human keratinocyte cell line, HaCaT, were used in all *in vitro* experiments. In the case of cytotoxic assay, cell viability also was evaluated by the cervical cancer cell line HeLa, the liver cancer cell line HepG2, the breast cancer cell line MCF-7 and lung cancer cell line A549. 3T3 and A549 were purchased from Sigma-Aldrich as a worldwide provider of European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), whereas HaCaT, HeLa and MCF-7 were obtained from Eucellbank (Celltec-Universitat de Barcelona, Spain). HepG2 cell line was kindly donated by Dr. Borràs of Experimental Toxicology and Ecotoxicology Platform (UTOX-CERETOX) of Parc Científic of Universitat de Barcelona.

Cell maintenance and culture were performed in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and 100 U/mL:100 U/mL streptomycin-penicillin mixture (10% FBS-DMEM) at 37°C in a 5% carbon dioxide (CO₂)-humidified incubator. Cells were routinely subcultured in 75 cm² flasks.

Experimental treatments were performed when cells reached 80% of confluence, culture medium was removed, cells were rinsed with PBS and then detached by trypsinization (trypsin-EDTA). From the cellular suspension obtained and after adjusting cell density at 1 × 10⁵ cells/mL, 100 were seeded in 96 well microplates and incubated overnight (37°C and 5% CO₂). Cell density was adjusted by counting the number of viable cells with the trypan blue (0.4%) dye exclusion.

Cytotoxicity Activity of Methanolic Extract of *Polypodium vulgare* L. in Non-Tumoral and Tumoral Cells Lines

Non-tumoral (3T3 and HaCaT) and tumoral cells lines (HeLa, HepG2, MCF-7 and A549) were treated for 24 h (37°C and 5% CO₂) with increasing concentrations of methanolic extract 0.01, 0.1, 1 and 2 mg/mL *P. vulgare* in 5% FBS-DMEM. For each independent experiment and plate, untreated cells (maintained with culture medium) were included as negative controls. Cytotoxicity of PVM was determined by the NRU and MTT assays.

Determination of Cell Viability by Neutral Red Uptake and 2,5-Diphenyl-3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl) Tetrazolium Bromide Assays

Cell viability were determined by the NRU and MTT methods after treatments.

The Borenfreund and Puerner protocol for the determination of cell viability by NRU has been followed with some described adaptations (Borenfreund and Puerner, 1985). Once the incubation time of the cells with the treatments had elapsed, the supernatant was extracted from each well and 100 μ l of NR solution was applied (0.05 mg/mL in serum-free DMEM without phenol red). After 3 hours, the supernatant was removed by inversion from the plate and 100 μ l of the developer NR solution was added. In the developer solution, the formaldehyde was replaced by an acidic ethanol solution (Riddell et al., 1986). The quantification of the remnant NR, which corresponds to the NRU bound to the lysosomes, is proportional to the viable cells (Weyermann et al., 2005). After 5–10 min of shaking the plate, the absorbance was obtained at 550 nm, by means of the Tecan Sunrise microplate reader (Männedorf, Switzerland).

The MTT assay based on the experimental protocol of Mosmann (Mosmann, 1983) was used with the some previous adaptations (Zanette et al., 2011); 100 μ l of an MTT solution (0.5 mg/mL in serum-free DMEM without phenol red) was added in each well following incubation of the plates for at least 3 h in cell culture incubation conditions (37°C and 5% CO₂). At the end of incubation, supernatant was removed and 100 μ l of the organic dissolvent dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well to dissolve the formazan crystals (Präbst, 2017). The amount of soluble formazan is proportional to the number of cells with optimal mitochondrial activity (Fotakis and Timbrell, 2006). Absorbance was measured at 550 nm using a Tecan Sunrise microplate reader (Männedorf, Switzerland), previous homogenization of the well content by gently shaking each microplate during 5 min at 100 rpm/min.

Cell viability for NRU and MTT assays were calculated using the following equation:

$$\text{Cell viability (\%)} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

where A_{control} and A_{sample} are the absorbance of the control and each sample, respectively.

Cytoprotective Activity in 3T3 and HaCaT Cell Lines

Potential protective effect of the extract was then explored in the non-tumoral cell lines against oxidative stress induced by hydrogen peroxide (Cásedas et al., 2020). Cells were pre-treated with 0.01, 0.1, 1 and 2 mg/mL PVM (100 μ l) dissolved by 5% FBS-DMEM for 24 h following addition of H₂O₂ (in 5% FBS-DMEM) at a final concentration 2 mM for 2.5 h. Finally, cell viability was determined by NRU and MTT assay. In each microplate negative and positive controls were included. In this case, positive controls consist of cells treated by H₂O₂ at 2 mM during 2.5 h without previous pre-treatment with the extracts.

Cytoprotective activity was calculated as follows:

$$\text{Cytoprotective activity (\%)} = \left(\frac{CV_{\text{PVM-H}_2\text{O}_2} - CV_{\text{H}_2\text{O}_2}}{CV_{\text{PVM-H}_2\text{O}_2}} \right) \times 100$$

where CV is the cell viability for each condition described in the formula.

Cellular Repair Activity in 3T3 Cells

Cellular repair properties were evaluated using 100 μ l H₂O₂ at 2 mM during 2.5 h before applying PVM at different concentrations (0.01, 0.1, 1 and 2 mg/mL). Cell viability was assessed by NRU and MTT assays 24 h after incubation with the treatments.

Cellular repair activity was calculated as follows:

$$\text{Cellular repair activity (\%)} = \left(\frac{CV_{\text{PVM-H}_2\text{O}_2} - CV_{\text{H}_2\text{O}_2}}{CV_{\text{PVM-H}_2\text{O}_2}} \right) \times 100$$

where CV is the cell viability for each condition described in the formula.

Phototoxicity Activity of Methanolic Extract of *Polypodium vulgare* L. in 3T3 and HaCaT Cell Lines

In parallel with the study of the potential cytoprotective protection of the extract, we have explored the potential phototoxic activity of PVM. For this purpose we followed the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) TG 432 (2019) (OECD, 2019) with some adaptations.

Briefly, 3T3 and HaCaT cells were plated at a density of 1 x 10⁵ cells/mL (100 μ l) in a 96 well microplate in 10% FBS-DMEM for 24 h. Cells were treated with PVM samples and incubated for 1 h (37°C, 5% CO₂) before being irradiated with 1.8 J/cm² of ultraviolet A (UVA) light. To avoid as much as possible protein interferences with protein and light absorbing components, PVM samples were solubilized in serum-free DMEM without phenol red. Moreover, for comparative purposes and to correctly interpret the data, negative controls consisted in non-treated cells whereas positive controls consisted in cells treated with the well-known phototoxic chemical chlorpromazine.

After irradiation, cell media was replaced for 100 μ l of fresh medium (10% FBS-DMEM) and cell viability was determined after 24 h of incubation by the NRU and MTT colorimetric assays.

Light exposure was performed in a photostability UV chamber (58 x 34 x 28 cm) equipped with three UVA lamps Actinic BL TL/TL-D/T5 (Philips, 43 V, 352 nm, 15 W) as described by our research group (Martínez et al., 2013). Dosage and time exposition of cells to UVA light was regularly settled thanks to a photoradiometer Delta OHM provided with a UVA probe (HD2302 - Italy). We followed the equation:

$$E \left(\frac{\text{J}}{\text{cm}^2} \right) = t \text{ (s)} \times P \left(\frac{\text{W}}{\text{cm}^2} \right)$$

where E stands for ultraviolet dose, t represents the time expressed in seconds and, finally, P is the lamp potency.

Intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) Induced by H₂O₂ of Methanolic Extract of *Polypodium vulgare* L. in 3T3 and HaCaT Cell Lines

ROS production was tested accordingly (Ferreira et al., 2018). After the incubation of the cells with the different concentrations of the extract for 24 h as reported in previous sections for *in vitro* assays, cells were washed twice with PBS and DCF (100 μM) was applied to each well for 45 min (37°C and 5% CO₂). DCF that has not penetrated cells was removed by washing twice with cell culture medium and then H₂O₂ (1 and 2 mM) was added to induce oxidative stress. The fluorescence intensity of the oxidized product of DCF was registered (λ_{excitation} 480 nm; λ_{emission} 530 nm) at 0, 1, 2 and 3 h by a plate reader ThermoFisher SCIENTIFIC VARIOSKAN LUX (ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, Massachusetts, United States). Results were expressed as *Fluorescence Intensity (FI)* which have adimensional units. The $FI_{z\ h\ vs\ 0\ h}$ were calculated as follows:

$$\text{Fluorescence Intensity}_{z\ h\ vs\ 0\ h} (FI_{z\ h\ vs\ 0\ h}) = \left(\frac{FI_{z\ h} - FI_{0\ h}}{FI_{z\ h}} \right) \times 100$$

where $FI_{z\ h}$ is the intensity fluorescence at z h (z as 1, 2 or 3 h) of incubation and $FI_{0\ h}$ the amount fluorescence intensity at 0 h.

The *FI* for each specific time was calculated using this formula:

$$FI = \frac{\text{Fluorence}_{480\ \text{nm}} (\text{excitation})}{\text{Fluorence}_{530\ \text{nm}} (\text{emision})}$$

The ΔROS, which have adimensional units for *FI*, was obtained using the following formula:

$$\Delta ROS_{H_2O_2} = \Delta ROS_{PVM\ \text{with}\ DCF-H_2O_2} - \Delta ROS_{DCF-H_2O_2}$$

Statistical Analysis

All experiments were carried out in triplicates and almost three independent experiments were assayed, on different days, except for the cytoprotection PVM HaCaT against 2 mM H₂O₂ (2.5 h) MTT for which the results correspond to $n = 2$ experiments. Statistical significance for MTT cell viability and fluorescence intensity was analysed by using GraphPad Prism version 7, San Diego, CA, United States. Data are presented as mean ± standard error. Activities have been compared using a two-way analysis of variance (ANOVA) by Bonferroni. Statistical differences were considered as follows: $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***) and $p \leq 0.0001$ (****).

RESULTS

Phytochemical Characterization by Liquid Chromatography With Diode-Array Detection (HPLC-DAD)

Different types of polyphenols were monitored in the extract. The extract proved to contain different types of phenolic acids and

TABLE 1 | Quantitative determination of metabolites in the methanolic extract *Polypodium vulgare* L. by HPLC-DAD reported at 272 nm.

No.	Phytochemicals	Quantity (mg/kg extract) ^{a,b}
1	Shikimic acid	5,339.3 ± 70.6
2	Gallic acid	1791.3 ± 38.3
3	5-O-caffeoylquinic acid	256.5 ± 12.1
4	3-O-caffeoylquinic acid	58,778.3 ± 417.7
5	(+)-Catechin hydrate	3,879.8 ± 153.3
6	(-)-Epicatechin	7,158.5 ± 88.8
7	Rutin	422.7 ± 30.4
8	Hyperoside	91.3 ± 11.7
9	3,5-di-O-caffeoylquinic acid	106.0 ± 15.5
	Total content	77,823.7 ± 838.4

^aResults are expressed in mg/kg dry extract, $n = 3$.

^bCinnamic acid, eugenol, naringin, quercitrin, rosmarinic acid and trans-cinnamaldehyde were not detected.

flavonoids, as observed in **Table 1** (77,823.7 mg/kg). However, naringin, quercitrin, rosmarinic acid, cinnamic acid, eugenol and trans-cinnamaldehyde were not detected.

The major constituents in the extract, as seen in **Figure 1**, were 3-O-caffeoylquinic acid (58,778.3 mg/kg), epicatechin (7,158.5 mg/kg), shikimic acid (5,339.3 mg/kg) and catechin (3,879.8 mg/kg) which were phenol acids. The peculiar secondary metabolites found were hyperoside and 3,5-di-O-caffeoylquinic acid, with low concentrations (91.3 and 106.0 mg/kg respectively).

Cytotoxic Activity in Non-Tumoral and Tumoral Cell Lines

A set of cytotoxic assays was carried out to determine the cytotoxic potential; however, data on NRU method were not shown.

Figure 2 shows cell viability obtained by the MTT assay for the different cell lines described here. First, we evaluated the cytotoxic activity of the PVM in 3T3 and HaCaT as a representation of non-tumoral cell lines. In both cell lines a marked increase in cytotoxicity was observed, at concentrations of 1 and 2 mg/mL PVM compared to 0.01 and 0.1 mg/mL PVM but with a slightly higher cytotoxicity activity of PVM in HaCaT (35.3%) than in 3T3 (46.4%) at 1 mg/mL PVM.

The cytotoxicity study was extended to tumoral cells such as HeLa, HepG2, MCF-7 and A549 cells. As we can observe in **Figure 2**, PVM on HeLa and HepG2 cells presents a similar cytotoxic behaviour, presenting a significant decrease in cell viability at the highest concentration assessed, being this decrease slightly higher in HepG2 (44.2%) than HeLa (49.0%). No cytotoxic effects have been determined at 0.01 and 0.1 mg/mL of the extract.

For MCF-7 and A549 cells (**Figure 2**) no statistical differences among cell viability is observed at the different concentrations studied of PVM, although values show a slight decrease to 72.5% in MCF-7 at 2 mg/mL and 77.3% in A549 at 0.1 mg/mL.

The present results exhibited that, cytotoxicity effects only appear at 1 and 2 mg/mL PVM in 3T3, HaCaT, HeLa and HepG2.

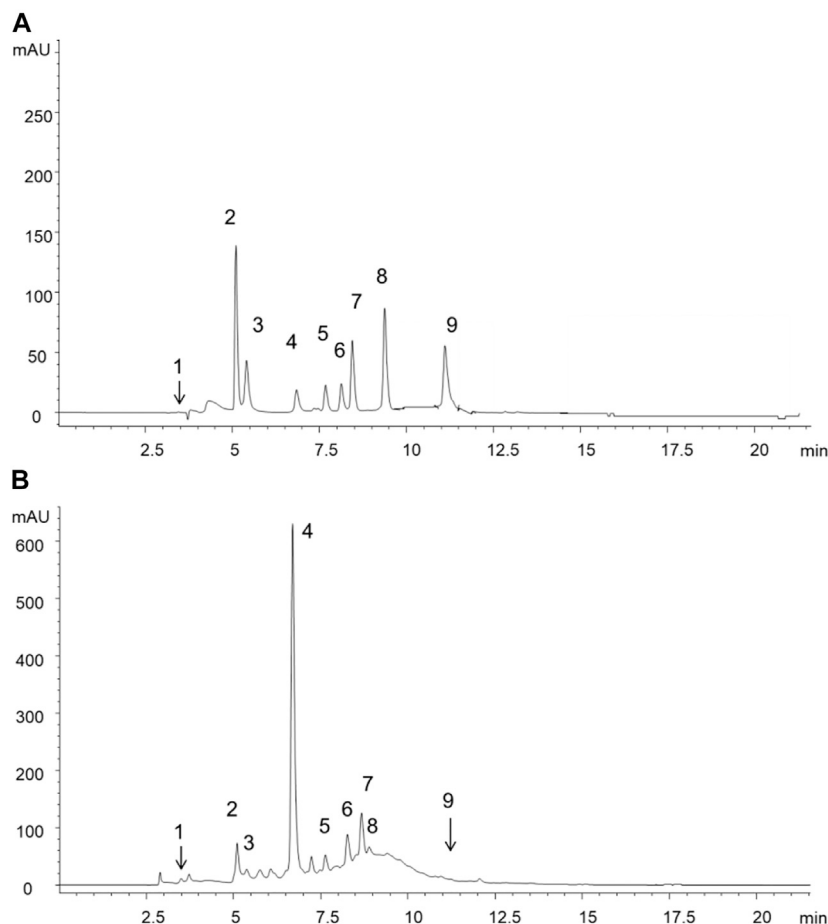


FIGURE 1 | HPLC-DAD chromatograms reported only at 272 nm for sake of clarity and corresponding to (A) standard mixture solution (B) extract of methanolic fronds extract of *Polypodium vulgare* L. List of compounds: 1 = shikimic acid, 2 = gallic acid, 3 = 5-O-caffeoylquinic acid, 4 = 3-O-caffeoylquinic acid, 5 = catechin, 6 = epicatechin, 7 = rutin, 8 = hyperoside, 9 = 3,5-di-O-caffeoylquinic acid.

Cytoprotective Activity in 3T3 and HaCaT Cell Lines

Before the potential cytoprotective activity were studied, the deleterious effects of H_2O_2 in the cells were initially determined. From this previous assay (data not shown), we have established that cell viability obtained at 2 mM of H_2O_2 for 2.5 h (30.5 and 41.0% for 3T3 and HaCaT respectively) allows us to evaluate potential beneficial effects of PVM.

As observed in **Figure 3**, cell viability in 3T3 increases mainly in parallel to PVM concentrations indicating some cytoprotective effect although not statistically significant, being this cytoprotective activity of 18.9 and 26.5% at 0.1 and 2 mg/mL, respectively. In the case of HaCaT, no cytoprotective effect has been observed in any of the concentrations tested.

Cellular Repair Activity in 3T3 Cells

In the cellular repair assay, we have used the same conditions of H_2O_2 as in cytoprotection assay (2 mM H_2O_2 for 2.5 h). As we can observe in **Figure 4**, there is an increase in cell viability as PVM concentration rises; however, this discrete reparation effect is proportional to the concentration of the extract.

Phototoxicity Activity of Methanolic Extract of *Polypodium vulgare* L. in 3T3 and HaCaT Cell Lines

The validity of the assay has been determined by calculating the ratio of cell viability in irradiated respect to non-irradiated conditions of both negative and positive control cells. Doses of 1.8 J/cm² of UVA light affects the viability of non-treated cells that decrease in both cell lines. In the phototoxicity assay is important to consider that cell viability of control cells not treated but irradiated present a cell viability of about 63.3 and 75.0% respect from the non-irradiated ones for 3T3 and HaCaT respectively. Indicating that 3T3 are much sensitive to light than HaCaT and that interpretation of data should be interpreted carefully, as seen in **Figure 5**. However, the effect of the photosensitizer CPZ in 3T3 and HaCaT is confirmed by the important drop of cell viability when exposed to UVA respect not exposed to UVA in both cell lines, 26.9 and 13.7% cell viability respectively. Considering these ratios, the viability obtained when cells were exposed to UVA in the presence of PVM is considered.

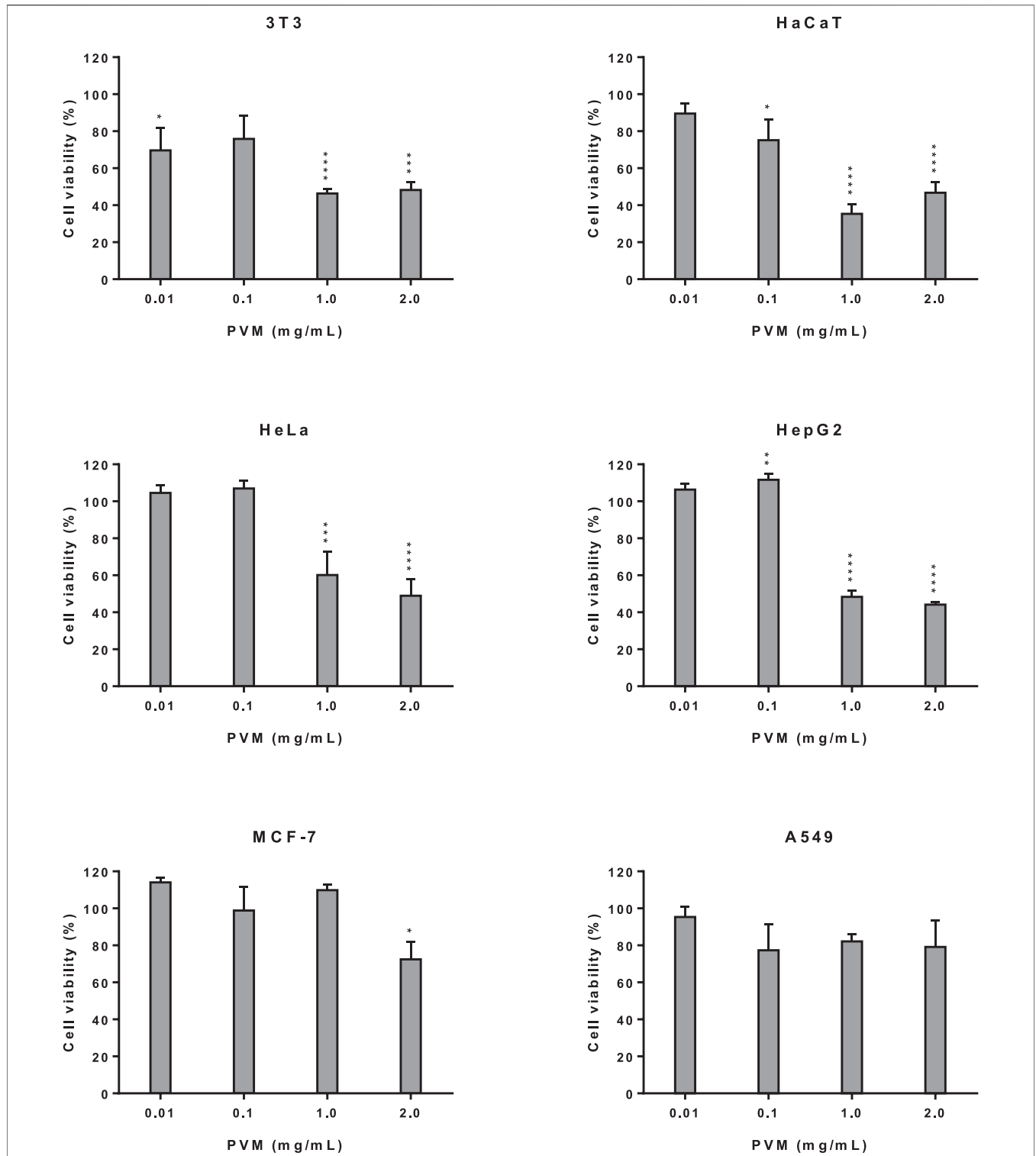
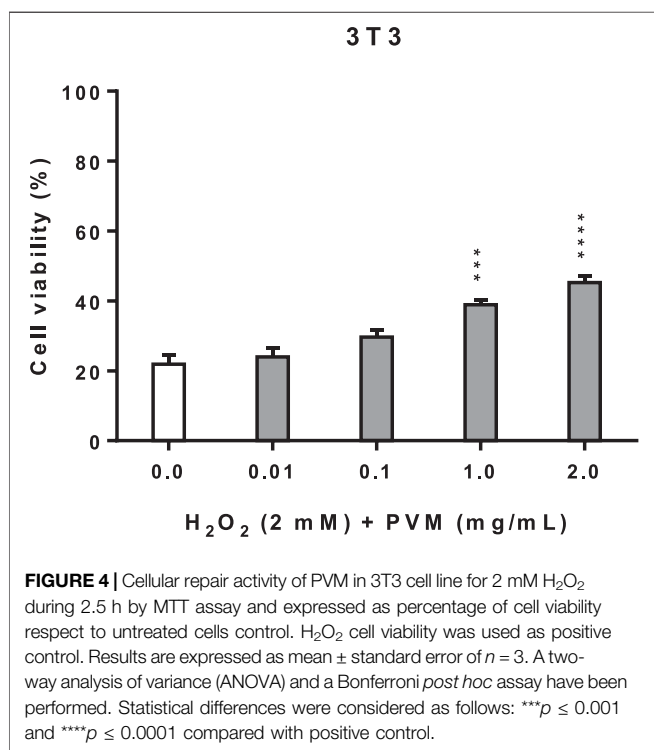
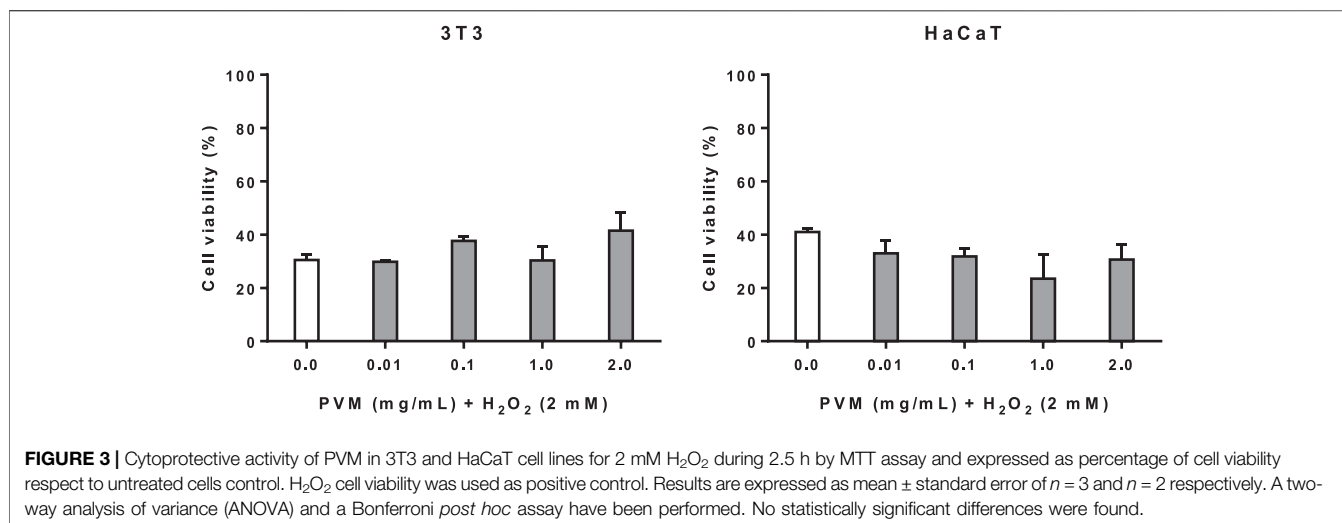


FIGURE 2 | Cytotoxicity activity of PVM in 3T3, HaCaT, HeLa, HepG2, MCF-7 and A549 cell lines by MTT assay and expressed as percentage of cell viability respect to control cells. Results are expressed as mean ± standard error of $n = 3$. Control cells were maintained only with culture medium. A two-way analysis of variance (ANOVA) and a Bonferroni *post hoc* assay have been performed. Statistical differences were considered as follows: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ and **** $p \leq 0.0001$ compared with no treated cells (negative control).



In general, PVM did not show phototoxic behaviour in the assayed conditions, except at 0.1 mg/mL. At this concentration, there is a decrease in viability when cells are exposed to light.

Intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) Induced by H₂O₂ of Methanolic Extract of *Polypodium vulgare* L. in 3T3 and HaCaT Cell Lines

The production of ROS was explored by the fluorescence intensity with the DCF probe. As shown in **Figure 6**, for each

cell line was obtained the same tendency of ROS production at 2 h, with similar pattern recorded at 1 and 3 h (data not shown).

The production of ROS in the conditions tested here are significantly different for both cell lines. In the case of 3T3, positive controls show similar values of ROS production at the two concentrations of H₂O₂ but higher than those obtained in the case of HaCaT. This observation suggests that keratinocytes are less sensitive than 3T3.

In the case of 3T3 there is a peak of intracellular ROS production in the presence of PVM at 0.1 mg/mL, which is more pronounced in cells treated with 2 mM H₂O₂, followed by an important reduction at 1 mg/mL and, finally, reverted at 2 mg/mL. This pattern is independent of the final concentration of H₂O₂. In contrast, the production of ROS is dose dependent in the case of HaCaT, except at 2 mg/mL PVM at 1 mM H₂O₂. One explanation to this different behavior between the two cell lines can be attributed to the presence of different protective antioxidant systems and that can also explain the ROS production showed by the positive controls.

DISCUSSION

Despite the significant biological activities attributed to the *Polypodiaceae* family reported in various studies, such as antidiabetic (*Phymatopteris triloba* (Houtt.) Pic. Serm.) (Chai et al., 2013), anticancer (*Polypodium leucotomos*) (Gonzalez et al., 2010) and anti-inflammatory activities (*Polypodium leucotomos*) (Choudhry et al., 2014), there are many other *Polypodiaceae* ferns not yet characterized or studied specifically for their potential food or medical uses. This is the case of *Polypodium vulgare* L. Probably, the most studied *Polypodiaceae* fern is *Polypodium leucotomos* because of the commercialization of its standardized aqueous extract fronds (PLE) (known as Fernblock and formulated in cosmetic products and food supplements used to protect from sun exposition) (Palomino, 2015) and its standardized ethanolic dry extract rhizome (known as the oral medicine Difur for skin inflammatory disorders) (AEMPS, 2013).

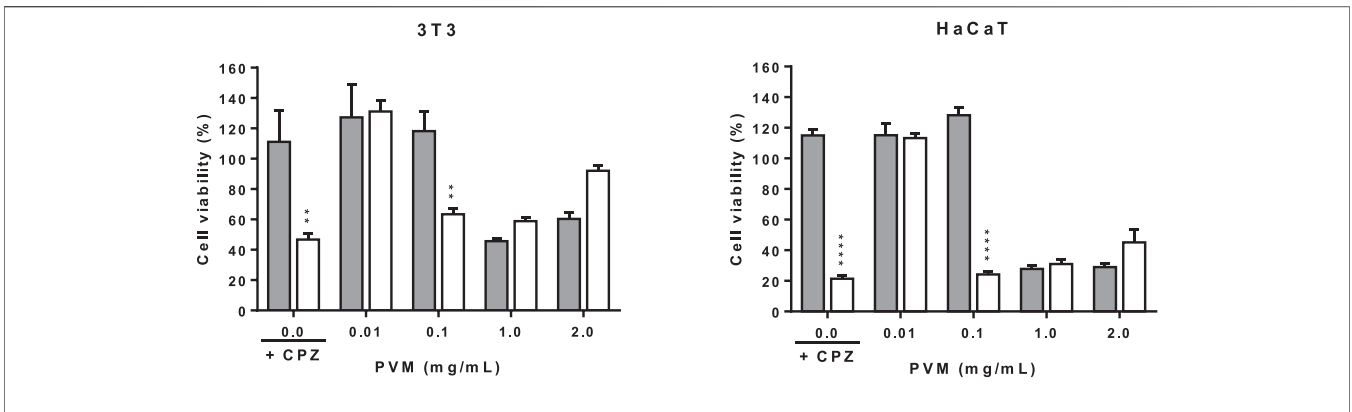


FIGURE 5 | Phototoxicity activity of PVM in 3T3 and HaCaT cell lines by MTT assay and expressed as percentage of cell viability respect to the correspondent control cells. Chlorpromazine cell viability was used as positive control. Gray columns correspond to cells non exposed to UVA light and white columns correspond to cells exposed to 1.8 J/cm² of UVA light. Results are expressed as mean ± standard error of *n* = 3. A two-way analysis of variance (ANOVA) and a Bonferroni *post hoc* assay have been performed. Statistical differences were considered as follows: ***p* ≤ 0.01 and *****p* ≤ 0.0001 compared with correspondence no irradiated/irradiated positive control.

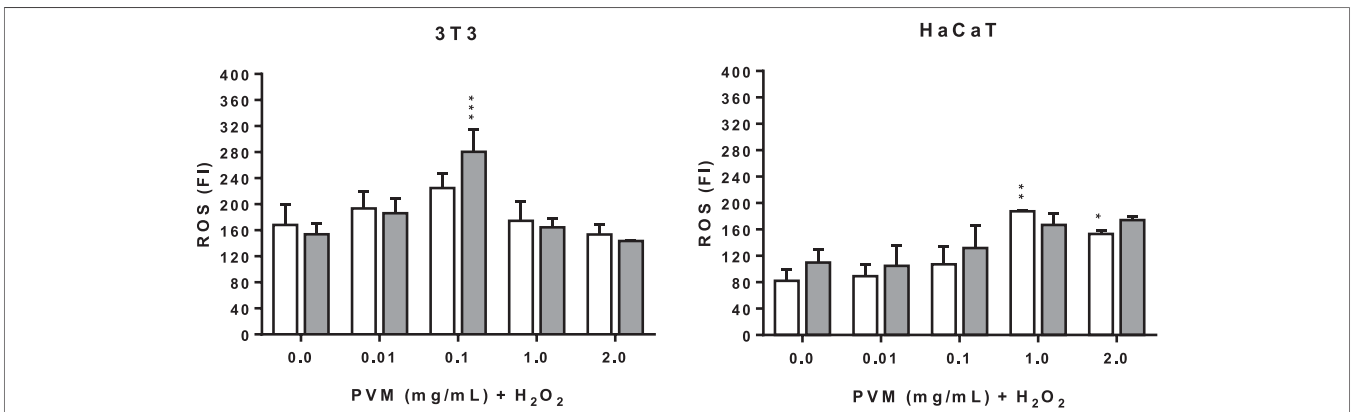


FIGURE 6 | Intracellular ROS induced by 1 and 2 mM H₂O₂ for 2 h treatment with PVM in 3T3 and HaCaT cells. H₂O₂: positive control. White columns correspond to 1 mM H₂O₂ and gray columns correspond to 2 mM H₂O₂. Results are expressed as mean ± standard error of *n* = 3. A two-way analysis of variance (ANOVA) and a Bonferroni *post hoc* assay have been performed. Statistical differences were considered as follows: **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.01 and ****p* ≤ 0.001 compared with the correspondent positive control.

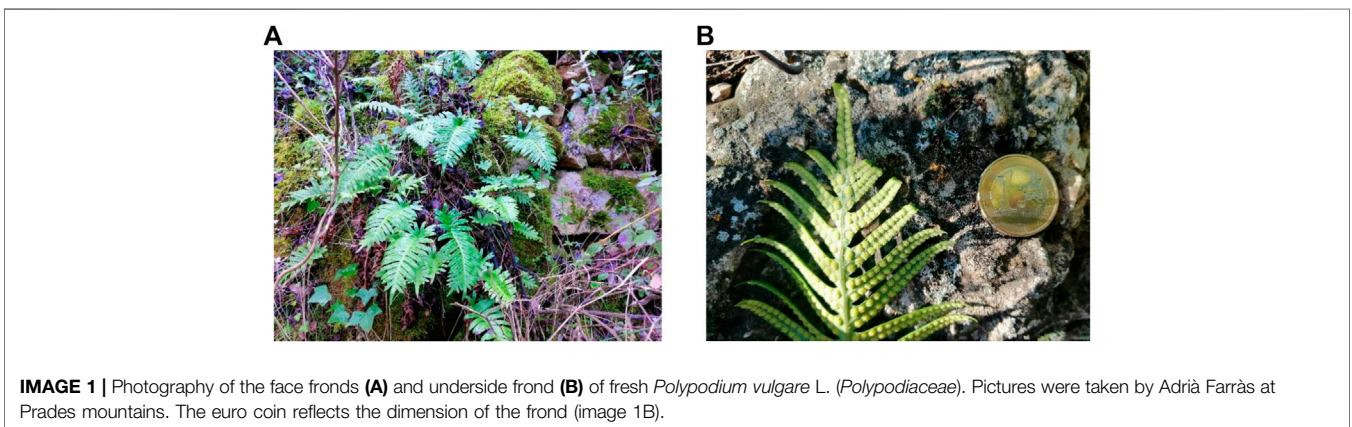


IMAGE 1 | Photography of the face fronds (A) and underside frond (B) of fresh *Polypodium vulgare* L. (*Polypodiaceae*). Pictures were taken by Adrià Farràs at Prades mountains. The euro coin reflects the dimension of the frond (image 1B).

In addition, the aqueous extract fronds of *P. leucotomos* has been reported as a natural product for the treatment of skin alterations such as photodermatosis, adjunctive treatment of melasma (as

chemopreventive), vitiligo, psoriasis vulgaris and atopic dermatitis, among others (Choudhry et al., 2014; Parrado et al., 2018; Thompson and Kim, 2020).

As stated by Messeguer (Messeguer et al., 1998), the two major drugs used of *P. vulgare* are rhizomes and fronds as reported for other species of *Polypodium* (Liu et al., 1998). In the present study we have obtained a methanol extract from the fronds of the fern. Some studies reported the isolated phytochemical composition of the rhizome, describing the different types of phytochemicals namely flavonoids as flavan-3-ol derivatives (Glensk et al., 2019a), triterpenoids hydrocarbons, triterpenoids alcohols of the cycloartane group, saponin glycosides (Arai et al., 1989; Arai et al., 1991), phytoecdysteroids (Messeguer et al., 1998) and others (Dar et al., 2012). However, to date no published work or study has dealt with the composition of the fronds of *P. vulgare* except for the one of Messeguer describing the presence of some phytoecdysteroids (Messeguer et al., 1998). Among the few articles reporting the composition and bioactivity of this fern, Sofiane et al. (2015) describes antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities attributing these activities to different groups of phytochemicals but unspecifying the part of the plant used (drug plant). Also, Glensk et al. (2019b) reports the antimicrobial activity of the rhizome attributed to osladin. It is widely known that the production of secondary metabolites is a response to environmental conditions (environmental stress, period of the year, among other variables) to which the plant is exposed (Wu et al., 2017). To eliminate this variable, the fronds from which the extract was obtained in the present study were collected at the same time of the year (November 2016). Using HPLC-DAD, we have determined a high number of phenolic related compounds and a small fraction of flavonoids (less than 15% of the total polyphenolic species) represented by (+)-catechin hydrate, (-)-epicatechin, rutin and hyperoside. This observation agrees with our previous study using thin layer chromatography (TLC) (Farràs et al., 2019). It is well known that flavonoids, due to their radical scavenging ability provided by its chemical structure described elsewhere (Rice-Evans et al., 1996; Prochazkova et al., 2011; Wen et al., 2014), have a greater antioxidant capacity than certain phenolic acids (Leopoldini et al., 2011); however, flavonoids are residual components of our extract. Other phenolics such as *p*-coumaric, ferulic, caffeic, vanillic and chlorogenic acids, were reported as the major polyphenol phytochemicals in *P. leucotomos* (Gombau et al., 2006; García et al., 2006). Another important aspect to consider is the synergy that the different phytochemicals present in an extract against the oxidative damage (Yen et al., 2013; Naik and Sellappan, 2020).

In the Asian continent, a variety of ferns have been used as remedies as the case of the Gusuibu ferns (Chang et al., 2007). Nevertheless, other fern species, such as *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (*Dennstaedtiaceae* family), contain ptaquiloside, a toxic compound that can cause cancer (da Costa et al., 2012; O'Connor et al., 2019). For this reason, the objective of the present work is to study the bioactivity of the polar constituents of *P. vulgare* including its cytotoxic potential in non-tumoral (3T3 and HaCaT) and tumoral cells (HeLa, HepG2, MCF-7 and A549). The protective activity of the extract against oxidative stress is also studied by different assays. Four concentrations of the extract (0.01, 0.1, 1 and 2 mg/mL) were selected in the present study

considering physiological and non physiological concentrations for a better understanding.

There are many viability assays used to evaluate cytotoxic activity of different substances and products. NRU has been proven to be a sensitive assay to study the cytotoxic activity and potential protection of procyanidin fractions from grape and pine against the H₂O₂ insult (Ugartondo et al., 2007; Mitjans et al., 2011). In addition, MTT is regarded as a gold standard of cytotoxicity assays as it is highly sensitive and a high-throughput screening assay. However, recently Karakas have described an interfering effect of the methanolic extract of different Turkish's plant extracts resulting in false-positive viability (Karakas et al., 2017). In this sense, potential interferences of our fern extracts with the MTT assay were performed previously to study their cytotoxic activity. Taken together these aspects, we considered studying the biological activity of our extracts by these two assays. In our case, NRU failed to be sensitive according to our MTT data. However, our results can indicate that mechanism of cytotoxic behaviour of PVM does not include lysosomal damage.

The potential use of ferns to prevent or treat tumoral processes, as the case of some Asiatic fern species, has been demonstrated by the cytotoxic, pro-apoptotic or cell cycle-arresting effects of non-characterized plant extracts (Tomsik, 2014). In our case, no relevant cytotoxic effects have been reported for the extract in the different cell lines, except in the case of the HaCaT cells, but only at the very high concentrations. The phytochemical characterization by HPLC-DAD indicates that epicatechin is the second major compound of the flavonoid components of the extract. Moreover (Cao et al., 2014), a strong cytotoxic behaviour of an ethanol extract of the whole fern *Davallia cylindrica* Ching in A549 cells has been described and attributed to the high content of quercitrin and some of its derivatives. Using HPLC-DAD we failed to detect quercitrin (a glycosylated derivative of quercetin), which can explain the absence of relevant cytotoxicity (Farràs et al., 2019). Results obtained with 3T3 and HaCaT cell lines open the possibility to validate the traditional use of this species in the Sobrarbe region as disinfectant and wound healing (Huesca) (Villar and Bonet, 2018), mostly considering that fibroblasts, the most common cells in connective tissue, play a critical role in wound healing and keratinocytes form epidermis, which is a biological and physical barrier against injuries. These results are in line with the fact that the pteridophytes presents an antibiotic properties (Banerjee and Sen, 1980).

The protective effect of the extract was assessed in this study against hydrogen peroxide in 3T3 and HaCaT cells. Our results show that H₂O₂ causes slightly higher mortality in 3T3 (30.5% cell viability) than in HaCaT (41.0% cell viability), which can be explained by a higher antioxidant defence system on keratinocytes than fibroblasts (Pérez et al., 1995). This minor mortality in HaCaT can justify that the extract failed to present cytoprotective capacity in such cell line. We have observed a discrete cytoprotective effect of PVM in the 3T3 cells being the first report that deals with this kind of assays using a fern extract from the *Polypodiaceae* family. However, Gomes et al. (2001) and Gombau et al. (2006) have described the potential antioxidant activity of *P. leucotomos*, by different *in vitro* methods.

H₂O₂ is recognized as a pleiotropic compound in the induction of oxidative stress (Sies and Jones, 2020). However, its effect on the induction of oxidative stress differs in whether a pre-treatment (cytoprotective activity), co-treatment or post-treatment (cellular repair activity) trial is performed (Siddiqui et al., 2011). In the post-treatment test, as result of an oxidative stress that triggers severe cellular damage, cells are sometimes unable to regain redox homeostasis despite being subsequently treated with an antioxidant agent. Considering our results of cytoprotection, the cellular repair test was only performed in the 3T3 cell line. This assay showed that there is a significant increase in cellular viability directly proportional to PVM concentration suggesting the capacity of the extract to induce cellular repair mechanisms.

Other authors have reported that *P. leucotomos* was able to protect human fibroblast from cytoskeletal disarrangements induced by UVA light (1 J/cm²) (Alonso-Lebrero et al., 2003). Moreover, Philips et al. (2003) reported that a concentration lower than 0.1% improves cellular membrane integrity and inhibits MMP-1 on fibroblast and keratinocytes thus suggesting its potential use in prevention on skin photoaging. However, before studying the potential photoprotective activity of the extract, we should discard any phototoxic reactions. In the present study, the determination of phototoxicity is based on the OECD TG 432 (OECD, 2019), where the BALB/c 3T3 cell line has been replaced by NIH 3T3 and we included the HaCaT cell line and the determination of cell viability by MTT as previously reported (Baccarin et al., 2015). In general, we can conclude that PVM is not phototoxic although the decrease in cell viability at 0.1 mg/mL in both cell lines needs to be clarified. One interpretation could arise from the direct toxic effects of UVA light over the cells that can be reverted by the presence of the extract at high concentrations but not at moderate ones as 0.1 mg/mL PVM. Further investigation should be conducted to explore the cellular mechanisms that are activated. Contact time of the extract also should be considered, thus in this phototoxicity test is 1 h plus the time of UVA exposition, whereas in the rest of assays the extract remains approximately 24 h in contact with cells.

It is known that UV damages mitochondrial DNA (Hseu et al., 2015), for this reason it would be interesting to also evaluate the potential phototoxic or photoprotective activity of the PVM by other assays such as the comet assay in a similar way as previously described for pomegranate seed oil nanoemulsion in HaCaT (Baccarin et al., 2015). Currently, the mechanisms by which *P. leucotomos* protects against UV-induced DNA damage, such as overexpression of the p53 gene, have already been described (Parrado et al., 2020).

Hydrogen peroxide is an oxidative agent that promote the endogenous generation of ROS in diverse cell lines (Uguz et al., 2016). If high ROS concentrations trigger cell death, the loss of mitochondrial functionality begins with the consequent apoptosis (Moloney and Cotter, 2018). In our case, there is an increase of ROS production in both cell lines except at 2 mg/mL. This increase of ROS production observed here and, particularly in HaCaT cells apart from the lowest concentration extract tested (0.01 mg/mL PVM), may be explained by the pro-oxidant effect of polyphenols (Santos et al., 2018). The mechanism why this ROS can diminish cell viability needs to be clarified and further explored in other tumoral cell lines as a first step to better characterize the chemotherapeutic potential of PVM (Skibola and Smith, 2000).

Additionally, in recent years, phenolic compounds are positioning themselves as the reference antioxidant substances of natural origin (Virgili and Marino, 2008; Piccolella et al., 2019). Thus, certain foods and plant extracts with high antioxidant properties are positioned as a powerful adjuvant treatment to counteract the adverse drug reactions (ADR) associated with the chemotherapy (Oyenihi and Smith, 2019).

CONCLUSION

The absence of cytotoxicity at physiological concentrations determined in the six cell lines of the present study, together with the high concentration of phenolics in the fronds of *P. vulgare*, is decisive to confirm this fern as a source of bioactive and antioxidant compounds with pharmaceutical applications. Some traditional uses of *P. vulgare*, such as the wound healing benefits, have still not been proved but this is the first time that the fronds are positioned as potential bioactive agents. This article could also be an inflexion point to justify further research of the fronds of *P. vulgare*.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: MM and VL; methodology: AF, MM and FM; analysis: AF, FM, GC and MM; investigation: AF, MM and VL; resources: MM, MPV and VL; writing-original draft preparation: AF; writing-review and editing: MM and VL; supervision: MM and VL; funding acquisition: MM and MPV. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

FUNDING

This work was financially supported by project 307,629 of Fundació Bosch & Gimpera - Universitat de Barcelona.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the technical support of Universitat de Barcelona and Universidad San Jorge.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphar.2021.727528/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Addor, F. A. S. (2017). Antioxidants in Dermatology. *An Bras Dermatol.* 92, 356–362. doi:10.1590/abd1806-4841.20175697
- AEMPS (2013). *PROSPECTO: INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE Difur 120 Mg Cápsulas Duras*. Spain: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), 4.
- Alonso-Lebrero, J. L., Domínguez-Jiménez, C., Tejedor, R., Brieva, A., and Pivel, J. P. (2003). Photoprotective Properties of a Hydrophilic Extract of the Fern *Polypodium leucotomos* on Human Skin Cells. *J. Photochem. Photobiol. B* 70, 31–37. doi:10.1016/s1011-1344(03)00051-4
- Alvarado-Sansininea, J. J., Sánchez-Sánchez, L., López-Muñoz, H., Escobar, M. L., Flores-Guzmán, F., Tavera-Hernández, R., et al. (2018). Quercetagenin and Patuletin: Antiproliferative, Necrotic and Apoptotic Activity in Tumor Cell Lines. *Molecules* 23, 18. doi:10.3390/molecules23102579
- Arai, Y., Shiojima, K., and Ageta, H. (1989). Fern Constituents: Cyclopodmenyl Acetate, a Cycloartanoid Having a New 33-carbon Skeleton, Isolated from *Polypodium vulgare*. *Chem. Pharm. Bull.* 37, 560–562. doi:10.1248/cpb.37.560
- Arai, Y., Yamaide, M., Yamazaki, S., and Ageta, H. (1991). Fern Constituents: Triterpenoids Isolated from *Polypodium vulgare*, *P. fauriei* and *P. virginianum*. *Phytochemistry* 30, 3369–3377. doi:10.1016/0031-9422(91)83212-4
- Asensi, M., Ortega, A., Mena, S., Feddi, F., and Estrela, J. M. (2011). Natural Polyphenols in Cancer Therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 48, 197–216. doi:10.3109/10408363.2011.631268
- Baccarin, T., Mitjans, M., Ramos, D., Lemos-Senna, E., and Vinardell, M. P. (2015). Photoprotection by *Punica granatum* Seed Oil Nanoemulsion Entrapping Polyphenol-Rich Ethyl Acetate Fraction against UVB-Induced DNA Damage in Human Keratinocyte (HaCaT) Cell Line. *J. Photochem. Photobiol. B* 153, 127–136. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.09.005
- Banerjee, R. D., and Sen, S. P. (1980). Antibiotic Activity of pteridophytes. *Econ. Bot.* 34, 284–298. doi:10.1007/bf02858649
- BDBC (2015). Barcelona: Generalidad de Cataluña. Available at: <http://biodiver.bio.ub.es/biocat/index.jsp> (Accessed December 15, 2015).
- Bolós, O., and Vigo, J. (1984). “Flora Dels Països Catalans I,” in *Polipodiàcies: Polypodium vulgare L. Editorial Barcino*, Barcelona: Editorial Barcino, 188–190.
- Bonet, M. A., and Vallès, J. (2007). Ethnobotany of Montseny Biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula): Plants Used in Veterinary Medicine. *J. Ethnopharmacol.* 110, 30–47. doi:10.1016/j.jep.2006.09.016
- Borenfreund, E., and Puerner, J. A. (1985). Toxicity Determined *In Vitro* by Morphological Alterations and Neutral Red Absorption. *Toxicol. Lett.* 24, 119–124. doi:10.1016/0378-4274(85)90046-3
- Burton, G., and Ingold, K. (2015). “Antioxidant Defences Synthesized *In Vivo*,” in *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5 ed. (Oxford: Oxford University Press), 77–152.
- Cao, J., Xia, X., Chen, X., Xiao, J., and Wang, Q. (2013). Characterization of Flavonoids from *Dryopteris erythrosora* and Evaluation of Their Antioxidant, Anticancer and Acetylcholinesterase Inhibition Activities. *Food Chem. Toxicol.* 51, 242–250. doi:10.1016/j.fct.2012.09.039
- Cao, J., Xia, X., Dai, X., Wang, Q., and Xiao, J. (2014). Chemical Composition and Bioactivities of Flavonoids-Rich Extract from *Davallia cylindrica* Ching. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 571–579. doi:10.1016/j.etap.2014.01.011
- Caprioli, G., Alunno, A., Beghelli, D., Bianco, A., Bramucci, M., Frezza, C., et al. (2016). Polar Constituents and Biological Activity of the Berry-Like Fruits from *Hypericum androsaemum* L. *Front. Plant Sci.* 7, 232. doi:10.3389/fpls.2016.00232
- Cásedas, G., Les, F., Choya-Foces, C., Hugo, M., and López, V. (2020). The Metabolite Urolithin-A Ameliorates Oxidative Stress in Neuro-2a Cells, Becoming a Potential Neuroprotective Agent. *Antioxidants (Basel)* 9, 16. doi:10.3390/antiox9020177
- Cásedas, G., Les, F., Gómez-Serranillos, M. P., Smith, C., and López, V. (2016). Bioactive and Functional Properties of Sour Cherry Juice (*Prunus cerasus*). *Food Funct.* 7, 4675–4682. doi:10.1039/c6fo01295g
- Chai, T. T., Elamparuthi, S., Yong, A. L., Quah, Y., Ong, H. C., and Wong, F. C. (2013). Antibacterial, Anti-glucosidase, and Antioxidant Activities of Selected highland Ferns of Malaysia. *Bot. Stud.* 54, 55. doi:10.1186/1999-3110-54-55
- Chang, H.-C., Huang, G.-J., Agrawal, D. C., Kuo, C.-L., Wu, C.-R., and Tsay, H.-S. (2007). Antioxidant Activities and Polyphenol Contents of Six Folk Medicinal Ferns Used as “Gusuibu”. *Bot. Stud.* 48, 397–406.
- Chear, N. J., Khaw, K. Y., Murugaiyah, V., and Lai, C. S. (2016). Cholinesterase Inhibitory Activity and Chemical Constituents of *Stenochlaena palustris* Fronds at Two Different Stages of Maturity. *J. Food Drug Anal.* 24, 358–366. doi:10.1016/j.jfda.2015.12.005
- Chen, C., and Kong, A. N. (2005). Dietary Cancer-Chemopreventive Compounds: from Signaling and Gene Expression to Pharmacological Effects. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 318–326. doi:10.1016/j.tips.2005.04.004
- Choudhry, S. Z., Bhatia, N., Ceilley, R., Hougeir, F., Lieberman, R., Hamzavi, I., et al. (2014). Role of Oral *Polypodium leucotomos* Extract in Dermatologic Diseases: a Review of the Literature. *J. Drugs Dermatol.* 13, 148–153.
- Dar, P. A., Sofi, G., and Jafri, M. A. (2012). *Polypodium vulgare* Linn. A Versatile Herbal Medicine: a Review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 3, 1616–1620.
- Dvorakova, M., Pumprova, K., Antonínová, Z., Rezek, J., Haisel, D., Ekrt, L., et al. (2021). Nutritional and Antioxidant Potential of Fiddleheads from European Ferns. *Foods* 10, 15. doi:10.3390/foods10020460
- EMA (2008). Assessment Report on *Polypodium vulgare* L., Rhizoma. London: EMEA/HMPC/600669/2007 European Medicines Agency (EMA).
- Evans, J. A., and Johnson, E. J. (2010). The Role of Phytonutrients in Skin Health. *Nutrients* 2, 903–928. doi:10.3390/nu2080903
- Farràs, A., Cásedas, G., Les, F., Terrado, E. M., Mitjans, M., and López, V. (2019). Evaluation of Anti-Tyrosinase and Antioxidant Properties of Four Fern Species for Potential Cosmetic Applications. *Forests* 10, 14. doi:10.3390/f10020179
- Ferreira, I., Silva, A., Martins, J. D., Neves, B. M., and Cruz, M. T. (2018). Nature and Kinetics of Redox Imbalance Triggered by Respiratory and Skin Chemical Sensitizers on the Human Monocytic Cell Line THP-1. *Redox Biol.* 16, 75–86. doi:10.1016/j.redox.2018.02.002
- Fotakis, G., and Timbrell, J. A. (2006). *In Vitro* Cytotoxicity Assays: Comparison of LDH, Neutral Red, MTT and Protein Assay in Hepatoma Cell Lines Following Exposure to Cadmium Chloride. *Toxicol. Lett.* 160, 171–177. doi:10.1016/j.toxlet.2005.07.001
- García, F., Pivel, J. P., Guerrero, A., Brieva, A., Martínez-Alcázar, M. P., Caamaño-Somoza, M., et al. (2006). Phenolic Components and Antioxidant Activity of Fernblotom, an Aqueous Extract of the Aerial Parts of the Fern *Polypodium leucotomos*. *Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.* 28, 157–160. doi:10.1358/mf.2006.28.3.985227
- Gegotek, A., Domingues, P., and Skrzydlewska, E. (2020). Natural Exogenous Antioxidant Defense against Changes in Human Skin Fibroblast Proteome Disturbed by UVA Radiation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020, 1–12. doi:10.1155/2020/3216415
- Gil da Costa, R. M., Bastos, M. M., Oliveira, P. A., and Lopes, C. (2012). Bracken-associated Human and Animal Health Hazards: Chemical, Biological and Pathological Evidence. *J. Hazard. Mater.* 203–204, 1–12. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.12.046
- Glensk, M., Dudek, M. K., Ciach, M., and Włodarczyk, M. (2019a). Isolation and Structural Determination of Flavan-3-ol Derivatives from the *Polypodium vulgare* L. Rhizomes Water Extract. *Nat. Product. Res.* 10, 1–10. doi:10.1080/14786419.2019.1655302
- Glensk, M., Tichaczek-Goska, D., Sroda-Pomianek, K., Włodarczyk, M., Wesolowski, C. A., and Wojnicz, D. (2019b). Differing Antibacterial and Antibiofilm Properties of *Polypodium vulgare* L. Rhizome Aqueous Extract and One of its Purified Active Ingredients-Osladin. *J. Herbal Med.* 17–18, 100261. doi:10.1016/j.hermed.2019.100261
- Gombau, L., García, F., Lahoz, A., Fabre, M., Roda-Navarro, P., Majano, P., et al. (2006). *Polypodium leucotomos* Extract: Antioxidant Activity and Disposition. *Toxicol. Vitro* 20, 464–471. doi:10.1016/j.tiv.2005.09.008
- Gomes, A. J., Lunardi, C. N., Gonzalez, S., and Tedesco, A. C. (2001). The Antioxidant Action of *Polypodium leucotomos* Extract and Kojic Acid: Reactions with Reactive Oxygen Species. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 1487–1494. doi:10.1590/s0100-879x2001001100018
- Gonzalez, S., Gilaberte, Y., and Philips, N. (2010). Mechanistic Insights in the Use of a *Polypodium leucotomos* Extract as an Oral and Topical Photoprotective Agent. *Photochem. Photobiol. Sci.* 9, 559–563. doi:10.1039/b9pp00156e
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., and Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol. Biochem.* 44, 532–553. doi:10.1159/000485089

- Hseu, Y. C., Lo, H. W., Korivi, M., Tsai, Y. C., Tang, M. J., and Yang, H. L. (2015). Dermato-protective Properties of Ergothioneine through Induction of Nrf2/ARE-Mediated Antioxidant Genes in UVA-Irradiated Human Keratinocytes. *Free Radic. Biol. Med.* 86, 102–117. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.026
- Karakas, D., Ari, F., and Ulukaya, E. (2017). The MTT Viability Assay Yields Strikingly False-Positive Viabilities Although the Cells Are Killed by Some Plant Extracts. *Turkish J. Biol.* 41, 919–925. doi:10.3906/biy-1703-104
- Khare, C. (2007). “*Polypodium vulgare* Linn.,” in *Indian Medicinal Plants*. Editor C. Khare (New York, NY: Springer). doi:10.1007/978-0-387-70638-2_1262
- Kimlin, M. G., and Guo, Y. (2012). Assessing the Impacts of Lifetime Sun Exposure on Skin Damage and Skin Aging Using a Non-invasive Method. *Sci. Total Environ.* 425, 35–41. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.02.080
- Langhansova, L., Pumprova, K., Haisel, D., Ekrt, L., Pavicic, A., Zajičková, M., et al. (2021). European Ferns as Rich Sources of Antioxidants in the Human Diet. *Food Chem.* 356, 129637. doi:10.1016/j.foodchem.2021.129637
- Leopoldini, M., Russo, N., and Toscano, M. (2011). The Molecular Basis of Working Mechanism of Natural Polyphenolic Antioxidants. *Food Chem.* 125, 288–306. doi:10.1016/j.foodchem.2010.08.012
- Liu, B., Diaz, F., Bohlin, L., and Vasänge, M. (1998). Quantitative Determination of Antiinflammatory Principles in Some *Polypodium* Species as a Basis for Standardization. *Phytomedicine* 5, 187–194. doi:10.1016/S0944-7113(98)80026-3
- Martínez, V., Galbati, V., Corsini, E., Martín-Venegas, R., Vinardell, M. P., and Mitjans, M. (2013). Establishment of an *In Vitro* Photoassay Using THP-1 Cells and IL-8 to Discriminate Photoirritants from Photoallergens. *Toxicol. Vitro* 27, 1920–1927. doi:10.1016/j.tiv.2013.06.013
- Messegueur, J., Melé, E., Reixach, N., Irurru-Santilari, J., and Casas, J. (1998). “*Polypodium vulgare* L. (Wood Fern): *In Vitro* Cultures and the Production of Phytoecdysteroids,” in *Medicinal and Aromatic Plants X* (Berlin, Heidelberg: Springer), 333–348.
- Mitjans, M., Ugartondo, V., Martínez, V., Touriño, S., Torres, J. L., and Vinardell, M. P. (2011). Role of Gallylation and Polymerization in Cytoprotective Effects of Polyphenolic Fractions against Hydrogen Peroxide Insult. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2113–2119. doi:10.1021/jf1025532
- Moloney, J. N., and Cotter, T. G. (2018). ROS Signalling in the Biology of Cancer. *Semin. Cel Dev. Biol.* 80, 50–64. doi:10.1016/j.semcdb.2017.05.023
- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Naik, A. V., and Sellappan, K. (2020). *In Vitro* evaluation of *Annona muricata* L. (Soursop) Leaf Methanol Extracts on Inhibition of Tumorigenicity and Metastasis of Breast Cancer Cells. *Biomarkers* 25, 701–710. doi:10.1080/1354750X.2020.1836025
- Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2012). Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 75, 311–335. doi:10.1021/np200906s
- O’Connor, P. J., Alonso-Amelot, M. E., Roberts, S. A., and Povey, A. C. (2019). The Role of Bracken Fern Illudanes in Bracken Fern-Induced Toxicities. *Rev. Mutat. Res.* 782, 39. doi:10.1016/j.mrr.2019.05.001
- OECD (2019). “OECD Test No. 432: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test,” in *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4* (Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)).
- Oyenihi, A. B., and Smith, C. (2019). Are Polyphenol Antioxidants at the Root of Medicinal Plant Anti-cancer success? *J. Ethnopharmacol.* 229, 54–72. doi:10.1016/j.jep.2018.09.037
- Palomino, O. M. (2015). Current Knowledge in *Polypodium leucotomos* Effect on Skin protection. *Arch. Dermatol. Res.* 307, 199–209. doi:10.1007/s00403-014-1535-x
- Parrado, C., Nicolas, J., Juarranz, A., and Gonzalez, S. (2020). The Role of the Aqueous Extract *Polypodium leucotomos* in Photoprotection. *Photochem. Photobiol. Sci.* 19, 831–843. doi:10.1039/d0pp00124d
- Parrado, C., Philips, N., Gilaberte, Y., Juarranz, A., and González, S. (2018). Oral Photoprotection: Effective Agents and Potential Candidates. *Front. Med. (Lausanne)* 5, 188. doi:10.3389/fmed.2018.00188
- Pérez, S., Sergent, O., Morel, P., Chevanne, M., Dubos, M. P., Cillard, P., et al. (1995). Kinetics of Lipid Peroxidation Induced by UVB on Epidermal Cell Cultures. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales* 189, 453–465.
- Philips, N., Smith, J., Keller, T., and Gonzalez, S. (2003). Predominant Effects of *Polypodium leucotomos* on Membrane Integrity, Lipid Peroxidation, and Expression of Elastin and Matrixmetalloproteinase-1 in Ultraviolet Radiation Exposed Fibroblasts, and Keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 32, 1–9. doi:10.1016/s0923-1811(03)00042-2
- Piccolella, S., Crescente, G., Candela, L., and Pacifico, S. (2019). Nutraceutical Polyphenols: New Analytical Challenges and Opportunities. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 175, 112774. doi:10.1016/j.jpba.2019.07.022
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., and Hübner, H. (2017). “Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin,” in *Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin*. First ed. (New York: Springer), 1–17. doi:10.1007/978-1-4939-6960-9_1
- Procházková, D., Boušová, I., and Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and Prooxidant Properties of Flavonoids. *Fitoterapia* 82, 513–523. doi:10.1016/j.fitote.2011.01.018
- Quer, P. F. (2016). “Plantas Medicinales. El Dioscórides Renovado” in PTERIDÓFITOS: POLIPODIO (*Polypodium vulgare* L.) (Barcelona: Ediciones Peninsula), 73–75.
- Ren, W., Qiao, Z., Wang, H., Zhu, L., and Zhang, L. (2003). Flavonoids: Promising Anticancer Agents. *Med. Res. Rev.* 23, 519–534. doi:10.1002/med.10033
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganga, G. (1996). Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 933–956. doi:10.1016/0891-5849(95)02227-9
- Riddell, R. J., Clothier, R. H., and Balls, M. (1986). An Evaluation of Three *In Vitro* Cytotoxicity Assays. *Food Chem. Toxicol.* 24, 469–471. doi:10.1016/0278-6915(86)90095-5
- Rundle, C. W., Militello, M., Barber, C., Presley, C. L., Rietcheck, H. R., and Dellavalle, R. P. (2020). Epidemiologic Burden of Skin Cancer in the US and Worldwide. *Curr. Derm Rep.* 9, 309–322. doi:10.1007/s13671-020-00311-4
- Santos, J. S., Deolindo, C. T. P., Hoffmann, J. F., Chaves, F. C., do Prado-Silva, L., Sant’Ana, A. S., et al. (2018). Optimized *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Ilex paraguariensis*, and *Aspalathus linearis* Blend Presents High Antioxidant and Antiproliferative Activities in a Beverage Model. *Food Chem.* 254, 348–358. doi:10.1016/j.foodchem.2018.02.021
- Shukla, S., Meeran, S. M., and Katiyar, S. K. (2014). Epigenetic Regulation by Selected Dietary Phytochemicals in Cancer Chemoprevention. *Cancer Lett.* 355, 9–17. doi:10.1016/j.canlet.2014.09.017
- Siddiqui, M. A., Kashyap, M. P., Kumar, V., Tripathi, V. K., Khanna, V. K., Yadav, S., et al. (2011). Differential protection of Pre-, Co- and post-treatment of Curcumin against Hydrogen Peroxide in PC12 Cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 30, 192–198. doi:10.1177/0960327110371696
- Sies, H., and Jones, D. P. (2020). Reactive Oxygen Species (ROS) as Pleiotropic Physiological Signalling Agents. *Nat. Rev. Mol. Cel Biol.* 21, 363–383. doi:10.1038/s41580-020-0230-3
- Silva, V. A. O., Alves, A. L. V., Rosa, M. N., Silva, L. R. V., Melendez, M. E., Cury, F. P., et al. (2019). Hexane Partition from *Annona crassiflora* Mart. Promotes Cytotoxicity and Apoptosis on Human Cervical Cancer Cell Lines. *Invest. New Drugs* 37, 602–615. doi:10.1007/s10637-018-0657-y
- Skibola, C. F., and Smith, M. T. (2000). Potential Health Impacts of Excessive Flavonoid Intake. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 375–383. doi:10.1016/s0891-5849(00)03004-x
- Sofiane, G., Wafa, N., and Ouarda, D. (2015). Antioxidant, Antimicrobial and Anti-inflammatory Activities of Flavonoids and Tannins Extracted from *Polypodium vulgare* L. *Asian J. Biochem. Pharm. Res.* 5, 114–122.
- The Plant List. 2021. *Polypodium vulgare* L.. Available at: <http://www.theplantlist.org/tp1.1/record/tro-26600283> (Accessed January 20, 2021)
- Thompson, K. G., and Kim, N. (2020). Dietary Supplements in Dermatology: A review of the Evidence for Zinc, Biotin, Vitamin D, Nicotinamide, and *Polypodium*. *J. Am. Acad. Dermatol.* doi:10.1016/j.jaad.2020.04.123
- Tomsik, P. (2014). Ferns and Lycopods-A Potential Treasury of Anticancer Agents but Also a Carcinogenic Hazard. *Phytotherapy Res.* 28, 798–810. doi:10.1002/ptr.v28.5
- Ugartondo, V., Mitjans, M., Touriño, S., Torres, J. L., and Vinardell, M. P. (2007). Comparative Antioxidant and Cytotoxic Effect of Procyanidin Fractions from Grape and Pine. *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1543–1548. doi:10.1021/tx700253y
- Uguz, A. C., Oz, A., and Naziroglu, M. (2016). Curcumin Inhibits Apoptosis by Regulating Intracellular Calcium Release, Reactive Oxygen Species and

- Mitochondrial Depolarization Levels in SH-SY5Y Neuronal Cells. *J. Recept. Signal Transduct.* 36, 395–401. doi:10.3109/10799893.2015.1108337
- Villar, L., and Bonet, M. À. (2018). “Polypodium L.” in *Inventario Español de los Conocimientos Tradicionales relativos a la Biodiversidad*. 2 ed. (Madrid: Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente de España), 51–55.
- Virgili, F., and Marino, M. (2008). Regulation of Cellular Signals from Nutritional Molecules: a Specific Role for Phytochemicals, beyond Antioxidant Activity. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1205–1216. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.001
- Wen, L., He, J., Wu, D., Jiang, Y., Prasad, K. N., Zhao, M., et al. (2014). Identification of Sesquignans in Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Leaf and Their Anticancer Activities. *J. Funct. Foods* 8, 26–34. doi:10.1016/j.jff.2014.02.017
- Weyermann, J., Lochmann, D., and Zimmer, A. (2005). A Practical Note on the Use of Cytotoxicity Assays. *Int. J. Pharm.* 288, 369–376. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.09.018
- Willcox, J. K., Ash, S. L., and Catignani, G. L. (2004). Antioxidants and Prevention of Chronic Disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 275–295. doi:10.1080/10408690490468489
- Wu, S., Li, J., Wang, Q., Cao, H., Cao, J., and Xiao, J. (2017). Seasonal Dynamics of the Phytochemical Constituents and Bioactivities of Extracts from *Stenoloma chusanum* (L.) Ching. *Food Chem. Toxicol.* 108, 458–466. doi:10.1016/j.fct.2016.10.003
- Yen, W. J., Chyau, C. C., Lee, C. P., Chu, H. L., Chang, L. W., and Duh, P. D. (2013). Cytoprotective Effect of white tea against H₂O₂-Induced Oxidative Stress *In Vitro*. *Food Chem.* 141, 4107–4114. doi:10.1016/j.foodchem.2013.06.106
- Zanette, C., Pelin, M., Crosera, M., Adami, G., Bovenzi, M., Laresse, F. F., et al. (2011). Silver Nanoparticles Exert a Long-Lasting Antiproliferative Effect on Human Keratinocyte HaCaT Cell Line. *Toxicol. Vitro* 25, 1053–1060. doi:10.1016/j.tiv.2011.04.005
- Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.
- The handling editor declared a past co-authorship with several of the authors FM, GC.
- Publisher’s Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Farràs, Mitjans, Maggi, Caprioli, Vinardell and López. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

GLOSSARY

- 3T3 = NIH 3T3** mouse fibroblast cell line
- A549** lung cancer cell line
- ADR** Adverse Drug Reactions
- CO₂** carbon dioxide
- CV** Cell Viability
- CPZ** chlorpromazine hydrochloride
- E** ultraviolet dose
- EMA** European Medicines Agency
- DCF** 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate
- DMEM** Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DMSO** dimethyl sulfoxide
- EDTA** ethylenediaminetetraacetic acid
- ECACC** European Collection of Authenticated Cell Cultures
- FBS** Fetal Bovine Serum
- FI** Fluorescence Intensity
- HaCaT** spontaneously immortalized human keratinocyte cell line
- HeLa** cervical cancer cell line
- HepG2** liver cancer cell line
- HPLC-DAD** liquid chromatography with diode-array detection
- H₂O₂** hydrogen peroxide
- MCF-7** breast cancer cell line
- MTT** 2,5-diphenyl-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) tetrazolium bromide
- NR** Neutral Red
- NRU** Neutral Red Uptake
- OECD** Organisation for Economic Cooperation and Development
- PBS** Phosphate Buffered Saline
- PL** *Polypodium leucotomos*
- PLE** aqueous extract of *Polypodium leucotomos*
- PVM** methanolic extract of *Polypodium vulgare* L. fronds
- ROS** Reactive Oxygen Species
- RNS** Reactive Nitrogen Species
- TLC** Thin Layer Chromatography
- UV** ultraviolet
- UVA** ultraviolet A

Publicación 3 → Chemical Composition and Cytoprotective Activities of Methanolic Extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. (*Aspleniaceae*)

DOI

10.3390/horticulturae8090815

Resumen

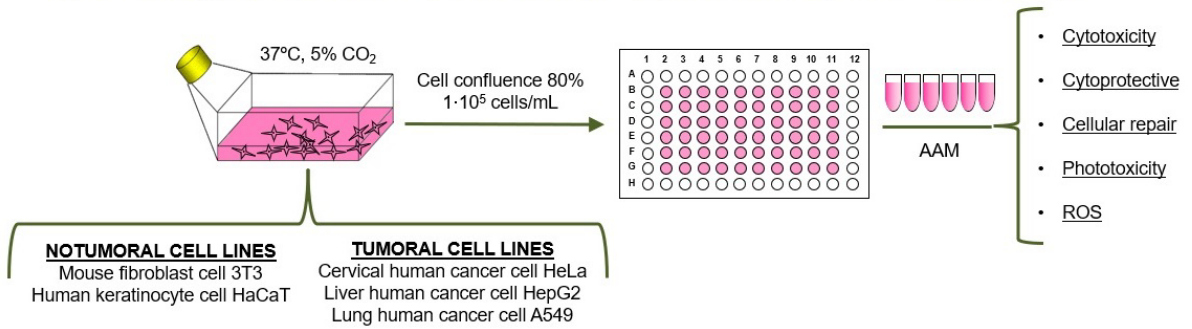
Los helechos pueden ser una fuente de compuestos fenólicos, siendo las frondes las partes principales descritas en los estudios etnofarmacológicos. El presente estudio determinó fitoquímicos fenólicos y evaluó las actividades *in vitro* de un extracto metanólico de las frondes de *Asplenium adiantum-nigrum* L. (AAM), un helecho *Aspleniaceae* recolectado en las montañas de Prades (Tarragona, España). La fitocaracterización por HPLC-MS/MS confirmó que los principales flavonoides aislados en AAM son los flavanoles, mientras que los principales fitoquímicos son los ácidos fenólicos, siendo el ácido clorogénico el más representativo. La citotoxicidad, la citoprotección, la actividad de reparación celular y la fototoxicidad se determinaron *in vitro* en presencia de 0,01, 0,1 y 1 mg/mL del extracto. No se obtuvo citotoxicidad en ninguna de las líneas celulares ensayadas: células no tumorales (3T3 y HaCaT) y células tumorales (HeLa, HepG2 y A549). Además, el extracto polifenólico mostró un mayor efecto protector contra el H₂O₂ en las células 3T3 que en las células HaCaT. A pesar del bajo contenido total de compuestos fenólicos de AAM (1405,68 mg fitoquímicos fenólicos/kg extracto seco), la actividad citoprotectora de este extracto podría estar asociada a la acción antioxidante sinérgica de su perfil polifenólico. Además, el extracto no presentó fototoxicidad frente a la dosis no citotóxica de 1,8 J/cm² de luz UVA en ambas líneas celulares no tumorales.

Resumen gráfico

Methanolic extraction and polyphenolic profile



Cytotoxicity, cytoprotective, cellular repair, phototoxicity and ROS activity





Article

Chemical Composition and Cytoprotective Activities of Methanolic Extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. (*Aspleniaceae*)

Adrià Farràs ^{1,2}, Víctor López ^{2,3}, Filippo Maggi ⁴, Giovanni Caprioli ⁴, María Pilar Vinardell ¹ and Montserrat Mitjans ^{1,*}

- ¹ Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain
² Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Universidad San Jorge, Villanueva de Gállego, 50830 Zaragoza, Spain
³ Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, CITA-Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain
⁴ School of Pharmacy, Università di Camerino, 62032 Camerino, Italy
* Correspondence: montsemitjans@ub.edu; Tel.: +34-934-024-505

Abstract: Ferns can be a source of polyphenolic compounds, with the fronds being the main parts described in ethnopharmacological studies. The present study screened polyphenolic phytochemicals and evaluated *in vitro* activities of a methanolic extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. fronds (AAM), an *Aspleniaceae* fern collected from the Prades mountains (Tarragona, Spain). Phytocharacterization by HPLC-MS/MS confirmed that the major flavonoids isolated in AAM are flavanols while the major phytochemicals are phenol acids, with chlorogenic acid being the most representative one. Cytotoxicity, cytoprotection, cellular repair activity, and phototoxicity were determined *in vitro* in the presence of 0.01, 0.1, and 1 mg/mL of the extract. No cytotoxicity was obtained in any of the cell lines tested: non-tumoral (3T3 and HaCaT) and tumoral (HeLa, HepG2, and A549) cells. Additionally, the polyphenolic extract showed greater protective effect against H₂O₂ in 3T3 than HaCaT cells. Despite the low total phenolic content of AAM (1405.68 mg phenolic phytochemicals/kg dry extract), the cytoprotective activity of this extract could be associated with the synergistic antioxidant action of their polyphenolic profile. In addition, the extract did not present phototoxicity against the non-cytotoxic 1.8 J/cm² dose of UVA light in both non-tumoral cell lines.

Keywords: *Asplenium adiantum-nigrum* L.; cytoprotection; cytotoxicity; ethnopharmacology; ferns; oxidative stress



Citation: Farràs, A.; López, V.; Maggi, F.; Caprioli, G.; Vinardell, M.P.; Mitjans, M. Chemical Composition and Cytoprotective Activities of Methanolic Extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. (*Aspleniaceae*). *Horticulturae* **2022**, *8*, 815. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8090815>

Academic Editor: Charalampos Proestos

Received: 19 July 2022

Accepted: 29 August 2022

Published: 6 September 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Living organisms have developed a set of different endogenous antioxidant mechanisms, which act by enzymatic and non-enzymatic mechanisms, with the aim of preventing reactive oxygen species (ROS) imbalances. Consequently, free radicals are indispensable for the maintenance of redox homeostasis [1]. In the last decades, oxidative stress has been associated with a sedentary lifestyle, an unhealthy diet, and continued exposure to substances with toxicological potential. Supplementation with exogenous antioxidant substances is a potentially evident strategy in the prevention and reduction of the incidence of oxidative stress, especially from plant extracts due to the synergistic antioxidant action of the phytochemicals [2].

Phenolic phytochemicals are characterized by having aromatic rings with at least one hydroxyl group. The antioxidant activity of phenolic phytochemicals are hydrogen atom transfer, single electron transfer, and transition metals chelation [3]. These phytochemicals are involved in a multitude of physiological plant functions, such as protection against oxidative stress induced by ultraviolet radiation in plants. Due to their antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial action, these phytochemicals have been described as

bioactive agents in the prevention and treatment of skin diseases and other severe affections such as osteosarcoma [4,5].

Ferns are poorly represented in the pharmacopoeias compared with other vascular plants and even more so when compared with angiosperms. Multiple reasons can account for this, for example, inadequate methods of fern identification and collection [6]. However, different oriental health systems consider ferns in their texts [7–9]. In this sense, the *Pteridaceae* family have been described in Ayurveda medicine; this is the case for the species *Adiantum incisum* Forssk. (*Pteridaceae*) used for the treatment of skin disorders [7], or *Adiantum capillus-veneris* L. (*Pteridaceae*) which is described for treating measles [10]. Currently, the fern with a high number of studies as an agent in the treatment of skin conditions is the aqueous extract of *Polypodium leucotomos* (*Polypodiaceae*) fronds (PLE) because of its phenolic content [11,12].

In Europe, different properties of ferns have been described as potential nutritional agents since their fronds have been described as a source of phytochemicals with antioxidant activity [13,14]. In the Iberian Peninsula and the Balearic Islands a high biodiversity of *Pteridophytes* has been recorded [15], including different *Aspleniaceae* with veterinary ethnopharmacological uses as *Asplenium trichomanes* L. ssp. *trichomanes* and *Asplenium adiantum-nigrum* L. ssp. *onopteris* [16,17]. The Prades mountains (Tarragona, Spain) is a mountainous orography of great plant biodiversity where important representations of different species of ferns have been described, especially belonging to the *Aspleniaceae* [18]. Among them, the *Asplenium adiantum-nigrum* L. (Figure 1), also known by the scientific name *Asplenium andrewsii* A. Nelson [19], is characterized by presenting fronds with a long black petiole [20]. In Catalonia, the fronds of *A. adiantum-nigrum* L. have been reported for the treatment of chicken coccidiosis [18] and for human oral fungal infection (Catalan popular called *mal blanc*) [21].



Figure 1. Face fronds (A) and underside frond (B) of fresh *Asplenium adiantum-nigrum* L. (*Aspleniaceae*) at the Prades mountains by Adrià Farràs. The euro coin provides a reference for the size of frond (B).

The extracts from the *Asplenium trichomanes* L. and *Asplenium nidus* L. (also reported as *Asplenium australasicum* (J. Sm.) Hook.) fronds, ferns from *Aspleniaceae* family, have been described for the treatment of burns (oily extract) and for wound healing (aqueous-ethanolic extract), respectively [22,23]. The main goal of our work is to characterize one of the most representative ferns of the Prades mountains (Tarragona, Spain) and to relate to their traditional and/or potential uses. As a preliminary study, we present here the characterization of a polyphenolic extract obtained from the fronds of *Asplenium adiantum-nigrum* L. analysing 38 phytochemicals. Moreover, the cytotoxic profile in various cell lines, their potential cytoprotective and cellular repair activity, phototoxic activity, and protection against ROS production were assessed in 3T3 and HaCaT.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

All reagents used were of analytical grade. Reference materials for all bioactive phytochemicals were supplied by Sigma-Aldrich (Milan, Italy), except for kaempferol-3-glucoside and quercetin that were supplied by PhytoLab (Vestenbergsgreuth, Germany). Pure reference materials were dissolved in methanol until reaching the corresponding stock solutions (1000 mg/L). These solutions were kept at 5 °C in glass-stoppered bottles until analysis. Standard working solutions were prepared fresh by diluting stock solutions with methanol (HPLC grade). Formic acid at 99% concentration and methanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and from Sigma-Aldrich (Milan, Italy), respectively. Ultrapure water (resistivity >18 MΩ cm) was obtained by filtration of deionized water with the Milli-Q SP reagent water system (Millipore, Bedford, MA, USA). All liquids were filtered through 0.2 µm polyamide filters obtained from Sartorius Stedim (Goettingen, Germany). The samples injected in the HPLC were previously filtered with Phenex™ RC 4 mm 0.2 µm syringeless filters acquired from Phenomenex (Castel Maggiore, BO, Italy). The following reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain): trypan blue (0.4%) dye, hydrogen peroxide (H₂O₂) 30% w/w, 2,5-diphenyl-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) tetrazolium bromide (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO), 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF), and chlorpromazine hydrochloride (CPZ, CAS No. 69-09-0). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with and without phenol red, phosphate-buffered saline (PBS), L-glutamine solution (200 mM), trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution (170,000 U/L trypsin and 0.2 g/L EDTA), and penicillin-streptomycin solution (10,000 U/mL penicillin and 10 mg/mL streptomycin) were obtained from Lonza (Verviers, Belgium). Thermo Scientific (Northumberland, UK) supplied HyClone fetal bovine serum (FBS). The 75 cm² culture flasks and well culture plates were purchased from TPP (Trasadingen, Switzerland).

2.2. Plant Material

The Prades mountains are the area where the fronds of *Asplenium adiantum-nigrum* L. have been collected. The existence in this area of this fern was previously verified by the *Banco de Datos de Biodiversidad de Cataluña* [24]. A specimen of the fresh frond was authenticated by an expert using taxonomic keys. The fronds were dried at room temperature under laboratory filter paper for 4–5 consecutive days and, finally, a dried specimen was stored at the Herbarium of Universidad San Jorge (Zaragoza, Spain): voucher no. 004-2016.

2.3. Preparation of Methanolic Extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. Fronds

Once the fronds were powdered, this material was macerated with methanol for 24 h at room temperature. Subsequently, the corresponding extract was filtered using a Whatman N°4 filter paper. The solvent of the corresponding filtrate was evaporated using a rotary evaporator with a thermostatic bath at 30 °C. This entire process was repeated three times to obtain the corresponding exhaustion extract [25]. Finally, the methanolic extracts were kept at −20 °C until we carried out the experiments.

2.4. Polyphenol Characterization of Methanolic Extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. Fronds by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS)

Phytochemical quantification was obtained by modifications of a previously described method of our group [26]. HPLC-MS/MS assay was accomplished with an Agilent 1290 Infinity series and a Triple Quadrupole 6420 purchased from Agilent Technology, located in Santa Clara, CA, USA, and connected to an electrospray ionization (ESI) source that operated in negative and positive ionization modes. The MS/MS parameters of each standard were optimized by operating flow injection analysis (FIA) by Optimizer Software (see Table S1 of Supplementary Materials). The separation of phenolic compounds was obtained by direct injection of the diluted sample (1:5) using gradient elution mode on a

Phenomenex Synergi Polar-RP C18 column (250 mm × 4.6 mm, 4 μm) using a mixture of water and methanol as solvents A and B, respectively, both with 0.1% formic acid. For column protection, a Polar RP security guard cartridge preceded the column (4 mm × 3 mm ID). The composition of the mobile phase was: 0–1 min, isocratic condition, 20% B; 1–25 min, 20–85% B; 25–26 min, isocratic condition, 85% B; and 26–32 min, 85–20% B. All solutions and solvents were filtered through a 0.2 μm polyamide filter. The injection volume was 2 μL, and the flow rate was kept at 0.8 mL/min. The temperature of the column was set to 30 °C, and the drying gas temperature in the ionization source was set to 350 °C. The flow rate of the gas was set to 12 L/min, the capillary voltage was 4000 V, and the nebulizer pressure was 55 psi. After detection in the dynamic-multiple reaction monitoring (dynamic-MRM) mode, the peak areas were integrated for quantification. The most abundant product ion was used for quantification, while the remaining ions were used for qualitative analysis. The Δ retention time (each compound's unique time window) was set at 2 min.

2.5. Cell Culture and Cytotoxicity Studies

Two cell lines were selected, the NIH 3T3 mouse fibroblast cell line, obtained from the repository of the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) by purchasing them at Sigma Aldrich, and the immortalized human keratinocyte cell line HaCaT, acquired at Eucellbank (Celltec-Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain).

Cells were grown and maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with 4.5 g/L glucose supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, and 100 U/mL:100 U/mL streptomycin-penicillin mixture (10% FBS-DMEM) at 37 °C in a 5% carbon dioxide (CO₂)-humidified incubator. Cells were regularly checked and subsequently subcultured in 75 cm² flasks.

For cytotoxicity studies, we followed the protocol previously described in Farràs et al. 2021 [27]. Cells were treated with 0.01, 0.1, and 1 mg/mL of methanolic fronds extract of *A. adiantum-nigrum* in 5% FBS-DMEM. For each cell line and plate, a negative control was included, which corresponds to untreated cells. The cytotoxicity of AAM was finally determined by the neutral red uptake (NRU) and 2,5-diphenyl-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) tetrazolium bromide (MTT) assays after treatments, as follows.

After, the cell treatments' supernatant was extracted from each well and 100 μL of NR solution (0.05 mg/mL) or 100 μL of an MTT solution (0.5 mg/mL) in serum-free DMEM without phenol red was applied. Plates were maintained for at least 3 h at 37 °C and 5% CO₂ and then the supernatant was discarded. Then, in the case of NRU, 100 μL of a destain solution containing an acidic ethanol solution was added to dissolve the NR uptaken by viable cells. For the MTT, 100 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well to dissolve the formazan crystals. Before reading the absorbance at 550 nm in a Tecan Sunrise microplate reader (Männedorf, Switzerland), plates were shaken for 5 to 10 min at 100 rpm/min to homogenize the well content.

Cell viability for NRU and MTT assays was calculated using the following equation:

$$\text{Cell viability (\%)} = \left(\frac{A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

where A_{control} and A_{sample} are the absorbance of the control and each sample, respectively.

The effect of the extract over cell viability was also studied with the human tumoral cell lines: cervical cancer cell line HeLa (Eucellbank, Celltec-Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain), liver cancer cell line HepG2 (Dr. Borràs of Experimental Toxicology and Ecotoxicology Platform (UTOX-CERETOX) of Parc Científic of Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain), and lung cancer cell line A549 (ECACC).

2.6. Cytoprotective and Cellular Repair Activity of Methanolic Extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. Fronds in Non-Tumoral Cell Lines

In a similar way as previously assessed [27], hydrogen peroxide was used to induce oxidative stress. The capacity of fern extracts to prevent cellular damage or induce cellular

repair was assessed by treating cells before or after peroxide insult with 0.01, 0.1, and 1 mg/mL AAM in 5% FBS-DMEM [28]. Briefly, to prevent cellular damage, cells were pre-treated with AAM at the different concentrations for a period of 24 h. Then, the medium was discarded, cells washed with PBS, and the peroxide insult was induced by 1 mM or 2 mM H₂O₂ for 2.5 h. After treatment with H₂O₂, cell viability was determined by the NRU and the MTT assay as described above (Section 2.5).

In the case of cellular repair activity, cells were previously incubated with H₂O₂ for 2.5 h. Then, the medium was discarded, cells were washed and finally treated with 0.01, 0.1, and 1 mg/mL AAM in 5% FBS-DMEM for 24 h. Finally, after AAM treatment, cellular repair activity was calculated by determining cell viability with the NRU and MTT tests.

For each independent experiment and plate, correspondent negative and positive controls were included. In this case, positive controls consisted of H₂O₂ at 1 mM or 2 mM treated cells for 2.5 h but without pre- or post-treatment with the extract, while negative ones were untreated cells.

Cytoprotective and cellular repair activity were calculated as follows:

$$\text{Cytoprotective and cellular repair activity (\%)} = \left(\frac{CV_{AAM-H_2O_2} - CV_{H_2O_2}}{CV_{AAM-H_2O_2}} \right) \times 100$$

where CV is the cell viability for each condition described in the formula.

2.7. Phototoxicity Activity of Methanolic Extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. Fronds in 3T3 and HaCaT Cell Lines

The potential phototoxic activity of AAM was evaluated according to Farràs et al., 2021 [27], which is a modified protocol of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) TG 432 (2019) [29]. In this assay, cytotoxicity of the extract was compared in the presence and in the absence of exposure to a non-cytotoxic dose of ultraviolet A light and, therefore, we can exclude the presence of phototoxic reactions.

For each experiment, two plates were prepared, one for being exposed to ultraviolet A (UVA) light and the other for remaining in the dark. Cells were treated with 0.01, 0.1, and 1 mg/mL of AAM extract solved in 0% FBS-DMEM without phenol red for 1 h and then exposed to 1.8 J/cm² UVA light or remaining in the dark. In each plate, cells not treated (negative control) and treated with chlorpromazine (37.5 µg/mL 0% FBS-DMEM without phenol red) as internal positive controls, were included. Cell viability was determined by the NRU and MTT colorimetric assays.

2.8. Intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) Induced by H₂O₂ of Methanolic Extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. Fronds in 3T3 and HaCaT Cell Lines

The level of ROS generated in cells lines by H₂O₂ over a range of time was assayed pursuant to Ferreira et al. (2018) [30]. After cell pre-treatment with 0.01, 0.1, and 1 mg/mL AAM in 5% FBS-DMEM, cells were washed twice with PBS, and DCF (100 µM) was added to each well for 45 min (37 °C and 5% CO₂). To eliminate the excess DCF, another two PBS washes were performed and then H₂O₂ (1 and 2 mM) was added. Fluorescence intensity of the oxidized product of DCF was registered (λ_{excitation} 480 nm; λ_{emission} 530 nm) at 0, 1, 2, and 3 h by a ThermoFisher SCIENTIFIC VARIOSKAN LUX plate reader (ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, MA, USA). Results were expressed as fluorescence intensity (FI) which have dimensionless units. The $FI_{z\ h\ vs.\ 0\ h}$ was calculated as follows:

$$\text{Fluorescence Intensity}_{z\ h\ vs.\ 0\ h} (FI_{z\ h\ vs.\ 0\ h}) = \left(\frac{FI_{z\ h} - FI_{0\ h}}{FI_{z\ h}} \right) \times 100$$

where $FI_{z\ h}$ is the intensity fluorescence at z h (z as 1 h, 2 h, or 3 h) of incubation and $FI_{0\ h}$ the amount of fluorescence intensity at 0 h.

The *FI* for each specific time was calculated using this formula:

$$FI = \frac{\text{Fluorence}_{480 \text{ nm (excitation)}}}{\text{Fluorence}_{530 \text{ nm (emision)}}$$

The ΔROS , which have dimensionless units for *FI*, was obtained using the following formula:

$$\Delta ROS_{H_2O_2} = \Delta ROS_{AAM \text{ with } DCF-H_2O_2} - \Delta ROS_{DCF-H_2O_2}$$

2.9. Statistical Analysis

All experiments were executed in triplicates and almost three independent experiments were assayed, on different days, except for the cytoprotection of AAM HaCaT against 2 mM H₂O₂ (2.5 h) MTT for which the results correspond to *n* = 2 experiments, respectively. Statistical analysis for MTT cell viability and fluorescence intensity (*FI*) was performed using GraphPad Prism version 7, San Diego, CA, USA. All data were expressed as mean +/− standard error. Activities have been compared using a two-way analysis of variance (ANOVA) by Bonferroni. The results were regarded as significantly different when: *p* ≤ 0.05 (*), *p* ≤ 0.01 (**), *p* ≤ 0.001 (***), and *p* ≤ 0.0001 (****).

3. Results

3.1. Phytochemical Characterization of Methanolic Extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. Fronds by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS)

The extract contains different types of phenol species (1405.68 mg/kg dry extract), as we observe in Table 1. Moreover, the total extract presents a higher proportion of phenolic acids (81.06%) than flavonoids (18.40%). Analysis of the three main phytochemicals, chlorogenic acid (681.10 mg/kg), vanillic acid (235.19 mg/kg), and procyanidin B2 (110.16 mg/kg), also shows that phenolic acids are the major phytochemicals determined by HPLC-MS/MS.

Table 1. Content (mg/kg of dry extract) of 38 phenol phytochemicals in the methanolic extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. fronds analysed by HPLC-MS/MS (*n* = 3, RSD% ranged from 1.8 to 6.8%).

N°	Phytochemicals	Methanolic Extract <i>Asplenium adiantum-nigrum</i> L. Fronds (AAM)
Phenolic acids		
1	Gallic acid	30.56
2	Neochlorogenic acid	n.d.
3	Chlorogenic acid	681.10
4	p-Hydroxybenzoic acid	109.38
5	3-Hydroxy benzoic acid	n.d.
6	Caffeic acid	16.68
7	Vanillic acid	235.19
8	Syringic acid	n.d.
9	p-Coumaric acid	61.10
10	Ferulic acid	1.77
11	3,5-Dicaffeoylquinic acid	3.62
12	Ellagic acid	n.d.
Flavonoids		
(A) Anthocyanins		
13	Delphinidin-3,5-diglucoside	2.06
14	Delphinidin-3-galactoside	0.52
15	Cyanidin-3-glucoside	64.07
16	Petunidin-3-glucoside	n.d.

Table 1. Cont.

N°	Phytochemicals	Methanolic Extract <i>Asplenium adiantum-nigrum</i> L. Fronds (AAM)
17	Pelargonidin-3-rutinoside	n.d.
18	Pelargonidin-3-glucoside	n.d.
19	Malvidin-3-galactoside	n.d.
	(B) Flavonols	
20	Rutin	5.54
21	Isoquercitrin	3.17
22	Quercitrin	0.99
23	Myricetin	0.71
24	Kaempferol-3-glucoside	36.85
25	Quercetin	0.74
26	Isorhamnetin	0.18
27	Hyperoside	5.59
28	Kaempferol	1.88
	(C) Flavan-3-ols (Flavanols)	
29	Catechin	n.d.
30	Epicatechin	7.69
31	Procyanidin B2	110.16
32	Procyanidin A2	3.63
	(D) Dihydrochalcones	
33	Phloridzin	n.d.
34	Phloretin	n.d.
	(E) Flavanones	
35	Hesperidin	14.81
36	Naringin	n.d.
	Stilbenes	
37	Resveratrol	n.d.
	Non-phenolic acids	
38	Trans-cinnamic acid	7.69
	Total phenol content	1405.68

nd = not detected.

Other phenol acids as neochlorogenic acid, 3-hydroxybenzoic acid, syringic acid, and ellagic acid were not detected. Interestingly, we determined a variability of flavonoids in residual amounts, although they represent a low proportion of the total phytochemicals determined. Among them are quercitrin, quercetin, myricetin, delphinidin-3-galactoside, and isorhamnetin.

3.2. In Vitro Cell Assays

Determination of cell viability by the NRU assay shows no significant differences between treated and untreated cells independently of the cell line studied (data not shown). Thus, according to NRU data, the extract is not cytotoxic in the conditions assayed. For this reason, only data obtained by the MTT assay is analysed.

3.2.1. Cytotoxicity of Methanolic Extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. Fronds in Non-Tumoral and Tumoral Cell Lines

We evaluated the effect of increasing concentrations of AAM at 0.01, 0.1, and 1 mg/mL, in non-tumoral (3T3 and HaCaT) and tumoral (HeLa, HepG2 and A549) cell lines. As observed in Figure 2, AAM does not induce an important cytotoxicity in 3T3 and HaCaT (Figure 2A,B, respectively). However, a slightly lower viability has been recorded for fibroblasts than for keratinocytes; being the lowest cell viability recorded at 0.1 mg/mL AAM in 3T3 (62.4% cell viability).

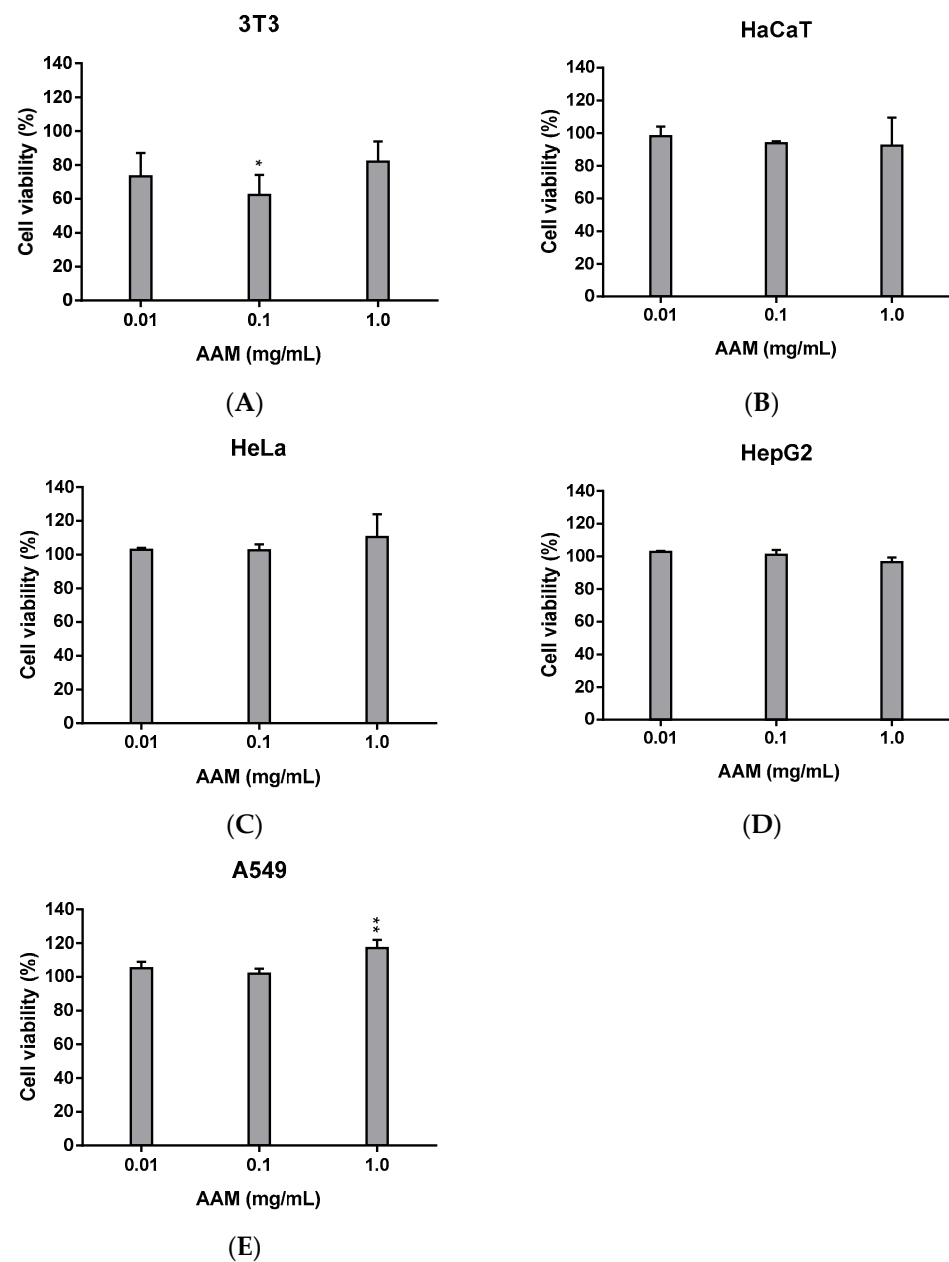


Figure 2. Cytotoxic activity of AAM in 3T3 (A), HaCaT (B), HeLa (C), HepG2 (D), and A549 (E) cell lines obtained by MTT assay and expressed as percentage of cell viability with respect to control cells. Results are expressed as mean \pm standard error of $n = 3$. Control or untreated cells were maintained with culture medium. A two-way analysis of variance (ANOVA) and a Bonferroni post hoc assay have been performed. Statistical differences were considered as follows: * $p \leq 0.05$, and ** $p \leq 0.01$ in comparison with untreated cells (negative control).

For the tumoral cell lines (Figure 2C–E), we failed to find any cytotoxic behaviour at the conditions tested for the extract. For this reason, the following studies were only performed with non-tumoral cell lines.

3.2.2. Cytoprotective Activity of Methanolic Extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. Fronds in 3T3 and HaCaT Cell Lines

We evaluated the capacity of the AAM extract to prevent oxidative damage induced by H_2O_2 (2 and 1 mM H_2O_2 for 2.5 h). However, we only found some cytoprotective activity against 2 mM H_2O_2 for 2.5 h (results obtained for 1 mM H_2O_2 are presented in Figure S1 of Supplementary Materials).

Figure 3 shows cell viability obtained for both cell lines, 3T3 (Figure 3A) and HaCaT (Figure 3B). Cell viability of positive controls (cells treated by H₂O₂ but not with AAM extract) indicate that 3T3 cells seem to be more sensitive to H₂O₂ than HaCaT (32.6% and 45.9% cell viability, respectively), which could explain in part the higher cytoprotection observed in 3T3. However, it is only in the case of 3T3 treated with 1 mg/mL AAM that we found statistically significant cytoprotective activity, with a calculated value of cytoprotective effect greater than 30% (Table 2). According to Siddiqui, et al., 2011, cellular repair activity (i.e., post-treatment by the extract) presents good results only in the case that protective effects have been observed in the pre-treatment, since repairing mechanisms require more cellular energy than the protective ones. Consequently, cellular repair activity was only assessed in 3T3 cells.

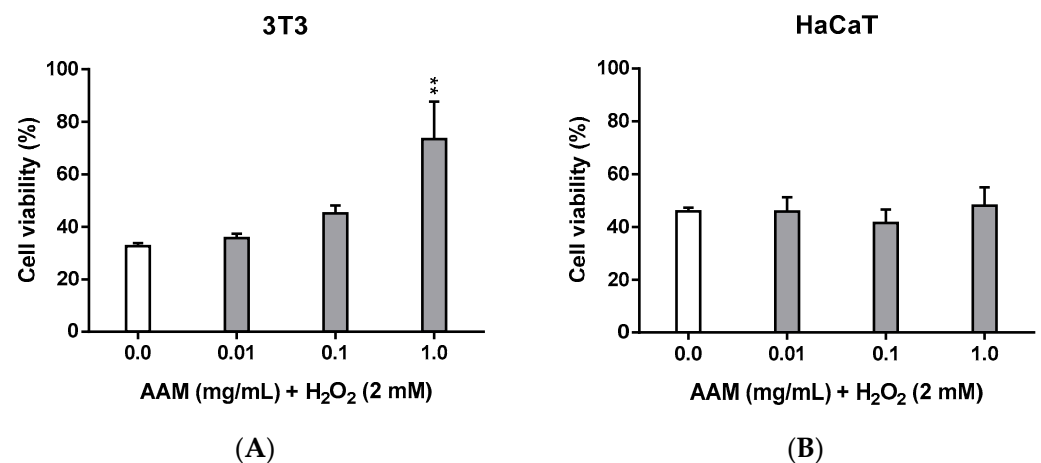


Figure 3. Cytoprotective activity of AAM in 3T3 (A) and HaCaT (B). Cells were incubated 24 h in the absence (white column) or in the presence of AAM (gray columns) and subsequently treated with 2 mM H₂O₂ for 2.5 h and finally cell viability was determined by MTT assay and expressed as a percentage with respect to untreated cells. H₂O₂ cell viability in absence of the extract was used as a positive control. Results are expressed as mean \pm standard error of $n = 3$ (3T3) and $n = 2$ (HaCaT). A two-way analysis of variance (ANOVA) and a Bonferroni post hoc assay have been performed. Statistical differences were considered as follows: ** $p \leq 0.01$ in comparison with positive control.

Table 2. Cytoprotective activity of AAM on 3T3 and HaCaT cells.

Concentration of AAM (mg/mL)	0.01	0.1	1
Cytoprotection activity (%) ^a in 3T3	8.7%	27.7%	55.6%
Cytoprotection activity (%) ^a in HaCaT	0.0%	0.0%	4.4%

^a Percentage of cytoprotection activity has been obtained from the following relation $[(CV_{AAM-H_2O_2} - CV_{H_2O_2}) / CV_{AAM-H_2O_2}] \times 100$.

3.2.3. Cellular Repair Activity of Methanolic Extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. Fronds in 3T3 Tissue Cell Line

In a similar way as in the previous experiments of cytoprotection, 3T3 cells suffer a high decrease in viability (21.9%) 24 h after being treated with 2 mM H₂O₂ for 2.5 h (Figure 4).

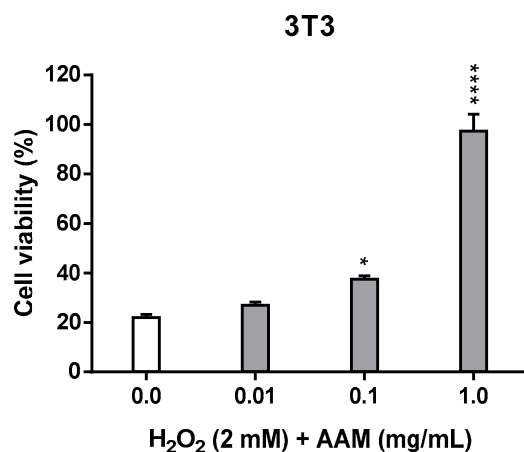


Figure 4. Cellular repair activity of AAM in 3T3 cells. Cells previously treated with 2 mM H₂O₂ for 2.5 h were incubated in the absence (white column) or in the presence of AAM for 24 h (gray columns) and finally cell viability was determined by MTT assay and expressed as a percentage with respect to untreated cells. H₂O₂ cell viability in absence of the extract was used as a positive control. Results are expressed as mean \pm standard error of $n = 3$. A two-way analysis of variance (ANOVA) and a Bonferroni post hoc assay have been performed. Statistical differences were considered as follows: * $p \leq 0.05$, and **** $p \leq 0.0001$ in comparison with positive control.

Results obtained here indicate a tendency to increase viability in a concentration dependent manner (Table 3). However, statistical significance of such increase is only recorded at 0.1 and 1 mg/mL extract.

Table 3. Cellular repair activity of AAM in 3T3 cell line for 2 mM H₂O₂ during 2.5 h by MTT assay.

Concentration of AAM (mg/mL)	0.01	0.1	1
Cellular repair activity (%) ^a	18.8%	41.6%	77.5%

^a Percentage of cellular repair activity has been obtained from the following relation $[(CV_{AAM-H_2O_2} - CV_{H_2O_2}) / CV_{AAM-H_2O_2}] \times 100$.

3.2.4. Phototoxicity Activity of Methanolic Extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. Fronds in 3T3 and HaCaT Tissue Cell Lines

UVA light sensitivity for 3T3 and HaCaT cells was determined in each experiment by including negative controls (cells not treated) and comparing their cell viability in irradiated and dark conditions. In our case, 3T3 showed a cell viability of 63.3% and HaCaT 75.0%, indicating moderate sensitivity of our cells to UVA light, a fact that could account to underestimate the phototoxic behaviour of our products. Nevertheless, cells treated with CPZ, a well-known phototoxic chemical (internal positive control), show a high decrease in cell viability when exposed to light, which is more pronounced in the case of HaCaT cells, indicating that phototoxicity has been induced.

Figure 5 presents the viability for 3T3 and HaCaT cells obtained by MTT in dark and UVA light conditions. In both cases, cell viability of cells treated with AAM is not affected by UVA light exposition and thus phototoxicity activity of the extract can be discarded. Interestingly, cells treated by the AAM extract show a high increase of cell viability, which is independent of UVA treatment, achieving values of almost 200% in the case of 3T3 in some conditions, although no statistical signification is found.

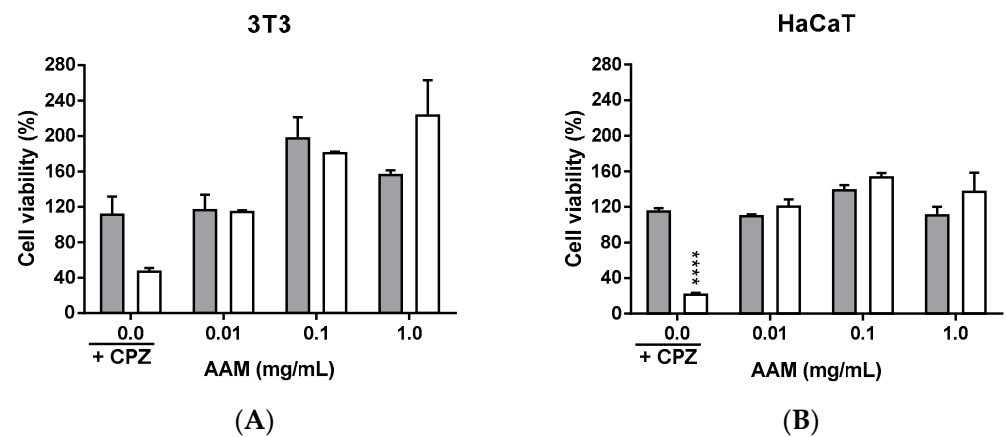


Figure 5. Phototoxicity activity of AAM in 3T3 (A) and HaCaT (B) cell lines obtained by MTT assay and expressed as percentage of cell viability respect to the correspondent control cells. Chlorpromazine cell viability was used as positive control. Gray columns correspond to non-exposed cells to UVA light and white columns correspond to cells exposed to 1.8 J/cm² of UVA light. Results are expressed as mean \pm standard error of $n = 3$. A two-way analysis of variance (ANOVA) and a Bonferroni post hoc assay have been performed. Statistical differences were considered as follows: **** $p \leq 0.0001$ in comparison with the equivalent non-irradiated condition homologue.

3.2.5. Intracellular ROS Induced by H₂O₂ of Methanolic Extract of *Asplenium adiantum-nigrum* L. Fronds in 3T3 and HaCaT Cell Lines

DCF probe was used to determine the production of intracellular ROS expressed as FI as shown in Figure 6 for 2 h. Absolute ROS values increase with time (1, 2, and 3 h), but no differences in pattern behaviour is observed (data not shown). Thus, we only present here the ROS production at 2 h.

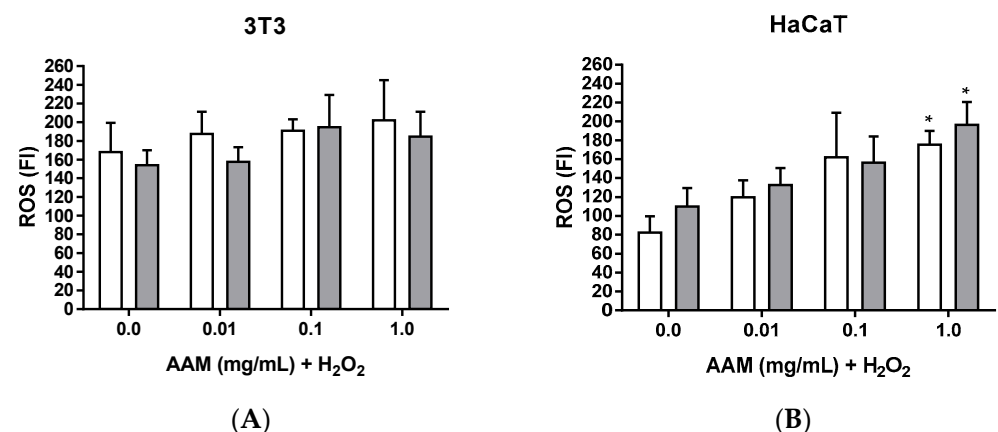


Figure 6. Intracellular ROS induced by 1 and 2 mM H₂O₂ for 2 h treatment after 24 h incubation with AAM in 3T3 (A) and HaCaT (B) cells. H₂O₂ treated cells were used as positive control. White columns correspond to 1 mM H₂O₂ and gray columns correspond to 2 mM H₂O₂. Results are expressed as mean \pm standard error of $n = 3$. A two-way analysis of variance (ANOVA) and a Bonferroni post hoc assay have been performed. Statistical differences were considered as follows: * $p \leq 0.05$ in comparison with the corresponding positive control.

ROS production shows a similar pattern for 1 mM and 2 mM H₂O₂ with a slight tendency to increase in parallel to AAM extract concentration but the only statistically significant case is that of HaCaT at 1 mg/mL of AAM (Figure 6B). This observation can be attributed to the lower values of ROS production induced by H₂O₂ in the case of HaCaT.

Table 4 summarizes the different increases of ROS production in the various conditions assessed. It is observed that in the case of HaCaT the amount of ROS has a significant rise as stated before.

Table 4. Intracellular Δ ROS^a induced by 1 and 2 mM H₂O₂ for 2 h respect 0 h at different concentrations of AAM in 3T3 and HaCaT.

Cell Line	3T3			HaCaT		
Concentration of AAM (mg/mL)	0.01	0.1	1	0.01	0.1	1
1 mM H ₂ O ₂	19.6	22.7	34.0	37.5	79.7	93.1
2 mM H ₂ O ₂	3.8	40.8	30.6	22.8	46.4	86.4

^a Intracellular Δ ROS cytoprotective activity has been obtained from the following relation $ROS_{AAM} \text{ with DCF-H}_2\text{O}_2 - ROS_{DCF-H}_2\text{O}_2$ expressed as fluorescence intensity (FI).

The increase of ROS generation should be studied as the extract confers some cytoprotective effect to 3T3 when treated with 2 mM H₂O₂ for 2.5 h but not to HaCaT (Figure 3 and Table 2).

4. Discussion

Many of the active principles used in the treatment of diseases have emerged from ethnomedicinal studies. The correct documentation of medicinal uses is essential before they fall into oblivion [16]. For example, in an ethnopharmacological study of medicinal plant uses in Pakistan, the treatment of measles is documented with an extract of the fronds of *A. capillus-veneris* (Pteridaceae) [10].

To date, different studies have reported antioxidant activity of different fern species [9,31,32], with the PLE being the most studied fern for its antioxidant properties that have been considered useful for the treatment of skin disorders [27,33,34]. The phytochemicals described in PLE are phenolic acids belonging to the hydroxycinnamic acid (*p*-coumaric acid, caffeic acid, chlorogenic acid, and ferulic acid) and benzoic acid (vanillic acid) [35]. In a similar way, our research group determined the polyphenolic profile of the methanolic extract of *Polypodium vulgare* L. fronds (PVM), another fern of the *Polypodiaceae* family, by HPLC-DAD. Among the high number of phenolic acids identified, 3-O-caffeoylquinic acid or chlorogenic acid (hydroxycinnamic acid), a potent antioxidant used in the treatment of oxidative stress and cancer [5], was reported as one of the major constituents [27]. Taken together, these studies indicate that the fronds of *Polypodiaceae* are important reservoirs of polyphenols and related compounds. Therefore, ferns are considered important sources of phytochemical diversity, such as flavonoids [32,36]. The *Aspleniaceae* family, besides being a source of phenolic acids, is also regarded as a source of flavanols, one of the types of flavonoids [37]. In our case, HPLC-MS/MS determination indicates that flavanols are the major flavonoids isolated from AAM, with procyanidin B2 (flavanol) the main flavonoid isolated. Procyanidins are oligomers of catechins that share the structure of flavanols. Catechins and the phytochemicals related to them act directly in the prevention of oxidative stress induced by solar radiation on the skin [38]. Moreover, the described potent antioxidant activity of the flavonoids catechin, epicatechin, and kaempferol is concluded to be the trigger of the chemopreventive activity in melanoma and lung cancer, respectively [39]. In our case, although flavanols are the largest flavonoids in the extract (8.64% total phytochemicals determined), we also find flavonols, which represent 3.96% of total extract and whose main representative is kaempferol-3-glucoside.

Methanol solvent is frequently used to extract flavonoids from fern fronds such as *Lygodium venustum* Sw. (*Lygodiaceae*) [40] and *Asplenium normale* D. Don (*Aspleniaceae*) [41]. However, due to the cytotoxicity of methanol, it must be removed from the extract; otherwise, it could give false positives in cytotoxicity tests [42]. Currently, *in vitro* cytotoxicity tests are the first test to evaluate the biocompatibility of any plant drug for its subsequent use in health-related products [40]. However, one limiting factor for *in vitro* tests is the solubility and penetration of the extract in the target of the structure, which determines

the cellular viability [43]. To avoid that, AAM requires previous ultrasonic agitation before being applied to the cells. Another factor to bear in mind is the bioassay chosen to evaluate the cytotoxic behaviour of phytochemicals. In our case, we evaluated the potential cytotoxicity of AAM by the NRU assay (cellular viability determined by the integrity of the lysosome membrane) and the MTT assay (cellular viability obtained by mitochondrial metabolic activity). Our results indicate that MTT is more sensitive than NRU, and that the extract penetrates the cell and consequently reaches the mitochondria localized in the cytosol [44–46]. However, MTT assay has some disadvantages that are dependent on the cell ability to overcome cell death. For example, the damaged mitochondria may be still able to reduce the tetrazolium salt. To avoid these false positives of the MTT assay, a periodic control of cell structure and density should be carried out [47,48]. The reduced number of cytotoxicity studies together with the complex comparison of bioactivities of fern extracts makes it difficult to compare our results *in vitro* with other studies. Differences in extraction solvent polarity, inconsistency on extract concentrations tested, and numerous cellular viability assays performed among the different studies are some variables that make a reliable comparison difficult.

3T3 is considered a widely used cell line to determine the doses to be tested in subsequent systemic toxicological studies *in vivo* [49]. In cytotoxicity assays, the use of a minimum of two cell lines with different cell origins is recommended. Moreover, the use of 3T3 and HaCaT is frequently combined when characterizing phytochemicals with dermal applications [50,51]. Here, AAM extract induces low cytotoxic effects according to cell viability values obtained with MTT. In a similar way, no cytotoxicity on HaCaT was described for the 2-propanol extract from the fronds of *Ophioglossum vulgatum* L. (*Ophioglossaceae*) and demonstrated healing properties. This extract contains flavonols derived from quercetin and kaempferol [52]. The AAM extract, as the *O. vulgatum* extract, has a representative amount of flavonols, among which are quercetin and kaempferol. However, if in future studies the healing activity of the AAM extract is determined, the flavanols will probably be responsible for this bioactivity as they are the main flavonoids of this extract.

The gallate group, structure of gallic acids, is a powerful antioxidant. However, on certain occasions it alters crucial cellular functions, resulting in cytotoxicity [53]. For example, green tea is a source of catechins and catechin derivatives with the presence of the gallate group catechin gallate. Catechin, as well as its derivatives such as epicatechin, have been shown to have antiproliferative effects in different carcinoma cell lines. In addition, beneficial effects of green tea application on smokers' preneoplastic oral cavity lesions has also been reported [54]. For this reason, it is required to evaluate the cytotoxicity of phytochemicals containing the gallate group in different tumoral and non-tumoral cell lines *in vitro* as a previous step of its potential uses. In our case, the absence or low cytotoxic activity of AAM obtained by the MTT assay in the non-tumoral and tumoral cell lines, rules out the potential cytotoxicity a priori conceived by the content of gallic acid and phytochemicals with gallate group.

Other three ferns from the *Aspleniaceae* family (*Asplenium ceterach* L., *Asplenium scolopendrium* L., and *Asplenium trichomanes* L.) also did not show any cytotoxicity on the lung cancer cell line A549, as described by Petkov, et al. (2021) [55]. However, in the same study, these ferns show a selective cytotoxicity for HeLa cells in contrast to our results. One explanation can be derived from the different phytochemical profile described for these three ferns because they contain flavonols like the AAM extract, but also fatty acids. Petkov, et al. (2021) [55] suggest that their fatty acids composition may contribute to the selective antiproliferative effects on HeLa cells.

Currently, the PLE extract has been described as a powerful chemopreventive agent because of the powerful antioxidant action of its polyphenolic acids. Among these polyphenolic acids, we find different derivatives of cinnamic acid and benzoic acid, such as chlorogenic acid and vanillic acid, respectively. However, derivatives of benzoic acids have a lower antioxidant capacity compared with cinnamic acids because the first group lacks

the -CH=CH-COOH chain, which is the structure that provides the electron donor properties [35]. The main phytochemical and most representative of the big number of phytochemicals determined in AAM by HPLC-MS/MS is chlorogenic acid.

3T3 cells have shown greater sensitivity than HaCaT against AAM in the cytotoxicity and the cytoprotective assays performed. In different studies with flavanol fractions, a greater sensitivity has also been obtained in 3T3 than in HaCaT [50]. The positive controls of the cytoprotection assays have also presented a higher sensitivity in the 3T3 line than in the HaCaT, agreeing with Maier, et al. (1991) [56] who described higher sensitivity of 3T3 to oxidizing and irritating agents than HaCaT. The statistically significant antioxidant *in vitro* protection effects of AAM in the 3T3 cell line confirm our previous studies that indicated good antioxidant capacity determined by the *in chemico* models DPPH, ORAC, and superoxide radicals generated by xanthine/xanthine oxidase [25]. However, we failed to demonstrate this fact in HaCaT cells. Differences between the two cell lines (origin, source, metabolic capacity, among other variables) could explain our findings. When oxidative stress is generated before potential antioxidant treatment, greater cell damage is observed (Figure 4). This fact generally entails a greater cytoprotective effect in the pre-treatment than in the post-treatment, as reported in the case of the *in vitro* protective capacity of the curcumin (curcuminoid) in PC12 (a rat pheochromocytoma cell line) against H₂O₂ [57]. According to outcomes in the cytoprotective assay, the 3T3 cell line was selected for the cellular repair one. For both assays, the protective effects observed were directly related to the concentration of AAM assayed. The greater protection induced by AAM in 3T3 in front H₂O₂ injury in post-treatment than in pre-treatment suggests the need to evaluate the protective mechanisms of this extract. However, open questions remain, and further investigations are still needed as a consequence of the multi-target mechanisms of extracts derived of their phytochemicals content [58].

The phototoxicity assay OECD TG 432 [29], based on the determination of phototoxic substances using the NRU and BALB/c 3T3 cell line, has high sensitivity to identify photosensitive substances failing somehow in some cases and thus reporting false positive results. For this reason, using another cell line, especially a cutaneous cell line, can contribute to minimize the overestimation of phototoxicity reactions. We chose HaCaT cells to be a human keratinocyte cell line and thus complementary to the fibroblast cell line 3T3. The different location and consequently the different function of these cell lines in skin is an adequate combination for analysing phototoxicity [59]. UVA produces different alterations at the cellular level, including disorganization of the cytoskeleton. In a similar way as reported for PLE [60], AAM has not induced phototoxicity under our conditions of UVA irradiation in both cell lines studied. Surprisingly, we observe an increase in cell viability both in non-irradiated and irradiated cells treated with the extract, which is more evident in the case of 3T3 at 0.1 and 1 mg/mL. Comparing these results with those of cytotoxicity, some questions emerge. Experimental conditions of time exposition, media, and temperature can explain such different behaviour. However, further studies at short time exposition could clarify the open questions encountered here. On the other hand, the main flavonoid identified in AAM is procyanidin B2, a key phytochemical in the protection of skin cells exposed to UVB by reducing lipid peroxidation [61].

Mitochondria is the basic structure to generate energy in aerobic organisms, and thus also generating ROS [62]. In physiological situations, endogenous antioxidant systems counteract ROS. However, on certain occasions, the decrease of ROS may be attributed to a decrease of cellular viability, as dead cells no longer generate ROS. This fact may explain the minor ROS production observed for the 3T3 positive control at 2 mM H₂O₂ compared with the corresponding one at 1 mM H₂O₂. Nevertheless, it is necessary to supplement this assumption with cell count assays. It is well known that flavonoids, due to their radical scavenging by an ortho-dihydroxy (catechol) structure in the B ring, 2,3-double bond in conjugation with a 4-oxo function in the C ring and hydroxyl groups at positions 3 and 5 [63–65], have a greater antioxidant capacity than phenolic acids [3]. It is possible that, due to the powerful antioxidant action of our extract on ROS production, a prooxidant effect

could have been generated, and thus an increase in ROS with respect to the corresponding positive controls. Phytochemicals can present different antioxidant behaviour depending on the global phytochemicals of the extract due to synergistic antioxidant actions [66,67], as is the case with the synergistic antioxidant action of (–)-epicatechin and its galloylated derivatives in contact with the flavonols quercetin, kaempferol, and myricetin described for water extracts of white tea [68]. Recently, it has been described that flavanols are the main flavonoids in AAM together with a large amount of mangiferin and mangiferin glucoside, which are both xanthenes. Therefore, Zivkovic, et al. (2020) attributes the *in vitro* antioxidant activity of AAM to the presence of these xanthenes and, consequently, xanthenes are regarded as polyphenolic phytochemicals with high antioxidant activity *in vitro* [69]. In our investigations, we also determined that flavanols are the main flavonoids of AAM, however, we have not analysed the presence or absence of xanthenes in the HPLC-MS/MS. This fact leads us to speculate that the observed antioxidant activity of the AAM extract in the cell lines evaluated is a consequence of the synergistic antioxidant action of the flavanols with the xanthenes, a fact that characterizes AAM as a valuable reservoir of polyphenols.

5. Conclusions

Ferns are considered reservoirs of interesting phytochemicals because of their adaptation to the environment. Many of them are potential candidates for ethnopharmacological studies to contribute to the assessment and conservation of plant biodiversity. Methanolic extracts of *Aspleniaceae adiantum-nigrum* L. fronds are composed by a variety of polyphenols as phenol acids (as chlorogenic acid) and flavanols (as procyanidin B2), which confer the biological activities reported here for the extract. Thus, the cellular repair capacity observed in the 3T3 cells treated with AAM after peroxide insult can be explained by the antioxidant capacity reported in previous studies. In addition, AAM has shown no relevant cytotoxicity in the five cell lines and no phototoxic adverse effects when treated fibroblasts and keratinocytes were exposed to a non-cytotoxic dose of UVA light. These observations, together with its capacity to inhibit tyrosinase enzyme, open the possibility of using AAM in cosmetic formulations as ingredients in sunscreens or hyperpigmentation treatments, but also in pharmaceutical preparations for wound healing. Therefore, the cellular mechanisms and specific phytochemicals involved in such activities should be further investigated.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/horticulturae8090815/s1>, Figure S1: Cytoprotective activity of AAM in 3T3 (A) and HaCaT (B) cell lines for 1 mM H₂O₂ during 2.5 h by MTT assay and expressed as percentage of cell viability respect to untreated cells; Table S1: HPLC-MS/MS acquisition parameters (dynamic-MRM mode) used for the analysis of the 38 marker compounds.

Author Contributions: Conceptualization M.M. and V.L.; methodology, A.F., M.M. and F.M.; analysis, A.F., F.M., G.C. and M.M.; investigation, A.F., M.M. and V.L.; resources, M.M., M.P.V. and V.L.; writing—original draft preparation, A.F.; writing—review and editing, M.M. and V.L.; supervision, M.M. and V.L.; funding acquisition M.M. and M.P.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was financially supported by project 307,629 of Fundació Bosch & Gimpera—Universitat de Barcelona.

Acknowledgments: We acknowledge the technical support of Universitat de Barcelona and Universidad San Jorge.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

3T3 = NIH 3T3	NIH 3T3 mouse fibroblast cell line
A549	Human Caucasian lung carcinoma
AAM	Methanolic extract of <i>Asplenium adiantum-nigrum</i> L. fronds
CO₂	Carbon dioxide
CPZ	Chlorpromazine hydrochloride
CV	Cell Viability
E	Ultraviolet dose
DCF	2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FBS	Fetal Bovine Serum
FI	Fluorescence Intensity
HaCaT	Spontaneously immortalized human keratinocyte cell line
HeLa	Human cervix epitheloid carcinoma
HepG2	Human Caucasian hepatocyte carcinoma
HPLC-MS/MS	High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry
H₂O₂	Hydrogen peroxide
MTT	2,5-diphenyl-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) tetrazolium bromide
NR	Neutral Red
NRU	Neutral Red Uptake
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
PBS	Phosphate Buffered Saline
PLE	Aqueous extract of <i>Polypodium leucotomos</i> fronds
PVM	Methanolic extract of <i>Polypodium vulgare</i> L. fronds
ROS	Reactive Oxygen Species
UV	Ultraviolet
UVA	Ultraviolet A
WHO	World Health Organization

References

- Sies, H.; Jones, D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 363–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sharifi-Rad, M.; Kumar, N.V.A.; Zucca, P.; Varoni, E.M.; Dini, L.; Panzarini, E.; Rajkovic, J.; Fokou, P.V.T.; Azzini, E.; Peluso, I.; et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Leopoldini, M.; Russo, N.; Toscano, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* **2011**, *125*, 288–306. [[CrossRef](#)]
- Dzialis, M.; Mierziak, J.; Korzun, U.; Preisner, M.; Szopa, J.; Kulma, A. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 41. [[CrossRef](#)]
- Fatima, N.; Baqri, S.S.R.; Alsulimani, A.; Fagoonee, S.; Slama, P.; Kesari, K.K.; Roychoudhury, S.; Haque, S. Phytochemicals from Indian Ethnomedicines: Promising Prospects for the Management of Oxidative Stress and Cancer. *Antioxidants* **2021**, *10*, 28. [[CrossRef](#)]
- Reinaldo, R.; Santiago, A.C.P.; Medeiros, P.M.; Albuquerque, U.P. Do ferns and lycophytes function as medicinal plants? A study of their low representation in traditional pharmacopoeias. *J. Ethnopharmacol.* **2015**, *175*, 39–47. [[CrossRef](#)]
- Upreti, K.; Jalal, J.S.; Tewari, L.M.; Joshi, G.C.; Pangtey, Y.P.S.; Tewari, G. Ethnomedicinal uses of *Pteridophytes* of Kumaun Himalaya, Uttarakhand, India. *J. Am. Sci.* **2009**, *5*, 4.
- Singh, S.; Kharkwal, K.; Kant, R.; Sinha, B.K.; Ambrish, K. Studies on Ethnobotanical aspects of Pteridophytes in Great Himalayan National Park, Kullu, Himachal Pradesh. *Phytotaxonomy* **2017**, *17*, 43–49.
- Chang, H.-C.; Huang, G.-J.; Agrawal, D.C.; Kuo, C.-L.; Wu, C.-R.; Tsay, H.-S. Antioxidant activities and polyphenol contents of six folk medicinal ferns used as "Gusuibu". *Bot. Stud.* **2007**, *48*, 397–406.
- Abbasi, A.M.; Khan, M.A.; Ahmad, M.; Zafar, M.; Jahan, S.; Sultana, S. Ethnopharmacological application of medicinal plants to cure skin diseases and in folk cosmetics among the tribal communities of North-West Frontier Province, Pakistan. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *128*, 322–335. [[CrossRef](#)]

11. González, S.; Gilaberte, Y.; Philips, N. Mechanistic insights in the use of a *Polypodium leucotomos* extract as an oral and topical photoprotective agent. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2010**, *9*, 559–563. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Parrado, C.; Mascaraque, M.; Gilaberte, Y.; Juarranz, A.; Gonzalez, S. Fernblock (*Polypodium leucotomos* Extract): Molecular Mechanisms and Pleiotropic Effects in Light-Related Skin Conditions, Photoaging and Skin Cancers, a Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 1026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Langhansova, L.; Pumprova, K.; Haisel, D.; Ekrt, L.; Pavicic, A.; Zajickova, M.; Vanek, T.; Dvorakova, M. European ferns as rich sources of antioxidants in the human diet. *Food Chem.* **2021**, *356*, 129637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dvorakova, M.; Pumprova, K.; Antoninova, Z.; Rezek, J.; Haisel, D.; Ekrt, L.; Vanek, T.; Langhansova, L. Nutritional and Antioxidant Potential of Fiddleheads from European Ferns. *Foods* **2021**, *10*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Moreno Saiz, J.C.; Pataro, L.; Pajaron Sotomayor, S. Atlas of the pteridophytes of the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Acta Bot. Malacit.* **2015**, *40*, 5–55.
16. Akerreta, S.; Calvo, M.I.; Cavero, R.Y. Ethnoveterinary knowledge in Navarra (Iberian Peninsula). *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *130*, 369–378. [[CrossRef](#)]
17. Bonet, M.À.; Vallès, J. Ethnobotany of Montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula): Plants used in veterinary medicine. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *110*, 130–147. [[CrossRef](#)]
18. Bonet, M.À.; Agelet, A.; Vallès, J.; Villar Pérez, L. Contribution à la connaissance ethnobotanique des ptéridophytes dans les Pyrénées. *Bocconea* **2001**, *13*, 605–612.
19. TheWorldFloraOnline. *Asplenium adiantum-nigrum* L. Available online: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0001109303> (accessed on 13 June 2022).
20. Smith, A.R.; Pryer, K.M.; Schuettpelz, E.; Korall, P.; Schneider, H.; Wolf, P.G. A classification for extant ferns. *Taxon* **2006**, *55*, 705–731. [[CrossRef](#)]
21. Bonet Galobart, M.À.; Vallès Xirau, J. Etnobotànica del Montseny: Valoració i comparació d’alguns aspectes. In *Plantes, Remeis i Cultura Popular Del Montseny-Etnobotànica d’una Reserva de la Biosfera*; Brau, Ed.; Brau: Figueres, Spain, 2006; pp. 651–722.
22. Corsi, G.; Gaspari, G.; Pagni, A.M. L’uso delle piante nell’economia domestica della Versilia collinare e montana. *Atti Della Soc. Toscana Sci. Nat. Mem. Ser. B* **1980**, *87*, 309–386.
23. Zeng, W.W.; Lai, L.S. Multiple-physiological benefits of bird’s nest fern (*Asplenium australasicum*) frond extract for dermatological applications. *Nat. Prod. Res.* **2017**, *33*, 736–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Font Castell, X.; de Càceres, M.; Quadrada, R.; Moreno, J.; Martí, D. Banco de Datos de Biodiversidad de Cataluña. 2015. Available online: <http://biodiver.bio.ub.es/biocat/index.jsp> (accessed on 25 May 2017).
25. Farràs, A.; Cásedas, G.; Les, F.; Terrado, E.M.; Mitjans, M.; López, V. Evaluation of Anti-Tyrosinase and Antioxidant Properties of Four Fern Species for Potential Cosmetic Applications. *Forests* **2019**, *10*, 14. [[CrossRef](#)]
26. Mustafa, A.M.; Angeloni, S.; Abouelenein, D.; Acquaticci, L.; Xiao, J.B.; Sagratini, G.; Maggi, F.; Vittori, S.; Caprioli, G. A new HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 36 polyphenols in blueberry, strawberry and their commercial products and determination of antioxidant activity. *Food Chem.* **2022**, *367*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Farràs, A.; Mitjans, M.; Maggi, F.; Caprioli, G.; Vinardell, M.P.; López, V. *Polypodium vulgare* L. (*Polypodiaceae*) as a Source of Bioactive Compounds: Polyphenolic Profile, Cytotoxicity and Cytoprotective Properties in Different Cell Lines. *Front. Pharmacol.* **2021**, *12*, 15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Cásedas, G.; Les, F.; Choya-Foces, C.; Hugo, M.; López, V. The Metabolite Urolithin-A Ameliorates Oxidative Stress in Neuro-2a Cells, Becoming a Potential Neuroprotective Agent. *Antioxidants* **2020**, *9*, 16. [[CrossRef](#)]
29. OECD. OECD test No. 432: In vitro 3T3 NRU phototoxicity test. In *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*; Organization for Economic Cooperation and Development (OECD): Paris, France, 2019. [[CrossRef](#)]
30. Ferreira, I.; Silva, A.; Martins, J.D.; Neves, B.M.; Cruz, M.T. Nature and kinetics of redox imbalance triggered by respiratory and skin chemical sensitizers on the human monocytic cell line THP-1. *Redox Biol.* **2018**, *16*, 75–86. [[CrossRef](#)]
31. Ding, Z.T.; Fang, Y.S.; Tai, Z.G.; Yang, M.H.; Xu, Y.Q.; Li, F.; Cao, Q.E. Phenolic content and radical scavenging capacity of 31 species of ferns. *Fitoterapia* **2008**, *79*, 581–583. [[CrossRef](#)]
32. Xia, X.; Cao, J.G.; Zheng, Y.X.; Wang, Q.X.; Xiao, J.B. Flavonoid concentrations and bioactivity of flavonoid extracts from 19 species of ferns from China. *Ind. Crops Prod.* **2014**, *58*, 91–98. [[CrossRef](#)]
33. García, F.; Pivel, J.P.; Guerrero, A.; Brieva, A.; Martínez-Alcázar, M.; Caamaño-Somoza, M.; González, S. Phenolic components and antioxidant activity of Fernblock[®], an aqueous extract of the aerial parts of the fern *Polypodium leucotomos*. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **2006**, *28*, 157–160. [[CrossRef](#)]
34. Palomino, O.M. Current knowledge in *Polypodium leucotomos* effect on skin protection. *Arch. Dermatol. Res.* **2014**, *307*, 199–209. [[CrossRef](#)]
35. Gombau, L.; Garcia, F.; Lahoz, A.; Fabre, M.; Roda-Navarro, P.; Majano, P.; Alonso-Lebrero, J.L.; Pivel, J.P.; Castell, J.V.; Gomez-Lechon, M.J.; et al. *Polypodium leucotomos* extract: Antioxidant activity and disposition. *Toxicol. Vitro.* **2006**, *20*, 464–471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tomsík, P. Ferns and Lycopods—A Potential Treasury of Anticancer Agents but Also a Carcinogenic Hazard. *Phytother. Res.* **2014**, *28*, 798–810. [[CrossRef](#)]
37. Iwashina, T.; Matsumoto, S. Flavonoid Properties of Six *Asplenium* Species in Vanuatu and New Caledonia, and Distribution of Flavonoid and Related Compounds in *Asplenium*. *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci. Ser. B.* **2011**, *37*, 133–145.

38. Bae, J.; Nayoung, K.; Yunyoung, S.; Soo-Yeon, K.; You-Jeong, K. Activity of catechins and their applications. *Biomed. Dermatol.* **2020**, *4*, 1–10. [[CrossRef](#)]
39. Asensi, M.; Ortega, A.; Mena, S.; Feddi, F.; Estrela, J.M. Natural polyphenols in cancer therapy. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2011**, *48*, 197–216. [[CrossRef](#)]
40. Morais-Braga, M.F.B.; Souza, T.M.; Santos, K.K.A.; Guedes, G.M.M.; Andrade, J.C.; Vega, C.; Rolón, M.; Costa, J.G.M.; Saraiva, A.A.F.; Coutinho, H.D.M. Phenol composition, cytotoxic and anti-kinetoplastidae activities of *Lygodium venustum* SW. (Lygodiaceae). *Exp. Parasitol.* **2013**, *134*, 178–182. [[CrossRef](#)]
41. Iwashina, T.; Matsumoto, S.; Ozawa, K.; Akuzawa, K. Flavone Glycosides from *Asplenium Normale*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 3543–3546. [[CrossRef](#)]
42. Alam, M.N.; Bristi, N.J.; Rafiquzzaman, M. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm. J.* **2013**, *21*, 143–152. [[CrossRef](#)]
43. Sun, C.L.; Wu, Z.S.; Wang, Z.Y.; Zhang, H.C. Effect of Ethanol/Water Solvents on Phenolic Profiles and Antioxidant Properties of Beijing Propolis Extracts. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2015**, *2015*, 9. [[CrossRef](#)]
44. Nogueira, D.R.; Mitjans, M.; Infante, M.R.; Vinardell, M.P. Comparative sensitivity of tumor and non-tumor cell lines as a reliable approach for *in vitro* cytotoxicity screening of lysine-based surfactants with potential pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* **2011**, *420*, 51–58. [[CrossRef](#)]
45. Clothier, R.; Gómez-Lechón, M.J.; Kinsner-Ovaskainen, A.; Kopp-Schneider, A.; O'Connor, J.E.; Prieto, P.; Stanzel, S. Comparative analysis of eight cytotoxicity assays evaluated within the ACuteTox Project. *Toxicol. Vitro.* **2013**, *27*, 1347–1356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bacanlı, M.; Anlar, H.G.; Başaran, A.A.; Başaran, N. Assessment of Cytotoxicity Profiles of Different Phytochemicals: Comparison of Neutral Red and MTT Assays in Different Cells in Different Time Periods. *Turk. J. Pharm. Sci.* **2017**, *14*, 95–107. [[CrossRef](#)]
47. Van Tonder, A.; Joubert, A.M.; Cromarty, A.D. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res. Notes* **2015**, *8*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Karakas, D.; Ari, F.; Ulukaya, E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turk. J. Biol.* **2017**, *41*, 919–925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Stokes, W.S.; Casati, S.; Strickland, J.; Paris, M. Neutral red uptake cytotoxicity tests for estimating starting doses for acute oral toxicity tests. *Curr. Protoc. Toxicol.* **2008**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Ugartondo, V.; Mitjans, M.; Torres, J.L.; Vinardell, M.P. Biobased Epicatechin Conjugates Protect Erythrocytes and Nontumoral Cell Lines from H₂O₂-Induced Oxidative Stress. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4459–4465. [[CrossRef](#)]
51. Dutta, D.; Markhoff, J.; Suter, N.; Rezwani, K.; Brüggemann, D. Effect of Collagen Nanofibers and Silanization on the Interaction of HaCaT Keratinocytes and 3T3 Fibroblasts with Alumina Nanopores. *Acs Appl. Bio Mater.* **2021**, *4*, 1852–1862. [[CrossRef](#)]
52. Clericuzio, M.; Burlando, B.; Gandini, G.; Tinello, S.; Ranzato, E.; Martinotti, S.; Cornara, L. Keratinocyte wound healing activity of galactoglycerolipids from the fern *Ophioglossum vulgatum* L. *J. Nat. Med.* **2014**, *68*, 31–37. [[CrossRef](#)]
53. Ugartondo, V.; Mitjans, M.; Tourino, S.; Torres, J.L.; Vinardell, M.P. Comparative Antioxidant and Cytotoxic Effect of Procyanidin Fractions from Grape and Pine. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, *20*, 1543–1548. [[CrossRef](#)]
54. Babich, H.; Zuckerbraun, H.L.; Weinerman, S.M. In vitro cytotoxicity of (-)-catechin gallate, a minor polyphenol in green tea. *Toxicol. Lett.* **2007**, *171*, 171–180. [[CrossRef](#)]
55. Petkov, V.; Batsalova, T.; Stoyanov, P.; Mladenova, T.; Kolchakova, D.; Argirova, M.; Raycheva, T.; Dzhambazov, B. Selective Anticancer Properties, Proapoptotic and Antibacterial Potential of Three *Asplenium* Species. *Plants* **2021**, *10*, 14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Maier, K.; Schmittlandgraf, R.; Siegemund, B. Development of an in Vitro Test System with Human Skin Cells for Evaluation of Phototoxicity. *Toxicol. Vitro.* **1991**, *5*, 457–461. [[CrossRef](#)]
57. Siddiqui, M.A.; Kashyap, M.P.; Kumar, V.; Tripathi, V.K.; Khanna, V.K.; Yadav, S.; Pant, A.B. Differential protection of pre-, co- and post-treatment of curcumin against hydrogen peroxide in PC12 cells. *Hum. Exp. Toxicol.* **2011**, *30*, 192–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Efferth, T.; Koch, E. Complex Interactions between Phytochemicals. The Multi-Target Therapeutic Concept of Phytotherapy. *Curr. Drug Targets* **2011**, *12*, 122–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Liang, Q.; Wang, F.; Xiao, M. Comparison of Phototoxicity Sensitivity by the Neutral Red Uptake Method for BALB/c 3T3, HaCaT, and HDFa Cells In Vitro. *Innov. Digit. Health Diagn. Biomark.* **2021**, *2*, 7. [[CrossRef](#)]
60. Alonso-Lebrero, J.L.; Dominguez-Jimenez, C.; Tejedor, R.; Brieva, A.; Pivel, J.P. Photoprotective properties of a hydrophilic extract of the fern *Polypodium leucotomos* on human skin cells. *J. Photochem. Photobiol. B-Biol.* **2003**, *70*, 31–37. [[CrossRef](#)]
61. Dasiman, R.; Nor, N.M.; Eshak, Z.; Mutalip, S.S.M.; Suwandi, N.R.; Bidin, H. A Review of Procyanidin: Updates on Current Bioactivities and Potential Health Benefits. *Biointerface Res. Appl. Chem.* **2022**, *12*, 5918–5940. [[CrossRef](#)]
62. Napolitano, G.; Fasciolo, G.; Venditti, P. Mitochondrial Management of Reactive Oxygen Species. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1824. [[CrossRef](#)]
63. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Erratum: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids (Free Radical Biology and Medicine (1996) 20 (933–956)). *Free. Radic. Biol. Med.* **1996**, *21*, 417. [[CrossRef](#)]
64. Procházková, D.; Boušová, I.; Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 513–523. [[CrossRef](#)]

65. Wen, L.R.; He, J.R.; Wu, D.; Jiang, Y.M.; Prasad, K.N.; Zhao, M.M.; Lin, S.; Jiang, G.X.; Luo, W.; Yang, B. Identification of sesquignans in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) leaf and their anticancer activities. *J. Funct. Foods* **2014**, *8*, 26–34. [[CrossRef](#)]
66. Carocho, M.; Ferreira, I. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *51*, 15–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Giordano, M.E.; Caricato, R.; Lionetto, M.G. Concentration Dependence of the Antioxidant and Prooxidant Activity of Trolox in HeLa Cells: Involvement in the Induction of Apoptotic Volume Decrease. *Antioxidants* **2020**, *9*, 12. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Yen, W.-J.; Chyau, C.-C.; Lee, C.-P.; Chu, H.-L.; Chang, L.-W.; Duh, P.-D. Cytoprotective effect of white tea against H₂O₂-induced oxidative stress *in vitro*. *Food Chem.* **2013**, *141*, 4107–4114. [[CrossRef](#)]
69. Zivkovic, S.; Milutinovic, M.; Maksimovi, V.; Ciric, A.; Ivanov, M.; Bozunovic, J.; Banjanac, T.; Mistic, D. Antioxidant and antimicrobial activity of two *Asplenium* species. *South Afr. J. Bot.* **2020**, *132*, 180–187. [[CrossRef](#)]

Publicación 4 → Exploring wild *Aspleniaceae* ferns as safety sources of polyphenols: The case of *Asplenium* *trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd.

DOI

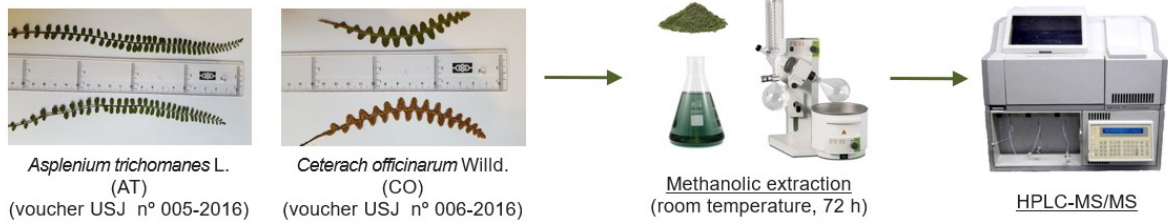
10.3389/fnut.2022.994215

Resumen

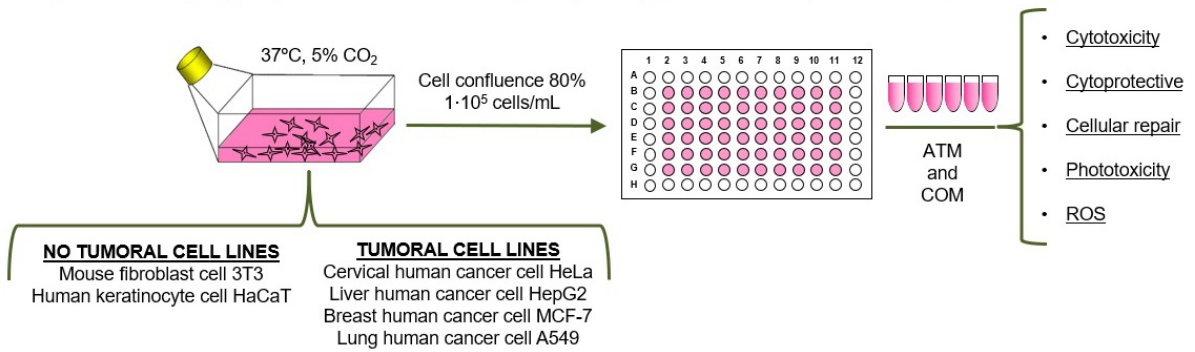
El ecosistema forestal es una fuente de recursos materiales utilizados desde la antigüedad por la humanidad. Los helechos forman parte de diferentes sistemas orientales de medicina tradicional debido a la variedad de fitoquímicos de sus frondes, lo que ha permitido validar su uso tradicional a través de estudios etnofarmacológicos. En Europa, diferentes culturas han utilizado el mismo helecho con una gran variedad de aplicaciones debido a su presencia en la mayoría de los bosques Europeos. En los últimos años se han publicado estudios sobre la fitocaracterización y actividad biológica de las frondes de los principales helechos Europeos. En este estudio, se evaluó la presencia de fitoquímicos fenólicos mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplado a un detector de espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) de las frondes de dos helechos silvestres junto con actividades *in vitro* en líneas celulares no tumorales y en líneas celulares tumorales humanas. Los polifenoles se extrajeron de *Asplenium trichomanes* L. y *Ceterach officinarum* Willd. por maceración en frío en metanol. Los principales fitoquímicos de origen fenólico en los extractos de *A. trichomanes* y *C. officinarum* determinados por HPLC-MS/MS fueron el flavonol hiperósido y el ácido fenólico ácido clorogénico, respectivamente. Esta diferente naturaleza fenólica de ambos extractos contribuye a la divergencia del comportamiento experimentado en las actividades biológicas ensayadas, pero ninguno de los extractos mostró un perfil citotóxico o fototóxico en las diferentes líneas celulares ensayadas. Sin embargo, los valores citoprotectores frente al estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en las líneas celulares 3T3 y HaCaT posicionan estos extractos como posibles candidatos para futuras aplicaciones en salud.

Resumen gráfico

Methanolic extraction and polyphenolic profile



Cytotoxicity, cytoprotective, cellular repair, phototoxicity and ROS activity





OPEN ACCESS

EDITED BY

Márcio Caroch,
Centro de Investigação de Montanha
(CIMO), Portugal

REVIEWED BY

Gokhan Zengin,
Selcuk University, Turkey
Uroš M. Gašić,
University of Belgrade, Serbia
Harald Schneider,
Xishuangbanna Tropical Botanical
Garden (CAS), China

*CORRESPONDENCE

Victor López
ilopez@usj.es

SPECIALTY SECTION

This article was submitted to
Food Chemistry,
a section of the journal
Frontiers in Nutrition

RECEIVED 14 July 2022

ACCEPTED 04 August 2022

PUBLISHED 12 September 2022

CITATION

Farràs A, Mitjans M, Maggi F, Caprioli G,
Vinardell MP and López V (2022)
Exploring wild *Aspleniaceae* ferns as
safety sources of polyphenols:
The case of *Asplenium trichomanes* L.
and *Ceterach officinarum* Willd.
Front. Nutr. 9:994215.
doi: 10.3389/fnut.2022.994215

COPYRIGHT

© 2022 Farràs, Mitjans, Maggi, Caprioli,
Vinardell and López. This is an
open-access article distributed under
the terms of the [Creative Commons
Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the
original author(s) and the copyright
owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is
cited, in accordance with accepted
academic practice. No use, distribution
or reproduction is permitted which
does not comply with these terms.

Exploring wild *Aspleniaceae* ferns as safety sources of polyphenols: The case of *Asplenium trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd.

Adrià Farràs^{1,2}, Montserrat Mitjans¹, Filippo Maggi³,
Giovanni Caprioli³, María Pilar Vinardell¹ and Víctor López^{2,4*}

¹Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ²Department of Pharmacy, Faculty of Health Sciences, Universidad San Jorge, Zaragoza, Spain, ³School of Pharmacy, Università di Camerino, Camerino, Italy, ⁴Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, CITA-Universidad de Zaragoza, Zaragoza, Spain

The forest ecosystem is a source of material resources used since ancient times by mankind. Ferns are part of different oriental systems of traditional medicine due to the phytochemical variety of their fronds, which have allowed their traditional use to be validated through ethnopharmacological studies. In Europe, different cultures have used the same fern with a wide variety of applications due to its presence in most European forests. In recent years, studies on the phytocharacterization and biological activity of the fronds of the main European ferns have been published. In this study, the presence of polyphenolic phytochemicals has been evaluated by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) in the fronds of two wild ferns together with *in vitro* activities in non-tumoral and human tumoral cell lines. The polyphenols were extracted from *Asplenium trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd. by cold maceration using methanol. The main phytochemicals of polyphenolic origin in the extracts of *A. trichomanes* and *C. officinarum* determined by HPLC-MS/MS were the flavonol hyperoside and the phenolic acid chlorogenic acid, respectively. This different polyphenolic nature of both extracts contributes to the divergence of the behavior experienced in the biological activities tested, but none of the extracts showed a cytotoxic or phototoxic profile in the different tested cell lines. However, the cytoprotective values in front of the H₂O₂ oxidative stress induced in the 3T3 and HaCaT cell lines position these extracts as possible candidates for future health applications.

KEYWORDS

bioeconomy, cytoprotection, cytotoxicity, ethnopharmacology, ferns, functional food, polyphenolic phytochemicals

Introduction

Currently, in most countries, forest management is oriented to obtain wood resources. However, in the last decade, there has been an increase in the demand for natural food production, and the global food demand for 2050 is predicted to triplicate the actual demand. Forests may be one via to ensure the food and nutritional security of the population according to the World Food Security (1), especially in industrialized societies due to its lower relationship with nature than rural societies. Bioeconomy is the discipline that covers all activities related to the production, use, and transformation of bioresources, and their functions and principles, among which we find food production, animal feed, and the generation of products, energy, and services (2). Currently, the European Commission's concept of the bioeconomy incorporates sustainability and circularity with the aim of being respectful with the environment. The food plant resource is one of the main branches of innovations in the bioeconomy due to the broad spectrum of macronutrients and micronutrients in plants compared to foods from animal sources (3).

Pteridophytes (from Greek *pteron*, meaning “wing” and *phyton*, meaning “plants”) are the tracheophyta plants with an authentic development of the vascular system and that reproduces sexually by spores (4). Currently, the potential uses of ferns are underestimated as only the properties of a small number of the around 13,000 species of ferns have been studied (5). In 2017, Cao et al. (6) published a review of the valuable reservoir of phytochemicals with the corresponding properties, among which antioxidant, anticancer, antimicrobial, and anti-inflammatory activities have been demonstrated.

Literature reviewing the uses of ferns is irregular worldwide. The continents with the highest number of records in decreasing order are Asia-Tropical, South America, and Asia-Temperate. Nevertheless, Asia-Tropical has approximately three times more reviewed literature uses of ferns than South America (7). Ferns are currently considered a source of polar phytochemicals as phenolic acids and flavonoids with therapeutic and nutritional value in eastern countries, especially in Nepal, India, and China (8–10). This is the case of some ferns described in the traditional Chinese medicine, as the case of *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (*Dennstaedtiaceae*) (10). In addition, the presence of non-polar phytochemicals, such as fatty acids and lipids, has also been described in ferns (11).

Because of the limitations of the floral bioindicator methodology of Ellenberg values, the need for new ecological bioindicators is derived (12). Ferns are susceptible to little environmental changes, and this taxon is positioning itself as an important ecological indicator, as reported in an ecological indicator study in Mexico (13). In Europe, one of the most important families of ferns is the *Aspleniaceae* family (14), particularly at the Mediterranean coast characterized by its moderated temperatures and high humidity (15). The

phenotype studies classified as *Aspleniaceae* family (from Greek *a*, meaning “without” and *splen*, derive to “spleen” in reference to its use to treat ailments of that organ), known as “spleenwort,” in the eupolypods II group (16, 17). The sporophytes of this taxon are reported in different forms, but they have the common character to be epipetric ferns. Because they grow in rock habits they are also popularly known as “rock ferns”. Nowadays, in some areas of Europe, the *Pteridophytes* distribution has been characterized as the case of Sicily (18). In Spain, researchers have determined the distribution of Iberian Peninsula ferns (19), that is, the case of the *Banco de Datos de Biodiversidad de Cataluña* (20), being the *Asplenium trichomanes* L. (*Aspleniaceae*) (21) and *Ceterach officinarum* Willd. (*Aspleniaceae*) (22) the predominant fern species in the Prades mountains (Tarragona, Spain). *Asplenium ceterach* L. is a synonym name of *Ceterach officinarum* Willd.

The sporophyte is the principal characteristic part in the identification taxonomy of ferns (23). The *A. trichomanes* and *C. officinarum* fronds present different morphological features that facilitate the difference between both species, as shown in **Image 1**. The frond of *A. trichomanes* has a long black petiole with parallel oval pinnae not directly united with the rachis. While the frond of *C. officinarum* has a short petiole with the pinnae attached directly to the rachis alternately forming a saw. In addition, the sori of *C. officinarum* has the characteristic of being covered with reddish scales on the underside frond (24). Through the ambivalence of the Latin names used in the past text and the different names attributed to the same plant in different regions, *A. trichomanes* has been sometimes confused with another *Aspleniaceae* ferns as *C. officinarum* (16).

In Catalonia, the popular name of *A. trichomanes* is *falzia vermella* and for *C. officinarum* is *dauradella* (24). In English literature, these ferns are popularly known as “maidenhair spleenwort” for *A. trichomanes* (25) and “golden herb” for *C. officinarum* (26). Previous studies have considered the fronds of *A. trichomanes* and *C. officinarum* as reservoirs of flavonols (kaempferol and its glycosides) (27) and cinnamic acids (as chlorogenic acid) (28), respectively. The fact that leads to position these ferns as valuable resources of polyphenolic phytochemicals for nutritional applications. The reported traditional uses of *A. trichomanes* and *C. officinarum* in Pyrenees have been used for respiratory tract diseases. The fronds tisane from both ferns has been used for its anticatarrhal properties and specifically *A. trichomanes* as an antitussive (29, 30). These ethnopharmacological studies highlight the presence of phytochemicals in both species of these two active ferns against respiratory tract infectious diseases. Positioning both ferns as possible functional foods in the prevention of colds (31). Other described uses of the fronds of *A. trichomanes* are for the treatment of alopecia and kidney stones (16). In the case of the fronds of *C. officinarum*, in Catalonia, it has also been described as a vasotonic (32) in *Alt Empordà* and for the treatment of cold sores in the Prades mountains (33).

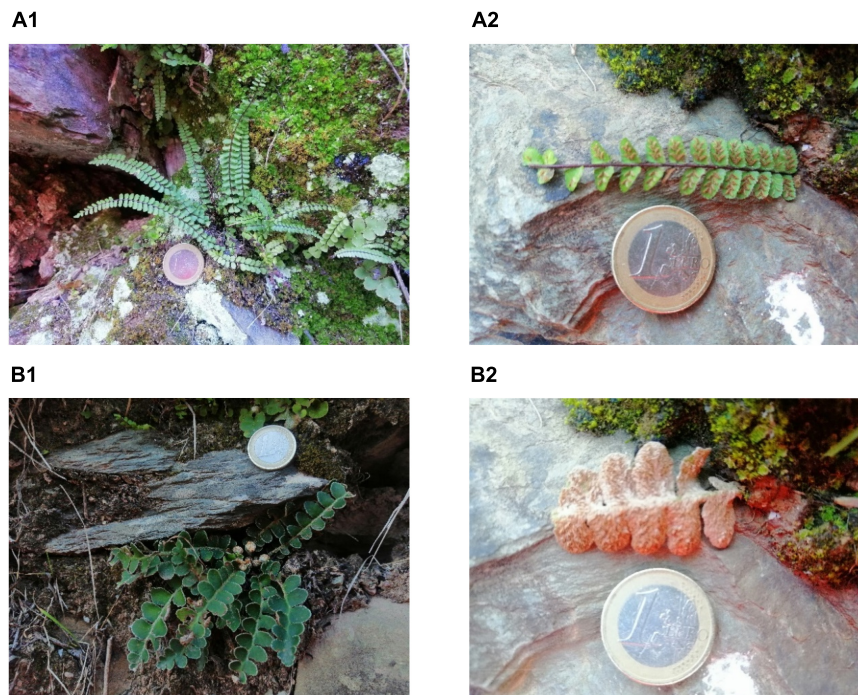


IMAGE 1

Face fronds (1) and underside frond (2) of fresh *Asplenium trichomanes* L. (*Aspleniaceae*) (A) and fresh *Ceterach officinarum* Willd. (*Aspleniaceae*) (B) by Adrià Farràs at Prades mountains. The euro coin refers the dimension of the frond (A2, B2).

In this article prior to the study of the *in vitro* activity against situations of oxidative stress of the methanolic extracts of *A. trichomanes* fronds (ATM) and *C. officinarum* fronds (COM) harvested in the Prades mountains, we have evaluated the cytotoxicity and phytocharacterization of both extracts.

Materials and methods

Chemicals and reagents

Sigma-Aldrich (Milan, Italy) served 36 analytical standards (which were gallic acid, neochlorogenic acid, chlorogenic acid, p-hydroxybenzoic acid, 3-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, vanillic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ferulic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, ellagic acid, delphinidin-3,5-diglucoside, delphinidin-3-galactoside, cyanidin-3-glucoside, petunidin-3-glucoside, pelargonidin-3-rutinoside, pelargonidin-3-glucoside, malvidin-3-galactoside, rutin, isoquercitrin, quercitrin, myricetin, isorhamnetin, hyperoside, kaempferol, catechin, epicatechin, procyanidin B2, procyanidin A2, phloridzin, phloretin, hesperidin, naringin, resveratrol, and trans-cinnamic acid) of the 38 phytochemicals, determined by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). While kaempferol-3-glucoside and quercetin were served by PhytoLab (Vestenbergsgreuth,

Germany). The 1,000 mg/mL concentration was used for each stock solution. In which the pure references substance was dissolved by HPLC-grade methanol and then stored at 5°C in glass vials until the evaluation. The HPLC-grade methanol was also used to prepare the diluting stock solutions for the working solutions. The HPLC-grade methanol and formic acid (99% concentration) was informed by Sigma-Aldrich and Merck, respectively. A 0.2 µm polyamide filters, which were used to filter all liquids, were administered by Sartorius Stedim provided (Goettingen, Germany). Before injecting into the HPLC, all samples were filtered by Phenex™ RC 4 mm 0.2 µm syringeless filters (Phenomenex, located in Castel Maggiore, BO, Italy). The ultrapure water (resistivity of >18 MΩ cm) was obtained by A Milli-Q SP Reagent Water System (Millipore, Bedford, MA, United States). The coolant trypan blue (0.4%) dye was obtained and was expedited from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). The reactive viability thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO) solvent, the marker 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF), and photosensitivity chlorpromazine hydrochloride (CPZ, CAS No. 69-09-0) also were supplied by Sigma-Aldrich. The products to maintain proper cell growth except for the HyClone fetal bovine serum (FBS) were purchased from Thermo Scientific (Northumberland, United Kingdom). These products were Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with and without phenol red, phosphate-buffered saline (PBS),

L-glutamine solution (200 mM), and penicillin–streptomycin solution (10,000 U/mL penicillin and 10 mg/mL streptomycin) were supplied by Lonza (Verviers, Belgium). This distributor also provides the trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution (170,000 U/L trypsin and 0.2 g/L EDTA). The TPP (Trasadingen, Switzerland) supplemented the 75 cm² culture flasks and 96-well plates.

Plant material

After we verified that *A. trichomanes* L. and *C. officinarum* Willd. were located at Prades mountains 41°17'34''N 1°02'42''E geographical coordinates (Tarragona, Spain) by *Banco de Datos de Biodiversidad de Cataluña* (20), the fronds of these ferns were harvested from this area. We obtained a dried voucher stored at Herbarium of Universidad San Jorge (Zaragoza, Spain), *A. trichomanes* L. with the voucher n° 005-2016 and *C. officinarum* Willd. with the voucher n° 006-2016. These ferns were authenticated by Dr. J.A. Vicente Orellana from Universidad CEU San Pablo (Madrid, Spain) using botanical keys.

Preparation of methanolic extract of *Asplenium trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd. fronds

Once we obtained the dried powdered fronds, these parts were macerated with methanol for 24 h at room temperature. The result was a methanolic extract which was filtered by Whatman N°4 filter paper and evaporated using a rotatory evaporator with a thermostatic bath at 30°C to eliminate the solvent. This process was repeated three times until exhaustion of the plant material. This process is described by us in a previous publication (34). The extracts were kept at –20°C until experimental bioassays. The samples were dissolved in methanol for HPLC analysis or in a culture medium for cell experiments.

Polyphenol characterization in the methanolic extract of *Asplenium trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd. fronds by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

The quantification of all phytochemicals determined was performed using a modified version of our prior designed assay (35). The Agilent 1290 Infinity series and a Triple Quadrupole 6420 bought from Agilent Technology located in Santa Clara

(CA, United States) were used to perform the HPLC-MS/MS and linked to an electrospray ionization (ESI) source that operated in negative and positive ionization modes. Using Optimizer Software, the MS/MS parameters of each standard were optimized by using flow injection analysis (FIA). The isolation of phenolic compounds was obtained by the following methodology: a direct injection of diluted sample (1:5) using gradient elution mode on a Phenomenex Synergi Polar–RP C18 column (250 mm × 4.6 mm, 4 μm) using a mixture of water and methanol as solvents A and B, respectively, both with 0.1% formic acid (starting ratio is 80% A and 20% B). For column protection, a polar RP security guard cartridge preceded the column (4 mm × 3 mm ID). The mobile phase composition was a mixture of the following components: 0–1 min, isocratic condition, 20% B; 1–25 min, 20–85% B; 25–26 min, isocratic condition, 85% B; 26–32 min, 85–20% B. The injection volume was 2 μL, and the flow rate was kept at 0.8 mL/min. The selected temperatures for the column and drying gas in the ionization source were 30 and 350°C, respectively; 12 L/min gas flow rate, 55 psi nebulizer pressure, 4,000 V the capillary voltage, and 2 min the specific time window for each compound (Δ retention time) were the technical specifications of the instrument defined for this assay. The peak areas were integrated for quantitation after detection in the dynamic-multiple reaction monitoring (dynamic-MRM) mode. The transition and collision energies for each compound are provided as **Supplementary material**. The principle product ion was used for quantification, while the rest of the ions were employed for qualitative analysis.

Cell culture

The non-tumoral cell lines (mouse fibroblast NIH 3T3 and the spontaneously immortalized human keratinocyte HaCaT cell lines) were used in all *in vitro* experiments. In the case of cytotoxic assay, cell viability was also evaluated by the human tumoral cell lines: cervix epitheloid carcinoma HeLa, Caucasian hepatocyte carcinoma HepG2, Caucasian breast adenocarcinoma MCF-7, and Caucasian lung carcinoma A549 cell lines. Sigma-Aldrich, as a worldwide provider of the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), provided the 3T3 and A549. Whereas Eucellbank (Celltec-Universitat de Barcelona) subminister the HaCaT, HeLa, and MCF-7. Kindly, Dr. Borràs of Experimental Toxicology and Ecotoxicology Platform (UTOX-CERETOX) of Parc Científic of Universitat de Barcelona donated the HepG2 cell line. Cell lines were grown in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, and 100 U/mL:100 U/mL streptomycin–penicillin mixture (10% FBS-DMEM) at 37°C in a 5% carbon dioxide (CO₂)-humidified incubator. Cells were regularly checked and subsequently subcultured in 75 cm² flasks. When cells reached 80% of confluence in the flask,

culture medium was removed, cells were treated with trypsin-EDTA after cleansing with PBS, to obtain a cell suspension. Cell density was determined by staining an aliquot of the cell suspension with the vital dye trypan blue (0.4%), and the final volume was adjusted according to 100 μ L of the cell suspension (1×10^5 cells/mL). Which were seeded in 96-well microplates and incubated overnight (37°C and 5% CO₂).

Determination of cell viability by the uptake of the Neutral Red dye and thiazolyl blue tetrazolium bromide assays

Cell viabilities were determined by the uptake of the Neutral Red dye (NRU) and thiazolyl blue tetrazolium bromide assays (MTT) methods after treatments.

Some explained adaptations have been applied to the Borenfreund and Puerner protocol for the determination of cell viability by NRU (36). The supernatant was aspirated from each well and 100 μ L of NR solution (0.05 mg/mL in DMEM 0% FBS without phenol red) was added after the treatment incubation time. After 3 h, the supernatant was removed by inversion from the plate, and 100 μ L of the developer NR solution was added. In the developer solution, the formaldehyde was replaced by an acidic ethanol solution as defined by Riddell et al. (37). The viable cells corresponded to the quantification of the remnant NR, which is the NRU linked to the lysosomes (38). After shaking the plate (5–10 min), the absorbance was obtained at 550 nm, by Tecan Sunrise[®] microplate reader (Männedorf, Switzerland).

The slight modifications described by Zanette et al. (39) were applied to the MTT assay, based on the experimental protocol of Mosmann (40). A total of 100 μ L of an MTT solution (0.5 mg/mL in 0% FBS-DMEM without phenol red) was incorporated in each well following incubation of the plates for at least 3 h in cell culture incubation conditions (37°C and 5% CO₂). When finished the incubation, the culture medium in all assay wells was substituted for 100 μ L of the organic dissolvent dimethyl sulfoxide (DMSO), with the objective to dissolve the formazan crystals (41). The amount of soluble formazan is proportional to the number of cells with optimal mitochondrial activity (42). Before reading the absorbance at 550 nm using a Tecan Sunrise[®] microplate reader (Männedorf, Switzerland), the homogenization content of each well content was realized by gently shaking the microplate (5 min at 100 rpm/min).

Cell viability for NRU and MTT assays was obtained using the following equation:

$$\text{Cell viability (\%)} = \left(\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right) \times 100$$

where A_{control} is the arc of the absorbance of the control, while A_{sample} is the absorbance for each sample.

Cytotoxicity activity of methanolic extract of *Asplenium trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd. fronds in non-tumoral and tumoral cells lines

Each cell lines assayed were treated for 24 h (37°C and 5% CO₂) with the following increment concentrations: 0.01, 0.1, and 1 mg/mL methanolic fronds extracts in 5% FBS-DMEM. In each plate, the negative controls were the untreated cells (maintained with a culture medium). Cytotoxicity of ATM and COM was evaluated by the NRU and MTT methods.

Cytoprotective and cellular repair activity of methanolic extract of *Asplenium trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd. fronds in non-tumoral cell lines

For the evaluation of the effect of the application of oxidative stress agent after treatment (cytoprotection) or before extract treatment (cellular repair), hydrogen peroxide was selected as the oxidative stress agent (43).

Cytoprotective activity in 3T3 and HaCaT cell lines

Cells were pretreated with the selected methanolic fronds extracts (0.01, 0.1, and 1 mg/mL; 100 μ L) dissolved by 5% FBS-DMEM for 24 h following addition of H₂O₂ (in 5% FBS-DMEM) at a final concentration 2 mM for 2.5 h. Then, cell viability was determined by NRU and MTT assay. In each microplate, negative and positive controls were included. The positive controls for this assay consist of cells treated with H₂O₂ at 2 mM during 2.5 h without previous pretreatment with the extracts.

Cytoprotective activity was obtained equation as follows:

$$\begin{aligned} \text{Cytoprotective activity (\%)} \\ = \left(\frac{CV_{\text{Fern extract-H}_2\text{O}_2} - CV_{\text{H}_2\text{O}_2}}{CV_{\text{Fern extract-H}_2\text{O}_2}} \right) \times 100 \end{aligned}$$

in which the cell viability for each condition is described in the formula where CV.

Cellular repair activity in 3T3 cell line

The potential cellular repair ability of ferns extracts was evaluated by treating cells with different concentrations of ferns extract (0.01, 0.1, and 1 mg/mL in 5% FBS-DMEM; 100 μ L), after induction of oxidative stress with 2 mM H₂O₂ 2.5 h. For each independent experiment and plate, negative and positive controls were included. In this case, positive controls consist of the cells with 2 mM H₂O₂ treated for 2.5 h but without AAM extract post-treatment. After 24 h incubation, cell viability was assessed by NRU and MTT assays.

Cellular repair activity was calculated as follows equation:

$$\begin{aligned} \text{Cellular repair activity (\%)} \\ = \left(\frac{CV_{\text{Fern extract-H}_2\text{O}_2} - CV_{\text{H}_2\text{O}_2}}{CV_{\text{Fern extract-H}_2\text{O}_2}} \right) \times 100 \end{aligned}$$

in which the cell viability for each condition is described in the formula where CV .

Phototoxicity activity of methanolic extract of *Asplenium trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd. fronds in 3T3 and HaCaT cell lines

The potential phototoxic activity of ATM and COM was evaluated following the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) TG 432 (2019) (44) with some adaptations. Briefly, 3T3 and HaCaT cells were seeded at a density to form monolayers at 1×10^5 cells/mL (100 μ L) in a 96-well microplate in 10% FBS-DMEM for 24 h. Then, pre-incubated with 0.01, 0.1, and 1 mg/mL methanolic fronds extracts (100 μ L). The 0% FBS-DMEM without phenol red was the dissolvent to the samples, while positive and negative controls (cells no treated and treated with chlorpromazine, 37.5 μ g/mL chlorpromazine, respectively) were dissolved by 0% FBS-DMEM without phenol red. After the 1 h incubation, one plate remains in the dark, and other was exposed to 1.8 J/cm² of ultraviolet A (UVA) light. When finished the irradiation process, the medium was replaced with 100 μ L of fresh medium (10% FBS-DMEM) to determine the cell viability after 24 h of incubation by the NRU and MTT colorimetric assays.

Light exposure was performed in a photostability UV chamber (58 cm \times 34 cm \times 28 cm) with three UVA lamps Actinic BL TL/TL-D/T5 (Philips, 43 V, 352 nm, 15 W) as described by Martínez et al. (45). The dosage and time exposition of cells to UVA light was regularly settled by a photoradiometer Delta OHM provided with a UVA probe (HD2302—Italy). We followed the following equation:

$$E \left(\frac{J}{cm^2} \right) = t(s) \times P \left(\frac{W}{cm^2} \right)$$

where ultraviolet dose is E , represents the time expressed in seconds is t and the lamp potency is P .

Intracellular reactive oxygen species induced by H₂O₂ of methanolic extract of *Asplenium trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd. fronds in 3T3 and HaCaT cell lines

For the ROS assay, we followed the methodology of Ferreira et al. (46). After the pretreatment cells with the different concentrations of the methanolic fronds extracts (0.01, 0.1, and 1 mg/mL) for 24 h, cells were washed twice with PBS, and DCF (100 μ M) was applied to each well for 45 min (37°C and 5% CO₂). To remove the DCF which no penetrated cells, this was removed by washing twice with a cell culture medium, and then H₂O₂ (1 and 2 mM) was added into each well to induce oxidative stress. The fluorescence intensity of the oxidized

product of DCF was registered ($\lambda_{excitation}$ 480 nm; $\lambda_{emission}$ 530 nm) at 0, 1, 2, and 3 h by a plate reader ThermoFisher SCIENTIFIC VARIOSKAN LUX (ThermoFisher SCIENTIFIC, Waltham, MA, United States). The fluorescence intensity (FI), which have adimensional units, was used to represent the results. The $FI_{z h vs 0 h}$ was calculated as follows equation:

$$\begin{aligned} \text{Fluorescence Intensity}_{z h vs 0 h} (FI_{z h vs 0 h}) \\ = \left(\frac{FI_{z h} - FI_{0 h}}{FI_{z h}} \right) \times 100 \end{aligned}$$

where $FI_{z h}$ is the intensity of fluorescence at z h (z as 1, 2, or 3 h) of incubation and $FI_{0 h}$ is the amount of fluorescence intensity at 0 h.

The FI for each specific time was calculated using this formula:

$$FI = \frac{\text{Fluorence}_{480 \text{ nm (excitation)}}}{\text{Fluorence}_{530 \text{ nm (emission)}}$$

The ΔROS , which has adimensional units for FI, was obtained using the following formula:

$$\Delta ROS_{H_2O_2} \Delta ROS_{\text{Fern extract with DCF-H}_2O_2} - \Delta ROS_{DCF-H_2O_2}$$

Statistical analysis

All experiments were executed in triplicates, and almost three independent experiments were assayed, on different days, except for the cytoprotection ferns extract for HaCaT against 2 mM H₂O₂ (2.5 h) MTT for which the results correspond to $n = 2$ experiments. Statistical analysis for MTT cell viability and fluorescence intensity (FI) was performed using GraphPad Prism version 7, San Diego, CA, United States. All data were expressed as mean \pm standard error. Activities have been compared using a two-way analysis of variance (ANOVA) by Bonferroni. The results were considered significantly different when $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***), and $p \leq 0.0001$ (****).

Results

Phytochemical characterization of methanolic extract of *Asplenium trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd. fronds by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Both methanolic extracts present a similar profile of phytochemicals except for neochlorogenic acid, pelargonidin-3-rutinoside, phloridzin, and naringin. Phloridzin was detected

for the first time in *A. trichomanes* in low amounts. The phytochemicals neochlorogenic acid and naringin have only been detected in COM, while pelargonidin-3-rutinoside and phloridzin have only been found in ATM. A clearly higher content of phenolic species has been determined in the extract of *C. officinarum* (55,490.94 mg polyphenolic species/kg dry extract) than in the extract of *A. trichomanes* (4,637.30 mg polyphenolic species/kg dry extract), as represented in **Table 1**. In the *C. officinarum* extract, the content of the majority phytochemical prevails hugely front the rest of all other phytochemicals. This phytochemical is chlorogenic acid and constitutes 78.95% of the total phytochemicals determined in the extract. In the case of the *A. trichomanes* extract, the two major phytochemicals are those that present a higher quantity than the other phytochemicals determined in the extract. These two phytochemicals are flavonols (one type of flavonoids) hyperoside and isoquercitrin, which constitute 54.72% of the determined phytochemicals in the extract.

When considering all the phytochemicals determined in HPLC-MS/MS, the different nature of both extracts is increased. Thus, when determining the global nature of the polyphenolic species, it is observed that in the extract of *A. trichomanes*, flavonoids (92.82% total phytochemicals determined) prevail over phenolic acids (7.10% total phytochemicals determined). While in the case of *C. officinarum*, phenolic acids prevail (84.08% total phytochemicals determined) over flavonoids (15.92% total phytochemicals determined).

The phenolic acids 3-hydroxybenzoic acid and syringic acid were not detected in both extracts. Some determined flavonoids represent a low proportion of the total phytochemicals determined for both extracts, as in the case of rutin, isorhamnetin, and procyanidin A2. The flavonoids petunidin-3-glucoside, pelargonidin-3-glucoside, malvidin-3-galactoside, myricetin, catechin, and phloretin were not found in any of the samples. The stilbene resveratrol wasn't identified either.

In vitro cell assays

The results obtained with the NRU test did not show differences regardless of the conditions tested (data not shown).

Cytotoxicity activity of methanolic extract of *Asplenium trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd. fronds in non-tumoral and tumoral cell lines

The 3T3 and HaCaT (which are the non-tumoral cell lines assayed), **Figures 1A,B**, are characterized by the absence of increased cell viability greater than the corresponding negative control. The increment of the ATM concentration leads to a decline in cell viability for 3T3 and HaCaT cell lines, in which ATM is more sensible to 3T3 than HaCaT. While in the case of COM, similar behavior is observed for the two non-tumoral

TABLE 1 Content (mg/kg of dry extract) of 38 polyphenolic phytochemicals in the methanolic extract of *Asplenium trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd. fronds.

No. Phytochemicals	Methanolic extract <i>Asplenium trichomanes</i> L. fronds (ATM)	Methanolic extract <i>Ceterach officinarum</i> Willd. fronds (COM)
Phenolic acids		
1 Gallic acid	5.36	13.14
2 Neochlorogenic acid	n.d.	2,300.25
3 Chlorogenic acid	55.93	43,809.25
4 p-Hydroxybenzoic acid	63.81	31.31
5 3-Hydroxybenzoic acid	n.d.	n.d.
6 Caffeic acid	14.80	112.88
7 Vanillic acid	85.52	213.81
8 Syringic acid	n.d.	n.d.
9 p-Coumaric acid	30.30	67.38
10 Ferulic acid	4.20	1.55
11 3,5-Dicaffeoylquinic acid	1.50	95.85
12 Ellagic acid	67.99	10.10
Flavonoids		
(A) Anthocyanins		
13 Delphinidin-3,5-diglucoside	897.53	1,138.14
14 Delphinidin-3-galactoside	5.85	1.18
15 Cyanidin-3-glucoside	26.13	3.15
16 Petunidin-3-glucoside	n.d.	n.d.
17 Pelargonidin-3-rutinoside	20.79	n.d.
18 Pelargonidin-3-glucoside	n.d.	n.d.
19 Malvidin-3-galactoside	n.d.	n.d.
(B) Flavonols		
20 Rutin	0.98	0.40
21 Isoquercitrin	1,185.02	1,362.95
22 Quercitrin	322.94	2.07
23 Myricetin	n.d.	n.d.
24 Kaempferol-3-glucoside	251.71	263.83
25 Quercetin	26.05	9.85
26 Isorhamnetin	0.06	0.14
27 Hyperoside	1,352.71	1,719.52
28 Kaempferol	52.50	9.56
(C) Flavan-3-ols (Flavanols)		
29 Catechin	n.d.	n.d.
30 Epicatechin	61.43	29.83
31 Procyanidin B2	83.24	39.40
32 Procyanidin A2	1.37	3.15
(D) Dihydrochalcones		
33 Phloridzin	1.30	n.d.
34 Phloretin	n.d.	n.d.
(E) Flavanones		
35 Hesperidin	14.81	15.06
36 Naringin	n.d.	4,234.63
Stilbenes		
37 Resveratrol	n.d.	n.d.
Non-phenolic acids		
38 Trans-cinnamic acid	3.47	2.56
Total phenol content	4,637.30	55,490.94

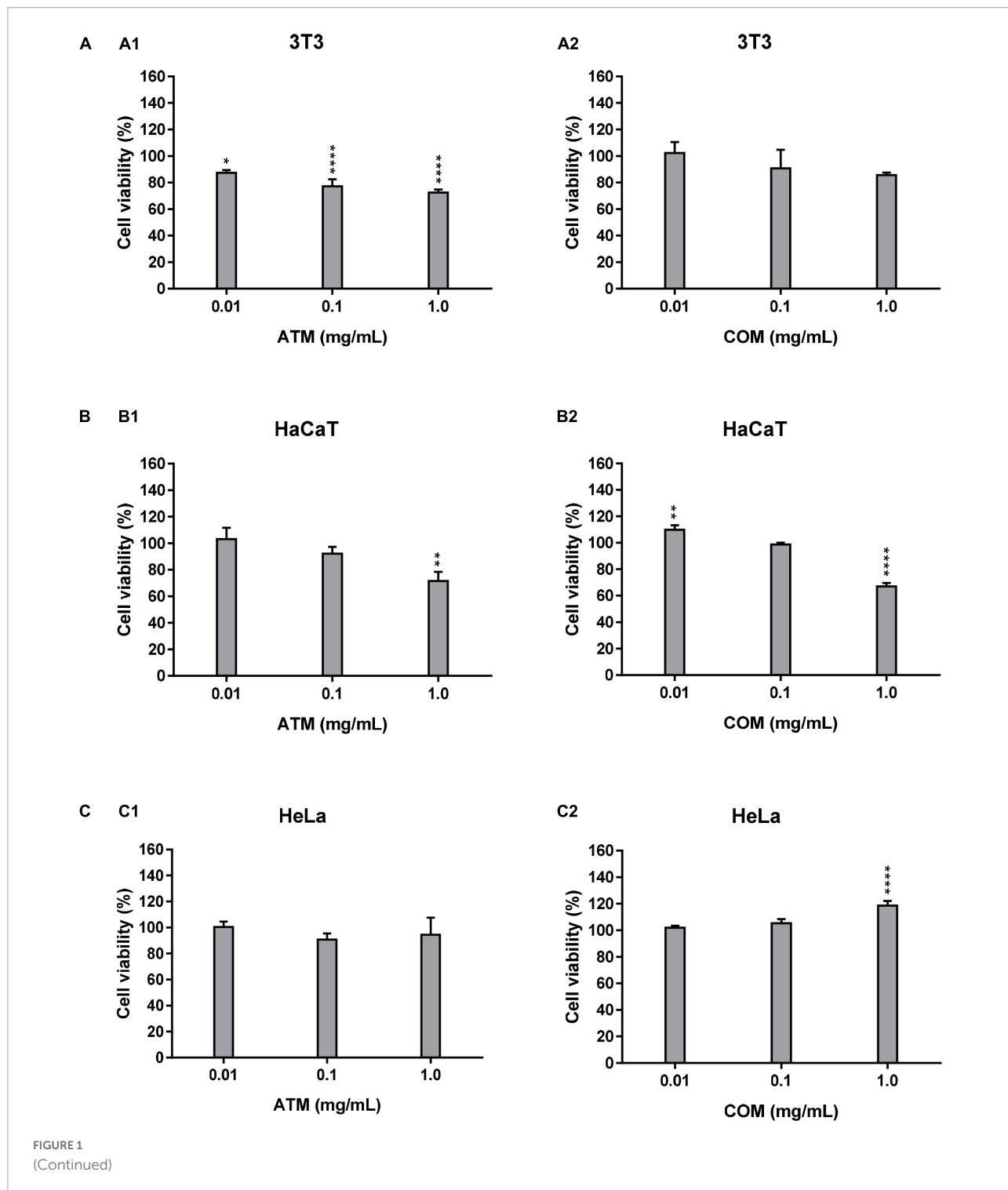
Fronds analyzed by HPLC-MS/MS ($n = 3$, RSD% ranged from 1.8 to 6.8%). nd = not detected.

cell lines except at 1 mg/mL COM. The situation in which obtained the lowest cell viability (67.2% cell viability) for the six cell lines assayed. This situation was the only cytotoxic

compartment for the six cell lines analyzed as a consequence that cell viability is $\leq 70\%$.

In the four human tumoral cell lines, both extracts show a similar behavior only for MCF-7 (Figure 1E). In which cell lines for both extracts present slightly higher cell viability than

the negative control. In the case of the remaining tumoral cell lines (HeLa, HepG2, and A549), Figures 1C,D,F, the behavior is similar for each extract. ATM for these three tumoral cell lines, there is a mild decrease in cell viability up to 0.1 mg/mL ATM in which cell viability is stabilized. The COM does not



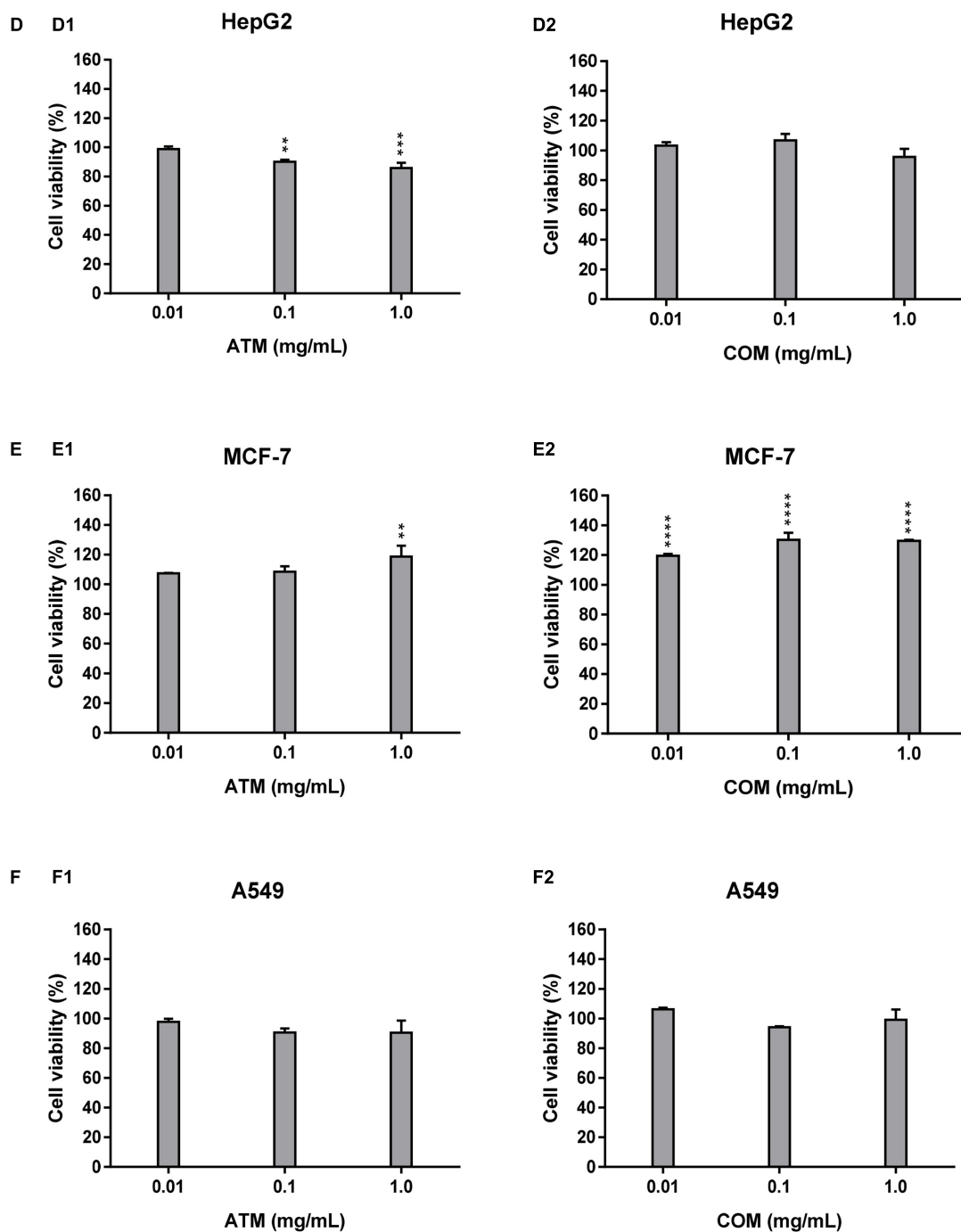


FIGURE 1

Cytotoxicity activity of ATM (1) and COM (2) in 3T3 (A) and HaCaT (B), HeLa (C), HepG2 (D), MCF-7 (E), and A549 (F) cell lines by MTT assay and expressed as a percentage of cell viability respect to control cells. Results are expressed as mean \pm standard error of $n = 3$. Control cells were maintained only with a culture medium. A two-way analysis of variance (ANOVA) and a Bonferroni *post hoc* assay have been performed. Statistical differences were considered as follows: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, and **** $p \leq 0.0001$ comparison with no treated cells (negative control).

show a clear affectation in the cell viability for HeLa, HepG2, and A549 cell lines at assayed extract concentrations. However, only a slight increase in HeLa cell viability is observed at

1 mg/mL COM. The situation in which there is observed an increment in cell viability less than 20% of the corresponding negative control.

When comparing the behavior of both extracts in non-tumoral versus tumoral cell lines, the only cell line in which a similar behavior has been determined has been in 3T3 and HepG2 for ATM.

Cytoprotective activity of methanolic extract of *Asplenium trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd. fronds in 3T3 and HaCaT cell lines

Prior to carrying out the cytoprotection assays, the cellular viability of HaCaT was determined for a range of concentrations-time of H₂O₂. To define the ideal conditions for the evaluation of the cytoprotective effect of ATM and COM in non-tumoral lines (data not shown). The ideal conditions for the oxidative stress-inducing agent selected were 2 mM H₂O₂ for 2.5 h.

In **Table 2**, cytoprotective results are shown at 2 mM H₂O₂ for 2.5 h. In **Figure 2A**, cytoprotection of ATM and COM in 3T3 cells against 2 mM H₂O₂ for 2.5 h is also demonstrated. Under these same cytoprotection conditions in the case of COM, this extract does not imply statistically significant modifications with respect to the corresponding positive control.

Figure 2B shows the behavior of HaCaT in the cytoprotection assay of each of the extracts against 2 mM H₂O₂ for 2.5 h. The evolution of cell viability in relation to the increase in ATM concentrations does not present a clear trend. All cell viabilities for ATM concentrations are lower than the corresponding positive control. Nevertheless, COM is the only extract that shows a clear trend in decreasing cell viability with increasing concentration. Without obtaining effective cytoprotection values for COM. No statistically significant cell viability values have been obtained for both extracts in this assay.

Cellular repair activity of methanolic extract of *Asplenium trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd. fronds in 3T3 cell line

The 3T3 cell viability of the positive controls in ATM and COM in the cellular repair assay (23.8 and 20.4% viability, respectively) is lower than the corresponding ones in the cytoprotection assay (35.7 and 40.5% viability, respectively). This variability is the consequence that the oxidizing agent in

the cellular repair assay is applied one day earlier than in the cytoprotective assay (described in methodology).

In the cellular repair assay, due to the absence of a cellular pre-treatment with the extract, which is carried out in the cytoprotection assay, it is expected to obtain lower cell viability than in the corresponding cytoprotection assays. In **Figure 3**, cellular repair assay in 3T3 for ATM and COM against the conditions of the agent inducing oxidative stress (2 mM H₂O₂ for 2.5 h), when compared with the corresponding cell viabilities of the assay of cytoprotection (**Figure 2A**) except for 1 mg/mL COM. In which cell viability in both cases are similar (Cytoprotective 3T3_{1 mg/mL COM} = 44.5% cell viability; Cellular repair 3T3_{1 mg/mL COM} = 44.6% cell viability).

Both extracts have generally exhibited a greater protective effect in the cellular repair assay than in the corresponding cytoprotective assay. The viability of the samples in the cellular repair assay is always higher than the corresponding positive control in COM (statistically significant values from 0.1 mg/mL COM), while in ATM, it is only from 0.1 mg/mL extract (3T3_{0.1 mg/mL ATM} = 26.1% cell viability), in which the only statistically significant values for ATM are at 1 mg/mL ATM. The trend of the evolution of 3T3 cell viability experienced for ATM in the cytoprotective assay is like that experienced in the cellular repair assay, in which the trend of increasing cell viability as a function of extract concentration is observed clearly from 0.1 to 1 mg/mL ATM. In the case of COM, the evolution of cell viability in the cell repair extract is different from that experienced in the cytoprotective assay (increasing the concentration of extract leads to an increase in cell viability). Result that no clear trend has experienced cell viability with the increasing COM concentration in cellular repair assay.

In the cellular repair assay for both extracts, a percentage of effective cellular repair is obtained only at 1 mg/mL extract. But COM seems clearly superior compared with ATM (**Table 3**).

Phototoxicity activity of methanolic extract of *Asplenium trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd. fronds in 3T3 and HaCaT cell lines

Irradiated DMEM control versus non-irradiated DMEM control gates a decrease of around 30% cell viability for 3T3

TABLE 2 Cytoprotection activity of ATM and COM in 3T3 and HaCaT cell lines for 2 mM H₂O₂ during 2.5 h by MTT assay.

Cytoprotection activity of fern extract front 2 mM H₂O₂ during 2.5 h by MTT assay

Fern extract	Concentration of fern (mg/mL)	0.01	0.1	1
ATM	Cytoprotection activity (%) ^a in 3T3	0.0	0.0	22.6
	Cytoprotection activity (%) ^a in HaCaT	0.0	0.0	0.0
COM	Cytoprotection activity (%) ^a in 3T3	8.0	17.6	9.1
	Cytoprotection activity (%) ^a in HaCaT	17.8	14.3	1.5

^aPercentage of cytoprotection activity has been obtained from the following relation $[(CV_{\text{Fern extract-H}_2\text{O}_2} - CV_{\text{H}_2\text{O}_2}) / CV_{\text{Fern extract-H}_2\text{O}_2}] \times 100$.

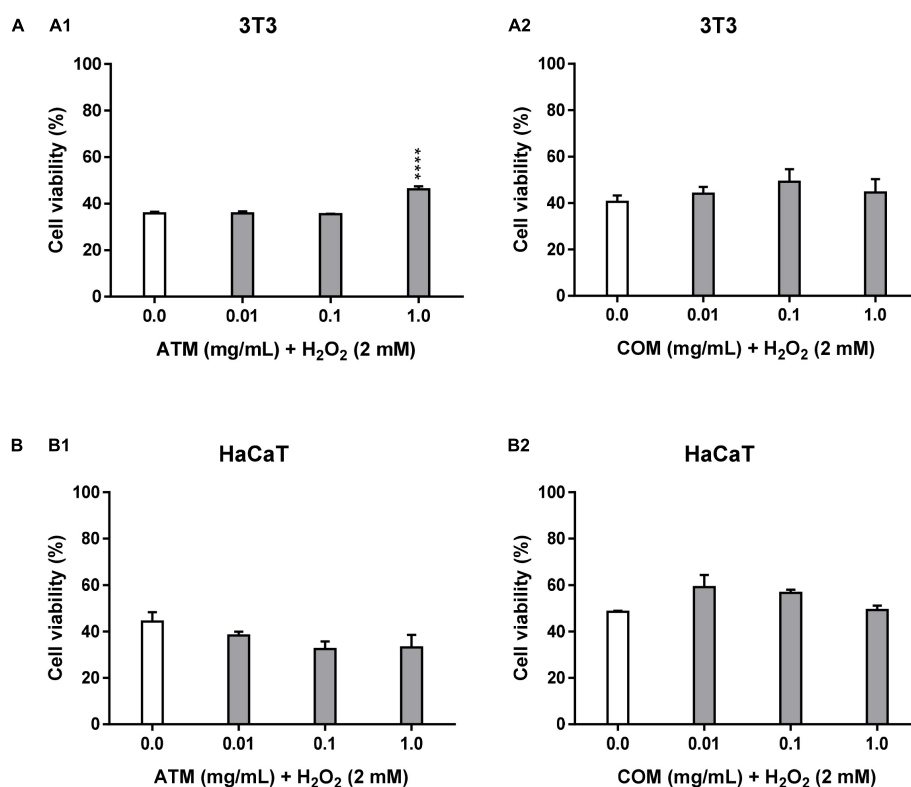


FIGURE 2

Cytoprotective activity of ATM (1) and COM (2) in 3T3 (A) and HaCaT (B) cell lines for 2 mM H₂O₂ during 2.5 h by MTT assay and expressed as a percentage of cell viability with respect to untreated cells control. H₂O₂ cell viability was used as a positive control. Results are expressed as mean \pm standard error of $n = 3$ (3T3) and $n = 2$ (HaCaT). A two-way analysis of variance (ANOVA) and a Bonferroni *post hoc* assay have been performed. Statistical differences were considered as follows: **** $p \leq 0.0001$ comparison with positive control.

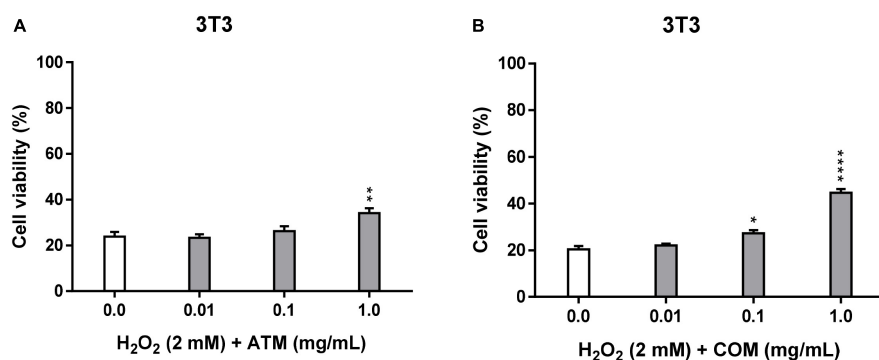


FIGURE 3

Cellular repair activity of ATM (A) and COM (B) in 3T3 cell line for 2 mM H₂O₂ during 2.5 h by MTT assay and expressed as a percentage of cell viability with respect to untreated cells control. H₂O₂ cell viability was used as a positive control. Results are expressed as mean \pm standard error of $n = 3$. A two-way analysis of variance (ANOVA) and a Bonferroni *post hoc* assay have been performed. Statistical differences were considered as follows: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and **** $p \leq 0.0001$ comparison with positive control.

and HaCaT cell lines (Table 4). One possible bias of the low ratio of this control has been eliminated, obtaining the corresponding viabilities with respect to the non-irradiated DMEM (in the graphic representation of the phototoxicity test, the cell viability is represented as a function of the

non-irradiated DMEM for the non-irradiated ones and the irradiated DMEM for irradiated).

The positive control shows a high phototoxic effect of irradiated chlorpromazine compared to the corresponding non-irradiated situation. Obtaining a greater sensitivity of the

TABLE 3 Cellular repair activity of ATM and COM in 3T3 cell line for 2 mM H₂O₂ during 2.5 h by MTT assay.

Oxidative agent conditions	Concentration of fern (mg/mL)	0.01	0.1	1
2 mM H ₂ O ₂ during 2.5 h	3T3 cellular repair activity (%) ^a by ATM	0.0	9.0	30.2
	HaCaT cellular repair activity (%) ^a by COM	7.5	24.9	54.2

^aPercentage of cellular repair activity has been obtained from the following relation $[(CV_{\text{Fern extract-H}_2\text{O}_2} - CV_{\text{H}_2\text{O}_2}) / CV_{\text{Fern extract-H}_2\text{O}_2}] \times 100$.

oxidative stress inducing agent in HaCaT than in 3T3, which is the contrast obtained in the positive cytoprotection control at 2 mM H₂O₂ for 2.5 h.

Figure 4 represents the phototoxicity test at 1.8 J/cm² for 3T3 and HaCaT using MTT for ATM and COM. In none of the concentrations tested for both extracts for 3T3 have phototoxic behavior been obtained (Figure 4A). Presenting both extracts a similar behavior to 0.01 and 0.1 mg/mL extract with higher cell viability in the irradiated homologue than in the non-irradiated one. The fact that by presenting an increase in the cell viability of the irradiated compared to the non-irradiated one $\geq 20\%$ in ATM at 0.1 mg/mL extract and in COM at 0.01 and 0.1 mg/mL extract, a possible photoprotective effect is considered. At 1 mg/mL COM, no irradiated decrease in cell viability is manifested in comparison to CPZ no irradiated. A situation that confirms the previous cytotoxic compartment of this extract in 3T3 at the highest concentration assayed.

Figure 4B represents the phototoxicity test at 1.8 J/cm² for the ATM and COM extracts in HaCaT by MTT. At 0.01 and 0.1 mg/mL extract, the same behavior is experienced as in the corresponding situation as in 3T3. Wherein the viability between homologues is higher in the irradiated compared to the corresponding non-irradiated. However, in 1 mg/mL COM, the effects previously observed in cytotoxicity assay prevail. While ATM, despite not observing a significant decrease in cell viability in the non-irradiated 1 mg/mL extract (it is not a cytotoxic extract at assayed conditions), in the corresponding irradiated situation the extract does not have the ability to reverse the photosensitizing effect induced by UVA.

Intracellular ROS induced by H₂O₂ of methanolic extract of *Asplenium trichomanes* L. and *Ceterach officinarum* Willd. fronds in 3T3 and HaCaT cell lines

The ROS value does not undergo significant modifications over time. Rather, time only slightly increases ROS values without modifying the profile experienced in each of the times analyzed (1, 2, and 3 h). The reason why only ROS is represented at 2 h (ROS at 1 h and 3 h not represented).

TABLE 4 Comparison of cell viability of irradiated with non-irradiated controls^a.

Cell line	DMEM (%)	CPZ (%)
3T3	68.0	34.8
HaCaT	73.4	16.4

^aExpressed as the percentage of cell viability of the irradiated control in relation to the corresponding non-irradiated.

The ROS value for both 3T3 positive controls (at 1 and 2 mM H₂O₂; for each concentration of H₂O₂ are the same positive controls for both extracts) is higher than the corresponding HaCaT values (ROS positive control for 1 mM H₂O₂: ROS_{1 mM H₂O₂ for 3T3} = 168.0 and ROS_{1 mM H₂O₂ for HaCaT} = 82.3; ROS positive control for 2 mM H₂O₂: ROS_{2 mM H₂O₂ for 3T3} = 153.9 and ROS_{2 mM H₂O₂ for HaCaT} = 110.0). However, the fact that in 3T3 higher ROS has been determined in 1 mM H₂O₂ than in 2 mM H₂O₂ is due to possible cell death at 2 mM H₂O₂. This is in line with the low cell viability of the positive controls in the cytoprotection at 2 mM H₂O₂ for 2.5 h assays in 3T3 compared to the corresponding ones in HaCaT. Because protective activity and ROS values are inversely related (less protective activity of cell line entails higher ROS values).

In Figure 5A, ROS assay in 3T3 for ATM and COM, a different evolution of ROS in relation to the increase in the concentration of each of the extracts is observed by both conditions of oxidative stress (1 and 2 mM H₂O₂). In all the tested conditions, the ROS value is always higher in ATM with respect to the corresponding COM except for 0.1 mg/mL COM at 2 mM H₂O₂. In the ATM extract, no clear trend is observed. In the case of COM, an increase in ROS to 0.01 and 0.1 mg/mL extract at 2 mM H₂O₂ stands out, possibly due to the increment of oxidative stress. Finally, at 1 mg/mL COM for both concentrations of H₂O₂ tested, the cytotoxic effects of the COM prevail, as observed in the cytotoxicity assay, producing decreases in the increase of ROS due to cell death itself.

In Figure 5B, ROS assay in HaCaT for ATM and COM, the same trend is determined for both H₂O₂ conditions applied in each extract assay. Where ROS increases with respect to the corresponding positive controls. Causing the majority of ROS increases to be positive (Table 5). A clear trend has been observed that increasing the ATM concentration carries an increase in ROS value. While in the case of COM, there is a decline in ROS from 0.1 mg/mL extract in both oxidative stress conditions assayed. This coincides is the case in the corresponding cytotoxicity assays in Figure 1B (cytotoxicity of both extracts in HaCaT).

Discussion

Although ferns have been poorly studied from a phytochemical and nutritional approach, fronds are the main part of the ferns used to make medicinal preparations by the *Malayalis* in Kolli hills, India (9). The election of the

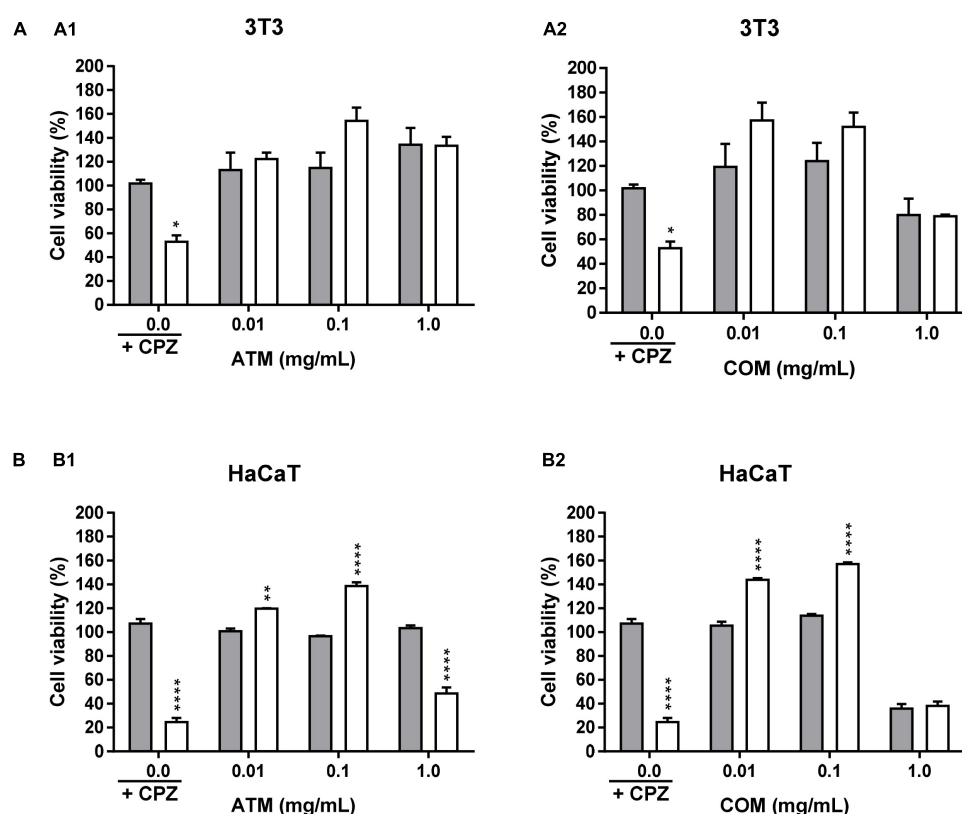


FIGURE 4

Phototoxicity activity of ATM (1) and COM (2) in 3T3 (A) and HaCaT (B) cell lines by MTT assay and expressed as a percentage of cell viability with respect to the correspondent control cells Chlorpromazine cell viability was used as positive control. Gray columns correspond to cells nonexposed to UVA light and white columns correspond to cells exposed to 1.8 J/cm² of UVA light. Results are expressed as mean \pm standard error of $n = 3$. A two-way analysis of variance (ANOVA) and a Bonferroni *post hoc* assay have been performed. Statistical differences were considered as follows: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and **** $p \leq 0.0001$ comparison with the equivalent nonirradiated condition homologue.

extraction solvent is a relevant aspect in the phytochemical determination of plant drugs. Selectivity (based on polarity target phytochemical), safety, neutral, and easy to separate from the rest of no target phytochemicals, low viscosity, low boiling temperature, and economical are the criteria for selecting the extraction solvent (47). Currently, most plant matrices are obtained from organic solvents compared to other solvents such as green solvents (environmentally friendly). For the *in vitro* studies that we have carried out on *A. trichomanes* and *C. officinarum* extracts, we have used the methanolic extract of their fronds while the correspondence hexane extract was discarded due to the lower presence of total polyphenol content (TPC) than the corresponding methanolic extract in a previous study (34).

In the Russian Far East, there are a minimum of 13 fronds of edible fern species, where *P. aquilinum* predominates (11). The degree of maturation of the fronds (young fronds, as known fern shots or fiddleheads, or mature fronds) and the way in which the fronds are preserved (by freezing, canning, salting, or drying) are important to determine the potential toxicity of edible ferns.

For example, different government dossiers regard the safeguard of public health against *P. aquilinum* to whose toxins affect human populations and animals. The main toxin that triggers the carcinogenesis of *P. aquilinum* is ptaquiloside (an illudane, a subclass of sesquiterpenes) (48, 49). Currently, ferns are not incorporated into the diet of European countries. However, the publication of nutritional properties of plant matrices of ferns may be an incentive to incorporate ferns in European diets (14).

We have considered the methanolic extracts of the fronds of *A. trichomanes* and *C. officinarum* as potential reservoirs of phytochemicals. Derived that other *Aspleniaceae* species have been described as reservoirs of phytochemicals. Such as the ferns *Asplenium adiantum-nigrum* L. (*Aspleniaceae*) and *Asplenium ruta-muraria* L. (*Aspleniaceae*) (50), of which the methanolic extract of the fronds of both ferns is the part with the highest total phenol content (TPC) and total flavonoid content (TFC). And specifically, the content of flavonoids in the fronds is relevant due to one of the functions of the flavonoids in the fronds, which are the neutralization of UV radiation and ROS (51). In the phytocharacterization by HPLC-MS/MS

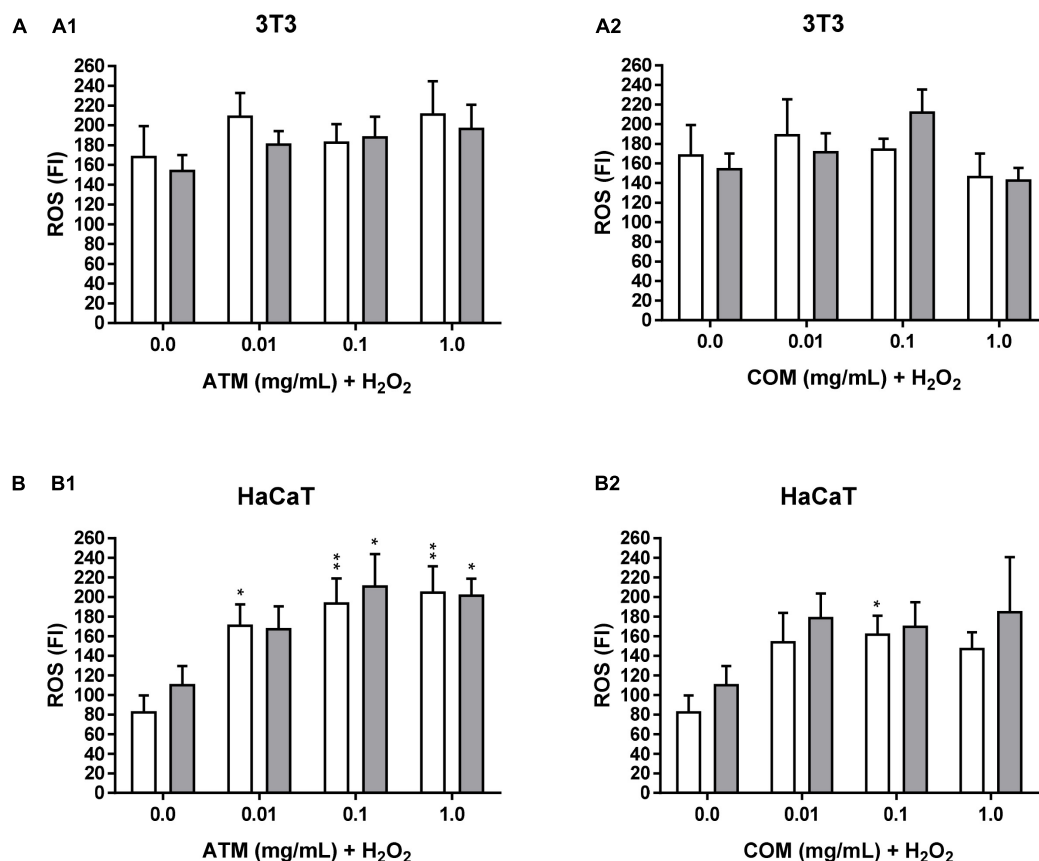


FIGURE 5
 Intracellular ROS induced by 1 and 2 mM H₂O₂ for 2 h treatment with ATM (1) and COM (2) in 3T3 (A) and HaCaT (B) cells. H₂O₂ cell viability was used as a positive control. White columns correspond to 1 mM H₂O₂, and gray columns correspond to 2 mM H₂O₂. Results are expressed as mean ± standard error of *n* = 3. A two-way analysis of variance (ANOVA) and a Bonferroni *post hoc* assay have been performed. Statistical differences were considered as follows: **p* ≤ 0.05 and ***p* ≤ 0.01 comparison with the corresponding positive control.

of ATM fronds, a greater quantity of flavonoids, especially flavonols related to kaempferol, was obtained, as Dall'Acqua et al. (52) described. In our phytocharacterization, the main phytochemical isolated from ATM has been hyperoside, another flavonol. We have also isolated kaempferol and kaempferol glycoside (kaempferol-3-glucoside). Resulting that flavonols are the main polyphenolic species determined in ATM, representing 68.8% of the total phytochemicals determined by HPLC-MS/MS. In the case of COM, flavonoids are minor phytochemicals detected by HPLC-MS/MS compared to phenolic acids. These results are equivalent to that obtained by Zivkovic et al. (53). In contrast to Zivkovic et al. (53), we have detected fractions of rutin in the fronds of *C. officinarum*. In this study, chlorogenic acid is the main phytochemical determined in COM, while the other cinnamic acids such as caffeic acid are only detected in traces. This observation has already been previously reported by Tomou et al. (28). Phytocharacterization by HPLC-MS/MS of both extracts coincides with the nature of the phytochemicals determined by TLC in a previous study (34).

Durdevic et al. (54) determined that the content of phenolic species in the ethylacetate extracts of *A. trichomanes* and *C. officinarum* is higher in the frond than in the correspondence rhizome. And the predominance of aglycone phytochemicals (no sugar phytochemicals) than glycone phytochemicals (sugar phytochemicals) in the ethylacetate frond extract. We have determined a higher amount of TPC in the methanolic extract

TABLE 5 Intracellular ΔROS^a induced by 1 and 2 mM H₂O₂ for 2 h with respect to 0 h at different concentrations of ATM and COM in 3T3 and HaCaT.

Cell line	3T3			HaCaT		
	0.01	0.1	1	0.01	0.1	1
1 mM H ₂ O ₂ for ATM	40.6	14.4	42.9	88.3	111.2	122.1
1 mM H ₂ O ₂ for COM	20.7	6.0	-21.9	71.3	79.3	64.5
2 mM H ₂ O ₂ for ATM	26.6	34.0	42.7	57.2	100.7	91.4
2 mM H ₂ O ₂ for COM	17.7	57.9	-11.5	68.4	59.5	74.5

^aIntracellular ΔROS cytoprotective activity has been obtained from the following relation ROS_{Fern extract with DCF-H₂O₂} - ROS_{DCF-H₂O₂} expressed as fluorescence intensity (FI).

of the fronds of *C. officinarum* than in the methanolic extract of the fronds of *A. trichomanes*, as described by Durdevic et al. (54).

Currently, there is a great discrepancy in the cytotoxicity of ferns, derived from the fact that they are a widely diversified taxon. However, in the cytotoxic determination of methanolic extracts, different species of ferns have concluded greater cytotoxicity in the frond than the corresponding rhizome (55). For this reason, it is important that cytotoxicity assays have been performed in a wide range of concentrations. The most common assays to determine cell viability are the reduction in the tetrazole salt or MTT, the uptake of the Neutral Red dye (NRU), or the release of lactate dehydrogenase among others (42). The measurements of most of these techniques are end point and present advantages and disadvantages. In this sense, MTT is usually the method of choice in different cytotoxic studies (38), because it has proven to be valid with different cell lines and is relatively straightforward and useful when conditions are optimized. Moreover, the MTT assay has been used to characterize the cytotoxic profile of different plant extracts including ferns (34). Actually, MTT is regarded as a gold standard of initial cytotoxicity assays as it is highly sensitive and a high-throughput screening assay together with its low economic cost (56). Nevertheless, the NRU test failed to be sensitive in our case. We are also aware that in our research there may be potential interferences of the extracts in the assays by colorimetric methods. It is described that some phytochemicals can interact with MTT producing false-positive cell viabilities (57). For this reason, the absence of interference has been verified by the MTT assay for the *in vitro* concentrations of the extracts tested. Petkov et al. 2021 (58) analyzed the cytotoxicity of methanolic fronds extracts of three *Aspleniaceae* ferns by MTT, of which two were *A. trichomanes* and *C. officinarum*. The comparison of our cytotoxicity results with the results of Petkov et al. 2021 (58) is relevant due to the same methodology for obtaining the frond extract (frond methanolic extract) and for determination of cell viability (MTT assay) for *A. trichomanes* and *C. officinarum*. In the initial toxicity studies of the pharmaceutical industry, assays with a high sensitivity against cytotoxicity with reasonable cost are used, in which various hepatic cell lines are generally used, such as HepG2 (59). The absence of cytotoxicity of the extracts in HepG2 confirms the safety of these extracts.

A diet rich in antioxidants and polyphenols contributes to reducing the risk of diseases resulting from oxidative damage. However, the employment of synthetic antioxidants, as in the case of butylated hydroquinone, in recent years, has been decreased for safety reasons (51). For this reason, investigations of new plant matrices with a high content of antioxidants have increased (60). Despite the low number of studies on ferns, the methanolic extract of their fronds is considered plant parts with a high amount of antioxidant phytochemicals (61, 62). Currently, the extracts of *Polypodiaceae* ferns such as *Polypodium leucotomos* (aqueous extract) and

Polypodium vulgare L. (methanolic extract) have been reported as antioxidant and cytoprotective agents *in vitro* (63, 64). However, few ferns of the *Aspleniaceae* family, despite being the main ferns in Europe, have been studied as plant matrices for the contribution of antioxidant phytochemicals (14). For example, in the methanolic extract of *A. adiantum-nigrum* and *C. officinarum* (both species are *Aspleniaceae* family), mangiferins and mangiferin-related phytochemicals have also been isolated among other polyphenolic phytochemicals (50, 53). This fact demonstrates the potential of the *Aspleniaceae* as a reservoir of polyphenolic phytochemicals.

Conclusion

The methanolic extracts of the fronds of the two main species of ferns from the Prades mountains, *A. trichomanes* and *C. officinarum*, present interesting phytochemicals of different nature without being cytotoxic in the mouse fibroblast 3T3, human keratinocyte HaCaT, cervical human cancer HeLa, liver human cancer HepG2, breast human cancer MCF-7, and lung human cancer A549 cell lines at the assayed concentrations. This fact provides new evidence for considering certain ferns of the *Aspleniaceae* family as plant matrices for the extraction of phytochemicals of pharmaceutical or nutritional interest.

Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Author contributions

MM and VL: conceptualization, writing-review and editing, and supervision. AF, MM, and FM: methodology. AF, FM, GC, and MM: analysis. AF, MM, and VL: investigation. MM, MV, and VL: resources. AF: writing—original draft preparation. MM and MV: funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

This work was financially supported by project 307,629 of Fundació Bosch & Gimpera - Universitat de Barcelona.

Acknowledgments

We acknowledge the technical support of Universitat de Barcelona and Universidad San Jorge.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnut.2022.994215/full#supplementary-material>

References

- Chamberlain JL, Darr D, Meinhold K. Rediscovering the contributions of forests and trees to transition global food systems. *Forests*. (2020) 11:21. doi: 10.3390/f11101098
- Jankovsky M, Garcia-Jacome SP, Dvorák J, Nyarko I, Hájek M. Innovations in forest bioeconomy: A bibliometric analysis. *Forests*. (2021) 12:17. doi: 10.3390/f12101392
- Haines A. Health in the bioeconomy. *Lancet Planet Health*. (2021) 5:E4–5.
- Nagalingum NS. Seedless land plants, evolution and diversification of. In: Kliman RM editor. *Encyclopedia of Evolutionary Biology* (Sydney, NSW: Elsevier) (2016). doi: 10.1016/B978-0-12-800049-6.00255-9
- Baskaran XR, Geo Vigila AV, Zhang SZ, Feng SX, Liao WB. A review of the use of pteridophytes for treating human ailments. *J Zhejiang Univ Sci B*. (2018) 19:1–35. doi: 10.1631/jzus.B1600344
- Cao H, Chai TT, Wang X, Morais-Braga MFB, Yang JH, Wong FC, et al. Phytochemicals from fern species: Potential for medicine applications. *Phytochem Rev*. (2017) 6:379–440. doi: 10.1007/s11101-016-9488-7
- Muhammad M, Ismail ZS, Schneider H, Hawkins JA. Medicinal use of ferns: An ethnobotanical review. *Sains Malaysiana*. (2020) 49:1003–14. doi: 10.17576/jsm-2020-4905-05
- Ojha R, Prasad Devkota H. Edible and medicinal pteridophytes of Nepal: A review. *Ethnobot Res Appl*. (2021) 22:16. doi: 10.32859/era.22.16.1-16
- Sureshkumar J, Silambarasan R, Bharati KA, Krupa J, Amalraj S, Ayyanar M. A review on ethnomedicinally important pteridophytes of India. *J Ethnopharmacol*. (2018) 219:269–87. doi: 10.1016/j.jep.2018.03.024
- Wang YL, Gao SS, He XY, Li Y, Zhang Y, Chen W. Response of total phenols, flavonoids, minerals, and amino acids of four edible fern species to four shading treatments. *PeerJ*. (2020) 8:18. doi: 10.7717/peerj.8354
- Nekrasov EV, Svetashev VI. Edible far eastern ferns as a dietary source of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Foods*. (2021) 10:16. doi: 10.3390/foods10061220
- Tyler T, Herbertsson L, Olofsson J, Olsson PA. Ecological indicator and traits values for Swedish vascular plants. *Ecol Indic*. (2021) 120:13. doi: 10.1016/j.ecolind.2020.106923
- Silva VL, Mehlreter K, Schmitt JL. Ferns as potential ecological indicators of edge effects in two types of Mexican forests. *Ecol Indic*. (2018) 93:669–76. doi: 10.1016/j.ecolind.2018.05.029
- Langhansova L, Pumprova K, Haisel D, Ekr L, Pavicic A, Zajickova M, et al. European ferns as rich sources of antioxidants in the human diet. *Food Chem*. (2021) 356:129637. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129637
- Bystriakova N, Peregrym M, Dragicevic S. Effect of environment on distributions of rock ferns in the Mediterranean climate: The case of the genus *Asplenium* in Montenegro. *Flora*. (2015) 215:84–91. doi: 10.1016/j.flora.2015.07.003
- Fiorin E, Saez L, Malgosa A. Ferns as healing plants in medieval Mallorca, Spain? Evidence from human dental calculus. *Int J Osteoarchaeol*. (2019) 29:82–90. doi: 10.1002/oa.2718
- Li CX, Yang Q. Notes on the divergence time of the fern genus *Asplenium* from fossil and molecular evidence. *Cretac Res*. (2013) 45:352–5. doi: 10.1016/j.cretres.2013.06.005
- Rizzo F. The distribution of Pteridophytes (ferns and lycophytes) in Sicily. *Biodivers J*. (2021) 12:91–120. doi: 10.31396/Biodiv.Jour.2021.12.1.91.120
- Ramos-Gutiérrez I, Lima H, Pajarón S, Romero-Zarco C, Sáez L, Pataro L, et al. Atlas of the vascular flora of the Iberian Peninsula biodiversity hotspot (AFLIBER). *Glob Ecol Biogeogr*. (2021) 30:1951–7.
- Font Castell X, de Càceres M, Quadrada R, Moreno J, Martí D. *Banco de datos de biodiversidad de Cataluña*. Barcelona: Generalidad de Cataluña (2015).
- The World Flora Online. *Asplenium trichomanes* L. World Flora Online (WFO) (2022). Available online at: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0001109364>
- The World Flora Online. *Ceterach officinarum* Willd. World Flora Online (WFO) (2022). Available online at: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-000114265>
- Vasco A, Moran RC, Ambrose BA. The evolution, morphology, and development of fern leaves. *Front Plant Sci*. (2013) 4:16. doi: 10.3389/fpls.2013.00345
- Bolós O, Vigo J. Flora dels països catalans I. *Polipodiàcies: Polypodium vulgare* L., Barcino editor. Barcelona: Editorial Barcino (1984). p. 188–90.
- Singh S, Kharkwal K, Kant R, Sinha BK, Ambrish K. Studies on ethnobotanical aspects of pteridophytes in great himalayan national park, kullu, himachal pradesh. *Phytotaxonomy*. (2017) 17:43–9.
- Pekgöz AK, Cinbilgel I. Phytochemical contents and antioxidant activities of fern, *Asplenium ceterach* L. In different altitudes. *Bangladesh J Bot*. (2019) 48:315–20.
- Imperato F. Flavonol Glycosides from Ferns of the Genera *Asplenium* and *Cheilanthes*. *Biochem Syst Ecol*. (1989) 17:161–6. doi: 10.1016/0305-1978(89)90074-4
- Tomou EM, Skaltsa H. Phytochemical investigation of the fern *Asplenium ceterach* (Aspleniaceae). *Nat Prod Commun*. (2018) 13:849–50.
- Bonet MÀ, Agelet A, Vallès J, Villar Pérez L. Contribution à la connaissance ethnobotanique des ptéridophytes dans les Pyrénées. *Bocconea*. (2001) 13:605–12.
- Rigat M, Vallès J, Iglésias J, Garnatje T. Traditional and alternative natural therapeutic products used in the treatment of respiratory tract infectious diseases in the eastern Catalan Pyrenees (Iberian Peninsula). *J Ethnopharmacol*. (2013) 148:411–22. doi: 10.1016/j.jep.2013.04.022
- Pappalardo G, Lusk JL. The role of beliefs in purchasing process of functional foods. *Food Qual Prefer*. (2016) 53:151–8. doi: 10.1016/j.foodqual.2016.06.009
- Parada M, Carrió E, Vallès J. Ethnobotany of food plants in the Alt Empordà region (Catalonia, Iberian Peninsula). *J Appl Bot Food Qual*. (2011) 84:11–25.
- Batet D, Cartanyà J, Castells R, Piñas I, Salat X. Entrevista n°13. *Etnobotànica a les Muntanyes de Prades*, Centre d'Història Natural de la Conca de Barberà editor. Montblanc: Centre d'Història Natural de la Conca de Barberà (2011).
- Farràs A, Cásedas G, Les F, Terrado EM, Mitjans M, López V. Evaluation of anti-tyrosinase and antioxidant properties of four fern species for potential cosmetic applications. *Forests* (2019) 10:14. doi: 10.3390/f10320179

35. Mustafa AM, Angeloni S, Aboueleinein D, Acquaticci L, Xiao JB, Sagratini G, et al. A new HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 36 polyphenols in blueberry, strawberry and their commercial products and determination of antioxidant activity. *Food Chem.* (2022) 367:11. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130743
36. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* (1985) 24:119–24. doi: 10.1016/0378-4274(85)90046-3
37. Riddell RJ, Clothier RH, Balls M. An evaluation of 3 *in vitro* cytotoxicity assays. *Food Chem Toxicol.* (1986) 24:469–71. doi: 10.1016/0278-6915(86)90095-5
38. Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm.* (2005) 288:369–76. doi: 10.1016/j.ijpharm.2004.09.018
39. Zanette C, Pelin M, Crosera M, Adami G, Bovenzi M, Larese FF, et al. Silver nanoparticles exert a long-lasting antiproliferative effect on human keratinocyte HaCaT cell line. *Toxicol Vitro.* (2011) 25:1053–60. doi: 10.1016/j.tiv.2011.04.005
40. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival – application to proliferation and cyto-toxicity assays. *J Immunol Methods.* (1983) 65:55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
41. Präbst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hübner H. Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. In: Gilbert DF, Friedrich O editor. *Cell viability assays. Methods and protocols.* New York, NY: Springer (2017). doi: 10.1007/978-1-4939-6960-9_1
42. Fotakis G, Timbrell JA. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett.* (2006) 160:171–177. doi: 10.1016/j.toxlet.2005.07.001
43. Cásedas G, Les F, Choya-Foces C, Hugo M, López V. The metabolite urolithin-A ameliorates oxidative stress in neuro-2a cells, becoming a potential neuroprotective agent. *Antioxidants.* (2020) 9:16. doi: 10.3390/antiox9020177
44. Organization for Economic Cooperation and Development [OECD]. *OECD test No. 432: In vitro 3T3 NRU phototoxicity test. In: OECD guidelines for the testing of chemicals, section 4.* Paris: Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (2019). doi: 10.1787/9789264071162-en
45. Martínez V, Galbiati V, Corsini E, Martin-Venegas R, Vinardell MP, Mitjans M. Establishment of an *in vitro* photoassay using THP-1 cells and IL-8 to discriminate photoirritants from photoallergens. *Toxicol Vitro.* (2013) 27:1920–1927. doi: 10.1016/j.tiv.2013.06.013
46. Ferreira I, Silva A, Martins JD, Neves BM, Cruz MT. Nature and kinetics of redox imbalance triggered by respiratory and skin chemical sensitizers on the human monocytic cell line THP-1. *Redox Biol.* (2018) 16:75–86. doi: 10.1016/j.redox.2018.02.002
47. Hikmawanti NPE, Ramadon D, Jantan I, Mun'im A. Natural deep eutectic solvents (NADES): Phytochemical extraction performance enhancer for pharmaceutical and nutraceutical product development. *Plants Basel.* (2021) 10:2091. doi: 10.3390/plants10102091
48. da Costa RMG, Bastos MMSM, Oliveira PA, Lopes C. Bracken-associated human and animal health hazards: Chemical, biological and pathological evidence. *J Hazard Mater.* (2012) 203:1–12. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.12.046
49. O'Connor PJ, Alonso-Amelot ME, Roberts SA, Povey AC. The role of bracken fern illudanes in bracken fern-induced toxicities. *Mutat Res Rev Mutat Res.* (2019) 782:39. doi: 10.1016/j.mrrev.2019.05.001
50. Zivkovic S, Milutinovic M, Maksimovi V, Ciric A, Ivanov M, Bozunovic J, Banjanac T, Mistic D. Antioxidant and antimicrobial activity of two *Asplenium* species. *S Afr J Bot.* (2020) 132:180–187. doi: 10.1016/j.sajb.2020.03.034
51. Lai HY, Lim YY, Tan SP. Antioxidative, tyrosinase inhibiting and antibacterial activities of leaf extracts from medicinal ferns. *Biosci Biotechnol Biochem.* (2009) 73:1362–6. doi: 10.1271/bbb.90018
52. Dall'Acqua S, Tomè F, Vitalini S, Agradi E, Innocenti G. *In vitro* estrogenic activity of *Asplenium trichomanes* L. extracts and isolated compounds. *J Ethnopharmacol.* (2009) 122:424–9. doi: 10.1016/j.jep.2009.02.012
53. Zivkovic S, Skoric M, Siler B, Dmitrovic S, Filipovic B, Nikolic T, et al. Phytochemical characterization and antioxidant potential of rustyback fern (*Asplenium ceterach* L.). *Lekovite Sirovine.* (2017) 37:15–20. doi: 10.5937/leksi1737015Z
54. Durdevic L, Mitrovic M, Pavlovic P, Bojovic S, Jaric S, Oberan L, et al. Total phenolics and phenolic acids content in leaves, rhizomes and rhizosphere soil under *Ceterach officinarum* D.C., *Asplenium trichomanes* L. and *A. adiantum nigrum* L. in the gorge of sicevo (SERBIA). *Ekologia.* (2007) 26:164–73.
55. Valizadeh H, Sonboli A, Mahmoodi Kordi F, Babak Bahadori M. Cytotoxicity, antioxidant activity and phenolic content of eight fern species from North of Iran. *Pharm Sci.* (2015) 21:18–24. doi: 10.15171/PS.2015.12
56. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes.* (2015) 8:47. doi: 10.1186/s13104-015-1000-8
57. Karakas D, Ari F, Ulukaya E. The MTT viability assay yields strikingly false-positive viabilities although the cells are killed by some plant extracts. *Turk J Biol.* (2017) 41:919–25. doi: 10.3906/biy-1703-104
58. Petkov V, Batsalova T, Stoyanov P, Mladenova T, Kolchakova D, Argirova M, et al. Selective anticancer properties, proapoptotic and antibacterial potential of three *Asplenium* species. *Plants Basel.* (2021) 10:14. doi: 10.3390/plants10061053
59. Richter LHJ, Beck A, Flockerzi V, Maurer HH, Meyer MR. Cytotoxicity of new psychoactive substances and other drugs of abuse studied in human HepG2 cells using an adopted high content screening assay. *Toxicol Lett.* (2019) 301:79–89. doi: 10.1016/j.toxlet.2018.11.007
60. Brewer MS. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* (2011) 10:221–47. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x
61. Ding ZT, Fang YS, Tai ZG, Yang MH, Xu YQ, Li F, et al. Phenolic content and radical scavenging capacity of 31 species of ferns. *Fitoterapia.* (2008) 79:581–3. doi: 10.1016/j.fitote.2008.01.011
62. Gupta SK, Mitali G, Rajib B, Saha BK, Das AP, Palash M. Evaluation of *in vitro* antioxidant activity of methanolic extracts of some ferns from Mawsynram of Meghalaya, India. *Int J Curr Sci.* (2014) 12:87–97.
63. Berman B, Ellis C, Elmets C. *Polypodium leucotomos* – An overview of basic investigative findings. *J Drugs Dermatol.* (2016) 15:224–8.
64. Farràs A, Mitjans M, Maggi F, Caprioli G, Vinardell MP, López V. *Polypodium vulgare* L. (*Polypodiaceae*) as a source of bioactive compounds: Polyphenolic profile, cytotoxicity and cytoprotective properties in different cell lines. *Front Pharmacol.* (2021) 12:15. doi: 10.3389/fphar.2021.727528

Glossary

3T3 = NIH 3T3	NIH 3T3 mouse fibroblast cell line
A549	Human Caucasian lung carcinoma
ATM	Methanolic extract of <i>Asplenium trichomanes</i> L. fronds
COM	Methanolic extract of <i>Ceterach officinarum</i> L. fronds
CO ₂	Carbon dioxide
CPZ	Chlorpromazine hydrochloride
CV	Cell Viability
E	Ultraviolet dose
DCF	2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal Bovine Serum
FI	Fluorescence Intensity
HaCaT	Spontaneously immortalized human keratinocyte cell line
HeLa	Human cervix epitheloid carcinoma
HepG2	Human Caucasian hepatocyte carcinoma
HPLC-MS/MS	High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
MCF-7	Human Caucasian breast adenocarcinoma
MTT	2,5-diphenyl-3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) tetrazolium bromide or thiazolyl blue tetrazolium bromide
NR	Neutral Red
NRU	Neutral Red Uptake or uptake of the Neutral Red dye
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
PBS	Phosphate Buffered Saline
PLE	Aqueous extract of <i>Polypodium leucotomos</i> fronds
ROS	Reactive Oxygen Species
TLC	Thin Layer Chromatography
TFC	Total Flavonoids Content
TPC	Total Phenol/Polyphenol Content
UV	Ultraviolet
UVA	Ultraviolet A

Discusión global de los resultados obtenidos

“Sometimes scientific progress is not based on a discovery or the generation of new data but on a change of viewpoint that allows one to see a set of already existing data in a new light”

- Michael Reth.

De las distintas conceptualizaciones de la etnobotánica descritas por Harshberger, Portères, Schultes y Barrau, se concluye que la etnobotánica es una ciencia interdisciplinar que requiere la cooperación de investigaciones sociales (etnográficas y antropológicas) y de investigaciones de ciencias de la naturaleza (biodiversidad vegetal y farmacognosia) (Bonet Galobart & Vallès Xirau, 2006; Vallès & Garnatje, 2016). Por otro lado, los países que han incorporado a sus sistemas de salud la medicina tradicional y complementaria (MTC) siguiendo la estrategia de la Organización Mundial para la Salud (OMS) 2014-2023, han experimentado una reducción de la incidencia en enfermedades generalizadas, como es la hipertensión. De manera que determinados países ya han incluido medicamentos tradicionales en sus listas nacionales de medicamentos esenciales para mejorar el propio sistema de salud (World Health Organization, 2013). De ahí la importancia de realizar estudios etnobotánicos sobre la MTC, antes que estos conocimientos se pierdan por la falta de transmisión intergeneracional. Desde tiempos prehistóricos los humanos han empleado sustancias provenientes de la naturaleza para la prevención y tratamiento de enfermedades. Estos recursos con actividad biológica pueden obtenerse de fuentes diversas, como de plantas, animales, microorganismos y seres marinos. Ahora bien, al observar los tratamientos empleados en los principales sistemas de la medicina tradicional, como la China (es el caso de la Gusuibu), la Ayurveda, la Kampo, la Koreana y la Unani, la mayoría de estos recursos biológicamente activos son de origen vegetal. El aislamiento de la morfina de la cápsula del opio por Friedrich Sertürner en 1805, marcó un hito al ser la primera sustancia vegetal farmacológicamente activa aislada. Desde este momento, la medicina tradicional se ha posicionado como un valioso reservorio de conocimiento en el aislamiento de nuevos principios activos, entre los cuales destacan los fitoquímicos (Yuan, Ma, Ye, & Piao, 2016). Así, entre los años 1981 y 2010 de todos los fármacos incorporados en la *Food and Drug Administration* (FDA) la mayor parte fueron productos de origen natural (46%), mientras que el resto fueron fármacos sintéticos (33%), fármacos biológicos (15%) y vacunas (6%) (Newman & Cragg, 2012). Ahora bien, desde el año 2010 ha habido un retroceso en la aprobación de nuevos fármacos de origen natural de manera que, en 2021, únicamente representaron un 8% del total (de la Torre & Albericio, 2022).

Actualmente existen pocos trabajos de investigación que relacionen la actividad biológica de los helechos con sus usos medicinales si se compara el número con el de otras especies vegetales. En este sentido, Reinaldo et al. (Reinaldo, Santiago, Medeiros, & Albuquerque, 2015) concluyeron que las razones son desde un inapropiado método de registro de los usos etnobotánicos de los helechos, una percepción que los helechos son recursos naturales con baja eficacia en el tratamiento de alteraciones de la salud, hasta una presencia infravalorada de los helechos en las farmacopeas en relación con su diversidad. Las claves taxonómicas descritas para la identificación de las distintas especies de helechos mediante su esporófito es un hecho determinante para evitar posibles ambigüedades en su identificación. Como los helechos son plantas criptógamas, ya que se reproducen sexualmente por esporas y en consecuencia no presentan flores, frecuentemente se les consideran hierbas. Esto explica porque popularmente el helecho *P. vulgare* es conocido en catalán como *herba pigotera* (Batet et al., 2011a). Por otro lado, la transmisión de sus usos tradicionales suele ser fuente de discusión por varias razones, como son el uso de distintos nombres vulgares, bien en distintas regiones para una misma especie de helecho, o bien en las traducciones de textos antiguos en latín, como por ejemplo el caso de *A. trichomanes* (Fiorin et al., 2019). Por esta razón, al estudiar las propiedades de los helechos es fundamental identificar correctamente la especie por medio de los correspondientes esporófitos. Hecho que incrementa el grado de dificultad en la identificación respecto las fanerógamas (se reproducen sexualmente por semillas y en consecuencia presentan flores). En este trabajo, los cuatro helechos se identificaron mediante las técnicas taxonómicas descritas en el libro *Claves para la determinación de plantas vasculares* (Bonnier et al.,

2002). Posteriormente, mediante una muestra representativa de cada una de las frondes de las distintas especies de helechos seleccionados, el Dr. J. A. Vicente Orellana de la Universidad CEU San Pablo (Madrid, España) corroboró su identificación (ver **Figura 3**, **Tabla 2** del apartado introducción). De cada una de las especies del estudio, se incluyó una fronde desecada y correctamente identificada en el herbario de la Universidad San Jorge (Villanueva de Gállego, Zaragoza).

La selección de la droga vegetal es determinante en el aislamiento de los fitoquímicos, derivado que cada droga vegetal está especializada en determinadas funciones vegetales. En el caso de los helechos se ha descrito el uso de todas sus partes como drogas vegetales: frondes, tallo/raquis, rizoma e incluso la planta entera. En determinados estudios únicamente se emplean las esporas, como es en el caso de *P. vulgare*. Pero en la mayoría de los estudios etnobotánicos y de bioprospección de helechos de las familias *Polypodiaceae* y *Aspleniaceae*, las frondes son la mayor droga vegetal empleada en usos medicinales (Sureshkumar, Silambarasan, Bharati, Krupa, Amalraj, & Ayyanar, 2018). Durdevic et al determinaron que para los extractos de acetato de etilo de los helechos *A. adiantum-nigrum*, *A. trichomanes* y *C. officinarum*, helechos pertenecientes a la familia *Aspleniaceae*, los extractos de las frondes presentan una mayor cantidad de compuestos fenólicos que en los correspondientes extractos de los rizomas (Durdevic et al., 2007). Además, Durdevic et al. aislaron un mayor contenido de compuestos fenólicos libres (agliconas) que gliconas en las frondes de estos extractos. Hecho que refuerza la idea de que las frondes son de forma generalizada la droga vegetal con un mayor contenido fitoquímico con actividad antioxidante de los helechos.

La polaridad del disolvente de extracción es clave para determinar la naturaleza de los compuestos fenólicos a extraer, así como el tiempo de contacto del disolvente con la droga vegetal (Dimcheva & Karsheva, 2018; Zhou, Chen, Lin, Fang, & Shang, 2019). Por ejemplo, los extractos de frondes de helechos obtenidos con disolventes apolares como el éter dietílico, contienen fitoquímicos de naturaleza apolar como son los terpenos presentes en aceites esenciales, considerados valiosos recursos en la fabricación de fragancias por la sociedad francesa de perfumes (Froissard, Fons, Bessièrre, Buatois, & Rapior, 2011). Por otro lado, los helechos son conocidos por un amplio espectro de actividades biológicas, pero fundamentalmente la principal es su actividad antioxidante resultado de los numerosos estudios del extracto acuoso de las frondes de *Polypodium leucotomos* (Parrado et al., 2020). En nuestro caso, una vez desecadas las correspondientes frondes se han obtenido los correspondientes extractos metanólicos y hexánicos. Los extractos metanólicos han presentado para todas las especies un mejor rendimiento de extracción respecto el correspondiente extracto hexánico (inferior al 3%). También se ha observado que los valores de rendimiento de los extractos hexánicos son similares y no tanto en el caso de los metanólicos, presentando unos valores que oscilan en el rango del 15% al 30%, aproximadamente (**Tabla 1 de Farràs et al. 2019**) (Farràs, Cásedas, Les, Terrado, Mitjans, & López, 2019). Esto permite sugerir que, en el caso del extracto metanólico, el taxón de la familia de las especies analizadas no determina el rendimiento de extracción.

La naturaleza de las familias de los compuestos fenólicos del tipo ácidos fenólicos y flavonoides se ha evaluado mediante TLC con el indicador F254 (**Material Suplementario de Farràs et al. 2019**) (Farràs et al., 2019). Los extractos hexánicos presentan una reducida cantidad de polifenoles, sin embargo, mediante TLC únicamente se han determinado polifenoles en *C. officinarum* que son ácidos fenólicos. En el caso de *P. vulgare*, *A. adiantum-nigrum* y *A. trichomanes*, la reducida cantidad de compuestos fenólicos, junto con los distintos tipos de polifenoles que contienen, no permiten alcanzar el umbral mínimo de detección. En relación con los extractos metanólicos, los resultados de Folin-Ciocalteu indican que los polifenoles de todos los extractos contienen ácidos fenólicos (marcas

azules) a excepción de *A. trichomanes*, pero únicamente en *A. trichomanes* y *C. officinarum* se detectan flavonoides (marcas de color naranja y amarillo).

En un estudio etnofarmacológico de helechos de la India se han descrito los usos medicinales tradicionales de distintos helechos entre los cuales encontramos *P. vulgare*, *A. adiantum-nigrum*, *A. trichomanes* y *C. officinarum* (Sureshkumar et al., 2018). Hecho que refuerza la idea que los helechos son reservorios de fitoquímicos potencialmente aplicables en el campo sanitario. Así, antes de realizar ensayos *in vitro* en cultivos celulares, se ha evaluado la capacidad antioxidante y anti-tirosinasa *in chemico* de los correspondientes extractos metanólicos y hexánicos para seleccionar los extractos más interesantes en los estudios posteriores (van Tonder, Joubert, & Cromarty, 2015).

Los extractos generalmente contienen una mezcla de fitoquímicos por lo que su acción antioxidante se puede deber a más de un mecanismo. Por otro lado, ningún método antioxidante permite evaluar los distintos mecanismos de captación de radicales libres ni las distintas formas de ROS (formas radicalarias y formas no radicalarias). Por ello, es recomendable combinar al menos dos métodos antioxidantes que determinen la actividad antioxidante por mecanismos distintos (Formagio, Volobuff, Santiago, Cardoso, Vieira, & Valdevina Pereira, 2014). Actualmente para determinar la actividad antioxidante se han descrito distintos métodos *in chemico*, pues la simplicidad de estos métodos hace que sean apropiados como un paso previo a la posterior evaluación de los extractos *in vitro* (Carocho & Ferreira, 2013) y, además, permiten atribuir la actividad antioxidante exclusivamente a los fitoquímicos.

Así, para la evaluación de la actividad antioxidante se han seleccionado el ensayo *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH), el método *oxygen radical absorbance capacity* (ORAC) que determina la acción antioxidante mediante la transferencia del átomo de hidrógeno (Karadag, Ozcelik, & Saner, 2009), el ensayo enzimático de la *xanthine/xanthine oxidase* (X/XO) y, finalmente, el *total phenolic content* (TPC). El radical DPPH presenta una coloración violeta que en presencia de un agente antioxidante se reduce transformándose en DPPH-H, sustancia de coloración amarilla. A pesar de que inicialmente se determinó este ensayo como un TAH, actualmente es considerado un TUE, pues la transferencia del átomo de hidrógeno experimentada es considerada una reacción marginal del ensayo (Carocho et al., 2013). Este ensayo tiene la desventaja que evalúa la actividad antioxidante mediante un sustrato no fisiológico (DPPH) y, por lo tanto, se recomienda corroborar los resultados con otros métodos que determinen la capacidad antioxidante mediante la captación de radicales que se forman en condiciones fisiológicas. Por consiguiente, se ha evaluado la captación de los radicales fisiológicos peróxido y superóxido por los métodos ORAC y X/XO, respectivamente. De esta manera, ampliamos el estudio de la capacidad antioxidante de los extractos frente a diferentes radicales y mecanismos de acción. Es decir, mediante el método ORAC ensayamos la actividad antioxidante por TAH, mientras que por X/XO es por TUE.

Por otro lado, la determinación del contenido total de compuestos fenólicos, en inglés *total phenolic content* (TPC), no es un método directo, sino indirecto porque evalúa la cantidad total de compuestos fenólicos mediante generación de radicales superóxidos al oxidarse los componentes fenólicos por acción del reactivo de Folin-Ciocalteu. La existencia de una correlación positiva entre los resultados obtenidos con ORAC y TPC (**Figura 2.A (ORAC Vs TPC) de Farràs et al. 2019**) (Farràs et al., 2019) permite concluir que todos los extractos evaluados presentan una acción antioxidante tanto por TAH como por TUE por medio de los radicales fisiológicos peróxido y superóxido, respectivamente. Además, mediante los dos métodos la clasificación de los extractos en base a su actividad antioxidante es la misma, de manera que el extracto de *C. officinarum* es el más antioxidante, seguido de *P. vulgare*, luego de *A. adiantum-nigrum* y finalmente de *A. trichomanes*.

Esta correlación positiva de un método antioxidante directo con uno indirecto ya se ha descrito anteriormente en otros extractos de especies vegetales (Karadag et al., 2009).

Los fitoquímicos principalmente captan las especies radicalarias (acción antioxidante) por TAH o por TUE, donde el agente antioxidante se oxida, y el sustrato susceptible de ser oxidado finalmente se reduce. Al evaluar los resultados del ensayo DPPH se ha confirmado la actividad antioxidante de los cuatro extractos metanólicos mediante TUE por medio de un radical no fisiológico que es el radical DPPH. Por otro lado, la reactividad del radical superóxido es limitada a nivel fisiológico y se considera potencialmente citotóxico debido a su conversión a radical hidroxilo y anión peroxinitrito (Vrchovská et al., 2006). En tal caso se manifiesta el interés de realizar ensayos antioxidantes en los cuales participen el radical superóxido como son el X/XO y el TPC. Los resultados de actividad antioxidante en DPPH (IC₅₀: 0,036 mg/mL) y X/XO (IC₅₀: 0,047 mg/mL) del extracto metanólico de *A. trichomanes* indican que es el menos antioxidante de los cuatro ensayados (**Tabla 3, de Farràs et al. 2019**) (Farràs et al., 2019). Mientras que los extractos metanólicos de *P. vulgare*, *A. adiantum-nigrum* y *C. officinarum* presentan valores próximos o iguales entre sí, pero significativamente más antioxidantes (entre 4 a 5 veces mayor) que los del extracto metanólico de *A. trichomanes*. Es interesante destacar que los valores de actividad antioxidante obtenidos por DPPH, ORAC y TPC de nuestros extractos metanólicos son equiparables a los obtenidos por Langhansova et al. (Langhansova et al., 2021), y que Petkov et al. (Petkov, Slavova, Teneva, Mladenova, Stoyanov, & Argirova, 2021) también han descrito una mayor actividad antioxidante para *C. officinarum* respecto *A. trichomanes*, a pesar que los factores bióticos y abióticos pueden alterar el metabolismo secundario de los vegetales y, por lo tanto, la composición y la capacidad antioxidante de los extractos.

La menor actividad antioxidante obtenida para los extractos hexánicos, atribuida a la no detección de compuestos fenólicos excepto en el caso de *C. officinarum* y los resultados de Hammami et al. (2016) en DPPH y TPC para extractos de acetato de etilo de las frondes de *A. adiantum-nigrum* y *A. trichomanes* (Hammami et al., 2016), indican que la gran parte de polifenoles de estos helechos se extrae mediante disolventes polares. Los disolventes de extracción de fitoquímicos de las plantas se seleccionan en base a la polaridad de los fitoquímicos a aislar. A pesar de que los fitoquímicos con capacidad antioxidante son mayoritariamente estructuras polares, es recomendable en los estudios iniciales ensayar la actividad antioxidante *in chemico* de extractos de distinta polaridad para una misma droga vegetal (Altemimi, Lakhssassi, Baharlouei, Watson, & Lightfoot, 2017). La reducida actividad antioxidante en los tres ensayos *in chemico* (DPPH, ORAC y X/XO) de los extractos hexánicos juntamente con los resultados de TPC y TLC, justifica que los ensayos *in vitro* únicamente se hayan realizado en los extractos metanólicos.

A nivel fisiológico la enzima clave en la ruta biosintética en la producción de melanina es la tirosinasa. Esta enzima actúa en distintos niveles en este proceso, siendo el paso determinante la oxidación de la L-DOPA a dopaquinona (Manap, Lum, Ong, Tang, Gew, & Chia, 2021). Actualmente, se han descrito efectos adversos nocivos de determinados inhibidores de la enzima tirosinasa que son referentes en el campo de la despigmentación, como es el caso de la arbutina, un inhibidor que actúa como sustrato de la reacción (Solimine et al., 2016). No obstante, inhibidores directos de la tirosinasa mediante la quelación de los iones de cobre del sitio activo (Zolghadri et al., 2019), como el ácido kójico, no han presentado dichos efectos. Por ello, existe un gran interés en el campo de la despigmentación en descubrir nuevos fitoquímicos con capacidad de inhibir la actividad de la tirosinasa, como es el caso de distintos flavonoles como la quercetina y el kaempferol.

Determinados estudios vinculan la actividad antioxidante como determinante en la actividad anti-tirosinasa. En nuestro caso, solamente *P. vulgare* ha demostrado actividad anti-tirosinasa en sus

ambos extractos ensayados. Corroborando las observaciones de Lai et al. (2009) (Lai, Lim, & Tan, 2009) que en su estudio con extractos metanólicos de las frondes de *Cibotium barometz* (L.) J. Sm. (*Cibotiaceae*) y *Dicranopteris linearis* (Burm. f.) Underw. (*Gleicheniaceae*), describieron una notable actividad antioxidante, pero una actividad anti-tirosinasa no relevante.

Wu et al. 2017 (Wu, Li, Wang, Cao, Cao, & Xiao, 2017) han confirmado que las frondes son la parte más efectiva en la actividad anti-tirosinasa de los helechos. En este estudio se vincula la actividad anti-tirosinasa del extracto etanólico de las frondes de *Odontosoria chusana* (L.) Masam. (*Lindsaeaceae*); sinónimo de *Stenoloma chusanum* (L.) Ching (*Lindsaeaceae*), al flavonol kaempferol y la flavona luteolina-7-O-glucósido. El extracto metanólico de *P. vulgare* presenta los flavonoles rutina y kaempferol-3-glucósido en cantidades relevantes (388,8 y 127,5 mg/kg extracto seco respectivamente) por la cantidad de flavonoides determinados en HPLC-MS/MS (917,3 mg flavonoides/kg extracto seco), por lo que se puede sugerir que son los responsables de la actividad anti-tirosinasa que ha presentado este extracto. En sentido opuesto, el hecho de que el extracto metanólico de *A. trichomanes* sea el extracto con una mayor cantidad de flavonoles (68,8% en HPLC-MS/MS, con un total de 3192,0 mg flavonoles/kg extracto seco) entre los cuales destaca el hiperósido y la isoquercitrina, justifica su baja actividad anti-tirosinasa. Además, ATM no presenta una cantidad relevante de flavonoles del tipo aglicona con actividad anti-tirosinasa como la miricetina, kaempferol, quercetina, morina, isorhamnetina, galangina o sus glucósidos (Zolghadri et al., 2019). Por otro lado, está descrito que los flavonoles requieren tener el radical hidroxilo en el carbono 3 del anillo C para presentar una potente actividad anti-tirosinasa (Kim & Uyama, 2005). Así, los derivados 3-O-glucósidos de kaempferol y quercetina presentan una reducida capacidad anti-tirosinasa en comparación con las respectivas agliconas. No obstante, las gliconas de las respectivas agliconas de los flavonoles con actividad anti-tirosinasa, como es el caso de la luteolina-7-O-glucósido, no conlleva a la pérdida de esta actividad.

Generalmente los metabolitos primarios de las especies vegetales carecen de interés farmacológico derivado de la ausencia de actividad biológica. En cambio, los metabolitos provenientes del metabolismo secundario, constituido principalmente por compuestos fenólicos, terpenos y alcaloides, son compuestos bioactivos ya que presentan actividad o modulan funcionalidades en los seres vivos. Estos metabolitos reciben el nombre de fitoquímicos (Shrinet, Singh, Chaurasia, Tripathi, & Kumar, 2021) y se generan en respuesta a la interacción del genoma de la planta con el medio ambiente para favorecer la supervivencia y adaptación de la propia especie (de Araújo, Farias, Neri-Numa, & Pastore, 2021).

Los polifenoles son los fitoquímicos con una mayor actividad *in vitro* e *in vivo* en la prevención y tratamiento de enfermedades humanas relacionadas con el estrés oxidativo. Su actividad antioxidante se debe a su estructura química, fundamentada en un anillo aromático con un mínimo de un grupo hidroxilo. Así, una dieta rica en polifenoles, como es la dieta Mediterránea, mejora la respuesta defensiva del organismo frente al daño oxidativo (Costa et al., 2017; Williamson, 2017).

Los polifenoles se clasifican en ácidos fenólicos y flavonoides con sus consecuentes derivados como son los lignanos y estilbenos entre otros fitoquímicos (Shahidi et al., 2015). En el caso de las frondes de los helechos, generalmente se atribuye su capacidad antioxidante a ácidos fenólicos y flavonoides (Aulakh, Kaur, & Saggoo, 2019; Ding et al., 2008). Por esta razón, en los estudios por HPLC-DAD de los extractos metanólicos, se ha optado por la determinación de fitoquímicos pertenecientes a ácidos fenólicos (6 fitoquímicos), flavonoides (6 fitoquímicos) y derivados de fenilpropano (3 fitoquímicos). La fitocaracterización de estos 15 fitoquímicos (**Apéndice 1**) de los extractos metanólicos de *P. vulgare*, *A. adiantum-nigrum*, *A. trichomanes* y *C. officinarum*, permiten

esclarecer la naturaleza de los compuestos fenólicos de estos cuatro extractos polares (Caprioli et al., 2016).

En todos los extractos metanólicos la cantidad del fitoquímico mayoritario, independientemente de cuál, ha representado una elevada proporción en comparación con el resto de fitoquímicos determinados en HPLC-DAD. A la vez, la naturaleza del fitoquímico mayoritario ha resultado ser de la misma naturaleza que los fitoquímicos fitocaracterizados en TLC. Así, el fitoquímico principal determinado por HPLC-DAD en *P. vulgare* es el ácido 3-O-cafeoilquínico (75,5% del total), en *A. adiantum-nigrum* es el ácido gálico (39,2% del total), en *A. trichomanes* es la rutina (44,0% del total) y en *C. officinarum* es el ácido 3-O-cafeoilquínico (80,3% del total). Por otro lado, las especies de *Aspleniaceae* son consideradas reservorios de flavonoides (Iwashina & Matsumoto, 2011), pero únicamente en *A. trichomanes* han sido los principales fitoquímicos detectados corroborando estudios previos (Dall'Acqua, Tomè, Vitalini, Agradi, & Innocenti, 2009). En cambio, en el caso de las otras especies estudiadas en este trabajo los fitoquímicos principales han sido ácidos fenólicos. Así, los extractos de *P. vulgare* y *C. officinarum* se pueden considerar un reservorio de derivados de ácido cinámico (principalmente de ácido 3-O-cafeoilquínico), mientras el extracto de *A. adiantum-nigrum* como un reservorio de derivados de ácido benzoico (principalmente de ácido gálico y ácido sikímico). Estos resultados llevan a concluir que la pertenencia a una familia botánica específica no determina la composición fitoquímica de los extractos.

Los flavonoles son los principales flavonoides aislados en diversos helechos usados tradicionalmente en China como hierbas medicinales (Xia, Cao, Zheng, Wang, & Xiao, 2014). De manera similar, estos fitoquímicos son también los detectados principalmente mediante HPLC-DAD en el extracto metanólico de *A. trichomanes*, específicamente rutina y quercitrina, y en el caso de *P. vulgare* y *C. officinarum* son el ácido cinámico ácido 3-O-cafeoilquínico seguido del flavanol (-)-epicatequina los más detectados. Esto sugiere que, en un helecho con una composición fenólica predominante de ácidos fenólicos, si se aíslan también flavonoides, estos serán principalmente flavanoles en lugar de flavonoles.

Del total de compuestos fenólicos identificados con HPLC-DAD (**Apéndice 1**), los únicos helechos que presentan un contenido total similar son *P. vulgare* y *C. officinarum*. En cambio, los tres helechos de la familia *Aspleniaceae* presentan un contenido diferente entre ellas. Si ordenamos estas especies en orden decreciente según el contenido de total de polifenoles determinado por HPLC-DAD en *C. officinarum* es el que presenta más (69.246,2 mg polifenoles/kg extracto seco), seguido de *A. trichomanes* (46.255,8 mg polifenoles/kg extracto seco) y finalmente *A. adiantum-nigrum* (23.954,4 mg polifenoles/kg extracto seco), que es el mismo orden descrito por Durdevic et al. (Durdevic et al., 2007) por los extractos de etilacetato de las frondes de estas tres especies *Aspleniaceae*.

Actualmente el HPLC-DAD es una técnica ampliamente empleada en la fitocaracterización inicial de fitoquímicos. No obstante, la identificación por superposición de picos puede dar lugar a una identificación incorrecta ya que el pico no es específico de cada fitoquímico, sino que puede ser de uno estructuralmente relacionado. Por ello, se requiere el uso de otra metodología, como es la técnica HPLC-MS/MS. Además, este tipo de doble detección ya se realizó con el extracto acuoso de las frondes de *Polypodium leucotomos* (García et al., 2006) y permite ampliar tanto la cantidad como los grupos de familias de fitoquímicos a determinar. Con ambas técnicas de fitocaracterización HPLC se han determinado los ácidos fenólicos ácido gálico, ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido neoclorogénico), ácido 3-O-cafeoilquínico (ácido clorogénico) y ácido 3,5-di-O-cafeoilquínico, así como los flavonoides rutina, quercitrina, hiperósido, catequina, epicatequina y naringenina.

En el **Apéndice 2**, se muestran los fitoquímicos aislados de los cuatro extractos metanólicos de los helechos en HPLC-MS/MS. La diferencia principal respecto a HPLC-DAD, es que en *A. adiantum-nigrum* la mayor cantidad de ácidos fenólicos son derivados de ácido cinámico, pero en una proporción reducida respecto los extractos de *P. vulgare* y *C. officinarum*. De manera que en los extractos metanólicos de los helechos *P. vulgare*, *A. adiantum-nigrum* y *C. officinarum*, el principal fitoquímico detectado mediante HPLC-MS/MS, es el ácido clorogénico. Esto explica la elevada actividad antioxidante determinada por DPPH y X/XO que presentan estos tres extractos. Por otro lado, la actividad antioxidante de estos mismos extractos mediante el método DPPH es menor en *A. trichomanes*, que es el extracto que presenta una menor cantidad de ácido clorogénico en HPLC-DAD y HPLC-MS/MS. Esta actividad antioxidante del ácido clorogénico ya se ha demostrado en el extracto acuoso de las frondes de *Polypodium leucotomos* (Gombau et al., 2006).

Otra diferencia en ambos ensayos HPLC es que el ácido gálico y la catequina son fitoquímicos con cantidades relevantes en *P. vulgare* y *A. adiantum-nigrum* mediante HPLC-DAD, en cambio mediante HPLC-MS/MS son residuales o en el caso de la catequina no detectados en *A. adiantum-nigrum*. En el caso del hiperósido, mediante las dos técnicas de HPLC, es un componente residual tanto en *P. vulgare* como en *A. adiantum-nigrum*. No sucede así en *A. trichomanes* y *C. officinarum* ya que el hiperósido no se ha aislado en HPLC-DAD y es un compuesto relevante en HPLC-MS/MS. Es relevante la distinta proporción del total del extracto y cantidad total del ácido clorogénico (ácido 3-O-cafeoilquínico) en *A. adiantum-nigrum* determinado en HPLC-DAD y HPLC-MS/MS. Finalmente, la naringenina no es un compuesto relevante en *C. officinarum* en HPLC-DAD, mientras que en HPLC-MS/MS sí lo es. A pesar de estas discrepancias, ambos análisis de fitocaracterización concuerdan con el grupo de fitoquímicos para un mismo extracto.

Únicamente se ha analizado la viabilidad celular *in vitro* obtenida mediante MTT, ya que los resultados obtenidos con el ensayo NRU no muestran diferencias independientemente de las condiciones ensayadas. Por lo tanto, podemos concluir que el NRU no es un ensayo adecuado para evaluar la citotoxicidad de los extractos metanólicos de los helechos del presente trabajo. Se han descrito distintos factores limitantes del método NRU, como son la insolubilidad de la muestra a analizar y la formación de cristales del colorante neutral red (Stokes, Casati, Strickland, & Paris, 2008).

Determinadas familias de fitoquímicos son importantes agentes antioxidantes que ya se utilizan como agentes activos frente el mantenimiento o reparación de la homeostasis redox del sistema tegumentario del organismo, bien aislados o bien en forma de extractos (Evans et al., 2010). En este sentido, se han descrito las propiedades beneficiosas del extracto acuoso de las frondes de *Polypodium leucotomos* (*Polypodiaceae*) como fotoprotector y adyuvante potencial en fototerapia para diversas enfermedades de la piel (González, Gilaberte, & Philips, 2010).

Actualmente son pocos los estudios de toxicidad de helechos en líneas celulares y predominan los ensayos realizados en organismos invertebrados como el ensayo de toxicidad en *Artemia salina* (Valizadeh, Sonboli, Mahmoodi Kordi, & Babak Bahadori, 2015). Por ello la caracterización del comportamiento de los extractos de los helechos en líneas celulares, más si son humanas, permitirá entender mejor sus usos actuales y potenciales. Así, la línea 3T3 está recomendada por el *US National Institute of Environmental Health Sciences, Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM)* para la evaluación de la citotoxicidad basal (Ponnusamy, Chear, Ramanathan, & Lai, 2015). No obstante, actualmente se recomienda en los ensayos de citotoxicidad para aplicaciones de la piel usar la combinación de líneas celulares de origen biológico distinto y de distinta naturaleza-distribución en la piel. Así el uso de los ensayos de citotoxicidad en

3T3 y HaCaT permiten obtener una valoración generalizada de la citotoxicidad y fototoxicidad en el estudio de extractos para aplicaciones dermatológicas (Liang, Wang, & Xiao, 2021).

En el caso de nuestros helechos, los extractos metanólicos han inducido una reducción de la viabilidad en las dos líneas celulares no tumorales ensayadas a partir de 1 mg/mL, excepto en el caso de *A. adiantum-nigrum* que muestra la máxima citotoxicidad en 3T3 a 0,1 mg/mL. Que justamente es el extracto metanólico con una menor cantidad de compuestos fenólicos y con una mayor proporción de derivados de ácido benzoico determinados en HPLC-DAD como también en HPLC-MS/MS. Esta reducción de la viabilidad celular es más evidente en el caso de *P. vulgare*, extracto en el cual la mayor parte de los fitoquímicos determinados en HPLC-DAD son derivados de ácido cinámico (76,0% del total), que es el extracto más citotóxico, mientras que los otros extractos podemos considerarlos seguros. De manera similar, el extracto metanólico de las frondes de *Dicranopteris linearis* (Burm. f.) Underw. (*Gleicheniaceae*) a una máxima concentración de 500 µg/mL no provocó citotoxicidad en los fibroblastos 3T3 (Ponnusamy et al., 2015), pero sí capacidad de reparación celular y por lo tanto su uso potencial en el tratamiento cicatrizante. En el caso del extracto de diclorometano de las frondes de *Ophioglossum vulgatum* L. (*Ophioglossaceae*) se determinó su efecto como cicatrizante en los queratinocitos HaCaT (Clericuzio et al., 2014). En estudios previos de citotoxicidad de distintos helechos, se ha observado que un mayor contenido de flavonoides induce un mayor grado de citotoxicidad (Sukumaran & Kuttan, 1991), el cual se atribuye al efecto prooxidante inducido por estos fitoquímicos. Esta observación explicaría la disminución de la viabilidad celular a 1 mg/mL de los extractos metanólicos de los cuatro helechos ensayados, y a la vez indica que nuestros extractos son suficientemente seguros, ya que esta elevada concentración raramente va a ser empleada en formulaciones o preparados.

Por otro lado, utilizando métodos similares y con un extracto de la droga vegetal de la misma naturaleza, Petkov et al. (V. Petkov et al., 2021), describe una leve disminución de la viabilidad celular por MTT en 3T3 en presencia de 100 µg/mL de *A. trichomanes* que no se detecta en *C. officinarum*. En nuestro caso, una disminución similar se observa para estos dos extractos de helechos, pero a una concentración diez veces más elevada. Ello se podría atribuir a un distinto origen de la droga vegetal, porque el metabolismo secundario estaría afectado y, por lo tanto, la composición de metabolitos secundarios en los extractos sería diferente afectando a las capacidades citotóxicas de *A. trichomanes*. Sin embargo, esto no explicaría el caso de *C. officinarum* por lo que otras variables difíciles de controlar han de considerarse, por ejemplo, factores abióticos como el tiempo de recolección de los helechos. En este sentido, se ha descrito que una mayor exposición solar junto con una baja humedad del suelo favorece la acumulación de flavonoides por su acción fotoprotectora en los vegetales (Wu et al., 2017).

En las últimas décadas se ha registrado un aumento del cáncer de piel del tipo no melanoma que se ha relacionado con un aumento a la exposición solar y a una mayor esperanza de vida (Rubió-Casadevall et al. 2016). La exposición solar induce un incremento de especies reactivas de oxígeno que supera la capacidad de los sistemas de defensa antioxidante de la piel provocando la alteración de las biomoléculas y la modulación de factores nucleares como el NF-kB. Por otro lado, el espectro UVA no solo representa la gran parte de la luz solar diaria total, sino que penetra profundamente en la piel por lo que tradicionalmente la capacidad fotoprotectora se ha centrado más en esta radiación. A todo esto, existe una preocupación acerca la seguridad y la toxicidad que presentan los fotoprotectores tradicionales formulados con TiO₂ o ZnO, por lo que la utilización de antioxidantes centra la nueva estrategia de protección solar (Dunaway, Odin, Zhou, Ji, Zhang, & Kadearo, 2018). En este sentido, los helechos son una fuente de gran interés para el descubrimiento de nuevas

moléculas para usos medicinales o cosméticos y por lo tanto también con potenciales usos en fotoprotección.

Diversidad de especies de helechos se han estudiado como plantas medicinales en el tratamiento de diversas afecciones de la piel, como son *Adiantum capillus-veneris* L. (*Pteridaceae*) y *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn (*Dennstaedtiaceae*) (Abbasi, Khan, Ahmad, Zafar, Jahan, & Sultana, 2010). No obstante, actualmente el helecho que presenta más estudios en el campo de la fotoprotección es el extracto acuoso de las frondes de *P. leucotomos* (González et al., 2010; Palomino, 2014). Su acción fotoprotectora radica principalmente en su composición en ácidos fenólicos, derivados de ácido benzoico y derivados de ácido cinámico, que le confieren una potente acción antioxidante (Aguilera et al., 2021). Además, se ha descrito que el ácido clorogénico entre otros ácidos fenólicos son metabolitos secundarios relacionados con la fotoprotección de las plantas (Gombau et al., 2006). En nuestro caso, hemos detectado mediante HPLC-MS/MS una elevada cantidad de ácido clorogénico en *P. vulgare*, *A. adiantum-nigrum* y *C. officinarum* indicando un posible potencial uso en el campo de la fotoprotección. Para ello, previamente se ha descartado un efecto fototóxico mediante el ensayo de fototoxicidad en fibroblastos 3T3 y queratinocitos HaCaT.

De los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, comprobamos que la citotoxicidad inducida por los extractos cuando las células están expuestas a la luz UVA, necesitan compararse con células expuestas a las mismas condiciones exceptuando la irradiación. Un menor tiempo de contacto de los extractos con las células, diferencias en el medio de cultivo utilizado, pequeños cambios de temperatura durante la irradiación, los cambios de ubicación, así como el número de lavados son factores que han de considerarse y que pueden provocar variaciones en la viabilidad celular. Por esta razón, los resultados de citotoxicidad a 24 horas no se pueden utilizar como controles no irradiados.

La generación de ROS después de la irradiación con luz UV es conocida y se ha relacionado con la destrucción de elementos celulares clave (Gegotek et al 2016). Los estudios de fototoxicidad *in vitro* suelen centrarse en el espectro UVA a pesar de que la elevada citotoxicidad asociada a UVB es conocida, puesto que la mayoría de los compuestos fototóxicos absorben en la región del espectro UVA (Ceridono et al., 2012; OECD, 2019). A su vez, los fibroblastos son muy sensibles a la radiación UVB por lo que se podrían interpretar incorrectamente los resultados (Ceridono et al., 2012).

En este ensayo, las células irradiadas incubadas en el vehículo presentan una disminución de la viabilidad de aproximadamente el 30% respecto a las células no irradiadas tanto en el caso de las 3T3 como de las HaCaT. Aunque esta disminución es algo superior a lo deseable ($\leq 20\%$, OECD 2019), sí se pueden evaluar los efectos de fototoxicidad inducidos por el control positivo clorpromazina (CPZ) que disminuye la viabilidad de las 3T3 ($\sim 70\%$) y las HaCaT ($\sim 90\%$) expuestas a UVA de manera muy significativa respecto a las células control irradiadas. Por esta razón, los resultados obtenidos deben tratarse con cautela y no podemos tratarlos como totalmente concluyentes. Ahora bien, se intuye que los extractos, en general, no presentan efectos fototóxicos evidentes a excepción de *P. vulgare* a la concentración de 0,1 mg/mL en ambas líneas celulares ensayadas y ATM a 1 mg/mL únicamente en HaCaT. Este comportamiento fototóxico podría deberse a la presencia de rutina. Un flavonol descrito como un importante agente protector frente el estrés oxidativo, pero del cual también se han descrito efectos toxicológicos (Gegotek, Jarocka-Karpowicz, & Skrzydlewska, 2020). No obstante, el hecho de la elevada cantidad de compuestos fenólicos en *P. vulgare* juntamente con la relevante cantidad de rutina (388,8 mg/kg extracto seco en HPLC-MS/MS) puede ser un desencadenante de efectos prooxidantes.

Por otro lado, el caso de *A. adiantum-nigrum* es sorprendente, ya que las 3T3 expuestas a este extracto y no irradiadas presentan un incremento de viabilidad celular que a la concentración de 0,1

mg/mL (197,2% viabilidad celular) es casi el doble de la viabilidad celular del control negativo de DMEM no irradiado. Este aumento no es tan evidente cuando las células están expuestas a la luz.

Estos resultados permiten hipotetizar que se podría evaluar la capacidad fotoprotectora o fotoreparadora de los extractos frente a un compuesto de referencia, evaluando otros marcadores de muerte o daño celular (Thiesen et al., 2017; Tomasello, Malfa, Acquaviva, La Mantia, & Di Giacomo, 2022). Además, el hecho que se observe una elevada viabilidad en condiciones de oscuridad, sobre todo en el caso de AAM, sugiere que los extractos pueden tener efectos proliferativos a tiempos de contacto más cortos que a los tiempos de contacto en el ensayo de citotoxicidad.

En el proceso de obtención de ATP de la cadena respiratoria mitocondrial se generan continuamente ROS. El desequilibrio por un exceso de ROS en situación fisiológica induce a la activación del propio sistema antioxidante. En el caso de no revertirse la situación, el propio estrés oxidativo termina desencadenando el daño oxidativo a nivel de biomoléculas hasta el punto de alterar las membranas celulares con la consecuente muerte celular y disminución de ROS (Pisoschi, Pop, Iordache, Stanca, Predoi, & Serban, 2021). Por esta razón, en los ensayos de detección de ROS es importante controlar la viabilidad celular y no atribuir de manera incorrecta una posible disminución de ROS a la actividad de la muestra a analizar. La sensibilidad de las líneas celulares utilizadas en este ensayo, basada en los niveles de ROS determinados en las células tratadas con la misma concentración de H₂O₂, muestra que las 3T3 parecen más sensibles que HaCaT. Por otro lado, la inspección microscópica realizada sistemáticamente antes de la determinación de ROS confirmó una menor viabilidad celular de las 3T3 tratadas respecto el correspondiente control, sobre todo a 2 mM H₂O₂, que no se observó en HaCaT. De ello se concluye que la disminución de ROS observada en 3T3 a 2 mM H₂O₂ no se puede atribuir únicamente al extracto, sino también a la citotoxicidad inducida por el propio agente oxidante. En consecuencia, el ROS determinado en el control en 3T3 a 2 mM H₂O₂ es inferior al determinado en el control en 3T3 a 1 mM H₂O₂.

En el caso de los extractos *P. vulgare* y *C. officinarum*, se observa que en las 3T3 tratadas con 1 mg/mL del extracto y 1 mM H₂O₂, hay una disminución de ROS que puede atribuirse a un efecto protector o a la muerte celular puesto que a esta concentración en el ensayo de citotoxicidad en ambos extractos la disminución de la viabilidad celular no es muy elevada. Estos dos extractos además de presentar una composición fitoquímica similar son los que tienen una mayor concentración de TPC. Sin embargo, esta elevada cantidad de TPC podría transformar los efectos antioxidantes del extracto a efectos prooxidantes cuando se aplique a concentraciones elevadas, tal y como se ha descrito para el trolox en la línea celular HaCaT (Giordano, Caricato, & Lionetto, 2020).

Por otro lado, el incremento de la concentración del extracto de *A. adiantum-nigrum* ha comportado un incremento de ROS que supera los valores obtenidos para los controles positivos. Hecho que va en línea con los valores de viabilidad celular de los controles no irradiados en las muestras de *A. adiantum-nigrum* ensayadas en ambas líneas celulares. En este caso sería interesante la realización del ensayo de biogénesis mitocondrial o la determinación de la actividad mitocondrial, ya que el ensayo de MTT no es específico.

Finalmente, el extracto de *A. trichomanes* en el ensayo ROS en 3T3 presenta un comportamiento similar al de *A. adiantum-nigrum*. En el cual ambos extractos no inducen variaciones significativas de ROS con el incremento de la concentración del extracto. El hecho que estos dos extractos presenten una menor cantidad TPC que *P. vulgare* y *C. officinarum*, indica que posiblemente no deben producirse efectos prooxidantes. No obstante, el distinto comportamiento citotóxico y en el ensayo ROS en HaCaT de los extractos de *A. trichomanes* y *A. adiantum-nigrum* puede deberse a que su distinta naturaleza de los compuestos fenólicos comporte efectos distintos en esta línea celular. Así,

A. trichomanes es rico en flavonoides (especialmente derivados de flavonol, 68,8% del total de compuestos fenólicos determinados en HLC-MS/MS), mientras *A. adiantum-nigrum* es rico en ácidos fenólicos (especialmente derivados de ácido cinámico, pero también de derivados de ácido benzoico con un 54,4% y un 26,7% del total de compuestos fenólicos determinados en HPLC-MS/MS, respectivamente).

La radiación solar puede alterar la homeostasis redox ya que al penetrar en la piel induce que el radical superóxido se transforme mediante la reacción de Haber-Weiss en combinación con la reacción de Fenton al radical hidroxilo, que es un potencial agente citotóxico (Bickers & Athar, 2006). Es decir, los valores obtenidos en ROS deben presentar una misma tendencia a los observados en el ensayo de fototoxicidad. Así, en el ensayo de fototoxicidad se podría relacionar la viabilidad celular con la producción de ROS. Sin embargo, esta hipótesis se debería confirmar a través de la monitorización de la formación de ROS en las células no expuestas y expuestas a la irradiación UVA, así como la evaluación de otros marcadores de lesión y muerte celular o activación de vías intracelulares de transcripción de enzimas detoxificantes (Liberti, Alfieri, Monti, Panzella, & Napolitano, 2020) que permitan relacionar nuestras observaciones, tal y como se ha comentado anteriormente.

Los polifenoles, en especial los ácidos fenólicos y los flavonoides, son fitoquímicos de referencia en variedad de extractos en los estudios de citoprotección, entre los cuales destacan los de los frutos secos. Así, en una revisión sobre la actividad antioxidante de los frutos secos se ha confirmado que los polifenoles ejercen su actividad antioxidante tanto por métodos directos (neutralizando radicales libres con el posterior bloqueo de la cascada ROS) como indirectos (estimulando los sistemas antioxidantes endógenos enzimáticos y no enzimáticos) (Rusu, Gheldiu, Mocan, Vlase, & Popa, 2018). Actualmente, los estudios *in vitro* que demuestran las actividades biológicas de los helechos con su utilización documentada en medicina tradicional y complementaria es todavía muy residual. No obstante, la mayoría de los ensayos de protección de los helechos focalizan su bioactividad protectora en la fracción fenólica (Cao et al., 2017).

En esta primera bioprospección sobre la actividad protectora de los cuatro principales helechos de las montañas de Prades, se ha focalizado en determinar el potencial interés de los correspondientes extractos metanólicos. El peróxido de hidrógeno es un inductor de estrés oxidativo ampliamente empleado en la evaluación de extractos de vegetales debido a la permeabilidad de la membrana celular a este sustrato y su posterior conversión en radical hidroxilo, el cual es capaz de inducir daños en el ADN. Así, de manera similar a la descrita para el extracto acuoso de las hojas del té blanco (Yen, Chyau, Lee, Chu, Chang, & Duh, 2013), se ha evaluado la capacidad citoprotectora de los extractos frente H₂O₂ en fibroblastos y queratinocitos (Dutta, Markhoff, Suter, Rezwan, & Brüggemann, 2021). Por otro lado, los ensayos de protección celular pueden evaluar distintos parámetros según el diseño experimental escogido. Así, en el caso de una incubación previa de las células con la muestra en estudio antes de provocar el estrés oxidativo, evaluamos la capacidad de prevención del daño celular: pre-tratamiento. El ensayo también puede evaluar la capacidad de inactivación al introducir conjuntamente la muestra a ensayar y el agente oxidante o co-tratamiento. Finalmente, mediante un post-tratamiento se ensaya la capacidad de reparación celular y contempla añadir el extracto después de provocar la lesión celular por parte del agente oxidante. Generalmente el post-tratamiento presenta buenos resultados únicamente en el caso que se hayan obtenido resultados protectores en el pre-tratamiento, ya que se requiere mayor potencia al activar mecanismos reparadores y no protectores (Siddiqui et al., 2011).

La hipótesis de partida es que la elevada cantidad de compuestos fenólicos determinados mediante HPLC-DAD y HPLC-MS/MS confiere a los extractos metanólicos una actividad protectora. Así, en nuestras condiciones, los resultados del ensayo de pre-tratamiento indican, que en general, se observa algún efecto protector en el caso de 3T3 debido, probablemente, a una mayor citotoxicidad del H₂O₂ en esta línea celular. En el caso de las HaCaT no observamos ningún efecto protector que sea significativo. Esta mayor sensibilidad de la línea 3T3 a los extractos metanólicos concuerda con los resultados del ensayo ROS. Por otro lado, para considerar un efecto citoprotector efectivo se ha considerado un porcentaje igual o superior al 30% de citoprotección, con el fin de descartar un aumento de la viabilidad celular fortuito del propio procedimiento, como previamente se ha descrito (Farràs, Mitjans, Maggi, Caprioli, Vinardell, & López, 2021). Esta situación únicamente sucede en el caso de 3T3 en presencia de 1 mg/mL de *A. adiantum-nigrum*, que es el extracto con menor cantidad de compuestos fenólicos aislados. Esta observación sugiere que el responsable de esta actividad citoprotectora sea algún otro fitoquímico con una estructura químicamente distinta a la de los fitoquímicos analizados en HPLC-DAD y HPLC-MS/MS. En este ensayo, los extractos de *P. vulgare* y *C. officinarum* también presentan un comportamiento similar, tal y como ya se ha observado en ensayos anteriores, y en el cual el máximo efecto citoprotector para 3T3, aunque muy leve, se observa a 0,1 mg/mL. El extracto de *A. trichomanes* muestra un aumento no significativo de la viabilidad celular a 1 mg/mL.

El ligero efecto protector observado en los fibroblastos 3T3 es indicativo que posiblemente estos extractos también presenten efectos reparadores, pues los fibroblastos están involucrados en los procesos de migración y proliferación celular además de sintetizar colágeno (Adetutu, Morgan, & Corcoran, 2011). En este sentido, el extracto metanólico de las frondes del helecho *Dicranopteris linearis* (Burm. f.) Underw. (*Gleicheniaceae*) ha demostrado en ensayos *in vitro* proteger a fibroblastos humanos frente a la lesión oxidativa de H₂O₂, pero además también con H₂O₂ ha sido capaz de inactivar y presentar efectos de reparación celular (Ponnusamy et al., 2015). En este trabajo, se observa que la presencia de los extractos después del daño oxidativo, favorecen un aumento de la viabilidad celular en 3T3, que es superior a la determinada en el ensayo de pre-tratamiento. Este hecho sugiere la activación de mecanismos antioxidantes indirectos como son la activación enzimática endógena antioxidante celular. El extracto metanólico de las frondes del helecho *Drynaria quercifolia* (L.) J. Sm. (*Polypodiaceae*) se ha descrito como un potente extracto antioxidante frente H₂O₂ *in chemico* con posibles aplicaciones protectoras frente el estrés oxidativo (Chaity, Khatun, & Rahman, 2016).

El estrés oxidativo se ha vinculado a distintas alteraciones fisiopatológicas como es el caso del cáncer. Diferentes polifenoles, especialmente los flavonoides, se consideran fitoquímicos de especial interés en el campo de la quimioprevención, ya que estos fitoquímicos son capaces de modular las vías y mecanismos previos al establecimiento del cáncer, como son la capacidad de proliferación celular, la apoptosis, la angiogénesis o la metástasis (Korkina, De Luca, Kostyuk, & Pastore, 2009). Actualmente, muchos anticancerígenos empleados en medicina son principios activos de origen vegetal que, en gran parte, se han encontrado tras estudios de bioprospección como el paclitaxel, un diterpeno aislado de *Taxus brevifolia* Nutt. (*Taxaceae*). Los helechos, especialmente los ricos en flavonoides, son un potencial reservorio de fitoquímicos con actividad quimiopreventiva por su capacidad antioxidante, pero la mayoría de los estudios que evalúan esta capacidad se centran en especies orientales (Tomsík, 2014). Un ejemplo es el helecho *Athyrium multidentatum* (Döll) Ching (*Athyriaceae*), utilizado en la medicina tradicional China como diurético y tranquilizante, que ha demostrado actividad anticancerígena en HepG2 (Qi, Yang, Xiao, Shi, Mi, & Liu, 2015). Por esta razón, se ha evaluado la actividad antiproliferativa de nuestros extractos en distintas líneas celulares

cancerosas comerciales, específicamente HeLa, HepG2, MCF-7 y A549, mediante el ensayo de viabilidad celular en MTT (véase **Apéndice 3** para el caso de AAM en MCF-7).

Los flavonoides con grupos hidroxilos (especialmente en el carbono 3 del anillo C) y con el doble enlace en el carbono 2 y 3 del anillo C (es decir, los flavonoles y en menor medida las flavonas ya que no presentan el grupo hidroxilo en el carbono 3 del anillo C) son potentes fitoquímicos con acción antiproliferativa en líneas celulares cancerosas, con mayor potencia si contienen el grupo catecol en el anillo B (Alvarado-Sansininea et al., 2018). En el caso de los extractos polifenólicos de los helechos, los flavonoles son los principales fitoquímicos descritos como agentes anticancerígenos. No obstante, se ha documentado actividad antiproliferativa no vinculada a flavonoides en extractos fenólicos de helechos como es el caso del extracto metanólico de las frondes de *S. frondosa* (Xia et al., 2014). En nuestro caso, *A. trichomanes* es el helecho con una mayor cantidad de flavonoides, sin embargo, no ha presentado actividad antiproliferativa en ninguna de las cuatro líneas tumorales ensayadas. Estos resultados discrepan de los obtenidos con el extracto etanólico del helecho *Pteris ensiformis* Burm. f. (*Pteridaceae*) que a la concentración de 800 µg/mL disminuyó la viabilidad celular de HepG2 y MCF-7 al 50%. Esta actividad antiproliferativa se podría atribuir a los flavonoides en forma aglicona identificados en el extracto, como quercetina (flavonol) y luteolina (flavona) (Hou et al., 2020). La selectividad del efecto antiproliferativo de la quercetina (es una aglicona de quercitrina) en líneas tumorales se atribuye a la propia estructura de los flavonoles y al carácter de la ausencia de grupo funcional en el carbono 6 del anillo A de este flavonol (Alvarado-Sansininea et al., 2018). En el extracto de *A. trichomanes* hemos determinado que los dos fitoquímicos mayoritarios en HPLC-DAD son los flavonoles rutina y quercitrina (44,0% y 33,2% del total en HPLC-DAD respectivamente) y en HPLC-MS/MS son los flavonoles hiperósido y isoquercitrina, (29,2% y 25,6% del total en HPLC-MS/MS respectivamente). De manera que los dos fitoquímicos principales tanto en HPLC-DAD como en HPLC-MS/MS son flavonoles en forma glicona. De ello se puede concluir que las formas azucaradas inducen una pérdida de funcionalidad antiproliferativa respecto las correspondientes agliconas.

Tampoco se ha detectado actividad antiproliferativa para *A. adiantum-nigrum* y *C. officinarum* en ninguna de las cuatro líneas celulares. Sin embargo, aunque ambos extractos presentan ácidos fenólicos, uno es rico tanto en derivados de ácido cinámico como en derivados de ácido benzoico, mientras el otro es uno es rico en derivados de ácido cinámico y poco en derivados de ácido benzoico. No obstante, ambos extractos presentan una cantidad reducida de flavonoides que actualmente son los compuestos fenólicos con una mayor evidencia antiproliferativa. A diferencia de nuestros resultados, en el caso de la línea celular HeLa, Petkov determinó una IC₅₀ de 120,7 y 40,5 µg/mL para *A. trichomanes* y *C. officinarum*, respectivamente. (V. Petkov et al., 2021). Una de las posibles causas podría ser el distinto grado de maduración de las frondes en ambas investigaciones, pues en determinadas especies de helechos, entre los cuales hay *P. vulgare*, ya se ha reportado una mayor capacidad antioxidante de las frondes jóvenes (*fiddleheads*) que las frondes maduras (Dvorakova et al., 2021).

P. vulgare es el único extracto que ha presentado actividad antiproliferativa a partir de 1 mg/mL en HeLa y HepG2, a pesar de que presenta una composición similar a la de *C. officinarum* (son extractos ricos en derivados de ácido cinámico, especialmente en el 3-O-cafeiolquímico, equivalente al ácido clorogénico, que resulta ser el compuesto mayoritario de ambos extractos en HPLC-DAD como en HPLC-MS/MS). Este distinto comportamiento de los extractos podría explicarse por la existencia de fitoquímicos todavía no determinados hasta el momento. Así, por ejemplo en el caso del rizoma y las frondes de *P. vulgare* se ha descrito la presencia de ecdiesteroides, como el 20-hidroxiecdisona (Messeguer, Melé, Reixach, Irurre-Santilari, & Casas, 1998), también aislado de las

frondes del helecho *Microsorium scolopendria* (Burm. f.) Copel. (*Polypodiaceae*) (Snogan et al., 2007). Los ecdiesteroides son fitoquímicos producidos por el estrés biótico que inducen los insectos a través del metabolismo secundario en estos dos helechos de la familia *Polypodiaceae* y que pueden ser un desencadenante de la actividad antiproliferativa (Mamadaliyeva, 2012). Aunque estos ecdiesteroides son terpenos, se pueden aislar en la extracción metanólica, así se deduce que en el extracto metanólico de *P. vulgare* pueden estar presentes.

Finalmente, en el caso del extracto de *A. adiantum-nigrum*, se ha detectado mediante HPLC-DAD una cantidad significativa de ácido gálico que ha resultado ser no relevante en HPLC-MS/MS. La citotoxicidad de este fitoquímico así como de los respectivos derivados está validada (Babich, Zuckerbraun, & Weinerman, 2007) pero, inesperadamente, este extracto no ha inducido una disminución de la viabilidad celular en ninguna de las líneas celulares estudiadas. En cambio, se ha observado un aumento significativo de la viabilidad celular en A549 (1 mg/mL AAM) y, sobre todo, en MCF-7 (a partir de 0,1 mg/mL AAM) (**Apéndice 3**). El aumento de viabilidad celular en A549 se observa a una concentración elevada de extracto y, aunque es estadísticamente significativo, no es muy elevada respecto el correspondiente control negativo. En cambio, en el caso de las MCF-7, estos resultados deben interpretarse con mucha precaución, pues esta línea celular presenta una gran inestabilidad genética y engloba diferentes fenotipos individuales. Además, en ciertas condiciones de cultivo celular alguna de las sublíneas puede expandirse de manera preferente sin conocerse bien si expresan receptores alterados y, por lo tanto, responden de manera anómala (Comsa, Cimpean, & Raica, 2015). Este extracto también es el que ha demostrado una mayor capacidad citoprotectora en 3T3, calculándose un incremento de la viabilidad celular del 55,6% a la concentración de 1 mg/mL AAM. Este comportamiento tan diferenciado del resto de los helechos junto con el hecho que este extracto es el que presenta una menor cantidad de polifenoles induce a hipotetizar en la presencia de fitoquímicos aún no detectados.

Sin embargo, quedan todavía aspectos a clarificar sobre la actividad de los extractos de estos helechos, como la potencial capacidad de reparación celular y el posible aumento de la biogénesis mitocondrial observada en *A. adiantum-nigrum* o el uso tradicional como cicatrizante de *P. vulgare* y su directa relación con su composición. Por todo ello, hay que continuar investigando otras actividades biológicas de los extractos, así como terminar de perfilar su composición fitoquímica y aportar la base científica de sus usos tradicionales en medicina y veterinaria.

Conclusiones

“Quan es troben remeis dels que no fallen, gairebé sempre vénen per via popular”

- Pius Font Quer.

A partir de los objetivos planteados, se resumen en este apartado las conclusiones obtenidas.

- 1- Sobre la identificación y obtención de los extractos metanólicos y hexánicos de los helechos, se concluye que:
 - *Polypodium vulgare* L., *Asplenium adiantum-nigrum* L., *Asplenium trichomanes* L. y *Ceterach officinarum* Willd. son los cuatro principales helechos de las montañas de Prades. Estos se han identificado por técnicas taxonómicas de sus frondes.
 - Por lo que se refiere a la obtención de los extractos a partir de las frondes, la extracción metanólica ha presentado mejor rendimiento que la hexánica en todos los casos.

- 2- Del estudio de las propiedades antioxidantes y actividad anti-tirosinasa mediante métodos *in chemico* se deduce que:
 - La actividad antioxidante y anti-tirosinasa de los extractos hexánicos ha sido residual, por lo que se concluye que los extractos metanólicos presentan mayor capacidad antioxidante y anti-tirosinasa.
 - Los resultados de los ensayos DPPH, ORAC y X/XO indican que los extractos metanólicos de *P. vulgare*, *A. adiantum-nigrum*, *A. trichomanes* y *C. officinarum* presentan una actividad antioxidante notable y similar que se puede correlacionar con su contenido total de compuestos fenólicos, mientras que *P. vulgare* fue el mejor helecho como inhibidor de la enzima tirosinasa.

- 3- La identificación de compuestos bioactivos polares de referencia de los extractos metanólicos indica que:
 - Los extractos de *P. vulgare* y *C. officinarum* presentan una cantidad total de compuestos fenólicos similar, siendo el 3-O-cafeiolquínico (ácido clorogénico) el fitoquímico mayoritario tanto por HPLC-DAD, como por HPLC-MS/MS.
 - El extracto del helecho *A. adiantum-nigrum* es el que tiene menor cantidad de compuestos fenólicos, con una cantidad relevante de derivados de ácido benzoico entre los cuales destaca el ácido gálico en HPLC-DAD y el ácido vanílico en HPLC-MS/MS.
 - *A. trichomanes* es la única especie en la cual los flavonoides representan la mayoría de los fitoquímicos determinados, concretamente derivados de flavonol, y el helecho que presenta una menor cantidad de ácido clorogénico en HPLC-DAD y HPLC-MS/MS.

4- El estudio de las propiedades citotóxicas y fototóxicas de los extractos metanólicos en líneas celulares no tumorales sugiere que:

- El ensayo del NRU no ha resultado útil para comparar la citotoxicidad de los extractos metanólicos de los helechos estudiados, ya que a ninguna de las concentraciones ensayadas y para ninguno de los helechos estudiados se han observado diferencias en la viabilidad celular.
- Por otro lado, mediante el ensayo del MTT, los extractos metanólicos son poco o muy poco citotóxicos, ya que solamente *P. vulgare* a elevadas concentraciones disminuye la viabilidad celular por debajo del 50%.
- El ensayo de fototoxicidad indica que solamente *P. vulgare* presenta capacidad fototóxica en 3T3 y HaCaT a una concentración de 0,1 mg/mL. Esta fototoxicidad puede atribuirse a la elevada cantidad de compuestos fenólicos juntamente con su contenido del flavonol rutina.

5- Respecto a las propiedades citoprotectoras y citoreparadoras *in vitro* de los extractos metanólicos:

- El pre-tratamiento de las células con los extractos metanólicos indica, que en general, las 3T3 han respondido mejor que las HaCaT y que solamente ha habido una citoprotección significativa en el caso de *A. adiantum-nigrum* a la concentración de 1 mg/mL en 3T3.
- Cuando se ha realizado el post-tratamiento en 3T3, todos los extractos presentan una cierta actividad citoreparadora que oscila entre un 7,5% en el caso de *C. officinarum* hasta un 77,5% en el caso de *A. adiantum-nigrum*.
- En ambos ensayos, el *A. adiantum-nigrum* es el helecho que ha presentado mayor efecto tanto citoprotector como citoreparador en 3T3, seguido de *C. officinarum* y *P. vulgare* que han presentado un comportamiento similar.

6- El examen de la actividad antiproliferativa en las diferentes líneas celulares tumorales, demuestra que:

- Solo el extracto de *P. vulgare* a la concentración de 1 mg/mL presenta capacidad antiproliferativa en las líneas HepG2 y HeLa.
- *A. adiantum-nigrum* ha inducido un aumento de viabilidad celular en MCF-7 mucho más evidente a 1 mg/mL. Este aumento puede ser debido a una respuesta anómala de esta línea celular.

Bibliografía

“La paciencia es una planta amarga cuyos frutos son dulces”

- Jean-Jacques Rousseau.

- Abbasi, A. M., Khan, M. A., Ahmad, M., Zafar, M., Jahan, S., & Sultana, S. (2010). Ethnopharmacological application of medicinal plants to cure skin diseases and in folk cosmetics among the tribal communities of North-West Frontier Province, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(2), 322-335. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.01.052>.
- Adetutu, A., Morgan, W. A., & Corcoran, O. (2011). Ethnopharmacological survey and in vitro evaluation of wound-healing plants used in South-western Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 50-56. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.03.073>.
- Aguilera, J., Vicente-Manzanares, M., de Gálvez, M. V., Herrera-Ceballos, E., Rodríguez-Luna, A., & González, S. (2021). Booster Effect of a Natural Extract of *Polypodium leucotomos* (Fernblock®) That Improves the UV Barrier Function and Immune Protection Capability of Sunscreen Formulations. *Frontiers in Medicine*, 8, 10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.684665>.
- Altemimi, A., Lakhssassi, N., Baharlouei, A., Watson, D. G., & Lightfoot, D. A. (2017). Phytochemicals: Extraction, Isolation, and Identification of Bioactive Compounds from Plant Extracts. *Plants-Basel*, 6(4), 23. <https://doi.org/10.3390/plants6040042>.
- Alvarado-Sansininea, J. J., Sánchez-Sánchez, L., López-Munoz, H., Escobar, M. L., Flores-Guzmán, F., Tavera-Hernández, R., & Jiménez-Estrada, M. (2018). Quercetagenin and Patuletin: Antiproliferative, Necrotic and Apoptotic Activity in Tumor Cell Lines. *Molecules*, 23(10), 18. <https://doi.org/10.3390/molecules23102579>.
- Aulakh, M. K., Kaur, N., & Saggoo, M. I. S. (2019). BIOACTIVE PHYTOCONSTITUENTS OF PTERIDOPHYTES - A REVIEW. *Indian Fern Journal*, 36(1-2), 37-79.
- Babich, H., Zuckerbraun, H. L., & Weinerman, S. M. (2007). In vitro cytotoxicity of (-)-catechin gallate, a minor polyphenol in green tea. *Toxicology Letters*, 171(3), 171-180. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.05.125>.
- Bansal, M., & Kaushal, N. (2014). Introduction to Oxidative Stress. In M. Bansal & N. Kaushal (Eds.), *Oxidative Stress Mechanisms and their Modulation* (pp. 1-18). New Delhi: Springer.
- Batet, D., Cartanyà, J., Castells, R., Piñas, I., & Salat, X. (2011a). Entrevista nº10. In *Etnobotànica a les muntanyes de Prades* (pp. 127-129). Montblanc: Centre d'Història Natural de la Conca de Barberà.
- Batet, D., Cartanyà, J., Castells, R., Piñas, I., & Salat, X. (2011b). *Etnobotànica a les muntanyes de Prades*. (1 ed.). Montblanc: Centre d'Història Natural de la Conca de Barberà.
- Beckman, C. H. (2000). Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57(3), 101-110. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.0287>.
- Bickers, D. R., & Athar, M. (2006). Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(12), 2565-2575. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700340>.
- Bonet Galobart, M. À., & Vallès Xirau, J. (2006). Metodologia: L'etnobotànica, una ciència recent. In BRAU (Ed.), *Plantes, Remeis i cultura popular del Montseny: Etnobotànica d'una Reserva de la Biosfera* (pp. 61-62). Granollers, Espanya: BRAU.
- Bonet, M. À., Agelet, A., Vallès, J., & Villar Pérez, L. (2001). Contribution à la connaissance ethnobotanique des ptéridophytes dans les Pyrénées. *Bocconeia*, 13, 605-612.
- Bonet, M. À., & Vallès, J. (2007). Ethnobotany of Montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula): Plants used in veterinary medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(1), 130-147. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.016>.
- Bonnier, G., & De Layens, G. (2002). *Claves para la determinación de plantas vasculares*. (Primera ed.). Barcelona: Ediciones Omega, S.L.

- Booker, A., Johnston, D., & Heinrich, M. (2012). Value chains of herbal medicines-Research needs and key challenges in the context of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 140(3), 624-633. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.01.039>.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia: Fitoquímica, Plantas Medicinales*. (2 ed.): Acribia.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Taylor, M. R., Simon, E. J., & Dickey, J. L. (2009). Plants, Fungi, and the Colonization of Land: Concepts and Connections. In Pearson (Ed.), *Biology: Concepts and Connections*.
- Cao, H., Chai, T. T., Wang, X., Morais-Braga, M. F. B., Yang, J. H., Wong, F. C., . . . Coutinho, H. D. M. (2017). Phytochemicals from fern species: potential for medicine applications. *Phytochemistry Reviews*, 1-62. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9488-7>.
- Caprioli, G., Alunno, A., Beghelli, D., Bianco, A., Bramucci, M., Frezza, C., . . . Maggi, F. (2016). Polar Constituents and Biological Activity of the Berry-Like Fruits from *Hypericum androsaemum* L. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00232>.
- Carocho, M., & Ferreira, I. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15-25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>.
- Ceridono, M., Tellner, P., Bauer, D., Barroso, J., Alépée, N., Corvi, R., . . . Wilcox, P. (2012). The 3T3 neutral red uptake phototoxicity test: Practical experience and implications for phototoxicity testing - The report of an ECVAM-EFPIA workshop. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 63(3), 480-488. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.06.001>.
- Chaity, F. R., Khatun, M., & Rahman, M. S. (2016). In vitro membrane stabilizing, thrombolytic and antioxidant potentials of *Drynaria quercifolia* L., a remedial plant of the Garo tribal people of Bangladesh. *Bmc Complementary and Alternative Medicine*, 16, 9. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1170-5>.
- Clarke, J. T., Warnock, R. C. M., & Donoghue, P. C. J. (2011). Establishing a time-scale for plant evolution. *New Phytologist*, 192(1), 266-301. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03794.x>.
- Clericuzio, M., Burlando, B., Gandini, G., Tinello, S., Ranzato, E., Martinotti, S., & Cornara, L. (2014). Keratinocyte wound healing activity of galactoglycerolipids from the fern *Ophioglossum vulgatum* L. *Journal of Natural Medicines*, 68(1), 31-37. <https://doi.org/10.1007/s11418-013-0759-y>.
- Comsa, S., Cimpean, A. M., & Raica, M. (2015). The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research*, 35(6), 3147-3154.
- Costa, C., Tsatsakis, A., Mamoulakis, C., Teodoro, M., Briguglio, G., Caruso, E., . . . Fenga, C. (2017). Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 286-299. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.023>.
- Dall'Acqua, S., Tomè, F., Vitalini, S., Agradi, E., & Innocenti, G. (2009). In vitro estrogenic activity of *Asplenium trichomanes* L. extracts and isolated compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(3), 424-429. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.02.012>.
- de Araujo, F. F., Farias, D. D., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2021). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, 338, 15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127535>.
- de Araújo, F. F., Farias, D. D., Neri-Numa, I. A., & Pastore, G. M. (2021). Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. *Food Chemistry*, 338, 15. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127535>.

- de la Rosa, L. A., Omar Moreno-Escamilla, J., Rodrigo-Garcia, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Phenolic Compounds. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, 253-271. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813278-4.00012-9>.
- de la Torre, B. G., & Albericio, F. (2022). The Pharmaceutical Industry in 2021. An Analysis of FDA Drug Approvals from the Perspective of Molecules. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(3). <https://doi.org/10.3390/molecules27031075>.
- del Río Legazpi, L. A. (2016). HISTORIA DEL GRUPO ESPAÑOL DE INVESTIGACIÓN EN RADICALES LIBRES (GEIRLI).
- Dimcheva, V., & Karsheva, M. (2018). *Cistus incanus* from Strandja Mountain as a Source of Bioactive Antioxidants. *Plants-Basel*, 7(1), 14. <https://doi.org/10.3390/plants7010008>.
- Ding, Z. T., Fang, Y. S., Tai, Z. G., Yang, M. H., Xu, Y. Q., Li, F., & Cao, Q. E. (2008). Phenolic content and radical scavenging capacity of 31 species of ferns. *Fitoterapia*, 79(7-8), 581-583. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2008.01.011>.
- Domingo, M., & Borau, J. A. (1998). *Muntanyes de Prades: paisatge i fauna*. Valls: Cossetània Edicions.
- Dunaway, S., Odin, R., Zhou, L. L., Ji, L. Y., Zhang, Y. H., & Kadekaro, A. L. (2018). Natural Antioxidants: Multiple Mechanisms to Protect Skin From Solar Radiation. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00392>.
- Durdevic, L., Mitrovic, M., Pavlovic, P., Bojovic, S., Jaric, S., Oberan, L., . . . Kostic, O. (2007). Total phenolics and phenolic acids content in leaves, rhizomes and rhizosphere soil under *Ceterach officinarum* DC, *Asplenium trichomanes* L. and *A. adiantum nigrum* L. in the gorge of sicevo (SERBIA). *Ekologia (Bratislava)*, 26(2), 164-173.
- Dutta, D., Markhoff, J., Suter, N., Rezwan, K., & Brüggemann, D. (2021). Effect of Collagen Nanofibers and Silanization on the Interaction of HaCaT Keratinocytes and 3T3 Fibroblasts with Alumina Nanopores. *Acs Applied Bio Materials*, 4(2), 1852-1862. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01538>.
- Dvorakova, M., Pumprova, K., Antoninova, Z., Rezek, J., Haisel, D., Ekrt, L., . . . Langhansova, L. (2021). Nutritional and Antioxidant Potential of Fiddleheads from European Ferns. *Foods*, 10(2), 15. <https://doi.org/10.3390/foods10020460>.
- Díaz González, T. E., Fernández-Carvajal Álvarez, M. C., & Fernández Prieto, J. A. (2004). *Curso de Botánica*. (1 ed.). Gijón (Asturias): Gráficas Summa, S.A.
- Efferth, T., & Koch, E. (2011). Complex Interactions between Phytochemicals. The Multi-Target Therapeutic Concept of Phytotherapy. *Current Drug Targets*, 12(1), 122-132. <https://doi.org/10.2174/138945011793591626>.
- Elsner, P., Holzle, E., Diepgen, T., Grether-Beck, S., Honigsmann, H., Krutmann, J., . . . Luger, T. (2007). Recommendation: daily sun protection in the prevention of chronic UV-induced skin damage. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, 5(2), 166-173. <https://doi.org/10.1111/j.1610-0387.2007.06099.x>.
- Evans, J. A., & Johnson, E. J. (2010). The Role of Phytonutrients in Skin Health. *Nutrients*, 2(8), 903-928. <https://doi.org/10.3390/nu2080903>.
- Farràs, A., Cásedas, G., Les, F., Terrado, E. M., Mitjans, M., & López, V. (2019). Evaluation of Anti-Tyrosinase and Antioxidant Properties of Four Fern Species for Potential Cosmetic Applications. *Forests*, 10(2), 14. <https://doi.org/10.3390/f10020179>.
- Farràs, A., Mitjans, M., Maggi, F., Caprioli, G., Vinardell, M. P., & López, V. (2021). *Polypodium vulgare* L. (*Polypodiaceae*) as a Source of Bioactive Compounds: Polyphenolic Profile, Cytotoxicity and Cytoprotective Properties in Different Cell Lines. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.727528>.

- Fernández-Ochoa, Á., Cádiz-Gurrea, M. D., Fernández-Moreno, P., Rojas-García, A., Arraez-Roman, D., & Segura-Carretero, A. (2022). Recent Analytical Approaches for the Study of Bioavailability and Metabolism of Bioactive Phenolic Compounds. *Molecules*, 27(3), 22. <https://doi.org/10.3390/molecules27030777>.
- Fiorin, E., Saez, L., & Malgosa, A. (2019). Ferns as healing plants in medieval Mallorca, Spain? Evidence from human dental calculus. *International Journal of Osteoarchaeology*, 29(1), 82-90. <https://doi.org/10.1002/oa.2718>.
- Font Castell, X., de Càceres, M., Quadrada, R., Moreno, J., & Martí, D. (2015). Banco de datos de biodiversidad de Cataluña. (2015 ed., p. aprox. 2 pantallas). Barcelona: Generalidad de Cataluña.
- Formagio, A. S. N., Volobuff, C. R. F., Santiago, M., Cardoso, C. A. L., Vieira, M. d. C., & Valdevina Pereira, Z. (2014). Evaluation of Antioxidant Activity, Total Flavonoids, Tannins and Phenolic Compounds in Psychotria Leaf Extracts. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 3(4), 745-757. <https://doi.org/10.3390/antiox3040745>.
- Frijhoff, J., Winyard, P. G., Zarkovic, N., Davies, S. S., Stocker, R., Cheng, D., . . . Ghezzi, P. (2015). Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(14), 1144-1170. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6317>.
- Froissard, D., Fons, F., Bessièrè, J. M., Buatois, B., & Rapior, S. (2011). Volatiles of French Ferns and "fougère" Scent in Perfumery. *Natural Product Communications*, 6(11), 1723-1726.
- Fukuda, H. (1997). Tracheary element differentiation. *Plant Cell*, 9(7), 1147-1156. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.7.1147>.
- García, F., Pivel, J. P., Guerrero, A., Brieva, A., Martínez-Alcázar, M., Caamaño-Somoza, M., & González, S. (2006). Phenolic components and antioxidant activity of Fernblock®, an aqueous extract of the aerial parts of the fern *Polypodium leucotomos*. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 28(3), 157-160. <https://doi.org/10.1358/mf.2006.28.3.985227>.
- Gartmann, F. (2015). Ferns and Fern Allies as Medicinal, Economic and Magic Plants: The Ethnobotanical Importance of Vascular Cryptogams. *Schweizerische Zeitschrift Fuer Ganzheitsmedizin*, 27(2), 100-112. <https://doi.org/10.1159/000371460>.
- Gegotek, A., Jarocka-Karpowicz, I., & Skrzydlewska, E. (2020). Cytoprotective Effect of Ascorbic Acid and Rutin against Oxidative Changes in the Proteome of Skin Fibroblasts Cultured in a Three-Dimensional System. *Nutrients*, 12(4), 15. <https://doi.org/10.3390/nu12041074>.
- Giordano, M. E., Caricato, R., & Lionetto, M. G. (2020). Concentration Dependence of the Antioxidant and Prooxidant Activity of Trolox in HeLa Cells: Involvement in the Induction of Apoptotic Volume Decrease. *Antioxidants*, 9(11), 12. <https://doi.org/10.3390/antiox9111058>.
- Glensk, M., Tichaczek-Goska, D., Sroda-Pomianek, K., Wlodarczyk, M., Wesolowski, C. A., & Wojnicz, D. (2019). Differing antibacterial and antibiofilm properties of *Polypodium vulgare* L. Rhizome aqueous extract and one of its purified active ingredients-osladin. *Journal of Herbal Medicine*, 17-18. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2019.100261>.
- Gombau, L., García, F., Lahoz, A., Fabre, M., Roda-Navarro, P., Majano, P., . . . González, S. (2006). *Polypodium leucotomos* extract: Antioxidant activity and disposition. *Toxicology in Vitro*, 20(4), 464-471. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.09.008>.
- González, S., Gilaberte, Y., & Philips, N. (2010). Mechanistic insights in the use of a *Polypodium leucotomos* extract as an oral and topical photoprotective agent. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 9(4), 559-563. <https://doi.org/10.1039/b9pp00156e>.
- Guerriero, G., Berni, R., Munoz-Sanchez, J. A., Apone, F., Abdel-Salam, E. M., Qahtan, A. A., . . . Faisal, M. (2018). Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. *Genes*, 9(6), 22. <https://doi.org/10.3390/genes9060309>.

- Guillon, J. M. (2007). Molecular phylogeny of horsetails (*Equisetum*) including chloroplast *atpB* sequences. *Journal of Plant Research*, 120(4), 569-574. <https://doi.org/10.1007/s10265-007-0088-x>.
- Halliwell, B. (2006). Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of Neurochemistry*, 97(6), 1634-1658. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x>.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015a). Antioxidant defences synthesized *in vivo*. In B. Halliwell & J. M. C. Gutteridge (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine* (pp. 77-152). Oxford: Oxford University Press.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015b). Antioxidants from the diet. In B. Halliwell & J. M. C. Gutteridge (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine* (pp. 153-198). Oxford: Oxford University Press.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015c). Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence, and death. In B. Halliwell & J. M. C. Gutteridge (Eds.), *Free Radicals in Biology and Medicine* (pp. 199-283). Oxford: Oxford University Press.
- Hammami, S., Snene, A., El Mokni, R., Faidi, K., Falconieri, D., Dhaouadi, H., . . . Porcedda, S. (2016). Essential Oil Constituents and Antioxidant Activity of *Asplenium* Ferns. *Journal of Chromatographic Science*, 54(8), 1341-1345. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmw071>.
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L. B., Liu, T. Y., & Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2), 532-553. <https://doi.org/10.1159/000485089>.
- Heinrich, M. (2015). Quality and safety of herbal medical products: regulation and the need for quality assurance along the value chains. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 80(1), 62-66. <https://doi.org/10.1111/bcp.12586>.
- Hou, M. Y., Hu, W. Z., Xiu, Z. L., Shi, Y. S., Hao, K. X., Cao, D., . . . Yin, H. L. (2020). Efficient enrichment of total flavonoids from *Pteris ensiformis* Burm. extracts by macroporous adsorption resins and *in vitro* evaluation of antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1138, 9. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.121960>.
- Iwashina, T., & Matsumoto, S. (2011). Flavonoid Properties of six *Asplenium* Species in Vanuatu and New Caledonia, and Distribution of Flavonoid and Related Compounds in *Asplenium*. (Vol. Z53-S372, p. 13). Tokyo: Bulletin of the National Museum of Nature and Science. Series B, Botany / National Museum of Nature and Science.
- Jin, D.-M., Zhou, X.-L., Schneider, H., Wei, H.-J., Wei, H.-Y., & Yan, Y.-H. (2020). Functional traits: Adaption of ferns in forest. *Journal of Systematics and Evolution*. <https://doi.org/10.1111/jse.12669>.
- Jones, D. P., & Sies, H. (2015). The Redox Code. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(9), 734-746. <https://doi.org/10.1089/ars.2015.6247>.
- Juslen, A., Vare, H., & Wikstrom, N. (2011). Relationships and evolutionary origins of polyploid *Dryopteris* (*Dryopteridaceae*) from Europe inferred using nuclear *pgiC* and plastid *trnL-F* sequence data. *Taxon*, 60(5), 1284-1294. <https://doi.org/10.1002/tax.605005>.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41-60. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9067-7>.
- Kim, Y. J., & Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(15), 1707-1723. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5054-y>.
- Korkina, L. G., De Luca, C., Kostyuk, V. A., & Pastore, S. (2009). Plant Polyphenols and Tumors: From Mechanisms to Therapies, Prevention, and Protection Against Toxicity of Anti-Cancer

- Treatments. *Current Medicinal Chemistry*, 16(30), 3943-3965. <https://doi.org/10.2174/092986709789352312>.
- Krutmann, J., Passeron, T., Gilaberte, Y., Granger, C., Leone, G., Narda, M., . . . Lim, H. W. (2020). Photoprotection of the future: challenges and opportunities. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 34(3), 447-454. <https://doi.org/10.1111/jdv.16030>.
- Kumar, N., & Goel, N. (2019). Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24, 10. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>.
- Lai, H. Y., Lim, Y. Y., & Tan, S. P. (2009). Antioxidative, Tyrosinase Inhibiting and Antibacterial Activities of Leaf Extracts from Medicinal Ferns. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 73(6), 1362-1366. <https://doi.org/10.1271/bbb.90018>.
- Langhansova, L., Pumprova, K., Haisel, D., Ekrt, L., Pavicic, A., Zajickova, M., . . . Dvorakova, M. (2021). European ferns as rich sources of antioxidants in the human diet. *Food chemistry*, 356, 12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129637>.
- Leopoldini, M., Russo, N., & Toscano, M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry*, 125(2), 288-306. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.012>.
- Liang, Q., Wang, F., & Xiao, M. (2021). Comparison of Phototoxicity Sensitivity by the Neutral Red Uptake Method for BALB/c 3T3, HaCaT, and HDFa Cells In Vitro. *Innovations in Digital Health, Diagnostics, and Biomarkers*, 2, 7. <https://doi.org/10.36401/IDDB-21-02>.
- Liberti, D., Alfieri, M. L., Monti, D. M., Panzella, L., & Napolitano, A. (2020). A Melanin-Related Phenolic Polymer with Potent Photoprotective and Antioxidant Activities for Dermo-Cosmetic Applications. *Antioxidants*, 9(4), 14. <https://doi.org/10.3390/antiox9040270>.
- Mamadalieva, N. Z. (2012). Phytoecdysteroids from *Silene* plants: distribution, diversity and biological (antitumour, antibacterial and antioxidant) activities. *Boletin Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromaticas*, 11(6), 474-497.
- Manap, A. S. A., Lum, Y. K., Ong, L. H., Tang, Y. Q., Gew, L. T., & Chia, A. Y. Y. (2021). Perspective approaches on melanogenesis inhibition. *Dermatologica Sinica*, 39(1), 1-12. https://doi.org/10.4103/ds.ds_46_20.
- Maverakis, E., Miyamura, Y., Bowen, M. P., Correa, G., Ono, Y., & Goodarzi, H. (2010). Light, including ultraviolet. *Journal of Autoimmunity*, 34(3), J247-J257. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.11.011>.
- Messeguer, J., Melé, E., Reixach, N., Irurre-Santilari, J., & Casas, J. (1998). *Polypodium vulgare* L. (Wood Fern): In Vitro Cultures and the Production of Phytoecdysteroids. In B. Y.P.S. (Ed.), *Medicinal and Aromatic Plants X* (pp. 333-348). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Monaghan, P., Metcalfe, N. B., & Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters*, 12(1), 75-92. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01258.x>.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417, 1-13. <https://doi.org/10.1042/bj20081386>.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2012). Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75(3), 311-335. <https://doi.org/10.1021/np200906s>.
- OECD. (2019). OECD Test No. 432: In vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4* (Vol. 2021): Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).

- Palomino, O. M. (2014). Current knowledge in *Polypodium leucotomos* effect on skin protection. *Archives of Dermatological Research*, 307(3), 199-209. <https://doi.org/10.1007/s00403-014-1535-x>.
- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>.
- Pardo de Santayana, M., Morales, R., Tardío, J., & Molina, M. (2018). *Inventario Español de los Conocimientos Tradicionales relativos a la Biodiversidad*. Madrid.
- Parrado, C., Mascaraque, M., Gilaberte, Y., Juarranz, A., & Gonzalez, S. (2016). Fernblock (*Polypodium leucotomos* Extract): Molecular Mechanisms and Pleiotropic Effects in Light-Related Skin Conditions, Photoaging and Skin Cancers, a Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/ijms17071026>.
- Parrado, C., Nicolas, J., Juarranz, A., & Gonzalez, S. (2020). The role of the aqueous extract *Polypodium leucotomos* in photoprotection. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 19(6), 831-843. <https://doi.org/10.1039/d0pp00124d>.
- Petkov, V., Batsalova, T., Stoyanov, P., Mladenova, T., Kolchakova, D., Argirova, M., . . . Dzhambazov, B. (2021). Selective Anticancer Properties, Proapoptotic and Antibacterial Potential of Three *Asplenium* Species. *Plants-Basel*, 10(6), 14. <https://doi.org/10.3390/plants10061053>.
- Petkov, V., Slavova, I., Teneva, D., Mladenova, T., Stoyanov, P., & Argirova, M. (2021). Phytochemical Study and Biological Activity of Three Fern Species of the *Asplenium* Genus Growing in Bulgaria. *The Natural Products Journal*, 10(1), 9. <https://doi.org/10.2174/2210315511666210512024716>.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Iordache, F., Stanca, L., Predoi, G., & Serban, A. I. (2021). Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 209. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>.
- Pittermann, J., Watkins, J. E., Cary, K. L., Schuettpelz, E., Brodersen, C., Smith, A. R., & Baer, A. (2015). The Structure and Function of Xylem in Seed-Free Vascular Plants: An Evolutionary Perspective. In U. Hacke (Ed.), *Functional and Ecological Xylem Anatomy* (pp. 1-37): Springer.
- Plackett, A. R. G., Di Stilio, V. S., & Langdale, J. A. (2015). Ferns: the missing link in shoot evolution and development. *Frontiers in Plant Science*, 6, 19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00972>.
- Ponnusamy, Y., Chear, N. J. Y., Ramanathan, S., & Lai, C. S. (2015). Polyphenols rich fraction of *Dicranopteris linearis* promotes fibroblast cell migration and proliferation *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology*, 168, 305-314. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.062>.
- Preiser, J. C. (2012). Oxidative Stress. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 36(2), 147-154. <https://doi.org/10.1177/01486071111434963>.
- Prochazkova, D., Bousova, I., & Wilhelmova, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.01.018>.
- Qi, G. Y., Yang, L. Q., Xiao, C. X., Shi, J., Mi, Y. S., & Liu, X. B. (2015). Nutrient values and bioactivities of the extracts from three fern species in China: a comparative assessment. *Food & Function*, 6(9), 2918-2929. <https://doi.org/10.1039/c5fo00510h>.
- Quer, P. F. (2016). Plantas Medicinales. El Dioscórides renovado. In Península (Ed.), *PTERIDÓFITOS: POLIPODIO (*Polypodium vulgare* L.)* (pp. 73-75): Ediciones Península.
- Ramos-Gutiérrez, I., Lima, H., Pajarón, S., Romero-Zarco, C., Sáez, L., Pataro, L., . . . Moreno-Saiz, J. C. (2021). Atlas of the vascular flora of the Iberian Peninsula biodiversity hotspot (AFLIBER). *Global Ecology and Biogeography*.

- Reinaldo, R., Santiago, A. C. P., Medeiros, P. M., & Albuquerque, U. P. (2015). Do ferns and lycophytes function as medicinal plants? A study of their low representation in traditional pharmacopoeias. *Journal of Ethnopharmacology*, 175, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.003>.
- Rizzo, F. (2021). The distribution of Pteridophytes (ferns and lycophytes) in Sicily. *Biodiversity Journal*, 12(1), 91-120. <https://doi.org/10.31396/Biodiv.Jour.2021.12.1.91.120>.
- Rubió-Casadevall, J., Hernandez-Pujol, A. M., Ferreira-Santos, M. C., Morey-Esteve, G., Vilardell, L., Osa-Gelis, G., . . . Marcos-Gragera, R. (2016). Trends in incidence and survival analysis in non-melanoma skin cancer from 1994 to 2012 in Girona, Spain: A population-based study. *Cancer Epidemiology*, 45, 6-10. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2016.09.001>.
- Rudrapal, M., Khairnar, S. J., Khan, J., Bin Dukhyil, A., Ansari, M. A., Alomary, M. N., . . . Devi, R. (2022). Dietary Polyphenols and Their Role in Oxidative Stress-Induced Human Diseases: Insights Into Protective Effects, Antioxidant Potentials and Mechanism(s) of Action. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 15. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.806470>.
- Rundle, C. W., Militello, M., Barber, C., Presley, C. L., Rietcheck, H. R., & Dellavalle, R. P. (2020). Epidemiologic Burden of Skin Cancer in the US and Worldwide. *Current Dermatology Reports*, 9(4), 309-322. <https://doi.org/10.1007/s13671-020-00311-4>.
- Rusu, M. E., Gheldiu, A. M., Mocan, A., Vlase, L., & Popa, D. S. (2018). Anti-aging potential of tree nuts with a focus on the phytochemical composition, molecular mechanisms and thermal stability of major bioactive compounds. *Food & Function*, 9(5), 2554-2575. <https://doi.org/10.1039/c7fo01967j>.
- Sander, C. S., Hamm, F., Elsner, P., & Thiele, J. J. (2003). Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *British Journal of Dermatology*, 148(5), 913-922. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2003.05303.x>.
- Santos, J. S., Deolindo, C. T. P., Hoffmann, J. F., Chaves, F. C., do Prado-Silva, L., Sant'Ana, A. S., . . . Granato, D. (2018). Optimized *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Ilex paraguariensis*, and *Aspalathus linearis* blend presents high antioxidant and antiproliferative activities in a beverage model. *Food Chemistry*, 254, 348-358. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.021>.
- Sessa, E. B. (2018). Evolution and Classification of Ferns and Lycophytes. In H. Fernández (Ed.), *Current Advances in Fern Research* (pp. 179-200): Springer.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>.
- Sharifi-Rad, M., Kumar, N. V. A., Zucca, P., Varoni, E. M., Dini, L., Panzarini, E., . . . Sharifi-Rad, J. (2020). Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Frontiers in Physiology*, 11, 21. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>.
- Shrestha, S. S., Sut, S., Di Marco, S. B., Zengin, G., Gandin, V., De Franco, M., . . . Rajbhandary, S. (2019). Phytochemical Fingerprinting and *In Vitro* Bioassays of the Ethnomedicinal Fern *Tectaria coadunata* (J. Smith) C. Christensen from Central Nepal. *Molecules*, 24(24), 20. <https://doi.org/10.3390/molecules24244457>.
- Shrinet, K., Singh, R. K., Chaurasia, A. K., Tripathi, A., & Kumar, A. (2021). Bioactive compounds and their future therapeutic applications. In R. p. Sinha & D.-P. Häder (Eds.), *Natural Bioactive Compounds: Technological Advancements* (pp. 337-362).
- Siddiqui, M. A., Kashyap, M. P., Kumar, V., Tripathi, V. K., Khanna, V. K., Yadav, S., & Pant, A. B. (2011). Differential protection of pre-, co- and post-treatment of curcumin against hydrogen peroxide in PC12 cells. *Human & Experimental Toxicology*, 30(3), 192-198. <https://doi.org/10.1177/09603271110371696>.

- Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*, 4, 180-183. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>.
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11, 613-619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>.
- Sies, H., & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 363-383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>.
- Silva, V. L., Mehltreter, K., & Schmitt, J. L. (2018). Ferns as potential ecological indicators of edge effects in two types of Mexican forests. *Ecological Indicators*, 93, 669-676. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.05.029>.
- Smith, A. R., Pryer, K. M., Schuettpelz, E., Korall, P., Schneider, H., & Wolf, P. G. (2006). A classification for extant ferns. *Taxon*, 55(3), 705-731. <https://doi.org/10.2307/25065646>.
- Snogan, E., Vahirua-Lechat, I., Ho, R., Bertho, G., Girault, J. P., Ortiga, S., . . . Lafont, R. (2007). Ecdysteroids from the Medicinal Fern *Microsorium scolopendria* (Burm. f.). *Phytochemical Analysis*, 18(5), 441-450. <https://doi.org/10.1002/pca.1000>.
- Sokoloff, D. D., & Remizown, M. V. (2021). Diversity, development and evolution of archegonia in land plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 195(3), 380-419. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boaa077>.
- Solimine, J., Garo, E., Wedler, J., Rusanov, K., Fertig, O., Hamburger, M., . . . Butterweck, V. (2016). Tyrosinase inhibitory constituents from a polyphenol enriched fraction of rose oil distillation wastewater. *Fitoterapia*, 108, 13-19. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.11.012>.
- Stokes, W. S., Casati, S., Strickland, J., & Paris, M. (2008). Neutral red uptake cytotoxicity tests for estimating starting doses for acute oral toxicity tests. *Current protocols in toxicology*, Chapter 20, Unit 20.24. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx2004s36>.
- Sukumaran, K., & Kuttan, R. (1991). Screening of 11 ferns for cytotoxic and antitumor potential with special reference to *Pityrogramma calomelanos*. *Journal of Ethnopharmacology*, 34(1), 93-96. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(91\)90194-j](https://doi.org/10.1016/0378-8741(91)90194-j).
- Sureshkumar, J., Silambarasan, R., Bharati, K. A., Krupa, J., Amalraj, S., & Ayyanar, M. (2018). A review on ethnomedicinally important pteridophytes of India. *Journal of Ethnopharmacology*, 219, 269-287. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.03.024>.
- Taylor, J. H., & Rosen, C. F. (2020). Systemic Photoprotection. *Current Dermatology Reports*, 9(3), 181-188. <https://doi.org/10.1007/s13671-020-00306-1>.
- ThePlantList. (2021). The Plant List: A working list of all plant species. Retrieved from: <http://theplantlist.org/> Accessed.
- TheWorldFloraOnline. (2022). The World Flora Online. Retrieved from: <http://www.worldfloraonline.org> Accessed.
- Thiesen, L. C., Baccarin, T., Fischer-Muller, A. F., Meyre-Silva, C., Couto, A. G., Bresolin, T. M. B., & Santin, J. R. (2017). Photochemoprotective effects against UVA and UVB irradiation and photosafety assessment of *Litchi chinensis* leaves extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 167, 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.033>.
- Tomasello, B., Malfa, G. A., Acquaviva, R., La Mantia, A., & Di Giacomo, C. (2022). Phytocomplex of a Standardized Extract from Red Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) against Photoaging. *Cells*, 11(9), 19. <https://doi.org/10.3390/cells11091447>.
- Tomescu, A. M. F. (2009). Megaphylls, microphylls and the evolution of leaf development. *Trends in Plant Science*, 14(1), 5-12. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.008>.

- Tomsík, P. (2014). Ferns and Lycopods-A Potential Treasury of Anticancer Agents but Also a Carcinogenic Hazard. *Phytotherapy Research*, 28(6), 798-810. <https://doi.org/10.1002/ptr.5070>.
- Valizadeh, H., Sonboli, A., Mahmoodi Kordi, F., & Babak Bahadori, M. (2015). Cytotoxicity, Antioxidant Activity and Phenolic Content of Eight Fern Species from North of Iran. *Pharmaceutical Sciences*, 21, 18-24. <https://doi.org/10.15171/PS.2015.12>.
- Vallès, J., & Garnatje, T. (2016). A VINDICATION OF ETHNOBOTANY BETWEEN NATURAL AND SOCIAL SCIENCE. *Metode Science Studies Journal*(6), 23-27. <https://doi.org/10.7203/metode.6.4402>.
- van Tonder, A., Joubert, A. M., & Cromarty, A. D. (2015). Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC research notes*, 8, 47. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1000-8>.
- Vasco, A., Moran, R. C., & Ambrose, B. A. (2013). The evolution, morphology, and development of fern leaves. *Frontiers in Plant Science*, 4, 16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00345>.
- Vrchovská, V., Sousa, C., Valentao, P., Ferreres, F., Pereira, J. A., Seabra, R. M., & Andrade, P. B. (2006). Antioxidative properties of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC) external leaves against DPPH, superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *Food Chemistry*, 98(3), 416-425. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.06.019>.
- Wen, W. W., Alseekh, S., & Fernie, A. R. (2020). Conservation and diversification of flavonoid metabolism in the plant kingdom. *Current Opinion in Plant Biology*, 55, 100-108. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2020.04.004>.
- Wickett, N. J., Mirarab, S., Nguyen, N., Warnow, T., Carpenter, E., Matasci, N., . . . Leebens-Mack, J. (2014). Phylotranscriptomic analysis of the origin and early diversification of land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(45), E4859-E4868. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323926111>.
- Williamson, G. (2017). The role of polyphenols in modern nutrition. *Nutrition Bulletin*, 42(3), 226-235. <https://doi.org/10.1111/nbu.12278>.
- World Health Organization, W. (2013). *WHO traditional medicine strategy: 2014-2023*. Hong Kong SAR, China: WHO.
- Wu, S. Q., Li, J., Wang, Q. X., Cao, H., Cao, J. G., & Xiao, J. B. (2017). Seasonal dynamics of the phytochemical constituents and bioactivities of extracts from *Stenoloma chusanum* (L.) Ching. *Food and Chemical Toxicology*, 108, 458-466. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.10.003>.
- Xia, X., Cao, J. G., Zheng, Y. X., Wang, Q. X., & Xiao, J. B. (2014). Flavonoid concentrations and bioactivity of flavonoid extracts from 19 species of ferns from China. *Industrial Crops and Products*, 58, 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.04.005>.
- Yen, W.-J., Chyau, C.-C., Lee, C.-P., Chu, H.-L., Chang, L.-W., & Duh, P.-D. (2013). Cytoprotective effect of white tea against H₂O₂-induced oxidative stress *in vitro*. *Food Chemistry*, 141(4), 4107-4114. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.106>.
- Yuan, H. D., Ma, Q. Q., Ye, L., & Piao, G. C. (2016). The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. *Molecules*, 21(5), 18. <https://doi.org/10.3390/molecules21050559>.
- Zhou, M. M., Chen, P., Lin, Y., Fang, S. Z., & Shang, X. L. (2019). A Comprehensive Assessment of Bioactive Metabolites, Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Cyclocarya paliurus* (Batal.) Iljinskaja Leaves. *Forests*, 10(8), 16. <https://doi.org/10.3390/f10080625>.
- Zivkovic, S., Milutinovic, M., Maksimovi, V., Ciric, A., Ivanov, M., Bozunovic, J., . . . Mistic, D. (2020). Antioxidant and antimicrobial activity of two *Asplenium* species. *South African Journal of Botany*, 132, 180-187. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.03.034>.

Zolghadri, S., Bahrami, A., Khan, M. T. H., Munoz-Munoz, J., Garcia-Molina, F., Garcia-Canovas, F., & Saboury, A. A. (2019). A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34(1), 279-309. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1545767>.

Apéndices

“Las palabras pertenecen a sus dueños, pero el paisaje es de quien sabe apreciarlo”

- Upton Sinclair.

Apéndice 1

Apéndice 1: Contenido (mg/kg de extracto seco) de 15 compuestos bioactivos en muestras de helecho analizadas por HPLC-DAD (n = 3); n.d. significa no detectado.

N°	Compuesto	PVM	AAM	ATM	COM
A) Ácidos fenólicos					
A.1) Ácidos benzoicos					
1	Ácido gálico	1.791,3 ± 38,3	9.381,2 ± 281,6	326,6 ± 14,7	978,1 ± 18,1
2	Ácido sikímico	5.339,3 ± 70,6	7.549,2 ± 112,4	1.065,2 ± 38,6	847,7 ± 19,0
A.2) Ácidos cinámicos					
3	Ácido 3-O- cafeoilquínico (ácido clorogénico)	58.778,3 ± 417,7	175,4 ± 15,2	76,9 ± 13,0	55.607,9 ± 205,7
4	Ácido 5-O- cafeoilquínico (ácido neoclorogénico)	256,5 ± 12,1	302,6 ± 16,8	81,9 ± 5,8	754,4 ± 17,1
5	Ácido 3,5-di-O- cafeoilquínico	106,0 ± 15,5	24,9 ± 5,2	n.d.	n.d.
6	Ácido cinámico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
7	Ácido rosmarínico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B) Flavonoides					
B.1) Flavonoles					
8	Hiperósido	91,3 ± 11,7	106,5 ± 6,5	n.d.	n.d.
9	Quercitrina	n.d.	n.d.	15.372,7 ± 35,3	n.d.
10	Rutina	422,7 ± 30,4	2.791,3 ± 28,2	20.350,5 ± 266,9	1.927,1 ± 47,8

B.2) Flavanoles					
11	(+)-Catequina hidrato	3.879,8 ± 153,3	2.573,3 ± 119,6	2.460,2 ± 44,0	1.636,5 ± 57,9
12	(-)-Epicatequina	7.158,5 ± 88,8	1.050,0 ± 99,0	6.175,1 ± 56,7	6.973,5 ± 55,9
B.3) Flavanonas					
13	Naringenina	n.d.	n.d.	346,7 ± 14,9	521,0 ± 43,9
C) Derivados de fenilpropano (no compuestos fenólicos)					
14	Eugenol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15	Trans-cinamaldehído	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Contenido total		77.823,7 ± 838,4	23.954,4 ± 684,5	46.255,8 ± 489,9	69.246,2 ± 465,4

Apéndice 2

Apéndice 2: Contenido (mg/kg de extracto seco) de 38 compuestos bioactivos en muestras de hehecho analizadas por HPLC-MS/MS (n = 3, RSD% osciló entre 1,8 y 6,8%); n.d. significa no detectado.

N°	Compuesto	PVM	AAM	ATM	COM
A) Ácidos fenólicos					
A.1) Ácidos benzoicos					
1	Ácido gálico	9,03	30,56	5,36	13,14
2	Ácido p-hidroxibenzoico	88,64	109,38	63,81	31,31
3	Ácido 3-hidroxibenzoico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	Ácido vanílico	748,34	235,19	85,52	213,81
5	Ácido siríngico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6	Ácido elágico	n.d.	n.d.	67,99	10,10
A.2) Ácidos cinámicos					
7	Ácido 3-O-cafeoilquínico (ácido clorogénico)	39.359,72	681,10	55,93	43.809,25
8	Ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido neoclorogénico)	52,0	n.d.	n.d.	2.300,25
9	Ácido 3,5-dicafeoilquínico	109,63	3,62	1,50	95,85
10	Ácido cafeico	381,54	16,68	14,80	112,88
11	Ácido ferúlico	24,30	1,77	4,20	1,55
12	Ácido p-cumárico	160,00	61,10	30,30	67,38
B) Flavonoides					

B.1) Antocianidinas

13	Delfinidina-3,5-diglucósido	27,77	2,06	897,53	1.138,14
14	Delfinidina-3-galactósido	13,02	0,56	5,85	1,18
15	Cianidina-3-glucósido	10,60	64,07	26,13	3,15
16	Petunidina-3-glucósido	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
17	Pelargonidina-3-rutinósido	n.d.	n.d.	20,79	n.d.
18	Pelargonidin-3-glucósido	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
19	Malvidina-3-galactósido	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

B.2) Flavonoles

20	Rutina	388,78	5,54	0,98	0,40
21	Isoquercitrina	58,27	3,17	1.185,02	1.362,95
22	Quercitrina	4,18	0,99	322,94	2,07
23	Miricetina	0,57	0,71	0,00	0,00
24	Kaempferol-3-glucósido	127,52	36,85	251,71	263,83
25	Quercetina	2,39	0,74	26,05	9,85
26	Isorhamnetina	0,25	0,18	0,06	0,14
27	Hiperósido	87,07	5,59	1.352,71	1.719,52
28	Kaempferol	12,52	1,88	52,50	9,56

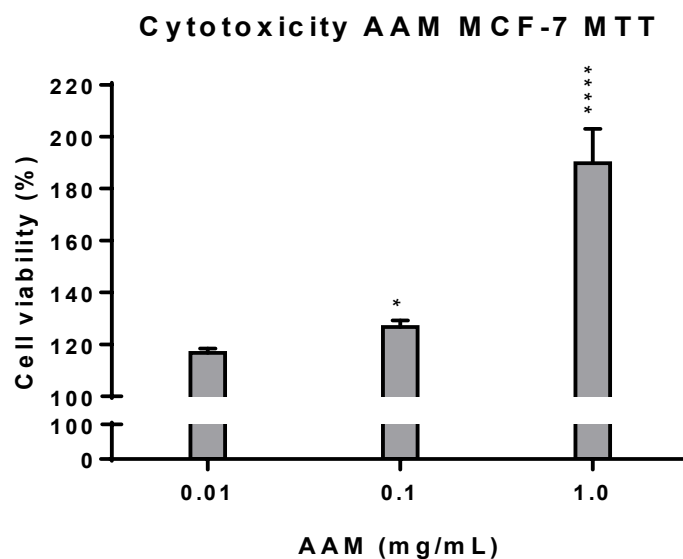
B.3) Flavana-3-ol

29	Catequina	38,08	n.d.	n.d.	n.d.
30	Epicatequina	22,45	7,69	61,43	29,83

31	Procianidina B2	102,67	110,16	83,24	39,40
32	Procianidina A2	7,58	3,63	1,37	3,15
B.4) Dihidrochalconas					
33	Floridzina	n.d.	n.d.	1,30	n.d.
34	Floretina	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B.5) Flavanonas					
35	Hesperidina	13,58	14,81	14,81	15,06
36	Naringenina	n.d.	n.d.	n.d.	4.234,63
C) Stilbenos					
37	Resveratrol	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
C) Derivado de fenilpropano (no compuesto fenólico)					
38	Ácido trans-cinámico	n.d.	7,69	3,47	2,56
Contenido total		41.850,50	1.405,68	4.637,30	55.487,79

Apéndice 3

Apéndice 3: Actividad citotóxica de AAM en la línea celular MCF-7 obtenida por el ensayo MTT y expresada como porcentaje de viabilidad celular respecto a las células control. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de $n = 3$. Las células de control se mantuvieron solo con medio de cultivo. Se han realizado un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) seguido del ensayo post hoc de Bonferroni. Se ha considerado la existencia de diferencias estadísticas cuando $p \leq 0.05$ (*), $p \leq 0.01$ (**), $p \leq 0.001$ (***) o $p \leq 0.0001$ (****) al comparar con las células no tratadas (control negativo).



Permisos de uso del material gráfico

"El que busca un camino para llegar al mar que siga río abajo"

- Plauto.

Permiso de uso del material gráfico Figuras 11, 12 y 13

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Sep 09, 2022

This Agreement between Mr. Adrià Farràs Martínez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number 5384960693137

License date Sep 09, 2022

Licensed Content
Publisher Elsevier

Licensed Content
Publication Food Chemistry

Licensed Content Title The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants

Licensed Content Author Monica Leopoldini, Nino Russo, Marirosa Toscano

Licensed Content Date Mar 15, 2011

Licensed Content
Volume 125

Licensed Content Issue 2

Licensed Content Pages 19

Start Page 288

End Page	306
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables /illustrations	2
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	Fitocaracterización y actividad biológica de extractos de helechos de las familias "Polypodiaceae" y "Aspleniaceae" procedentes de las montañas de Prades (Tarragona)
Institution name	Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona
Expected presentation date	Sep 2022
Portions	Scheme 1 and Scheme 2
Requestor Location	Mr. Adrià Farràs Martínez Av. Joan XXIII s/n Facultat Farmàcia UB Barcelona, Barcelona 08028 Spain Attn: Mr. Adrià Farràs Martínez
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12

Permiso de uso del material gráfico Figura 19

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 09, 2022

This Agreement between Mr. Adrià Farràs Martínez ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5384950528504
License date	Sep 09, 2022
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Ecology Letters
Licensed Content Title	Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation
Licensed Content Author	Roxana Torres, Neil B. Metcalfe, Pat Monaghan
Licensed Content Date	Dec 9, 2008
Licensed Content Volume	12
Licensed Content Issue	1

Licensed Content Pages	18
Type of use	Dissertation/Thesis
Requestor type	University/Academic
Format	Print and electronic
Portion	Figure/table
Number of figures/tables	1
Will you be translating?	No
Title	Fitocaracterización y actividad biológica de extractos de helechos de las familias "Polypodiaceae" y "Aspleniaceae" procedentes de las montañas de Prades (Tarragona)
Institution name	Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona
Expected presentation date	Sep 2022
Portions	Figure 1
Requestor Location	Mr. Adrià Farràs Martínez Av. Joan XXIII s/n Facultat Farmàcia UB Barcelona, Barcelona 08028 Spain Attn: Mr. Adrià Farràs Martínez
Publisher Tax ID	EU826007151

Permiso de uso del material gráfico Figura 21

SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jul 19, 2022

This Agreement between Mr. Adrià Farràs Martínez ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number 5352660197859

License date Jul 19, 2022

Licensed Content Publisher Springer Nature

Licensed Content Publication Nature Reviews Molecular Cell Biology

Licensed Content Title Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents

Licensed Content Author Helmut Sies et al

Licensed Content Date Mar 30, 2020

Type of Use Thesis/Dissertation

Requestor type academic/university or research institute

Format print and electronic

Portion figures/tables/illustrations

Number of figures/tables /illustrations	1
High-res required	no
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title	Fitocaracterización y actividad biológica de extractos de helechos de las familias "Polypodiaceae" y "Aspleniaceae" procedentes de las montañas de Prades (Tarragona)
Institution name	Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona
Expected presentation date	Sep 2022
Order reference number	2
Portions	Figure 3
Requestor Location	Mr. Adrià Farràs Martínez Av. Joan XXIII s/n Facultat Farmàcia UB Barcelona, Barcelona 08028 Spain Attn: Mr. Adrià Farràs Martínez
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

Permiso de uso del material gráfico Figura 23

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 09, 2022

This Agreement between Mr. Adrià Farràs Martínez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5384960973616
License date	Sep 09, 2022
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal of Autoimmunity
Licensed Content Title	Light, including ultraviolet
Licensed Content Author	Emanuel Maverakis, Yoshinori Miyamura, Michael P. Bowen, Genevieve Correa, Yoko Ono, Heidi Goodarzi
Licensed Content Date	May 1, 2010
Licensed Content Volume	34
Licensed Content Issue	3
Licensed Content Pages	11
Start Page	J247

End Page	J257
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	Fitocaracterización y actividad biológica de extractos de helechos de las familias "Polypodiaceae" y "Aspleniaceae" procedentes de las montañas de Prades (Tarragona)
Institution name	Department of Biochemistry and Physiology, Faculty of Pharmacy and Food Sciences, Universitat de Barcelona
Expected presentation date	Sep 2022
Portions	Figure 3
Requestor Location	Mr. Adrià Farràs Martínez Av. Joan XXIII s/n Facultat Farmàcia UB Barcelona, Barcelona 08028 Spain Attn: Mr. Adrià Farràs Martínez
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12