

Short Communication

Extractos de *Microsorium scolopendra*: como nuevos agentes bioactivos[*Microsorium scolopendra* extracts: as new bioactive agents]**Cristóbal Balada¹, Valentina Díaz¹, Mónica Castro², María José Marchant¹ y Leda Guzmán^{1*}**¹Laboratorio de Biomedicina y Biocatálisis, Instituto de Química, Facultad de Ciencias,
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile²Laboratorio de Propagación, Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agronómicas y de los Alimentos,
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Quillota, Chile*Correspondence to: leda.guzman@pucv.cl

Abstract: *Microsorium scolopendria* (MS), grows on the Chilean island of Rapa Nui, is a fern used to treat several diseases. The aim of this study was to perform a characterization of compound and to evaluate biological properties of MS extracts. The compound identity was analyzed using reversed-phase high-performance liquid chromatography method coupled to mass spectrometry. The radical scavenging and anti-inflammatory activities were evaluated for DPPH, ORAC, and COX inhibition activity assay. A 46% of phenolic compound were founded in rhizome and several important flavonoids such as protocatechic acid 4-O-glucoside. MS extract showed antioxidant properties and anti-inflammatory selective property against COX-2 enzyme. MS extract could have a therapeutic potential to treat several inflammatory diseases.

Keywords: *Microsorium*; Antioxidant; Cyclooxygenase.

Resumen: *Microsorium scolopendria* (MS), crece en la isla chilena de Rapa Nui; helecho utilizado para tratar diversas enfermedades. El objetivo de este estudio fue realizar una caracterización de compuestos y evaluar sus propiedades biológicas en extractos de MS. La identidad de los compuestos se analizó mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa acoplado a espectrometría de masas. La actividad antioxidante se evaluó midiendo la actividad de inhibición de DPPH, ORAC y la actividad anti-inflamatoria evaluando la inhibición de las enzimas ciclooxigenasas COX. Se encontró que un 46% de compuestos fenólicos en extractos de rizoma y flavonoides importantes como el ácido protocatequico 4-O-glucósido. El extracto de MS mostró importantes propiedades antioxidantes y propiedades selectivas anti-inflamatorias contra la enzima COX-2. El extracto de MS mostró un potencial terapéutico para tratar varias infecciones y enfermedades inflamatorias.

Palabras clave: *Microsorium*; Antioxidante; Ciclooxigenasa.

This article must be cited as: Balada C, Díaz V, Castro M, Marchant MJ, Guzmán L. 2022. Extractos de *Microsorium scolopendra*: como nuevos agentes bioactivos. **Med Plant Commun** 5 (1): 6 – 10.

INTRODUCCIÓN

Microsorium scolopendria (MS) es un helecho que crece en la isla de Rapa Nui, conocido por los nativos como “Matu'a Pua'a”, extracto de rizoma es usado en la medicina alternativa con diversos propósitos. MS es originario de las islas polinésicas como Fiji, Tahiti, Hawái y Rapa Nui (Chiou y Farrar, 1997) y Madagascar (Ramanitrahasimbola *et al.*, 2005), donde se utiliza para tratar asma, enfermedades inflamatorias y como agente anticancerígeno (Fernández *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010). MS pertenece a la familia Polypodiaceae, de rizoma rastrero y gran parte de sus propiedades medicinales se asocian a su alta concentración de polifenoles y fitoecdisteroides (Soare *et al.*, 2012; Chai *et al.*, 2013). Dada la importancia que tiene MS para la cultura de Rapa Nui, sumado a los pocos estudios que existen a nivel mundial, es que realizamos un estudio sobre la caracterización MS a partir de un extracto de rizoma, en cuanto a la identificación de polifenoles y flavonoids y sus propiedades biológicas. Para ello, se realizó una cromatografía en fase reversa acoplado a espectroscopia de masa (RP-HPLC) (Mittal *et al.*, 2014). La capacidad de eliminación de radicales libres de cada muestra fue determinada usando el método descrito por Wong *et al.* (2006), DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) y el método ORAC y la capacidad antiinflamatoria por la inhibición de las enzimas Ciclooxygenasas. Se identificaron sobre 100 compuestos como polifenoles y falvonoides, lo que da cuenta se las propiedades biológicas que posee MS.

METODOLOGÍA

Obtención de extractos de MS

MS fue obtenida desde el reservorio de CONAF de Rapa Nui. Los rizomas se molieron y se dejaron en agitación con hexano por 72 horas a 35°C. Luego, se retiró el hexano y se adicionó acetato de etilo por 72 horas a 35°C en agitación. La solución fue filtrada y los solventes fueron eliminados mediante destilación a presión reducida en un rotavapor (Heildolph, Alemania). Una vez secada, se pesó y disolvió en etanol a una concentración de 10000 +/- µg/mL, posterior filtrado a través de un filtro de 0,22 µm y almacenamiento a -20°C para posteriores análisis. Los extractos obtenidos se denominaron RAE.

RP-HPLC-MS/MS de extractos de MS

El análisis RP-HPLC-MS/MS se realizó utilizando un equipo HPLC 1100 (Agilent Technologies, USA) y un espectrofotómetro de masas TRAP 3200 Q TRAP híbrido de triple cuadrupolo/ion lineal. Se utilizó un gradiente de disolvente A (Acido fórmico al 0,1%) y B (Metanol al 100%), con un caudal de 0,5 mL/min. Se realizó una gradiente de la solución B de 5 a 50% durante 30 min, seguido de un aumento a 75% de B durante 25 min. El rango de medición fue entre m/z 100 y 1000 y se detectó en modo positivo y negativo. Los datos fueron analizados utilizando el programa Thermo Xcalibur 2.2 SP1.48 (Thermo Fisher Scientific Inc.), utilizando los pesos moleculares obtenidos de <http://phenol-explorer.eu/>.

Determinación actividad antioxidante por DPPH

Se utilizó 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), para determinar la capacidad de eliminación de radicales libres de cada muestra usando el método descrito por Dudonné *et al.* (2009). Brevemente, la solución de DPPH 10 mg/mL se disolvió a 1:5 en etanol. Se añadieron 20 µL de la muestra a evaluar a una concentración de 20 µg/mL a 180 µL de DPPH. La medición se realizó cada 20 segundos durante 20 minutos a 517 nm. Para calcular el % de inhibición, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{ABS Inicial} - \text{ABS Final}}{\text{ABS Inicial}} \times 100$$

Ensayo ORAC-FL

Se utilizó el método de Dávalos y Gómez-Cordovés (2004), con algunas modificaciones. La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato 75 mM (pH 7,4) y la mezcla de reacción final fue de 200 µL en microplacas de fondo oscuro de 96 pocillos. Se colocaron 20 µL de la muestra a analizar a una concentración de 20 µg/mL y fluoresceína. La mezcla fue preincubada y se añadió una solución de AAPH. La fluorescencia se registró cada minuto durante 80 min. A partir de las curvas normalizadas, el área bajo la curva de decaimiento de fluorescencia (AUC) se calculó como:

$$\text{AUC} = 1 + \sum_{i=1}^{i=80} \frac{f_i}{f_0}$$

donde f_0 es la lectura de fluorescencia inicial a 0 min y f_i es la lectura de fluorescencia en el tiempo i . El AUC neto correspondiente a una muestra se calculó restando el AUC correspondiente al blanco. Se calcularon las ecuaciones de regresión entre el AUC neto y la concentración de antioxidantes para todas las muestras. Los valores de ORAC-FL se expresan como equivalentes de TROLOX utilizando la curva estándar calculada para cada ensayo. Los resultados finales son expresados Valor ORAC, siendo 1 el valor obtenido de la muestra control TROLOX.

Inhibición de enzimas COX. La evaluación de la inhibición de las enzimas COX se realizó utilizando los kits de BioVisión® “COX-1-COX2 Inhibitor Screening Kit (Fluorometric)” siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron mediciones a través del tiempo, incubando con 3 µg/mL de extracto de MS y los fármacos SC560 (inhibidor comercial de COX-1) y Celecoxib (inhibidor comercial de COX-2, midiéndose la fluorescencia ($\lambda_{exc}/\lambda_{em}$: 535/587 nm) en un lector de multiplacas (Thermo Scientific Skanit® Appliskan) a 25°C por 10 minutos. El porcentaje de inhibición se calculó a partir de la siguiente fórmula:

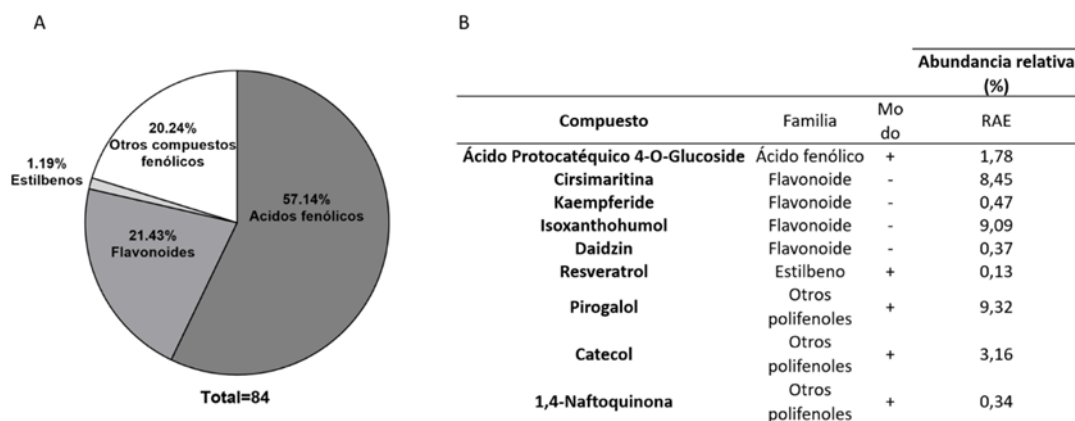
$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Pendiente control enzima} - \text{Pendiente Compuesto inhibidor}}{\text{Pendiente control enzima}} \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de RP-HPLC acoplado a masa, permitió evaluar en modo positivo y negativo los compuestos presentes en los extractos de MS. Utilizando los pesos moleculares de más de 1200 muestras de la base de datos Phenol-explorer, podemos ver una representación gráfica del contenidos o familias de polifenoles en porcentaje y los compuestos con mayor abundancia relativa encontrados en el extracto de MS llamado RAE (Figura N° 1).

Figura N° 1

A. Porcentajes de distribución relativa de familias de polifenoles en extractos de MS. B. Abundancias relativas de compuestos detectados en extracto de MS



La Tabla N° 1 indica los resultados de capacidad antioxidante evaluado por DPPH y Valor ORAC para los extractos de MS. Se utilizó como control positivo ácido gálico y Vitamina C para los ensayos de inhibición de DPPH, y para el ensayo de ORAC se utilizó como control positivo TROLOX.

Se evaluó el efecto del extracto sobre la inhibición de las enzimas COX-1 y COX-2. La enzima COX-1 se expresa de forma constitutiva y es considerada una proteína de mantenimiento, responsable de mantener un funcionamiento fisiológico normal.

Tabla N° 1
Determinación de la capacidad antioxidante del extracto de MS por métodos de DPPH y ORAC

Muestra	DPPH (% Inhibición)	Valor ORAC
RAE	82,96 ± 0,53	1,63 ± 0,02
Acido gálico	79,24 ± 0,26	1,03 ± 0,14
Vitamina C	70,45 ± 1,34	0,52 ± 0,04
TROLOX	-	1

La enzima COX-2 es una enzima inducible y su expresión se activa cuando ocurre daño tisular y condiciones inflamatorias. La inhibición de COX-1 produce efectos secundarios como lo son la inhibición de agregación plaquetaria y formación de melanomas (Perrone *et al.*, 2010), mientras que la inhibición de COX-2 tiene efectos terapéuticos sobre el dolor producido por la inflamación (Kundu y Fulton, 2002; Gautam *et al.*, 2010). Por tanto, se espera tener una inhibición selectiva de la enzima COX-2 por sobre la enzima COX-1.

Los IC₅₀ de los extractos de MS frente a las enzimas COX se presentan en la Tabla N° 2 junto al índice de selectividad.

Tabla N° 2
IC₅₀ e índices de selectividad por extractos de MS frente a enzimas COX.

Muestra	IC ₅₀ (µg/mL)		Índice de selectividad
	COX-1	COX-2	
RAE	31,28 ± 0,39	3,14 ± 0,02	9,96
HH	36,89 ± 4,96	6,19 ± 0,61	5,96
SC560	6,54x10 ⁻³ ± 9,02x10 ⁻⁵	-	-
Celecoxib	-	1,81 ± 0,02	-

Los controles positivos corresponden a SC560 para COX-1 y Celecoxib para COX-2, ambos presentan una selectividad mayor para sus respectivas enzimas (Kundu y Fulton, 2002). Estos resultados se complementan con los ensayos de capacidad antioxidante DPPH y el valor ORAC encontrado, ya que el extracto de MS no solo es capaz de actuar sobre las moléculas radicalarias, sino que también son capaces de inhibir su producción.

CONCLUSIÓN

Microsorum scolopendria exhibió altas concentraciones de polifenoles en los rizomas, principalmente en flavonoides. Ácido protocatequico 4-O-glucósido, cirsimaritina, isoxanto-humol, daidzeína, pirogalol y resveratrol exhibiendo las mayores abundancias relativas. Los polifenoles pueden ser interesantes desde una perspectiva farmacológica debido a su alta actividad de captación de radicales y su capacidad para modular las vías metabólicas intracelulares. Los extractos de rizoma presentaron una alta actividad de captación de radicales en los ensayos DPPH y ORAC. La evaluación de la inhibición de la enzima COX mostró que estos extractos de MS son selectivos con una inhibición 9,96 mayor frente a COX-2 que frente a COX-1. A futuro se requiere hacer evaluaciones in vitro e in silico para encontrar objetivos celulares para un eventual uso terapéutico.

AGRADECIMIENTOS

ANID-FONDEF IT18I0015 “Propagación masiva para el desarrollo sustentable de especies medicinales en Rapa Nui”; Beca de estudios ANID 21190657 y Dirección de Investigación de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios Avanzados, Pontificia Uni-versidad Católica de Valparaíso, Chile DIE 039.411/2021.

REFERENCIAS

- Chai T, Elamparuthi S, Yong A, Quah Y, Ong H. 2013. Antibacterial, anti-glucosidase, and antioxidant activities of selected highland ferns of Malaysia. **Botanical Studies** 54: 1-7. <https://doi.org/10.1186/1999-3110-54-55>
- Chiou WL, Farrar DR. 1997. Antheridiogen production and response in Polypodiaceae species. **Am J Bot** 84: 633-640. <https://doi.org/10.2307/2445900>
- Dávalos A, Gómez-Cordovés BB. 2004. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC–Fluorescein). **Assay** 52: 48-54. <https://doi.org/10.1021/jf0305231>
- Dudonné S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Mérillon JM. 2009. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **J Agric Food Chem** 57: 1768-1774. <https://doi.org/10.1021/jf803011r>
- Fernández H, Kumar A, Revilla MA. 2010. Working with ferns: Issues and applications. **Issues Applications** 2: 1-386. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7162-3>
- Perrone G, Scilimati M, Simone A, Vitale P. 2010. Selective COX-1 inhibition: A therapeutic target to be reconsidered. **Curr Med Chem** 17: 3769-3805. <https://doi.org/10.2174/092986710793205408>
- Gautam R, Srivastava A, Jachak SM, Saklani A. 2010. Anti-inflammatory, cyclooxygenase (COX)-2, COX-1 inhibitory and antioxidant effects of *Dysophylla stellata* Benth. **Fitoterapia** 81: 45-49. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.07.004>
- Ho R, Teai T, Biachini JP, Lafont R, Raharivelomanana P. 2010. Ferns: From traditional uses to pharmaceutical development, chemical identification of active principles. In Working with ferns: **Issues Applications** June 2017: 1-386). <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7162-3>
- Kundu N, Fulton AM. 2002. Selective cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 inhibitors control metastatic disease in a murine model of breast cancer. **Cancer Res** 62: 2343-2346.
- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. 2014. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants Redox Signaling** 20: 1126-1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>
- Ramanitrahambola D, Rakotondramanana DA, Rasoanaivo P, Randriantsoa A, Ratsimamanga S, Palazzino G, Galeffi C, Nicoletti M. 2005. Bronchodilator activity of *Phymatodes scolopendria* (Burm.) Ching and its bioactive constituent. **J Ethnopharmacol** 102: 400-407. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.037>
- Soare LC, Ferdeş M, Stefanov S, Denkova Z, Nicolova R, Denev P, Bejan C, Păunescu A. 2012. Antioxidant activity, polyphenols content and antimicrobial activity of several native pteridophytes of Romania. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca** 40: 53-57. <https://doi.org/10.15835/nbha4016648>
- Wong SP, Leong LP, William Koh JH. 2006. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chem** 99: 775-783. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.058>