



Total phenolic content and antioxidant capacity of hydromethanolic extracts of *in vitro* and *ex vitro* plantlets of *Drosera* spp

Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante de extractos hidrometanólicos de plántulas *in vitro* y *ex vitro* de *Drosera* spp

Ana Karina Carrera-Felipe¹, Sugey Vásquez-Hernández¹, María Teresa González-Arnao¹, Enrique Bonilla-Zavaleta¹, Rosalía Nuñez-Pastrana², Carlos Alberto Cruz-Cruz^{1*}.

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, Prolongación de Oriente 6 # 1009, Orizaba 94340, Veracruz, Mexico.

²Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Amatlán de los Reyes 94945, Veracruz, Mexico.

*Corresponding author

E-mail address: calcruz@uv.mx (C. A. Cruz-Cruz)

Article history:

Received: 16 December 2019 / Received in revised form: 25 May 2020 / Accepted: / 7 June 2020 / Published online: 1 July 2020.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2020.5.3.17>

ABSTRACT

Drosera, is one of the most numerous genera of carnivorous plants. It has been reported to have pharmacological activities such as anticancer, antibacterial and anti-inflammatory. However, total phenolic content and antioxidant capacity have been poorly studied. Five specimens were *in vitro* propagated (*D. binata*, *D. capensis* Alba, *D. capensis* All Red, *D. spatulata* and *D. spatulata* x *nidiformis*) and acclimatized for three months. Total phenolic content (TPC) was quantified by the Folin-Ciocalteu test and the antioxidant capacity of the hydromethanolic extracts against the free radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was determined. *In vitro* plantlets of *D. capensis* All Red showed the highest TPC (3.32 ± 0.07 mg GAE/g) determined in dry weight. While, the highest antioxidant capacity determined in fresh weight, was obtained in *D. capensis* All Red and *D. spatulata* with 692.36 ± 66.91 and 665.14 ± 41.82 TE/g, respectively. The acclimatized plantlets of *D. spatulata* x *nidiformis* showed the highest TPC and the highest antioxidant capacity (both evaluated in fresh weight), with 6.13 ± 0.07 mg GAE/g

and 1027.91 ± 4.56 TE/g, respectively. The specimen and the origin of the extracts influence the response of total phenolic content and antioxidant capacity.

Keywords: Antioxidant capacity, *Drosera* spp, total phenolic content.

RESUMEN

Drosera, es uno de los géneros más numerosos de plantas carnívoras. Se ha reportado que poseen actividades farmacológicas como anticancerígenos, antibacterianas y antiinflamatorias. Sin embargo, el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante han sido poco estudiadas. Se propagaron cinco ejemplares *in vitro* (*D. binata*, *D. capensis* Alba, *D. capensis* All Red, *D. spatulata* y *D. spatulata* x *nidiformis*) y se aclimatizaron durante tres meses. Se cuantificó el contenido de fenoles totales (CFT) mediante el ensayo Folin-Ciocalteu y se determinó la capacidad antioxidante de los extractos hidrometanólicos contra el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH). Las plántulas *in vitro* de *D. capensis* All Red presentaron el mayor CFT (3.32 ± 0.07 mg GAE/g) determinado en peso seco. Mientras que, la mayor capacidad antioxidante determinada en peso fresco, se obtuvieron en *D. capensis* All Red y *D. spatulata* con 692.36 ± 66.91 y 665.14 ± 41.82 TE/g, respectivamente. Las plántulas aclimatizadas de *D. spatulata* x *nidiformis* presentaron el mayor CFT y la mayor capacidad antioxidante (evaluados en peso fresco), con 6.13 ± 0.07 mg GAE/g y 1027.91 ± 4.56 TE/g, respectivamente. Los ejemplares y el origen de los extractos influyeron en la respuesta del contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante.

Palabras clave: capacidad antioxidante, contenido de fenoles totales, *Drosera* spp.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas carnívoras han atraído el interés de científicos y público en general debido a su naturaleza exótica y a su adaptación en suelos con bajo contenido de nutrientes (Ellison & Adamec, 2018; Pavlovič & Mithöfer, 2019), una respuesta evolutiva a estas condiciones ambientales ha sido la captura de presas para obtener de ellos los nutrientes que no adquieren del suelo, desarrollando órganos modificados para la atracción, captura y digestión de sus presas (Pavlovič *et al.*, 2016).

Algunas de las plantas carnívoras con mayor distribución son las plantas del género *Drosera*. Se ha reportado que este género presenta compuestos tales como naftoquinonas y flavonoides responsables de propiedades farmacológicamente importantes; es por ello que ha surgido un creciente interés por los metabolitos secundarios producidos por el género *Drosera* (Boonsnongcheep *et al.*, 2019).

Los compuestos fenólicos son uno de los grupos más grandes y diversos de metabolitos secundarios presentes en las plantas (Kubalt, 2016), desempeñan importantes funciones fisiológicas y ecológicas en la vida vegetal; son esenciales para el crecimiento, coloración, polinización, defensa ante factores bióticos y abióticos y como agentes protectores contra la luz UV (Lin *et al.*, 2016), además poseen la capacidad de actuar como antibióticos, antifúngicos, pesticidas y antioxidantes (Tungmunnithum *et al.*, 2018). Se han reportado que poseen propiedades funcionales de eliminación de radicales libres (Asirvatam *et al.*, 2018), debiendo su propiedad antioxidante al alto potencial redox que les permite actuar como agentes reductores, donantes de hidrógeno y extintores del oxígeno singulete (Tupec *et al.*, 2017).

Los organismos aeróbicos presentan de manera constante la formación de radicales libres, principalmente de especies reactivas de oxígeno (EROS) (Kruk *et al.*, 2019), en las plantas son generadas a partir de reacciones de oxidación-reducción y como subproductos de varias rutas metabólicas (Bhattacharjee, 2019), que se originan en organelos como los cloroplastos, peroxisomas y mitocondrias, los niveles bajos de EROS son necesarios en las plantas para varios procesos biológicos; sin embargo, en niveles altos las EROS plantean una amenaza para las células vegetales (Huang *et al.*, 2019), ocasionando que estas especies ataquen a las biomoléculas y conduzcan a la célula al estrés oxidativo y posteriormente a la muerte, por lo cual, para proteger los componentes celulares, las plantas recurren a los antioxidantes (Kim *et al.*, 2018).

Los antioxidantes son compuestos que tienen la capacidad de transferir electrones y/o átomos de hidrógeno de tipo radical para neutralizar radicales libres, son compuestos de gran interés por la capacidad que poseen de reducir los efectos adversos causados por las EROS, retrasando o inhibiendo el daño celular (David *et al.*, 2019).

Diversos estudios han revelado el hecho de que existe una correlación entre el contenido fenólico total y los potenciales antioxidantes de los extractos de las plantas (Chaudhuri & Ray, 2018), por lo cual se han reportado varias técnicas como el ensayo bioquímico del reactivo Folin-Ciocalteu para evaluar el contenido de compuestos fenólicos en muestras biológicas (Puangbanlang *et al.*, 2019), mientras que uno de los métodos más utilizados para evaluar la capacidad antioxidante basado en la transferencia de electrones individuales (SET) es el método 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), ampliamente utilizado para extractos de origen vegetal (Chaves *et al.*, 2020).

Sin embargo, la mayoría de estos compuestos aún se obtienen de plantas en sus hábitats naturales, es por ello que se ha recurrido a técnicas de cultivo de tejidos vegetales para la obtención de material vegetal y metabolitos secundarios (Cardoso *et al.*, 2019). Estudios realizados por Makowski *et al.*, (2019) reportan la presencia de metabolitos fenólicos en especies del género *Drosera*. Por lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo cuantificar el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante de cinco ejemplares del género *Drosera*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material biológico

Se utilizaron plantas del género *Drosera*, pertenecientes a la colección activa del laboratorio de Biotecnología y Criobiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana: *D. binata*, *D. capensis* Alba, *D. capensis* All Red, *D. spatulata* y *D. spatulata x nidiformis* en cultivo *in vitro* en medio semisólido MS (Murashige & Skoog, 1962) a $1/2$ de su concentración y aclimatizadas utilizando como sustrato Peat Moss y agrolita (1:1), con $60 \pm 5\%$ de humedad relativa y una irradiancia de luz natural de $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se depositó una muestra de cada uno de los ejemplares en el Herbario CORU Dr. Jerzy Rzedowski Rotter de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Córdoba, Veracruz, con número de certificados de identificación AKCF001, AKCF002, AKCF003, AKCF004 y AKCF005, respectivamente.

2.2 Determinación del contenido de humedad del material vegetal

La determinación del contenido de humedad de las muestras se realizó de acuerdo a Pérez *et al.*, (2017) con ligeras modificaciones; se utilizó 1 g de peso fresco por triplicado de cada uno de los ejemplares *in vitro* y aclimatizadas, se depositaron en cápsulas de porcelana y se sometieron a secado durante 48 h a 75 °C en una estufa (BINDER, modelo FED 115), transcurrido el tiempo, las cápsulas se colocaron en un desecador hasta obtener el peso constante. El contenido de agua de las muestras se calculó por diferencia de peso y se expresó en porcentaje de humedad: % de Humedad = [(peso de la muestra + peso de la cápsula al inicio)/peso de muestra + peso de la cápsula posterior al secado] x 100.

2.3. Preparación de extractos hidrometanólicos

Se pesaron 0.5 g de tejido vegetal fresco y seco, se realizaron 3 réplicas por cada tratamiento y se mezclaron con 5 mL de una solución metanol:agua (1:1) v/v, utilizando una relación 1:10 masa/solvente. Posteriormente, las muestras se homogenizaron en vórtex (Corning® LSE™ U.S.A.), se mantuvieron en un agitador orbital (IKA™ Alemania) a 350 rpm durante 10 min, se centrifugaron a 3500 rpm por 10 min y finalmente, se retiró el sobrenadante para la determinación de los análisis químicos.

2.4. Determinación de fenoles totales

La determinación del contenido fenólico total (CFT) se llevó a cabo de acuerdo a la metodología reportada por Spinoso-Castillo *et al.*, (2017); se tomaron 180 μL de los extractos hidrometanólicos y se adicionaron 100 μL de reactivo Folin-Ciocalteu (E. Merck, Darmstadt, Alemania) al 10%, y se homogenizó en vórtex (Corning® LSE™, U.S.A). Posteriormente, se adicionaron 30 μL de carbonato de calcio (Sigma-Aldrich® St. Louis, MO) al 20%, se homogenizó nuevamente y se incubaron durante 2 h a una temperatura de 26 °C a oscuridad para evitar la fotooxidación. Finalmente, se midió la absorbancia a 765 nm en espectrofotómetro ultravioleta-

visible (Thermo SCIENTIFIC® U.S.A), usando como blanco metanol/agua. Se realizó una curva estándar de ácido gálico (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO) a diferentes concentraciones (0-10000 µg/mL) y los resultados se expresaron como equivalentes en mg de ácido gálico por gramo (mg GAE/g).

2.5. Evaluación de la capacidad antioxidante por el método DPPH

El ensayo DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), modificado por Huang *et al.*, (2002), se utilizó para evaluar la capacidad de eliminación de radicales libres de las soluciones acuosas. Se preparó una solución de DPPH 0,1 mM con metanol grado reactivo. Posteriormente, se tomó una alícuota de 3900 µL de DPPH y 100 µL de extracto, utilizando una curva de calibración de Trolox (Sigma-Aldrich®, St. Louis MO) a diferentes concentraciones (0 a 1500 µM). La reacción se homogenizó en vórtex (Corning® LSE™, U.S.A) y se incubó durante 30 minutos a 26 °C. La absorbancia se midió a 515 nm en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (Thermo SCIENTIFIC®, U.S.A). Los resultados se expresaron en Equivalentes Trolox por gramo (TE/g).

2.6. Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental de los tratamientos fue completamente al azar y cada tratamiento constó de un total de 10 explantes como unidad, cada experimento se realizó con tres réplicas por tratamiento y fueron repetidas al menos dos veces. Los datos se procesaron con el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versión 22 para Windows. Se realizó el análisis estadístico mediante un análisis de varianza (ANDEVA) y una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey con un valor de ($p \leq 0.05$) para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos y un análisis multifactorial para el análisis de interacciones.

3. RESULTADOS

3.1. Cultivo *in vitro* y aclimatación de *Drosera* spp.

Las plántulas de los cinco ejemplares del género *Drosera* propagadas *in vitro* (Fig.1), mostraron la producción de nuevos brotes, aumento en la elongación y tamaño de la roseta, con índices de contaminación bajos.

Las plántulas aclimatizadas en invernadero (Fig. 2), produjeron mucílago, presentaron una elongación y tamaño de roseta desarrollada; las hojas de *D. capensis* Alba no mostraron cambios en la coloración (Fig. 2b), mientras que el resto de las plántulas exhibieron una pigmentación en tonalidades rojas, siendo *D. spatulata* x *nidiformis* el ejemplar que presentó mayor coloración (Fig. 2e).

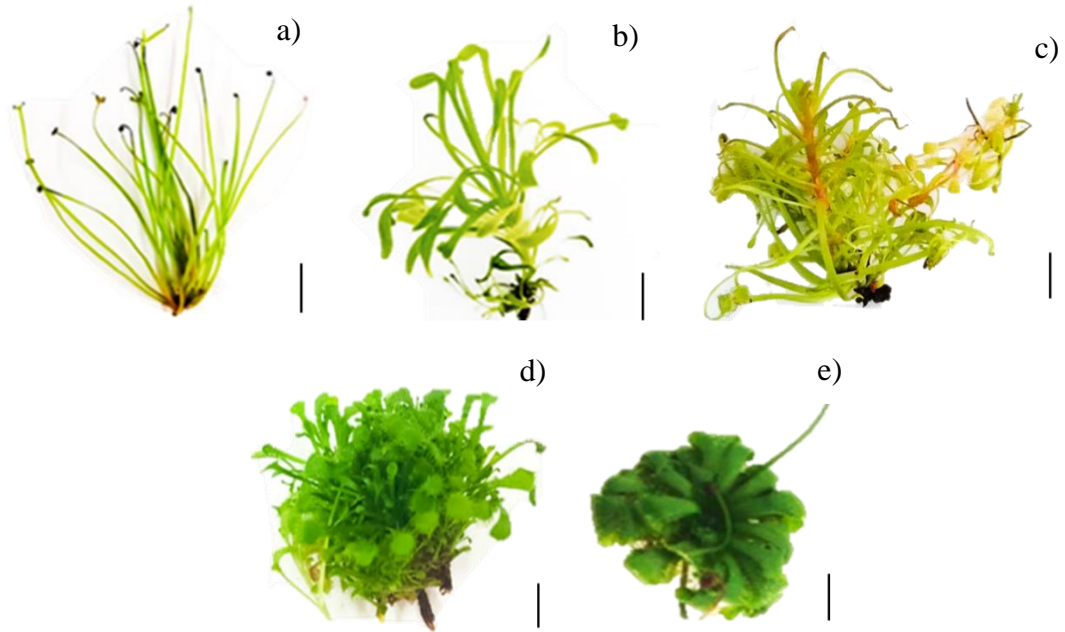


Fig. 1. Plántulas *in vitro* de *Drosera* spp. de tres meses de edad. a) *D. binata*, b) *D. capensis* Alba, c) *D. capensis* All Red, d) *D. spatulata* y e) *D. spatulata* x *nidiformis*), Barra= 1 cm.

Fig. 1. Three month-old *in vitro* plantlets of *Drosera* spp. a) *D. binata*, b) *D. capensis* Alba, c) *D. capensis* All Red, d) *D. spatulata* and e) *D. spatulata* x *nidiformis*), Bar= 1 cm.

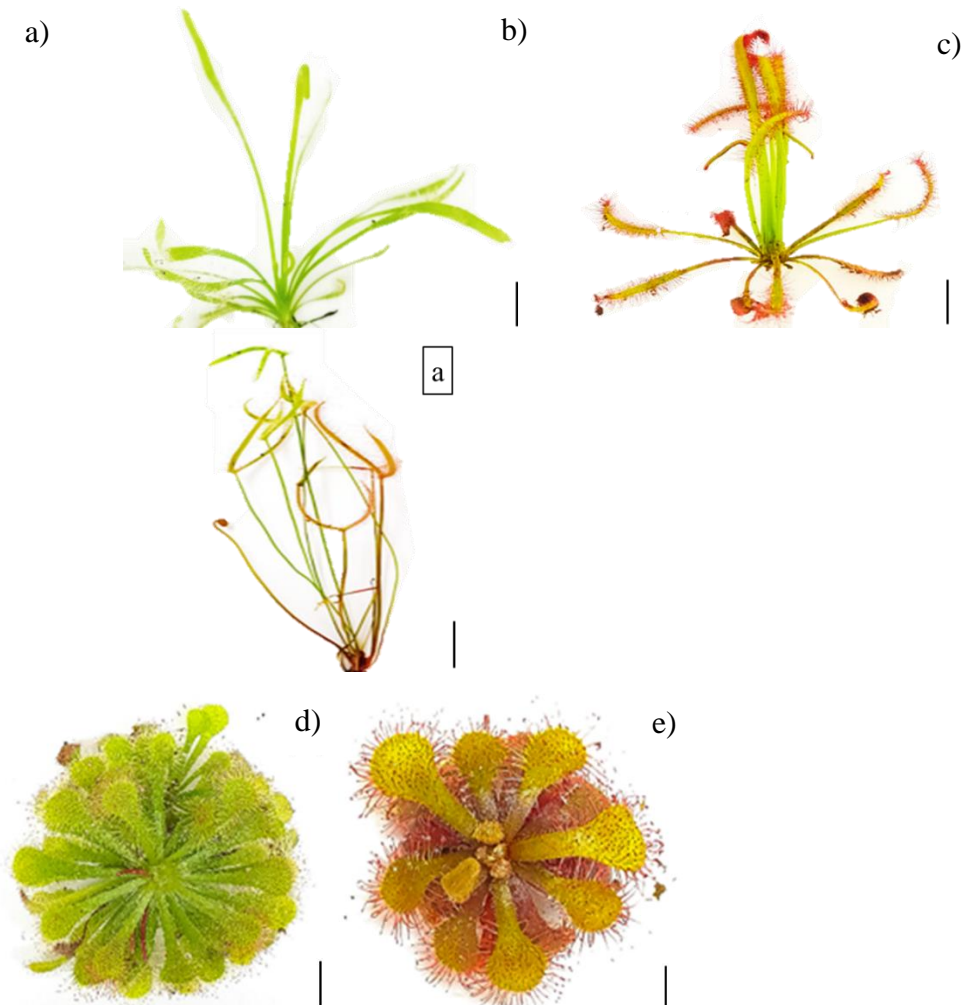


Fig. 2. Plantas aclimatizadas de *Drosera* spp. de tres meses de edad. a) *D. binata*, b) *D. capensis* Alba, c) *D. capensis* All Red, d) *D. spatulata* y e) *D. spatulata* x *nidiformis*), Barra= 1 cm.

Fig. 2. Three month-old acclimatized plantlets of *Drosera* spp. a) *D. binata*, b) *D. capensis* Alba, c) *D. capensis* All Red, d) *D. spatulata* and e) *D. spatulata* x *nidiformis*), Bar= 1 cm.

3.2. Determinación del contenido de humedad del material vegetal

La evaluación del contenido de agua, mostró que *D. spatulata* x *nidiformis* presentó el mayor porcentaje de humedad en condiciones *in vitro* y aclimatizadas, con diferencias estadísticas significativas, respecto al resto de las plántulas, con valores de $95.00 \pm 0.58\%$ y $91.33 \pm 0.66\%$, respectivamente. El menor contenido de humedad en condiciones *in vitro* se observó en *D. capensis* Alba y en las plántulas aclimatizadas se obtuvo en *D. spatulata*, ambas condiciones con valores de 87.33% (Tabla 1).

Tabla 1. Contenido de humedad de plántulas de *Drosera* spp.

Table 1. Water content of *Drosera* spp. plantlets.

	<i>In vitro</i> (%)	Aclimatizadas (%)
<i>D. binate</i>	90.00 ± 0.58 ^{bc}	90.67 ± 0.67 ^{ab}
<i>D. capensis</i> Alba	87.33 ± 1.76 ^c	89.00 ± 0.57 ^{ab}
<i>D. capensis</i> All Red	88.33 ± 1.20 ^c	90.33 ± 0.88 ^{ab}
<i>D. spatulata</i>	94.67 ± 0.33 ^{ab}	87.33 ± 0.88 ^b
<i>D. spatulata</i> x <i>nidiformis</i>	95.00 ± 0.58 ^a	91.33 ± 0.66 ^a

Determinación del contenido de humedad de los ejemplares del género *Drosera* a los 90 días de cultivo. Los valores representan la media ± EE (Error Estándar). Medias con diferente letra dentro de la columna son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

3.3. Evaluación del contenido de fenoles totales

La evaluación del contenido de fenoles totales de los extractos hidrometanólicos de las plántulas *in vitro* de *Drosera* spp., determinadas en peso fresco, no mostró diferencia estadística significativa entre los ejemplares evaluados, presentando valores entre 1.15 y 1.50 mg GAE/g (Tabla 2); sin embargo, en la determinación en peso seco, se observó que *D. capensis* All Red presentó el mayor contenido de fenoles totales con 3.32 ± 0.07 mg GAE/g y *D. spatulata* mostró el menor contenido con valores de 1.22 ± 0.08 mg GAE/g. Por otro lado, la evaluación del contenido de fenoles totales de los extractos hidrometanólicos de plántulas aclimatizadas, determinadas en peso fresco, mostró que *D. spatulata* x *nidiformis* presentó el mayor contenido de fenoles totales con 6.13 ± 0.07 mg GAE/g, mientras que, *D. capensis* Alba mostró el menor contenido con valores de 2.31 ± 0.08 mg GAE/g; en la determinación en peso seco no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los ejemplares evaluados, presentando valores entre 2.78 y 3.12 GAE/g (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de fenoles totales de extractos hidrometanólicos de *Drosera* spp.

Table 2. Total phenolic content of hidromethanolic extracts of *Drosera* spp.

Ejemplar		<i>In vitro</i> (mg GAE/g)		Aclimatizadas (mg GAE/g)
<i>D. binata</i>	FW	1.15 ± 0.07 ^d	FW	2.37 ± 0.08 ^d
	DW	2.01 ± 0.4 ^{bc}	DW	2.78 ± 0.19 ^d
<i>D. capensis</i> Alba	FW	1.26 ± 0.10 ^d	FW	2.31 ± 0.08 ^d
	DW	2.26 ± 0.18 ^{ab}	DW	2.89 ± 0.05 ^d
<i>D. capensis</i> All Red	FW	1.50 ± 0.05 ^{cd}	FW	3.84 ± 0.08 ^{bc}
	DW	3.32 ± 0.07 ^a	DW	3.05 ± 0.37 ^{cd}
<i>D. spatulata</i>	FW	1.47 ± 0.14 ^{cd}	FW	4.93 ± 0.14 ^b
	DW	1.22 ± 0.08 ^d	DW	2.99 ± 0.37 ^{cd}
<i>D. spatulata</i> x <i>nidiformis</i>	FW	1.16 ± 0.08 ^d	FW	6.13 ± 0.07 ^a
	DW	2.25 ± 0.07 ^b	DW	3.12 ± 0.30 ^{cd}
Ejemplar		0.000		0.000
Peso		0.000		0.000
Ejemplar x peso		0.000		0.000

Determinación del contenido de fenoles totales de los extractos hidrometanólicos de cinco ejemplares del género *Drosera* a los 90 días de cultivo, FW (peso fresco) y DW (peso seco). Los valores representan la media ± EE (Error Estándar). Medias con diferente letra dentro de la columna son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

3.4. Evaluación de la capacidad antioxidante

La evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos hidrometanólicos de las plántulas de *Drosera* spp. en condiciones *in vitro*, determinada en peso fresco, mostró que *D. capensis* All Red y *D. spatulata* presentaron la mayor capacidad antioxidante con 692.36 ± 66.91 y 665.14 ± 41.82 TE/g, respectivamente; en la determinación en peso seco, se observó que no presentaron diferencia estadística significativa con valores entre 279.59 y 298.42 TE/g. Por otro lado, la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos hidrometanólicos de las plántulas aclimatizadas, determinadas en peso fresco, mostró que la mayor capacidad antioxidante, se obtuvo en *D. spatulata* x *nidiformis* con 1027.91 ± 4.56 TE/g; mientras que en la determinación en peso seco no se observó diferencia estadística significativa entre ellas, presentando valores entre 282.08 y 300.25 TE/g (Tabla 3).

De acuerdo con los resultados del análisis multifactorial, existe una interacción entre los factores del ejemplar y peso fresco o peso seco, con el contenido de fenoles (Tabla 2) y la capacidad antioxidante (Tabla 3). Este comportamiento indica que la respuesta a la producción de fenoles y la capacidad antioxidante se ve influenciada por el ejemplar y el origen del extracto.

Tabla 3. Capacidad antioxidante de extractos hidrometanólicos de *Drosera* spp.**Table 3.** Antioxidant capacity of hidromethanolic extracts of *Drosera* spp.

Ejemplar		<i>In vitro</i> (TE/g)		Aclimatizadas (TE/g)
<i>D. binata</i>	FW	287.80 ± 24.12 ^b	FW	654.79 ± 26.21 ^c
	DW	279.59 ± 0.83 ^b	DW	282.08 ± 20.73 ^d
<i>D. capensis</i> Alba	FW	477.10 ± 69.50 ^{ab}	FW	922.95 ± 6.12 ^b
	DW	295.78 ± 38.20 ^b	DW	293.24 ± 12.68 ^d
<i>D. capensis</i> All Red	FW	692.36 ± 66.91 ^a	FW	991.83 ± 0.63 ^{ab}
	DW	295.57 ± 28.44 ^b	DW	294.09 ± 22.14 ^d
<i>D. spatulata</i>	FW	665.14 ± 41.82 ^a	FW	335.29 ± 32.90 ^d
	DW	285.10 ± 16.81 ^b	DW	297.48 ± 22.73 ^d
<i>D. spatulata</i> x <i>nidiformis</i>	FW	419.49 ± 70.42 ^b	FW	1027.91 ± 4.56 ^a
	DW	298.42 ± 0.83 ^b	DW	300.25 ± 29.47 ^d
Ejemplar		0.001		0.000
Peso		0.000		0.000
Ejemplar x peso		0.001		0.000

Determinación de la capacidad antioxidante de los extractos hidrometanólicos de cinco ejemplares del género *Drosera* a los 90 días de cultivo, FW (peso fresco) y DW (peso seco). Los valores representan la media ± EE (Error Estándar). Medias con diferente letra dentro de la columna son significativamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

4. DISCUSIÓN

Las plántulas del género *Drosera* obtenidas del cultivo *in vitro* mostraron un excelente desarrollo en el medio de cultivo semisólido MS a ½ de su composición, donde las plantas a los tres meses de edad presentaron mayor tamaño de roseta, elongación y la producción de brotes nuevos. Kim & Jang (2004) reportaron resultados similares, donde el medio MS a la mitad de su fuerza iónica con pH de 5.8 fue el mejor para el desarrollo *in vitro* de especies del género *Drosera*, ya que los explantes mostraron una mayor tasa de proliferación de brotes, longitud, diámetro y peso fresco. Adicionalmente, Marczak *et al.* (2005) reportaron la adaptación de explantes provenientes de especies del género *Drosera*, cultivados en medio MS a ½ de su composición, después de 60 días de la introducción al cultivo *in vitro*, los explantes comenzaron a desarrollar nuevos brotes, resultados similares a los obtenidos en este trabajo a los 90 días de cultivo *in vitro*.

Por otro lado, las plantas aclimatizadas presentaron una mayor elongación, tamaño de roseta, pigmentación rojiza y producción de mucílago en comparación con las plantas obtenidas del cultivo *in vitro*. El estado heterotrófico de las plantas, la alta humedad relativa y la baja intensidad de luz son los principales factores que favorecen la inducción de alteraciones de las plantas cultivadas *in vitro*, en comparación con las condiciones *ex vitro* (Barry-Etienne *et al.*, 2002; Padilha *et al.*, 2018). Resultados similares se han reportado en *D. intermedia* (Grevenstuck *et al.*, 2010), *D. burmanii* Vahl, (Jayaram & Prasad 2008) y en *D. rotundifolia* (Clapa *et al.*, 2009). Adicionalmente, para lograr la supervivencia de plantas del género

Drosera en condiciones *ex vitro* se requiere de una baja temperatura y alta humedad, además, deben transferirse a un hábitat restringido con un suelo pobre en nutrientes y de naturaleza ácida (Jayaram & Prasad, 2007).

Los extractos hidrometanólicos de plántulas *in vitro* de *Drosera* spp. evaluados en peso seco a excepción de *D. spatulata*, presentaron un contenido de fenoles totales más alto que los extractos hidrometanólicos provenientes de plantas evaluadas en peso fresco. Hamrouni-Sellami *et al.* (2013), reportaron resultados similares en extractos metanólicos de plantas de salvia (*Salvia officinalis* L.) evaluadas en peso seco, donde, la presión de vapor y la alta temperatura a las cuales se sometió al material vegetal, ocasionó la interrupción de los polímeros de la pared celular. Adicionalmente, Inchuen *et al.* (2010), reportaron que a consecuencia de esto se podrían liberar polifenoles presentes en la pared celular, lo que provocaría un aumento de estos compuestos en los extractos de plantas sometidas a secado. Sin embargo, un proceso de desecación prolongado y excesivo puede desnaturalizar algunas enzimas y compuestos bioactivos (Cabrera *et al.*, 2012).

Los extractos hidrometanólicos de plántulas aclimatizadas presentaron un mayor contenido de fenoles totales en comparación con las plantas obtenidas del cultivo *in vitro*. De acuerdo con Kováčik *et al.* (2012), el ambiente deficiente en nutrientes en el que crecen las plantas carnívoras explica la alta acumulación de fenoles, debido a que la actividad de la fenilalanina amoniaco-liasa (PAL) aumenta en condiciones deficientes en nitrógeno, siendo la biosíntesis de compuestos fenólicos regulada por esta enzima. Adicionalmente, las plántulas aclimatizadas *D. capensis* All Red, *D. spatulata* y *D. spatulata* x *nidifromis*, determinadas en peso fresco presentaron mayor contenido de fenoles totales en comparación con las plantas determinadas en peso seco. Lo anterior, podría deberse a que los compuestos bioactivos son sensibles en presencia de calor, reduciendo su eficiencia por descomposición térmica (Cabrera *et al.*, 2012).

La capacidad antioxidante presentada por los ejemplares *Drosera* spp. fue significativa tomando como referencia la curva estándar del ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox). Asirvatham *et al.* (2013), reportaron resultados similares a los obtenidos, en donde los extractos etanólicos de *D. indica* L. presentaron capacidades antioxidantes significativas contra diferentes pruebas *in vitro*. Adicionalmente, Grevenstuk *et al.* (2009), reportaron actividad antioxidante en los extractos metanólicos de *D. intermedia*; estos resultados son atribuidos principalmente a los compuestos fenólicos. Se ha reportado que los extractos de *Drosera* spp. son ricos en polifenoles, incluidos los glucósidos flavonoides y los derivados del ácido elágico.

De la misma manera a lo observado con el contenido de fenoles totales, la mayor capacidad de captación de radicales libres DPPH se registró en los extractos hidrometanólicos provenientes de plantas aclimatizadas evaluadas en peso fresco. Adicionalmente, Liu *et al.* (2004), reportaron que para extractos de ajenojo (*Artemisia judaica* L.) provenientes de plántulas en condiciones *ex vitro*, presentó una mayor capacidad antioxidante en comparación con los extractos provenientes de plantas cultivadas en condiciones *in vitro*; esto es debido a que las condiciones

presentes en invernadero como la disponibilidad de agua, nutrientes y luz han sido reportados como factores importantes para la producción de compuestos fenólicos en las plantas. Por otro lado, Carvalho & Amâncio (2002), reportaron un aumento en los niveles de antioxidantes en plantas aclimatizadas de vid (*V. vinifera* L. var. Touriga Nacional) y en el híbrido de castaño M3 (*C. sativa* x *C. crenata*), debido a las condiciones de estrés a las que se enfrentaron la plantas, lo que estimuló el aumento de antioxidantes para proteger a los fotosistemas del ataque de EROS.

Los extractos hidrometanólicos de *Drosera* spp. en condiciones *in vitro* y aclimatizadas, evaluadas en peso fresco, presentaron una capacidad antioxidante mayor que los extractos provenientes de plantas sometidas a secado. Capecka *et al.* (2005), reportaron resultados similares, en extractos de orégano (*Origanum vulgare*) y menta (*Mentha*) en peso fresco obteniendo una mayor capacidad antioxidante que los extractos de plantas secas; esto se debe a que, el uso de temperaturas relativamente altas durante el secado del tejido vegetal, ocasiona que se presenten pérdidas significativas de compuestos con propiedades antioxidantes, teniendo una influencia sobre la capacidad antioxidante (Hossain *et al.*, 2010).

La alta capacidad antioxidante presentada en el extracto de *D. spatulata* x *nidiformis* fue asociada a su adaptación a las condiciones *ex vitro* estimulando la producción de metabolitos secundarios debido al estrés abiótico al que fueron sometidas. Mendez *et al.* (1999), reportaron en *Pinguicola* (*P. vulgaris*) que los compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas son inducidos por la radiación UVB y la limitación de nutrientes en plantas *ex vitro*, aportando grandes beneficios a la planta.

Por lo anterior, *Drosera* spp. pueden ser consideradas como fuentes naturales prometedoras de antioxidantes con potencial aplicación en campos nutricionales o farmacéuticos para la prevención de enfermedades asociadas al estrés oxidativo ocasionado por los radicales libres (Asirvatham *et al.* 2013).

Adicionalmente, los resultados del presente trabajo mostraron que, el contenido final de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante, se ven afectados por el uso de temperaturas de secado relativamente altas (75°C), por lo que, en estudios posteriores, se sugiere realizar el secado a temperaturas menores para reducir este efecto perjudicial o utilizar tejido vegetal fresco.

AGRADECIMIENTOS

Dr. Gerardo Benjamín Torres Cantú por la identificación botánica de los ejemplares de estudio en tiempos de pandemia y al Herbario CORU Dr. Jerzy Rzedowski Rotter de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Veracruzana, Córdoba, Veracruz.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Asirvatam R. & Arockiasamy-Josphin M. C. 2018. Free radical scavenging potential of *Drosera indica* L in presence of Dalton Ascites lymphoma (DAL) tumor bearing mice. Indonesian Journal of Pharmacy. 29 (3): 127-135. <http://dx.doi.org/10.14499/indonesianjpharm29iss3pp127>.
- Asirvatham, R., Christina, A. J., & Murali, A. 2013. *In vitro* antioxidant and anticancer activity studies on *Drosera indica* L. (*Droseraceae*). Advanced pharmaceutical bulletin. 3(1): 115-120. <http://dx.doi.org/10.5681/apb.2013.019>
- Barry-Etienne, D., Bertrand, B., Vasquez, N., & Etienne, H. 2002. Comparison of somatic embryogenesis derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex vitro*: Morphological, mineral and water characteristics. Annals of Botany. 90: 77-85. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf149>.
- Bhattacharjee S. 2019. ROS and Oxidative Stress: Origin and Implication. In: Reactive Oxygen Species in Plant Biology, (Bhattacharjee, S., ed) Springer, New Delhi. DOI: 10.1007/978-81-322-3941-3_1.
- Boonsongcheep, P., Sae-foo W., Banpakoat K., Channarong S., Chitsaithan S., Uafua P. & Putalun W. 2019. Artificial color light sources and precursor feeding enhance plumbagin production of the carnivorous plants *Drosera burmannii* and *Drosera indica*. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 111628. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111628>.
- Cabrera, H., Morón, C. F., Victoria, M. del C., García, A., & Acosta, C. L. 2012. Composición Fitoquímica de partes aéreas frescas de *Phania matricarioides*. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 17 (3): 268–278.
- Capecka E., Mareczek A. & Leja M. 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. Food chemistry. 93 (2): 223-226. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.020>.
- Cardoso K. C., Oliveira M. E. B. S. & Cardoso F. C. I. 2019. Advances and challenges on the *in vitro* production of secondary metabolites from medicinal plants. Horticultura Brasileira. 37: 124-132. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-053620190201>.
- Carvalho L. C. & Amâncio S. 2002. Antioxidant defence system in plantlets transferred from *in vitro* to *ex vitro*: effects of increasing light intensity and CO₂ concentration. Plant Science. 162 (1): 33-40. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00524-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00524-6).
- Chaudhuri A. & Ray S. 2018. *In vitro* free radical scavenging activities of aerial parts aqueous extract and extract fractions of *Ampelocissus latifolia* (Roxb.) Planch in relation to total phenolics and flavonoid contents. Journal of King Saud University-Science. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.12.006>.

- Chaves N., Santiago A. & Alías J. C. 2020. Quantification of the Antioxidant Activity of Plant Extracts: Analysis of Sensitivity and Hierarchization Based on the Method Used. *Antioxidants*. 9(1): 76. <https://doi.org/10.3390/antiox9010076>.
- Clapa D., Alexandru F. I. R. A. & Pacurar I. 2009. *In vitro* multiplication, conservation and *ex vitro* acclimation of *Drosera rotundifolia*. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture*. 66 (1): 34-39. <http://dx.doi.org/10.15835/buasvmcn-hort:3777>.
- David M., Serban A., Radulescu C., Danet A. F. & Florescu M. 2019. Bioelectrochemical evaluation of plant extracts and gold nanozyme-based sensors for total antioxidant capacity determination. *Bioelectrochemistry*. 129: 124-134. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.05.011>.
- Ellison A. M. & Adamec L. (Eds.). 2018. *Carnivorous Plants: physiology, ecology, and evolution*. Oxford University Press. pp 36.
- Grevenstuk T., Coelho N., Gonçalves S. & Romano A. 2010. *In vitro* propagation of *Drosera intermedia* in a single step. *Biologia plantarum*. 54 (2): 391-394. <https://doi.org/10.1007/s10535-010-0071-6>.
- Grevenstuk T., Gonçalves S., Almeida S., Coelho N., Quintas C., Gaspar M. N. & Romano A. 2009. Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Properties of *in vitro* Cultured *Drosera intermedia* extracts. *Natural product communications*. 4 (8): 1934578X0900400809. <https://doi.org/10.1177%2F1934578X0900400809>.
- Hamrouni-Sellami I., Rahali F. Z., Rebey I. B., Bourgou S., Limam F. & Marzouk B. 2013. Total phenolics, flavonoids, and antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* L.) plants as affected by different drying methods. *Food and Bioprocess Technology*. 6 (3): 806-817. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0877-7>.
- Hossain, M. B., Barry, R. C., Martin, D. A. B. & Brunton, N. P. 2010. Effect of drying method on the antioxidant capacity of six *Lamiaceae* herbs. *Food Chemistry*. 12: 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.04.003>
- Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A. & Prior R. L. 2002. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of agricultural and food chemistry*. 50 (16): 4437-4444. <https://doi.org/10.1021/jf0201529>.
- Huang H., Ullah F., Zhou D. X., Yi M. & Zhao Y. 2019. Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Frontiers in Plant Science*, 10: 800. <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffpls.2019.00800>.
- Inchuen S., Narkrugsa W. & Pornchaloempong P. 2010. Effect of drying methods on chemical composition, color and antioxidant properties of Thai red curry powder. *Kasetsart Journal of Natural Science*. 44: 142–151.
- Jayaram K. & Prasad M. N. V. 2007. Rapid *in vitro* multiplication of *Drosera indica* L.: a vulnerable, medicinally important insectivorous plant. *Plant Biotechnology Reports*. 1 (2): 79-84. <https://doi.org/10.1007/s11816-007-0014-7>.

Jayaram, K., & Prasad, M. N. V. 2008. Rapid *in vitro* multiplication of *Drosera burmanii* Vahl.: A vulnerable and medicinally important insectivorous plant. Indian Journal of Biotechnology. 7: 260-265.

Kim K. S. & Jang G. W. 2004. Micropropagation of *Drosera peltata*, a tuberous sundew, by shoot tip culture. Plant cell, tissue and organ culture. 77(2): 211-214. <https://doi.org/10.1023/B:TICU.0000016812.66762.45>.

Kim Y., Mun B. G., Khan A. L., Waqas M., Kim H. H., Shahzad R. & Lee I. J. 2018. Regulation of reactive oxygen and nitrogen species by salicylic acid in rice plants under salinity stress conditions. PloS one, 13(3): e0192650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192650>.

Kováčik J., Klejdus B. & Repčáková K. 2012. Phenolic metabolites in carnivorous plants: inter-specific comparison and physiological studies. Plant Physiology and Biochemistry. 52: 21-27. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.11.007>.

Kruk J., Aboul-Enein H. Y., Kładna A. & Bowser J. E. 2019. Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions: the effect of physical activity on cellular redox homeostasis. Free radical research. 53 (5): 497-521. <https://doi.org/10.1080/10715762.2019.1612059>.

Kubalt K. 2016. The role of phenolic compounds in plant resistance. Food Science and Biotechnology. 80 (2): 97-108.

Lin D., Xiao M., Zhao J., Li Z., Xing B., Li X. & Chen H. 2016. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. Molecules. 21(10): 1374. <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>.

Liu C. Z., Murch S. J., El-Demerdash M. & Saxena P. K. 2004. *Artemisia judaica* L.: micropropagation and antioxidant activity. Journal of Biotechnology. 110(1): 63-71. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.01.011>.

Makowski W., Tokarz B., Banasiuk R., Królicka A., Dziurka M., Wojciechowska R. & Tokarz K. M. 2019. Is a blue-red light a good elicitor of phenolic compounds in the family *Droseraceae*? A comparative study. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 201: 111679. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2019.111679>.

Marczak Ł., Kawiak A., Łojkowska E. & Stobiecki M. 2005. Secondary metabolites *in vitro* cultured plants of the genus *Drosera*. Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques. 16(3): 143-149. <https://doi.org/10.1002/pca.833>.

Mendez M., Jones D. G. & Manetas Y. 1999. Enhanced UV-B radiation under field conditions increases anthocyanin and reduces the risk of photoinhibition but does not affect growth in the carnivorous plant *Pinguicula vulgaris*. The New Phytologist. 144 (2): 275-282. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00511.x>.

Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Padilha, J. H. D., Ribeiro, A. Z., Amano, É., Steinmacher, D., & Quoirin, M. 2018. Leaf histology of greenhouse plants, *in vitro* cultured and somatic embryo-derived plants of *Bactris gasipaes* Kunth. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 40 (1): e37340. <https://doi.org/10.4025/actasciobiolsci.v40i1.37340>.

Pavlovič A. & Mithöfer A. 2019. Jasmonate signalling in carnivorous plants: copycat of plant defence mechanisms. *Journal of Experimental Botany*. 70 (13): 3379-3389. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz188>.

Pavlovič A., Krausko M. & Adamec L. 2016. A carnivorous sundew plant prefers protein over chitin as a source of nitrogen from its traps. *Plant Physiology and Biochemistry*. 104: 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.03.008>.

Pérez M. C., Bone E. C., Parra J. C. P., Rosero C. C. & Blanco O. C. 2017. Determinación de componentes nutricionales presentes en las hojas secas de *Annona muricata* L. (Guanábana). *Cumbres*. 3(1): 09-16.

Puangbanlang C., Sirivibulkovit K., Nacapricha D. & Sameenoi Y. 2019. A paper-based device for simultaneous determination of antioxidant activity and total phenolic content in food samples. *Talanta*. 198, 542-549. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.048>.

Spinoso-Castillo J. L., Chavez-Santoscoy R. A., Bogdanchikova N., Pérez-Sato J. A., Morales-Ramos V. & Bello-Bello J. J. 2017. Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 129 (2): 195-207. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1169-8>.

Tungmunnithum D., Thongboonyou A., Pholboon A. & Yangsabai A. 2018. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines*. 5 (3): 93. <https://doi.org/10.3390/medicines5030093>.

Tupec M., Hýsková V., Bělonožníková K., Hraníček J., Červený V. & Ryšlavá H. 2017. Characterization of some potential medicinal plants from Central Europe by their antioxidant capacity and the presence of metal elements. *Food Bioscience*. 20: 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.08.001>.