

EVALUACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA (FILANTÓSIDOS Y LIGNANOS) DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DEL ÁRBOL DE CHILILLO (*PHYLLANTUS ACUMINATUS* VAHL) PROCEDENTE DE DIFERENTES SITIOS DE COSTA RICA

EVALUATION OF THE CHEMICAL COMPOSITION (PHYLLANTHOSIDES AND LIGNANS) OF THE CRUDE EXTRACT OF THE CHILILLO TREE (*PHYLLANTHUS ACUMINATUS* VAHL) FROM DIFFERENT SITES OF COSTA RICA

Daniel Esquivel Alvarado

Gerardo Rodríguez Rodríguez

Laboratorio de Fitoquímica, Escuela de Química
Universidad Nacional

Sergio Madrigal Carballo

Laboratorio de Polímeros, Escuela de Química
Universidad Nacional

Recibido el 30 de junio de 2012. Corregido el 28 de agosto de 2012. Aceptado el 28 de octubre de 2012.

RESUMEN: El propósito del presente trabajo fue en primera instancia el realizar un estudio del contenido de filantósidos y lignanos presentes en muestras de diferentes partes del árbol de chilillo (*Phyllanthus acuminatus Vahl*), colectadas en diferentes sitios del país. Para la primera parte del estudio se utilizó cromatografía de alta eficiencia (HPLC). Los resultados de estas pruebas mostraron no solo variación en el número de picos del cromatograma, sino también variaciones en la intensidad, en función del sitio de colecta de las muestras. Por otra parte, se desarrolló un método espectrofotométrico simple, rápido y barato para cuantificar el contenido de filantósidos y lignanos que fuera comparable con el método por HPLC. Los resultados obtenidos con el nuevo método se correlacionaron con los datos obtenidos empleando la técnica de HPLC. El coeficiente de determinación obtenido en esta correlación fue excelente y estadísticamente significativo ($R^2 = 0,99$; $p < 0,05$). Finalmente se evaluó la actividad antioxidante con el ensayo del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y se determinó el contenido de polifenoles totales, mediante el método Folin-Ciocalteu. Tradicionalmente existe una excelente correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante; sin embargo, en este estudio no fue posible obtenerla, ya que la correlación entre ambos métodos resultó ser relativamente baja ($R^2 = 0,4334$). Estos resultados revelan claramente que el árbol de chilillo no es una fuente potencial de polifenoles y no posee una buena capacidad antioxidante, especialmente si se compara con otras muestras vegetales ricas en compuestos

fenólicos como el caso de la mora (*Rubus sp*) y el rambután (*Nephelium lappaceum*).

Palabras claves: Phyllanthus, filantósidos, chilillo, polifenoles, antioxidantes.

ABSTRACT: The purpose of this research work was in the first instance, to conduct a study of the content of phyllantosides and lignans in samples from different parts of the tree known as “Chilillo” (*Phyllanthus acuminatus Vahl*), collected at different sites of the country. The first objective of the study was focused on the characterization of the samples using high efficiency liquid chromatography (HPLC). The results obtained by this technique showed variation not only in the number of peaks in each chromatogram, but also in the peak intensity, also significant variations in the composition of the samples were found among the different collecting sites. The second objective of this work, was to develop a simple, fast and inexpensive colorimetric method to quantify the content of phyllantosides and lignans in different samples of Chilillo that was comparable to the HPLC data. The results obtained with the new method were correlated with the results obtained by HPLC, the coefficient of determination obtained in this correlation was excellent and statistically significant ($R^2 = 0,99$; $p < 0,05$). Finally, the last objective of the study was to evaluate the antioxidant activity in all the samples of Chilillo and its correlation with its total polyphenolic content, using the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) for antioxidant activity determinations and Folin-Ciocalteu for total polyphenolic content. Traditionally there is a good correlation between total polyphenol content and antioxidant activity, but in this study the correlation between the two methods was relatively low ($R^2 = 0.4334$). These results clearly show that Chilillo tree can not be consider as an important source of polyphenols or natural antioxidants, especially when compared with other plant samples rich in phenolic compounds such as blackberry (*Rubus sp*) or rambutan (*Nephelium lappaceum*).

Keywords: Phyllanthus, phyllanthosides, chillillo tree, polyphenols, antioxidants.

Los metabolitos secundarios son un grupo diverso de moléculas que están involucradas en la adaptación de las plantas al ambiente, pero no forman parte de su crecimiento y reproducción (Waksmunzka, Sherma y Kowalska, 2008). Se estima que más del 60% de todos los medicamentos existentes hasta la fecha, han tenido su origen de fuentes naturales (Gordon, Cragg, Newman y Snader, 1999).

Según Calderón (1999), el árbol de chilillo del género *Phyllanthus* (Reino Plantae, Familia Euphorbiaceae) se distribuye en toda Centroamérica, y tiene la habilidad de biosintetizar una serie de glicósidos antineoplásicos (Pettit y Schaufelberger, 1988). De la raíz del árbol, el Instituto Nacional contra el Cáncer de los Estados Unidos (NCI) halló sustancias que inhiben el crecimiento de la leucemia linfocítica P-388 y del melanoma B16 (Pettit, Schaufelberger, Nieman, Dufresne y Saenz-Renaud, 1990).

Estudios previos realizados por el personal del Laboratorio de Fitoquímica de la Escuela de Química y en colaboración con un grupo de investigadores de la Escuela de Ciencias Ambientales, ambos de la Universidad Nacional y estos últimos liderados por el botánico Luis Poveda Rodríguez, han permitido identificar, de forma cualitativa, la presencia de filantósidos, lignanos y otros compuestos polifenólicos en extractos crudos de la raíz del árbol de chilillo.

De la misma forma, en los últimos años se viene desarrollando un importante interés por los problemas relacionados con el estrés oxidativo, radicales libres, especies reactivas del oxígeno y los antioxidantes (Venereo, 2002). En la mayoría de los casos, la actividad antioxidante de una muestra vegetal está directamente relacionada con su contenido total de polifenoles, lignanos y otros taninos relacionados.

El presente trabajo tiene como objetivo realizar una bioprospección del árbol de chilillo (*Phyllanthus acuminatus Vahl*) con el propósito de identificar, en forma cuantitativa, la presencia de sustancias activas de interés biológico en esta especie (antineoplásicas y antioxidantes). Se realizó un muestreo del árbol en diferentes sitios geográficos donde crece esta especie y se procedió a realizar extracciones con diferentes disolventes para determinar la mezcla óptima que permite la extracción del mayor contenido de metabolitos secundarios. Una vez optimizado el proceso de extracción, se realizó un estudio cuantitativo orientado a desarrollar un método analítico colorimétrico rápido y económico para la cuantificación química de metabolitos no fenólicos como los filantósidos y los lignanos, responsables de la actividad antineoplásica, presentes igualmente en los extractos del árbol de chilillo. Este nuevo método en desarrollo sería comparado con un ensayo paralelo, pero empleando la técnica de cromatografía líquida en fase reversa de alta eficiencia (RP-HPLC) para evaluar su eficiencia. Finalmente, se procedió a determinar el contenido total de polifenoles y la actividad antioxidante de los extractos, con el empleo del método de Folin Ciocalteu y de radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la biomasa vegetal

Entre los meses de julio a noviembre del 2010, se realizaron los muestreos del árbol de chilillo en seis sitios diferentes del país. Los sitios de muestreo se eligieron tomando en cuenta información suministrada por el grupo del botánico Luis Poveda Rodríguez, del Herbario Juvenal Valerio Rodríguez (tabla 1).

Tabla 1
Sitios en el país en donde se realizó el muestreo del árbol de chilillo (*Phyllanthus acuminatus* Vahl)

Lugar	Latitud	Longitud
Tucurrique de Cartago	9°51'10.82"N	83°43'01.25"O
Grecia de Alajuela	10°02'56.59" N	84°16'39.68" O
San Isidro de Dota. San José	9°29'06.54" N	84°00'28.93" O
Las Nubes, Coronado, San José.	9°59'33.28" N	83°57'38.10" O
Guayabo de Turrialba, Cartago	9°57'48.74" N	83°40'29.76" O
Palmichal de Acosta, San José	9°50'58.96" N	84°11'22.69" O

En cada sitio de muestreo se colectaron muestras compuestas (de al menos 3 árboles diferentes), de raíz, tallo y hojas, las cuales se transportaron en hieleras hasta el Laboratorio de Fitoquímica (LaFit) para ser analizadas. Los extractos crudos ricos en filantósidos y lignanos de las muestras de raíz y tallo se extrajeron empleando una mezcla (1:1 v/v) de diclorometano:metanol. Para determinar el número óptimo de extracciones, se realizaron varias extracciones, las cuales fueron leídas a 277 nm en un espectrofotómetro UV-Vis, según Pettit *et al.* (1982). Con la ayuda del programa estadístico ASSISTAT[®], se estableció la cantidad de extracciones necesarias para cada estructura del árbol.

Obtención de los extractos crudos ricos en filantósidos y lignanos del árbol de chilillo

Las extracciones se realizaron de la siguiente manera: de la muestra seca y molida (2 mm el tamaño de partícula), y en un tubo de ensayo, se pesaron 50 mg de la misma, luego se adicionaron 2 mL de la mezcla de extracción (1:1 v/v) diclorometano:metanol, para lo cual se dejó 5 minutos en un baño ultrasónico; terminado este tiempo, se centrifugó a 400g por 5 min y se decantó el líquido sobrenadante. Este proceso de extracción se repitió varias veces en muestras diferentes y los extractos obtenidos se combinaron y fueron evaporados en un rotavapor a presión reducida y una temperatura no superior a los 35 °C, luego el residuo casi seco fue reconstituido en una mezcla (1:1 v/v) metanol:agua. Se realizaron repetidas extracciones a las muestras hasta que estadísticamente los extractos no fueran diferentes.

Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (RP-HPLC)

La determinación cualitativa y cuantitativamente por RP-HPLC se realizó con una bomba cuaternaria Shimadzu LC-20AT y un detector de arreglo de diodos Shimadzu SPD-M20A. Los disolventes empleados para la elución en gradiente fueron una mezcla de agua/ácido trifluoroacético (TFA) (99,9:0,1 % v/v), disolvente A y

metanol disolvente B. El gradiente de elución estuvo formado por una serie de pasos: de 40% a 30% A durante 4 min, de 30% a 10% A durante 6 min, se mantuvo a 10% A por 2 min, de 10% a 0% A durante 2 min y de 0% a 40% A en los últimos 2 minutos, para un tiempo total de corrida de 16 min. La longitud de onda (λ) empleada para monitorear el cromatograma fue de 277 nm, y se utilizó el software Shimadzu LC Solution para procesar y analizar los cromatogramas en dos y tres dimensiones.

Desarrollo del método de análisis espectrofotométrico del contenido de filantósidos y lignanos totales presentes en los extractos crudos del árbol de chilillo

En el método espectrofotométrico para la determinación cuantitativa del contenido total de filantósidos y lignanos, se mezclaron 2 mL de la muestra reconstituida y rica en estos metabolitos con 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (95-97%, $\rho = 1,84$). Esta mezcla se agitó en un vortex por un minuto y se dejó reposando por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se procedió a realizar el barrido espectrofotométrico para establecer la longitud de onda (λ) de máxima absorbancia. Finalmente, todas las muestras analizadas que corresponden a las diferentes partes del árbol de chilillo, mostraron la máxima absorbancia a 440 nm. Los resultados de estos análisis fueron comparados con las áreas de todos los picos presentes en los cromatogramas obtenidos por RP-HPLC. Esta comparación nos permite establecer la validez del método espectrofotométrico.

Obtención de los extractos crudos ricos en polifenoles del árbol de chilillo

Las extracciones se realizaron de la siguiente manera: de la muestra seca y molida (2 mm el tamaño de partícula) y en un tubo de ensayo, se pesaron 100 mg de esta; luego se adicionaron 2 mL de la mezcla de extracción (4:4:2 v/v) acetona:metanol:agua, y se dejaron 5 min en un baño ultrasónico. Terminado este tiempo, se centrifugó a 400g por 5 min y se decantó el líquido sobrenadante. Al igual que con la extracción de los filantósidos, aquí se determinó el número de extracciones óptimas. Los diversos extractos obtenidos se combinaron y fueron evaporados casi a sequedad en un rotavapor a presión reducida y a una temperatura no superior a los 35 °C, luego el residuo casi seco fue reconstituido en una mezcla (1:1 v/v) metanol:agua, antes del análisis. Se realizaron repetidas extracciones hasta que estadísticamente la concentración de los extractos no fuera diferente.

Análisis del contenido total de polifenoles y la actividad antioxidante

El contenido total de polifenoles fue determinado empleando el método de Folin-Ciocalteu, mientras que la actividad antioxidante fue obtenida según el método de DPPH, descrito por González (2008). Los resultados obtenidos en el contenido de polifenoles se expresaron en mg de ácido gálico/g de muestra y los resultados de la actividad antioxidante se expresó en porcentaje de DPPH reducido/30mg de muestra. Para estos dos análisis se utilizó un espectrofotómetro T80⁺ UV/Vis (PG Instruments Ltd; New York, USA).

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos debido a los tratamientos aplicados a las muestras se realizó empleando un ensayo ANOVA, y la diferencia entre los tratamientos se determinó por medio de la prueba de medias de Tukey, ambos utilizando el programa estadístico ASSISTAT®.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la investigación fitoquímica cuantitativa es fundamental no solo una buena escogencia del disolvente o de la mezcla de disolventes para extraer eficientemente los metabolitos de interés, sino también el número de extracciones a realizar a las muestras. Para lograr este objetivo se probaron diferentes disolventes y mezclas de estos, al igual se probaron diferentes números de extracciones para obtener la máxima eficiencia de extracción de filantósidos, lignanos y compuestos fenólicos.

Los resultados obtenidos sobre el mejor disolvente indican que una mezcla de disolventes es lo mejor y se encontró que la combinación: diclorometano:metanol (1:1 v/v) es la más eficiente. Tomando en cuenta este resultado de solubilidad y la posibilidad de realizar varias extracciones, se realizó un análisis de varianza completamente al azar, con el propósito de determinar el número óptimo. Los resultados obtenidos mostraron que para todas las partes del árbol de chilillo a las cuales se le realizaron 5 extracciones, y de acuerdo con los tratamientos de medias obtenidas, se determinó, para la raíz, tallo y hojas, el número óptimo de extracciones con la mezcla diclorometano:metanol (1:1 v/v), es de 3, 4 y 2, respectivamente.

Tabla 2

Resultados del análisis espectroscópico realizado a 277* nm para la determinación del número óptimo de extracciones efectuadas a la raíz de chilillo, empleando la mezcla diclorometano:metanol (1:1 v/v) como disolvente

Número de extracciones	Absorbancia** ($\pm 0,003$)
1	0,116 ^{c***}
2	0,149 ^b
3	0,163 ^a
4	0,166 ^a
5	0,169 ^a

*Máxima longitud de onda de absorción de los filantósidos y lignanos.

**Promedio de tres repeticiones.

***Letras iguales en la columna corresponden a una misma concentración de filantósidos, según la comparación de medias con la prueba de Tuckey ($P \leq 0.05$).

Como se puede observar en la tabla 2, el máximo de absorción se obtiene después de la tercera extracción: posteriores extracciones a la muestra de raíz no proporcionan efectos significativos en el aumento de la concentración de los filantósidos y lignanos extraídos. Estos resultados igualmente se representan gráficamente en la figura 1, donde se observa que, después de la tercera extracción, la relación del número de extracciones versus la absorbancia o concentración de filantósidos y lignanos se mantiene prácticamente constante.

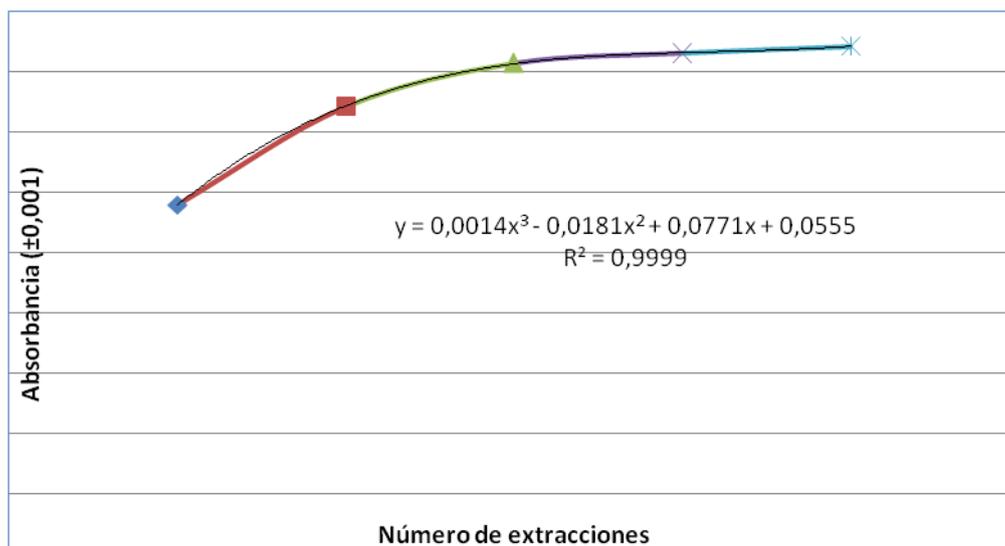


Figura 1. Representación gráfica de la determinación espectrofotométrica ($\lambda_{\text{max}} = 277$ nm) del número óptimo de extracciones de los filantósidos y lignanos presentes en las raíces del árbol de chilillo, al emplear diclorometano:metanol (1:1 v/v) como disolvente

En la figura 2 se muestran los cromatogramas de RP-HPLC correspondientes a la variación en el número y concentración de los compuestos presentes en los extractos de las muestras del árbol de chilillo recolectadas en un mismo sitio de muestreo (Grecia, Alajuela), en función de la parte del árbol analizada. Al comparar los cromatogramas correspondientes a los extractos crudos de la raíz y tallo, respectivamente, se observa que la cantidad y concentración de metabolitos secundarios presentes en el tallo es significativamente menor para la raíz, lo cual indica, por tanto, que los tallos del árbol de chilillo no son una buena fuente de filantósidos o lignanos.

Estos resultados nos permiten concentrar toda la atención del estudio en las muestras de raíces solamente. Esta diferencia tan marcada entre la composición química de la raíz y el tallo puede deberse a que, en la mayoría de las plantas vasculares, las raíces constituyen la parte subterránea del esporófito, y están implicadas principalmente en la fijación y la absorción de nutrientes; mientras que la función del tallo es brindar soporte para que las hojas realicen la fotosíntesis. De esta forma, al evaluar los extractos obtenidos a partir de las raíces del árbol de chilillo, se notan diferencias cualitativas y cuantitativas entre las muestras de raíces provenientes de los diferentes sitios de colecta,

como se puede observar en las figuras 2 a 5. Se aprecia que el sitio de Guayabo de Turrialba presenta una mayor cantidad de metabolitos secundarios (más picos en el cromatograma) con respecto al sitio de las Nubes de Coronado, San José. Igualmente se destacan diferencias entre la concentración (intensidad de los picos) de metabolitos secundarios en estos sitios. Tal es el caso del sitio de colecta de las Nubes de Coronado, el cual posee más concentración que sus dos análogos de Guayabo de Turrialba y de Grecia de Alajuela (figuras 2 a 4).

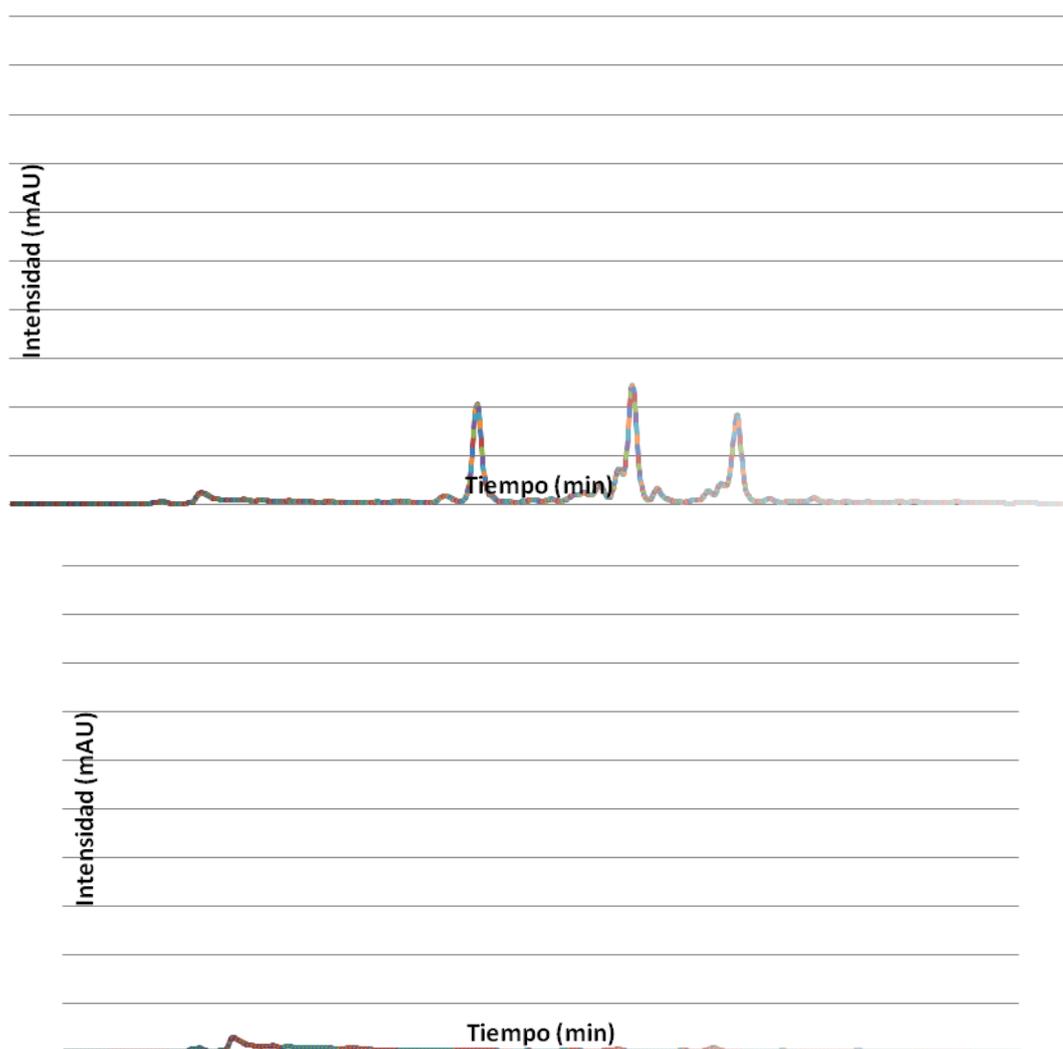


Figura 2. Cromatogramas de RP-HPLC de los extractos crudos de raíz (arriba) y tallo (abajo) del árbol de chilillo, muestras colectadas en Grecia de Alajuela, ($\lambda = 277 \text{ nm}$)

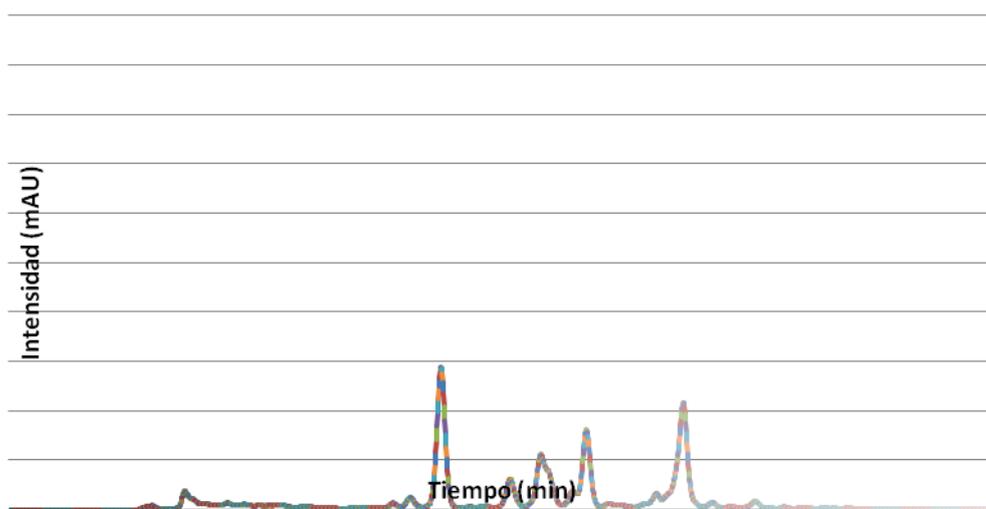


Figura 3. Cromatograma de RP-HPLC del extracto crudo de la muestra de raíz del árbol de chilillo, muestra colectada en Guayabo de Turrialba, Cartago ($\lambda = 277$ nm)

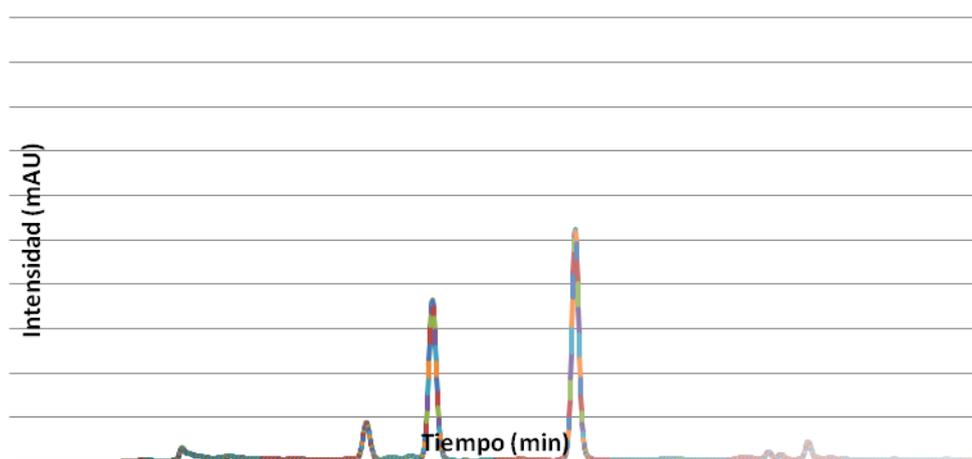


Figura 4. Cromatograma de RP-HPLC del extracto crudo de la muestra de raíz del árbol de chilillo, colectada en las Nubes de Coronado, San José ($\lambda = 277$ nm)

En este estudio también se encontró que durante los muestreos de las raíces del árbol de chilillo de diferentes localidades del país, no todas las muestras presentaban el mismo grosor, por lo tanto, se procedió a realizar una pequeña comparación de acuerdo con el diámetro de la raíz. Al respecto se encontraron diferencias cualitativas y cuantitativas en cuanto a la presencia de los metabolitos secundarios, como se puede observar en la figura 5.

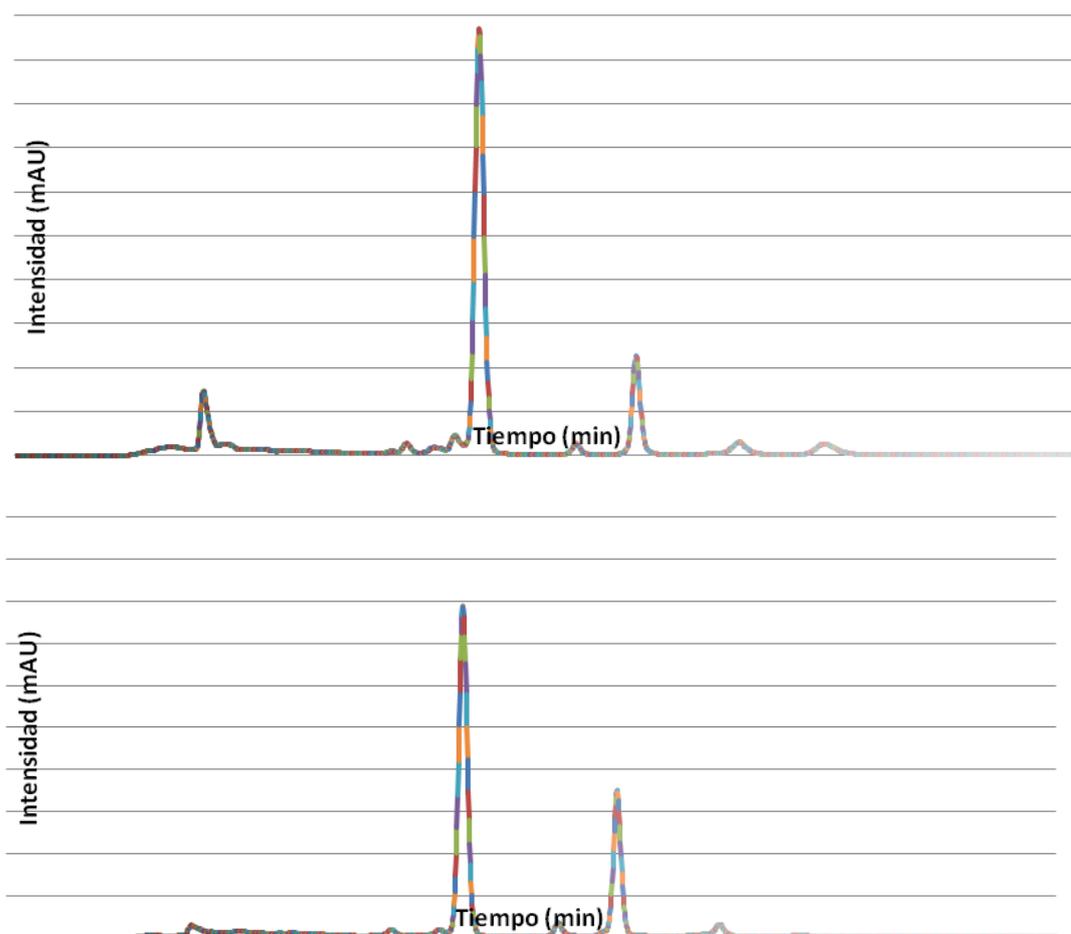


Figura 5. Cromatograma de RP-HPLC de los extractos crudos de muestras de raíz del árbol de chilillo de diferentes grosores (5 cm, arriba y 15 cm, abajo), ambas colectadas en San Isidro de Dota, San José ($\lambda = 277$ nm)

Una vez obtenidos los cromatogramas de las diferentes muestras en relación con las partes seleccionadas del árbol de chilillo y sus respectivos sitios de colecta, se procedió a determinar las áreas totales de los picos correspondientes a los metabolitos secundarios presentes. Se confirmaron diferencias entre las partes del árbol, sitio de muestreo y el grosor de las raíces. Se debe entender que el área de los picos es proporcional a la concentración de los metabolitos secundarios representados en cada pico del cromatograma.

En la siguiente figura 6 se representan las áreas totales de los cromatogramas, los cuales corresponden al contenido total de metabolitos secundarios en relación con la parte de la planta (raíz o tallo) y del sitio de recolección del material vegetal analizado.

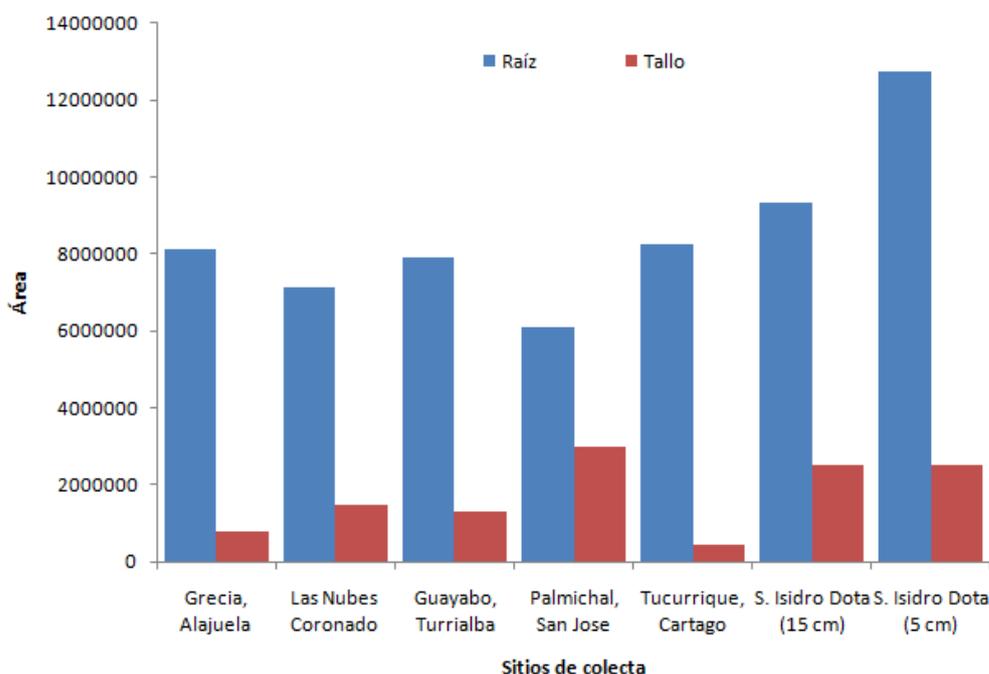


Figura 6. Área cromatográfica total correspondiente a los metabolitos secundarios presentes en los extractos de las diferentes partes del árbol de chilillo, en relación con el sitio de colecta, mediante la técnica cromatográfica RP-HPLC, ($\lambda = 277 \text{ nm}$)

En conformidad con la figura 6, se puede observar que la diferencia más marcada en la concentración de estos compuestos se encontró entre los dos diámetros de raíces colectas en San Isidro de Dota de San José. Las de 5 cm muestran mucha mayor área en comparación con las de 15 cm de diámetro. Así mismo, en ninguno de los sitios de colecta, el tallo superó la concentración de metabolitos observada para las respectivas muestras de raíces.

Debido a esto, se hace necesaria la adecuación de un método espectrofotométrico para la cuantificación del contenido total de filantosidos y lignanos presentes en raíces y tallos del árbol de chilillo. Estos metabolitos secundarios de naturaleza terpénica comunmente reaccionan en presencia de ácido sulfúrico concentrado, y generan una serie de reacciones desconocidas que al final producen un color amarillo muy estable (por más de 2 horas). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de filantosidos y lignanos presentes en la muestra, lo que lo hace conveniente para una cuantificación mediante la técnica de espectrofotometría UV-Visible. Los resultados obtenidos del análisis de diversas muestras del árbol de chilillo con este método colorimétrico se correlacionaron con las áreas totales de los picos de los cromatogramas obtenidos para las mismas muestras, pero empleando la técnica de HPLC, como se presenta en la figura 7.

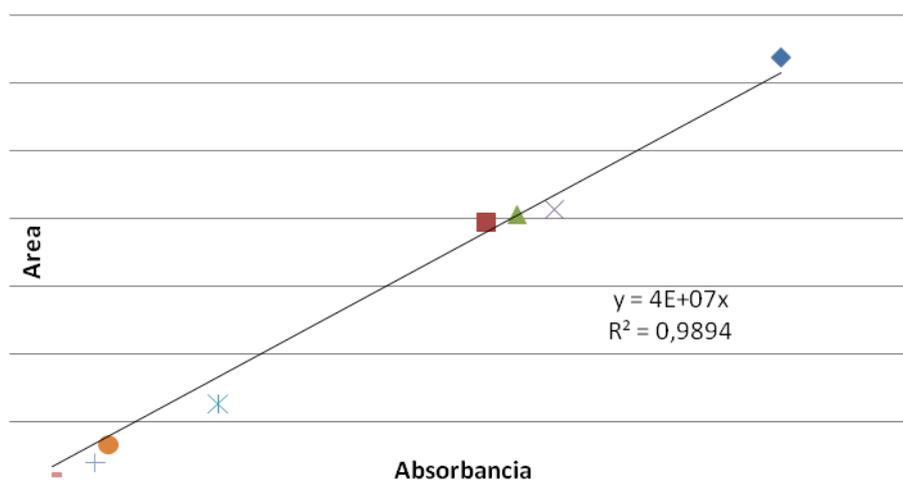


Figura 7. Representación gráfica de la determinación del coeficiente de correlación entre el área total del contenido de filantósidos y lignanos presentes en extractos crudos del árbol de chilillo, obtenida por el método de RP-HPLC y la absorbancia obtenida empleando el método espectrofotométrico desarrollado

Los resultados presentados en la figura 7 evidencian claramente que la correlación entre ambos métodos mostró un excelente coeficiente de determinación ($R^2 = 0,9894$), por lo que se puede afirmar que ambos métodos presentan una linealidad significativa, y que el análisis de la concentración de los filantósidos y lignanos se puede realizar empleando cualquiera de los dos métodos, siendo el espectrofotométrico el más simple, accesible y barato.

Finalmente, en la figura 8 se presentan los resultados obtenidos de los ensayos de determinación del contenido de polifenoles y su respectiva actividad antioxidante en el árbol de chilillo. Definitivamente queda evidenciado que el *Phyllanthus acuminatus* Vahl no es una importante fuente de polifenoles. De las diferentes muestras evaluadas, se puede asegurar, con estos resultados, que la muestra de raíz de San Isidro de Dota (5 cm) presentó la mayor cantidad de polifenoles totales ($0,028 \pm 0,004$ mg ácido gálico/g muestra) así como la mayor neutralización de radicales libres (20 ± 1 %DPPH reducido/30mg muestra).

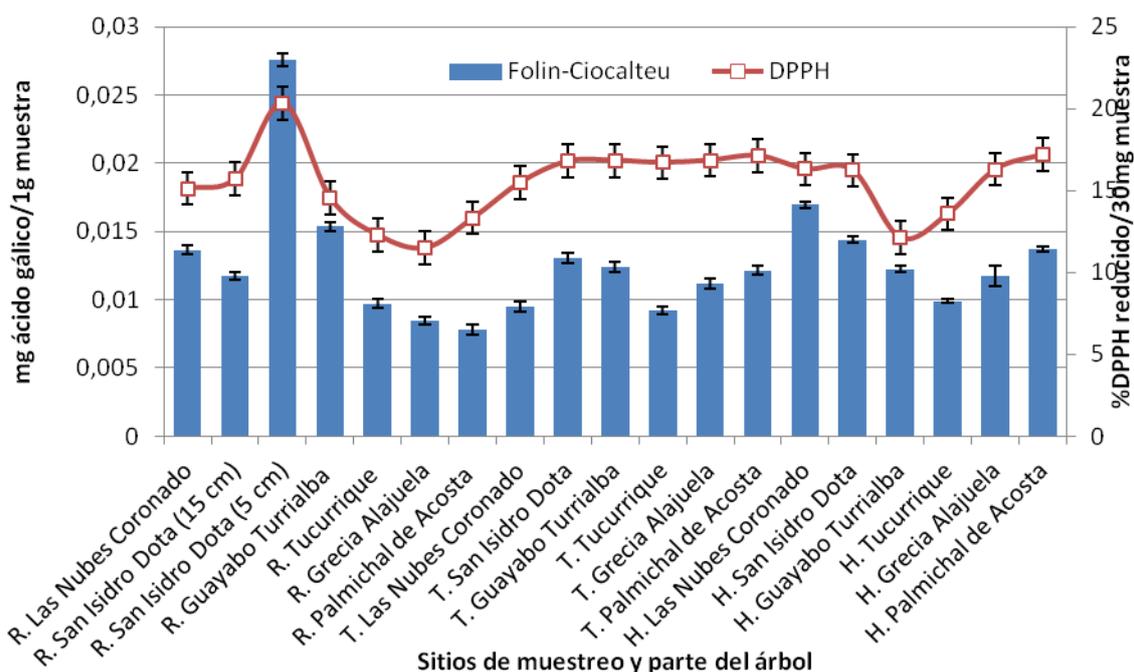


Figura 8. Representación gráfica de la relación del contenido de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu) y su respectiva actividad antioxidante (DPPH) de las diferentes partes de la planta de chilillo, colectadas en diversas partes del país.

Es importante mencionar que al realizar una correlación entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante, el coeficiente de determinación resultó ser relativamente bajo ($R^2 = 0,4334$). Por lo tanto, la capacidad antioxidante observada en los diferentes extractos no puede ser atribuida solamente al contenido de los polifenoles totales presentes, sino también a otros metabolitos secundarios que mostraron actividad antioxidante.

CONCLUSIONES

Los resultados evidencian que la mezcla de disolventes idónea para extraer cuantitativamente los filantósidos y lignanos presentes en las diferentes partes del árbol de chilillo, resultó ser la combinación de diclorometano:metanol (1:1 v/v). También se encontró que el número de extracciones óptimas a realizar al tallo, raíz y hojas del árbol de chilillo, resultó ser de 4, 3 y 2 respectivamente.

A partir del análisis cuantitativo de metabolitos secundarios, mediante el método de cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (RP-HPLC), se determinó que la muestra de raíz de San Isidro de Dota presentó la máxima concentración (expresada en unidades de área), mientras que todas las muestras de tallo, sin importar el sitio de muestreo, resultaron ser despreciables con respecto al contenido de filantósidos y lignanos.

Se logró obtener un excelente coeficiente de determinación ($R^2 = 0,989$) para el análisis de correlación entre el método espectrofotométrico y la técnica de

cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en la determinación del contenido de filantósidos y lignanos en muestras de chilillo. Estos resultados indican que ambos métodos son comparables en el estudio de estos metabolitos secundarios, razón por la cual se puede escoger la técnica más apropiada, dependiendo de la disponibilidad del equipo y resto de recursos en el laboratorio.

Tradicionalmente existe una excelente correlación entre el contenido de polifenoles totales y la actividad antioxidante; sin embargo, en este estudio no fue posible obtenerla, ya que la correlación entre ambos resultó relativamente baja ($R^2 = 0,4334$). Esto implica que la capacidad antioxidante observada en los diferentes extractos no puede ser atribuida solamente al contenido de los polifenoles totales presentes, sino también a otros metabolitos secundarios que mostraron actividad antioxidante. Igualmente se puede concluir que el método de Folin-Ciocalteu no estimó apropiadamente en contenido de polifenoles totales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento del Fondo FEES del Consejo Nacional de Rectores (CONARE), por medio del cual fue posible completar las actividades descritas en el presente trabajo.

REFERENCIAS

- Calderón, R. (1999). *Flora de Costa Rica*. Heredia, Costa Rica.
- González, D. (2008). *Estudio de la actividad antioxidante y anti-inflamatoria de los extractos de la flor de Jamaica (Hibiscus sabdariffa), empleando las técnicas de evaluación de DPPH y modelo de edema de pata de roedores*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica.
- Gordon, M., Cragg, D., Newman, J. y Snader, K. (1997). Natural Products in drug discovery and development [Descubrimiento y desarrollo de fármacos en productos naturales]. *J. Nat. Prod.* 60, 52-60.
- Kuskoski, M., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini-Filho, J. y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc. Tecnol. Aliment. Campinas*, 25(4), 726-732.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity [El uso del estable radical difenilpicrilhidracilo (DPPH) para estimar la actividad antioxidante]. *Songklanakarín J. Sci. Technol.*, 26(2), 211-219.
- Pettit, G. y Schaufelberger, D. (1988). Isolation and structure of the cytostatic lignan glycoside phyllanthostatin [Aislamiento y elucidación del lignano citostático glicosido filantostatino]. *A. J. Nat. Prod.*, 51(6), 1104-1112.

- Pettit, G., Schaufelberger, D., Nieman, R., Dufresne, C. y Saenz-Renauld, D. (1990). Antineoplastic agent, 177. Isolation and structure of phyllanthostatin [Agente antineoplásico, 177. Aislamiento y elucidación del filantostatino]. 6. *J. Nat. Prod.*, 53(6), 1406-1413.
- Venereo, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cubana Med Milit.*, 31(2), 126-133.
- Waksmunzka, M. Sherma, J. y Kowalska, T. (2008). Thin layer chromatography in Phytochemistry [Cromatografía de capa fina en fitoquímica]. *Chromatographic science series*, volume 99. New Jersey, USA. CRC Press.