

Determinación del contenido de polifenoles y actividad antioxidante de los extractos polares de comfrey (*Symphytum officinale* L)

Determination of polyphenols and antioxidant activity of polar extracts of comfrey (*Symphytum officinale* L)

Diana Lisseth Nossa González, Yudy Verónica Talero Pérez, Wilson Elías Rozo Núñez

Laboratorio de Síntesis Orgánica. Laboratorio de Espectroscopia. Grupo de investigación Química-Física Molecular y Modelamiento Computacional (QUIMOL). Escuela de Ciencias Químicas. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC). Boyacá, Colombia.

RESUMEN

Introducción: el Comfrey (*Symphytum officinalis* L.) (fam. *Boraginacea*), es una planta que ha sido utilizada con propósitos terapéuticos en la medicina popular. Se ha usado en forma externa para contusiones, dolores articulares y reumáticos y también su uso para el tratamiento en enfermedades del tracto digestivo. Debido a la presencia de algunos alcaloides hepatotóxicos, su uso es externo.

Objetivo: determinar el contenido de polifenoles totales y estudiar el potencial antioxidante de los extractos polares de las hojas de Comfrey.

Métodos: los extractos de las hojas de Comfrey se prepararon en diferentes solventes: metanol-agua 50 %, agua y acetato de etilo. Luego se determinó el contenido de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu, y la actividad antioxidante por los métodos de DPPH•+ (1,1-difenil-2-picrilhidracil) y ABTS•+ (ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico).

Resultados: los tres extractos polares estudiados mostraron potencial antioxidante. El extracto metanólico presentó la mayor concentración de polifenoles totales con un valor de 6,93 mg ácido Gálico/ g de extracto seco. Este mismo extracto presentó el mayor potencial antioxidante por los dos métodos utilizados, dado que mostró mayor poder de inhibición de radicales.

Conclusiones: se evidenció el potencial antioxidante de los extractos polares de Comfrey y el contenido de polifenoles totales.

Palabras clave: *Symphytum officinalis* L; capacidad antioxidante; polifenoles totales.

ABSTRACT

Introduction: The Comfrey (*Symphytum officinalis* (L.) (fam. *Boraginacea*), is a plant that has been used for therapeutic purposes in popular medicine. It has been used externally for bruises, joint pains and rheumatic and also its use for treatment of diseases of the digestive tract. Due to the presence of some hepatotoxic alkaloids, its use has been restricted only to the external.

Objective: To determine the content of entire polifenoles and to study the antirust potential of the polar extracts of the leaves of Comfrey.

Methods: The extracts of the leaves of Comfrey were prepared in different solvents: methanol - water to 50 %, water and acetate of ethyl. Polyphenol content was then determined by the Folin-Ciocalteu method, and the antioxidant activity by the methods of DPPH •+ (1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS•+ (2.2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

Results: The three studied polar extracts showed antioxidant potential. The methanol extract showed the highest concentration of polyphenols with a value of 6.93 mg Gallic acid / g dry extract. This same extract had the highest antioxidant potential by the two methods, since most power showed radical scavenging.

Conclusions: The antioxidant potential of polar extracts of Comfrey and total polyphenol content was evident.

Key words: *Symphytum officinalis* L; antioxidant capacity; total polyphenols.

INTRODUCCIÓN

El Comfrey (*Symphytum officinalis* L.) (fam. *Boraginacea*) es una planta de rápido crecimiento, la cual ha sido utilizada desde el siglo XVI con propósitos terapéuticos para el tratamiento externo en la medicina popular. Desde el siglo XVI se ha usado en aplicaciones externas para contusiones, dolores articulares y reumáticos, en enfermedades del tracto digestivo, entre otros.¹⁻⁷ Al respecto, se sabe que el Comfrey contiene polisacáridos y glicopéptidos responsables de la actividad antiinflamatoria.^{8,9}

Varias propiedades le han sido atribuidas a compuestos presentes en esta especie, como el ácido rosmarínico y en especial a la alantoína, entre estas se pueden citar: ser el responsable del inicio de la división celular y el crecimiento del tejido conjuntivo, huesos, cartílagos y de la aceleración de la cicatrización.⁹⁻¹² También se ha identificado la presencia de otros compuestos como alcaloides hepatotóxicos¹³ de la familia de las pirrolizidinas.^{8,9} Entre estos se encuentran la siocarpina, lycopsamina, intermedina, symladina, rideliina y varias symfitinas, todas ellas con efectos tóxicos.^{8,11} Aun así esta planta sigue continua utilizándose para el tratamiento de muchas enfermedades, aunque se ha restringido para uso externo.

Por otra parte, la mayoría de las investigaciones de esta planta se han encaminado en el estudio de la raíz,¹⁴ y en menor medida se han estudiado las propiedades de las hojas, por lo cual el objetivo del trabajo se ha encaminado al estudio del potencial antioxidante y el contenido de polifenoles en tres tipos de extractos de las hojas de Comfrey.

MÉTODOS

Material Vegetal

Las hojas de comfrey (*Symphytum officinale* L.) fueron recolectadas en la ciudad de Sogamoso (Boyacá), Vereda Santa Helena. Las hojas se recolectaron frescas y sanas. Parte del material vegetal se deshidrató a temperatura ambiente a la sombra sobre papel periódico, a una temperatura promedio de 20 °C.

Un ejemplar de la planta fue llevado al herbario de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia para comprobar su identificación, allí se encuentra un ejemplar para herbario bajo la codificación 019087 (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de Comfrey

HERBARIO UPTC	
Familia	Boraginaceae
Genero	Symphytum
Especie	<i>Symphytum officinale</i> L.
Nombre Común	Comfrey

Obtención de Extractos

Para el estudio se prepararon tres extractos de la siguiente forma:

Extracto acuoso (EA)

Se pesaron 0,5 g de hojas secas de Comfrey, se mezclaron con 20mL de agua destilada y se dejó en agitación continua por 24h, se filtró y almacenó a temperatura de refrigeración para su posterior utilización.

Extracto metanol-agua 50 % (EMA)

Se pesaron 0,5 g de hojas secas de Comfrey, se mezclaron con 20mL de una solución al 50% metanol-agua y se dejó en agitación constante por 1h a 50 °C, se filtró y almacenó a temperatura de refrigeración para su uso posterior.

Extracto acetato de etilo (EAE)

Se pesaron 10 g de hojas secas de Comfrey, se le agregaron 300 mL acetato de etilo y se dejó en agitación constante por tres días, se filtró y almacenó a temperatura de refrigeración para su posterior análisis.¹⁵

Determinación de Polifenoles Totales por el Método de Folin-Ciocalteu

El contenido de polifenoles se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu desarrollado por *Liu y colaboradores*.¹⁶ El ensayo se realizó de la siguiente manera: se midieron 125 μ L de la solución patrón de ácido gálico, se adicionaron 0,5 mL de H₂O destilada y 125 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu; se deja reaccionar por 6 min y se agregan 1,25 mL de una solución de Na₂CO₃ al 7 %, por último se agrega 1 mL de H₂O destilada y se deja reposar por 90 min en condiciones de laboratorio (17 °C y 65 % de humedad relativa), las lecturas se realizaron a una longitud de onda (λ) de 760 nm, en el espectrofotómetro UV Genesys 10UV (thermo-electron). Luego, cada extracto fue diluido 1:5 con solución metanólica al 50 %, y se determinó el contenido de polifenoles totales de la misma forma como se hizo con los patrones de ácido gálico. Después por interpolación de las absorbancias de los extractos en la curva del ácido gálico se logró determinar el contenido de polifenoles totales. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Actividad Antioxidante (DPPH)

La actividad antioxidante de los tres extractos por el método de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) se realizó, según el método desarrollado por *Singh y colaboradores*.¹⁷ Para este ensayo se hizo una curva de calibración con ácido ascórbico para expresar la actividad antioxidante de los extractos como equivalente en mM/L de ácido ascórbico. Para la curva se utilizaron 6 patrones de ácido ascórbico de concentración 0,02mM; 0,05mM; 0,1mM; 0,2mM; 0,5mM; 2 mM. Se tomaron 100 μ L de cada una de las soluciones y se les adicionó 5 mL de solución metanólica de DPPH•+ (1x10⁻⁴M), se agitó y se dejó en la oscuridad durante 30 min. Se midió la absorbancia (Abs) a una longitud de onda de 517 nm empleándose un espectrofotómetro UV Genesys 10 UV (thermo-electron). El mismo tratamiento se utilizó para los extractos. El análisis se realizó por triplicado.

Actividad Antioxidante por ABTS• +

Método ABTS•+ (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico, se desarrolló según la metodología descrita por *Puertas y colaboradores*.¹⁸ Para expresar la actividad antioxidante de los extractos en equivalente trolox se hizo una curva de calibración con este reactivo en un rango de concentraciones entre 0,1 y 0,5mM. Para cada solución de trolox se tomaron 20 μ L, se adicionan 1000 μ L de la solución de ABTS•, se dejaron reaccionar por 7 min y se midió la absorbancia a una λ = 724 nm. El mismo tratamiento se utiliza para los extractos. El análisis se realizó por triplicado.

El potencial antioxidante de los extractos se determinó a una misma concentración.

RESULTADOS

El contenido de polifenoles totales presentes en cada uno de los extractos y la actividad antioxidante, se expresan en términos del IC₅₀ y de equivalente trolox para ABTS (ET, milimoles/L) y de equivalente de ácido ascórbico (EAA) para DPPH (EAA, milimoles/L), como se observa en la [tabla 2](#).

Tabla 2. Comparación entre los controles de los requisitos de calidad de la tintura al 20 % de las hojas de *F. occidentalis*

Requisitos de calidad	Mediciones				Indicadores estadísticos		
	72 h después de su elaboración		6 meses después de su elaboración		t-valor	SE	P
	\bar{x}	DS	\bar{x}	DS			
pH	5,37 ^a	0,0115	5,38 ^a	0,0115	-1,06	0,006	1,0000
n_D^{25}	1,6320 ^a	0,0000	1,6323 ^a	0,0000	-	-	-
S_t (g/100mL)	0,531 ^a	0,0241	0,531 ^a	0,0246	0,03	0,014	0,9806
ρ_r^{25}	0,8377 ^a	0,0012	0,8377 ^a	0,0012	-0,07	0,001	0,9782

Leyenda:

pH: Índice de acidez de la tintura; n_D^{25} : Índice de refracción a 25 °C; S_t : Sólidos totales; ρ_r^{25} : Densidad relativa a 25 °C; \bar{x} : Valor promedio; $\pm DS$: Desviación estándar de la media; t-valor: Valor estadístico de t para $\alpha = 0,05$; SE: Error estándar; P: Probabilidad para $\alpha=0,05$.

La capacidad antioxidante de los extractos fue evaluada por medio de los modelos *in vitro* del (DPPH) y del ABTS (tabla 2). Por el método de DPPH se observa que el potencial antioxidante es mayor en el EMA, dado que presenta un IC_{50} de 119,96 mg/L y un EAA de 4,63 mm/L, mientras que el EAE mostro un IC_{50} de L 476,20 mg/L y un EAA de 1,09 mm/L, es el extracto de menor potencial.

El método de ABTS confirma que el EMA es el que presenta mayor potencial antioxidante, dado que mostró un IC_{50} de 193,65 mg/L y un ET de 0,61 mm/L, los cuales son mucho mayores comparados con el EA y EAE. Correlacionando los extractos se puede observar que el EMA, el cual presenta mayor contenido de polifenoles, mayores valores de EAA (DPPH) es el que presenta menor IC_{50} .

DISCUSIÓN

El método de *Folin-Ciocalteus* la metodología más rutinaria para determinar el contenido de polifenoles totales en matrices de procedencia natural.¹⁹

El contenido de polifenoles totales de los extractos oscila entre el 6,93 y 1,09 mg de ac. gálico/g de extracto seco, muy similar a los valores reportado para extractos de té (0,47-7,42 μ g/mg de extracto) por Valéria M. Di Mambro y colaboradores.²⁰ De los extractos estudiados y la misma concentración, el EMA presentó un mayor contenido, fue el EAE, el que presentó menor concentración. La concentración mostrada por el EMA se debe a la mayor capacidad de extracción de los compuestos polifenólicos, dado la afinidad que estos tienen por el metanol. De esta forma se demuestra que a partir del comfrey se pueden obtener extractos muy activos, con altos contenidos fenólicos. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Sanja Čavar Zeljković y colaboradores, donde los extractos metanólicos muestran mayor contenido de polifenoles que los extractos con otro tipo de solvente como cloroformo,²¹ esto debido a la baja afinidad de los compuestos polifenolicos con solventes de baja polaridad.

En el ensayo del DPPH se observó una mayor decoloración de este reactivo con el EMA, seguido del EA y EAE. Esta decoloración está relacionada con la capacidad de donación de hidrogeno de los antioxidantes presentes en un extracto. Los resultados muestran que para el EMA, este comportamiento se le atribuye a la mayor concentración de polifenoles extraídos en la solución. EAE presentó baja actividad inhibitoria contra el radical DPPH, mostrándose la menor afinidad de los antioxidantes presentes en las hojas del comfrey, respecto a este solvente orgánico.

Para el ensayo del ABTS también mostró que el extracto que presentó actividad destacada al igual que para el DPPH fue el EMA, seguidos del EA. Se encontró una correspondencia entre ambos ensayos (DPPH y ABTS), tal como se observó en otras investigaciones,²² lo cual muestra que los extractos evaluados del comfrey tienen actividades comparables por ambos métodos y por tanto que estos son reproducibles al momento de medir la actividad antioxidante. Se corrobora que los extractos provenientes de solventes más polares son los que tienen tanto mayor contenido de polifenoles y mayor inhibición de radicales oxidantes, de acuerdo con lo reportado por *Subraman D. Priyadharshin y colaboradores*,²³ en la cual el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante está relacionada. Estos resultados indican que para las hojas de comfrey hay mayor presencia de polifenoles en solución metanólica que en agua o acetato de etilo. Se revalida la existencia de la relación entre tres parámetros, es decir, que los extractos con mayor potencial antioxidante deben presentar mayor contenido de polifenoles, mayores valores de EAA (DPPH), y menores valores de IC₅₀. La misma tendencia se presenta para el ABTS.

Muchos reportes han mostrado una cercana relación entre el contenido de fenoles y la actividad antioxidante de las plantas.²⁰ Aunque hay una estrecha relación entre el contenido de polifenoles y la actividad antioxidante, no se puede considerar que esta última se deba solo a la presencia de compuestos fenólicos, puesto que en su composición química pueden existir otros metabolitos secundarios que debido a su estructura contribuyan a su eficacia antioxidante.

Agradecimientos

A la Dirección de Investigaciones (DIN) de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), por su ayuda al desarrollo del proyecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gomez M, Olivera C, Xavier J, Villano B. Comfrey (*Symphytum officinale L.*) and experimental hepatic carcinogenesis: A short-term carcinogenesis model study. *eCAM*. 2010;7(2):197-202.
2. Adams M, Berset C, Kessler M, Hamburger M. Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders-A survey of European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009;121:343-59.
3. Foster S, Tyler V. *Tyler's Honest herbal: A sensible guide to the use of herbs and related remedies*. Routledge. 1999:1-470.

4. Liu F, Yin Wan S, Jiang Z, Yau Li S, Ong E, Castaño J, et al. Determination of pyrrolizidine alkaloids in comfrey by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Talanta*. 2009;80:916-23.
5. Steckel F, Seitz H. The efficacy and safety of comfrey. *Public Health Nutrition*. 2000;3(4A):501-8.
6. Frost R, MacPherson H, O'Meara S. The external use of comfrey: A practitioner survey. *Complementary Therapies in Clinical Practice*. 2014:1-9.
7. Smith D, Jacobson B. Effect of a blend of comfrey root extract (*Symphytum officinale* L.) and tannic acid creams in the treatment of osteoarthritis of the knee: randomized, placebo-controlled, double-blind, multiclinical trials. *Journal of Chiropractic Medicine*. 2011;10:147-56.
8. Koll M, Dieter R, Pabst H, Predel H, Petrowicz O, Giannetti B, et al. Efficacy and tolerance of a comfrey root extract (Extr. Rad. Symphyti) in the treatment of ankle distortions: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Phytomedicine*. 2004;11:470-7.
9. Frost R, MacPherson H, O'Meara S. A critical scoping review of external uses of comfrey (*Symphytum* spp.). *Complementary Therapies in Medicine*. 2013;21:724-45.
10. Kim N, Oberlies N, Brine D, Handy R, Wani M, Wall M, et al. Isolation of Symplandine from the Roots of Common Comfrey (*Symphytum officinale*) Using Countercurrent Chromatography. *J. Nat. Prod.* 2001;64:251-3.
11. Mei N, Guo L, Fu P, Heflich R, Chen T. Mutagenicity of comfrey (*Symphytum officinale*) in rat liver. *British Journal of Cancer*. 2005;92:873-5.
12. Glickman R, Mukherji A. Moxibustion for asthma, acupuncture for epilepsy, psychological therapies for irritable bowel syndrome, exercise training for multiple sclerosis, comfrey root for acute back pain. *Explore: The journal of science and healing*; 2014. p. 1-5.
13. Chen T, Fuscoe J, Li Z. MicroRNAs and their predicted target messenger RNAs are deregulated by exposure to a carcinogenic dose of comfrey in rat liver. *Toxicology Letters*. 2011;205:S62.
14. Bergmana M, Varshavskya L, Gottlieb H, Grossmana S. The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. *Phytochemistry*. 2001;58:143-52.
15. Pérez R, Rodríguez C, Lara J, Montes R, Ramírez G. Toxicidad de aceites, esencias y extractos vegetales en larvas de mosquito *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Acta Zoológica Mexicana*. 2004;20(1):141-52.
16. Dewanto V, Wu X, Adom K, Liu R. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:3010-4.
17. Singh R, Murthy C, Jayaprakasha G. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. *J. Agric. Food Chem.* 2002;50:81-6.

18. Puertas M, Tobón J, Arango V. *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet. & H. y su potencial uso como fuente de antioxidantes y colorantes naturales. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2014;19(1):61-8.
19. Gene E, Kim S, Marjorie L, Medina B, Robert A. Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin-Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. Journal of Food Composition and Analysis. 2012;27:102-7.
20. Valéria M, Mambro Di, Maria J, Fonseca V. Assays Of Physical Stability And Antioxidant Activity Of A Topical Formulation Added With Different Plant Extracts. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2005;37:287-95.
21. Sanja Ć, Zeljković A, Požgan F, Štefane B, Arkowski P, Maksimović M. Antioxidant activity of natural and modified phenolic extracts from *Satureja montana* L. Industrial Crops and Products. 2015;76:1094-9.
22. Babbar N, Oberoi HS, Uppal DS, Patil RT. Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. Food Research International. 2011;44:391-6.
23. Subramanian D. Priyadharshini, Venugopal Sujatha. Antioxidant Profile And Gc-MS Analysis Of *Solanum Erianthum* Leaves And Stem- A Comparison. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2013;5:652-8.

Recibido: 12 de diciembre de 2014.

Aprobado: 11 de noviembre de 2015.

Wilson Elías Rozo Núñez. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC).
Boyacá, Colombia.
Correo electrónico: wilson.rozo@uptc.edu.co