

INHIBICIÓN DE LA OXIDACIÓN DE LÍPIDOS Y CONSTITUYENTES FENÓLICOS RELACIONADOS EN LA MADERA Y LA CORTEZA DE TRES ESPECIES DE ENCINO (*Quercus candicans*, *Q. laurina* y *Q. rugosa*)

INHIBITION OF LIPID OXIDATION AND RELATED PHENOLIC CONSTITUENTS IN THE WOOD AND BARK OF THREE OAK SPECIES (*Quercus candicans*, *Q. laurina*, and *Q. rugosa*)

María G. Argüeta-Solís¹, Cristóbal N. Aguilar², Luis F. Pintor-Ibarra¹, Mónica Chávez-González², Romeo Rojas-Molina², Jorge E. Wong-Paz², Fabiola E. Pedraza-Bucio¹, José G. Rutiaga-Quiñones^{1*}

¹Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 58040. Avenida Francisco J. Mugica s/n, Edificio D, planta alta, Ciudad Universitaria, Colonia Felicitas del Rio, Morelia, Michoacán, México. (rutiaga@umich.mx). ²Departamento de Investigación en Alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. 25280. Boulevard Venustiano Carranza y José Cárdenas V. Colonia República, Saltillo, Coahuila, México.

RESUMEN

La búsqueda de fenoles con capacidad antioxidante presentes en diferentes plantas, frutos y otras estructuras para combatir enfermedades que ocasionan los radicales libres va en aumento. Estas sustancias también se han detectado en maderas de coníferas y en algunas especies de encinos, pero hay pocos estudios con maderas de este género y que puedan ser fuente de estos fenoles. Por ello, el objetivo de este estudio fue determinar la capacidad antioxidante y el perfil fenólico de extractos metanólicos y acuosos en albura, duramen y corteza de tres encinos (*Quercus candicans*, *Q. laurina* y *Q. rugosa*). Los extractos se obtuvieron por extracción sucesiva con disolventes de polaridad creciente (ciclohexano, acetona, metanol) en equipo Soxhlet y al final con reflujo de agua caliente. La actividad antioxidante se analizó mediante la inhibición de la oxidación de lípidos y la composición fenólica de los extractos por análisis HPLC. Los rendimientos mayores se obtuvieron en los extractos totales con metanol de las cortezas. La inhibición de la oxidación de lípidos fue mayor con el extracto metanólico de la albura de *Q. rugosa* (94.09 % de actividad antioxidante), en contraste el extracto metanólico de la albura de *Q. laurina* fue el menor (42.54 %). Los compuestos fenólicos más frecuentes en los extractos de los tres encinos fueron el ácido clorogénico, resorcinol, catequina y ácido gálico. Los extractos metanólicos y acuosos de madera y corteza de los tres encinos son ricos en compuestos fenólicos con actividad antioxidante potente y son una alternativa como fuente de biomoléculas.

ABSTRACT

An increasing number of researches have focused on phenols with antioxidant capacities that can fight diseases caused by free radicals. Those phenols can be found in various plants, fruits, and other structures. These substances were also detected in the wood of conifers and some oak species. However, there are few studies about this kind of wood, even though they could be a source of these phenols. Therefore, the objective of this study was to determine the antioxidant capacity and the phenolic profile of the methanolic and aqueous extracts from the sapwood, heartwood, and bark of three oaks (*Quercus candicans*, *Q. laurina*, and *Q. rugosa*). The extracts were obtained by successive extraction with solvents of increasing polarity (cyclohexane, acetone, and methanol) in a Soxhlet equipment, and they were finally subject to hot water with reflux. The antioxidant activity was analyzed through the inhibition of the lipid oxidation, while the phenolic composition of the extracts was analyzed through a HPLC analysis. Higher outputs were obtained from the total extracts with methanol taken from bark. The inhibition of the lipid oxidation was higher when the methanolic extract was taken from the sapwood of *Q. rugosa* (antioxidant activity: 94.09 %), while the methanolic extract taken from the sapwood of *Q. laurina* was lower (42.54 %). The phenolic compounds most frequently found in the extracts taken from the three oaks were chlorogenic acid, resorcinol, catechin, and gallic acid. Methanolic and aqueous extracts taken from the wood and bark of three oaks are rich in phenolic compounds with potent antioxidant activity and they are an alternative source of biomolecules.

*Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: octubre, 2017. Aprobado: junio, 2018.

Publicado como ARTÍCULO en Agrociencia 52: 757-766. 2018.

Key words: extractives, sapwood, heartwood, *Quercus* spp., antioxidant activity, phenols.

Palabras clave: extraíbles, albura, duramen, *Quercus* spp., actividad antioxidante, fenoles.

INTRODUCCIÓN

Hay varios estudios de la capacidad antioxidante y análisis químico de extractos de plantas diversas y de frutos, y algunos de esos compuestos están aprobados para tratamientos medicinales. Esta actividad antioxidante de las plantas se debe a compuestos no nutricionales, con actividad biológica elevada, como polifenoles, vitaminas y minerales (Khalaf *et al.*, 2008; Chemah *et al.*, 2010). Entre los polifenoles en plantas o árboles destacan los flavonoides, isoflavonas, flavonas, quercitina, catequinas, ácido gálico y resorcinol (Cai *et al.*, 2010; Ruiz-Martínez *et al.*, 2011; Rosales-Castro *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2015).

La actividad antioxidante en plantas es importante porque puede ser de ayuda y bienestar para personas que las consumen y combatir enfermedades causadas por radicales libres (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011). La oxidación celular es promovida por los radicales libres, los cuales son moléculas o grupos de moléculas con un electrón desapareado, son muy reactivos y pueden favorecer una reacción en cadena que daña el organismo y ocasiona el estrés oxidativo asociado con Alzheimer, cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares debido a mecanismos de peroxidación lipídica, daño al ADN y proteínas (Butera *et al.*, 2002; Nuengchamnon *et al.*, 2004).

La composición química de las sustancias extraíbles es compleja (Fengel y Wegener, 1984) y separar cada compuesto antioxidante y estudiarlo de forma individual es costoso e ineficiente (Kalia *et al.*, 2008; Wong-Paz *et al.*, 2015a). Hay sistemas disponibles para evaluar la actividad antioxidante de las plantas como el radical libre DPPH (1,1-difenil-2-picril hidracina) y el catión ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Otros métodos sugieren información más cercana sobre la capacidad antioxidante en los sistemas biológicos como la inhibición de la oxidación de lípidos (Huang *et al.*, 2005). Esta capacidad antioxidante se ha detectado en compuestos en frutas, verduras, partes de plantas inferiores, en coníferas (Rosales-Castro *et al.*, 2009) y algunos encinos (Kim *et al.*, 2008; Rocha-Guzmán *et al.*, 2009; Rosales-Castro *et al.*,

INTRODUCTION

There are several studies about the antioxidant capacity and chemical analysis of the extracts of various plants and fruits. Some of their compounds were approved for medicinal treatments. The antioxidant activity of the plants is caused by non-nutritional compounds with high biological activity, such as polyphenols, vitamins, and minerals (Khalaf *et al.*, 2008; Chemah *et al.*, 2010). The following polyphenols found in plants or trees stand out: flavonoids, isoflavones, flavones, quercetin, catechin, gallic acid, and resorcinol (Cai *et al.*, 2010; Ruiz-Martínez *et al.*, 2011; Rosales-Castro *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2015).

Plants have a very important antioxidant activity that can help and improve the well-being of the people who consume them, as well as fight diseases caused by free radicals (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011). Free radicals—molecules or groups of molecules with an unpaired electron—cause cellular oxidation. They are highly reactive and they contribute to a chain reaction that damages the organism and causes the oxidative stress associated with Alzheimer, cancer, diabetes, and cardiovascular diseases (associated with lipid peroxidation mechanisms), as well as damage to DNA and proteins (Butera *et al.*, 2002; Nuengchamnon *et al.*, 2004).

The chemical composition of extractives is complex (Fengel and Wegener, 1984) and separating each antioxidant compound and studying it individually is costly and inefficient (Kalia *et al.*, 2008; Wong-Paz *et al.*, 2015a). Some available systems can evaluate the antioxidant activity of plants, such as the DPPH free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine) and ABTS cation (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). Other methods suggest more accurate information about the antioxidant capacity of biological systems such as the inhibition of lipid oxidation (Huang *et al.*, 2005). This antioxidant capacity has been detected in compounds found in fruits, vegetables, and parts of lower plants, as well as in conifers (Rosales-Castro *et al.*, 2009) and some oaks (Kim *et al.*, 2008; Rocha-Guzmán *et al.*, 2009; Rosales-Castro *et al.*, 2012). Oaks—trees that belong to the *Quercus* genus—are the second most important group for Mexican economy and about 250 species are distributed in the country's various regions (Martínez, 1951). Their

2012). Los encinos, árboles del género *Quercus*, son el segundo grupo de importancia económica en México y hay unas 250 especies en diferentes regiones del país (Martínez, 1951). Estas maderas son ricas en sustancias extraíbles y hay diferencias en rendimiento entre albura y duramen; la corteza también suele tener alta concentración de sustancias extraíbles (Fengel y Wegener, 1984).

Hay pocos estudios relacionados con la actividad antioxidante de extractos de maderas del género *Quercus*. Estas sustancias extraíbles pudieran ser fuente de fenoles con propiedades antioxidantes, por lo cual el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antioxidante mediante la inhibición de la oxidación de lípidos y realizar el perfil fenólico por análisis HPLC de los extractos metanólicos y acuosos de la madera (albura y duramen) y corteza de tres especies de encino (*Quercus candicans* Née, *Q. laurina* Humb. & Bonpl. y *Q. rugosa* Née).

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de material

El material de estudio fueron muestras de madera y corteza del uso forestal en la Comunidad Indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México (19° 21' 00" y 19° 34' 45", 102° 08' 15" y 102° 17' 30"). La albura y duramen se separaron de la madera. Las muestras de albura, duramen y corteza de las tres especies de encinos se secaron al aire libre bajo sombra. Después el material se molió en un molino Wiley (TAPPI, 2000), se tamizó y se obtuvo harina de madera malla 40 (420 μ) para realizar este estudio.

Reactivos

Los solventes químicos utilizados en el proceso de extracción Soxhlet fueron grado analítico y se obtuvieron de J. T. Baker (México). Todos los reactivos usados en la determinación de la capacidad antioxidante y los estándares utilizados en el análisis HPLC se obtuvieron de Sigma-Aldrich (México).

Contenido de sustancias extraíbles

Los extractos se obtuvieron mediante extracción sucesiva por 6 h con solventes de polaridad creciente (ciclohexano, acetona, metanol) en equipo Soxhlet y después con agua caliente a reflujo (Mejía-Díaz y Rutiaga-Quíñones, 2008). Los solventes orgánicos se recuperaron en rotavapor usando vacío y los extractos acuosos

wood is rich in extractives and their heartwood and sapwood have different output; there is also a high concentration of extractives in their bark (Fengel and Wegener, 1984).

There are few studies about the antioxidant activity of extractives taken from wood of the *Quercus* genus. These extractives could be a source of phenols with antioxidant properties. Therefore, the aim of this study was to evaluate their antioxidant capacity —through the inhibition of lipid oxidation— and to obtain their phenolic profile —through an HPLC analysis of the methanolic and aqueous extracts of the wood (sapwood and hardwood) and the bark of three oak species (*Quercus candicans* Née, *Q. laurina* Humb. & Bonpl., and *Q. rugosa* Née).

MATERIALS AND METHODS

Collecting the material

The materials studied were wood and bark samples from the forest use of the indigenous community at Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacan, Mexico (19° 21' 00" and 19° 34' 45", 102° 08' 15" and 102° 17' 30"). Sapwood and heartwood were separated from the wood. Sapwood, heartwood, and bark samples from the three oak species were dried outside in the shade. Afterwards, the material was crushed using a Wiley mill (TAPPI, 2000), it was sieved with a 40 mesh (420 μ), and the wood dust obtained was used to carry out this study.

Reagents

Chemical solvents with analytical degree were used during the Soxhlet extraction process. They were obtained from J. T. Baker (Mexico). All the reagents used to determine the antioxidant capacity and the standards used in the HPLC analysis were obtained from Sigma-Aldrich (Mexico).

Extractive content

The extractives were obtained through a successive 6 h extraction using solvents with increasing polarity (cyclohexane, acetone, methanol) in a Soxhlet equipment, before subjecting to hot water under reflux (Mejía-Díaz and Rutiaga-Quíñones, 2008). Organic solvents were recovered in a rotary evaporator (using vacuum), while the aqueous extracts were recovered using a lyophilization equipment. For this study, only the methanolic and aqueous extracts were studied, as explained below.

se recuperaron mediante un equipo de liofilización. En este estudio sólo se analizaron los extractos metanólicos y acuosos, como se indica a continuación.

Prueba de inhibición de la oxidación de lípidos

Esta prueba se realizó con el método descrito por Huang *et al.* (2005) y el porcentaje de actividad antioxidante se calculó con la ecuación:

$$\text{Reducción de peroxidación de lípidos \%} = (A_c - A_m) / A_c * 100$$

donde A_c es la absorbancia del control (agua destilada) y A_m es la absorbancia de la muestra (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011).

HPLC (cromatografía líquida de alta resolución)

El perfil fenólico de los extractos metanólicos y acuosos de la madera y corteza de los tres encinos utilizados en la actividad antioxidante, se evaluó con la metodología reportada por Ruiz-Martínez *et al.* (2011), en un equipo HPLC (Varian Pro-Star 330), modelo 0128. Las muestras (10 μ L) se inyectaron en una columna varian pursuit Xrs C₁₈ (150 $\times$ 4.6 mm), las soluciones estándar fueron ácido cinámico, ácido clorogénico, ácido cumárico, ácido hidroxicinámico, catequina, ácido gálico, metil galato, quercetina, pirogalol y resorcinol.

Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado y en los resultados se reporta el promedio $\pm$ desviación estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de sustancias extraíbles

El contenido total de compuestos extraídos fue en orden ascendente de albura < duramen < corteza de las tres especies de encino, cuyos valores variaron de 8.72 % (Albura, *Q. candicans*) a 19.39 % (Corteza, *Q. rugosa*) (Cuadro 1). La corteza es más rica en sustancias extraíbles y en el duramen se encuentran más concentrados en comparación con la albura (Fengel y Wegener, 1984), con lo cual coinciden nuestros resultados. Respecto a los solventes utilizados la mayor solubilidad fue con metanol, las sustancias polifenólicas se extraen con disolventes de polaridad alta como alcoholes y agua, y estos compuestos fenólicos presentan buena

Inhibition of lipid oxidation test

This test was carried out using the method described by Huang *et al.* (2005) and the antioxidant activity percentage was calculated using the following equation:

$$\% \text{ of the reduction of lipid peroxidation} = (A_c - A_m) / A_c * 100$$

where A_c is the witness' absorbance (distilled water) and A_m is the sample's absorbance (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011).

HPLC (high pressure liquid chromatography)

The phenolic profile of the methanolic and aqueous extracts—taken from the wood and bark of the three oaks used in the antioxidant activity—was evaluated according to the methodology proposed by Ruiz-Martínez *et al.* (2011), using a HPLC equipment (Varian Pro-Star 330, model 0128). The 10- μ L samples were injected into a varian pursuit Xrs C₁₈ column (150 $\times$ 4.6 mm). The standard solutions were cinnamic acid, chlorogenic acid, coumaric acid, hydrocinnamic acid, catechin, gallic acid, methyl gallate, quercetin, pyrogallol, and resorcinol.

Statistical analysis

All the analyses were carried out in triplicate and the results included the average $\pm$ standard deviation.

RESULTS AND DISCUSSION

Content of extractives

The total content of compounds extracted from the tree oak species was classified in ascending order as follows: sapwood > heartwood > bark. Their values varied from 8.72 % (sapwood, *Q. candicans*) to 19.39 % (bark, *Q. rugosa*) (Table 1). According to Fengel and Wegener (1984), bark had a great content of extractives and their concentration in heartwood is greater than in sapwood. The findings of our study match those results. With regard to the solvents used, methanol had the highest solubility; polyphenolic substances are extracted with high polarity solvents (such as alcohols and water), and these phenolic compounds show good antioxidant activity (Salazar *et al.*, 2008; Wong-Paz *et al.*, 2015a). The overall quantity of compounds extracted from the heartwood of *Q. candicans* is similar to the percentage (10.2 %) obtained from

actividad antioxidante (Salazar *et al.*, 2008; Wong-Paz *et al.*, 2015a). La cantidad total de compuestos extraídos en duramen de *Q. candicans* es similar al obtenido (10.2 %) en la misma especie por Rutiaga *et al.* (2000). El rendimiento total de sustancias extraíbles en *Q. laurina* en nuestro estudio fue mayor al reportado en albura (5.29 %), duramen (5.35 %) y en la corteza fue ligeramente menor al de la corteza interna (14.9 %) para la misma especie de encino (Ruiz-Aquino *et al.*, 2015). El contenido total de compuestos extraídos en *Q. laurina* en nuestro estudio fue mayor a la albura (4.91 %) y duramen (5.02 %) obtenidos para la misma especie de encino, del estado de Puebla, por Honorato y Hernández (1998). La variación de los porcentajes de extractos en las especies maderables no sólo dependen de los solventes utilizados, sino también de la misma especie; además, puede haber influencia de factores ambientales y genéticos, la edad del árbol, las condiciones climáticas, los nutrientes disponibles y la época de corte (Hillis, 1971).

Inhibición de la oxidación lipídica

La inhibición de los extractos contra la peroxidación de ácido linoleico causada por FeCl_2 no modificó la actividad antioxidante con ninguno de los tejidos de los tres encinos, independiente del disolvente de extracción (Cuadro 2). El extracto metanólico de la albura de *Q. rugosa* presentó el porcentaje de actividad antioxidante más alto (94.09 %); en contraste el extracto metanólico de la albura de *Q. laurina* tuvo el porcentaje más bajo (42.54 %). La inhibición contra la peroxidación del ácido linoleico del extracto metanólico de la albura de *Q. rugosa* presentó actividad similar al ácido gálico (95 %) aplicado con la misma técnica (Sánchez-Aldama *et al.*, 2013). La actividad antioxidante de los extractos acuosos de duramen y corteza de los tres encinos en nuestra investigación son mayores al 65 % en promedio en extractos etanol-acuosos de plantas de la geografía semiárida mexicana (*Flourensia cernua*, *Eucalyptus camaldulensis* y *Turnera diffusa*) con base a la misma metodología (Wong-Paz *et al.*, 2015a). Los valores de inhibición de los extractos metanólicos de la corteza de *Q. laurina* y la albura de *Q. rugosa* son mayores al 76.86 % del extracto etanólico de *Laurus nobilis* (Muñiz-Márquez *et al.*, 2014). La cantidad de compuestos fenólicos en los extractos está correlaciona con su actividad

the same species by Rutiaga *et al.* (2000). The overall output of extractives in *Q. laurina* in this study was higher than the percentage reported for sapwood (5.29 %) and heartwood (5.35 %), while bark had a slightly lower percentage than the one reported for the inner bark (14.9 %) of the same oak species (Ruiz-Aquino *et al.*, 2015). The overall content of compounds extracted from *Q. laurina* in this study was higher than the content obtained from the sapwood (4.91 %) and heartwood (5.02 %) of the same oak species, at the State of Puebla, by Honorato and Hernández (1998). The variation of extract percentage in timber-yielding species does not only depend on the solvents that are used, but also on the species itself. Additionally, environmental and genetic factors, the age of the tree, weather conditions, available nutrients, and the time when the cut is made can influence the result (Hillis, 1971).

Inhibition of lipid oxidation

Inhibiting the extracts against the peroxidation of the linoleic acid caused by FeCl_2 did not modify the antioxidant activity of any of the tissues of the three oaks, regardless of the solvent used to extract them (Table 2). The methanolic extract taken from the sapwood of *Q. rugosa* had the highest percentage of antioxidant activity (94.09 %). In contrast, the methanolic extract taken from the sapwood of *Q. laurina* had the lowest percentage (42.54 %). The inhibition against the peroxidation of the linoleic acid from the methanolic extract taken from the sapwood of *Q. rugosa* had a similar activity to gallic acid (95 %), when the same technique was applied (Sánchez-Aldama *et al.*, 2013). The antioxidant activity of the aqueous extracts taken from the sapwood and bark of the three oaks studied in our research is greater than the 65 % (average) obtained from ethanol-aqueous extracts of plants located in semiarid regions of Mexico (*Flourensia cernua*, *Eucalyptus camaldulensis*, and *Turnera diffusa*), when the same methodology is used (Wong-Paz *et al.*, 2015a). The inhibition values of the methanolic extracts taken from the bark of *Q. laurina* and from the sapwood of *Q. rugosa* are higher than the 76.86 % of the ethanolic extract taken from *Laurus nobilis* (Muñiz-Márquez *et al.*, 2014). The number of phenolic compounds in the extracts correlates with their antioxidant activity (Wong-Paz *et al.*, 2015b) which confirms that the variation

Cuadro 1. Rendimiento de extractos en albura, duramen y corteza de las especies de encino (%).
Table 1. Output of sapwood, heartwood, and bark extracts from oak species (%).

Extractos	<i>Q. candicans</i>			<i>Q. laurina</i>			<i>Q. rugosa</i>		
	Al	Du	Co	Al	Du	Co	Al	Du	Co
Ciclohexano	0.29±0.12	0.42±0.04	0.26±0.15	0.53±0.24	0.56±0.13	0.60±0.02	0.17±0.02	0.53±0.01	2.02±0.18
Acetona	4.81±1.49	1.68±0.07	3.87±1.17	3.17±0.57	4.08±0.51	3.52±0.30	3.81±0.25	7.65±1.61	4.93±0.19
Metanol	2.24±0.04	4.56±1.28	6.16±0.03	4.49±2.15	2.77±0.75	5.86±0.69	2.62±0.07	5.47±0.31	6.45±0.69
Agua caliente	1.44±0.08	2.92±0.12	2.89±0.26	1.39±0.25	2.15±0.34	2.81±0.27	2.88±0.79	4.62±0.35	5.99±0.29
Extractos totales	8.72±1.64	9.58±1.42	13.18±0.71	8.26±1.12	9.57±0.71	12.80±0.14	9.47±0.44	18.27±1.55	19.39±0.39

Albura (Al), duramen (Du), corteza (Co). ♦ sapwood (Al), heartwood (Du), bark (Co).

Cuadro 2. Inhibición de la oxidación lipídica (%) de extractos metanólicos y acuosos de albura, duramen y corteza de las especies de encino.
Table 2. Inhibition of the lipid oxidation (%) of the methanolic and aqueous extracts taken from sapwood, heartwood, and bark of the oak species.

Inhibición de la oxidación lipídica	<i>Q. candicans</i>			<i>Q. laurina</i>			<i>Q. rugosa</i>		
	Al	Du	Co	Al	Du	Co	Al	Du	Co
Metanol	68.36±5.75	50.69±15.52	48.01±8.03	42.54±10.5	72.33±3.38	89.92±4.72	94.09±1.50	74.76±15.89	68.91±4.05
Agua caliente	53.96±2.38	68.30±8.28	82.01±24.58	60.39±26.7	87.67±17.71	67.05±23.34	73.05±32.2	68.30±28.80	87.17±9.95

Albura (Al), duramen (Du), corteza (Co). ♦ sapwood (Al), heartwood (Du), bark (Co).

antioxidante (Wong-Paz *et al.*, 2015b); esto confirma que la variación de actividad antioxidante depende de la polaridad de los solventes utilizados y de los compuestos fenólicos en los extractos de cada planta.

Análisis HPLC

Los compuestos identificados por el análisis cualitativo mediante HPLC en los extractos metanólicos y acuosos se presentan en el Cuadro 3. El compuesto más frecuente en las zonas albura, duramen y corteza de los tres encinos fue el ácido clorogénico; este compuesto es un potente antioxidante (Kamiyama *et al.*, 2015) y, además, este ácido es el componente principal de extractos metanólicos y etanólicos de plantas usados en la medicina tradicional china (Wu, 2007). Los extractos metanólicos del duramen de *Q. laurina* y *Q. rugosa* son los más ricos en compuestos fenólicos con seis compuestos cada uno; el resorcinol fue frecuente en los extractos metanólicos del duramen de las tres especies de encinos (Cuadro 3), y se usa como intermedio químico para la síntesis de productos farmacéuticos (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011). En la madera de *Q. rugosa* se identificó ácido gálico, un compuesto

of antioxidant activity depends on the polarity of the solvents used and on the phenolic compounds that contain the extracts from each plant.

HPLC analysis

The compounds identified by the qualitative HPLC analysis of the methanolic and aqueous extracts are shown in Table 3. The compound most frequently found in the sapwood, heartwood, and bark of the three oaks was chlorogenic acid which is a powerful antioxidant compound (Kamiyama *et al.*, 2015). Additionally, it is the main component of the methanolic and ethanolic extracts found in the plants used in traditional Chinese medicine (Wu, 2007). Methanolic extracts taken from the sapwood of *Q. laurina* and *Q. rugosa* have the highest content of phenolic compounds (six compounds each); resorcinol was frequently found in the methanolic extracts taken from heartwood of the three oak species (Table 3), and it is used as a chemical intermediate for the synthesis of pharmaceutical products (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011). Gallic acid—a chemical compound with powerful antioxidant, antiviral, antibacterial,

Cuadro 3. Compuestos fenólicos detectados por HPLC en extractos metanólicos y acuosos de albura, duramen y corteza de las especies de encino.

Table 3. Phenolic compounds detected by means of HPLC in methanolic and aqueous extracts taken from the sapwood, heartwood, and bark of the oak species.

EST	TR	<i>Q. candicans</i>						<i>Q. laurina</i>						<i>Q. rugosa</i>					
		Al		Du		Co		Al		Du		Co		Al		Du		Co	
		M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A	M	A
PG	6.5	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
ACG	4.40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—
RES	9.57	—	—	+	—	+	—	—	—	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—
ACL	11.11	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+
ACU	15.14	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
CAT	15.77	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—
ACH	17.75	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—
MEG	12.92	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	—	—	—
QUE	20.06	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
ACI	21.04	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—

Estándar (EST), tiempo de retención (TR), metanol (M), agua (A), albura (Al), duramen (Du), corteza (Co), pirogalol (PG), ácido gálico (ACG), resorcinol (RES), ácido clorogénico (ACL), ácido coumárico (ACU), catequina (CAT), ácido hidroxicinámico (ACH), metilgalato (MEG), quercetina (QUE), ácido cinámico (ACI), presencia (+) y ausencia (—). ♦ Standard (EST), retention period (TR), methanol (M), water (A), sapwood (Al), heartwood (Du), bark (Co), pyrogallol (PG), gallic acid (ACG), resorcinol (RES), chlorogenic acid (ACL), coumaric acid (ACU), catechin (CAT), hydrocinnamic acid (ACH), methyl gallate (MEG), quercetin (QUE), cinnamic acid (ACI), presence (+), and absence (—).

químico con potentes propiedades antioxidantes, antivirales, antibacterianas y anticancerígenas (Lekha y Lonsane, 1997; Shahrzard *et al.*, 2001; Ruiz-Martínez *et al.*, 2011). La catequina contribuye a propiedades antimicrobianas y antioxidantes importantes para prevenir patologías como la diabetes (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011; Alam *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015). Este compuesto se detectó en el extracto metanólico de la corteza de *Q. candicans*, y también en duramen y corteza de *Q. laurina*. Estudios en otras especies de encino han identificado en el extracto de acetona-acuosa (70 %) de la corteza de *Quercus sideroxyla* ácido gálico y catequina (Rosales-Castro *et al.*, 2012) y en infusiones con agua de hojas de *Q. resinosa*, ácido cumárico, ácido gálico, catequina y ácido clorogénico (Rocha-Guzmán *et al.*, 2009); en ambos casos, detectados mediante análisis HPLC.

En duramen y corteza de *Q. laurina* se identificó metilgalato, que tiene fuerte actividad antimicrobiana y antioxidante (Choi *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2009). La quercetina, un poderoso antioxidante, antihistamina, antiinflamatorio, y antidiabetes (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011; Alam *et al.*, 2014), se encontró en extracto metanólico del duramen de *Q. rugosa*. En otro estudio también se encontró metilgalato y quercetina en extracto metanólico del tallo de *Q. salicina* mediante análisis IR (Kim *et al.*, 2008). En los extractos metanólicos de la corteza de *Q. candicans* y en el duramen de *Q. rugosa* se reconoció ácido cinámico y este fenol es un potente antimicrobiano, inhibe ciertas especies fúngicas y es responsable de la actividad antituberculosa (Guzmán, 2014). Con base en la discusión hay certeza de que los extractos de madera y corteza de los tres encinos son ricos en compuestos fenólicos con potente actividad antioxidante y pudieran prevenir e inhibir ciertas patologías del ser humano. Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar las mejores condiciones de uso.

CONCLUSIONES

El rendimiento mayor de los extractos se encontró en las cortezas y su solubilidad fue más elevada en metanol. Los extractos metanólicos y acuosos de las tres especies de encino inhibieron la peroxidación de ácido linoleico, que se correlaciona con la actividad antioxidante que pudo ser ocasionada principalmente por los compuestos fenólicos detectados: ácido clorogénico, resorcinol, catequina y ácido gálico. Los

and anticarcinogenic properties— was identified in the wood of *Q. rugosa* (Lekha and Lonsane, 1997; Shahrzard *et al.*, 2001; Ruiz-Martínez *et al.*, 2011). Catechin contributes to the antimicrobial and antioxidant properties which are important to prevent such pathologies as diabetes (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011; Alam *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2015). This compound was detected in the methanolic extract taken from the bark of *Q. candicans*, as well as from the sapwood and bark of *Q. laurina*. Studies about other oak species have identified gallic acid and catechin in the acetone-aqueous extract (70 %) taken from the bark of *Quercus sideroxyla* (Rosales-Castro *et al.*, 2012), while coumaric acid, gallic acid, catechin, and chlorogenic acid have been identified in infusions made from the leaves of *Q. resinosa* (Rocha-Guzmán *et al.*, 2009). In both cases, they were detected through a HPLC analysis.

Methyl gallate was identified in the sapwood and bark of *Q. laurina* and this compound has a strong antimicrobial and antioxidant activity (Choi *et al.*, 2009; Cheng *et al.*, 2009). Quercetin is a powerful antioxidant, antihistamine, anti-inflammatory, and antidiabetic agent (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011; Alam *et al.*, 2014). This phenol was found in the methanolic extract taken from the heartwood of *Q. rugosa*. Using an IR analysis, Kim *et al.* (2008) found methyl gallate and quercetin in the methanolic extract taken from the trunk of this species. Cinnamic acid was identified in the methanolic extracts taken from the bark of *Q. candicans* and from the heartwood of *Q. rugosa*; this phenol is a powerful antimicrobial agent, it inhibits certain fungi species and is responsible for antitubercular activity (Guzmán, 2014). Based on this discussion, wood and bark extracts from the three oaks are certainly rich in phenolic compounds with a powerful antioxidant activity; besides, they might prevent and inhibit certain human pathologies. Nevertheless, further studies are necessary to determine conditions for a better use.

CONCLUSIONS

The highest output of the extracts was found in the bark and they were more soluble in methanol. Methanolic and aqueous extracts taken from the three oak species inhibited the peroxidation of linoleic acid, which correlates with the antioxidant activity that could have been mainly caused by the phenolic

extractos metanólicos de madera y corteza de los tres encinos son ricos en compuestos fenólicos con potente actividad antioxidante.

AGRADECIMIENTOS

M. G. Argueta-Solís y L. F. Pintor-Ibarra agradecen al Departamento de Investigación en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, por la oportunidad de realizar parte de su tesis de licenciatura. Los autores agradecen al CONACYT el apoyo al proyecto CB-166444, a la Comunidad Indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, del estado de Michoacán, México por la donación del material de estudio, y al M. C. Miguel Ángel Silva por la identificación de los encinos.

LITERATURA CITADA

- Alam, M. M., D. Meerza, and I. Naseem. 2014. Protective effect of quercetin on hyperglycemia, oxidative stress and DNA damage in alloxan induced type 2 diabetic mice. *Life Sci.* 109: 8-14.
- Butera, D., L. Tesoriere, F. Di Gaudio, A. Bongiorno, M. Allegra, A. M. Pintauro, R. Kohen, and M. A. Livrea. 2002. Antioxidant activities of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanina e indicaxantina. *J. Agric. Food Chem.* 50: 6895-6901.
- Cai, W., X. Gu, and J. Tang. 2010. Extraction, purification, and characterization of the flavonoids from *Opuntia milpa alta* Skin. *Czech J. Food Sci.* 28: 108-116.
- Chemah, T. C., A. Aminah, A. Noriham, and W. M. Wan Aida. 2010. Determination of pitaya seeds as a natural antioxidant and source of essential fatty acids. *Int. Food Res. J.* 17: 1003-1009.
- Cheng, K. W., R. Y. Yang, S. C. S. Tsou, C. S. C. Lo, C. T. Ho, T. C. Lee, and M. Wang. 2009. Analysis of antioxidant activity and antioxidant constituents of Chinese toon. *J. Funct. Foods* 1: 253-259.
- Choi, J. G., O. H. Kang, Y. S. Lee, Y. C. Oh, H. S. Chae, H. J. Jang, D. W. Shin, and D. Y. Kwon. 2009. Antibacterial activity of methyl gallate isolated from *Galla Rhois* or carvacrol combined with nalidixic acid against nalidixic acid resistant bacteria. *Molecules* 14: 1773-1780.
- Fengel, D., and G. Wegener. 1984. *Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Walter de Gruyter. Berlin, Germany. 613 p.
- Guzmán, J. D. 2014. Natural cinnamic acids, synthetic derivatives and hybrids with antimicrobial activity. *Molecules* 19: 19292-19349.
- Hillis, W. E. 1971. Distribution properties and formation of some wood extractives. *Wood Sci. Technol.* 5: 272-289.
- Honorato S., J. A., y J. Hernández P. 1998. Determinación de componentes químicos de la madera de cinco especies de encino del estado de Puebla. *Madera y Bosques* 4: 79-93.
- Huang, D., B. Ou, and R. Prior. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1841-1856.
- compounds that were detected: chlorogenic acid, resorcinol, catechin, and gallic acid. The methanolic extracts taken from the wood and bark of the three oaks have a high content of phenolic compounds with a powerful antioxidant activity.
- End of the English version—
- ✻
- Huang, D., Y. Jiang, W. Chen, F. Yao, G. Huang, and L. Sun. 2015. Evaluation of hypoglycemic effects of polyphenols and extracts from *Penthorum chinense*. *J. Ethnopharmacol.* 163: 256-263.
- Kalia, K., K. Sharma, H. P. Singh, and B. Singh. 2008. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 56: 10129-10134.
- Kamiyama, M., J. K. Moo, H. W. Jang, and T. Shibamoto. 2015. Role of degradation products of chlorogenic acid in the antioxidant activity of roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* 63: 1996-2005.
- Khalaf, N. A., A. K. Shaky, A. Al-Othman, Z. El-Agbar, and H. Farah. 2008. Antioxidant activity of some common plants. *Turk J. Biol.* 32: 51-55.
- Kim, J. I., H. H. Kim, S. Kin, K. Y. Lee, I. H. Ham, and W. K. Whang. 2008. Antioxidative compounds from *Quercus salicina* Blume Stem. *Arch. Pharmacol. Res.* 31: 274-278.
- Lekha, P. K., and B. K. Lonsane. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Adv. Appl. Microbiol.* 44: 215-260.
- Martínez, M. 1951. Los encinos de México. *An. Inst. Biol. Mex.* XXII. 2. *In: Serie Técnica* No. 8. 1981. Comisión Forestal. Michoacán, México. 358 p.
- Mejía-Díaz, L.A., and J. G. Rutiaga-Quiñones. 2008. Chemical composition of *Schinus molle* L. wood and kraft pulping process. *Rev. Mex. Ing. Quím.* 7: 145-149.
- Muñiz-Márquez, D. B., R. Rodríguez, N. Balagurusamy, M. L. Carrillo, R. Belmares, J. C. Contreras, G. V. Nevárez, and C. N. Aguilar. 2014. Phenolic content and antioxidant capacity of extracts of *Laurus nobilis* L., *Coriandrum sativum* L. and *Amaranthus hybridus* L. *CyTA-J. Food* 12: 271-276.
- Nuengchamnong, N., A. Hermans-Lokkerbol, and K. Ingkaninan. 2004. Separation and detection of the antioxidant flavonoids, rutin and quercetin, using HPLC coupled on-line with colorimetric detection of antioxidant activity. *Naresuan University J.* 12: 25-37.
- Rocha-Guzmán, N. E., J. A. Gallegos-Infante, R. F. González-Laredo, R. Reynoso-Camacho, M. Ramos-Gómez, T. García-Gasca, M. E. Rodríguez-Muñoz, S. H. Guzmán-Maldonado, L. Medina-Torres, and B. A. Lujan-García. 2009. Antioxidant activity and genotoxic effect on HeLa cells of phenolic compounds from infusions of *Quercus resinosa* leaves. *Food Chem.* 115: 1320-1325.
- Rosales-Castro, M., R. F. González-Laredo, N. E. Rocha-Guzmán, J. A. Gallegos-Infante, J. Peralta-Cruz, y J. J. Karchesy. 2009.

- Evaluación química y capacidad antioxidante de extractos polifenólicos de cortezas de *Pinus cooperi*, *P. engelmannii*, *P. leiophylla* y *P. teocote*. *Madera y Bosques* 15: 87-105.
- Rosales-Castro, M., R. F. González-Laredo, N. E. Rocha-Guzmán, J. A. Gallegos-Infante, M. J. Rivas-Arreola, and J. J. Karchesy. 2012. Antioxidant activity of fractions from *Quercus sideroxyla* bark and identification of proanthocyanidins by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Holzforschung* 66: 577-584.
- Ruiz-Martínez, J., J. A. Ascacio, R. Rodríguez, D. Morales, and C. N. Aguilar. 2011. Phytochemical screening of extracts from some Mexican plants used in traditional medicine. *J. Medicinal Plants Res.* 5: 2791-2797.
- Ruiz-Aquino, F., M. M. González-Peña, J. I. Valdez-Hernández, U. S. Revilla, and A. Romero-Manzanares. 2015. Chemical characterization and fuel properties of wood and bark of two oaks from Oaxaca, Mexico. *Industrial Crops and Products* 65: 90-95.
- Rutiaga Q., J. G., E. Windeisen, and C. Strobil. 2000. Composición química del duramen de la madera de *Quercus candicans* Neé. *Madera y Bosques* 6: 73-80.
- Sánchez-Aldama, D., C. N. Aguilar, G. V. Nevarez-Moorillon, and J. C. Contreras Esquivel. 2013. Comparative extraction of pectic and polyphenols from mexican lime pomace and a bagasse. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 8: 309-322.
- Salazar, R., M. E. Pozos, P. Cordero, J. Perez, M. C. Salinas, and N. Waksman. 2008. Determination of the antioxidant activity of plants from northeast Mexico. *Pharm. Biol.* 46: 166-170.
- Shahrzard, S., K. Aoyagi, A. Winter, A. Koyama, and I. Bitsch. 2001. Pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J. Nutr.* 131: 1207-1210.
- TAPPI. 2000. Test Methods. TAPPI Press. Atlanta. T 264 cm-97, Preparation of wood for chemical analysis. 3 p.
- Wong-Paz, J. E., J. C. Contreras-Esquivel, R. Rodríguez-Herrera, M. L. Carrillo-Inungaray, L. I. López, G. V. Nevárez-Moorillón, and C. N. Aguilar. 2015a. Total phenolic content, *in vitro* antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. *Asian Pacific J. Trop. Medic.* 8: 104-111.
- Wong-Paz, J. E., D. B. Muñoz-Márquez, G. C. G. Martínez-Ávila, R. E. Belmares-Cerda, and C. N. Aguilar. 2015b. Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from native plants in the Mexican desert. *Ultrasonics Sonochem.* 22: 474-481.
- Wu, L. 2007. Effect of chorogenic acid antioxidant activity of Flos Lonicerae extracts. *J. Zhejiang University Sci. B* 8: 673-679.