

## Influencia del medio de extracción en la composición de sustancias volátiles de las hojas de *Zanthoxylum pistacifolium* Griseb

*Influence of Extraction Composition of volatile substances from the leaves of Zanthoxylum pistacifolium Griseb*

MSc. Yamilé Heredia-Díaz<sup>I</sup>, Lic. Rosalia González-Fernández<sup>II</sup>, Dr. Julio C. Escalona-Arranz<sup>I</sup>; Lic. Jesús García-Díaz<sup>I</sup>, Lic. Jorge de la Vega-Acosta<sup>I</sup>

yheredia@cnt.uo.edu.cu

<sup>I</sup>Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba; <sup>II</sup>Centro de Toxicología y Biomedicina (TOXIMED), Universidad de Ciencias Médicas, Santiago de Cuba

Recibido: 10 de febrero 2015

Aprobado: 28 de mayo 2015

### Resumen

El *Zanthoxylum pistacifolium* Griseb, es una planta endémica de Cuba, que crece en los montes y montañas cercanas a la costa sur-oriental. En la bibliografía consultada no se hallaron reportes ni de su composición química ni de su uso etnobotánico y/o farmacológico. Por ello en este trabajo se desarrolló la extracción e identificación de los compuestos volátiles de las hojas (colectadas en la localidad del Palenque, playa Siboney, Santiago de Cuba), empleando el método de extracción por hidrodestilación-cohobación en tres medios diferentes: neutro, ácido y básico. La identificación de los componentes químicos se realizó empleando la Cromatografía Gaseosa acoplada a la Espectrometría de Masas. Los medios ácido y básico, a pesar de aumentar el rendimiento extractivo, condujeron a la modificación estructural de los compuestos volátiles, por lo que la extracción en medio neutro resultó la más útil. Un total de 82 compuestos fueron identificados en el medio neutro (97,76 % del total extraído) con predominio de derivados terpenoides, resultando como compuestos mayoritarios el  $\alpha$ -Pino (12,35 %), Linalol (6,68 %), 2,6-dimetil-2,4,6-Octatrieno (6,50 %), Limoneno (6,19 %) y Fitol (6,06 %).

**Palabras clave:** *Zanthoxylum pistacifolium* Griseb, extracción, compuestos volátiles.

### Abstract

*Zanthoxylum pistacifolium* Griseb is an endemic plant that grows in the forests and hills of the south-Eastern cost of Cuba. In the reviewed bibliography none report regarding to the chemical composition, ethnobotanic and/or pharmacological information was find out. That is why the intention of this experimental work was to extract and to identify the volatile components of leaves collected in the locality of "el Palenque", Siboney beach, Santiago de Cuba. The hydrodistillation-cohobation extraction method in three different mediums: neutral, acid and basic was used, while Gas Chromatography coupled to a Mass Spectrometry was considered for the chemical separation and characterization of the volatile compounds extracted. The acid and basic mediums increases the extraction yield but attempts against the structural integrity of the volatile compounds, that is why the conventional method was selected as the most effective. In neutral medium, 82 compounds (97,76 % of the total extracted) were identified, most of them belonging to terpene type. The main compounds isolated were  $\alpha$ -Pinene (12,35 %), Linalool (6,68 %), (4E,6Z)-2,6-dimethyl-2,4,6-Octatriene (6,50 %), Limonene (6,19 %) and Phytol (6,06 %).

**Keywords:** *Zanthoxylum pistacifolium* Griseb, extraction, volatile compounds.

## Introducción

La familia *Rutaceae* es muy rica en la producción de aceites esenciales y medicinales, que se extraen de los diferentes géneros y especies que la conforman /1/. Uno de los géneros que posee mayor riqueza en aceites esenciales es el *Zanthoxylum*, acumulándose principalmente en las hojas, flores, semillas y frutos.

Existen reportes de estudios de los aceites esenciales de hojas del *Z. acanthopodium*, donde los constituyentes más abundantes fueron el sabineno, limoneno, 1.8-cineol y el germacreno D /2/. Se reportan como constituyentes mayoritarios de las hojas de *Z. rhetsa*, el óxido de cariofileno, cariofileno,  $\beta$ -copaeno y el espatuneol /3/. En el aceite esencial de las hojas de *Z. rhoifolium* los componentes más abundantes fueron: el germacreno D, limoneno, trans-2-hexenal,  $\beta$  elemeno, 2-undecanone, mirceno, biciclogermacreno y germacreno A /4/.

En los frutos, se han realizado estudios con especies de este género (*Z. monophyllum*, *Z. rhoifolium*, *Z. fagara*, *Z. xanthoxyloides* y *Z. leprieurii*), para determinar la composición química de aceites esenciales aislados por destilación a vapor. A través de la Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (CG/MS) se pudieron identificar los componentes principales del aceite de *Z. monophyllum* (Sabineno, 1.8-Cineol, y cis-4-Thujanol), *Z. rhoifolium* ( $\beta$ -Mirceno,  $\beta$ -Felandreno, y D-Germacreno); *Z. fagara* (D-Germacren-4-ol, Elemol y  $\alpha$ -Cadinol) /5/; *Z. xanthoxyloides* (citronelol, geraniol, citronelol acetato, limoneno y citronelal; y de *Z. leprieurii* (E)- $\beta$ -ocimeno, mirceno, limoneno y  $\beta$  pineno) /6/.

Estudios de la composición de aceites esenciales, en especies costarricenses del género *Zanthoxylum* (*Z. fagara*, *Z. acuminatum*, *Z. melanostictum*, *Z. monophyllum*), revelaron la presencia de un gran número de terpenos, principalmente monoterpenoides, tales como Linalol, 4-Terpineol,  $\alpha$ -Terpineol, y trans-2-Hexenol /7/.

El aceite esencial obtenido a partir de semillas del *Z. bungeanum*, el extracto etanólico de frutas del *Z. alatum* y los extractos hexánico, etéreo, metanólico y de acetato de etilo obtenidos a partir de frutos del *Z. piperitum*, demostraron tener propiedades antioxidantes /8/.

El género *Zanthoxylum* en Cuba está representado por 25 especies, de ellas 15 endémicas. En la costa sur de la región oriental de Cuba abunda la especie *Zanthoxylum pistacifolium* Griseb, y de acuerdo con la literatura consultada, no existen reportes de estudios de los constituyentes volátiles de las hojas de esta especie. Atendiendo a esta

abundancia de reportes referentes a los aceites esenciales del género *Zanthoxylum sp.* y la ausencia de información respecto a la especie *Zanthoxylum pistacifolium* Griseb, en el presente trabajo nos proponemos, como objetivo, la extracción e identificación de compuestos volátiles de las hojas de la especie *Zanthoxylum pistacifolium* Griseb.

## **Materiales y métodos**

### *Material vegetal*

Las hojas de la especie vegetal *Zanthoxylum pistacifolium* Griseb, se recolectaron, en horas de la mañana, en el Palenque (poblado de Siboney), en Santiago de Cuba. La identificación taxonómica se llevó a cabo por especialistas del Centro Oriental de Ecosistemas y Biodiversidad (BIOECO), en el Museo Tomás Romay de Santiago de Cuba. Un ejemplar de la planta fue depositado en BIOECO con el número de ficha 21660.

El material colectado fue pesado en una balanza técnica marca **Nagema** de procedencia alemana y se empleó en su forma fresca para la extracción directa de sus compuestos volátiles.

### *Extracción de los compuestos volátiles de las hojas*

La extracción de los compuestos volátiles se realizó por el método de hidrodestilación-cohobación auxiliado de un aparato tipo Clevenger /9/. Para ello se emplearon 200 g de droga fresca en 1 600 mL de agua, ácido sulfúrico [ $\text{H}_2\text{SO}_4$  (4 %)] y carbonato de [ $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (10%)].

### *Determinación de la composición química de las sustancias volátiles por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM)*

El análisis cualitativo y cuantitativo del aceite esencial obtenido de las hojas se realizó por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas empleando un equipo SHIMADZU GC/MS-QP500 de procedencia japonesa, constituido por un cromatógrafo de gases mega 2 series acoplado a un espectrómetro de masas cuadrupolar de impacto electrónico positivo (modo de ionización) y una columna capilar DB-5 MS, de 30 m · 0,32 mm y un diámetro interno = 1µm, bajo las siguientes condiciones: gas portador, He; velocidad de flujo, 1 mL/min.; temperatura de inyección, 270 °C (razón de separación 100:1); temperatura de detección 250 °C.

El programa de temperatura fue 30 °C (3 min), 40 °C/min hasta 250 °C (10 min). La adquisición de los datos fue realizada en el intervalo de masas entre 10 y 500 u.m.a. /10, 11/. Todos los espectros de masas fueron adquiridos en el modo de impacto electrónico

con un voltaje de ionización de 70 eV. Las muestras de aceite fueron diluidas en n-hexano y el volumen de inyección fue de 1 µl.

La identificación de los compuestos se realizó comparando los espectros de masas y los índices de retención, obtenidos con los existentes en la base de datos “*National Institute of Standards*” (NIST). Algunos espectros de masa se compararon con la bibliografía especializada del tema /12/.

Para determinar los índices de retención de Kovats, las muestras se analizaron conjuntamente con patrones de alcanos lineales en el intervalo desde C-6 hasta C-32, con incremento de dos átomos de carbono. La ecuación empleada fue la siguiente:

$$I_x = 100n + 100k \frac{[(t_x) - (t_n)]}{[(t_N) - (t_n)]} \quad (1)$$

donde:

**I<sub>x</sub>**= es el índice de retención de la sustancia en estudio

**n**= es el número de átomos de carbono del alcano lineal que antecede en el cromatograma a la sustancia en estudio

**k** = es el número de átomos de carbono que existen entre un patrón de alcano y otro (en este estudio el valor de k es siempre 2)

**t<sub>x</sub>**= es el tiempo de retención obtenido para la sustancia en estudio

**t<sub>n</sub>**= es el tiempo de retención del alcano lineal que antecede en el cromatograma a la sustancia en estudio

**t<sub>N</sub>**= es el tiempo de retención del alcano lineal que precede en el cromatograma a la sustancia en estudio.

## Resultados y discusión

### *Extracción de los compuestos volátiles de las hojas*

Muchas especies de la familia *Rutaceae* contienen glándulas que secretan sustancias volátiles en diferentes órganos de las plantas tales como los frutos, hojas, corteza, raíces, semillas, rizomas y tallos. El género *Zanthoxylum* acumula aceites volátiles en hojas, flores y fruto /13/.

Los compuestos volátiles de las hojas de *Zanthoxylum pistacifolium* Griseb fueron obtenidos empleando el método de extracción hidrodestilación-cohobación auxiliado de un aparato tipo Clevenger en medio neutro. El aceite presentó un aspecto transparente, de color verde limón y un olor penetrante característico al de las hojas de la especie. La

extracción en medio neutro permitió obtener un rendimiento de 0,05 % (v/m), resultando superior al reportado para otras especies del género, donde los rendimientos para las hojas son incluso inferiores, por ejemplo 0,019 % (v/m) y 0,017 % (v/m) para *Zanthoxylum acanthopodium* en verano e invierno respectivamente /2/.

Con el propósito de obtener rendimientos superiores, se realizó la extracción de compuestos volátiles variando el pH del medio. Esta experiencia había sido desarrollada con anterioridad para la extracción de los compuestos volátiles de semillas de *Zanthoxylum rhetsa* por Reddy y Beena en el 2011, logrando diferencias en sus resultados en relación con el rendimiento y la actividad farmacológica medida /9/.

En este experimento se comprobó, que en el medio básico el rendimiento resultó similar al obtenido en medio neutro, o sea 0,05 % (v/m), mientras que para la extracción en medio ácido este triplicó rendimiento hasta un valor de 0,15 % (v/m). Las hojas del *Zanthoxylum pistacifolium* Griseb resultan marcadamente xeromórficas, debido a la zona de estrés hídrico donde fue colectada, por lo que sus estructuras almacenadoras y secretoras de aceites esenciales se podrían encontrar protegidas por la gruesa epidermis. De hecho, una cutícula prominente rodeaba ambas superficies de las hojas colectadas. Es por ello que resulta probable que el medio ácido influyera en la ruptura de estas capas protectoras, haciendo más viable el acceso del agua al interior de las estructuras almacenadoras y/o secretoras, facilitando así la salida de los compuestos volátiles de la especie.

#### ***Determinación de la composición química de los compuestos volátiles por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM)***

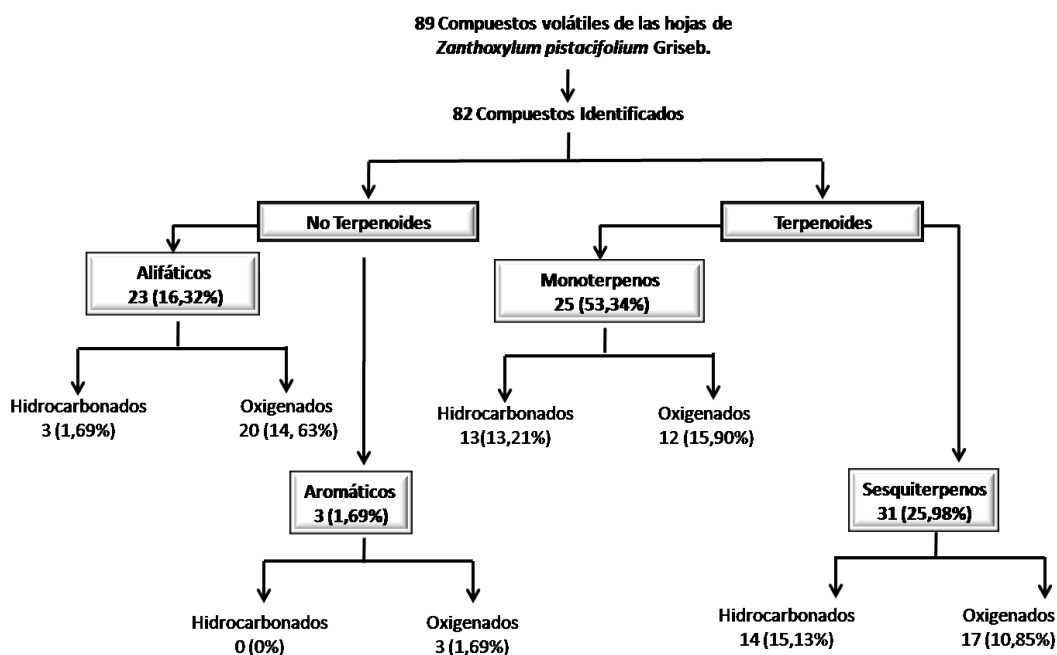
Cada uno de los tres destilados (medio neutro, ácido y básico) fue sometido a un análisis de la composición química de sus compuestos volátiles. Para el medio neutro se logró extraer y separar un total de 89 compuestos, 82 de los cuales lograron ser identificados, para un 97,76 %. Los compuestos volátiles extraídos en medio neutro con sus índices de retención y masas moleculares se muestran en la tabla 1.

**TABLA 1. COMPUESTOS VOLÁTILES EXTRAÍDOS DE LAS HOJAS DE *Z. pistacifolium* EN MEDIO NEUTRO**

Nº	Compuesto	IR	A (%)	Nº	Compuesto	IR	A (%)
1	(3E)-Hexenol	842	0,21	46	$\gamma$ -Gurjuneno	1475	0,39
2	(3Z)-Hexenol	852	0,12	47	D-Germacreno	1479	0,48
3	n-Hexanol	855	0,10	48	$\beta$ -Selineno	1489	1,27
4	$\alpha$ -Pino	925	12,34	49	$\alpha$ -Selineno	1496	1,21
5	$\alpha$ -Fencheno	949	0,76	50	(E,E)- $\alpha$ -Farneseno	1505	1,11
6	Benzaldehído	961	0,95	51	$\gamma$ -Cadineno	1510	0,08
7	Sabineno	970	0,21	52	$\delta$ -Cadineno	1517	0,54
8	$\beta$ -Pino	978	1,28	53	(E)- $\alpha$ -Bisaboleno	1538	0,13
9	Mirceno	993	3,08	54	$\alpha$ -Elemol	1546	0,09
10	$\alpha$ -Felandreno	1005	0,11	55	Nerolidol (E)	1559	0,13
11	$\alpha$ -Terpineno	1015	0,26	56	Benzoate (3Z)-hexenyl	1570	0,64
12	Limoneno	1034	6,19	57	¿No identificado?	1571	0,12
13	Eucalyptol	1036	0,45	58	Óxido de Cariofileno	1578	0,34
14	(Z)- $\beta$ -Ocimeno	1040	2,36	59	¿No identificado?	1585	0,20
15	(E)- $\beta$ -Ocimeno	1049	2,80	60	Viridiflorol	1593	0,50
16	$\gamma$ -Terpineno	1058	0,60	61	Guaiol	1603	0,18
17	Óxido de cis-Linalol	1070	0,22	62	Humuleno epóxido II	1605	0,30
18	Terpinoleno	1083	0,95	63	Copaborneol	1616	1,05
19	Linalol	1108	6,68	64	Epicubanol	1630	3,87
20	2(E),6(Z)- dimetil-2,4,6-Octatrieno	1133	6,50	65	$\gamma$ -Eudesmol	1633	0,12
21	¿No identificado?	1140	0,23	66	1,2,3,4,4a,7,8,8a-octahidro-, 4-isopropil-, 1,6-dimetil-Naftol	1641	0,71
22	2-metil-Propanoato de (3Z)-hexenilo	1143	0,20	67	10-OH-4-Cadineno	1643	0,19
23	Alcanfor	1147	0,13	68	Acetato de (Z)-Nerolidilo	1661	1,81
24	Borneol	1171	0,26	69	Intermedeol	1664	0,93
25	4-Terpineol	1181	1,05	70	(9Z)-Tetradecenol	1676	0,25
26	3-Decanona	1187	0,58	71	$\alpha$ -Bisabolol	1685	0,09
27	Salicilato de Metilo	1189	0,10	72	¿No identificado?	1704	0,09
28	$\gamma$ -Terpineol	1201	4,29	73	(Z,Z)-Farnesol	1712	0,23
29	Nerol	1225	0,14	74	Biciclo [10.1.0] trideca-4,8-diene-13-oxa-trimetilo	1726	0,18
30	2-metil-Butanoato de (3Z)-hexenilo	1232	0,85	75	¿No identificado?	1765	0,12
31	2-metil-Butanoato de hexilo	1237	0,35	76	Ácido-Tetradecanóico	1769	0,17
32	3-metil-Butanoato de (2E) -hexenilo	1238	0,24	77	Fitona	1839	0,14
33	Geraniol	1252	0,26	78	14-metil -(8Z)-Hexadecenal	1860	0,30
34	Geranial	1268	0,10	79	Isofitol	1938	0,35
35	Tiglatol de (3Z)-hexenilo	1323	0,13	80	Ácido Hexadecanóico	1972	2,64
36	Acetato de Dihidrocarvylo	1330	0,25	81	13- Z-Octadecenal	2016	1,50
37	$\delta$ -Elemeno	1335	1,04	82	Fitol	2110	6,06
38	Eugenol	1355	2,07	83	Ácido Oleico	2135	0,60
39	$\alpha$ -Copaeno	1372	0,19	84	Ácido Octadecanóico	2157	0,22
40	¿No identificado?	1379	0,43	85	Heptacosano	2694	0,05
41	$\beta$ -Elemeno	1391	4,61	86	n-Pentacosanol	2766	0,05
42	(E)-Cariofileno	1419	2,62	87	¿No identificado?	2789	1,05
43	$\gamma$ -Elemeno	1426	0,30	88	Nonacosano	2894	0,78
44	$\alpha$ -Humuleno	1454	0,80	89	Hentriacontano	3081	0,86
45	4,11-Selindieno	1471	0,49				

Leyenda: IR→Índice de Retención; A→Área relativa; en **negrita**→mayoritarios

Del análisis de la naturaleza química de los componentes extraídos por este medio neutro se puede deducir que estos compuestos volátiles son tanto de naturaleza terpenoide como no terpenoide (figura 1), resultando mayoritarios el grupo de los sesquiterpenos. No existen antecedentes en el estudio de los compuestos volátiles de las hojas del *Z. pistacifolium*, por lo que todos los compuestos reportados en esta tabla constituyen un primer informe para la especie.



**Figura 1. Naturaleza química y abundancia de los compuestos volátiles aislados de las hojas en medio neutro**

Desde el punto de vista cuantitativo, el análisis mostró (tabla 2), que el  $\alpha$ -Pino, Linalol, 2,6-dimetil-2,4,6-Octatrieno, Limoneno y el Fitol fueron los constituyentes más abundantes en el medio acuoso neutro. La literatura reporta que el  $\alpha$ -Pino fue identificado como una de las sustancias mayoritarias para el aceite extraído de las semillas de *Z. rhetsa* en medio acuoso /9/. El Limoneno se ha reportado como compuesto mayoritario en la especie *Z. acanthopodium* /2/ y el Mirceno como mayoritario de hojas de *Z. rhoifolium* /5/.



**TABLA 2. COMPUESTOS VOLÁTILES MAYORITARIOS EXTRAÍDOS EN LOS MEDIOS NEUTRO, ÁCIDO Y BÁSICO**

Neutro		Ácido		Básico	
Compuestos	%	Compuestos	%	Compuestos	%
$\alpha$ -Pinoeno	12,34	1,4-Cineol	8,53	Epicubenol	10,43
Linalol	6,68	Terpinoleno	5,88	Hentriacontanol	8,52
2,6-dimetil Octatrieno	2,4,6-6,50	<i>p</i> -Cimeno	5,27	<i>E</i> -Cariofileno	7,06
Limoneno	6,19	$\alpha$ -Terpineol	3,66	13- óxido -epi-Manoilo	6,38
Fitol	6,06	$\gamma$ -Terpineno	3,51	Fitol	6,76

Adicionalmente al  $\alpha$ -Pinoeno y al Limoneno, otros compuestos volátiles del tipo monoterpénicos han sido identificados en otras especies del género, y ellos son: el Sabineno (*Z. monophyllum* /5/, *Z. acanthopodium* /2/, *Z. gillettii* /14/, *Z. alatum* /15/, *Z. armatum* /16/, *Zanthoxylum rhetsa* /17/);  $\beta$ -Pinoeno, y Linalol (*Z. acanthopodium* /2/, *Z. alatum* /15/, *Z. armatum* /16/);  $\gamma$ - Terpineno (*Z. acanthopodium* /2/ y *Z. gillettii* /14/);  $\alpha$ -Terpineno, (Z)- $\beta$ -Ocimeno, (E)- $\beta$ -Ocimeno, Terpinoleno y Nerol en las especies *Z. acanthopodium* /2/ y *Z. armatum* /16/. Esto hace que de 25 monoterpenos aislados de las hojas de *Z. pistacifolium* solamente 12 se hayan reportado con anterioridad para especies del género, resultando los 13 restantes novedosos, incluso para el género.

Terpenoides del tipo sesquiterpenos aislados para otras especies del género, son el  $\alpha$ -Copaeno, D-Germacreno,  $\beta$ -Selineno y  $\delta$ -Cadineno (*Z. alatum* /15/ y *Z. gillettii* /14/). El óxido de Cariofileno y el  $\alpha$ -Selineno se han reportado en el *Z. alatum* /15/, mientras que en *Z. acanthopodium* se han aislado el  $\beta$ -Elemeno, el (*E*)-Cariofileno, el  $\alpha$ -Humuleno, el  $\delta$ -Cadineno y el (*E*)-Nerolidol /2/. Por su parte, el  $\alpha$ -Elemol ha sido informado como compuesto mayoritario del *Z. fagara* /5/ y el Geraniol en el *Z. armatum* /16/. De este tipo de sustancias, se aislaron de las hojas en estudio, un total de 31 compuestos, y como antecedentes genéricos solo existen estos anteriormente informados, por lo que los restantes 19 sesquiterpenos no mencionados, también resultan de un primer informe incluso para el género.

Compuestos de naturaleza no terpenoide también han sido informados en esencias de diversos órganos de especies de *Zanthoxylum*. Ácidos orgánicos como el palmítico y el oleico forman parte de los compuestos volátiles determinados en *Z. armatum* /16/, mientras que el Nonacosano ha sido aislado del *Z. gillettii* /14/. En estas dos especies



también han sido aislados derivados aromáticos, pero ninguno coincide con los aislados en el presente trabajo.

En sentido general, el número de compuestos volátiles extraídos de las hojas del *Zanthoxylum pistacifolium* Griseb que nunca antes había sido reportado para especies del género es relativamente alto; no obstante la presencia de determinados marcadores, como las sustancias mayoritarias  $\alpha$ -Pino y Linalol, constituyen una evidencia adicional de que la planta estudiada se trata de una especie del género *Zanthoxylum*.

### Extracción en medio ácido

Cuando se empleó este medio se logró no solo triplicar el rendimiento del proceso extractivo, sino que también se incrementó el número de compuestos extraídos, llegando a la cifra de 100. De ellos, un total de 91 fueron correctamente identificados, representando un 96,39 % del total extraído (figura 2). Cuando se realizó el análisis de la influencia de este medio con respecto al valor de rendimiento obtenido, se planteó la probable influencia del ácido sobre la destrucción de las estructuras celulares y subcelulares. Esta misma condición pudiera ser ahora la responsable del hecho de que se obtenga un mayor número de compuestos químicos, pues los mismos, al igual que las estructuras celulares, podrían estar expuestos a la acción hidrolítica y químicamente agresiva de estos ácidos.

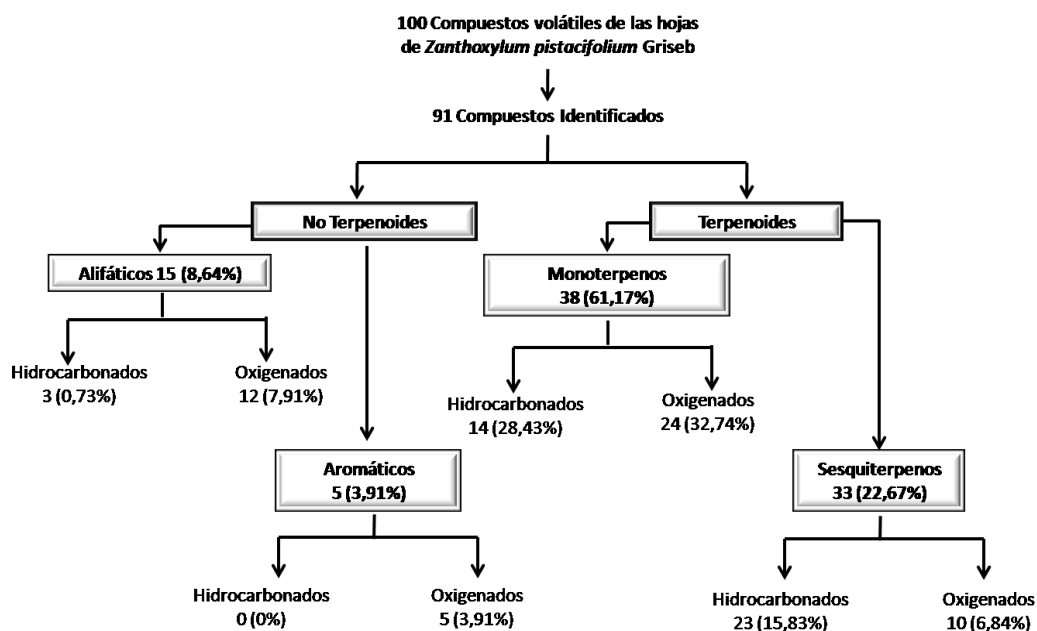


Figura 2. Naturaleza química y abundancia de los compuestos volátiles aislados de las hojas en el medio ácido.

Si se observa detenidamente la tabla 2 se comprobará, que ninguno de los componentes mayoritarios detectados en la extracción en medio neutro coincide con los identificados en el medio ácido. Esta evidencia, unido al hecho de que los niveles de concentración de esos compuestos mayoritarios son notablemente menores que los del método extractivo previo, pudieran explicar el posible efecto degradante que implica el empleo de ácidos como solventes extractivos.

La figura 2 muestra, además, la clasificación según la naturaleza química de los compuestos aislados en este medio. En ella se aprecia un incremento en número de compuestos, y el aporte al rendimiento relativo radica, esencialmente, en los compuestos monoterpénicos, precisamente las unidades estructurales más sencillas, las cuales pudieran ser el resultado de procesos degradativos y/o oxidativos. En su defecto, los compuestos hidrocarbonados no terpenoides son los que sufren una mayor disminución, tanto en número de compuestos, como en el por ciento relativo en el que se encuentran con respecto al resto de los componentes.

No obstante a lo anteriormente planteado, cincuenta compuestos resultan coincidentes entre ambos métodos, evidenciando que al menos uno de cada dos compuestos aislados por cualquiera de los medios resulta en común. Los compuestos en común son los representados en la tabla 3, así como el área relativa de esos compuestos en el medio ácido y la diferencia de áreas entre el medio ácido y neutro. Como se observa en esta tabla, los cinco compuestos mayoritarios del medio neutro son también aislados en el medio ácido, sin embargo todos ellos sufren importantes disminuciones en sus abundancias relativas. Adicionalmente, si se comparan los compuestos mayoritarios declarados para el medio de extracción ácido (tabla 2) con los compuestos en común con el medio neutro (tabla 3) observaremos que tres de ellos aparecen solamente en la extracción con ácido (1-4-Cineol, p-Cimeno y  $\alpha$ -Terpineol) mientras que los dos compuestos que coinciden son el  $\gamma$ -Terpineno y el Terpinoleno.

**TABLA 3. COMPUESTOS EXTRAÍDOS EN MEDIO NEUTRO Y MEDIO ÁCIDO. VALORES DE ABUNDANCIA RELATIVA EN MEDIO ÁCIDO Y DIFERENCIAS DE ÁREAS ENTRE AMBOS MEDIOS**

Nº	Compuesto	A (%)	A <sub>ac</sub> - A <sub>n</sub>	Nº	Compuesto	A (%)	A <sub>ac</sub> - A <sub>n</sub>
1	(3E)-Hexenol	0,15	-0,06	38	Eugenol	0,89	-1,18
2	(3Z)-Hexenol	0,07	-0,05	39	$\alpha$ -Copaeno	0,18	-0,01
4	$\alpha$ -Pinoeno	2,79	-9,55	41	$\beta$ -Elemeno	0,14	-4,47
5	$\alpha$ -Fencheno	1,31	0,55	42	(E)-Cariofileno	2,50	-0,12
6	Benzaldehído	0,35	-0,60	43	$\gamma$ -Elemeno	0,08	-0,22
9	Mirceno	3,00	-0,08	45	4,11-Selindieno	0,39	-0,10
10	$\alpha$ -Felandreno	0,83	0,72	46	$\gamma$ -Gurjuneno	1,40	1,01
11	$\alpha$ -Terpineno	0,88	0,62	47	D-Germacreno	0,41	-0,07
12	Limoneno	2,50	-3,69	49	$\alpha$ -Selineno	0,52	-0,69
13	Eucalyptol	2,17	1,72	51	$\gamma$ -Cadineno	0,08	0,00
15	(E)- $\beta$ -Ocimeno	0,20	-2,60	52	$\delta$ -Cadineno	0,43	-0,11
16	$\gamma$ -Terpineno	3,51	2,91	54	$\alpha$ -Elemol	0,22	0,13
18	Terpinoleno	5,88	4,93	56	Benzoate (3Z)- hexenyl	0,40	-0,24
19	Linalol	0,45	-6,23	58	Óxido de Cariofileno	0,27	-0,07
20	2(E),6(Z)- dimetil-2,4,6- Octatrieno	1,04	-5,46	61	Guaiol	0,68	0,50
22	2-metil-Propanoato de (3Z)- hexenilo	0,35	0,15	63	Copaborneol	0,31	-0,74
24	Borneol	1,52	1,26	64	Epicubenol	1,54	-2,33
25	4-Terpineol	0,60	-0,45	65	$\gamma$ -Eudesmol	0,34	0,22
26	3-Decanona	0,34	-0,24	67	10-OH-4-Cadineno	0,25	0,06
27	Salicilato de Metilo	0,05	-0,05	76	Ácido n- Tetradecanóico	0,17	0,00
28	$\gamma$ -Terpineol	0,66	-3,63	79	Isofitol	1,64	1,29
30	2-metil-Butanoato de (3Z)- hexenilo	0,11	-0,74	80	Ácido Hexadecanóico	2,59	-0,05
31	2-metil-Butanoato de hexilo	0,30	-0,05	82	Fitol	1,35	-4,71
33	Geraniol	0,09	-0,17	88	Nonacosano	0,23	-0,55
37	$\delta$ -Elemeno	1,14	0,10	89	Hentriacontano	0,22	-0,64

**Leyenda:** A  $\rightarrow$  Área relativa; A<sub>ac</sub>-A<sub>n</sub>  $\rightarrow$  Diferencias de Áreas entre el medio ácido (A<sub>ac</sub>) y el neutro (A<sub>n</sub>); en cursiva  $\rightarrow$  mayores diferencias, en negrita  $\rightarrow$  mayoritarios.

Estos dos compuestos mayoritarios (para el medio ácido) en común se lograron identificar en el medio neutro con valores muy bajos de área relativa (ver tabla 1), aspecto este que hace volver sobre la hipótesis del porqué el medio ácido favorece el proceso extractivo y las posibles consecuencias de su empleo en la especie en estudio. Por ello, el incremento significativo del área relativa de estos dos compuestos puede estar determinado por dos factores: primero que los mismos se encuentran almacenados en zonas de las hojas poco expuestas al exterior, a las cuales solo se puede acceder cuando agentes externos (medio ácido) son capaces de romper las estructuras celulares

de almacenamiento; y segundo que sean el resultado de una reacción química provocada por el ácido en su proceso de reflujo (4 h).

Para que se cumpla esta segunda hipótesis, sería necesario que algún o alguno de los metabolitos presentes en el medio neutro (natural), haya sufrido modificaciones químicas, disminuyendo su concentración a expensas de la creación de nuevos compuestos. El ejemplo más ilustrativo de esto sería el  $\alpha$ -Pineno (compuesto mayoritario en medio neutro), el cual disminuye su abundancia relativa en casi seis veces en el medio ácido, probablemente para la formación del  $\alpha$ -Terpineol (compuesto en abundancia obtenido exclusivamente en medio ácido), el cual a su vez se convierte en otros compuestos del medio ácido, según el esquema de reacción propuesto en la figura 3.

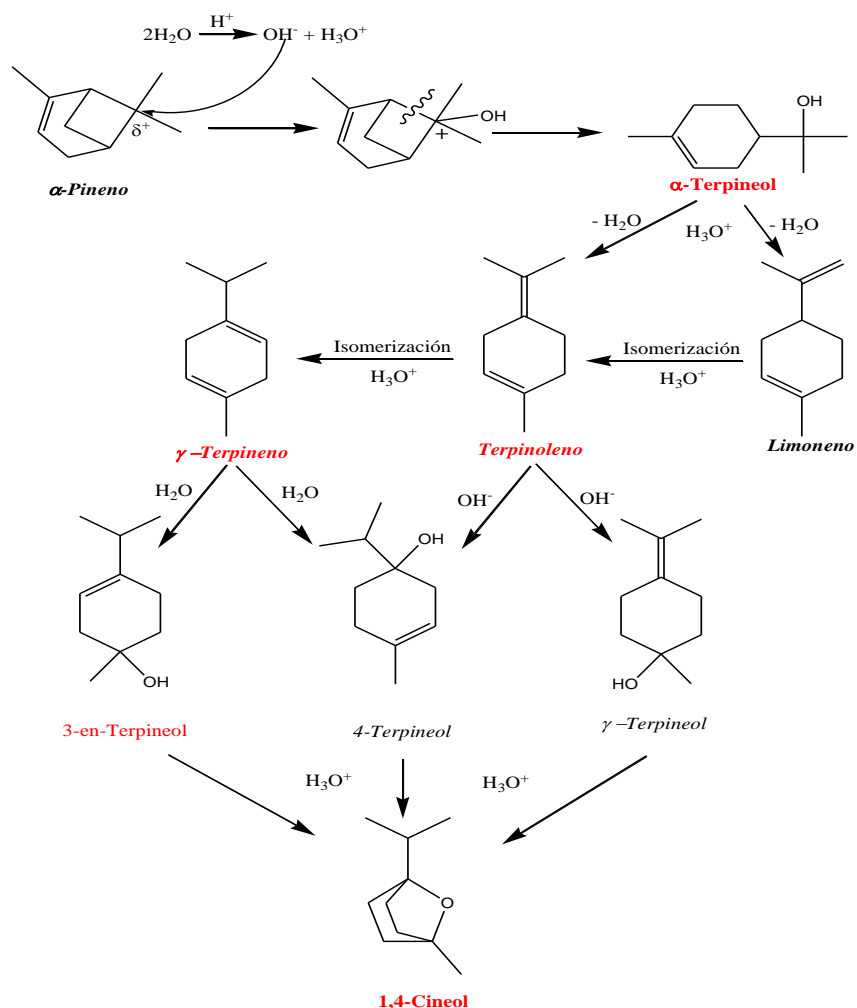


Figura 3. Esquema de reacción para la conversión del  $\alpha$ -pineno y otros compuestos mayoritarios del medio neutro a los compuestos del medio ácido

Leyenda: En *cursiva* compuestos en común (2), en **negrita** compuestos mayoritarios (6), en **rojo** compuestos exclusivos del medio ácido (1).

### Extracción en medio básico

A diferencia de la modificación del medio anterior, en este caso el número de compuestos extraídos resultó menor no solo con respecto al medio ácido, sino también con respecto al medio neutro. Se logró identificar un total de 63 compuestos del total de 69 que se aislaron, representando un 96,81 % de abundancia relativa del total extraído. De los 63 compuestos identificados un total de 42, resultaron comunes con los extraídos en el medio neutro, evidenciado una vez más que el mismo fue menos agresivo tanto para las estructuras celulares de las hojas como para los compuestos presentes en la misma. No obstante, la tabla 4 muestra cómo sí existen diferencias apreciables en cuanto a las abundancias que para el medio neutro presentaban los compuestos mayoritarios.

**TABLA 4. COMPUESTOS EXTRAÍDOS TANTO EN MEDIO NEUTRO COMO BÁSICO. VALORES DE ABUNDANCIA RELATIVA EN MEDIO BÁSICO Y DIFERENCIAS DE ÁREAS ENTRE AMBOS MEDIOS**

Nº	Compuesto	A (%)	A <sub>b</sub> -A <sub>n</sub>	Nº	Compuesto	A (%)	A <sub>b</sub> -A <sub>n</sub>
1	(3E)-Hexenol	0,30	0,09	48	β-Selineno	1,14	-0,13
4	α-Pineno	3,91	-8,43	49	α-Selineno	1,86	0,65
6	Benzaldehído	3,21	2,26	50	(E,E)-α-Farneseno	1,39	0,28
9	Mirceno	0,65	-2,43	51	γ-Cadineno	0,38	0,30
12	Limoneno	0,41	-5,78	52	δ-Cadineno	0,60	0,06
14	(Z)-β-Ocimeno	0,33	-2,03	55	Nerolidol (E)	0,44	0,31
15	(E)-β-Ocimeno	0,62	-2,18	56	Benzoate (3Z)-hexenyl	0,19	-0,45
17	Óxido de cis-Linalol	0,16	-0,06	58	Óxido de Cariofileno	1,67	1,33
19	Linalol	0,55	-6,13	60	Viridiflorol	1,09	0,59
20	2(E),6(Z)- dimetil-2,4,6-Octatrieno	1,28	-5,22	61	Guaiol	0,34	0,16
30	2-metil-Butanoato de (3Z)- hexenilo	0,12	-0,73	62	Humuleno epóxido II	0,56	0,26
36	Acetato de Dihidrocarvylo	0,67	0,42	63	Copaborneol	0,42	-0,63
37	δ-Elemeno	4,42	3,38	64	Epicubenol	10,43	6,56
38	Eugenol	0,73	-1,34	67	10-OH-4-Cadineno	1,19	1,00
41	β-Elemeno	1,96	-2,65	69	Intermedeol	1,87	0,94
42	(E)-Cariofileno	7,06	4,44	73	(Z,Z)-Farnesol	0,22	-0,01
43	γ-Elemeno	0,84	0,54	76	ácido n-Tetradecanóico	0,29	0,12
44	α-Humuleno	1,24	0,44	80	ácido Hexadecanóico	0,60	-2,04
45	4,11-Selindieno	0,38	-0,11	82	Fitol	6,76	0,70
46	γ-Gurjuneno	2,22	1,83	88	Nonacosano	5,53	4,75
47	D-Germacreno	0,61	0,13	89	Hentriacontano	1,10	0,24

Leyenda: A →Área relativa; A<sub>b</sub>-A<sub>n</sub>→Diferencias de Áreas entre el medio básico (A<sub>b</sub>) y el neutro (A<sub>n</sub>); en rojo →mayores diferencias, resaltados →mayoritarios.

La figura 4 muestra la clasificación estructural de los 63 compuestos identificados en la extracción por este medio.

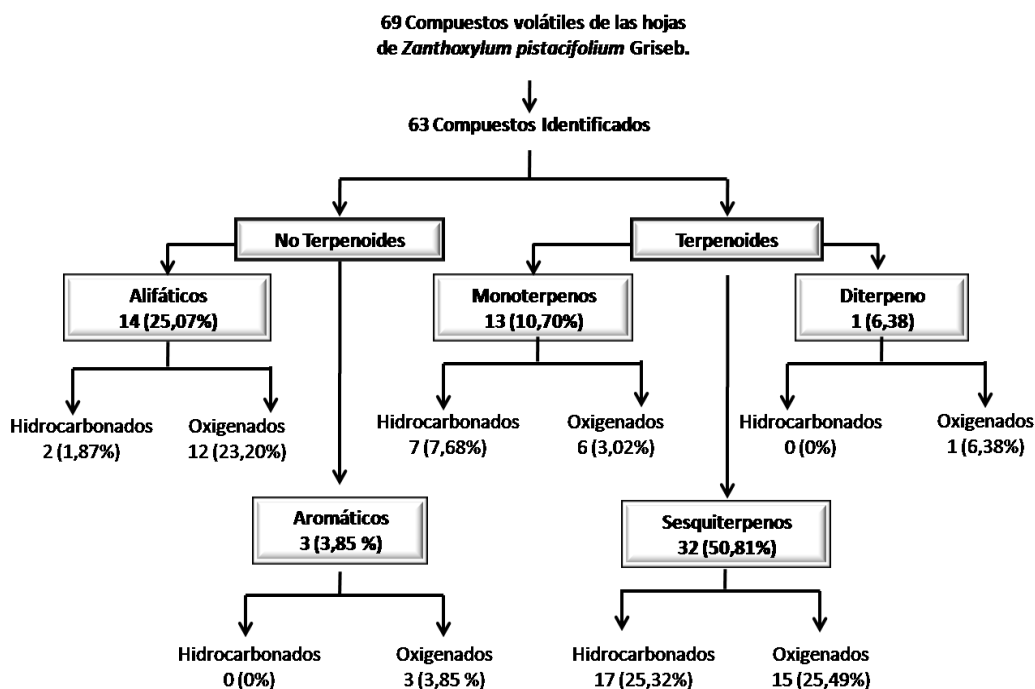


Figura 4. Naturaleza química y abundancia de los compuestos volátiles aislados de las hojas en el medio básico

Otra diferencia apreciable entre este medio básico y el resto de los medios empleados (neutro y ácido) radica en que los compuestos mayoritarios son esencialmente del tipo sesquiterpénico, algo no evidenciado anteriormente. Por ello, la hipótesis de que la extracción en medio básico no influye en la composición química de los compuestos volátiles resulta en esencia descartable (ver tabla 4).

A manera de resumen se puede notar, que en todos los medios empleados para la extracción de compuestos volátiles, se identificaron compuestos de naturaleza terpenoide y no terpenoide. Los que más prevalecieron en los tres medios fueron los terpenoides, 56 en el medio neutro para un 55,09 %; 71 compuestos en el medio ácido para un 83,84 %, y el medio básico se identificaron 46 para un 67,89 %. Si se consideraran los compuestos comunes en los tres medios de extracción, la cifra alcanzada sería 31, los cuales se muestran en la tabla 5.

Considerando las posibles modificaciones a las estructuras de los compuestos volátiles presentes en las hojas del *Zanthoxylum pistacifolium* Griseb, el método tradicional de extracción de compuestos volátiles empleando agua destilada resulta ser el más efectivo para la extracción de los mismos.

**TABLA 5. COMPUESTOS VOLÁTILES EXTRAÍDOS EN LOS TRES MEDIOS (ÁCIDO, BÁSICO Y NEUTRO)**

N°	Compuesto	N°	Compuesto
1	(3E)-Hexenol	47	D-Germacreno
4	$\alpha$ -Pinenol	49	$\alpha$ -Selineno
6	Benzaldehído	51	$\gamma$ -Cadineno
9	Mirceno	52	$\delta$ -Cadineno
12	Limoneno	56	Benzoate (3Z)-hexenyl
15	(E)- $\beta$ -Ocimeno	58	Óxido de Cariofileno
19	Linalol	61	Guaiol
20	2(E),6(Z)-dimetil-2,4,6-Octatrieno	63	Copaborneol
30	2-metil-Butanoato de (3Z)-hexenilo	64	Epicubenol
37	$\delta$ -Elemeno	67	10-OH-4-Cadineno
38	Eugenol	76	Ácido n-Tetradecanoico
41	$\beta$ -Elemeno	80	Ácido Hexadecanoico
42	(E)-Cariofileno	82	Fitol
43	$\gamma$ -Elemeno	88	Nonacosano
45	4,11-Selindieno	89	Hentriacontano
46	$\gamma$ -Gurjuneno		

## Conclusiones

*El medio ácido favoreció el rendimiento total de compuestos volátiles, sin embargo, afectó la naturaleza química cualitativa del aceite; por lo que se propone el método de extracción en medio neutro como el más efectivo en la extracción de compuestos volátiles de las hojas de *Zanthoxylum pistacifolium* Griseb, identificando como compuestos mayoritarios el  $\alpha$ -Pinenol, Linalol, 2,6-dimetil-2,4,6-Octatrieno, Limoneno y Fitol.*

## Referencias bibliográficas

1. MANCEBO, F.; HILJE, L.; MORA, G. A.; CASTRO, V. H.; SALAZAR, R. Biological activity of *Rutachalepensis* (Rutaceae) and *Sechiumpittieri* (Cucurbitaceae) extracts on *Hypsipylagrandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Revista de Biología Tropical*. 2001, 49, p. 501-508.
2. RAKIĆ, T.; ŠINŽAR, J.; FILIPOVIĆ, B.; TADIĆ, V.; STEVANOVIĆ, B.; TAN, K. Ecophysiological and Anatomical Characteristics of the Subtropical Shrub *Zanthoxylum acanthopodium* (Rutaceae) in Conditions of a Temperate Continental Climate (Serbia). *Archives of Biological Science. Belgrade*. 2009, 61, 2, p. 249-260.



3. ARUN KUMAR, K. V.; PARIDHAVI, M. "An Ethnobotanical, Phytochemical and Pharmacological utilization of widely distributed species *Zanthoxylum*: A comprehensive overview". *International Journal of Pharmaceutical Invention*. 2012, enero 2, 1, p. 24-35.
4. BOEHME, A. K.; NOLETTA, J. A.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. "Bioactivity and chemical composition of the leaf essential oils of *Zanthoxylum rhoifolium* and *Zanthoxylum setulosum* from Monteverde, Costa Rica". *Natural Product Research*. 2008, 22, 1, p. 31-36.
5. PRIETO, J. A.; PATIÑO, O. J.; DELGADO, W. A.; MORENO, J. P.; CUCA, L. E. "Chemical Composition, Insecticide and Antifungal Activities of the Essential Oils of Fruits of three *Zanthoxylum* Species from Colombia". *Chilean Journal of Agricultural Research*. 2011, p. 71, p. 73-82.
6. FOGANG, H. P. D. *et al.* "Characterization and biological activity of essential oils from fruits of *Zanthoxylum xanthoxyloides* Lam. and *Z. leprieurii* Guill. & Perr., two culinary plants from Cameroon". *Flavour Fragrance Journal*. 2012, 27, p. 171-179.
7. ADESINA, S. K. "The Nigerian *Zanthoxylum*: Chemical and Biological Values". *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2005, 2, p. 282-301.
8. LEE, S. J., LIM, K. T. "Glycoprotein of *Zanthoxylum piperitum* DC has a hepatoprotective effect via anti-oxidative character *in vivo* and *in vitro*". *Toxicology in Vitro*. 2008, 22, p. 376-385.
9. JOJI, R. L., BEENA, J. "Statistical analysis of the antibacterial activity of *Zanthoxylum rhetsa* seed essential oil". *Journal Chemical and Pharmaceutical Research*. 2011, 3, 1, p. 440-444.
10. SENATORE, F.; LANDOLFI, S.; CELIK, S.; BRUNO, M. "Volatile components of *Centaurea calcitrapa* L. and *Centaurea sphaerocephala* L. ssp. *sphaerocephala*, two Asteraceae growing wild in Sicily". *Flavour Fragrance Journal*. 2006, 21, p. 282-285.
11. PINO, J. A.; MESA, J.; MUÑOZ, Y.; MARTÍ, M. P.; MARBOT, R. "Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53, p. 2213-2223.
12. ADAMS, R. P. Identification of essential oil by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Illinois: Carol Stream. Allured publisher Corp. 1995.
13. PATIÑO, O. J.; PRIETO, J. A.; CUCA, L. E. *Zanthoxylum* Genus as Potential Source of Bioactive Compounds, *Bioactive Compounds in Phytomedicine*. Prof. Iraj

- Rasooli (Editor.). Rijeka: In Tech, 2012. p. 185-217. ISBN978-953-307-805-2.  
Disponibile en: <http://www.intechopen.com>.
14. OMBITO, O.; MATASYOH, C.; VULULE, M. "Chemical composition and larvicidal activity of *Zanthoxylum gillettii* essential oils against *Anopheles gambiae*". *African Journal of Biotechnology*. 2014, 13, 21, p. 2175-2180.
15. SANJAY, G.; TIKU, A. K.; KOUL, A.; SAHIL, G.; SINGH, G.; RAZDAN V. K. Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Essential Oil and Extracts of *Zanthoxylum alatum* Grown in North-Western Himalaya". *The Scientific World Journal*. 2013, abril, p. 9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/790580>.
16. BARKATULLAH, Ibar M. *et al.* "Chemical Composition and biological screening of essential oils of *Zanthoxylum armatum* from leaves". *Journal of Clinical Toxicology*. 2013, 3, 5, p.1-6. Disponible en: [http://dx. Doi.org: 10.4172/2161-0495.1000172](http://dx.doi.org/10.4172/2161-0495.1000172).
17. SHAFI, M. P.; JOSE, B.; JIROVETZ, L. "Conversion of sabinene to phellandral via p-menthane-1,2,7-triol". *Indian Journal of Chemistry*. 2008, 20, 47, p. 1731-1734.