

# Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de los frutos de una nueva especie del género *Zanthoxylum* (Sección Tobinia-Rutaceae) de Venezuela

Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from fruits of new species of the genus *Zanthoxylum* (Section Tobinia-Rutaceae) of Venezuela

Composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial dos frutos de uma nova espécie do gênero *Zanthoxylum* (Seção Tobinia-Rutaceae) da Venezuela

Nélida González de Colmenares<sup>1\*</sup>, Rosa Aparicio<sup>3</sup>, Carmen Araque<sup>1</sup>, Judith Velasco<sup>2</sup> y Alfredo Usubillaga<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Fitoquímica, Decanato de Investigación, Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET). Correos electrónicos: nelida\_c@yahoo.com, carmenmarisol13@hotmail.com. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Los Andes, Mérida, estado Mérida. Correo electrónico: judithvelasco2005@yahoo.es <sup>3</sup>Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, estado Mérida. Correo electrónico: usubilla80@gmail.com Fuente de financiamiento: Decanato de Investigación de la Universidad Experimental del Táchira (UNET).

## Resumen

El aceite esencial obtenido por hidrodestilación de los frutos de una nueva especie de *Zanthoxylum* (Rutaceae) fue analizada por CG-EM y CG-FID. El análisis cromatográfico reveló la presencia de 31 compuestos los cuales representaron el 99,57% de la composición del aceite. Los principales constituyentes fueron  $\beta$ -Felandreno (24,69%), *Cis-p*-Ment-2-en-1-ol (11,74%), Linalool (10,34%), Citronelal (9,87%) y *Trans-p*-2-Ment-2-en-1-ol (8,68%). La actividad antibacteriana del aceite esencial se investigó por el método de difusión

---

Recibido el 24-06-2016 • Aceptado el 29-11-2016

\*Autor de correspondencia e-mail: nelida\_c@yahoo.com

en agar con discos frente a los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). El aceite esencial inhibió el crecimiento de todas las bacterias excepto *P. aeruginosa*. Este es el primer reporte sobre la composición del aceite de los frutos de *Zanthoxylum* sp. nov. y su efecto antibacteriano frente a microorganismos, con valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) 50 y 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$ . Estos resultados constituyen un aporte al conocimiento sobre el género *Zanthoxylum*. Debido a la actividad antibacteriana del aceite esencial frente a bacterias de importancia clínica, se sugiere continuar los estudios botánicos para lograr su identificación a nivel de especie.

**Palabras clave:** Rutaceae, *Zanthoxylum*, aceite esencial,  $\beta$ -Felandreno, actividad antibacteriana.

### Abstract

The essential oil obtained by hydrodistillation from the fruits of new species of *Zanthoxylum* (Rutaceae) was analyzed by GC-MS and GC-FID. Gas chromatography analysis revealed the presence of 31 compounds which made up 99.57% of the oil composition. The main constituents were  $\beta$ -Phellandrene (24.69%), *Cis-p*-Ment-2-en-1-ol (11.74%), Linalool (10.34%), Citronellal (9.87%) and *Trans-p*-2-Ment-2-en-1-ol (8.68%). The antibacterial activity of this oil was investigated by the agar diffusion disc method against the following microorganisms: *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853). The essential oil inhibited the growth of all bacteria except *P. aeruginosa*. This is the first report on the composition of the essential oil from the fruits of *Zanthoxylum* sp. nov. and its antibacterial effect against microorganisms with values of minimum inhibitory concentration (MIC) of 50 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . These results constitute a contribution to the knowledge on the *Zanthoxylum* genus. Considering the antibacterial activity of its essential oil against bacteria of clinical importance, it is suggested further studies to ensure the botanical identification at this valuable species.

**Key words:** Rutaceae, *Zantoxylum*, essential oil,  $\beta$ -Phellandrene, antibacterial activity.

### Resumo

O óleo essencial obtido por hidrodestilação dos frutos de uma nova espécie de *Zanthoxylum* (Rutaceae) foi analisado por CG-MS e CG-FID. A análise cromatográfica revelou a presença de 31 compostos que representou 99,57% da composição de óleo. Os principais constituintes foram  $\beta$ -Felandreno (24,69%) de *Cis-p*-Ment-2-en-1-ol (11,74%), Linalool (10,34%), Citronelal (9,87%) e *Trans-*

*p*-2-Ment-2-en-1-ol (8,68%), a actividade antibacteriana do óleo essencial foi investigada pelo método de difusão em agar com discos contra os seguintes microorganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). O óleo essencial inibiu o crescimento de todas as bactérias com excepção de *P. aeruginosa*. Este é o primeiro relatório sobre a composição do óleo dos frutos de *Zanthoxylum* sp.nov. e seu efeito antibacteriano contra microorganismos, com valores de concentração inibitória mínima (MIC) 50 e 100 µg mL<sup>-1</sup>. Estes resultados, constituiu uma contribuição ao conhecimento sobre o género *Zanthoxylum*. Devido à actividade antibacteriana do óleo essencial contra bactérias de importância clínica, sugere-se continuar estudos botânicos até alcançar a sua identificação ao nível de espécie.

**Palavras-chave:** óleo essencial, Rutaceae, *Zanthoxylum*, β-Felandreno, actividade antibacteriana.

## Introducción

El género *Zanthoxylum* L. (Rutaceae) está distribuido mundialmente en el trópico y en zonas templadas del nuevo y viejo mundo; está compuesto por 666 especies que comprende desde arbustos hasta altos árboles (Plant List, 2013). Kallunki (2005) reportó especies del género *Zanthoxylum* para la región de Guayana, y Sanoja (2009) publicó sobre una nueva especie de *Zanthoxylum* en el estado Bolívar. Se han encontrado especies muy útiles con propósitos medicinales (Kala, 2005); para usar en aromaterapias antibióticas (Coutinho *et al.*, 2010). Cerca de 18 especies de *Zanthoxylum* han sido reportadas para Venezuela (Bono, 1996; Hokche *et al.*, 2008). La mayoría de las plantas de este género son dioicas. Los aceites esenciales extraídos de frutos de diferentes especies de *Zanthoxylum* se han estudiado para establecer su composición y actividad antimicrobiana, y se ha encontrado

## Introduction

*Zanthoxylum* L. (Rutaceae) is worldwide distributed in the tropic and temperate areas, it is composed by 666 species comprising from shrubs to the tallest trees (Plant List, 2013). Kallunki (2005) reported species of *Zanthoxylum* for Guayana, Sanoja (2009) published about new species of *Zanthoxylum* in Bolivar. Useful species have been found with medicinal purposes (Kala, 2005); to use in antibiotic aromatherapy (Coutinho *et al.*, 2010). Approximately 18 species of *Zanthoxylum* have been reported in Venezuela (Bono, 1996; Hokche *et al.*, 2008). Most of the plants of this genus are dioic. The essential oils extracted from fruits of different species of *Zanthoxylum* have been studied to establish its composition and antimicrobial activity, and it has been found that these oils are a complex mix of terpenic compounds (Ngassoum *et al.*, 2003). The essential oil of dried fruits of *Z. xanthoyloides* and *Z.*

que son una mezcla compleja de compuestos terpénicos (Ngassoum *et al.*, 2003). El aceite esencial de los frutos secos de *Z. xanthoyloides* y *Z. leprieuril*, dos plantas de Camerún usados como especies en gastronomía, mostraron actividad antibacteriana y antifúngica (Tatsadjieva *et al.*, 2003); por otra parte, el aceite esencial de los frutos de *Z. alatum* presentaron además actividad antihelmíntica (Metha *et al.*, 1981). Recientemente, se reportó el efecto antibacteriano del aceite esencial de los frutos de *Z. limonella* sobre bacterias resistentes a múltiples fármacos (Tangjitjaroenkun *et al.*, 2012).

Se han realizado diversas publicaciones vinculadas con la importancia del género *Zanthoxylum* en medicina tradicional etnobotánica y sobre la determinación de la composición química y actividad biológica de las plantas, sus extractos y sus aceites esenciales. En tal sentido, Negi *et al.* (2011) publicaron una revisión bibliográfica sobre la composición química y actividad biológica de aceites esenciales extraídos de plantas del género *Zanthoxylum* para facilitar información a los investigadores y a las industrias farmacéuticas. Los autores destacaron la presencia de alcaloides y cumarinas como los principales constituyentes del género.

Por otra parte, Prieto *et al.* (2011) determinaron la composición química y la actividad fúngica de aceites esenciales extraídos de los frutos de tres especies de *Zanthoxylum* de Colombia. En la composición química de dos especies predominaron sesquiterpenos y una de ellas *Z. monophyllum* (Lam.) P. Wilson mostró

*leprieuril*, two plants of Camerun used as species in gastronomy, showed antibacterial and antifungal activity (Tatsadjieva *et al.*, 2003); on the other hand, the essential oil of fruits of *Z. alatum* also had anthelmintic activity (Metha *et al.*, 1981). Recently, it was reported the antibacterial effect of the essential oil of *Z. limonella* fruits on bacteria resistant to multiple drugs (Tangjitjaroenkun *et al.*, 2012).

Different publications related to the importance of the genus *Zanthoxylum* have been carried out in ethnobotany and about the determination of the chemical composition and biologic activity of the plants, their extracts and essential oils. In this sense, Negi *et al.* (2011) published a bibliographic revision on the chemical composition and the biologic activity of essential oils extracted from plants of the genus *Zanthoxylum* to ease the information to the researchers and the pharmaceutical industry. The authors mentioned the importance of the alkaloids and coumarins as the main constituents of the genus.

On the other hand, Prieto *et al.* (2011) determined the chemical composition and fungal activity of the essential oils extracted from the fruits of the three species of *Zanthoxylum* in Colombia. In the chemical composition of the two species predominated sesquiterpenes and one of those *Z. monophyllum* (Lam.) P. Wilson showed significant insecticide activity against *Sitophilus oryzae*.

Additionally, Patiño *et al.* (2012) published a revision on the importance of ethnobotany, phytochemical and biologic activities of the genus

significativa actividad insecticida contra *Sitophilus oryzae*.

Adicionalmente, Patiño *et al.* (2012) publicaron una revisión sobre la importancia de la etnobotánica, fitoquímica y actividades biológicas del género *Zanthoxylum* haciendo énfasis en el uso medicinal de compuestos bioactivos extraídos del citado género.

Wen-Rui *et al.* (2013) determinaron la composición química del aceite esencial extraído del pericarpio de frutos maduros de *Z. schinifolium* Sieb. et Zucc., con predominio de monoterpenos oxigenados como el linalol y el limoneno. En relación a la actividad biológica evaluada, señalaron que el aceite esencial inhibió el desarrollo de *S. epidermis*.

Supabphol y Tangjitjareonkun (2014) publicaron una revisión bibliográfica sobre la composición química y actividad biológica de extractos de las plantas y en el aceite esencial de *Z. limonella*. La publicación compila información científica sobre la descripción botánica, usos tradicionales, componentes fitoquímicos y actividades biológicas tales como repelente y larvicida de mosquitos, antimicrobiano, antioxidantes y propiedades antitumorales de las especies.

En el presente trabajo se describe la composición química y la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de los frutos de una especie nueva de *Zanthoxylum* recolectada en los Andes de Venezuela.

## Materiales y métodos

### Material botánico

Los frutos de *Zanthoxylum* sp. nov., comúnmente conocida con los nombres

*Zanthoxylum* emphasizing in the medicinal use of bioactive compounds of the genus.

Wen-Rui *et al.* (2013) determined the chemical composition of the essential oil extracted from the pericarp of ripened fruits of *Z. schinifolium* Sieb. et Zucc., with predominance of oxygenated monoterpenes such as linalool and limonene. In relation to the biological activity evaluated, it was mentioned that the essential oil inhibited the development of the *S. epidermis*.

Supabphol and Tangjitjareonkun (2014) published a bibliographic revision on the chemical composition and biological activity of the plant extracts and in the essential oil of *Z. limonella*. The publication compiles scientific information about the botanic description, traditional uses, phytochemical components and biologic activity such as mosquito repellent and larvicide, antimicrobial, antioxidant and anti-tumoral properties of the species.

In this research are described the chemical composition and the antibacterial activity *in vitro* of the essential oil of fruits of the new specie *Zanthoxylum*, collected in the Andean region, Venezuela.

## Materials and methods

### Botanic material

Fruits of *Zanthoxylum* sp. nov., commonly known as 'Amarillo' and 'Espino', were collected in El Cobre, far, Nelson Ortíz, Tachira state, Venezuela in November 2012, at 2300 masl (8°0'34.64" N and 72°3'2.83" W). Three samples of the specie registered

'Amarillo' y 'Espino', se recolectaron en El Cobre, en la finca Nelson Ortíz, estado Táchira, República Bolivariana de Venezuela, en noviembre 2012, a 2300 msnm (8°0'34,64" N y 72°3'2,83" O). Tres muestras de la especie, registrada con el N° 6983, se depositaron en el Herbario J.J. Pacheco de la Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET); en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA) y en el Herbario PORT de la Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora (UNELLEZ), Venezuela.

El material botánico se encuentra bajo estudio en el Herbario PORT por la Dra. Nidia Cuello y el Dr. Gerardo Aymard, quienes concluyeron después de riguroso examen de especies y literatura, comparación con tipos de materiales de especies descritas y consultando varias colecciones de herbarios, que esta muestra corresponde a una nueva especie de *Zanthoxylum*. La misma pertenece a un grupo de especies Neotropicales con perianto trímero, estigma globoso y ramificaciones apical espinosas, ubicada por Reynel (1995) dentro del género *Zanthoxylum* sección Tobinia. Al igual que la mayoría de las plantas de este género, como por ejemplo *Z. caribaeum* (Eugler) Lam. y *Z. martenicense* (Lam.) DC (Bono, 1996; Morton, 1981), se trata de una especie dioica, en la cual las partes reproductivas se encuentran separadas en flores pistiladas (♀) y flores estaminadas (♂) y ubicadas en diferentes individuos. Es por eso que

with the number 6983, were deposited at the Herbarium J.J. Pacheco of the Universidad Experimental del Tachira (UNET); in the Herbarium MERF of the Pharmacy and Bioanalysis Faculty of Universidad de los Andes (ULA) and Herbarium PORT of Universidad Nacional Experimental de los Llanos Occidentales Ezequiel Zamora (UNELLEZ), Venezuela.

The botanic material is under research at the Herbarium PORT by Dr. Nidia Cuello and Dr. Gerardo Aymard, who concluded after a rigorous exam of species and literature revision, comparing with types of materials of the species described, consulting different collections of herbariums that this sample corresponds to a new species of *Zanthoxylum*, which belongs to a group of Neotropical species with trimerous perianth, globose stigma and throny apical ramification located by Reynel (1995) in the genus *Zanthoxylum*, Tobinia section. As most of the plants of this genus, such as *Z. caribaeum* (Eugler) Lam. and *Z. martenicense* (Lam.) DC (Bono, 1996; Morton, 1981), it is a dioic species on which the reproductive areas are separated into pistillate flowers (♀) and staminate flowers (♂) and located in different individuals.

For this reason this specie has not been described, since it is required to locate, collect and study species with staminate flowers to obtain a complete botanic description, which has not yet been found in the field. The scarce density of individuals of *Zanthoxylum* sp. suggests that it is a rare species, possibly in danger of extinction, since the area where are the studied trees

hasta el presente esta especie no ha sido descrita, ya que se requiere ubicar, recolectar, y estudiar especímenes de individuos con flores estaminadas, para su completa descripción botánica, los cuales aún no se han encontrado en el campo. La escasa densidad de individuos de este *Zanthoxylum* sp. sugiere que se trata de una especie rara, posiblemente en peligro de extinción, ya que el área donde se encuentran los árboles estudiados se ubica en una amplia zona agrícola en donde la vegetación original ha sido casi sustituida por cultivos limpios como las hortalizas.

#### **Extracción del aceite esencial**

Los frutos frescos, maduros y enteros de *Zanthoxylum* (1.000 g), se licuaron con 7 L de agua. Una vez licuados los frutos, se colocaron en un balón de 12 L. Los frutos licuados se sometieron a hidroddestilación durante 4 h, recogiendo el aceite esencial en una trampa de Clevenger. Terminado el proceso, se separó el aceite con una pipeta Pasteur y se colocó en un frasco ámbar con 0,5 g de sulfato de sodio anhidro para eliminar la humedad. Finalmente, se obtuvieron 5 mL de aceite seco que equivalió a 0,5% v/p de rendimiento con base a la materia fresca. El aceite se almacenó a una temperatura de 4 °C, para su posterior análisis.

#### **Cromatografía de gases**

El análisis cromatográfico se realizó en un equipo Perkin Elmer modelo AutoSystem equipado con un detector de ionización a llama (FID). Se utilizó una columna capilar de 5% fenil-95% metil polisiloxano AT-5 de 60 m de largo, 0,25 mm de diámetro y 0,25 mm de espesor de película. La temperatura

locates in a wide agricultural area where the original vegetation has been almost constituted by clean crops such as vegetables.

#### **Extraction of essential oil**

Fresh, ripened and entire fruits of *Zanthoxylum* (1.000 g), blended with 7 L of water. Once blended the fruits were put on a 12 L balloon. Blended fruits were submitted to hydrodistillation for 4 h and collecting the essential oil in a Clevenger trap. Once finished the process, the oil was divided using a Pasteur pipette and put on amber glass with 0.5 g of anhydrous sodium sulphate to eliminate humidity. Finally, 5 mL of dry oil were obtained equal to 0.5% v/p of yield with base to the fresh matter. The oil stored at a temperature of 4 °C for its posterior analysis.

#### **Gas chromatography**

The chromatograph analysis was done using AutoSystem Perkin Elmer equipment, equipped with a flame ion detector (FID). A 5% phenyl-95% methyl-polysiloxane capilar column AT-5 of 60 m of length, 0.25 mm of diameter and 0.25 of the film thickness. The oven temperature was programmed from 60 to 200 °C at a reason of 4 °C·min<sup>-1</sup>. The injector temperature was established at 200 °C and the detector at 250 °C. Helium was used as portable gas with 0.8 mL·min<sup>-1</sup> flow. A sample of 1.0 µL was injected using a 1:100 relation. The retention indexes were calculated using n-alkane pattern series from C<sub>8</sub> to C<sub>24</sub>. The identification of the compound was confirmed using Wiley and NISH database in the gas chromatographer coupled to mass

del horno se programó desde 60 hasta 200 °C a razón de 4 °C min<sup>-1</sup>. La temperatura del inyector se estableció a 200 °C y la del detector a 250 °C. Se utilizó helio como gas portador con un flujo de 0,8 mL min<sup>-1</sup>. Se inyectó una muestra de 1,0 µL usando una relación de reparto de 1:100. Bajo estas condiciones se calcularon los índices de retención utilizando una serie de patrones de *n*-alcanos desde C<sub>8</sub> hasta C<sub>24</sub>. La identificación de los compuestos se confirmó con las bases de datos Wiley y NISH en el equipo de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Para determinar la concentración relativa de los componentes del aceite esencial se realizó un análisis CG-FID, utilizando las mismas condiciones cromatograficas utilizadas para el equipo CG-EM. El cálculo se realizó mediante la normalización de áreas (Usubillaga *et al.*, 2001).

### Espectrometría de masas (CG-EM)

Los análisis CG-EM se realizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard Modelo 6890, equipado con detector de masas Hewlett Packard modelo 5973, equipado con detector de masas, inyector automático y una columna capilar HP-5MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espesor de la película. Temperatura de la fuente 230 °C; temperatura del cuadrupolo 150 °C; gas portador helio ajustado a una velocidad lineal de 34 cm s<sup>-1</sup>; energía de ionización 70 eV; amplitud del scan 40-500 amu; 3,9 scans s<sup>-1</sup>. El volumen inyectado fue de 1,0 µL de una solución al 2% de aceite en éter-dietílico, con relación de reparto de 1:100. La

spectrometry. The analysis CG-FID was done to determine the relative concentration of the components of essential oil, using the same chromatography conditions used for the equipment CG-EM. The calculus was done using the norms of the areas (Usubillaga *et al.*, 2001).

### Mass spectrometry (GC-EM)

GC-EM analyses were done in a Hewlett Packard Model 6890 gas chromatograph, equipped with flame detector Hewlett Packard model 5973, with mass detector, automatic injector and a HP-5MS capillary column of 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm of the film thickness. Temperature of the source 230 °C, temperature of the quadrupole 150 °C; helium portable gas adjusted at a lineal speed of 34 cm s<sup>-1</sup>; ionization energy 70 eV; amplitude of the scan 40-500 amu; 3,9 scans s<sup>-1</sup>. The injected volume was of 1.0 µL of a 2% solution of oil in diethyl ether at a 1:100 relation. The determination of the oil components was done through computerized comparison of the masses spectrum of the oil components of Wiley (sixth edition). Additionally, it was proved that the measured Kováts indexes (IK) for the oil components agreed to the ones reported in the literature (Davies, 1990; Adams, 2007).

### Microbiologic analysis

The antimicrobial activity was evaluated by the diffusion method in agar with discs described by Velasco *et al.* (2007), in relation to *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and



determinación de los componentes del aceite se realizó mediante comparación computarizada de los espectros de masas de los componentes del aceite con los espectros de la librería Wiley (6ta edición). Además, se comprobó que los índices de Kováts (IK) calculados para los componentes del aceite coincidieron con los reportados en la literatura (Davies, 1990; Adams, 2007).

### Analisis microbiológico

La actividad antimicrobiana se evaluó por el método de difusión en agar con discos descrito por Velasco *et al.* (2007), frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

## Resultados y discusión

### Análisis cromatográfico

El rendimiento del aceite esencial de los frutos de *Zanthoxylum* fue de 0,5% con base a materia vegetal húmeda, muy fragante y de color amarillo pálido.

El cuadro 1 muestra la composición química porcentual relativa del aceite. Se identificaron 31 compuestos que representaron el 99,57% de la masa del aceite conformada por una mezcla compleja de terpenos, en concordancia con lo reportado para otras especies de *Zanthoxylum* (Tirillini y Stoppini, 1994; Weyerstahl *et al.*, 1999; Jain *et al.*, 2001; Ngassounm *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2006 y Tangjitjaroenkun *et al.*, 2012). Los componentes más abundantes

*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

## Results and discussion

### Chromatographic analysis

The yield of the essential oil of *Zanthoxylum* was 0.5% with base to humid vegetal matter, with fragrance and pale yellow color.

Table 1 shows the relative chemical percentage composition of oil. Thirty one compounds were identified, which represented 99.57% of the oil mass formed by a complex mix of terpenes, in concordance to the reported by other species of *Zanthoxylum* (Tirillini and Stoppini, 1994; Weyerstahl *et al.*, 1999; Jain *et al.*, 2001; Ngassounm *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2006; Tangjitjaroenkun *et al.*, 2012). The most abundant components resulted to be monoterpenes (97.80%), on which 59.15% were oxygenated monoterpenes and 38.65% hydrocarbonated monoterpenes; additionally, there were two oxygenated sesquiterpenes (1.77%). The main components on the hydrocarbon monoterpenes were  $\beta$ -phellandrene (24.69%) and myrcene (6.76%); meanwhile, *Cis-p-Ment-2-en-1-ol* (11.74%), Linalool (10.34%) and Citronellal (9.87%) were important oxygenated monoterpenes. Other constituents were *Trans-p-2-Ment-2-en-1-ol* (8.68%), *Trans-piperitol* (4.78%), *Cis-piperitol* (2.93%) and Citronellol (2.74%).

Tirillini and Stoppini (1994) in relation to the results of the current research, reported  $\beta$ -phellandrene (36.68%) as the main constituent of the essential oil of secretory glands of *Z. bungeanum* fruits. Gong *et al.* (2009) did not find  $\beta$ -phellandrene

**Cuadro 1. Composición química del aceite esencial de los frutos de una nueva especie de *Zanthoxylum* sp. nov. de Venezuela.****Table 1. Chemical composition of the essential oil of the fruits of a new species of *Zanthoxylum* sp. nov. in Venezuela.**

TR (min)	Componentes	IK lit	IK calc	Área (%)
5,14	$\alpha$ -Pinoeno	939	939	0,70
6,01	Sabineno	975	977	0,30
6,11	$\beta$ -Pinoeno	979	981	0,46
6,29	6-Metil-5-hepten-2-ona	985	988	0,13
6,35	Mirceno	990	990	6,76
6,76	$\alpha$ -Felandreno	1002	1005	1,82
7,07	$\alpha$ -Terpineno	1017	1020	0,90
7,29	<i>p</i> -Cimeno	1024	1028	1,02
7,43	B-felandreno	1029	1031	24,69
8,23	$\gamma$ -Terpineno	1054	1058	0,69
9,10	$\alpha$ -Terpinoleno	1088	1093	1,18
9,47	Linaoolb	1096	1105	10,34
10,17	<i>Cis-p</i> -Ment-2-en-1-ol	1121	1129	11,74
10,72	<i>Trans-p</i> -2-Ment-2-en-1-ol	1140	1146	8,68
10,87	Isopulegol	1145	1149	1,31
11,11	Citronella	1153	1158	9,87
11,23	<i>Iso</i> -isopulegol	1159	1162	0,46
11,87	Terpineol-4-ol	1177	1180	0,66
12,17	Criptona	1185	1189	0,25
12,30	$\alpha$ -Terpineol	1188	1192	0,85
12,45	<i>Cis</i> -Piperitol	1195	1199	2,93

TR (min)= tiempo de retención (minutos). Ik lit: índice de Kováts literatura. Ik calc: índice de Kováts calculado.

**Cuadro 1. Composición química del aceite esencial de los frutos de una nueva especie de *Zanthoxylum* sp. nov de Venezuela (Continuación).**

**Table 1. Chemical composition of the essential oil of the fruits of a new species of *Zanthoxylum* sp. nov. in Venezuela (Continuation).**

TR (min)	Componentes	IK lit	IK calc	Área (%)
12,86	<i>Trans</i> -Piperitol	1208	1197	4,78
13,47	Citronelol	1225	1234	2,74
13,90	Neral	1238	1248	1,15
14,32	Piperitona	1249	1253	1,10
14,80	Geranial	1267	1278	1,45
16,53	Metil geraniato	1324	1331	0,19
17,45	Citronelil acetato	1352	1356	0,40
18,41	Neril acetato	1381	1383	0,25
26,11	<i>T</i> -Cadinol	1640	1648	0,65
26,47	$\alpha$ -Cadinol	1652	1656	1,12
<b>Total</b>				<b>99,57 %</b>

TR (min)= tiempo de retención (minutos). Ik lit: índice de Kováts literatura. Ik calc: índice de Kováts calculado.

resultaron monoterpenos (97,80%), dentro de los cuales 59,15% fueron monoterpenos oxigenados y 38,65% monoterpenos hidrocarbonados; además estuvieron presentes dos sesquiterpenos oxigenados (1,77%). Los principales compuestos dentro de los monoterpenos hidrocarbonados fueron  $\beta$ -Felandreno (24,69%) y Mirceno (6,76%); mientras que *Cis-p*-Ment-2-en-1-ol (11,74%), Linalool (10,34%) y Citronellal (9,87%) fueron los monoterpenos oxigenados

in the essential oil of the fruits *Z. bungeanum*. On the contrary, Tangjitjaroenkum *et al.* (2012) identified Sabineno (42.70%) and  $\alpha$ -phellandrene (39.40%) in the essential oil of the fruits *Z. limonella* Alston, with similar results to the essential oils of the current research.

In this research it was determined that oxygenated monoterpenes (59.15%) were the main components of the essential oil of *Zanthoxylum* fruits. Other authors such as Prieto *et al.*

predominantes. Otros constituyentes importantes fueron *Trans-p-2-Ment-2-en-1-ol* (8,68%), *Trans-piperitol* (4,78%), *Cis-piperitol* (2,93%) y *Citronelol* (2,74%).

Tirillini y Stoppini (1994) en concordancia con los resultados de la presente investigación, reportaron  $\beta$ -Felandreno (36,68%) como el constituyente principal del aceite esencial de las glándulas secretoras de los frutos de *Z. bungeanum*. Gong *et al.* (2009) no encontraron  $\beta$ -Felandreno en el aceite esencial de los frutos de *Z. bungeanum*. En contraste, Tangjitjaroenkum *et al.* (2012) identificaron Sabineno (42,70%) y  $\alpha$ -Felandreno (39,40%) en el aceite esencial de los frutos de *Z. limonella* Alston, con resultados similares a los del aceite esencial objeto del presente estudio.

En esta investigación se determinó que los monoterpenos oxigenados (59,15%) fueron los principales componentes del aceite esencial de los frutos de *Zanthoxylum*. Otros autores tales como, Prieto *et al.* (2011), encontraron abundantes sesquiterpenos en el aceite esencial en los frutos de tres especies de *Zanthoxylum*. Negi *et al.* (2011) en la revisión bibliográfica sobre la composición química de aceite esenciales extraídos de plantas del género *Zanthoxylum*, destacaron alcaloides y cumarinas como constituyentes predominantes. Patiño *et al.* (2012) publicaron sobre la importancia etnobotánica y fitoquímica de las especies del género *Zanthoxylum* por sus componentes bioactivos.

(2011) found abundant sesquiterpenes in the essential oil in the fruits of the three species of *Zanthoxylum*. Negi *et al.* (2011) in the bibliographic revision about the chemical composition of the essential oils extracted from plants of the genus *Zanthoxylum*, mentioned alkaloids and coumarins as main constituents. Patiño *et al.* (2012) published about the ethnobotanic and phytochemical importance of the species of the genus *Zanthoxylum* by its bioactive components.

The results of this research agreed to the ones reported by Wen-Rui *et al.* (2013), about the influence of oxygenated monoterpenes in the essential oil of the pericarp of fruits of *Z. schinifolium*. Sieb. et Zucc. contrasted to the findings of Supabphol and Tangjitjaroenkun (2014), who reported alkaloids, amides and lignin as main components of the essential oil of *Z. limonella*.

### Microbiologic analysis

The evaluation of the antibacterial activity of the essential oil of *Zanthoxylum*, revealed the growth inhibition of the microorganisms assayed excepting *P. aeruginosa*, with inhibition halos from 11-16 mm and CIM values from 50 to 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (table 2). In this sense, Tangjitjaroenkun *et al.* (2012) reported results related to the antibacterial effect of the essential oil of fruits of *Z. limonella* on multi-resistant bacteria such as *S. aureus* and *E. coli*. On the other hand, González de C. *et al.* (2014) published about the antibacterial activity of the essential oil of the fruits of other members of the Rutaceae family (*Swinglea glutinosa* Blanco

Los resultados de esta investigación concordaron con los reportados por Wen-Rui *et al.* (2013), relacionados con el predominio de monoterpenos oxigenados en el aceite esencial del pericarpio de los frutos de *Z. schinifolium* Sieb. et Zucc. Contrastaron con los hallazgos de Supabphol y Tangjitjareonkun (2014), quienes reportaron alcaloides, amidas y ligninas como compuestos mayoritarios del aceite esencial de *Z. limonella*.

### Analisis microbiológico

La evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de los frutos de *Zanthoxylum*, reveló inhibición del crecimiento de todos los microorganismos ensayados a excepción de *P. aeruginosa*, con halos de inhibición entre 11-16 mm y valores de CIM entre 50 y 100  $\mu\text{L mL}^{-1}$  (cuadro 2). En tal sentido, Tangjitjareonkun *et al.* (2012) reportaron resultados relacionados con el efecto antibacteriano del aceite esencial de las frutos de *Z. limonella* sobre bacterias multirresistentes tales como *S. aureus* y *E. coli*. Por otra parte, González de C. *et al.* (2014) publicaron sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de los frutos de otro miembro de la familia Rutaceae (*Swinglea glutinosa* Blanco Merr.), frente a los mismos microorganismos de referencia internacional.

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales es difícil correlacionarla con un componente específico, debido a su complejidad y variabilidad. Sin embargo, existen reportes que la vincularon con su contenido terpénico (Magiates *et al.*, 1999; Tzakou *et al.*, 2001; Filipowicz

Merr.), againsts the same microorganisms of international reference.

The antibacterial activity of the essential oils is difficult to correlate with a specific component, due to its complexity and variability. However, there are reports that linked it to its terpene content (Magiates *et al.*, 1999; Tzakou *et al.*, 2001; Filipowicz *et al.*, 2003). In this sense, 91.54% of the composition of the essential oil of the specie under research was represented by terpenes, compounds with toxic effect against microorganisms, with the cellular rupture and inhibition of the respiration processes and ionic transportation (Meccia *et al.*, 2007; Wen-Rui *et al.*, 2013).

It is important to mention the antibacterial activity observed in the essential oil of fruits of the new species of the studied genus *Zanthoxylum*, which inhibited the development of the microorganisms implied in important infection processes in the man, and the increment in the resistance to commercial anti-microbial, specially in hospitals, creating a public health problem (Cantón and Ruiz-Garbajosa, 2013; Yadav *et al.*, 2015).

### Conclusions

The analysis of the chemical composition of the essential oil obtained from fruits of this new species of *Zanthoxylum* revealed a high content of oxygenated monoterpenes, with the following main compounds:  $\beta$ -phellandrene (24.69%), *Cis-p*-Ment-2-en-1-ol (11.74%), Linalool (10.34%), Citronellal (9.87%) and Myrcene (6.76%).

**Cuadro 2. Actividad antibacteriana del aceite esencial de los frutos de una nueva especie de *Zanthoxylum* sp. nov. de Venezuela.****Table 2. Antibacterial activity of the essential oil of fruits of a new species of *Zanthoxylum* sp. nov. in Venezuela.**

Microorganismos	Zona inhibición (mm)*						CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
	Aceite esencial	Control positivo					
		SAM	VA	GM	AZT	CEF	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (25923)	16*	30*	-	-	-	-	60
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212)	16*	-	23*	-	-	-	60
<i>Escherichia coli</i> ATCC (25922)	15*	-	-	20*	-	-	50
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC (23357)	11*	-	-	-	31*	-	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC (27853)	NA	-	-	-	-	29*	NP

(SAM): Ampicillina-Sulbactam  $\text{\textcircled{R}}$  20  $\mu\text{g}$ ; (VA): Vancomicina  $\text{\textcircled{R}}$  30  $\mu\text{g}$ ; (GM): Gentamicina  $\text{\textcircled{R}}$  10  $\mu\text{g}$ ; (AZT): Aztreonam  $\text{\textcircled{R}}$  30  $\mu\text{g}$ ; CEF: Cefoperozona  $\text{\textcircled{R}}$  75  $\mu\text{g}$ ; \*Zona de inhibición expresada en mm, diámetro de disco 6 mm, promedio de dos ensayos consecutivos; CIM: Concentración inhibitoria mínima, rango de concentración 90-800  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; NA: No activo; NP: No probado.

*al.*, 2003). En tal sentido, el 91,54% de la composición del aceite esencial de la especie en estudio estuvo representada por terpenos, compuestos a los cuales se les ha adjudicado efecto tóxico contra microorganismos, mediante la ruptura celular e inhibición de los procesos de respiración y transporte iónico (Meccia *et al.*, 2007; Wen-Rui *et al.*, 2013).

Es importante resaltar la actividad antibacteriana observada en el aceite esencial de los frutos de la nueva especie del género *Zanthoxylum* investigada, el cual inhibió el desarrollo de microorganismos implicados en importantes procesos

The oil is a therapeutic alternative for future investigations with other microorganisms due to the activity of the essential oil against gram positive bacteria (*S. aureus* and *E. faecalis*) and Gram negative (*E. coli* and *K. pneumoniae*) with clinical importance.

### Acknowledgment

The authors thank the Research Dean of the UNET; also the engineer Juan Carmona (MERF-ULA) and the professor Sulay Zapata (HERBARIUM UNET) by their support in the reception and revision of the botanic

infecciosos en el hombre, aunado al incremento en la multirresistencia a los antimicrobianos comerciales, sobre todo a nivel hospitalario, constituyendo un verdadero problema de salud pública (Cantón y Ruiz-Garbajosa, 2013; Yadav *et al.*, 2015).

## Conclusiones

El análisis de la composición química del aceite esencial obtenido de los frutos de esta nueva especie de *Zanthoxylum* reveló un alto contenido de monoterpenos oxigenados, con los siguientes compuestos mayoritarios:  $\beta$ -Felandreno (24,69%), *Cis-p*-Ment-2-en-1-ol (11,74%), Linalool (10,34%), Citronellal (9,87%) y Mirceno (6,76%).

Debido a la actividad del aceite esencial frente a bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*) y Gram negativas (*E. coli* y *K. pneumoniae*) de importancia clínica, este aceite esencial se ubica como una alternativa terapéutica para futuras investigaciones con otros microorganismos.

## Agradecimientos

Al Consejo del Decanato de Investigación de la UNET; al Ing. Juan Carmona (MERF-ULA) y a la Profa. Sulay Zapata (HERBARIO UNET) por su apoyo en la recepción y revisión del material botánico. Al Dr. Luis B. Rojas (ULA) por el cálculo de los Índices de Kováts. A la Dra. Nidia Cuello (PORT) por sus esfuerzos y aportes para generar el producto reflejado en el estudio del material botánico.

material. Also, Dr. Luis B. Rojas (ULA) by his calculus of Kováts indexes. Dr. Nidia Cuello and Gerardo Aymard (PORT) by their efforts and knowledge to generate the product in the study of botanic material.

*End of English version*

---



---

## Literatura citada

- Adams, R. 2007. Identification of essential oil components by CG/MS. Allured Publishing Corporation, Carol Stream IL, USA. 9 p.
- Bono, G. 1996. Flora y vegetación del estado Táchira. Museo Regionale di Scienze Naturali Torino, Italia. 790 p.
- Cantón, R. y P. Ruiz-Garbajosa. 2013. Infecciones causadas por bacterias grampositivas multirresistentes (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp.). Enferm. Infec. Micro. Cl. 31(8):543-551.
- Coutinho, H.D.M., V. Falcão-Silva, J.P. Siquiera-Júnior and J.G.M. Costa. 2010. Use of aromatherapy associated with antibiotic therapy: Modulation of the antibiotic activity by the essential oil of *Zanthoxylum articulatum* using gaseous contact. J. Essent. Oil Bear. Pl. 13(6):670-675.
- Davies, N. 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and carbowax 20M phases. J. Chromatogr. A. 503:1-24.
- De Moura, N.F., J.O. Strapazzon, F. Loro, A.F. Morel and A. Flach. 2006. Composition of the leaf oils of Rutaceae: *Zanthoxylum hyemale* A. St. Hill, *Z. rhoifolium* Lam. and *Z. rugosum* A. St. Hill et. Tul. J. Essent. Oil Res. 18(6):627-628.
- Filipowicz, N., M. Kaminski, J. Kurlenda and M. Asztemborska. 2003. Antibacterial

and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components. *Phytother. Res.* 17(3):227- 231.

- González de C., N., C. Araque, Z. Montilva., J. Velasco y A. Usubillaga. 2014. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de frutos de *Swinglea glutinosa* (Blanco) Merr. *Revista Científica UNET.* 26(2):127-132.
- Gong, Y., Y. Huang, L. Zhou, X. Shi and Z. Guo. 2009. Chemical composition and antifungal activity of the fruit oil of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. (Rutaceae) from China. *J. Essent. Oil Res.* 21:174-178.
- Hokche, O., P.E. Berry y O. Huber. 2008. Catálogo de la flora vascular de Venezuela. Edit. Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser. Caracas, Venezuela. 599 p.
- Jain, N., S.K. Srivastava, K.K. Aggarwal, S. Ramesh and S. Kumar. 2001. Essential oil composition of *Zanthoxylum alatum* seeds from northern India. *Flav. Frag. J.* 16(6):408-410.
- Kala, C.P. 2005. Ethnomedicinal botany of the Apatani in the eastern Himalayan region of India. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 1:1-8.
- Kallunki, J. 2005. Rutaceae. p. 1-39. *In: Flora of the Venezuelan Guayana. Vol. 9. Rutaceae-Zygophyllaceae.* Berry, P., B.K. Holst & K. Yatskievych (Eds.). Missouri Botanical Garden Press, St. Louis; Timber Press, Portland.
- Magiatis, P., E. Melliou, A.L. Skaltsounis, I.B. Chinou, and S. Mitaku. 1999. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Pistacia lentiscus* var. Chia. *Planta Med.* 65(8):749-752.
- Metha, M.B., M.D. Kharya and R. Srivastava. 1981. Antimicrobial and anthelmintic activities of the essential oil of *Zanthoxylum alatum* Roxb. *Indian Perfume* 25(2):19-21.
- Meccia, G., L.B. Rojas, J. Velasco, T. Díaz and A. Usubillaga. 2007. Composition and antibacterial screening of the essential oil of leaves and roots of *Espeletopsis augustifolia* Cuatrec. *Nat. Prod. Commun.* 2(12):1221-1224.
- Morton, J.F. 1981. Atlas of medicinal plants of Middle America, Bahamas to Yucatan. Volume I. Rutacea Springfield, Illinois, USA. 381 p.
- Negi, J.S., V.K. Bisht, A.K. Bhandari, M.K. Bharti and R.C. Sundriyal. 2011. Chemical and pharmacological aspects of Toona (Meliaceae). *Res. J. Phytochem.* 5:14-21.
- Ngassounm, M.B., J.J. Essia-Ngang, L.N. Tatsadjieu, L. Jirovetz, G. Buchbauer and O. Adjoudji. 2003. Antimicrobial study of essential oils of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. *Fitoterapia* 74(3):284-287.
- Patiño, O.J., J.A. Prieto and S.L.E. Cuca. 2012. *Zanthoxylum* genus as potential source of bioactive compounds. p. 189-195. *In: Bioactive Compounds in Phytomedicine.* InTech. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/bioactive-compounds-in-phytomedicine/zanthoxylum-genus-as-potential-source-of-bioactive-compounds>. Fecha de consulta: diciembre de 2016.
- Prieto, J.A., O.J. Patiño, W.A. Delgado, J.P. Moreno and L.E. Cuca. 2011. Chemical composition, insecticidal, and antifungal activities of fruit essential oils of three Colombian *Zanthoxylum* species. *J. Agric. Res.* 71(1):73-82.
- Reynel, C. 1995. New Andean *Zanthoxylum* (Rutaceae) with distinctive vegetative characters. *Novon* 5(4):362-367.
- Sanoja, E. 2009. Nueva especie de *Zanthoxylum* L. (Rutaceae) de Sierra de Lema, Estado Bolívar, Venezuela. *Acta Bot. Venez.* 32(2):303-310.
- Supabphol, R. and J. Tangjitjareonkun. 2014. Review article chemical constituents and biological activities of *Zanthoxylum limonella* (Rutaceae). *Trop. J. Pharm. Res.* 13(12):2119-2130.
- Tangjitjareonkun, J., W. Chavasiri, S. Thunyaharn y C.H. Yampakdee.



2012. Bactericidal effects and time-kill studies of the essential oil from the fruits of *Zanthoxylum limonella* on multi-drug resistant bacteria. *J. Essent. Oil Res.* 24(4):363-370.

Tatsadjieua, L.N., J.J. Essia Nganga, M.B. Ngassouma and F.X. Etoab. 2003. Antibacterial and antifungal activity of *Xylopiya aethiopica*, *Monodora myristica*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum lepreurii* from Cameroon. *Fitoterapia* 74(5):469-472.

The Plant List (2013). Version 1.1. Published on the Internet. Disponible en: <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January). Fecha de consulta: octubre de 2016.

Tirillini, B. and A.M. Stoppini.1994. Volatile constituents of the fruit secretory glands of *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. *J. Essent. Oil Res.* 6:249-252.

Tzakou, O., D. Pitarokili, I.B. Chinou and C. Harvala. 2001. Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Salvia ringens*. *Planta Med.* 67(1):81-83.

Usubillaga, A., R. Aparicio, M. Romero, L.B. Rojas and N. Khouri. 2001. Volatile constituents from the leaves of four *Libanothamus* species from the Venezuela Andes. *Flav. Frag. J.* 16:209-211.

Velasco, J., J. Rojas., P. Salazar., M. Rodríguez., T. Díaz., A. Morales and M Rondón. 2007. Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia oreganoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. *Nat. Prod. Commun.* 2(1):85-88.

Wen-Rui, D., H. Qing-Ping, F. Sai-Sai, L. Wei-Qin and X. Jian-Guo. 2013. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from green huajiao (*Zanthoxylum schinifolium*) against selected foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 61(25):6044-6049.

Weyerstahl, P., H. Marschall, U. Splittgerber, P.T. Son, P.M. Giang and V.K. Kaul. 1999. Constituents of the essential oil from the fruits of *Zanthoxylum rhesoides* Drake from Vietnam and from the aerial parts of *Zanthoxylum alatum* Roxb. from India. *Flav. Frag. J.* 14(4):225-229.

Yadav, K., N. Adhikari, R. Khadka, A. Pant y B. Shah. 2015. Multidrug resistant Enterobacteriaceae and extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli*: a cross-sectional study in National Kidney Center, Nepal. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 4(42):2-7.