

COMUNICACIÓN CORTA

Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruta chalepensis* L.

Oriela Pino^I, Yaíma Sánchez^I, Miriam M. Rojas^I, Yudith Abreu^I, Teresa M. Correa^{II}, Dayamín Martínez^{II}, Rodney Montes de Oca^{II}

^IGrupo de Plagas Agrícolas, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. Teléfono: 47863014 ext-180. Correo electrónico: oriela@censa.edu.cu. ^{II}Laboratorio Anti-Doping, Instituto de Medicina Deportiva (IMD). 100 y Aldabó, Boyeros, La Habana, Cuba.

RESUMEN: El aceite esencial de *Ruta chalepensis* L, hierba perteneciente a la familia *Rutaceae*, es de utilidad en perfumería, como saborizante y posee actividad insecticida. Su composición depende de las condiciones geobotánicas específicas y se han descrito varios quimiotipos. El objetivo de este trabajo fue establecer las potencialidades del aceite esencial de *R. chalepensis* como candidato para el desarrollo de nuevos antibacterianos en el manejo de fitopatógenos. El aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación con equipo Clevenger; se determinó su rendimiento y su composición química se investigó por CG/EM. La evaluación del efecto antibacteriano se realizó por difusión en agar. En la composición del aceite esencial de ruda (rendimiento 0,3 % (v/p)) predominaron las cetonas alifáticas; las de mayor abundancia relativa fueron 2-undecanona (34,88 %) y 2-nonanona (25,23 %). La esencia de *R. chalepensis* inhibió el crecimiento de *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*. El efecto antibacteriano sugiere que esta esencia podría constituir la base del desarrollo futuro de nuevos antimicrobianos para el manejo de plagas en caña de azúcar y tomate.

Palabras clave: *Ruta chalepensis*, *Xanthomonas albilineans*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, aceite esencial, cetonas.

Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil from *Ruta chalepensis* L.

ABSTRACT: The essential oil of *Ruta chalepensis* L, herb belonging to *Rutaceae* family, is useful in perfumery, for flavoring and has insecticidal activity. Its composition depends on the specific geobotanical conditions, and several chemiotypes has been described. The aim of this work was to establish the potential of the essential oil obtained from *R. chalepensis* as a candidate for the development of new antibacterials in the management of plant pathogens. The essential oil was obtained by hydrodistillation with a Clevenger equipment; the yield determined and its chemical composition investigated by GC/MS. The antibacterial assessment was conducted using the agar diffusion technique. In the composition of the essential oil of rue (yield of 0.3 % (v/w)), aliphatic ketones were predominant; 2-undecanone (34.88%) and 2-nonanone (25.23%) showed the higher relative abundance. *R. chalepensis* essence inhibited growth of *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.* The antibacterial effect suggests that this essence can provide the basis for future development of new antimicrobials for pest management in sugar cane and tomato.

Key words: *Ruta chalepensis*, *Xanthomonas albilineans*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, essential oil, ketone.

La ruda (*Ruta chalepensis* L.) es una hierba perteneciente a la familia *Rutaceae*, que se cultiva en jardines, organopónicos y huertos (1, 2). Esta especie se emplea ampliamente en medicina tradicional para tratar picaduras de insectos, la gota, reumatismo, problemas estomacales, nerviosos y cardíacos; también se utiliza como planta repelente por los campesinos (1,2,3,4). El aceite esencial de *R. chalepensis* es de utilidad en perfumería; en la industria alimenticia como saborizante; además, posee actividad insecticida (5), repelente (5) y antifúngica (6). Su composición química se caracteriza por la abundancia de cetonas (5, 6). Sin embargo, se describieron varios quimiotipos asociados a diferentes condiciones geobotánicas (3) y los aceites esenciales extraídos de las partes aéreas difieren drásticamente de los obtenidos de las raíces (7).

Las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se investigaron para sugerir su selección como herramientas potenciales en la solución de los problemas asociados a la resistencia de los microorganismos y las enfermedades que estos causan (6). Esta actividad es variable de una cepa microbiana a otra (6) y de un aceite a otro, en dependencia de su composición química (8).

Las estrategias de manejo de bacterias fitopatógenas incluyen la utilización de semillas y plántulas sanas y la aplicación de antibióticos y compuestos de cobre. Sin embargo, estas estrategias no son siempre efectivas, especialmente cuando las condiciones ambientales son óptimas para la enfermedad o los niveles de inóculo son altos. Además, los tratamientos con plaguicidas pueden conducir a la selección de bacterias resistentes a los antibióticos. Esta situación es significativa para bacterias como *Xanthomonas albilineans* (Ashby) Dowson y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al.*, que provocan pérdidas considerables en cultivos de importancia económica (9, 10).

X. albilineans es un patógeno sistémico que causa la escaldadura foliar, enfermedad letal de la caña de azúcar. Esta bacteria se transmite a través de la semilla y los instrumentos infectados (9). *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* causa la enfermedad conocida como marchitez bacteriana del tomate y este patógeno se considera el más importante en las semillas de esta especie. La bacteria se transmite, probablemente, de uno o varios lotes de semillas a las plántulas y se multiplica en viveros, los cuales proveen plantas con la infección latente a las casas de cultivo comerciales (10). Las especies *X. albilineans* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* constituyen una

amenaza severa y constante en áreas productoras de caña de azúcar y tomate. Las afectaciones que provocan en producciones protegidas y a campo abierto demandan la búsqueda de alternativas de manejo, pues hasta el momento las medidas fitosanitarias utilizadas para su control no resultan efectivas (9, 10). El objetivo de este trabajo fue establecer las potencialidades del aceite esencial de *R. chalepensis* como candidato para el desarrollo de nuevos antibacterianos para el manejo de estos fitopatógenos.

Obtención del aceite esencial. Las hojas de *R. chalepensis* se recolectaron en el Municipio El Salvador (Guantánamo) en mayo de 2009. El aceite esencial se extrajo por hidrodestilación con equipo Clevenger durante tres horas (3). Posteriormente, se secó sobre sulfato de sodio (puro para análisis, AppliChem) y se almacenó a 8°C. Se calculó el rendimiento del aceite esencial mediante la expresión: $R = (V/M) \times 100$; donde: R: rendimiento (%), V: volumen del aceite esencial (ml) y M: masa del material vegetal (g).

Determinación de la composición química. La composición química del aceite se determinó por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, en un cromatógrafo de gases de la serie Agilent 6890 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) con un inyector del tipo «split splitless» (relación de split 20:1) acoplado con un espectrómetro de masas de la serie Agilent 05973 (ambos provenientes de la firma Agilent Technologies). Se utilizó una columna capilar SPB-5 (L=15m; DI=0,25mm; f=0,10mm) con una inyección de 2 µl. La temperatura del horno se programó a 60°C (2 min isotérmicos), seguido de una rampa de calentamiento hasta 100°C a razón de 4°C.min⁻¹ y otra rampa de 10°C.min⁻¹ desde 100°C hasta 250°C, donde finalmente permaneció durante 5 min isotérmicos. Como gas portador, se usó Helio con un flujo constante de 1,0 ml.min⁻¹. El espectrómetro de masas trabajó en modo scan de adquisición a 70eV. Se utilizó un analizador cuadrupolar a 150°C de temperatura del cuadrupolo; el detector trabajó en un rango de masas de hasta 800 uma, las temperaturas de la interfase y de la fuente fueron 280°C y 230°C, respectivamente. La identificación de los compuestos se llevó a cabo mediante el uso combinado de las bases de datos automatizadas NBS-NISTASCI y Wiley 275 y el Atlas Registry of Mass Spectra Data.

Ensayos de actividad antibacteriana. Se utilizaron las bacterias fitopatógenas *X. albilineans* (cepa JR) y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (cepa C21), pertenecientes al cepario del Laboratorio de Bacteriología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). La bacteria *X. albilineans* se

aisló de muestras procedentes de la Estación Territorial de Investigaciones de la Caña de Azúcar (ETICA) de Jovellanos y se identificó mediante métodos moleculares; mientras que *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, procedente de muestras de tomate, se aisló y caracterizó mediante técnicas morfológicas y bioquímicas.

Las bacterias se sembraron en medio Wilbrink (BDH) y Agar Nutriente (Biocen), respectivamente, y se incubaron a 28°C durante 48 horas. A partir de las colonias obtenidas, se prepararon suspensiones bacterianas en solución salina estéril (Cloruro de sodio (Merck) al 0,85%), hasta lograr una concentración de inóculo de $1-2 \times 10^{10}$ Unidades Formadoras de Colonias (UFC) $\cdot \text{ml}^{-1}$, equivalente a una densidad óptica de 1 a una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro (T90 + UV/Vis Spectrometer PG Instruments Ltd). De este inóculo se tomaron alícuotas de 20 μl se depositaron en placas Petri estériles de 9 cm con 20 ml del medio correspondiente para cada bacteria y se dispersaron con espátula de Drigalski.

Para evaluar la sensibilidad de estos microorganismos al aceite esencial, se empleó el método de difusión en agar, según la técnica estandarizada por el Instituto de Estándares de Laboratorios y Clínicas (CLSI; 2012) (11). Cuatro discos de papel de filtro (6 mm de diámetro) se depositaron cuidadosamente de forma equidistante sobre el medio inoculado con las suspensiones bacterianas. Se colocaron dos papeles tratados con la dosis correspondiente (10; 5 ó 2,5 μl) del aceite y dos papeles control (sin aceite) por placa. Se empleó un control del crecimiento bacteriano y, como control positivo, discos de Kanamicina (10 $\mu\text{g} \cdot \text{disco}^{-1}$) producidos por el Ministerio de Salud Pública (MINSAP, Cuba). La temperatura de incubación fue de 28°C, durante 48 horas. Una vez transcurrido este tiempo se midió el halo de inhibición del crecimiento bacteriano con una regla graduada.

La evaluación se realizó por cuatuplicado para cada tratamiento. Los resultados de las diferentes dosis evaluadas se compararon a través de un análisis de varianza, empleando la prueba de rangos múltiples de Duncan y el paquete estadístico SAS 9.0.

La hidrodestilación de las hojas de ruda produjo un aceite de olor intenso y penetrante. El rendimiento fue de 0,3% (v/p), valor inferior a los obtenidos para esta especie por otros autores (5,51% (4) y 0,8% (12)). El contenido total de aceite esencial en las plantas se puede afectar por el genotipo, el clima, la localidad de crecimiento, las precipitaciones y el régimen de recolecta (6). La variabilidad del rendimiento también puede asociarse a la existencia de subespecies (12), dife-

rencias en el secado del material vegetal (4), variaciones en los parámetros de destilación (4, 13), entre otros factores.

La composición química del aceite de *R. chalepensis* se caracterizó por el predominio en la mezcla de las cetonas alifáticas, con 70% de abundancia relativa (Tabla 1). Los componentes mayoritarios fueron la 2-undecanona y la 2-nonanona, que representaron el 60,11% del aceite, seguidas por el 1-noneno y la 2-dodecanona (Figura). El predominio de 2-cetonas es una característica detectada en aceites esenciales obtenidos a partir de otras plantas del mismo género (6).

La 2-undecanona, por su presencia como componente mayoritario en los aceites esenciales de varias especies de *Ruta*, es considerada como un marcador para este género (3). La prevalencia de este compuesto en el aceite estudiado permite incluirlo en el quimiotipo 2-undecanona, en correspondencia con su valor de abundancia relativa, que está comprendido en el rango de 20,40 a 82,74 % informado previamente (12). No obstante, el contenido de esta cetona fue inferior al encontrado en varias de las esencias analizadas en otros estudios (83,40 (12); 77,70 (13); 77,18 (4); 67,80; 66,49; 66,50 y 52,50 % (3)).

El aceite cubano se distingue por el elevado contenido de 2 nonanona. Esta cetona se detectó en solo seis de 16 muestras analizadas en investigaciones precedentes (3, 4, 12) y su contribución relativa fue superior al 20%, exclusivamente en las esencias procedentes de Irán (3) y Argelia (6). También la 2-dodecanona fue más abundante en el aceite estudiado que en los obtenidos de las plantas recolectadas en Argelia (6), Túnez (4), Turquía, Grecia, España y Portugal (3). En la mezcla investigada no se detectaron: α -pineno, alcanfor, sabineno y β -felandreno; hidrocarburos terpénicos que sí se identificaron previamente en esencias de esta especie (3, 4, 6). Las diferencias cualitativas y cuantitativas en la composición química del aceite de ruda estudiado, con los alcanzados en investigaciones anteriores a partir de esta planta, pueden deberse a diferencias en los orígenes geográficos, condiciones climáticas y el método de extracción (3, 4, 6).

El aceite de *R. chalepensis* evidenció un elevado efecto antibacteriano sobre *X. albilineans* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* (Tabla 2). Las dos dosis superiores de aceite produjeron una inhibición total del crecimiento de ambas bacterias y, al aplicar el menor volumen, la primera fue más susceptible. La diferencia de susceptibilidad entre las dos bacterias, a la menor dosis aplicada, se corresponde con los

TABLA 1. Composición química del aceite esencial de *Ruta chalepensis*./ *Chemical composition of Ruta chalepensis essential oil.*

| Pico | t _r (min) | Abundancia relativa (%)* | Identificación |
|-----------|----------------------|--------------------------|---|
| 1 | 6,967 | 25,23 | 2-nonanona |
| 2 | 7,034 | 1,09 | 2-nonanol |
| 3 | 7,693 | 0,44 | 3,4-dietenil-3-metil ciclohexeno |
| 4 | 7,934 | 3,31 | geyreno |
| 5 | 8,918 | 0,51 | 1-nonanol |
| 6 | 9,639 | 2,94 | 2-decanona |
| 7 | 11,011 | 10,93 | 1-noneno |
| 8 | 11,574 | 0,41 | 2-hidroxi-1,1,2-trimetil-oxetano |
| 9 | 13,041 | 34,88 | 2-undecanona |
| 10 | 13,158 | 0,48 | 2-heptadecanol |
| 11 | 13,708 | 0,34 | 5-deceno |
| 12 | 14,842 | 5,11 | 2-dodecanona |
| 13 | 15,288 | 0,13 | 6-[(1E)-1,3-butadienil]-1,4-cicloheptadieno |
| 14 | 15,488 | 1,59 | 2-undeceno |
| 15 | 16,418 | 1,82 | 2-tridecanona |
| 16 | 16,564 | 0,24 | α-farneseno |
| 17 | 17,106 | 0,78 | elemol |
| 18 | 17,294 | 0,10 | nerolidol |
| 19 | 17,811 | 0,11 | trans-isolimoneno |
| 20 | 18,140 | 0,13 | γ-eudesmol |
| 21 | 18,611 | 0,35 | 7-fenil-3-heptanol |
| 22 | 20,183 | 1,31 | 5,7-dimetoxi-6-metil-1,4-naftoquinona |
| 23 | 20,270 | 0,43 | 5-(1,1-dimetiletil)-1,3-benzodioxol |
| 24 | 22,400 | 1,47 | 1-(2-metoxibencil)-naftaleno |
| 25 | 23,097 | 0,48 | fitol |
| 26 | 23,614 | 0,33 | isomaturina |

t_r (tiempo de retención)

*Se presenta la identificación de los compuestos presentes en el aceite con una abundancia relativa mayor que 0,1%.

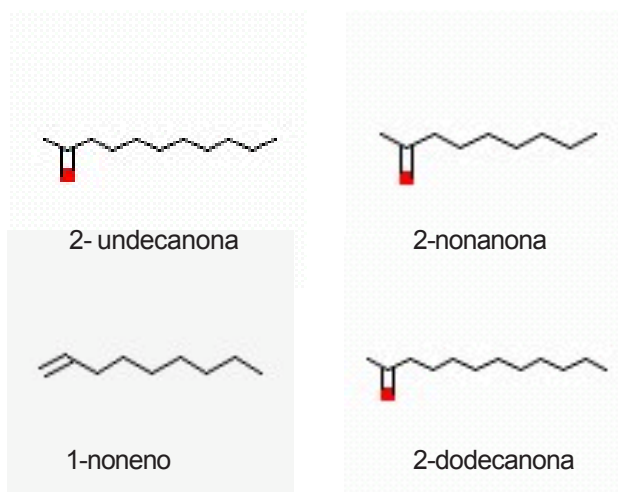


FIGURA. Componentes principales del aceite esencial de *Ruta chalepensis*./ *Main components of Ruta chalepensis essential oil.*

resultados obtenidos en muchos estudios previos que evidenciaron que las bacterias Gram-positivas (como *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*) son más resistentes a los aceites esenciales que las Gram-negativas (entre las que se incluye *X. albilineans*) (14). La esencia mostró un efecto superior al del antibiótico utilizado como control, lo que revela sus potencialidades como antibiótico.

En la literatura consultada no se encontró información sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial de *R. chalepensis* sobre los microorganismos fitopatógenos estudiados. El extracto alcohólico de esta planta provocó la inhibición del crecimiento de las bacterias fitopatógenas *Xanthomonas campestris* (Hedges) pv. *vesicatoria* (Doidge) Dows y *Erwinia carotovora* (L.R. Jones) Holland (15). Por consiguiente, los resultados obtenidos confirman las potencialidades de esta especie vegetal como fuente de metabolitos secundarios con actividad plaguicida.

TABLA 2. Inhibición del crecimiento de *Xanthomonas albilineans* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* provocada por diferentes dosis del aceite esencial de *Ruta chalepensis*./ Growth inhibition of *Xanthomonas albilineans* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* caused by different doses of *Ruta chalepensis* essential oil.

| Bacteria | Tratamiento | Cantidad.disco ⁻¹ | Halo de inhibición (mm)* |
|--|-----------------|------------------------------|--------------------------|
| <i>Xanthomonas albilineans</i> | Aceite esencial | 10 µl | 90,0 a |
| | | 5 µl | 90,0 a |
| | | 2,5 µl | 90,0 a |
| | Kanamicina | 10 µg | 17,5 b |
| <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> | Aceite esencial | 10 µl | 90,0 a |
| | | 5 µl | 90,0 a |
| | | 2,5 µl | 67,5 a |
| | Kanamicina | 10 µg | 13,5 b |

*Para cada bacteria letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

En la composición del aceite de ruda prevalecen los compuestos oxigenados, con una contribución de más del 75% de abundancia relativa, y la actividad antibacteriana podría asociarse a su presencia. Dentro de ellos, la 2-undecanona, cetona más abundante en este aceite, inhibió las bacterias *Escherichia coli* (Theodore von Escherich) y *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) en un estudio previo (16), lo que fortalece la posible vinculación de este compuesto con el efecto observado en el presente trabajo.

También, esta actividad antibacteriana puede no deberse únicamente a los compuestos mayoritarios; otra opción es la posible sinergia entre los componentes del aceite esencial. Una de las ventajas que se atribuye a la utilización de los aceites esenciales como antibióticos, es la menor la probabilidad de desarrollo de resistencia por parte de los patógenos a los mismos, debido a que, por lo general, comprenden un gran número de componentes y es probable que su modo de acción involucre varias dianas en la célula bacteriana (17). La hidrofobicidad de los aceites esenciales les permite particionarse en los lípidos de la membrana celular y la mitocondria, lo cual provoca la desestabilización de las estructuras celulares y un aumento en la permeabilidad que produce la pérdida del contenido celular y conduce a la muerte (14).

La actividad antibacteriana del aceite de *R. chalepensis* sobre *X. albilineans* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* evidencia sus potencialidades para el desarrollo de nuevos plaguicidas para el manejo de plagas en caña de azúcar y tomate. No obstante, se requieren estudios posteriores para determinar el costo, efectividad, seguridad y fitotoxicidad de estos agentes bioactivos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Víctor Fuentes del Instituto de Ecología y Sistemática por la identificación de la especie vegetal.

REFERENCIAS

1. Beyra A, León MC, Iglesias E, Ferrándiz D, Herrera R, Volpato G, et al. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). Anales del Jardín Botánico de Madrid. 2004;61(2):185-204.
2. Mesa JTR. Diccionario Botánico de Nombres Vulgares Cubanos. La Habana: Editora del Consejo Nacional de Universidades; 1965.
3. Ferhat M, Kabouche A, Kabouche Z. Comparative compositions of essential oils of three *Ruta* species growing in different soils. J Mater Environ Sci. 2014;5(3):735-738.
4. Mejrib J, Abderrabbab M, Mejri M. Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L: Influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts. Industrial Crops and Products. 2010;32:671-673.
5. Conti B, Leonardi M, Pistelli L, Profeti R, Ouerghemmi I, Benelli G. Larvicidal and repellent activity of essential oils from wild and cultivated *Ruta chalepensis* L. (*Rutaceae*) against *Aedes albopictus* Skuse (*Diptera: Culicidae*), an arbovirus vector. Parasitol Res. 2013;112(3):991-999.

6. Haddouchi F, Chaouche TM, Zaouali Y, Ksouri R, Attou A, Benmansour A. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from four *Ruta* species growing in Algeria. *Food Chemistry*. 2013;141:253-258.
7. Stashenko EE, Villa HS, Combariza MY. Comparative study of Colombian Rue oils by High Resolution Gas Chromatography using different detection systems. *J Microcolumn Separations*. 1995;7(2):117-122.
8. Amri I, Hanana M, Gargouri S, Jamoussi B, Hamrouni L. Comparative study of two coniferous species (*Pinus pinaster* Aiton and *Cupressus sempervirens* L. var. *dupreziana* (A. Camus) Silva) essential oils: chemical composition and biological activity. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 2013;73(3):259-266.
9. Marguerettaz M, Pieretti I, Gayral P, Puig J, Brin C, Cociancich S, et al. Genomic and evolutionary features of the SPI-1 Type III secretion system that is present in *Xanthomonas albilineans* but is not essential for xylem colonization and symptom development of sugarcane leaf scald. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2011;24(2):246-59.
10. León L, Rodríguez A, Llop P, López MM, Siverio F. Comparative study of genetic diversity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates from the Canary Islands by RAPD-PCR, BOX-PCR and AFLP. *Plant Pathology*. 2009;58:862-871.
11. Institute CaLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. Approved Standard M02-A11. Wayne, Pa: CLSI; 2012.
12. Boudiar T, Labeled I, Safaei-Ghomi J, Kabouche A, Kabouche Z. Analysis of the Essential Oil of *Ruta chalepensis* subsp. *angustifolia* from Algeria. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2011;14(6):792-795.
13. Jamel J, Bouajila J, Aydi A, Barth D, Abderrabbaa M, Mejri M. Supercritical CO₂ Extract and Essential Oil of *Ruta chalepensis* L. growing in Tunisia: A natural source of Undecan-2-one. *Analytical Chemistry Letters*. 2012;2(5):290-300.
14. Solórzano-Santos F, Miranda-Novales MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol*. 2011;23:1-6.
15. Grillo H, Castro N, Díaz A, Martín J, Fajardo E, Pérez A. Efectos de extractos alcohólicos de ruda (*Ruta chalepensis* L.) y albahaca (*Ocimum basilicum* L.) sobre bacterias fitopatógenas. *Centro Agrícola*. 2001;28(3):20-23.
16. Gibka J, Kunicka-Styczyńska A, Gliński M. Antimicrobial activity of Undecan-2-one, Undecan-2-ol and their derivatives. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2009;12(5):605-614.
17. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004;94:223-53.

Recibido: 5-10-2014.

Aceptado: 7-11-2014.