



## **Estudio comparativo de la composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. recolectada en los estados Mérida y Miranda, Venezuela.**

**Janne Rojas<sup>1\*</sup>, Tamara Mender<sup>2</sup>, Luis Rojas<sup>1</sup>, Eliana Gullien<sup>2</sup>, Alexis Buitrago<sup>1</sup>, Maria Lucena<sup>3</sup>, Nicolas Cardenas<sup>1</sup>.**

1) Grupo Biomoléculas Orgánicas, Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes. Sector Campo de Oro. Mérida, Apartado Postal 5101, Venezuela.

2) Unidad de Estudios Básicos. Departamento de Ciencias. Área de Química. Universidad de Oriente. Apartado Postal 8001

3) Departamento de Bioanálisis Clínico. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

(\*) [janner@ula.ve](mailto:janner@ula.ve).

**Recibido:** 30/08/2011

**Revisado:** 24/11/2011

**Aceptado:** 25/11/2011

### **Resumen:**

Los aceites esenciales de dos muestras de *R. graveolens* procedentes de los estados Mérida y Miranda; Venezuela, fueron analizados por **CG/EM** lográndose identificar como componentes mayoritarios: 2-undecanona, 2-nonanona y pregeijereno. Por otro lado, los ensayos de actividad antibacteriana mostraron que los aceites presentan un amplio rango de inhibición del crecimiento tanto para bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*) como Gram negativas (*E. coli* y *K. pneumoniae*) exhibiendo valores de CIM entre 100 µg/mL y 200 µg/mL.

**Palabras clave:** *Ruta graveolens*; Rutaceae; 2-undecanona; 2-nonanona; pregeijereno; actividad antibacteriana

### **Abstract**

Essential oil from two *R. graveolens* samples collected from Mérida and Miranda states, Venezuela, were analyzed by **GC/MS** identifying as major components: 2-undecanone, 2-nonanone and pregeijerene. On the other hand, the antibacterial activity assays showed the wide range of activity of the oils that inhibited the bacterial strains grow not only for the Gram positive (*S. aureus* and *E. faecalis*) but the Gram negative (*E. coli* and *K. pneumoniae*) as well, displaying **MIC** values between 100 µg/mL and 200 µg/mL.

**Keywords:** *Ruta graveolens*; Rutaceae; 2-undecanone; 2-nonanone; pregeijerene; antibacterial activity

### **Introducción**

La especie *Ruta graveolens* L. perteneciente a la familia Rutaceae, es una hierba perenne de aproximadamente 30-60 cm, posee flores de color amarillo y se caracteriza por su olor fuerte y penetrante. Es nativa de Europa pero fue introducida en América en la edad media, encontrándose en diferentes países de Centro y Suramérica. En Venezuela se cultiva en las regiones de clima templado, especialmente en los estados Mérida, Táchira, Trujillo, Lara y Miranda<sup>1</sup>. Muchas especies del género *Ruta* son conocidas por sus usos medicinales, entre los que se incluyen actividad antifúngica, antibacteriana, analgésica, antiinflamatoria y antihelmíntica<sup>2,3</sup>.

Estudios previos realizados al extracto acuoso de *Ruta graveolens* reportaron actividad anticonceptiva observándose que interfiere en el sistema reproductivo, alterando el nivel hormonal y la morfología de los ovarios en ratas hembras jóvenes<sup>4</sup>.

En relación a la composición química se han reportado alcaloides del tipo acridinas y quinolinas; flavonoides, cumarinas, fitotoxinas y terpenos; algunos de estos compuestos se les han atribuido propiedades citotóxicas y anticoagulantes<sup>5-7</sup>.

Por otro lado, los aceites esenciales de varias especies de *Ruta* han sido estudiados en diferentes ocasiones, reportándose principalmente compuestos del tipo mono-terpeno, sesquiterpeno y cetonas. El aceite de *R. graveolens* colectado en Irán mostró: 2-undecanona, 2-heptanol, 1-dodecanol, geireno y 2-nonanona como compuestos mayoritarios<sup>8</sup>, mientras el aceite de *Ruta chalepensis* estudiado en Tunisia presentó 2-nonanona y 2-undecanona como los compuestos en mayor proporción<sup>9</sup>.

De igual manera, algunos ensayos para determinar la actividad antibacteriana también han sido reportados para el

aceite esencial de esta especie, observándose actividad contra *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Listeria monocytogenes*<sup>9</sup>.

En la presente investigación se pretende realizar un estudio comparativo de la especie *R. graveolens* L. recolectada en dos localidades diferentes, estados Mérida y Miranda, con el propósito de identificar los componentes volátiles y determinar su actividad antibacteriana.

## Parte experimental

### Material vegetal

Las partes aéreas de *Ruta graveolens* L. fueron recolectadas en el Municipio Libertador (estado Mérida) a 1.500 m.s.n.m y en el Municipio El Hatillo (estado Miranda) a 1.175 m.s.n.m. Las muestras botánicas fueron determinadas por el Ing. Juan Carmona y depositadas en el Herbario MERF "Luís Ruiz Terán" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, bajo los números JR45 y JR46.

### Extracción del aceite

Las partes aéreas frescas; 410 g para la muestra de Miranda (MI) y 260 g para la muestra de Mérida (ME) se licuaron y colocaron por separado en un equipo de hidrodestilación, empleando la trampa de Clevenger durante 4 horas. Los aceites obtenidos se secaron con sulfato de sodio anhidro y se colocaron en frascos de color ámbar guardadas en la oscuridad bajo refrigeración a 4 °C.

### Cromatografía de gases (CG)

El análisis por CG se realizó en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer modelo AutoSystem, provisto de una columna capilar AT-5 (60 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno). Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 1 mL/min., con un volumen de inyección de la muestra de relación de split de 1:100. Temperatura inicial: 60°C (5 min.); temperatura final: 200°C (20 min.); gradiente de temperatura: 4°C/ min.; tiempo total de análisis: 60 min.; temperatura del inyector: 250°C; temperatura de la interfase: 280°C. Los Índices de Kováts (IK) fueron calculados en relación a una serie de 10 *n*-alcanos (de C<sub>6</sub> a C<sub>18</sub>) utilizados como estándares internos<sup>10,11</sup>.

### Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)

El estudio por CG/EM se realizó en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo 5973 serie II, equipado con columna capilar HP-5 MS (30 m de longitud, de 0,2 mm de diámetro interno, con un espesor de pared de 0,25 µm). La temperatura del puerto de inyección fue de 230°C y la del cuadrupolo 150°C. Se utilizó helio como gas portador, a un flujo de 0,9 mL/min ajustado a una velocidad lineal de 34 m/s. La energía de la fuente de ionización fue de 70 ev con un rango de barrido de 40-500 amu a 3,9 scans/s. Se inyectó 1,0 µL del aceite diluido en *n*-heptano con una relación de split de

1:100. La identificación de los componentes del aceite se realizó por comparación de sus espectros de masas con los reportados en la base de datos Wiley library data 6<sup>ta</sup> Edición y los IK reportados en la literatura<sup>10,11</sup>.

### Bacterias utilizadas en el ensayo de actividad antibacteriana

Para el presente estudio se utilizaron cinco cepas de referencia internacional de la American Type Culture Collection (ATCC, por sus siglas en inglés); *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25992), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357). Las mismas, fueron donadas por el Departamento de Bioanálisis Clínico. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

### Método de difusión de agar en discos de papel

Este ensayo fue realizado de acuerdo al método descrito por Rondón *et al*<sup>12</sup>. Las bacterias fueron conservadas en agar a temperatura ambiente. Un volumen de 2,5 mL para cada inóculo bacteriano se incubó en el medio Mueller-Hinton a 37°C por 18 h., seguidamente se diluyeron en solución salina estéril a 0,85 % hasta obtener una turbidez visualmente comparable al patrón McFarland N° 0,5 (10<sup>6-8</sup> CFU/mL). Los diferentes cultivos fueron dispersados en placas que contenían agar Mueller-Hinton y sobre estos, se colocaron discos de papel de filtro (6 mm de diámetro) previamente impregnados con 10 µL del aceite esencial. Estas placas se dejaron en reposo a temperatura ambiente por 30 min y luego se incubaron a 37°C por 24 h. Transcurrido este tiempo se midieron las zonas de inhibición alrededor del disco y se expresaron en milímetros (mm). Se usaron los antibióticos; Amikacina® (30 µg), Ampicilina® (10 µg) y Eritromicina® (15 µg) como controles positivos para chequear la sensibilidad de las bacterias frente a los antibióticos de uso común. El análisis de concentración inhibitoria mínima (CIM) se realizó únicamente con los microorganismos que mostraron zonas de inhibición y fue determinada por dilución del aceite esencial, en los rangos comprendidos entre 50 y 250 µg/mL en dimetilsulfoxido (DMSO), colocando 10 µL de cada dilución en un disco de papel. Los valores de CIM se definen como la concentración más baja que inhibe el crecimiento bacteriano<sup>13</sup>. Como control negativo se usó un disco impregnado con DMSO para descartar posible actividad del solvente contra las bacterias ensayadas. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

## Discusión de resultados

El aceite esencial de *R. graveolens* colectado en dos localidades diferentes, estado Mérida (1,6 mL, 0,62 %) y estado Miranda (2,4 mL, 0,58 %), fue analizado por CG/EM lográndose identificar el 90,6 % y 91,5 % del total de los componentes, respectivamente. Dichos compuestos, representados en la Tabla 1, fueron principalmente del tipo

etonas de cadena lineal saturada de la serie C<sub>8</sub>-C<sub>13</sub>, alcoholes, aldehídos, ésteres y terpenos.

Analizando las dos muestras en estudio se pudo observar (Figura 1) que los componentes mayoritarios son similares, diferenciándose únicamente en las proporciones en las que se encuentran, 2-undecanona (50,93% ME; 37,80% MI), 2-nonanona (16,85% ME; 28,28% MI) y pregeijereno (8,72% ME; 6,80% MI). Sin embargo, se lograron establecer algunas diferencias en la composición química entre las muestras de aceite; el *cis*-3-hexenol (0,30%), acetato de *n*-octil (0,28%) y 2-undecanol (0,70%) fueron observados únicamente en la muestra ME mientras que el pentadecanal (0,24%) solo se identificó en la muestra MI. El terpeno isomaturmina se encontró en mayor concentración en la muestra MI (3,94%) mientras que en la ME se observó como un compuesto minoritario (0,97%). Los resultados obtenidos en el presente estudio fueron comparados con los reportados previamente para la *R. graveolens* recolectada en La Culata, estado Mérida, pudiéndose observar similitudes en los componentes mayoritarios, 2-undecanona (43,0%), 2-nonanona (33,5%) y pregeijereno (6,0 %), sin embargo el terpeno *trans*-anetol (3,5%) reportado para ese estudio no fue observado en el presente análisis, así como otras diferencias en las concentraciones de los compuestos mayoritarios<sup>14</sup>.

Comparando estos resultados con los reportados para la misma especie estudiada en diferentes países se pueden observar algunas similitudes y diferencias en su composición química. En el aceite esencial de *R. graveolens* recolectado en Bulgaria obtuvieron los ácidos octanoico, nonanoico, decanoico, dodecanoico, tretadecanoico, hexadecanoico y el 2-undecanol como compuestos mayoritarios<sup>3</sup>, mientras que en un estudio realizado en Alemania los compuestos observados fueron 2-undecanol, 2-dodecanol, 2-tridecanol, 2-undecanona, 2-dodecanona, 2-tridecanona<sup>15</sup> y los terpenos elemol, mirceno, pregeijereno y geijereno<sup>16</sup>. En otro estudio realizado en Irán reportaron 2-nonanona, 2-decanona, 2-undecanona, 2-dodecanona, 2-heptanol, 2-nonanol, 1-dodecanol, geireno, geijereno, *cis* y *trans*-piperitenona, 2-metil-undecanal y elemol, entre sus componentes<sup>8</sup>.

Por otro lado, los resultados que se presentan en la Tabla 2 muestran que los aceites ensayados presentan un amplio rango de actividad tanto para bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*) como Gram negativas (*E. coli* y *K. pneumoniae*). Analizando los datos obtenidos en este ensayo se pudo observar que la muestra **MI** inhibió un total de cuatro bacterias, exhibiendo una **CIM** de 100 µg/mL para *S. aureus* (7mm) y 200 µg/mL para *E. faecalis* (8mm), *E. coli* (9mm) y *K pneumoniae* (7 mm); mientras que la **ME** mostró actividad contra *S. aureus* (8mm), *E. coli* (9 mm) y *K. pneumoniae* (8 mm) a una **CIM** de 200 µg/mL para cada bacteria.

**Tabla 1:** Composición química del aceite esencial de *Ruta graveolens* L.

Componentes	ME (%)	MI (%)	IR
<i>cis</i> -3-hexenol	0,30	-----	854
2-octanona	0,23	0,27	995
<b>2-nonanona</b>	<b>16,85</b>	<b>28,28</b>	<b>1101</b>
2-nonanol	1,17	0,58	1108
nonanal	0,20	0,22	1113
geireno	0,83	1,29	1152
2-decanona	2,29	2,41	1197
acetato de <i>n</i> -octilo	0,28	-----	1219
<b>pregeijereno</b>	<b>8,72</b>	<b>6,80</b>	<b>1306</b>
<b>2-undecanona</b>	<b>50,93</b>	<b>37,80</b>	<b>1314</b>
2-undecanol	0,70	-----	1317
acetato de nonilo	0,74	0,27	1325
2-dodecanona	2,65	1,03	1374
2-tridecanona	1,45	2,24	1506
elemol	0,14	0,30	1557
pentadecanal	-----	0,24	1728
135 (100); 232 (33)	1,81	4,38	1823
135 (100); 248 (39)	0,34	1,49	2050
isomaturmina	0,97	3,94	2184

ME: Mérida, MI: Miranda La composición del aceite esencial fue determinada por comparación de los espectros de masas de cada compuesto con la base de datos Willey 6<sup>a</sup> edición y también por sus índices de retención (IR).

**Tabla 2:** Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Ruta graveolens* L.

Microorganismos	Zona de inhibición (mm)*					CIM (µg/mL)	
	Aceite esencial		Control positivo			ME	MI
	ME	MI	Eri	Amp	Ami		
<i>S. aureus</i> ATCC (25923)	8	7	60	NE	NE	200	100
<i>E. faecalis</i> ATCC (29212)	NA	8	NE	50	NE	NE	200
<i>E. coli</i> ATCC (25992)	9	9	NE	NE	31	200	200
<i>K. pneumoniae</i> ATCC (23357)	8	7	NE	NE	38	200	200
<i>P. aeruginosa</i> ATCC (27853)	NA	NA	NE	NE	34	NE	NE

ME: Mérida, MI: Miranda, Ami: amikacina® (30 µg), Amp: Ampicilina® (10 µg), Eri: Eritromicina® (15 µg), NA: No-ensayado.\*El diámetro de la zona de inhibición se midió en mm usando discos de 6 mm, CIM: Concentración inhibitoria mínima, rango de concentración 50-200 µg/mL.

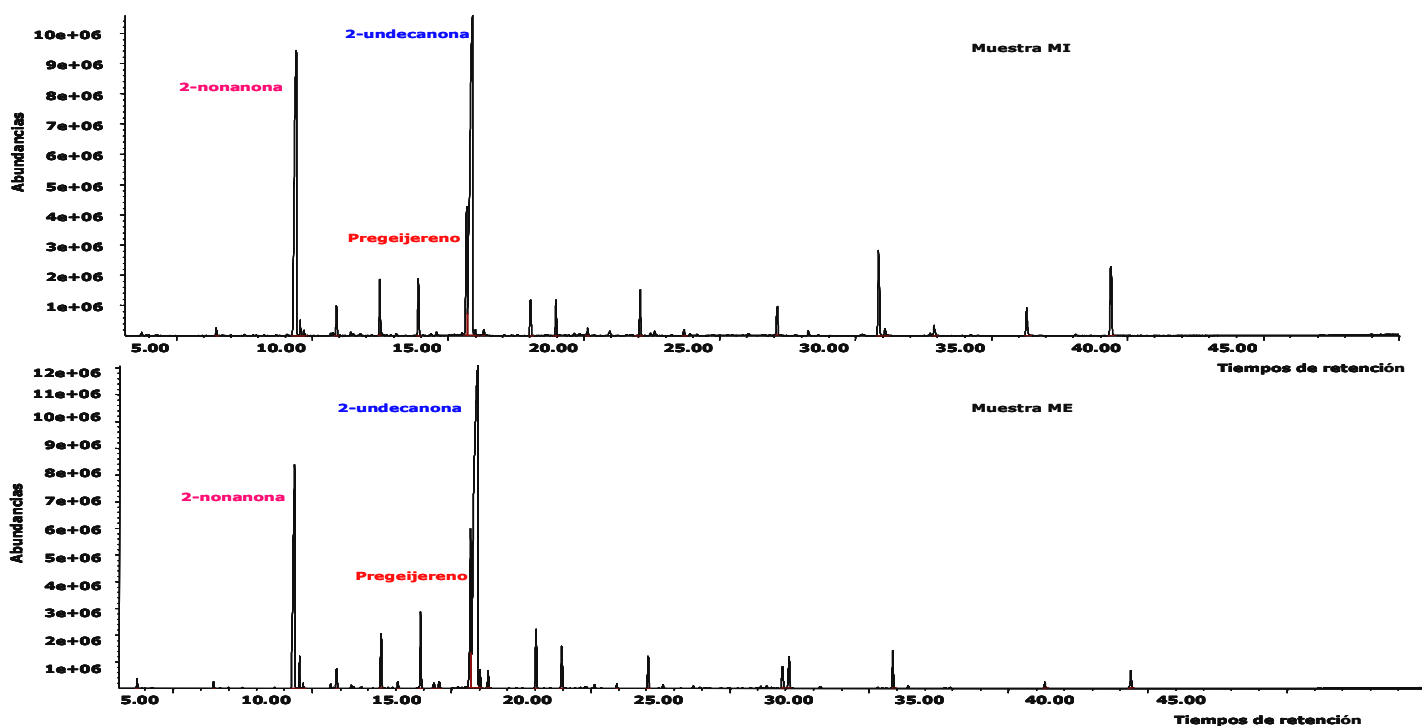


Figura 1.-Cromatograma de gases de las muestras de aceite esencial de *Ruta graveolens* L, MI: estado Miranda, ME: estado Mérida.

Estudios previos realizados al extracto metanólico de las hojas de *R. graveolens* reportaron actividad contra *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *B. cereus*<sup>17</sup>. Mientras en otra investigación realizada con la misma especie, pero usando los extractos metanólico, diclorometánico y acuoso de los tallos, mostraron actividad contra *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. aureus*<sup>18</sup>. Por su parte, el extracto metanólico de las hojas de *R. chalepensis* exhibió un amplio espectro de actividad, inhibiendo el crecimiento de las bacterias *E. coli*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*<sup>19</sup>. Mientras que en otro estudio de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *R. chalepensis* se determinó actividad contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus* y *L. monocytogenes*<sup>9</sup>. Otros investigadores en el año 2009, realizaron un ensayo de actividad antimicrobiana con 2-undecanona, 2-undecanol y otros derivados de estos compuestos, los cuales están presentes en la mayoría de los aceites esenciales de las diferentes especies de *Ruta*, observando que los mismos presentan actividad antibacteriana moderada contra *B. subtilis* y *E. coli* y mostrando mayor efectividad contra *C. micoderma* y *A. niger*<sup>20</sup>.

## Conclusiones

En el presente estudio se analizaron por **CG/EM**, dos muestras de aceite esencial de la especie *R. graveolens* procedentes de los estados Mérida y Miranda, lográndose identificar: 2-undecanona, 2-nonanona y pregeijereno, como componentes mayoritarios, siendo los dos primeros

compuestos, hidrocarburos de cadena lineal con una función cetónica en el carbono 2 de sus estructuras, mientras que el pregeijereno es un monoterpeno cíclico que presenta tres dobles enlaces posicionados en los carbonos 1, 3 y 7. Hasta la presente fecha no se conocen estudios que relacionen estos compuestos con algún tipo de actividad biológica.

Por otro lado, ambas muestras de aceite se sometieron a ensayos de actividad antibacteriana mostrando inhibición del crecimiento tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas, exhibiendo valores de 100 y 200 µg/mL. Es importante aclarar que la actividad antibacteriana de los aceites esenciales es muy difícil de asignar a la presencia o ausencia de un determinado compuesto, debido a la complejidad y variabilidad de sus componentes, sin embargo, está documentado, que la presencia de compuestos con funciones alcohólicas, cetónicas y aldehídicas pueden contribuir con esta actividad.<sup>21</sup>

## Referencias

1. J Morton. Atlas of the medicinal plants of middle America, Bahamas to Yucatan. Springfield, IL (USA): Charles C. Thomas, Publisher. p. 378-379 (1981).
2. K Meepagala, K Schrader, D Wedge, S Duke. Algicidal and antifungal compounds from the roots of *Ruta graveolens* and synthesis of their analogs. **Phytochem.**, **66**, 2689-2695 (2005).

3. A Ivanova, I Kostova, H Rodríguez, J Villegas. Volatile components of some *Rutaceae* species. **Z. Naturforsch.**, **59c**, 169-173 (2004).
4. F Nasirinezhad, F Khoshnevis, K Parivar, G Amin. Antifertility effect of aqueous extract of arial part of *Ruta graveolens* on immature female Balb/C mice. **Physiol. Pharm.**, **13(3)**, 279 -287 (2009).
5. T Wu, L Shi, J Wang, S Iou, H Chang, Y Chen, Y Kuo, Y Chang, C Teng. Cytotoxic and antiplatelet aggregation principles of *Ruta graveolens*. **J. Chin. Chem. Soc.**; **50**, 171-178 (2003).
6. A Hale, K Meepagala, A Oliva, G Aliotta, S Duke. Phytotoxins from the leaves of *Ruta graveolens*. **J. Agric. Food Chem.**, **52**, 3345-3349 (2004).
7. K El Sayed, M Al-Said, F El-Feraly, S Ross. New quinoline alkaloids from *Ruta chalepensis*. **J. Nat.Prod.**, **63**, 995-997 (2000).
8. M Soleimani, P Azar, M Saber-Tehrani, A Rustaiyan. Volatile composition of *Ruta graveolens* L. of north of Iran. **World Appl. Sci. J.**, **7(1)**, 124-126 (2009).
9. E Bnina, S Hammami, M Daamii-Remadi, H Jannet, Z Mighri. Chemical composition and antimicrobial effects of Tunisian *Ruta Chalepensis* L. essential oils. **J. Soc. Chim. Tunisie**, **12**, 1-9 (2010).
10. N Davies. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methylsilicone and carbowax 20M phases. **J. Chromat.**, **503**, 1-24 (1990).
11. R Adams. Identification of essential oils components by gas chromatography/ mass spectroscopy. Carol Stream, Illinois (USA): Allured Publishing Corporation, p. 1-469 (1995).
12. M Rond n, J Velasco, A Morales, J Rojas, J Carmona, M Gualtieri, V Hernández. Composition and antibacterial activity of the essential oil of *Salvia leucantha* Cav. cultivated in Venezuela Andes. **Rev. Lat. Qu m.**, **33**, 40-44 (2005).
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. CLSI document M100-S17 (2010).
14. G Meccia, L Rojas, A Usubillaga. Estudio del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. que crece en el estado Mérida, Venezuela. **Rev. Fac. Farm.**, **50(1)**, 7-9 (2008).
15. K Kubeczka. Essential oils of various *Ruta*-spp. **Herba Hung**, **10**, 109-117 (1971).
16. V De Feo, F De Simone, F Senatore. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochem.**, **61(5)**, 573-578 (2002).
17. N Alzoreky, K Nakahara. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. **Int. J. Food Microbiol.**, **80**, 223-230 (2003).
18. P Pandey, A Mehta, S Hajra. Evaluation of Antimicrobial Activity of *Ruta graveolens* Stem Extracts by Disc Diffusion Method. **J. Phytol.**, **3(3)**, 92-95 (2011).
19. P Sathiya-Priy, J Sasikumar, G Gowsigan. Antibacterial activity of methanol extract of *Ruta chalapensis* (L), *Quercus infectoria* (Oliver) and *Canthium parviflorum* (Lam). **Ancient Sci. Life**, **29(2)**, 28-31 (2009).
20. J Gibka, A Kunicka-Styczy nska, M Gli nski. Antimicrobial activity of undecan-2-one, undecan-2-ol and their derivatives. **JEOP**, **12(5)**, 605-614 (2009).
21. N Belletti, M Ndagihimana, C Sisto, M Guerzoni, R Lanciotti, F Gardini. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Agric. Food Chem.**, **52**, 6932-6938 (2004).