# Obtención de rutina y quercetina y contribución al estudio de sus propiedades antibacterianas

POR

F. BUSTINZA y A. CABALLERO LOPEZ
Laboratorio de Fisiología Vegetal.—Jardin Botánico de Madrid.

(Trabajo entregado el 14 de marzo de 1948)

La rutina es un pigmento amarillo que existe en gran número de vegetales. Se trata del *ramnoglucósido de la quercetina*, siendo ésta el 1-3-3'-4'- tetraoxiflavonol.

Despierta hoy gran interés el grupo de pigmentos flavonólicos, pues se emplea la rutina con eficacia en el tratamiento de la fragilidad capilar, tan frecuentemente asociada a la hipertensión sanguínea.

Basándonos en el trabajo de Naghski, Porter y Couch (1), publicado en el año 1947, hemos aprovechado el momento de la reciente floración, a fines de febrero, de la planta *Forsythia fortunei Rehd*, cultivada en nuestro Jardín Botánico, y a partir de los botones florales frescos hemos efectuado la extracción con etanol, hemos concentrado los extractos alcohólicos a presión reducida, hemos agregado agua y destilado nuevamente hasta eliminar el alcohol; el extracto acuoso caliente se filtra por papel y se trata

(1) J. Naghski, W. L. Porter and J. F. Couch. *Isolation of Rutin from two varieties of Forsythia*. «J. of the American Chemical Society», 69, 572 (1947).

con éter en embudo de separación para eliminar ciertos lipoides, y de la porción acuosa se precipita la rutina en forma de agujas microscópicas.

Recristalizamos la rutina por disolución en agua hirviendo y dejando enfriar a la disolución.

Desecados los cristales se determinó el punto de fusión, y observamos que a la temperatura de 185° empezaron a ablandarse los cristales y que a 192° la fusión era completa.

No solamente quedó identificada la rutina por su color amarillo y el punto de fusión, sino que practicamos con ella algunos ensayos, tales como su buena solubilidad en agua caliente, la coloración verde que adquiere con la disolución de cloruro férrico (coloración que al calentar pardea), la coloración rojo-púrpura con ácido clorhídrico y cinc por reducción y formación de la antocianina correspondiente y además hidrolizamos la rutina con disolución acuosa de ácido clorhídrico al 1 por 100, y obtuvimos azúcares reductores en los que identificamos la glucosa y la ramnosa y como aglucona la *quercetina*, que caracterizamos por su elevado punto de fusión (315°), por su color algo anaranjado, por ser mucho menos soluble que la rutina en el agua, dar coloración anaranjada con la sosa, en tanto que la rutina da con la sosa coloración amarilla intensa, y en que la reducción de la quercetina con el cinc y el ácido clorhídrico en presencia del alcohol amílico produce color rojo púrpura de la antocianidina correspondiente, pero en este caso toda la coloración pasa a la capa alcohólica, en tanto que en el caso de la rutina y operando también en presencia del alcohol amílico, gran parte de la coloración queda en la fase acuosa.

La única información bibliográfica que poseemos sobre la actividad antibacteriana de la rutina y quercetina es a través de los trabajos de Naghski, Copley y Couch (2) y Andersen y Berry (3).

Naghski y colaboradores trataron de ver si los flavonoles, *rutina*, *quercetrina* y *quercetina*, eran capaces de contrarrestar la acción bacteriostática del dicumarol, y observaron que los tres flavono-

---

(2) J. Naghski, M. J. Gopley and J. F. Couch. *Effect of flavonols on the bcateriostatic action of Dicoumarol.* «Science». Vol. 105, p. 125-126 (1947).

(3) A. A. Andersen and J. A. Berry. *Effect of flavonols on Clostridium botulinum.* «Science». Vol. 106, p. 644-645 (1947).

les citados antagonizan la acción bacteriostática del dicumarol frente al *S. aureus*, y al mismo tiempo vieron que la quercetina inhibe el crecimiento de esa bacteria a la dosis de 0,1 mg. por c. c. Nagski y colaboradores realizaron sus pruebas empleando medio de cultivo líquido.

Andersen y Berry trataron de ver si la rutina, quercetrina y quercetina ejercían alguna influencia sobre el *Clostridium botulinum*, y observaron que la rutina en concentraciones hasta de 1 por 1.000 no evita el crecimiento del *Cl. botulinum* ni interfiere con su producción de toxina; pero, en cambio, la quercetina en proporción de 0,080 a 0,16 por 1.000 interfiere con el crecimiento del *Cl. botulinum* y evita que este microbio produzca toxina, aunque en el caso de que la toxina esté ya preformada la adición de quercetina no es capaz de inactivar a la toxina.

En este trabajo de Andersen y Berry se cita un trabajo de Naghski, Copley y Couch, que no lo hemos podido consultar directamente, y en el que estos autores dan cuenta de que la quercetina interfiere el crecimiento de *Brucella abortus*, *Aerobacillus polymyxa* y *Staphylococcus*.

Nosotros hemos investigado la actividad antibacteriana de la rutina y de la quercetina por el método de la placa, que no es muy conveniente para sustancias poco solubles, como es el caso de la rutina y más aún de la quercetina, pero para aumentar la solubilidad de los flavonoles mencionados hemos obtenido con disolución de NaOH los derivados sódicos correspondientes, y cuyas disoluciones acuosas se han ajustado a un pH de 7,5 a 7,7.

La disolución del derivado sódico de la rutina es de color amarillo intenso y la disolución del derivado sódico de la quercetina es de color anaranjado intenso.

Como medio de cultivo hemos empleado el medio agar tampón fosfatos a pH 7 y las placas se sembraron por el método de inundación con los cultivos de veinticuatro horas en caldo de los siguientes gérmenes: *Staphylococcus aureus*, estirpe H; *Escherichia coli*, estirpe N. R. R. L. B. 686, y *Bacillus mycoides*, estirpe N. R. R. L. B. 615, y en el caso de los *Mycobacterium* hemos empleado el mismo medio sólido anterior con 5 por 100 de glicerina y el cultivo en medio líquido de las estirpes de *Mycobacterium* lo hemos efectuado: el *Mycobacterium phlei*, estirpe 525 del N.

C. T. C., en caldo corriente, y el *Mycobacterium tuberculosis avium*, *Mycobacterium smegmatis* (4) y el *Mycobacterium tuberculosis hominis*, estirpe virulenta H37Rv (5), en medio de Dubos (6), con hidrolizado enzimático de caseína, *tween* 80 y albúmina cristalina de plasma bovino (7).

Una vez sembradas las placas y desecada su superficie, con perforador estéril se practicaron cinco pocillos, convenientemente distanciados en cada placa de 10 cms. de diámetro, y en dichos pocillos se colocan las disoluciones cuya actividad antibacteriana se desea ensayar, reservando dos para la disolución del derivado sódico de la quercetina, otros dos para la disolución del derivado sódico de la rutina y el pocillo central para una disolución con un tampón fosfato a un pH 7,7, equivalente al pH de las disoluciones débilmente alcalinas de los derivados sódicos de la quercetina y rutina. La incubación se realiza a 37°, y al cabo de 24 horas o de varios días en el caso de *Mycob. hominis*, se examinan las placas.

En las condiciones en que hemos trabajado hemos observado que alrededor de los pocillos que contenían la disolución del derivado sódico de la quercetina se producen zonas de inhibición en el caso del *St. aureus*, *B. mycoides*, *Mycob. phlei*, *Mycob. avium*, *Mycob. smegmatis* y *Mycob. hominis* H37Rv, y con la particularidad de que en el caso de *St. aureus* y *B. mycoides*, no solamente se producen halos de inhibición, sino que en la zona de inhibición y a su alrededor hasta donde se ha difundido la disolución de quercetina se produce una coloración amoratada, que creemos pueda

---

(4) Las estirpes de *Mycobacterium tuberculosis avium* y *Mycobacterium smegmatis* nos fueron amablemente facilitadas por el Dr. Pérez Pardo, del I. N. de Sanidad.

(5) La estirpe de *Mycobacterium hominis H. 37 Rv.*, la recibimos del Dr. W. Steenken, Jefe del «The Trudeau Laboratory» (E. U.).

(6) R. J. Dubos and G. Middlebrook. *Media for Tubercle facilli.* «The American Review of Tuberculosis». Vol. 56. October, 1947, p. 334-345.

(7) Como hidrolizado enzimático de caseína utilizamos el *Optimo Protein Hydrolysate*, que generosamente nos facilitó S. B. Penick and Co. de Nueva York. El *Tween 80* nos fué amablemente enviado por Atlas Powder and Co. de Wilmington y la *seroalbúmina bovina cristalizada* nos fué facilitada por la sección de Bioquímica de Armour and Co. de Chicago.

ser debida a la reducción de la quercetina y formación de la antocianidina correspondiente.

En el caso de los *Mycobacterium* ensayados no hemos apreciado ese cambio en la coloración.

En el caso de *E. coli* no hemos visto halos de inhibición alrededor del derivado sódico de la quercetina, pero sí se aprecia perfectamente un cambio de coloración de la quercetina alrededor de los pocillos que la contienen, y estimamos que también en este caso se produce una reducción de la quercetina.

Alrededor de los pocillos que contienen el derivado sódico de la rutina no hemos apreciado ni cambio de coloración ni zonas de inhibición frente a las siete estirpes bacterianas mencionadas.

Hemos realizado otras series de ensayos colocando en los pocillos en lugar de los derivados sódicos de la rutina y de la quercetina, las disoluciones acuosas respectivas de esas dos sustancias, con exceso de rutina o de quercetina, al objeto de que estuvieran saturadas, y en ningún caso hemos apreciado inhibición ni cambio de coloración alrededor de los pocillos conteniendo la disolución acuosa de quercetina o de rutina.

A continuación presentamos las pruebas fotográficas correspondientes a algunos de nuestros trabajos.

Foto núm. 1.—Placa sembrada con *Staphylococcus aureus* H.:
Pocillos 1, 3 y 5.—Contienen disolución saturada acuosa del derivado sódico de quercetina.
» 2 y 4.—Contienen disolución acuosa del derivado sódico de rutina al 5 por 1.000.

*Resultados.*—Se observa claramente la inhibición alrededor de los pocillos que contienen la disolución de quercetina y, en cambio, no se ha producido inhibición alrededor de los pocillos que contienen rutina.

*Observación.*—En la placa al natural alrededor de los pocillos con quercetina y hasta donde se difunda ésta, más allá de la zona de inhibición, se aprecia color morado bastante intenso.

Foto núm. 2.—Placa sembrada con *Mycobacterium tuberculosis avium:*
Pocillos 1, 3 y 5.—Contienen disolución saturada acuosa del derivado sódico de quercetina.
» 2 y 4.—Contienen disolución acuosa del derivado sódico de quercetina al 5 por 1.000.

*Resultados.*—Se observa inhibición alrededor de los pocillos que contienen quercetina.

Foto núm. 3.—Placa sembrada con *Escherichia coli:*
Pocillos 1, 3 y 5.—Contienen disolución saturada acuosa del derivado sódico de quercetina.
» 2 y 4.—Contienen disolución acuosa del derivado sódico de rutina al 5 por 1.000.

*Resultados.*—No se ha producido inhibición alrededor de los pocillos que contienen quercetina, pero las zonas oscuras que aparecen alrededor de esos tres pocillos corresponden en la placa al natural con zonas de coloración morada.

Foto núm. 4.—Placa sembrada con *B. mycoides:*
Pocillos 1 y 3.—Contienen disolución acuosa del derivado sódico de quercetina a saturación.
» 2 y 4.—Contienen disolución acuosa del derivado sódico de rutina al 8 por 1.000.
» 5.—Disolución tampón de fosfatos a pH 7,7.

*Resultados.*—Se aprecia claramente la inhibición alrededor de los pocillos que contienen quercetina y que no hay inhibición ni alrededor de los pocillos con rutina ni del pocillo central.

*Observación.*—En la placa al natural, en la zona de inhibición y a su alrededor, se aprecia color morado.

Foto núm. 5.—Placa sembrada con *Mycobacterium phlei:*
Pocillos 1 y 3.—Contienen disolución acuosa del derivado sódico de quercetina.
» 2 y 4.—Contienen disolución acuosa del derivado sódico de rutina al 8 por 1.000.
» 5.—Contiene disolución acuosa de un tampón de fosfatos a pH 7,7.

*Resultados.*—Alrededor de los pocillos con quercetina se aprecia inhibición, sin que en la placa al natural hayamos advertido cambio de coloración.

## CONCLUSIONES

Hemos aislado la rutina a partir de los botones florales de la *Forsythia fortunei*, recogidos en el Jardín Botánico de Madrid a fines de febrero.

A partir de esa rutina hemos obtenido la quercetina.

Hemos explorado la actividad antibacteriana de la rutina y de la quercetina y hemos observado que el derivado sódico de la quercetina inhibe al *Staphylococcus aureus*, *Bacillus mycoides* y a los *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium hominis*, estirpe H37Rv; *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium avium*.

El cambio de coloración que experimenta el derivado sódico de la quercetina en la zona hasta donde se difunde alrededor de los pocillos en los cultivos de *Staphylococcus aureus, Bacillus mycoides* y *Escherichia coli* estimamos que pueda ser debido a su transformación por reducción en la antocianidina correspondiente, y creemos que puede servir para diferenciar a la rutina de la quercetina.

## CONCLUSIONS

We have obtained rutin from the blossoms of *Forsythia fortunei* gathered in the Botanical Garden of Madrid at the end of february.

From that rutin we have obtained quercetin.

We have explored the antibacterial activity of rutin and of quercetin and we found that the sodium derivative of quercetin inhibits the growth of *Stapyhlococcus aureus, Bacillus mycoides, Mycobacterium phlei, Mycobacterium smegmatis, Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis hominis.*

The change of coloration that the sodium derivative of quercetin experiments in the zone up to where that substance is diffused in the culture plates of *Staphylococcus aureus, Bacillus mycoides* and *Escherichia coli,* we think that it is due to its transformation by reduction in the corresponding antocyanidin and we believe this change in the coloration can be used for the differentation of quercetin and rutin.

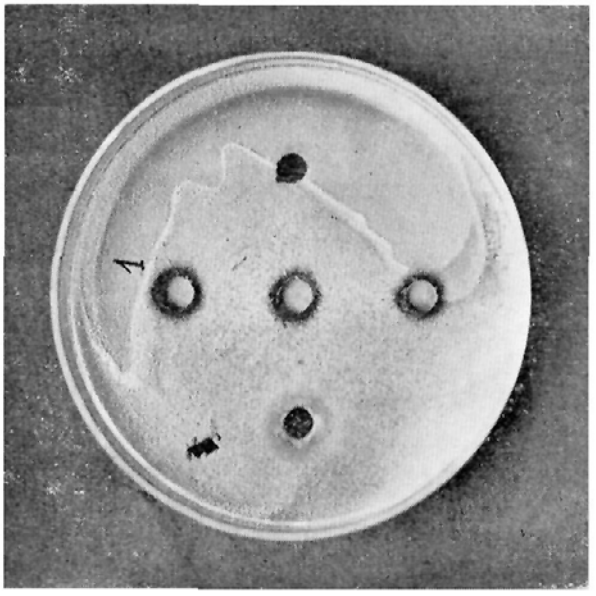


Fig. 2.—Placa sembrada con *Mycobacterium tuberculosis avium*.

Los pocillos 1, 5 y 3 contienen el derivado sódico de la quercetina. Los pocillos 2 y 4 contienen el derivado sódico de la rutina.

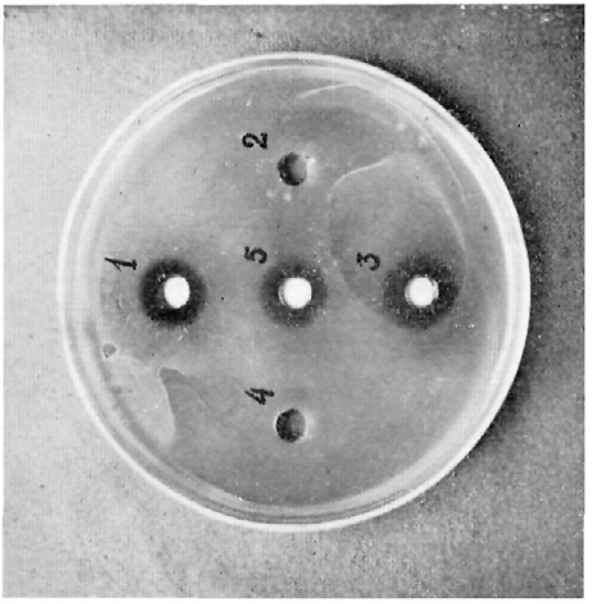


Fig. 1.—Placa sembrada con *Staphylococcus aureus H*. Los pocillos 1, 5 y 3 contienen el derivado sódico de la quercetina. Los pocillos 2 y 4 contienen el derivado sódico de la rutina. Alrededor de los pocillos 1, 3 y 5 se ha producido inhibición y cambio de coloración.

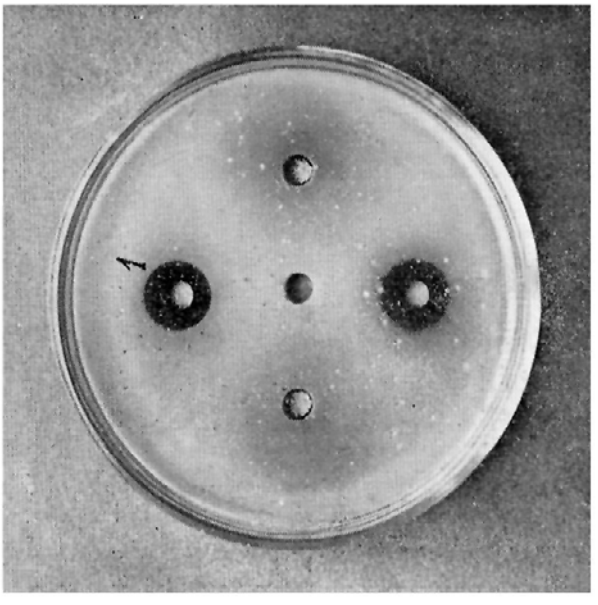


Fig. 4.—Placa sembrada con *B. mycoides*. Los pocillos 1 y 3 contienen el derivado sódico de la quercetina. Los pocillos 2 y 4 contienen el derivado sódico de la rutina. El pocillo núm. 5 contiene tampón fosfatos a un pH de 7.7. Alrededor de los pocillos 1 y 3 se ha producido inhibición y cambio de coloración.

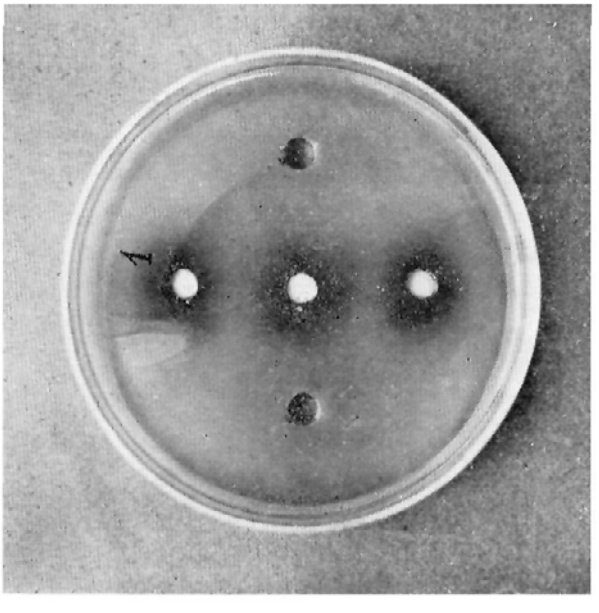


Fig. 3.—Placa sembrada con *Escherichia coli*. Los pocillos 1, 5 y 3 contienen el derivado sódico de la quercetina. Los pocillos 2 y 4 contienen el derivado sódico de la rutina. Alrededor de los pocillos 1, 3 y 5 no se ha producido inhibición sino solamente una coloración amoratada.

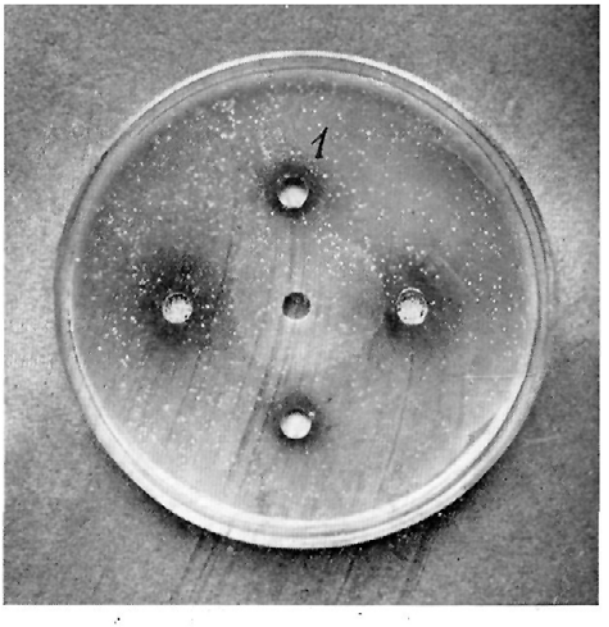


Fig. 5.—Placa sembrada con *Mycobacterium phlei*. Los pocillos 1 y 3 contienen el derivado sódico de la quercetina. Los pocillos 2 y 4 contienen el derivado sódico de la rutina. El pocillo núm. 5 contiene tampón fosfatos a un pH de 7.7. Alrededor de los pocillos 1 y 3 se ha producido inhibición.