

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UN NUEVO FLAVONOIDE DE *Chromolaena odorata*.

Willian Henríquez¹, Oscar Crescente¹, Doris Hidalgo²,
Alfredo Rosas R.³, Julio Herrera³ y , Reinaldo
Compagnone⁴

therefore it is assumed that this is the first report for a new compound. The compound showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* with a MIC between 179.2-338.3 µg/ml against both microorganisms.

RESUMEN

El extracto en diclorometano de las hojas de *Chromolaena odorata* (L.) K. et R. Compositae, tratado para lactonas sesquiterpénicas y posteriormente fraccionado a través de cromatografía columna flash sobre sílica gel, de exclusión molecular y TLC, arrojó como resultado la separación de 6-hidroxi-4',5,7-trimetoxi flavanona. La identificación de la flavanona aislada se realizó combinando técnicas de análisis espectrales de RMN (¹H y ¹³C), UV/vis., EM e IR, y por comparación con resultados de estructuras modelos. Una búsqueda bibliográfica no proporcionó dato alguno sobre éste compuesto por lo que se presume que éste es el primer reporte para esta flavanona. Por otra parte, la flavanona aislada posee acción antibacterial contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, mostrando una CMI de 179,2-238,3 µg/ml contra ambos microorganismos.

KEY WORDS: *Chromolaena odorata*, flavanone, 6-hydroxy- 4', 5, 7- trimethoxy flavanone, antibacterial activity.

INTRODUCCIÓN

Chromolaena odorata (L.) King y Robinsom, anteriormente llamada *Eupatorium odoratum* L. es una especie vegetal perteneciente a la familia de las Compositae y se encuentra con frecuencia en el oriente del país. Esta planta tiene un amplio uso en la medicina popular en algunas partes del mundo para contrarrestar ciertos males, tales como: tos, malaria, infecciones en piel, heridas y úlceras, vómitos, hemorragias internas y externas, además de cicatrizante según Baruach and Leclerq (1993), Inya-Agha et al. (1987), Metwally and Ekejiuba (1981), y Phan et al. (1996). Así como, también es usada para el envenenamiento de peces, según Arene et al. (1978) y Talapatra et al. (1974).

ASBTRACT

The dichloromethane leaf extract of *Chromolaena odorata* (L.) K. et R. Compositae, treated with lead acetate as for sesquiterpene lactones was further fractionated with flash chromatography over silica gel, Sephadex LH-20 and TLC over silica plates. It afforded 6-hydroxy-4',5,7-trimethoxy flavanone identified by ¹H and ¹³C NMR, UV/vis., MS and IR. A bibliographic search did not yield any information on the above mentioned flavanone and

Numerosos estudios han sido realizados tanto desde el punto de vista químico, así como biológico sobre esta especie vegetal arrojando como resultado la identificación de lactonas sesquiterpénicas, triterpenos, flavonoides y alcaloides pirrolizidínicos dentro de sus constituyentes, Arene et al. (1978), Barua et al. (1978), Biller et al. (1994), Bose et al. (1973), Metwally and Ekejiuba (1981), Talapatra et al. (1974). Por otra parte, los estudios biológicos de extractos en solventes diferentes han demostrado actividad antimicrobial contra bacterias y hongos, así como actividad hemostática, Akak (1990) e Iwu y Chiori (1984).

El gran interés en el análisis fitoquímico en este género se debe a la presencia de metabolitos secundarios potencialmente activos. Además, debido a la facilidad de

1- Universidad de Oriente, Dpto. de Química. Cumaná, Venezuela
2- Universidad de los Andes, Dpto. de Química. Mérida, Venezuela
3- Universidad Simón Bolívar, Dpto. de Química. Caracas, Venezuela.
4- Universidad Central de Venezuela, Escuela de Química. Caracas, Venezuela.

Recibido: Julio 1997. Aprobado: Abril 1998.

localización de *C. odorata* y su amplio uso en la medicina popular, hizo que se seleccionara la especie con la finalidad de realizar un análisis fitoquímico y un estudio biológico que permitiera evaluar la actividad antibacteriana del extracto en diclorometano de las hojas de esta especie vegetal y separar, en lo posible, el o los compuestos responsables de tal efecto biológico.

PARTE EXPERIMENTAL

Muestreo de tejidos vegetales

Chromolaena odorata fue colectada al azar en la región de San Juan de Macarapana, Estado Sucre, entre febrero-marzo de 1994 y autenticada por comparación con especímenes idénticos depositados en el herbario IRBR del Departamento de Biología del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente, a cargo del Prof. Luis José Cumana.

BIOENSAYO

Para comprobar el efecto antibacteriano del extracto crudo, fracciones y/o compuestos aislados se utilizaron los siguientes microorganismos, aislados de procesos patológicos en el Hospital Universitario Antonio Patricio de Alcalá de Cumaná, Estado Sucre, y bacterias ATCC.

Microorganismo	Origen	Coloración de Gram
<i>Escherichia coli</i>	Clínico	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clínico	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	Clínico	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Clínico	+
<i>Bacillus cereus</i>	Clínico	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC (25722)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (25416)	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC (25923)	+

ANTIBIOSIS

La determinación de la actividad antibacteriana del extracto crudo, fracciones y/o compuestos aislados se realizó mediante la técnica de difusión en agar llamada antibiograma, descrita por Bauer *et al.* (1966), la cual consiste en impregnar 10 o 25 µl de una solución del extracto o compuesto a probar en discos de papel de filtro Whatman N° 3 de 5 a 10 mm de diámetro, según el volumen de muestra a colocar, luego estos discos son colocados en placas de Petri previamente servidas con agar Mueller-Hinton e inoculadas con una suspensión bacteriana de las cepas a utilizar. Posteriormente, las placas son preincubadas a 5°C por 12 horas y luego se incuban a 37°C por 24 horas. La acción antibacteriana se midió tomando el diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco.

EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN

Las hojas secas y molidas (420 g) de *C. odorata* fueron extraídas en un Soxhlet con CH₂Cl₂ hasta agotamiento, obteniéndose 90 g de extracto crudo, éste fue tratado con etanol caliente y acetato de plomo acuoso al 4% (1:1). La solución resultante fue extraída con CH₂Cl₂ y la fase orgánica fue evaporada a presión reducida obteniendo de esta forma 10,5 g de extracto, el cual fue fraccionado a través de una cromatografía de columna flash según Still *et al.* (1978), (110 x 3 cm), sobre sílica gel (260 g, 70-270 mesh, 60 Å Aldrich), la elución se inició con n-hexano, variando luego la polaridad del solvente en orden creciente hasta llegar a metanol. Se colectaron eluatos de 125 ml, los cuales fueron agrupados, según comparación en TLC analítica, obteniéndose 15 fracciones.

La fracción 9 (0,4 g), la cual eluyó con AcOEt:MeOH (1:1), fue purificada mediante cromatografía de columna sobre gel de Sephadex LH 20, 25-100 µm (Pharmacia) con fase móvil n-hexano-diclorometano-metanol (7:4:1), obteniéndose cuatro subfracciones. La primera (320 mg) fue repurificada en TLC de 0,5 mm de espesor sobre sílica gel Kieselgel 60 H y fase móvil una mezcla de tolueno-acetato de etilo (5:2), separándose tres nuevas fracciones, la tercera de estas (R_f= 0,27) dió 44,3 mg, presentando una coloración verde bajo luz UV.

ANÁLISIS ESPECTRALES

RMN

Los análisis de RMN (¹H y ¹³C) fueron realizados en un espectrómetro Bruker de 300 MHz. Los espectros fueron tomados de la muestra en cloroformo deuterado y tetrametil silano como estándar interno. Los espectros se realizaron a 270 y 68 MHz, respectivamente.

CG/EM

El análisis de cromatografía de gases por capilaridad se realizó en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo HP58890 series II, equipado con un inyector split/splitless, y un detector de masas Hewlett-Packard modelo HP5971A. El voltaje de ionización aplicado fue de 70 eV. La muestra fue disuelta en acetona.

UV/vis.

El compuesto fue disuelto en metanol y los análisis realizados en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2, con celdas de cuarzo de 1x5cm. Los espectros se tomaron en MeOH, NaOMe, NaOAc y AlCl₃, para observar los desplazamientos químicos provocados por los cromóforos formados por los grupos funcionales en los anillos, A y B, de la molécula.

IR

Los espectros de infrarrojo se registraron en un espectrómetro Perkin Elmer FT-IR 1725X. Los análisis se realizaron sólido-KBr vs KBr-aire, y las pastillas se compactaron en una prensa a 15 000 libras/pulg² de presión.

ANÁLISIS FÍSICO

El punto de fusión de compuesto se determinó en un fusímetro marca Thermolyne de 120 voltios.

El compuesto cristalizado presentó un p.f. 102-105°C. con los siguientes datos espectrales: RMN ¹H (CDCl₃), 270 MHz: δ 2,7328 (1H, q, J=2,73 y 16,79 Hz, H-3^{cia}), 3,0163 (1H, q, J=13,34 y 16,79 Hz, H-3^{trms}), 3,8088 (3H, s, OMe), 3,8756 (3H, s, OMe), 3,9186 (3H, s, OMe), 5,3191 (1H, q, J=2,70 y 13,34 Hz, H-2), 6,3379 (1H, s, H-8), 6,9281 (2H, d, J=8,76 Hz, H-3', 5') y 7,3678 (2H, d, J=8,76 Hz, H-2', 6'). RMN ¹³C (CDCl₃), 68 MHz: δ=45,3083 (C-3), 55,4472 (OMe), 56,3669 (OMe), 61,8391 (OMe), ~79 (C-2), 96,3982 (C-8), 108,4828 (C-10), 114,2287 (C-3', C-5'), 127,8030 (C-2', C-6'), 130,7520 (C-1'), 133,8757 (C-6), 154,0320 (C-9), 157,3306 (C-4'), 159,9831 (C-7) y 189,8907 (C-4). IR, ν^{KBr} cm⁻¹: 3418,5 (OH), 1656,9 (C=O) y 1614,9 (C=C). UV, λ^{MeOH} nm: 278,8 (B II), 343,0 h (B I), λ^{NaOMe} nm: 256,1; 280,4 h (B II), 381,2 h (B I), λ^{NaOAc} nm: 275,0 (B II), 381,8 h (B I) y λ^{AlCl_3} nm: 278,7 (B II), 345,0 h (B I). EM, 330 m/e [C₁₈H₁₈O₆]⁺ (21,05); 196 m/e [C₉H₈O₃]⁺ (100); 134 m/e [C₉H₁₀O]⁺ (10,53); 181 m/e [C₈H₅O₃]⁺ (10,95); 153 m/e [C₇H₅O₄]⁺ (24); 119 m/e [C₈H₇O]⁺ (3,24) y 91 m/e [C₇H₇]⁺ (2,21).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El espectro de masas muestra a [M]⁺ correspondiente a C₁₈H₁₈O₆, además, la estructura de la flavanona posee 106 m/e adicionales, lo que implica tres grupos OMe adicionales al esqueleto base de las flavanonas (224 m/e), dos sobre el anillo A y uno sobre el B, además de un grupo OH sobre el anillo A que sumados todos hace 106 m/e. Otras señales que se observan, producto de la fragmentación retro Diels-Alder, son [A₁]⁺, C₉H₈O₃; [B₃]⁺, C₉H₁₀O; [A₁-CH₃]⁺, C₈H₅O₃; [A₁-COCH₃]⁺, C₈H₅O₄; [B₃-CH₃]⁺, C₈H₇O y [B₃-COCH₃]⁺, C₇H₇. Los espectros UV muestran que el compuesto es una flavanona, al observarse en el espectro en MeOH una banda II a λ^{MeOH} nm: 278,8 y un hombro correspondiente a la banda I a λ^{MeOH} nm: 343, debido a la ausencia del doble enlace en el anillo central. En el espectro de la solución metanólica con NaOMe se observa un desplaza-

miento hipsocrómico de 22,7 nm, con una degeneración de la banda II al presentar un hombro a 281 nm, indicando la ausencia de grupos 7-OH y 5-OH, así como de grupos OH en posiciones 5, 6 y 7 ó 6, 7 y 8 sustituidos. Al agregar NaOAc a solución nueva, se registro un espectro casi idéntico al obtenido en la solución metanólica, confirmando la inexistencia de 7-OH. Por otra parte, al añadir AlCl₃ se observe un desplazamiento parecido al ocurrido en el análisis con NaOAc, indicando la ausencia de 5-OH, así como en posiciones orto-sustituidos.

El espectro de RMN ¹H muestra la ausencia del doble enlace del anillo central, que confirman que el compuesto en realidad es una flavanona, observándose un par de cuartetos a δ 2,7328 (1H, q, J=2,73 y 16,79 Hz, H-3^{cia}) y δ 3,0163 (1H, q, J=13,34 y 16,79 Hz, H-3^{trms}) que se acoplan entre si, además de hacerlo con el protón H-2 cuya señal aparece a δ 5,3191 (1H, q, J=2,70 y 13,34 Hz, H-2), otra señal es la observada como un singulete a δ 6,3379 correspondiente al protón H-8. Por otra parte, el espectro muestra que el compuesto es para-sustituido en el anillo B, al presentar un par de dobletes a δ 6,9280 (2H, d, J=8,76 Hz, H-3', 5') y δ 7,3678 (2H, d, J=8,76 Hz, H-2', 6') correspondientes a los protones H-3', 5' y H-2', 6' que se acoplan mutuamente, además de presentar tres singuletes a δ 3,8088; 3,8756 y 3,9186 cuyas integrales dan claramente para tres protones cada una, correspondientes a tres grupos OMe. Por su parte, el espectro de ¹³C presenta las señales de los C-2 y C-3 a δ ~79 y 45,3159, respectivamente. La señal del C-4 aparece a δ 189,8907, esto implica que sobre C-5 no existe grupo OH que forme puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonilo, lo cual hace que se desplace la señal del C-4 a campo más bajo, según Agrawal (1989). También, presenta tres señales a δ 55,4472; 56,3669 y 61,8391 que corresponden a los tres carbonos metoxílicos, además de observarse señales correspondientes a los carbonos C-2', C-6' d 127,8030 y C-3', C-5' d 114,2287, las cuales confirman que el anillo B es para-sustituido. El espectro IR presenta una banda ancha a ν^{KBr} cm⁻¹: 3418,5 que se debe al grupo OH, otra señal característica aparece a ν^{KBr} cm⁻¹: 1656,9 atribuida al doble enlace C=O, además de la que se observa a ν^{KBr} cm⁻¹: 1614,9 que se debe a los dobles enlaces C=C de los grupos aromáticos.

Para establecer las posiciones de los sustituyentes sobre los anillos bencénicos, de la estructura molecular, se determinó las diferencias espectroscópicas de los desplazamientos químicos del proton sobre C-6 cuando existe un grupo OH en posición 8, y viceversa, en flavanonas sustituidas, además de poseer grupos OMe en los carbonos C-5 y C-7. Se analizaron todos los resultados espectrales y

localización de *C. odorata* y su amplio uso en la medicina popular, hizo que se seleccionara la especie con la finalidad de realizar un análisis fitoquímico y un estudio biológico que permitiera evaluar la actividad antibacteriana del extracto en diclorometano de las hojas de esta especie vegetal y separar, en lo posible, el o los compuestos responsables de tal efecto biológico.

PARTE EXPERIMENTAL

Muestreo de tejidos vegetales

Chromolaena odorata fue colectada al azar en la región de San Juan de Macarapana, Estado Sucre, entre febrero-marzo de 1994 y autenticada por comparación con especímenes idénticos depositados en el herbario IRBR del Departamento de Biología del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente, a cargo del Prof. Luis José Cumana.

BIOENSAYO

Para comprobar el efecto antibacteriano del extracto crudo, fracciones y/o compuestos aislados se utilizaron los siguientes microorganismos, aislados de procesos patológicos en el Hospital Universitario Antonio Patricio de Alcalá de Cumaná, Estado Sucre, y bacterias ATCC.

Microorganismo	Origen	Coloración de Gram
<i>Escherichia coli</i>	Clínico	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Clínico	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	Clínico	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Clínico	+
<i>Bacillus cereus</i>	Clínico	+
<i>Escherichia coli</i>	ATCC (25722)	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC (25416)	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC (25923)	+

ANTIBIOSIS

La determinación de la actividad antibacteriana del extracto crudo, fracciones y/o compuestos aislados se realizó mediante la técnica de difusión en agar llamada antibiograma, descrita por Bauer *et al.* (1966), la cual consiste en impregnar 10 o 25 µl de una solución del extracto o compuesto a probar en discos de papel de filtro Whatman Nº 3 de 5 a 10 mm de diámetro, según el volumen de muestra a colocar, luego estos discos son colocados en placas de Petri previamente servidas con agar Mueller-Hinton e inoculadas con una suspensión bacteriana de las cepas a utilizar. Posteriormente, las placas son preincubadas a 5°C por 12 horas y luego se incuban a 37°C por 24 horas. La acción antibacteriana se midió tomando el diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco.

EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN

Las hojas secas y molidas (420 g) de *C. odorata* fueron extraídas en un Soxhlet con CH₂Cl₂ hasta agotamiento, obteniéndose 90 g de extracto crudo, éste fue tratado con etanol caliente y acetato de plomo acuoso al 4% (1:1). La solución resultante fue extraída con CH₂Cl₂ y la fase orgánica fue evaporada a presión reducida obteniendo de esta forma 10,5 g de extracto, el cual fue fraccionado a través de una cromatografía de columna flash según Still *et al.* (1978), (110 x 3 cm), sobre sílica gel (260 g, 70-270 mesh, 60 Å Aldrich), la elución se inició con n-hexano, variando luego la polaridad del solvente en orden creciente hasta llegar a metanol. Se colectaron eluatos de 125 ml, los cuales fueron agrupados, según comparación en TLC analítica, obteniéndose 15 fracciones.

La fracción 9 (0,4 g), la cual eluyó con AcOEt:MeOH (1:1), fue purificada mediante cromatografía de columna sobre gel de Sephadex LH 20, 25-100 µm (Pharmacia) con fase móvil n-hexano-diclorometano-metanol (7:4:1), obteniéndose cuatro subfracciones. La primera (320 mg) fue repurificada en TLC de 0,5 mm de espesor sobre sílica gel Kieselgel 60 H y fase móvil una mezcla de tolueno-acetato de etilo (5:2), separándose tres nuevas fracciones, la tercera de estas (R_f= 0,27) dió 44,3 mg, presentando una coloración verde bajo luz UV.

ANÁLISIS ESPECTRALES

RMN

Los análisis de RMN (¹H y ¹³C) fueron realizados en un espectrómetro Bruker de 300 MHz. Los espectros fueron tomados de la muestra en cloroformo deuterado y tetrametil silano como estándar interno. Los espectros se realizaron a 270 y 68 MHz, respectivamente.

CG/EM

El análisis de cromatografía de gases por capilaridad se realizó en un cromatógrafo Hewlett-Packard modelo HP58890 series II, equipado con un inyector split/splitless, y un detector de masas Hewlett-Packard modelo HP5971A. El voltaje de ionización aplicado fue de 70 eV. La muestra fue disuelta en acetona.

UV/vis.

El compuesto fue disuelto en metanol y los análisis realizados en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 2, con celdas de cuarzo de 1x5cm. Los espectros se tomaron en MeOH, NaOMe, NaOAc y AlCl₃, para observar los desplazamientos químicos provocados por los cromóforos formados por los grupos funcionales en los anillos, A y B, de la molécula.

IR

Los espectros de infrarrojo se registraron en un espectrómetro Perkin Elmer FT-IR 1725X. Los análisis se realizaron sólido-KBr vs KBr-aire, y las pastillas se compactaron en una prensa a 15 000 libras/pulg² de presión.

ANÁLISIS FÍSICO

El punto de fusión de compuesto se determinó en un fusiometro marca Thermolyne de 120 voltios.

El compuesto cristalizado presentó un p.f. 102-105°C. con los siguientes datos espectrales: RMN ¹H (CDCl₃), 270 MHz: δ 2,7328 (1H, q, J=2,73 y 16,79 Hz, H-3^{cia}), 3,0163 (1H, q, J= 13,34 y 16,79 Hz, H-3^{trms}), 3,8088 (3H, s, OMe), 3,8756 (3H, s, OMe), 3,9186 (3H, s, OMe), 5,3191 (1H, q, J= 2,70 y 13,34 Hz, H-2), 6,3379 (1H, s, H-8), 6,9281 (2H, d, J=8,76 Hz, H-3', 5') y 7,3678 (2H, d, J= 8,76 Hz, H-2', 6'). RMN ¹³C (CDCl₃), 68 Mhz: δ=45,3083 (C-3), 55,4472 (OMe), 56,3669 (OMe), 61,8391 (OMe), ~79 (C-2), 96,3982 (C-8), 108,4828 (C-10), 114,2287 (C-3', C-5'), 127,8030 (C-2', C-6'), 130,7520 (C-1'), 133,8757 (C-6), 154,0320 (C-9), 157,3306 (C-4'), 159,9831 (C-7) y 189,8907 (C-4). IR, ν^{KBr} cm⁻¹: 3418,5 (OH), 1656,9 (C=O) y 1614,9 (C=C). UV, λ^{MeOH} nm: 278,8 (B II), 343,0 h (B I), λ^{NaOMe} nm: 256,1; 280,4 h (B II), 381,2 h (B I), λ^{NaOAc} nm: 275,0 (B II), 381,8 h (B I) y λ^{AlCl_3} nm: 278,7 (B II), 345,0 h (B I). EM, 330 m/e [C₁₈H₁₈O₆]⁺ (21,05); 196 m/e [C₉H₈O₃]⁺ (100); 134 m/e [C₉H₁₀O]⁺ (10,53); 181 m/e [C₈H₅O₃]⁺ (10,95); 153 m/e [C₇H₅O₄]⁺ (24); 119 m/e [C₈H₇O]⁺ (3,24) y 91 m/e [C₇H₇]⁺ (2,21).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

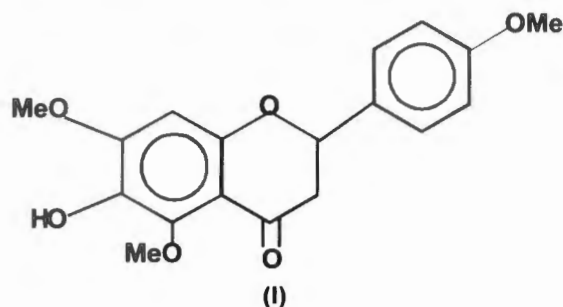
El espectro de masas muestra a [M]⁺ correspondiente a C₁₈H₁₈O₆, además, la estructura de la flavanona posee 106 m/e adicionales, lo que implica tres grupos OMe adicionales al esqueleto base de las flavanonas (224 m/e), dos sobre el anillo A y uno sobre el B, además de un grupo OH sobre el anillo A que sumados todos hace 106 m/e. Otras señales que se observan, producto de la fragmentación retro Diels-Alder, son [A₁]⁺, C₉H₈O₃; [B₃]⁺, C₉H₁₀O; [A₁-CH₃]⁺, C₈H₅O₃; [A₁-COCH₃]⁺, C₇H₅O₄; [B₃-CH₃]⁺, C₈H₇O y [B₃-COCH₃]⁺, C₇H₇. Los espectros UV muestran que el compuesto es una flavanona, al observarse en el espectro en MeOH una banda II a λ^{MeOH} nm: 278,8 y un hombro correspondiente a la banda I a λ^{MeOH} nm: 343, debido a la ausencia del doble enlace en el anillo central. En el espectro de la solución metanólica con NaOMe se observa un despla-

miento hipsocrómico de 22,7 nm, con una degeneración de la banda II al presentar un hombro a 281 nm, indicando la ausencia de grupos 7-OH y 5-OH, así como de grupos OH en posiciones 5, 6 y 7 ó 6, 7 y 8 sustituidos. Al agregar NaOAc a solución nueva, se registro un espectro casi idéntico al obtenido en la solución metanólica, confirmando la inexistencia de 7-OH. Por otra parte, al añadir AlCl₃ se observe un desplazamiento parecido al ocurrido en el análisis con NaOAc, indicando la ausencia de 5-OH, así como en posiciones orto-sustituidos.

El espectro de RMN ¹H muestra la ausencia del doble enlace del anillo central, que confirman que el compuesto en realidad es una flavanona, observándose un par de cuartetos a δ 2,7328 (1H, q, J=2,73 y 16,79 Hz, H-3^{cia}) y δ 3,0163 (1H, q, J= 13,34 y 16,79 Hz, H-3^{trms}) que se acoplan entre si, además de hacerlo con el protón H-2 cuya señal aparece a δ 5,3191 (1H, q, J= 2,70 y 13,34 Hz, H-2), otra señal es la observada como un singulete a δ 6,3379 correspondiente al protón H-8. Por otra parte, el espectro muestra que el compuesto es para-sustituido en el anillo B, al presentar un par de dobletes a δ 6,9280 (2H, d, J=8,76 Hz, H-3', 5') y δ 7,3678 (2H, d, J=8,76 Hz, H-2', 6') correspondientes a los protones H-3', 5' y H-2', 6' que se acoplan mutuamente, además de presentar tres singuletes a δ 3,8088; 3,8756 y 3,9186 cuyas integrales dan claramente para tres protones cada una, correspondientes a tres grupos OMe. Por su parte, el espectro de ¹³C presenta las señales de los C-2 y C-3 a δ ~79 y 45,3159, respectivamente. La señal del C-4 aparece a δ 189,8907, esto implica que sobre C-5 no existe grupo OH que forme puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonilo, lo cual hace que se desplace la señal del C-4 a campo más bajo, según Agrawal (1989). También, presenta tres señales a δ 55,4472; 56,3669 y 61,8391 que corresponden a los tres carbonos metoxílicos, además de observarse señales correspondientes a los carbonos C-2', C-6' d 127,8030 y C-3', C-5' d 114,2287, las cuales confirman que el anillo B es para-sustituido. El espectro IR presenta una banda ancha a ν^{KBr} cm⁻¹: 3418,5 que se debe al grupo OH, otra señal característica aparece a ν^{KBr} cm⁻¹: 1656,9 atribuida al doble enlace C=O, además de la que se observa a ν^{KBr} cm⁻¹: 1614,9 que se debe a los dobles enlaces C=C de los grupos aromáticos.

Para establecer las posiciones de los sustituyentes sobre los anillos bencénicos, de la estructura molecular, se determinó las diferencias espectroscopicas de los desplazamientos químicos del proton sobre C-6 cuando existe un grupo OH en posición 8, y viceversa, en flavanonas sustituidas, además de poseer grupos OMe en los carbonos C-5 y C-7. Se analizaron todos los resultados espectrales y

por otro lado se compararon éstos con los datos de compuestos modelos, tales como los reportados por: Iinuma *et al.* (1984), Panichpol y Waterman (1978) y Tomimori *et al.* (1985), y se estableció que el grupo oxhidrilo está sobre el C-6. Por tal razón se asignó al compuesto la estructura de la 6-hidroxi-4',5,7-trimetoxi flavanona(I), de la cual no se consigue reporte previo en la literatura, por lo que se presume que sea una nueva estructura para la química.



El fraccionamiento y separación de la sustancia activa fue evaluado por el método de difusión en agar. El compuesto aislado manifestó cierta acción antibacteriana contra *S. aureus* y *B. cereus*, presentando una C.M.I. entre 169,2-338,3 mg/ml, frente a las dos cepas bacterianas. Este hecho confirma el uso que se le da a *C. odorata* en la medicina tradicional, debido a que *S. aureus* es causante de muchas infecciones cutáneas debidas a traumatismos y heridas.

CONCLUSIONES

1.- El extracto en diclorometano de las hojas de *C. odorata* inhibe el crecimiento bacteriano de *S. aureus* y *B. cereus*, por lo que se puede considerar, éste, como una fuente de sustancias capaces de contrarrestar el efecto de estos microorganismos.

2.- La flavanona aislada presentó acción antibacteriana contra *S. aureus* y *B. cereus*, lo que corrobora el uso de *C. odorata* en la medicina tradicional para combatir infecciones en la piel.

3.- Se aísla un compuesto para el cual por análisis espectroscópicos de RMN (^1H y ^{13}C), UV/vis. IR, así como también de CG/EM, además de comparación con datos de estructuras modelos, se le asignó la estructura de la 6-hidroxi-4',5,7-trimetoxi flavanona.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se llevó a cabo gracias a los aportes financieros del Consejo de Investigación de la UDO CI-5-023-00459/91-92 y el CONICIT S1-2202.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRAWAL, P. K. 1989. Carbon-13 NMR of flavonoids, Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam-Netherlands. pp. 97.
- AKAK, P. A., 1990. Mechanism of hemostatic activity of *Eupatorium odoratum*. Int. J. Crude Drug. Res., 28(4):253-256.
- ARENE, E.; PETTIT, G. y ODE, R., 1978. The isolation of isosakuranetin methyl ether from *Eupatorium odoratum*. Lloydia, 41(2):186-189.
- BARUA, R.; SHARMA, R.; THYAGARAJAN, G. y HERTZ, W., 1978. Flavonoids of *Chromolaena odorata*. Phytochemistry, 17, 1807-1808.
- BARUAH, R.N. and LECLERQ, P. A., 1993. Constituents of the essential oil from the flowers of *Chromolaena odorata*. Planta Med., 53, 283.
- BAUER, A., KIRBY, W., SHERRIS, J., y TURK, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am. J. Clin. Path., 45(4):493-496.
- BILLER, A.; BOPPRÉ, M.; WITTE, L. and HARTMANN, T., 1994. Pyrrolizidine alkaloids in *Chromolaena odorata*. Chemical and chemoeological aspects. Phytochemistry. 35(3):615-619.
- BOSE, P. K.; CHAKRABARTI, P.; CHAKRABARTI, S.; DUTTA, S. P. and BARUA, A. K. 1973. Flavonoid constituents of *Eupatorium odoratum*. Phytochemistry, 17, 1807-1808.
- IINUMA, M.; MATSUURA, S. And TANAKA, T., 1984. Synthetic studies on flavone derivatives. XV. Isomerization of chalcones into flavanones in methyl cellosolve-phosphoric acid, Chem. Phar. Bull., 32(4):1472-1476.
- INYA-AGHA, S.; OGUNTIMEN, B.; SOFOWORA, A. y BENJAMIN, T., 1987. Phytochemical and antibacterial studies on the essential oil of *Eupatorium odoratum*, Int. J. Crude Drug Res., 25(1):49-52.
- IWU, M. M. y CHIORI, C. O., 1984. Antimicrobial activity of *Eupatorium odoratum* extracts, Fitoterapia, 55(6)354-356.

- METWALLY, A. M. and EKEJIUBA, E. C., 1981. Methoxylated flavonols and flavanones from *Eupatorium odoratum*, *Planta Med.*, 42, 403-405.
- PANICHPOL, K. and WATERMAN, P. G., 1978. Novel flavonoids from the stem of *Popowia cauliflora*, *Phytochemistry*, 17, 1363-1367.
- PHAN, T. T.; HUGHES, M. A.; CHERRY, G. W.; LE, T. T. and PHAM, H. M., 1996. An aqueous extract of the leaves of *Chromolaena odorata* (formerly *Eupatorium odoratum*) (Eupolin) inhibits hydrated collagen lattice contraction by normal human dermal fibroblasts, 2(3):335-343.
- STILL, W. KAHN, M. y MITRA, A., 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution, *J. Org. Chem.*, 43(14):2923-2925.
- TALAPATRA, S. K., BHAR, D. S. and TALAPATRA, B., 1974. Flavonoid and terpenoid constituents of *Eupatorium odoratum*, *Phytochemistry*, 13, 284-284.
- TOMIMORI, T.; MIYAICHI, Y.; IOMOTO, Y.; KIZU, H. and NAMBA, T., 1985. Studies on nepalese crude drugs. V. On the flavonoid constituents of the root of *Scutellaria discolor* Colbr, *Chem. Pharm. Bull.*, 33(10):4457-4463.