

45.
20je.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

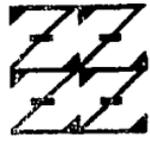


FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

SINTESIS DE N - ISOBUTILCINAMAMIDAS
METOXILADAS Y DETERMINACION DE SU
ACTIVIDAD LARVICIDA EN *Culex quinquefasciatus*
(CULICIDEA) Y EN *Artemia salina* (LEANCH).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :
PATRICIA PINEDA GUTIERREZ

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION

México, D.F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	M. EN C. JOSE IGNACIO REILA CONTRERAS
VOCAL	M. EN C. ANDRES NAVARRETE CASTRO
SECRETARIO	M. EN C. LINO REYES TREJO
SUPLENTE	Q.F.B. ADELFO REYES RAMIREZ
SUPLENTE	Q.F.B. VALENTIN ISLAS PEREZ

SITIO EN DONDE SE DESARROLLO EL TRABAJO:

**LABORATORIO DE QUIMICA ORGANICA, UNIDAD DE ESTUDIOS DE POSGRADO,
FACULTAD DE QUIMICA, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES, AREA DE QUIMICA DEL DEPARTAMENTO DE PREPARATORIA AGRICOLA, UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO.

FEB ENEOERA UMAN, MEXICO, D.F., 1994.

SUBSISTENTE: PATRICIA PINEDA GUTIERREZ

**DIRECTORES DEL TRABAJO: M. EN C. ANDRES NAVARRETE CASTRO
M. EN C. LINO REYES TREJO**

AGRADECIMIENTOS

SE AGRADECE A LA BDA. ROCIO POBAS NORCASILLAS Y AL M. EN C. LINO REYES TREJO Y A TODOS LOS INTEGRANTES DEL LABORATORIO DE QUIMICA ORGANICA UBICADO EN LA UNIDAD DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUIMICA UMAN, POR EL APOYO BRINDADO PARA LA REALISACION DE ESTE TRABAJO.

SE AGRADECE EN ESPECIAL AL M. EN C. ANDRES NAVARRETE CASTRO POR SU VALIOSO APOYO E IMPORTANTES CONSEJOS QUE HICIERON POSIBLE LA REALISACION DE ESTE TRABAJO.

POR LAS FACILIDADES BRINDADAS AL USAR SUS INSTALACIONES SE AGRADECE A LA LA UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO, EN PARTICULAR AL AREA DE QUIMICA DEL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES, EN DONDE SE REALIO UNA PARTE DE ESTE TRABAJO.

SE AGRADECE A LOS INTEGRANTES DEL LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES, EN ESPECIAL A LA QUIMICA CARMEN SIXTOS POR EL APOYO Y LA AMISTAD QUE ME BRINDO.

DEDICATORIA

**ESTA TRABAJO LO DEDICO A TODOS LOS QUE
DE ALGUNA MANERA ME APOYARON.**

**A MI MADRE, EN DONDE ESTES TE DEDICO
ESTE TRABAJO.**

**A MI PADRE POR DARME LA OPORTUNIDAD DE
DE ESTUDIAR Y SUPERARME.**

**A MIS HERMANOS POR EL LA AMISTAD QUE
HAN BRINDADO EN TODO MOMENTO, DESEANDO
QUE REALICEN TODAS SUS METAS Y
ASPIRACIONES.**

INDICE

Página

RESUMEN -----	1
1. INTRODUCCION. -----	2
II. FUNDAMENTO DEL TEMA.	
2.1. Entomología médica. -----	5
2.1.1. Artropodos como agentes directos de enfermedades o molestias. -----	5
2.1.2. Vectores. -----	6
2.1.3. Transmisión de patógenos por Artropodos. -----	7
2.1.3.1. Mosquitos como vectores. -----	7
2.1.3.2. Otros vectores (artropodos) -----	8
2.1.4. Mosquitos <i>Anopheles</i> y <i>Culex</i> . -----	9
2.1.4.1. <i>Anopheles</i> . -----	11
2.1.4.2. <i>Culex</i> . -----	11
2.1.4.2.1. Características de <i>C. quinquefasciatus</i> -----	12
2.1.4.2.2. Ciclo biológico de <i>Culex</i> . -----	13
2.2. Control de Artropodos. -----	15
2.2.1. Compuestos de origen vegetal. -----	15
2.3. Modelos de actividad insecticida. -----	17
2.3.1. Mosquitos adultos y larvas. -----	18
2.3.2. Método de microinyección. -----	18
2.3.3. Bioensayo por alimentación con dieta artificial. -----	18

2.3.4. Inhibidores alimentarios.	
ensayo en disco. -----	19
2.3.5. Ensayo en papel filtro. -----	20
2.3.6. Larva de mosquito, <i>Culex</i>	
<i>quinquefasciatus</i> , como modelo. -----	20
2.4. Bioensayo general. (<i>Artemia salina</i>) -----	21
2.5. Isobutilamidas. -----	22
2.5.1. Estructura general. -----	22
2.5.2. Presencia en la naturaleza. -----	22
2.5.3. Actividad biológica de las	
N-isobutilamidas. -----	25
2.5.4. Actividad insecticida. -----	27
2.5.4.1. Relación estructura-actividad. --	27
2.5.4.2. Mecanismo de acción. -----	34
2.5.5. Síntesis de N-isobutilamidas. -----	34
2.5.5.1. Condensación aldólica. -----	34
2.5.5.1.1. Condensación de	
Knoevenagel. -----	35
2.5.5.2. Formación del cloruro de acilo. -	36
2.5.5.3. Síntesis de amidas a partir de	
cloruro de acilo. -----	37
III. JUSTIFICACION DEL TEMA. -----	39
IV. OBJETIVOS.	
4.1. Objetivo general. -----	41
4.2. Objetivos particulares. -----	41
V. HIPOTESIS. -----	43

VI. MATERIAL.

6.1. Material para la síntesis.

6.1.1. Material de laboratorio. -----	44
6.1.2. Equipo. -----	44
6.1.3. Substancias. -----	44
6.1.4. Disolventes. -----	45

6.2. Material para los bioensayos.

6.2.1. Material biológico. -----	45
6.2.2. Material de laboratorio. -----	46
6.2.3. Substancias. -----	46
6.2.4. Disolventes. -----	46
6.2.5. Equipo. -----	46

VII. METODOS.

7.1. Síntesis de N-isobutilcinamamidas.

7.1.1. Síntesis de ácidos cinámicos a partir de benzaldehídos. -----	47
7.1.2. Obtención de cloruros de ácido. -----	47
7.1.3. Formación de la amida. -----	48
7.1.4. Identificación. -----	48

7.2. Establecimiento del ciclo de la larva de *Culex quinquefasciatus*. -----

50

7.2.1. Determinación de la actividad larvicida sobre <i>Culex quinquefasciatus</i> . -----	50
---	----

7.3. Producción de *Artemia salina*. -----

52

7.3.1. Determinación de la actividad biológica en <i>Artemia salina</i> . -----	52
--	----

7.4. Determinación de la Cl_{50} en <i>C. quinquefasciatus</i> y <i>A. salina</i> . -----	52
--	----

VIII. RESULTADOS.

8.1. Síntesis de las N-isobutilcinamamidas. -----	54
8.1.1. Identificación de los compuestos sintetizados. -----	55
8.2. Determinación de la actividad larvica. -----	60

IX. ANALISIS DE RESULTADOS.

9.1. Síntesis de las amidas. -----	71
9.2. Identificación. -----	72
9.2.1. Resonancia magnética nuclear. -----	73
9.2.2. Espectros de infrarrojo. -----	73
9.2.3. Espectros de Ultravioleta. -----	73
9.2.4. Espectrometría de masa. -----	73
9.3. Determinación de la actividad larvica de las N-isobutilcinamamidas. -----	74
9.3.1. Actividad larvica sobre <i>Culex</i> <i>quinquefasciatus</i> . -----	74
9.4. Actividad larvica sobre <i>Artemia salina</i> . -----	77
9.5. Correlación entre la actividad larvica en <i>C. quinquefasciatus</i> y <i>A. salina</i> . -----	79

X. CONCLUSIONES. -----	81
------------------------	----

XI. SUBERENCIAS. ----- 83

XII. BIBLIOGRAFIA. ----- 84

XIII. APENDICE. ----- 88

INDICE DE ESQUEMAS Y FIGURAS

	Página
ESQUEMA 1. Síntesis de las N-isobutilamidas. -----	49
ESQUEMA 2. Determinación de la CL ₅₀ en larva de mosco común. -----	51
ESQUEMA 3. Determinación de la CL ₅₀ en larva de <i>Artemia salina</i> . -----	53

FIGURAS.

Curvas dosis-respuesta del efecto larvicida en *Culex quinquefasciatus*.

Fig 1. -H amida. -----	62
Fig 2. 2-metoxi -----	62
Fig 3. 3-metoxi -----	63
Fig 4. 4-metoxi -----	63
Fig 5. 2,3-dimetoxi -----	64
Fig 6. 2,5-dimetoxi -----	64
Fig 7. 3,4-dimetoxi -----	65
Fig 8. 3,5-dimetoxi -----	65

Curvas dosis-respuesta en *Artemia salina* de las amidas sintéticas.

Fig 9. -H Amida. -----	67
Fig 10. 2-metoxi. -----	67
Fig 11. 3-metoxi. -----	68
Fig 12. 4-metoxi. -----	68
Fig 13. 2,5-dimetoxi. -----	69
Fig 14. 2,6-dimetoxi. -----	69
Fig 15. 3,4-dimetoxi. -----	70
Fig 16. 3,5-dimetoxi. -----	70

Fig 17. Actividad larvicida de las amidas sobre <i>Culex quinquefasciatus</i> . -----	76
Fig 18. Actividad larvicida de las amidas sobre <i>Artemia salina</i> . -----	78
Fig 19. Correlación entre la actividad en <i>A. salina</i> y <i>C. quinquefasciatus</i> . -----	80

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA I. Análisis de la importancia del grupo N-isobutilo. -----	29
TABLA II. Actividades relativas de algunas N-isobutilamidas con cambios en los sustituyentes en el anillo aromático. ---	30
TABLA III. Variación de la actividad insecticida de acuerdo al tipo de insaturación y a la estereoquímica. -----	32
TABLA IV. Cambios en la actividad insecticida con diferente sustituyente en el dieno. -	33
TABLA V. Condiciones de reacción de las amidas sintetizadas. -----	56
TABLA VI. Resultados de la síntesis de las N-isobutilcinamidas metoxiladas. -----	57
TABLA VII. Principales bandas de los espectros de infrarrojo. -----	58
TABLA VIII. Máximos de absorción de las amidas sintéticas a partir de los espectros de ultravioleta. -----	59
TABLA IX. Concentración letal 50 en <i>Culex</i> <i>quinquefasciatus</i> de las amidas. -----	61
TABLA X. Concentración letal de las amidas sobre <i>Artemia salina</i> . -----	66

RESUMEN.

El control de insectos es de suma importancia para el hombre, ya que afectan su salud, su bienestar y su economía. Este control se ha vuelto más difícil por el uso indiscriminado de los insecticidas sintéticos, debido a la formación de mecanismos de resistencia en los insectos.

Un grupo de compuestos de origen natural que cobra importancia en el control de los insectos son las N-isobutilamidas de cadena lineal poliinsaturada de 8 a 20 carbonos. La mayoría de estos compuestos presentan buena actividad insecticida contra varias especies de insectos, sin embargo son poco estables, lo que limita su uso.

Las N-isobutilamidas se han tomado como modelo para la síntesis de análogos más estables que las amidas de origen natural.

En este trabajo se sintetizaron 11 N-isobutilcinamamidas metoxiladas en diferentes posiciones del anillo aromático y la N-isobutilcinamamida con rendimientos del 46 al 93 %. La identificación se realizó por análisis espectroscópico.

Se determinó la actividad larvicida de las amidas sintetizadas en larvas de *Culex quinquefasciatus* y en *Artemia salina*. Se tomó como referencia al α -sanshool (una N-isobutilamida de origen natural) y al etilparatión. Ninguna de las amidas presentó una actividad mayor o igual que el α -sanshool en los bioensayos empleados (*C. quinquefasciatus* CL_{50} = 1.82 μ g/ml; *A. salina* CL_{50} = 2.6 μ g/ml). De las amidas sintetizadas la más activa en ambos bioensayos fue la metoxilada en la posición 3 (*C. quinquefasciatus* CL_{50} = 80.4 μ g/ml y *A. salina* 23.5 μ g/ml); la amida 4-metoxi presentó una actividad prácticamente igual (CL_{50} = 22.5 μ g/ml) a la amida metoxilada en 3 sobre *A. salina*.

Se encontró una buena correlación entre la actividad larvicida de *Culex quinquefasciatus* y *Artemia salina* con un coeficiente de correlación de 0.91.

I. INTRODUCCION.

Diversos artrópodos están involucrados en alteraciones de salud mental y física del ser humano, independientemente de que son fuente de fastidio y malestar. Los insectos son vectores potentes de diversas enfermedades que afectan tanto al hombre como a los animales. (Harwood, 1987)

Las enfermedades más importantes que ocasionan pérdidas en la productividad humana son: la Malaria, ocasionada por varias especies de *Plasmodium*, transmitidas por el mosquito *Anopheles*; la Filariasis de Bancroft, transmitida por insectos del género *Culex*; diversas enfermedades virales, transmitidas por insectos de la familia Culicidae. La mosca doméstica puede transmitir bacterias entéricas patógenas como *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio cholerae* (agente etiológico del Cólera), el virus de la poliomielitis y otras enfermedades enterovirales. La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis, es ocasionada por chinches de la familia Triatominae, la Peste que es transmitida por pulgas, y la Oncocercosis (agente causal *Onchocerca volvulus*), tiene como vectores a los insectos Simúlidos. (Harwood, 1987)

Por lo cual, el control de artrópodos es un factor importante para la posible erradicación de algunas de estas enfermedades.

Los insecticidas sintéticos, como el DDT, gozaron de amplio uso debido a su baja o moderada toxicidad aguda para el ser humano, aunada a la toxicidad extraordinaria para muchos artrópodos. Una de sus características es su toxicidad prolongada por contacto, propiedad que mostró ser de gran valor para el control de muchos insectos adultos importantes. Pero el uso incontrolado de estos insecticidas ocasionaron que los insectos formarían mecanismos de

resistencia y además, el tratamiento de plantas y animales daría como resultado residuos tóxicos en los alimentos. Todos estos factores llevaron a la búsqueda de nuevos insecticidas de origen natural. Se han encontrado que diversas plantas tienen principios activos contra insectos, como las especies del género *Zanthoxylum*. La flor de *Spilanthes oleracea*, *Crisantemum cinerariaefolium* y *Heliopsis helianthoides* entre otras. El aislamiento e identificación de los principios activos de las plantas es de gran importancia ya que a partir de estos, se podrían sintetizar compuestos análogos, buscando que conserven su actividad insecticida, que sean fácilmente biodegradables y que no sean tóxicos para el hombre o los animales. (Haral, 1984; Kubo, 1991).

De la corteza de *Zanthoxylum liebmannianum* se identificó al α -sanshool, como el principio activo larvicida. El α -sanshool es una N-isobutilamida de 12 átomos de carbono tiene actividad larvicida con una Concentración letal 50 (CL₅₀) = 1.82 ppm. En este trabajo la idea principal fué sintetizar N-isobutilamidas análogas de cadena corta, que fueran estables y que fueran activas como larvicidas, tomando como modelo la N-isobutilamida de origen natural.

Se sintetizaron 11 N-isobutilcinamamidas metoxiladas en diferentes posiciones del anillo aromático, y la misma N-isobutilcinamamida sin sustituyentes. Para la síntesis se tuvo como materia prima benzaldehidos y ácidos cinámicos metoxilados. Los benzaldehidos se transformaron a ácidos por medio de la reacción de condensación de Knoevenagel, para obtener el ácido correspondiente, del cual se formó el cloruro de acilo con cloruro de tionilo. La formación de la amida se realizó por la reacción del cloruro de acilo y la isobutilamina. De las N-isobutilcinamamidas que se sintetizaron tres de ellas, la N-isobutilcinamamida, N-isobutil-3,4-dimetoxicinamamida y la N-isobutil- 4 -

metoxicinamamida ya fueron sintetizadas y se encontró que tenían actividad larvicida. (Carballo y Melchor, 1973)

A cada una de las amidas sintetizadas se les determinó su CL_{50} en larvas de mosco común (*Culex quinquefasciatus*) y en larvas de *Artemia salina*.

II. FUNDAMENTO DEL TEMA.

2.1 ENTOMOLOGIA MEDICA.

Muchos insectos y otros artrópodos tienen importancia médica y veterinaria por causar estados patológicos o transmitir organismos patógenos al hombre o a los animales. Los artrópodos involucrados pueden ser: a) agentes causales por sí mismos (por ejemplo, el ácaro de la sarna); b) huéspedes intermediarios (ciertos escarabajos son huéspedes intermediarios de helmintos parásitos); ó c) vectores de patógenos (los mosquitos *Anopheles* en relación con la malaria). El estudio de estas condiciones incluye amplios aspectos de la biología y control de los artrópodos dañinos, así como el reconocimiento del daño que causan y la manera como lo hacen. Es obvia su repercusión en la salud pública e individual, además de que afecta a los animales domésticos y silvestres. Los insectos afectan tanto la salud mental como la física, así como la comodidad y el bienestar general. (Harwood, 1987)

Existen diversas formas en las que los artrópodos se relacionan con la salud y el bienestar del hombre. Se clasifican en 2 grupos, como agentes causantes directos o como vectores.

2.1.1 ARTRÓPODOS COMO AGENTES DIRECTOS DE ENFERMEDADES O MOLESTIAS.

Los artrópodos provocan alteraciones que pueden dañar tanto al hombre como a los animales en general pueden provocar entomofobia, pérdidas de sangre por las picaduras de insectos, daño accidental a los organos de los sentidos, envenenamiento, dermatosis, miasis y alergias.

2.1.2 VECTORES.

Vectores se les llama a los artrópodos que son capaces de transmitir organismos que causan enfermedades en huéspedes vertebrados.

Transmisión mecánica. El vector es sólo un portador que transmite patógenos con las partes bucales y patas contaminadas o por el paso de agentes a través del intestino sin que éstos sufran cambios.

Transmisión biológica. Es la manera más común de desarrollo de patógenos entre las enfermedades de vertebrados relacionados con artrópodos. Huff en 1931, clasificó la transmisión biológica basándose en el desarrollo del patógeno en el vector. Los diferentes tipos de transmisión biológica se mencionarán a continuación:

a) Transmisión ciclopropagativa. En esta transmisión los organismos causales sufren cambios cíclicos y se multiplican en el cuerpo del artrópodo como en el caso de la transmisión de plasmodios de la malaria por mosquitos anofelinos y en muchas otras instancias de desarrollo en protozoarios esporozoarios, que utilizan a los artrópodos como vectores. Hay una gran multiplicación dentro del vector, hay etapas intermedias de desarrollo del patógeno durante las que es incapaz de infectar al huésped vertebrado; sólo la última etapa de crecimiento es infectiva.

b) Transmisión cicloevolutiva. Los organismos causales sufren cambios cíclicos, pero no se multiplican en el cuerpo del artrópodo, por ejemplo la transmisión de filarias *Wuchereria bancrofti*, organismo causal de la Filariasis de Bancroft por mosquitos. Hay desarrollo del patógeno en una etapa infectiva para los vertebrados, pero no hay multiplicación. Este desarrollo es típico de helmintos, que

utilizan artrópodos como agentes de transferencia; p.e. el estadio larval de tenias de aves domésticas, se desarrollan en coleópteros.

c) Transmisión propagativa. Cuando los organismos no sufren cambios cíclicos, pero se multiplican en el cuerpo del vector, se dice que la transmisión es sólo propagativa. Este término se utiliza para describir la multiplicación bacteriana y viral en vectores; por ejemplo, el organismo de la peste en pulgas, o el organismo de la fiebre recurrente en garrapatas. Cualquier etapa de estos patógenos puede infectar al huésped vertebrado.

2.1.3 TRANSMISION DE PATOGENOS POR ARTRÓPODOS.

Los vertebrados son huéspedes de los artrópodos y de patógenos que diseminan, ya sea una relación, parásita normal o debida al azar. En la entomología médica las infecciones del hombre son de primordial interés, pero otros vertebrados, como los animales domésticos y salvajes, pueden presentar la misma enfermedad o ser sensibles a las molestias que causan los artrópodos. Se mencionarán algunas de las enfermedades y sus respectivos vectores.

2.1.3.1 Mosquitos como vectores.

Los mosquitos son vectores potentes de tres tipos de organismos patógenos al hombre y a los animales.

El mosquito *Anopheles* transmite parásitos como los plasmodios, que son organismos causales de la malaria en el hombre.

Las filarias parásitas del nombre (*Wuchereria bancrofti*), utiliza como vector principalmente al mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus*.

Se han aislado alrededor de 90 virus de mosquitos en la naturaleza, la mayoría de éstos de la familia Culicidae. Ejemplos de algunos virus: el virus de la encefalitis equina, virus de la fiebre amarilla, virus de la viruela aviar y virus de la hepatitis B.

2.1.3.2 Otros vectores (artrópodos).

La mosca doméstica es un vector de diversos agentes patógenos, tales como bacterias (principalmente de la familia Enterobacteriaceae) y parásitos (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Taenia solium*, *Hymenolepis nana*, *Ascaris lumbricoides*, entre otros).

Ejemplos de otros vectores:

Las chinches de la subfamilia triatominae transmite la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis.

Los piojos y la ladilla son capaces de servir como huéspedes en los cuales proliferan las rickettsias, el tifo y las espiroquetas de la fiebre recurrente.

Los insectos simúlidos transmiten a la filaria *Onchocerca volvulus*, agente causal de la oncocercosis humana.

Las pulgas son parásitos obligatorios temporales, son vectores de la peste ocasionado por *Yersinia pestis* y el tifo cuyo agente causal es *Rickettsia typhi*.

2.1.4 MOSQUITOS ANOPHELES Y CULEX.

Estos mosquitos pertenecen al orden Díptera, y a la familia Culicidae. En el orden Díptera, casi todos los miembros tienen un solo par de alas, por lo general presentan ojos simples, los ocelos, colocados en un triángulo sobre la parte superior de la cabeza. Las partes bucales están provistas de estiletes perforadores o lacerantes, lo que los hace chupadores de sangre. La metamorfosis es compleja. La mayoría de las hembras son ovíparas. Algunas son altamente resistentes a medios adversos. (Harwood y James, 1987)

La familia Culicidae incluye a los artrópodos hematófagos más importantes. En el estado larvario son acuáticos, los adultos pueden diferenciarse por las características de sus alas y la longitud de su probosis.

Huevecillos. Los huevos son puestos en la superficie de agua, en forma de "balsa" (Culex) o en forma individual (Anopheles) o cerca del agua (Aedes). En algunas especies de mosquitos los huevecillos pueden sobrevivir largos periodos fuera del agua, preferentemente bajo condiciones húmedas.

Larvas. La larva de mosquito es acuática, se alimentan de algas o de partículas orgánicas, pocas se alimentan de larvas de otros mosquitos. Las larvas respiran principalmente en la superficie a través de un tubo respiratorio que se encuentra en la parte posterior del cuerpo. La larva de *Anopheles* no tiene tubo respiratorio y respira a través de un par de espículas que se encuentran en la parte posterior del cuerpo. La mayoría cuelgan suspendidas diagonalmente de la superficie del agua, por medio de un sifón respiratorio prominente. Las larvas de los *Anophelinae* permanecen horizontalmente suspendidas justo por debajo de la superficie del agua por medio de sedas

palmeadas. El alimento es llevado a la boca por medio de corrientes producidas por la acción de las largas sedas curvadas que se encuentran en las maxilas; después fluye hacia la faringe por medio de la succión y aquí ocurre el filtrado de sólidos suspendidos. Las larvas mudan cuatro veces de la última muda resulta la pupa. Para el desarrollo del estado larval se requieren aproximadamente 7 días, generalmente las larvas *Anophelinae* requiere más tiempo.

Fase de pupa. También es acuático, es bastante activa, no se alimenta. Esta etapa es muy corta, por lo general de 2 o 3 días. La pupa es extremadamente activa y sensitiva a molestias, moviéndose repentinamente con movimientos circulares hacia aguas más profundas y después de unos momentos regresa a la superficie con poco movimiento. Hay un par de traqueobranquias en forma de trompeta situados dorsalmente en el cefalotórax y unos remos en el extremo del abdomen.

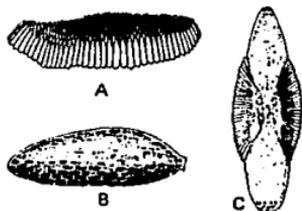
Adulto. Los mosquitos adultos usualmente son activos durante la noche, durante el día se alojan en huecos de los árboles o en un lugar similar y se quedan en reposo. La mayoría de los mosquitos prefieren alimentarse de mamíferos o aves, hay especies que se alimentan de peces que viven expuestos al aire, anfibios, reptiles y hasta larvas de insecto. Las hembras de especies hematófagas normalmente requieren una ingestión de sangre antes de la oviposición. Los machos permanecen durante no más de una semana y las hembras con abundante alimento pueden sobrevivir de 4 a 5 meses. Los sexos de los mosquitos pueden ser fácilmente determinados por la forma de la antena. La antena de los machos es muy plumosa, mientras que las hembras presentan pocos pelos cortos.

2.1.4.1 Anopheles

Características: palpos de ambos sexos tan largos como la proboscis, palpos de macho con las puntas en forma de remo; el escutelo uniformemente redondeado o parecido a una banda; patas largas y delgadas sin sedas tibiales claramente distinguibles y sin pulvilos; abdomen con esternitos en su mayoría sin escamas; las alas generalmente tienen marcas definidas; las larvas no presentan sifón y la superficie dorsal del cuerpo aparece con sedas palmeadas. Descansan con la proboscis, cabeza y abdomen casi en línea recta y cuando se alimentan mantienen el cuerpo a un ángulo determinado de la superficie. El zumbido de los anofelinos es claramente de tono más bajo y casi no se oye. (Service, 1986)

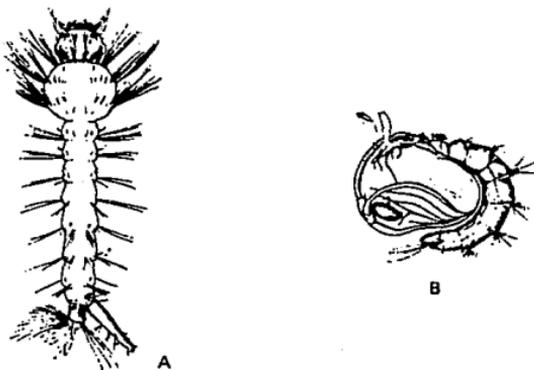
2.1.4.2 Culex.

Todos los adultos tienen un escutelo trilobado con sedas en cada lóbulo pero con áreas desnudas entre los lóbulos. El abdomen está completamente cubierto con escamas anchas, que casi siempre están en posición horizontal. Las larvas tienen un sifón prominente, generalmente con un pecten bien desarrollado y uno o varios penachos de sedas. En la mayoría de los casos, los huevecillos son depositados en grupos flotantes compactos en la superficie del agua. Los huevecillos no presentan los flotadores característicos de los anofelinos. (Borrór, Et al., 1989)



Huevecillos de A) *Culex* ; B) *Aedes* ; y C) *Anopheles*.

Las especies *Cx pipiens* y *Cx pipiens quinquefasciatus* se encuentran ampliamente diseminados en el viejo mundo. El mosquito doméstico de color café deposita los grupos de huevecillos flotantes en depósitos de agua de lluvia, tanques, cisternas. invaden libremente las casas. Su ciclo de vida requiere entre 10 y 14 días bajo condiciones cálidas de verano; la etapa de huevecillo de 14 a 36 horas. la larva de 7 a 10 días y la de pupa aproximadamente 2 días.

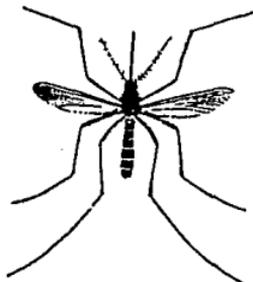


A) Fase larvaria y B) Fase de pupa del mosquito común (*Culex quinquefasciatus*).

2.1.4.2.1 Características de *Culex quinquefasciatus*.

Es un insecto pequeño, delgado y frágil que en reposo mantiene el abdomen paralelo a la superficie sobre la cual descansa, tiene una proboscis picadora alargada, las antenas son largas y plumosas en el macho y sencillas en la hembra, los palpos son tiesos, los ojos están ubicados arriba de las antenas. Tiene un par de alas transparentes orladas de escamas a lo largo del margen posterior y en las venas, las

cuales son transversales. en el torax hay escamas toscas de color amarillo latón y su escutelo es trilobulado. El abdomen es romo con escamas blancas que forman franjas anchas en las bases de los segmentos. posee tres pares de patas largas compuestas por femur, tibia y cinco tarsos. (Carballo y Melchor, 1973)



Mosquito común (*Culex*), en su fase de adulto.

2.1.4.2.2 Ciclo biológico de *Culex*.

Presenta metamorfosis compleja, que incluye cuatro estados de desarrollo: huevecillo, larva, pupa y adulto. Por lo general el número de huevecillos que pone una hembra es de 300 o más. Estos huevecillos son fusiformes y blancos al ser ovipositados, oscureciéndose poco después a un color crema o negro, su tamaño varía de 6 a 10 mm., son depositados en la superficie del agua como masas compactas en forma de "balsas" por carecer individualmente de flotadores. La incubación dura de 2 a 3 días, a una temperatura no mayor de 30°C, las larvas salen de los huevecillos. Las larvas son diferentes a los adultos, pasan a través de cuatro estadios de crecimiento y tres mudas, su cuerpo es alargado y no poseen patas, presentan cabeza móvil bien desarrollada, se alimentan de materia orgánica

suspendida en agua por medio de corrientes producidas por un par de densos penachos de largos pelos situados encima de la boca, posee antenas con un penacho de pelos sencillos, cortos dispuestos hacia dentro, los pelos cefálicos tanto superiores como inferiores están constituidos por cinco o más ramificaciones. Su masa torácica es ensanchada y el abdomen hay pelos laterales tanto dobles como sencillos, éste esta dividido en nueve segmentos, en la superficie dorsal del octavo segmento hay pelos ramificados. Su masa toracica es ensanchada y en el abdomen hay pelos laterales tanto dobles como sencillos, éste esta dividido en nueve segmentos, en la superficie dorsal del octavo segmento hay pelos ramificados, en este sitio se encuentra el peine, constituido por escamas redondeadas con el borde cubierto de espinas, de éste segmento surge el tubo respiratorio el cual es cuatro veces más largo que su anchura basal, tiene una columna de gruesos dientes llamada pecten, los cuales estan redondeados hacia un sólo lado y cada uno de ellos formado por cinco dientes laterales. El noveno segmento es el anal, a él se encuentra unida la placa dorsal que posee un cepillo ventral y un penacho dorsal, el orificio anal está rodeado en su ápice por cuatro branquias anales grandes.

Cuando las larvas han alcanzado su madurez (de 7 a 10 días), dejan de alimentarse y después de un período de inactividad se transforman en pupa. En el estadio de pupa se suspende la alimentación y soportan una serie de cambios fisiológicos y morfológicos que los transformaran en mosquito. Las pupas son de tipo comprimido en ellas el díptero permanece dentro de la última piel larval, que se endurece constituyendo el puparium. Presentan la forma de una coma, se mantienen en la superficie del agua por flotación, son muy activas y sensitivas a molestias por lo que se dirigen repentinamente hacia aguas más profundas con movimientos circulares para después regresar a la superficie con pocos movimientos.

Su aparato respiratorio es un par de traqueobranquias en forma de trompetas o sifones largos y delgados, situados dorsalmete en el cefalotorax, con los cuales rompen la pelicula superficial. Después de un período de aproximadamente dos días emerge del estado pupal el mosquito. Las hembras comienzan a picar de 1 a 2 días después de transformarse en adulto. (Carballo, 1993)

2.2 CONTROL DE ARTROPODOS

El principio básico en el control de artrópodos en la medicina es conservar la salud y bienestar del hombre, mientras que el control de insectos que afectan a la agricultura y ganadería se basa fundamentalmente en principios económicos. Para un control adecuado es necesario disponibilidad de recursos, influencias políticas y relaciones públicas.

Existen varias formas de control de los artrópodos que incluyen: barreras químicas como el deet (N,N-dietil-m-toluamida) el cual es ingrediente activo en muchos productos además insecticidas y acaricidas.

2.2.1 COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL.

El control de insectos dañinos para el hombre inicialmente se hizo a base de plantas utilizadas como remedios medicinales en varias culturas, en las cuales actualmente se siguen empleando para matar o repeler a los insectos. Después con el descubrimiento de los efectos insecticidas del DDT (Diclorofeniltricloroetano), el control se realizó a base de insecticidas sintéticos, que pronto presentaron problemas por su alta persistencia y acumulación en plantas y en animales, su alta toxicidad para los mamíferos y el desarrollo de resistencia por parte de los

insectos, llevo a restringir su uso. Esto propicio un nuevo interés por los productos naturales procedentes de plantas, tanto como fuentes de obtención de insecticidas como de modelos de compuestos para el control de los insectos dañinos. (Clocke, 1989)

Actualmente se conocen más de 2000 especies de plantas que poseen alguna actividad insecticida. De las plantas se ha encontrado varios compuestos que afectan a los axones nerviosos, a la sinápsis de los insectos (piretrina, nicotina y picrotoxina), compuestos que afectan a los músculos (ryanodina), su balance hormonal (hormonas juveniles), su reproducción (β -cisarona) y su comportamiento (atrayerentes, repelentes e inhibidores de la alimentación). Algunos de estos compuestos se han explotado comercialmente para el control de insectos (piretrinas, análogos de hormonas juveniles y atrayerentes) y otros sólo ofrecen la oportunidad de utilizarlos como modelos de nuevos agentes en el control de insectos, ya sea por el alto costo que representa su extracción, por su inestabilidad a la luz y a otros factores ambientales. (Clocke, 1989)

Los insecticidas extraídos de plantas tienen poca toxicidad por contacto para los mamíferos. Estos tóxicos incluyen la rotenona y el piretro. La rotenona es un ectoparasiticida eficaz, pero en la actualidad tiene poco uso. El piretro es una mezcla de cuatro compuestos llamados piretrinas. Estas tienen una toxicidad dérmica extremadamente baja para mamíferos y poca toxicidad oral. Poseen algo de repelencia para artópodos y las características que tienen es que derrivan a los insectos rápidamente. Las piretrinas tienen uso contra ectoparásitos y plagas domésticas.

Se han sintetizado muchos análogos del piretro como la aletrina y la resmetrina. Desafortunadamente, algunos análogos pueden tener alta toxicidad crónica para mamíferos.

2.3 MODELOS DE ACTIVIDAD INSECTICIDA.

Diversos metabolitos de plantas afectan el comportamiento, desarrollo y reproducción, de varios insectos. La identificación de esas sustancias es importante primero para conocer el efecto en el mosquito a nivel molecular y segundo para poder sintetizar análogos sintéticos; buscando con ello encontrar sustancias con una mejor actividad insecticida. Todo lo anterior tiene la finalidad de proporcionar un control más científico y racional de insectos.

Para realizar un bioensayo la primera consideración es la selección de la especie de insecto, para esta elección se debe tomar en cuenta lo siguiente: 1) importancia económica, 2) la facilidad de obtener huevecillos o mantener la colonia, 3) la sensibilidad del mosquito a varias sustancias químicas, etc. La elección de la especie no es restrictiva, pero la especie de ensayo podría contribuir en beneficio de la sociedad. Además de que se puede relacionar con otras plagas de insectos.

El mantenimiento de insectos en el laboratorio por muchas generaciones puede ocasionar cambios en su genética y en su comportamiento. El manejo de los insectos también puede introducir problemas tales como "enfermedades y parasitismos. Este es un dilema incluso para los entomólogos, pero los no especialistas tratan de evitar esos problemas. (Kubo, 1991)

2.3.1 MOSQUITOS ADULTOS Y LARVAS.

Desde 1950, se han utilizado a las larvas y al insecto adulto como modelo para la determinación de actividad insecticida de diversas sustancias. También se han utilizado las larvas en controles de residuos de insecticidas. (Mulla, 1964)

Los mosquitos más utilizados son *Culex pipiens*, *C. quinquefasciatus*, *Triatoma infects*, *Pantronygylus megistus* (los dos últimos vectores de la enfermedad de Chagas), entre otros.

2.3.2 METODO DE MICROINYECCION.

En 1972, Gilotra J. reporta un método para la determinación de susceptibilidad de mosquitos adultos a insecticidas. Este método es por inyección subcuticular, en el insecto adulto.

Es recomendado por la rápida biodegradación del insecticida. Fue utilizado para varias poblaciones de *Culex*, *Aedes* y *Anopheles*.

2.3.3 BIENSAYO POR ALIMENTACION CON DIETA ARTIFICIAL.

Preparación de la dieta artificial. Se utiliza como disolvente metanol y acetona; casi todas las sustancias orgánicas son solubles en esos solventes y además son fácilmente evaporados. Se manejan extractos de plantas en concentraciones en el rango de 0.1 a 1%. La muestra en solución es adicionada a α -celulosa, componente no

nutritivo; se evapora a sequedad bajo presión reducida. La mezcla mencionada es combinada con una solución de vitaminas y nutrientes, finalmente es mezclada con un agente gelificante. Los ensayos se realizan en viales de plástico en donde se coloca la dieta artificial y las larvas de ensayo. Se utilizan dos larvas de cada especie por recipiente. Cada muestra debe realizarse con 10 repeticiones. Las larvas son incubadas por 8 a 10 días a 28°C, en una incubadora. La humedad relativa controlada es de 90-95%. Las larvas son pesadas durante el período de ensayo y diariamente se observan al microscopio. El tiempo requerido para el bioensayo para una muestra de 10 repeticiones es de 30 a 40 minutos, sin embargo, el tiempo total del ensayo es de 10 a 14 días. (Kubo, 1991)

2.3.4 INHIBIDORES ALIMENTARIOS, ENSAYO EN DISCO.

Los insectos presentan varios comportamientos alimenticios, por lo que el ensayo antialimentario es de acuerdo a la especie del insecto. Se utilizan hojas de algodón, éstas deben ser de plantas no contaminadas, cultivadas en invernadero; y deberá identificarse su tamaño, apariencia, consistencia y contenido de clorofila. Se forman discos de 0.1cm de la hoja de algodón. Estos discos son colocados (12 discos por recipiente), en un círculo de papel filtro humedecido dentro de una caja de petri. Los discos son tratados en su superficie con 25 µl de acetona ó con 1 a 100 µg de una sustancia disuelta con 25 µl de acetona (aplicado con una microjeringa). Se colocan 3 larvas del tercer instar por disco, a 25°C y a un 80% de humedad relativa en un incubador en la obscuridad. Después de 48 horas, el disco es examinado visualmente. Recomiendan 6 repeticiones. (Kubo, 1991)

2.3.5 ENSAYO EN PAPEL FILTRO.

Se utiliza para determinar la actividad insecticida en insectos adultos. En papel filtro Whatman No. 2, se aplica el insecticida problema y se pone en contacto con insectos por lo general adultos. Se han observado una baja toxicidad en comparación con otros métodos, ya que se presenta una absorción en las fibras de celulosa. (Georghiou y Gidden, 1965)

2.3.6 LARVA DE MOSQUITO *Culex quinquefasciatus*, COMO MODELO.

Esta larva ha sido utilizada para determinar la actividad larvicida de compuestos y para el control de residuos de insecticidas. Se utilizan por lo general cuando están en su cuarto instar de desarrollo, de 7 a 10 días después de que los huevecillos eclosionan.

Se realizan las siguientes diluciones 5, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 % de la muestra a analizar, el disolvente puede ser acetona, agua ó etanol. Se colocan 20 larvas del cuarto instar en vasos desechables, se adiciona 0.5 ml de las diluciones, cada dilución se realiza por triplicado y se afora a 100 ml con agua de la llave. Después de 24 horas se cuentan las larvas muertas y se calcula la concentración letal 50 (CL₅₀). (Carballo y Melchor, 1993)

2.4. BIOENSAYO GENERAL. (*Artemia salina*)

Para los fitoquímicos lo más importante es el aislamiento, caracterización y publicación de un compuesto

de origen natural, sin tomar en cuenta su bioactividad. Por lo que la actividad biológica de diversos componentes puede permanecer desconocida por años. (Meyer, et al. 1982)

Un bioensayo general, el cual detecte un amplio espectro de actividades farmacológicas de plantas o de productos químicos naturales, que sea rápido, barato y que se pueda realizar en cualquier laboratorio de investigación, esta basado en la utilización de un diminuto crustáceo, la larva de *Artemia salina*. (Meyer, et al. 1982)

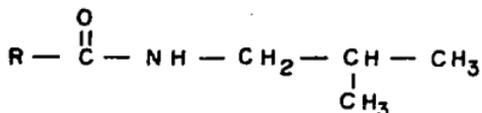
Los huevecillos de *Artemia salina* son fácilmente obtenidos, permanecen viables por años en lugares secos. Los huevecillos son colocados en agua de mar artificial, se incuban por 48 horas, se cubren y se les coloca una lámpara de luz. Después de este tiempo las larvas emergen y estan listas para ser utilizadas en bioensayos.

Las larvas se han utilizado en diversos ensayos como: análisis de residuos de pesticidas, micotóxicas, anestésicos, componentes unidos a morfina, toxicidad de aceites dispersantes y el control de tóxicos marinos. (Meyer, et al. 1982)

2.5. ISOBUTILAMIDAS

2.5.1 ESTRUCTURA GENERAL

Las isobutilamidas son compuestos con la siguiente estructura química:



Es un derivado de un ácido carboxílico en donde el grupo hidroxilo es reemplazado por otro heteroátomo o grupo, siendo en este caso la isobutilamina. (Pine, 1984)

2.5.2 PRESENCIA EN LA NATURALEZA.

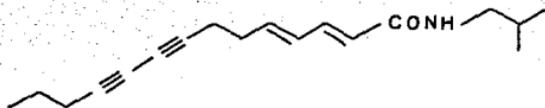
En diversos estudios se han aislado isobutilamidas de plantas de las familias Piperaceae, Aristolochiaceae y Rutaceae. Estas se caracterizan por ser ácidos olefinicos de 10 a 14 átomos de carbono unidos a la isobutilamida. (Haral, 1984).

Se han encontrado isobutilamidas alifáticas y aromáticas. De las alifáticas la primera estructura identificada fué la decadienamida pellitorina (a): después se aislaron e identificaron otras dos más, la neoherculina (b) y anaciclina (c). (Blade, 1990)



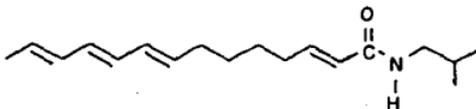
(a) Pellitorina

(b) Neoherculina



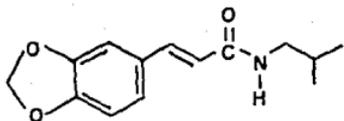
(c) Anaciclina.

De la corteza y del fruto de diferentes especies de *Zanthoxylum* se han encontrado isobutilamidas de 12 a 14 átomos de carbono, con una conjugación de los dobles enlaces con el grupo amida y con una geometría E. Ejemplos de algunas isobutilamidas aisladas de especies de *Zanthoxylum*. (Haral, 1984) Son: Neoherculina (b) y el α -sanshool (d).

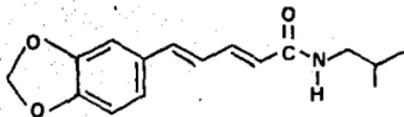


d) α -sanshool

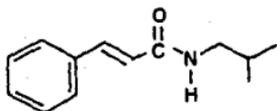
En cuanto a las isobutilamidas aromáticas, se han aislado 36 amidas de la raíz de *Piper amalago*. (Nakatani, et al. 1981). Esta planta es conocida en la India y América Central por ser un remedio eficaz en malestares estomacales. Algunas de estas amidas son: Fagaramida (e), Piperlongumina (f), N-isobutilcinamamida (g) y N-isobutil-3,4-dimetoxicinamamida (h).



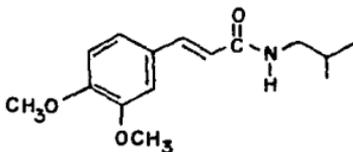
(e) Fagaramida.



(f) Piperiongumina..

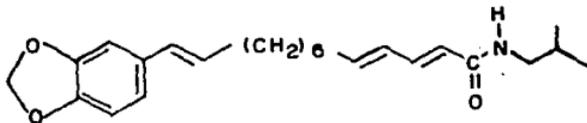


(g) N-isobutilcinamamida.

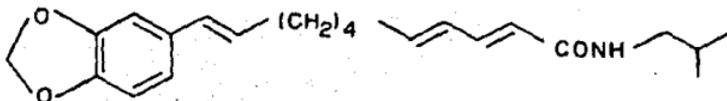


(h) N-isobutil-3,4-dimetoxicinamamida.

El grupo de Miyakado (Miyakado, Et al. 1989) aisló isobutilamidas aromáticas de la planta *Piper nigrum*, tales como (i) Guineensina y (j) Piperida.



(i) N-isobutil-13-(3,4-metilendioxfenil)-2E,4E-tridecatrienamida. Guineensina.



(j) Piperacida

2.5.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS ISOBUTILAMIDAS.

La actividad biológica de las isobutilamidas es muy extensa en general pueden ser antibacterianos, piscicidas, molusquicidas, antiinflamatorios, antitúxicos, anestésicos locales, insecticidas, larvicidas, inhibidores de la germinación y antialimentarios en insectos fitófagos, entre otras.

La raíz de *Anacyclus pyrethrum* (Haral, 1984), cuando es masticada produce un hormigueo persistente, provocado insensibilidad de la lengua y en las membranas mucosas; ocasionando un flujo de saliva. En 1878, Bucheim separó un material cristalino de la planta, la cual representó un constituyente activo llamado piretrina. Después el producto fué llamado pellitorina y se encontró que contenía 3 substancias. El componente en mayor porcentaje fué identificado como decadien-isobutilamida. La pellitorina cruda resultó ser tóxico para la mosca doméstica y también altamente letal para el gusano de la harina (*Tenebrio molitor* L)

La flor de *Spilanthes oleracea* L también contiene un principio picante el cual ha sido usado como medicamento. Fué el primero que se obtuvo en estado crudo por Gerber, lo designó como "Espilantol". Este material se ha reportado efectivo contra la larva de mosquito *Anopheles* y *Cule*. Jacobson, encontró que el espilantol es idéntico a la

Afinina. La cual fué obtenida originalmente de la raíz de *Helleopsis longipes*, una planta con actividad insecticida en México. Se encontró que si la raíz es masticada alivia el dolor de muelas, el extracto se usa para resfriados y la neumonia. La Afinina, tiene actividad biológica contra el caracol de agua dulce *Physa occidentalis*. (Haral, 1984)

Varias especies del género *Zanthoxylum* se ha reportado que poseen actividad insecticida. El material activo esta acumulado en la corteza del tallo, en la raíz y en su fruto. La corteza de *Z. piperitum* fue usado como un antihelmintico. La Neoherculina fué aislada de la corteza de *Z. clavaherulis*, componente altamente insecticida. La Neoherculina se encontró que era idéntica al α -sanshool aislado de *Z. piperitum*. (Crombie y Fisher, 1985).

La raíz de *Echinacea angustifolia* americana es altamente picante y se ha reportado que contiene un larvicida que actúa contra la larva de mosquito. Por otra parte, la raíz se ha usado en la curación de heridas, inflamaciones, como estimulante y antiséptico. (Haral, 1984)

Dos isobutilamidas de 18 carbonos (escabrina, heliopsina) fueron aisladas de *Helleopsis helianthoides*, poseen una actividad insecticida considerable. Se ha reportado que una pizca de escabrina en la lengua provoca una parálisis y una quemadura, efecto que dura cerca de dos horas. (Haral, 1984)

"Asiasari radix" de *Asiasarum heterotropoides* es una droga en la medicina China, que se ha utilizado desde hace tiempo como un antitúxico, expectorante y analgésico. La raíz se ha encontrado que contiene isobutilamidas olefinicas, las cuales contribuyen en la propiedad antitúxica. (Haral, 1984)

2.5.4 ACTIVIDAD INSECTICIDA.

2.5.4.1 Relación estructura-actividad.

Los estudios de la relación estructura actividad insecticida de las N-isobutilamidas fueron iniciados en 1987 por Michael Elliott, encontró que todos los compuestos naturales con una considerable actividad biológica tienen una doble ligadura conjugada con el grupo amida y además que pueden presentar más de un doble enlace.

Existen evidencias de que la posición del doble enlace, como isomerismo E-Z juega un papel importante en la actividad fisiológica e insecticida de las amidas. Una actividad significativa contra mosca doméstica fué encontrada solamente en isobutilamidas que presentan conjugación del doble enlace con el grupo carbonílico de la amida. Se ha reportado por estudios que en el sistema decadienisobutilamida la configuración 2E,4E es diez veces más activa que la 2E,4Z contra mosca doméstica. (Haral, 1984).

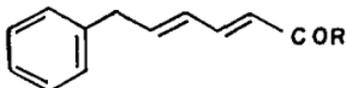
Otra parte de los estudios de M. Elliott (1987), se enfocó a la síntesis y evaluación de la actividad insecticida del grupo N-isobutilo. Para lo cual el grupo N-isobutilo fué substituido por N-piperidinil y N-isopropil, cuando era aplicado tópicamente a la mosca doméstica la actividad insecticida disminuía o se anulaba. Al probar la N-(2,2-dimetilpropil) decreció un poco la actividad comparada con la N-isobutil, mientras que las versiones cíclicas tuvieron nula o poca actividad como la N-(ciclopropilmetil). Si en vez del grupo isobutilo introducían un grupo fenilo o reemplazaban los metilos por fluor se anulaba toda la actividad. Un grupo metilo en C-1 o

en C-2 del isobutilo favorece un poco la actividad, mientras que la ramificación en C-3 decrece drásticamente. La introducción de un grupo metilo extra sobre el nitrógeno del grupo N-isobutilo, o un metileno extra en la cadena isobutilo adyacente al nitrógeno anula completamente la actividad, pero si son dos los metilos introducidos en C-1 la actividad se incrementa considerablemente. Sin embargo, ninguno de los compuestos evaluados presentó mayor actividad que la amida con isobutilo (Tabla I).

Otra parte de los estudios de M. Elliott (1987), fué encontrar los efectos de los substituyentes en el grupo fenilo de las amidas aromáticas. Encontró que los halosubstituyentes en el anillo aromático confieren a la amida la mayor actividad que la obtenida con otro tipo de substituyentes, sin embargo ésta no llega a ser mayor que cuando la molécula no tiene substituyentes. En la Tabla II se resumen los efectos de algunos substituyentes en el anillo aromático. Como se puede observar en la monohalogenación, la posición orto es la menos favorable para la actividad, anulándola totalmente; en la posición meta la actividad decrece conforme se incrementa el tamaño del halógeno, mientras tanto la posición en para favorece la actividad en grado aceptable.

Cuando el substituyente es metilo no hay cambios en la actividad, solo la posición orto substituida fué poco activa. En el caso de metoxilados en las tres posiciones, la 3-metoxi fué el único que tuvo actividad, aunque muy baja.

TABLE I. ANALISIS DE LA IMPORTANCIA DEL GRUPO *n*-ISOBUTILO EN ALGUNAS ANIDAS SINTETIZADAS POR M. ELLIOTT, PROGRAMAS EN MOSCA DOMESTICA.

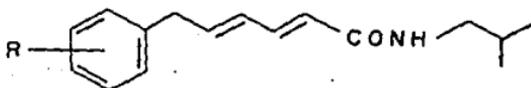


-R	ACTIVIDAD ^{nt}	-R	ACTIVIDAD ^{nt}
	3.9		8.6
	NT		2.8
	1.8		NT
	NT		NT
	1.8		NT
	2.8		NT

NTOMANDO COMO REFERENCIA A LA BIONESTRIM (DL₅₀ = 100 ppm.

NT: NO TOXICO. (Elliott, Et al., 1987)

TABLE II. ACTIVIDADES RELATIVAS DE ALGUNAS N-ISOBUTILAMIDAS.
 (INFLUENCIA DE LOS SUSTITUYENTES EN EL ANILLO AROMÁTICO.)



-R	% ACTIVIDAD INSECTICIDA* (Mosca domestica)
-H	3.9
2-F	NT
3-F	2.0
4-F	0.6
2-Cl	NT
3-Cl	1.0
4-Cl	1.5
2-Br	NT
3-Br	1.0
4-Br	0.3
2-I	NT
3-I	NT
4-I	2.6
2-CH ₃	1.0
3-CH ₃	NT
4-CH ₃	NT
2-OCH ₃	NT
3-OCH ₃	0.25

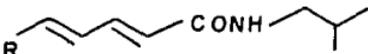
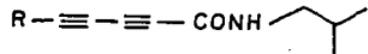
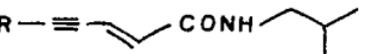
*CONSIDERANDO LA ACTIVIDAD DE LA BIONESTRINA (DL₅₀ = 100 ppm)

NT: NO TOXICO (Elliott, Et al., 1987)

Robert Blade (1990). realizó otros estudios en donde observaron que la dienamida es muy sensible a la modificación estructural. La estereoquímica es crítica, la (2E, 4E) dienamidas están consideradas como más activas que algunas de las otras posiciones del doble enlace. La geometría y el grado de insaturación proporcionados por enlaces acetilónicos tiene cierta desventaja. En la Tabla III se resumen los cambios en actividad contra mosca doméstica, aplicada directamente por aspersión, cuando la dienamida es cambiada en su estereoquímica y cuando hay triples enlaces en vez de dobles enlaces. La actividad de estos análogos está citado con respecto al grupo más potente (actividad = 1).

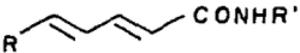
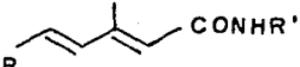
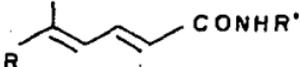
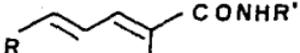
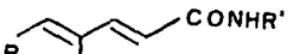
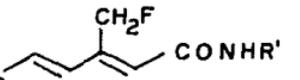
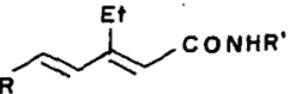
La substitución del grupo dieno trae un cambio substancial en la actividad. En una serie de componentes metilicos solamente la 3-metildienamida retiene una actividad apreciable. La última posición sensitiva es una modificación adicional que altera uno u otro substituyente natural electrónico o estérico. La Tabla IV, muestra la actividad en contra de mosca doméstica con respecto a las modificaciones mencionadas.

TABLA III. VARIACION DE LA ACTIVIDAD INSECTICIDA DE ACUERDO AL TIPO DE INSATURACION Y A LA ESTEREOQUIMICA.

No.	COMPUESTO	ACTIVIDAD CONTRA MOSCA DOMESTICA
1	 <E> <E>	1
2	<E> <Z>	0.05
3	<Z> <E>	0.05
4		<0.05
5		<0.05
6		0.1

*ACTIVIDAD RELACIONADA CON EL COMPUESTO No. 1 (Blade, 1990)

TABLA IV. CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD INSECTICIDA CON DIFERENTES SUSTITUYENTES EN EL GRUPO DIENO.

No.	COMPUESTO	ACTIVIDAD * (% DOMESTICA)
1	 <chem>R/C=C/C=C/CONHR'</chem>	1
2	 <chem>R/C=C/C(C)=C/CONHR'</chem>	0.8
3	 <chem>R/C=C(C)/C=C/CONHR'</chem>	0.05
4	 <chem>R/C=C/C=C(C)CONHR'</chem>	0.05
5	 <chem>R/C=C(C)/C=C/CONHR'</chem>	<0.05
6	 <chem>R/C=C/C(CF)C=CONHR'</chem>	0.05
7	 <chem>R/C=C/C(C)C=CONHR'</chem>	0.05

ACTIVIDAD RELACIONADA CON EL COMPUESTO MAS ACTIVO (ACTIVIDAD = 1)
(Blade, 1998)

2.5.4.2 Mecanismo de acción.

En un estudio realizado en preparaciones sinaptosomales de mamífero se reportó una acción dependiente de los niveles de sodio. En la que se libera un neurotransmisor por la presencia de las amidas, el cual podría ser bloqueado por tetrodotóxicas. En una preparación de insecto la amida no produce directamente la despolarización y los efectos sobre veratridina, la cual se ha observado induce la despolarización. Las amidas inhiben la respuesta de una manera relativamente reflexiva *in vivo*, puesto que realiza la respuesta de las deltametrinas.

Estos resultados parecen reflejar el comportamiento de las moscas domésticas resistentes a piretroides y sugiere un sitio de acción de las amidas que actúan en la compleja vía del sodio. (Blade, 1990)

2.5.5 SINTESIS DE N-ISOBUTILAMIDAS.

2.5.5.1 Condensación aldólica. Formación del ácido α,β -insaturado.

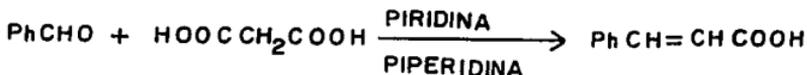
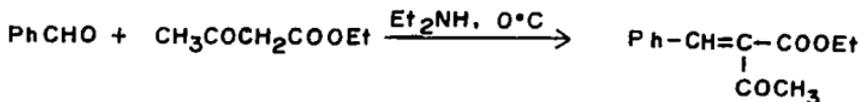
Hay diferentes tipos de condensación aldólica conocidas: de Perkin, Knoevenagel, Doebner, Claisen, Dieckmann; cada una de ellas supone un ataque de un carbanión a un grupo carbonílico. Este carbanión es generado, en cada caso, en prácticamente la misma forma: la abstracción de un hidrógeno en posición alfa con respecto al carbonilo por medio de una base. Pueden emplearse bases diferentes (hidróxido de sodio, etóxido de sodio, acetato de sodio, aminas) y también puede variar el grupo carbonilo con respecto al cual el hidrógeno es alfa (aldehído, cetona.

anhídrido, éster), pero la química es esencialmente la de la condensación aldólica. Se mencionara solo la condensación de Knoevenagel por estar relacionada con la condensación de aldehídos aromáticos, los cuales fueron la materia prima de este trabajo. (Mundy, 1985)

2.5.5.1.1 Condensación de Knoevenagel.

La condensación de aldehídos o cetonas, que usualmente no contienen un α -hidrógeno, los componentes en la forma $Z-CH-Z'$ ó $Z-CHR-Z'$ es usualmente llamada la reacción de Knoevenagel. Z y Z' pueden ser CHO , COR , $COOH$, $COOR$, CN , NO_2 , SOR , SO_2R , SO_2OR , o grupos similares. Cuando $Z = COOH$, la descarboxilación sucede *in situ*. Si se usa una base lo suficientemente fuerte la reacción puede llevarse a cabo en los componentes que poseen solamente un único Z , por ejemplo CH_3Z ó RCH_2Z . Otros componentes hidrógeno-activo pueden también emplearse como: $CHCl_3$, 2-metilpiridinas, acetilenos terminales, ciclopentadienos, etc.; cualquier componente que contenga enlaces C-H, el hidrógeno puede ser removido por una base.

Ejemplos de la reacción de Knoevenagel:



2.5.5.2. Formación del cloruro de acilo.

Un cloruro de acilo se puede obtener por sustitución del -OH por el -Cl del ácido carboxílico, para este fin se emplean a menudo tres reactivos: cloruro de tionilo, SOCl_2 ; tricloruro de fósforo, PCl_3 ; y pentacloruro de fósforo, PCl_5 . (Morrison, 1970).

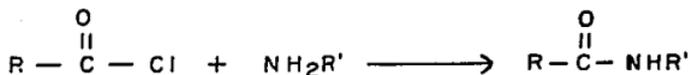
El cloruro de tionilo se emplea a menudo, debido a que su bajo punto de ebullición (79°) permite que el exceso de reactivo se elimine fácilmente. Además los productos que se forman aparte del cloruro de acilo, el SO_2 y HCl ; se liberan en forma de gases. Reacción general:



Los cloruros de acilo reaccionan con el reactivo organo cadmio para dar lugar a las cetonas, experimentan la acilación de Friedel - Crafts en presencia de tricloruro de aluminio para producir una arilacetona y pueden reducirse selectivamente por el hidruro de tri-tert-butoxialuminio y litio ó con gas hidrógeno en presencia de paladio y sulfato de bario para producir un aldehído. Los cloruros de acilo también son intermediarios importantes en la preparación de amidas. (Wingrove, 1984)

2.5.5.3 Síntesis de amidas a partir de cloruro de acilo.

Es el método de laboratorio, más general para preparar amidas. La reacción se lleva a cabo entre un cloruro de acilo y una amina. Reacción general:



R = Grupo fenilo R' = Isobutilamina

Esta es una reacción típica de sustitución acilnucleofílica; los pasos se muestran a continuación:

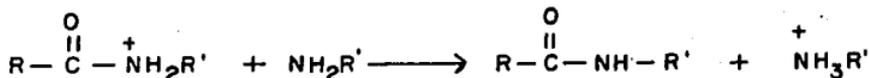


Intermediario tetraédrico
Inestable



Amida Protonada

Por lo tanto:



La molécula de aminanucleofílica se adiciona al grupo acilo y forman el intermediario tetraédrico, el cual se descompone para producir una amida protonada. Otra molécula de amina actúa como base y abstrae un protón a partir de la amida protonada para dar lugar a una amida libre y a un ión amonio. (Wingrove, 1984)

La reacción con cloruro de ácido es más rápida y esencialmente irreversible, en comparación con la de ácidos, la cual es más lenta y puede ser reversible. (Pine, Et al., 1984)

III. JUSTIFICACION DEL TEMA.

Los insectos representan un serio problema para el ser humano y para los animales. Intervienen en la transmisión de diversas enfermedades, provocan pérdidas económicas en la agricultura y en la ganadería, además de que su presencia es molesta para el hombre. Por lo que la necesidad de tener un control adecuado de insectos es de suma importancia.

Los insecticidas sistémicos utilizados para ectoparásitos son formulaciones que contienen DDT, el cual es tóxico al ser absorbido por la piel del mamífero.

La búsqueda de nuevos insecticidas está basada en encontrar compuestos que presenten actividad insecticida y que no sean tóxicos para el hombre o para los animales. En diversas investigaciones se han encontrado principios activos extraídos de plantas con actividad insecticida. Un grupo de compuestos aislados de plantas son las N-isobutilamidas, de ácidos alifáticos de cadena lineal poliinsaturada de 8 a 20 átomos de carbono, como ejemplo se puede mencionar al α -sanshool aislado de la corteza de *Zanthoxylum liebmannianum* (Rutaceae). (Reyes, Et al., 1991)

Existen N-isobutilamidas de cadena larga, como el α -sanshool, que son inestables por degradarse fácilmente, lo que hace que su síntesis en el laboratorio sea complicada. Sin embargo, existen N-isobutilamidas de cadena corta, como la Fagaramida, que son más estables, que presentan actividad insecticida y que son factibles de sintetizarse.

Las N-isobutilamidas son compuestos con buena actividad insecticida, sin embargo, las amidas de cadena larga

poliinsaturadas son inestables lo que limita su uso. Por otro lado, las amidas sólidas como la Fagaramida poseen una actividad insecticida moderada, por lo que sirven como modelo para sintetizar N-isobutilamidas con propiedades insecticidas.

Por lo anteriormente expuesto, el propósito de este proyecto fué sintetizar N-isobutilcinamamidas con metoxilos en las diferentes posiciones del anillo aromático, a partir de Ácidos cinámicos y de benzaldehidos metoxilados.

Esperandose que estos compuestos presenten buena actividad larvicida sobre *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) y sobre *Artemia salina* (Leanch). Actividad que puede ser útil para que los compuestos sintetizados sean potencialmente empleados en el control de ectoparásitos del hombre y de los animales.

IV. OBJETIVOS.

Los objetivos que se siguieron en este trabajo fueron:

4.1. OBJETIVO GENERAL.

Realizar la síntesis de N-isobutilcinamidas con sustituyentes metóxilos en las diferentes posiciones del anillo aromático y determinar su actividad larvicida sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* del 4o. estadio larvario y sobre el crustáceo *Artemia salina*.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.

4.2.1 Sintetizar las siguientes N-isobutilamidas.

1. N-isobutil-3-(fenil)-2(E)-propenamida.
2. N-isobutil-3-(2-metoxifenil)-2(E)propenamida.
3. N-isobutil-3-(3-metoxifenil)-2(E)propenamida.
4. N-isobutil-3-(4-metoxifenil)-2(E)-propenamida.
5. N-isobutil-3-(2,3-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
6. N-isobutil-3-(2,4-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
7. N-isobutil-3-(2,5-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
8. N-isobutil-3-(2,6-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
9. N-isobutil-3-(3,4-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
10. N-isobutil-3-(3,5-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
11. N-isobutil-3-(2,4,5-trimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
12. N-isobutil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2(E)-propenamida.

4.2.2. Determinar la actividad larvicida de las N-isobutilamidas sintetizadas en larva de mosquito común, *Culex quinquefasciatus*, en su cuarto instar.

4.2.3. Determinar la actividad larvicida de las N-isobutilamidas sintetizadas sobre *Artemia salina*.

4.2.4. Calcular la concentración letal 50 (CL_{50}) en larva de insecto y en *Artemia salina*.

4.2.5. Determinar la potencia relativa, de la acción letal de las N-isobutilamidas sintetizadas, sobre *Culex quinquefasciatus* y *Artemia salina*.

4.2.6. Establecer la posible correlación de la acción larvicida sobre *Culex quinquefasciatus* y *Artemia salina*.

V. HIPOTESIS

La hipótesis de trabajo bajo la cual se desarrolló esta investigación fue:

La actividad larvicida sobre larva de mosquito común (*Culex quinquefasciatus*) y sobre larva de *Artemia salina* de las N-isobutilcinamamidas monometoxiladas, dimetoxiladas y trimetoxiladas será mayor que la actividad larvicida de la N-isobutilamida de origen natural α -sanshool.

VI. MATERIAL.

6.1. Material para la síntesis.

6.1.1. Material de laboratorio.

Matraz bola de 50 ml. 14/23.
Refrigerante 14/23.
Cabeza de destilación.
Termometro.
Canastilla.
Termostato.
Agitador magnético.
Colector para vacío 14/23.
Embudo de separación de 150 ml.
Vasos de precipitado 50, 100, 200 ml.
Matraz erlenmeyer 125 y 250 ml.
Adaptador para termometro.
Pipetas graduadas 0.2, 1, 2, 5 y 10 ml.
Trampa de humedad.
Placas cromatográficas.

6.1.2. Equipo.

Balanza analítica.
Fisher Jonhons.
Espectrofotometro de IR, Nicolet FT-IR 5X de un solo haz.
Espectrofotometro de RMN, FT-80.
Espectrofotometro de UV, de doble haz Hitachi 220 S.
Espectrofotometro de masas, Hitachi Perkin-Eimer RMU 6D.

6.1.3. Substancias.

Acido cinámico.
Acido 2-metoxicinámico
Acido 3-metoxicinámico.

Acido 2,5-dimetoxicinámico.
Acido 3,4-dimetoxicinámico.
Acido 3,5-dimetoxicinámico.
Acido 2,3-dimetoxicinámico.
Acido 2,4-dimetoxicinámico.
Acido 2,4,5-trimetoxicinámico.
Acido 3,4,5-trimetoxicinámico.
3,5-dimetoxibenzaldehido.
2,6-dimetoxibenzaldehido.
2,3-dimetoxibenzaldehido.
2,4,5-trimetoxibenzaldehido.
Isobutilamina.
Acido clorhídrico.
Bicarbonato de sodio.
Cloruro de tionilo.
Piridina.
Piperidina.
Acido malónico.

Estos compuestos fueron obtenidos del Aldrich.

6.1.4. Disolventes.

Etanol.
Acetona.
Acetato de etilo.
Benceno.
Hexano.
Eter.
Diclorometano.

6.2. Material para los bioensayos.

6.2.2. Material biológico.

Larvas de *Culex quinquefasciatus* en el cuarto instar.
Larvas de *Artemia salina*.

6.1.2. Material del laboratorio.

Matraz erlenmeyer de 50 ml.
Pipetas graduadas de 10,5 y 1 ml.
Pipetas pasteur.
Espatulas.
Vasos desechables de 100 ml.
Viales de vidrio de 10 ml.
Recipientes de plástico (bandejas).

6.2.3. Substancias.

Sal marina.
Etil paratión.
 α -sanshool (obtenido de *Zanthoxylum Liebmanianum*).

6.2.4. Disolventes.

Acetona
Etanol.

6.2.5. Equipo.

Balanza analítica.

VII. METODOS.

7.1. SINTESIS DE N-ISOBUTILAMIDAS.

7.1.1. Síntesis de ácidos cinámicos, a partir de benzaldehidos. (Mundy, 1985)

En un matraz bola de 250 ml se colocaron 0.33 moles de benzaldehído, con 0.72 moles de ácido malónico, se adicionaron 150 ml. de piridina y 2.5 ml. de piperidina. Se calentó a reflujo, el tiempo de reacción se determinó por el seguimiento de la reacción en cromatografía en capa fina. La mezcla de reacción se dejó enfriar y se vació en una solución de ácido clorhídrico al 30% en un baño de hielo. El producto obtenido se filtró en un embudo buchner, se lavó con ácido clorhídrico al 10% y finalmente con agua destilada. Se purificó el ácido obtenido por cristalización simple, se determinó el punto de fusión y se obtuvieron los espectros de IR, RMN'H y EM. (ver esquema 1)

7.1.2. Obtención del cloruro de ácido. (Elliott, Et al. 1987)

En un matraz bola de 100 ml se colocaron 5.7 mmoles del ácido correspondiente con 27.3 mmoles de cloruro de tionilo, se calentó a reflujo por cerca de 5 horas. La reacción se siguió por cromatografía en capa fina. Después del reflujo, se destiló el exceso de cloruro de tionilo a presión reducida. La mezcla de reacción se lavó con benceno hasta que el destilado fué neutro al introducirle un papel indicador de pH. El cloruro de ácido obtenido se utilizó sin separarlo para la siguiente etapa de síntesis. (esquema 1)

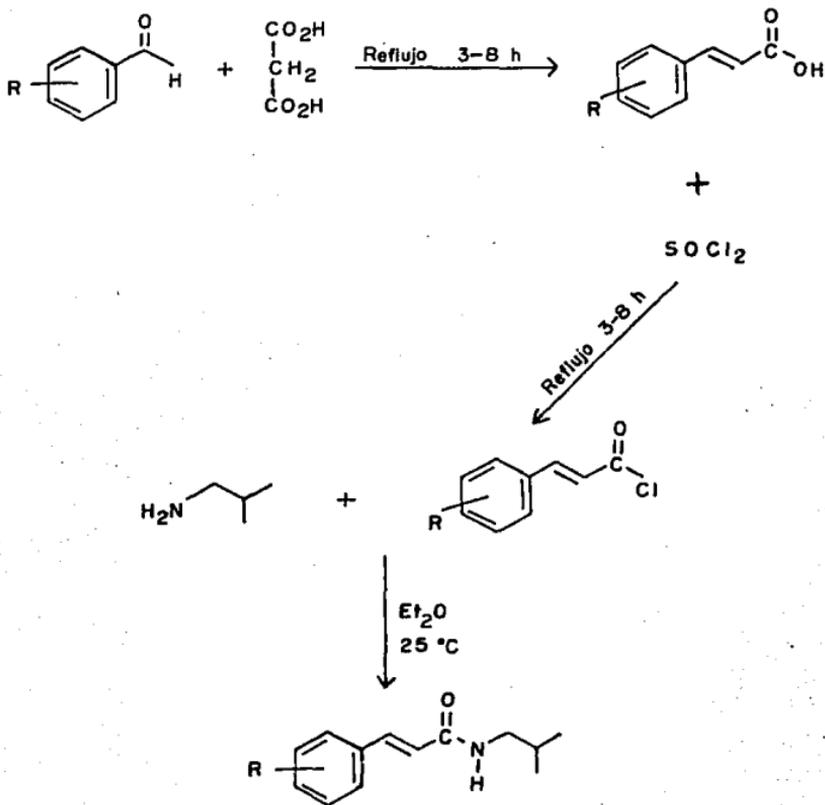
7.1.3. Formación de la amida. (Elliott, Et al. 1987)

El cloruro de ácido de la reacción anterior, se disolvió en 5 ml de éter etílico (destilado y seco); se adicionó una solución de isobutilamina (13 mmol en 50 ml. de éter). Se agitó la mezcla de reacción por 20 horas a temperatura ambiente. Se evaporó el éter de la mezcla de reacción y se disolvió ese producto en acetato de etilo. Esta mezcla se lavó consecutivamente con ácido clorhídrico al 10%, agua destilada, con una solución de bicarbonato de sodio al 10%, y finalmente con agua destilada hasta obtener un pH neutro. Posteriormente se separó la fase no acuosa y se secó con sulfato de sodio anhidro, el disolvente se evaporó a presión reducida en rotavapor. El producto se purificó por cristalización simple. (Esquema 1)

7.1.3.1. Identificación.

Los compuestos sintetizados se identificaron por medio de la determinación de sus propiedades físicas y espectroscópicas. Los puntos de fusión fueron medidos en aparato de Fisher-Jones y no fueron corregidos. Los espectros IR se obtuvieron de un espectrofotómetro Nicolet FT-IR SX de un solo haz. Los espectros de RMN se determinaron en espectrómetro FT-80. Los espectros de UV se obtuvieron en espectrómetro de doble haz Hitachi 220 S. Los espectros de masa se determinaron en un aparato Hitachi Perkin-Elmer RMU 6D.

ESQUEMA 1. ESQUEMA DE SINTESIS DE LAS N-ISOBUTILAMIDAS



R = H, CH₃O.

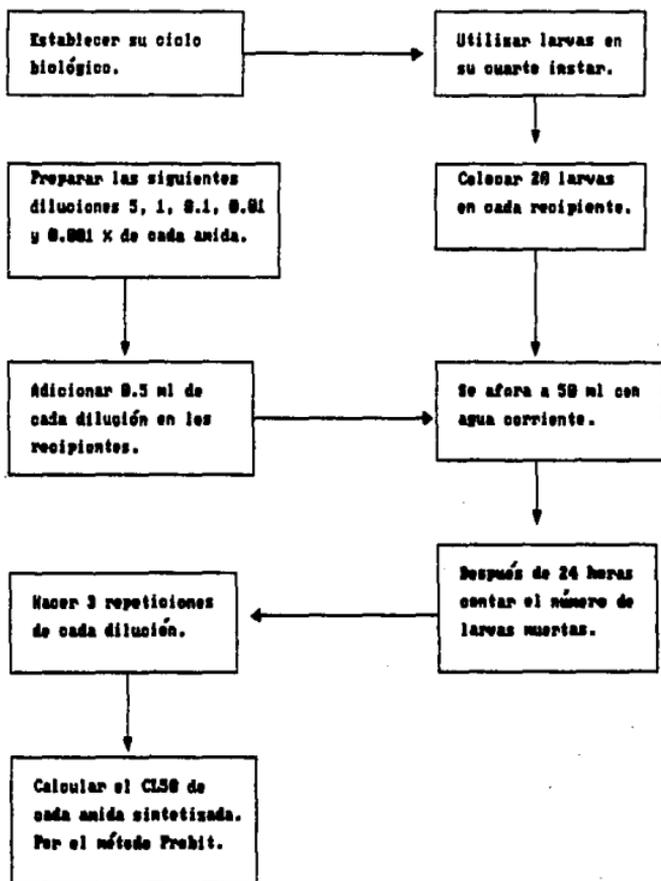
7.2. ESTABLECIMIENTO DEL CICLO BIOLÓGICO DE LA LARVA DE *Culex quinquefasciatus*.

Los huevecillos se colectaron de estanques del campo experimental "El Ranchito", de la Universidad Autónoma Chapingo. Se colocaron en recipientes con agua para su eclosión. Dos a tres días después, se observó si emergieron las larvas. Se les adicionó alimento de origen vegetal y se les cambió el agua por los menos cada tercer día. El periodo larvario duró aproximadamente 15 días. Después de esto se pasaron a pupa. Esta pupa se pasó a otro recipiente con agua, y se introdujo en una jaula entomológica en donde emergieron los adultos. Los moscos se alimentaron de sangre de pollo para lo cual se utilizó un pollo de aproximadamente 15 días de edad. Se colocaron recipientes con agua, para que la hembra deposite sus huevecillos, dentro de la jaula. Se colectaron los huevecillos diariamente y se colocaron en recipientes con agua, se siguió el ciclo, para obtener larvas en el cuarto estadio larvario. Manteniendo la colonia en el laboratorio.

7.2.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA SOBRE *Culex quinquefasciatus*.

Se prepararon las siguientes diluciones 5, 1, 0.1, 0.01, y 0.001%, se utilizó como disolvente acetona para cada uno de los compuesto que se sintetizaron. Se depositaron, 20 larvas del cuarto instar en aproximadamente 20 ml de agua, se adicionó 0.5 ml de cada una de las diluciones, se agitó y se aforo a 50 ml con agua. Se determinó la ventana biológica, que representaba el rango de concentraciones en donde se encontró el 100% y el 0% de mortalidad. Se hicieron otra serie de diluciones de al menos cuatro diluciones que se encontraran en el rango de concentraciones de la ventana biológica. (Ver esquema 2)

**ESQUEMA 2. DETERMINACION DEL CL50 EN LARVA DE MOSCO COMUN.
(Culex quinquefasciatus)**



7.3. PRODUCCION DE *Artemia salina*.

Se preparo agua de mar artificial, mezclando 38 g. de sal marina comercial en un litro de agua. Se colocaron en un recipiente amplio y se adicionó 50 mg de huevecillos de *A. salina*. Se cubrió y se colocó bajo una lámpara de luz. Las larvas se utilizaron 48 horas después.

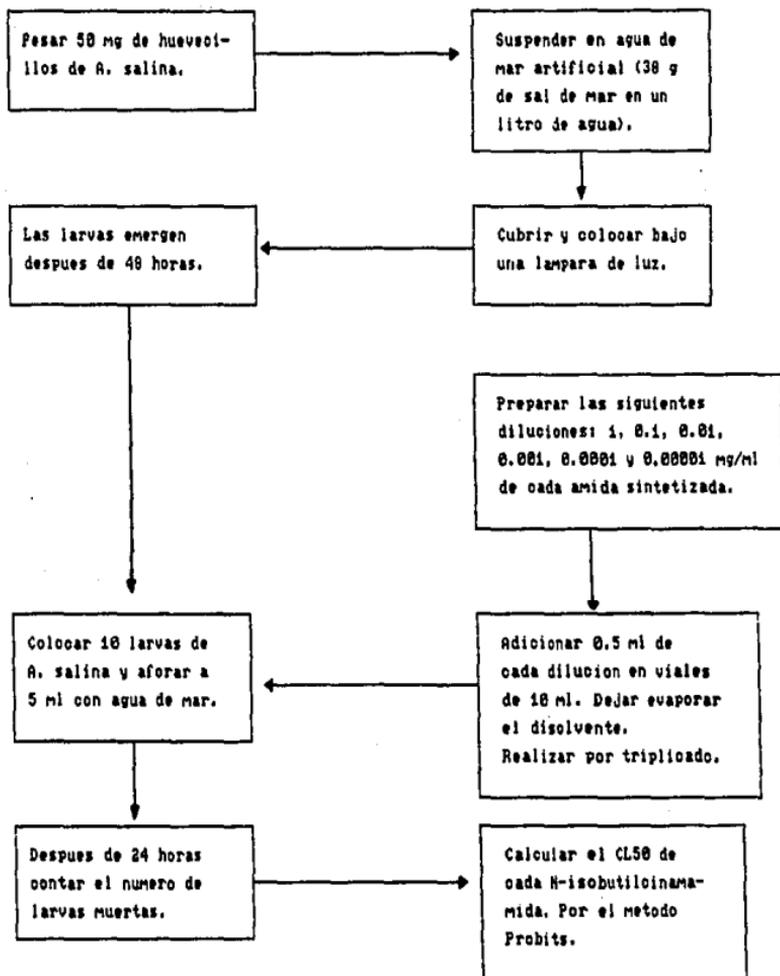
7.3.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA SOBRE *Artemia salina*.

Se pesaron 50 mg de cada uno de los compuestos, y se disolvieron en 5 ml de acetona (10 mg/ml). Se tomaron 0.5 ml de la dilucion anterior y se agregó 4.5 ml de acetona (1 mg/ml), se repitió esta operación en forma sucesiva para obtener las concentraciones de 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 mg/ml. Se prepararon 3 viales para cada concentración, marcando previamente el aforo a 5 ml., se utilizaron un total de 18 viales de prueba y 3 viales para controles, por cada compuesto evaluado.

Se adicionaron 0.5 ml de cada dilución en los viales de prueba correspondientes, a los viales control se les adicionó 0.5 ml de acetona, se dejó evaporar a temperatura ambiente por 24 horas. Se adicionó un poco de agua de mar y se agitó, se colocaron 10 larvas de *Artemia salina* por vial, se aforo a 5 ml con agua de mar artificial. Para contar las larvas se utilizó una pipeta pasteur larga. Después de 24 horas se contaron y se registraron las larvas muertas. (Ver esquema 3)

7.4. Se determinó la Concentración letal 50 (CL₅₀) en *Culex quinquefasciatus* y *Artemia salina*. Por medio del Análisis estadístico Probit, mediante un programa de computo. (Infante, 1984)

ESQUEMA 3. DETERMINACION DEL CL50 EN LARVA DE ARTEMIA SALINA.



VIII. RESULTADOS.

8.1. SINTESIS DE LAS N-isobutilcinamamidas.

Se sintetizaron 12 N-isobutilamidas, una de ellas la N-isobutilcinamamida y 11 sustituidas con metoxilos en el anillo aromático. De estas 11 N-isobutilcinamamidas metoxiladas 3 fueron monometoxiladas, 6 dimetoxiladas y 2 trimetoxiladas. De estos compuestos las 8 siguientes no habían sido sintetizadas:

1. N-isobutil-3-(2-metoxifenil)-2(E)-propenamida.
2. N-isobutil-3-(3-metoxifenil)-2(E)-propenamida.
3. N-isobutil-3-(2,3-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
4. N-isobutil-3-(2,4-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
5. N-isobutil-3-(2,5-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
6. N-isobutil-3-(2,6-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
7. N-isobutil-3-(3,5-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
8. N-isobutil-3-(2,4,5-trimetoxifenil)-2(E)-propenamida.

Para la síntesis de estas amidas se partió de ácidos cinámicos metoxilados y de benzaldehidos metoxilados. En la Tabla V, se presenta la materia prima con la cual se partió para la síntesis de cada compuesto, además de los tiempos de reflujo para la formación del ácido cuando se partió de benzaldehído y la formación del cloruro de ácido a partir del ácido. Para la formación de la amida a partir del cloruro de ácido correspondiente en presencia de la N-isobutilamina el tiempo de reacción fué constante en todos los casos, de aproximadamente 20 horas a temperatura ambiente. Estos tiempos de reflujo se determinaron por medio de un seguimiento de la reacción por cromatografía en capa fina de cada uno de los compuestos.

8.1.1. IDENTIFICACION DE LOS COMPUESTOS SINTETIZADOS.

En la Tabla VI se presentan los puntos de fusión de cada amida sintetizada así como su peso molecular encontrado por espectrometría de masas. También se indica el número de los espectros de resonancia magnética nuclear que se encuentran en el apéndice, y el rendimiento obtenido.

Se mencionaran los máximos de absorción de los compuestos sintetizados en los espectros de UV (Tabla VII) y las principales bandas en los espectros de IR (Tabla VIII).

TABLA V. CONDICIONES DE REACCION DE LAS AMIDAS SINTETIZADAS.

N-ISOBUTILCINAMAMIDA	MATERIA PRIMA	TIEMPO DE REFLUJO (HORAS)	
		FORMACION DEL ACIDO	SINTESIS DEL CLORURO DE ACIDO
-H	Benzaldehído	5.5	5.5
-2 OMe	Ac. 2-metoxicinámico	—	5.0
-3 OMe	Ac. 3-metoxicinámico	—	4.8
-4 OMe	4-metoxibenzaldehído	5.5	4.5
-2,3 diOMe	2,3-dimetoxibenzaldehído	5.0	5.0
-2,4 diOMe	2,4-dimetoxibenzaldehído	4.0	5.0
-2,5 diOMe	Ac. 2,5-dimetoxicinámico	—	3.5
-2,6 diOMe	2,6-dimetoxibenzaldehído	7.0	5.0
-3,4 diOMe	Ac. 3,4-dimetoxicinámico	—	4.0
-3,5 diOMe	3,5-dimetoxibenzaldehído	5.0	4.0
-2,4,5 triOMe	2,4,5-trimetoxibenzaldehído	7.0	5.0
-3,4,5 triOMe	Ac. 3,4,5-trimetoxicinámico	—	5.0

TABLA VI. RESULTADOS DE LA SINTESIS DE LAS N-ISOBUTILCINAMAMIDAS METOXILADAS.

N-ISOBUTILCINAMAMIDA	PM* (g/mol)	RENDIMIENTO (%)	PUNTO DE FUSION (°C)	No. ESPECTRO DE RMN-H**
-H	203	93.0	110 - 111	1
-2 OMe	233	61.0	109 - 110	2
-3 OMe	233	84.6	70 - 71	3
-4 OMe	233	46.3	103 - 104	4
-2,3 diOMe	263	55.0	105 - 106	5
-2,4 diOMe	263	81.7	106 - 107	6
-2,5 diOMe	263	65.0	147 - 148	7
-2,6 diOMe	263	61.6	160 - 161	8
-3,4 diOMe	263	58.3	104 - 105	9
-3,5 diOMe	263	69.6	80 - 90	10
-2,4,5 triOMe	293	60.0	136 - 137	11
-3,4,5 triOMe	293	77.0	149 - 150	12

*PESO MOLECULAR OBTENIDO POR ESPECTROMETRIA DE MASAS.

**ESPECTROS DE RMN, EN EL APENDICE 1, APARECEN EN NUMEROS SUCESIVOS.

TABLA VII. PRINCIPALES BANDAS DE LOS ESPECTROS DE INFRARROJO.

GRUPO FUNCIONAL	FRECUENCIA ν
-NH	3250 - 3300
C-H (Insaturado)	3000 - 3078
C-H (Saturado)	2940 - 3006
C=O	1650 - 1658
-C=C (Aromatico)	1604 - 1618
-C=C (Trans)	978 - 996
Monosustituidas	688 - 778
Disustituidas	758 - 838
Trisustituidas	728 - 866
Tetrasustituidas	822 - 854

TABLA VIII. MAXIMOS DE ABSORCION DE LAS AMIDAS SINTETICAS
EN EL ESPECTRO DE ULTRAVIOLETA.

N-ISOBUTILCINAMAMIDA	LONGITUD DE ONDA MAXIMA (m μ)
-H	269
-2 OMe	271, 316
-3 OMe	326
-4 OMe	288
-2,3-diOMe	276
-2,4-diOMe	288, 289, 317
-2,5-diOMe	339, 272
-2,6-diOMe	288
-3,4-diOMe	327
-3,5-diOMe	282
-2,4,5-triOMe	337, 283, 251
-3,4,5-triOMe	297

B.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA.

Para determinar la actividad larvicida de las N-isobutilamidas se realizaron dos tipos de bioensayos uno sobre larva de mosco común (*Culex quinquefasciatus*) en su cuarto estadio larvario y otro sobre larva del crustáceo *Artemia salina*.

En la tabla IX, se resumen los resultados obtenidos en larva de *Culex quinquefasciatus*, en la que se indica la concentración letal 50, la potencia relativa de cada N-isobutilcinamamida sintetizada tomando como referencia a una N-isobutilamida de origen natural el alfa sanshool, aislada de la corteza de *Zanthoxylum liebmanianum*, con un intervalo de confianza del 95%. También se utilizó un insecticida comercial, el etil paratión, para comparar la actividad larvicida de las amidas sintetizadas. Se realizaron curvas dosis respuesta de la actividad larvicida en *Culex quinquefasciatus* de cada una de las amidas sintetizadas, comparandolas con el α -sanshool. (figuras 1 a 8)

En la tabla 6 se presentan los resultados obtenidos sobre la actividad larvicida de las amidas sintetizadas sobre *Artemia salina*, se tomó como referencia al alfa sanshool y al etil paratión. También se construyeron curvas dosis-respuesta de la actividad larvicida en larva de *A. salina* de cada amida comparandola con la amida de origen natural α -sanshool. (figuras 9 a 16)

TABLA IX. CONCENTRACION LETAL 50 EN *Culex quinquefasciatus* DE LAS AMIDAS SINTETIZADAS.

COMPUESTO	CL ₅₀ (mg/L)	I C 95x	POTENCIA RELATIVA (%)
-H	167.5	(126.0 - 222.7)	1.1
-2 OMe	420.5	(264.2 - 669.3)	0.43
-3 OMe	80.4	(56.2 - 115.1)	2.27
-4 OMe	234.3	(171.6 - 319.8)	0.78
-2,3 dione	779.2	(174.0 - 3489.0)	0.23
-2,4 dione	I N A C T I	U O H A S T A	1000 mg/l
-2,5 dione	618.4	(383.1 - 998.2)	0.29
-2,6 dione	I N A C T I	U O H A S T A	1000 mg/l
-3,4 dione	372.4	(189.5 - 1266.6)	0.49
-3,5 dione	622.9	(359.1 - 1080.7)	0.29
-2,4,5 trione	I N A C T I	U O H A S T A	1000 mg/l
-3,4,5 trione	I N A C T I	U O H A S T A	1000 mg/l
ALFA SANDHOL	1.82	(0.91 - 3.63)	100
ETIL PARATHION	0.16x10 ⁻²	(3.0x10 ⁻² -1.7x10 ⁻³)	2.2x10 ⁷

**CURVA DOSIS RESPUESTA DEL EFECTO
LARVICIDA EN CULEX QUINQUEFASCIATUS
DE LA N-Isobutylcinamamida.**

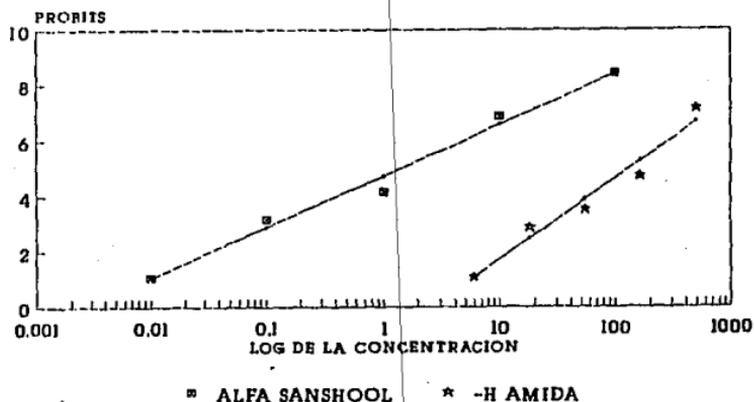


FIG. 1

**CURVA DOSIS RESPUESTA DEL EFECTO
LARVICIDA EN CULEX QUINQUEFASCIATUS
DE LA N-Isobutyl-o-metoxicinamamida.**

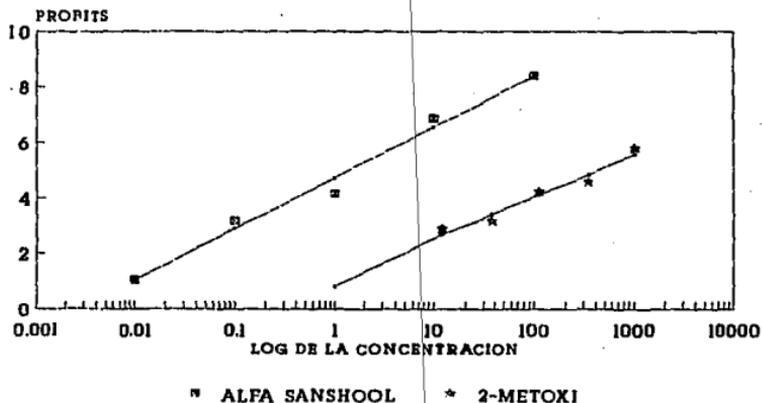


FIG. 2

**CURVA DOSIS RESPUESTA DEL EFECTO
LARVICIDA EN CULEX QUINQUEFASCIATUS
DE LA N-Isobutil-3-metoxicinamamida.**

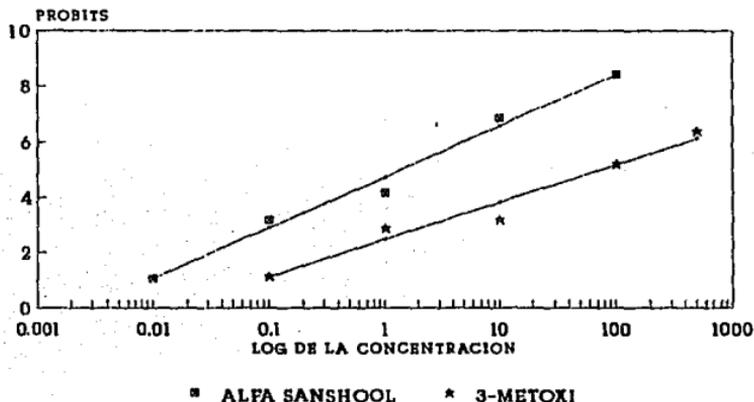


FIG. 3

**CURVA DOSIS RESPUESTA DEL EFECTO
LARVICIDA EN CULEX QUINQUEFASCIATUS
DE LA N-Isobutil-4-metoxicinamamida.**

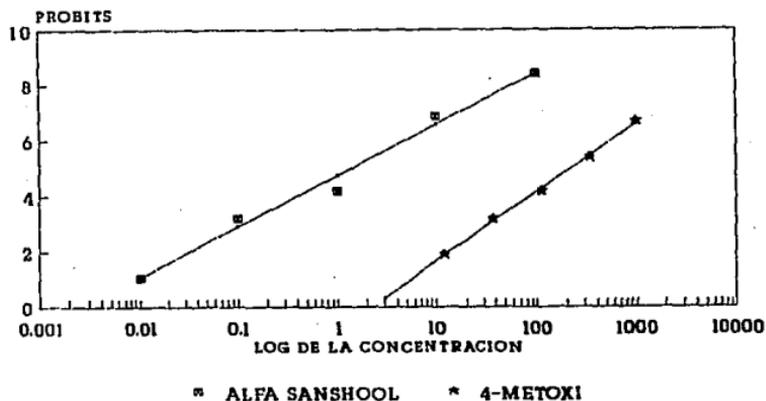


FIG. 4

**CURVA DOSIS RESPUESTA DEL EFECTO
LARVICIDA EN CULEX QUINQUEFASCIATUS
DE LA N-Isobutil-2,3-dimetoxicinamamida.**

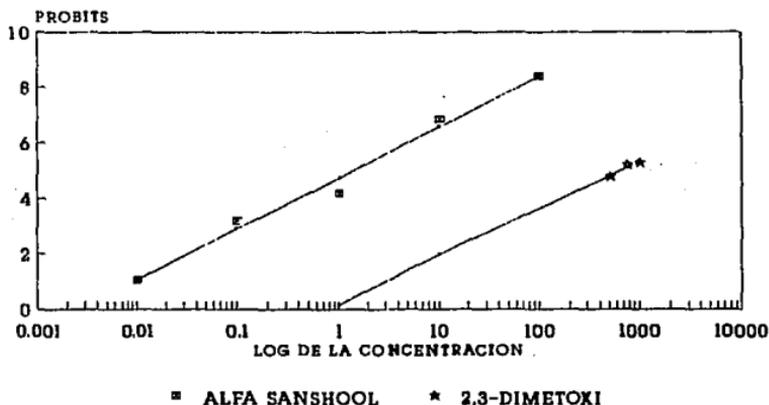


FIG. 5

**CURVA DOSIS RESPUESTA DEL EFECTO
LARVICIDA EN CULEX QUINQUEFASCIATUS
DE LA N-Isobutil-2,5-dimetoxicinamamida.**

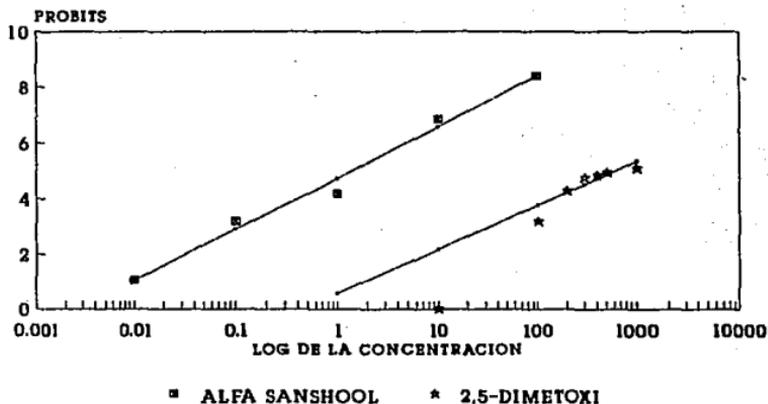


FIG. 6

**CURVA DOSIS RESPUESTA DEL EFECTO
LARVICIDA EN CULEX QUINQUEFASCIATUS
DE LA N-isobutil-3,4-dimetoxicinamamida.**

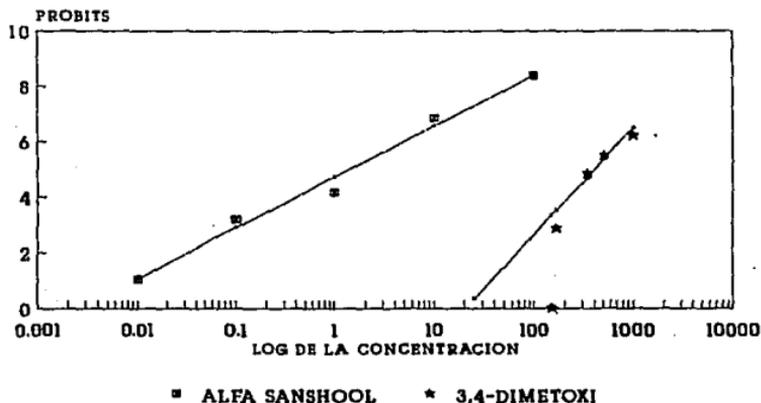


FIG. 7

**CURVA DOSIS RESPUESTA DEL EFECTO
LARVICIDA EN CULEX QUINQUEFASCIATUS
DE LA N-isobutil-3,5-dimetoxicinamamida.**

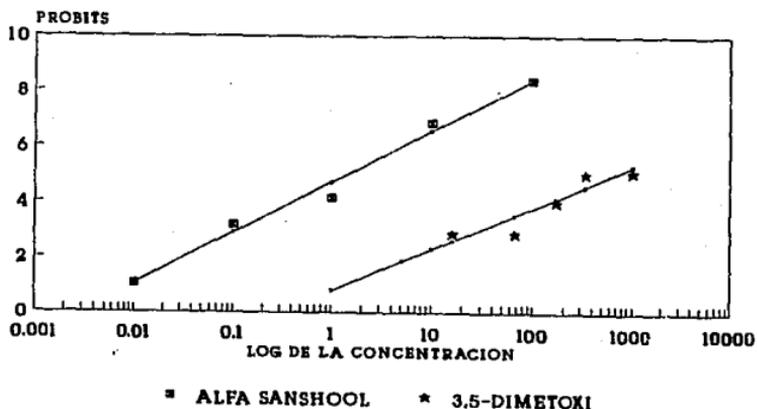


FIG. 8

TABLA X. CONCENTRACION LETAL 50 DE LAS AMIDAS SINTETIZADAS SOBRE Artemia salina.

COMPUESTO	CL ₅₀ (mg/L)	I C 95%	POTENCIA RELATIVA (%)
-H	28.0	(12.5 - 62.59)	9.0
-2 OMe	57.2	(23.7 - 138.0)	5.0
-3 OMe	23.5	(9.7 - 57.1)	10.0
-4 OMe	22.5	(11.9 - 42.63)	11.0
-2,3 diOMe	I N A C T I U O	H A S T A	1000 mg/l
-2,4 diOMe	I N A C T I U O	H A S T A	1000 mg/l
-2,5-diOMe	92.1	(37.1 - 228.7)	2.0
-2,6 diOMe	332.0	(98.3 - 1227.2)	0.77
-3,4 diOMe	89.0	(31.9 - 247.9)	3.0
-3,5 diOMe	070.6	(117.0 - 6597.0)	0.75
-2,4,5 triOMe	I N A C T I U O	H A S T A	1000 mg/l
-3,4,5 triOMe	I N A C T I U O	H A S T A	1000 mg/l
ALFA SAMSHOOL	2.6	(1.11 - 5.99)	100
ETIL PAMTION	38.6	(11.0 - 135.5)	6.68

CURVA DOSIS RESPUESTA EN ARTEMIA SALINA DE LA N-isobutilcinamamida.

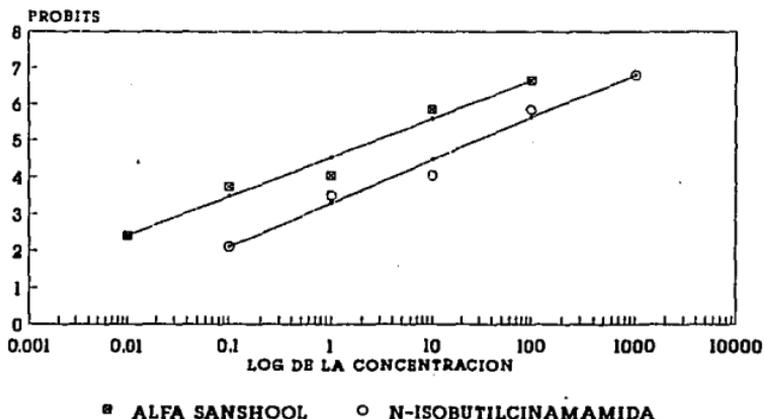


FIG. 9

CURVA DOSIS RESPUESTA EN ARTEMIA SALINA DE LA N-isobutil-2-metoxi-cinamamida.

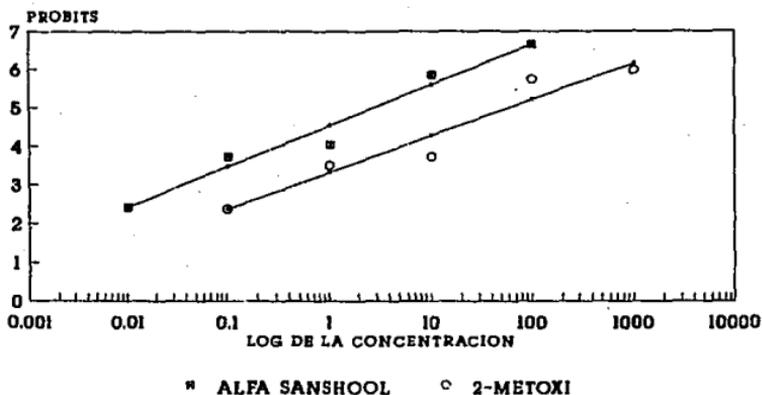


Fig. 10

**CURVA DOSIS RESPUESTA EN ARTEMIA
SALINA DE LA N-isobutil-3-metoxi-
cinamamida.**

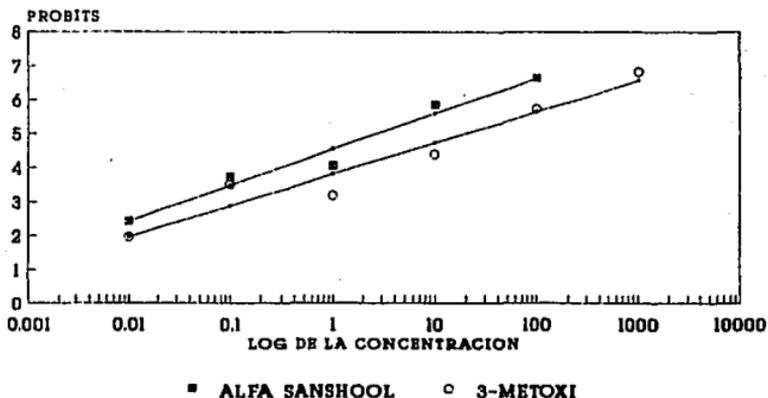


Fig. 11

**CURVA DOSIS RESPUESTA EN ARTEMIA
SALINA DE LA N-isobutil-4-metoxi-
cinamamida.**

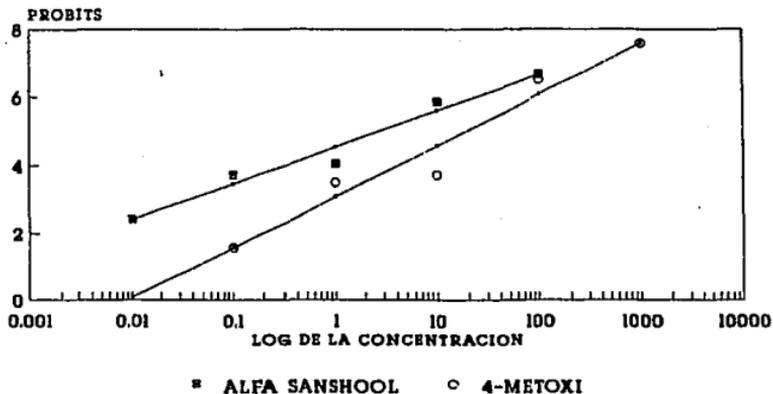


FIG. 12

**CURVA DOSIS RESPUESTA EN ARTEMIA
SALINA DE LA N-isobutil-2,5-dimetoxi-
cinamamida.**

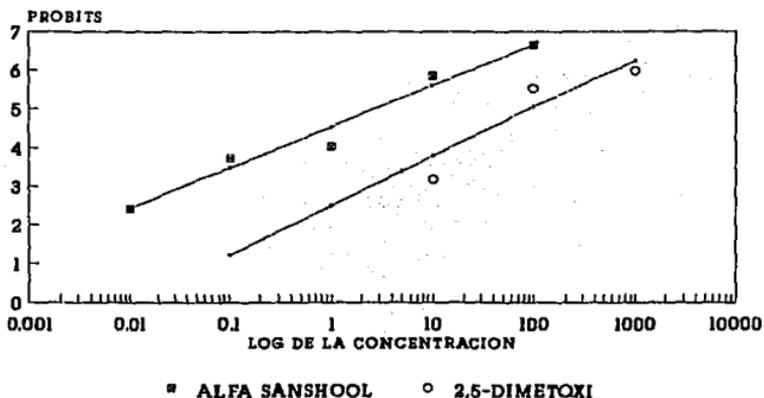


FIG. 13

**CURVA DOSIS RESPUESTA EN ARTEMIA
SALINA DE LA N-isobutil-2,6-dimetoxi-
cinamamida.**

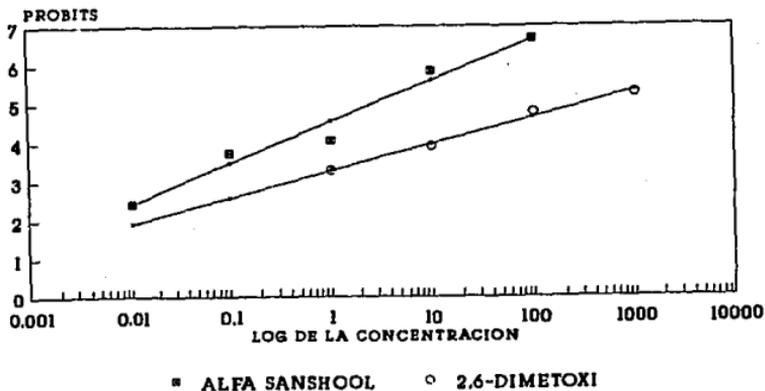


FIG. 14

**CURVA DOSIS RESPUESTA EN ARTEMIA
SALINA DE LA N-isobutil-3,4-dimetoxi-
cinamamida.**

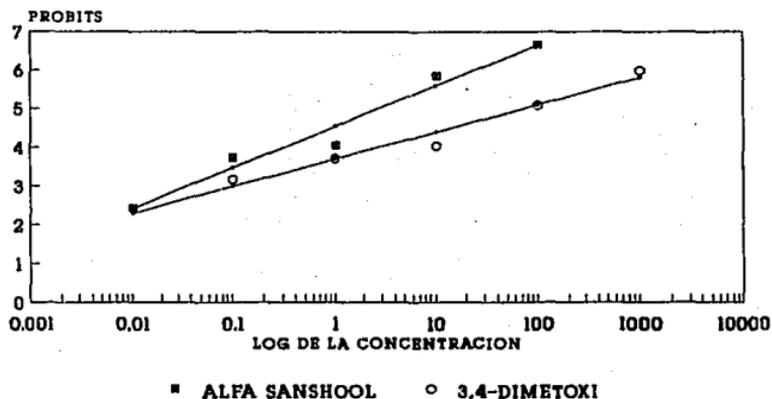


FIG. 15

**CURVA DOSIS RESPUESTA EN ARTEMIA
SALINA DE LA N-isobutil-3,5-dimetoxi-
cinamamida.**

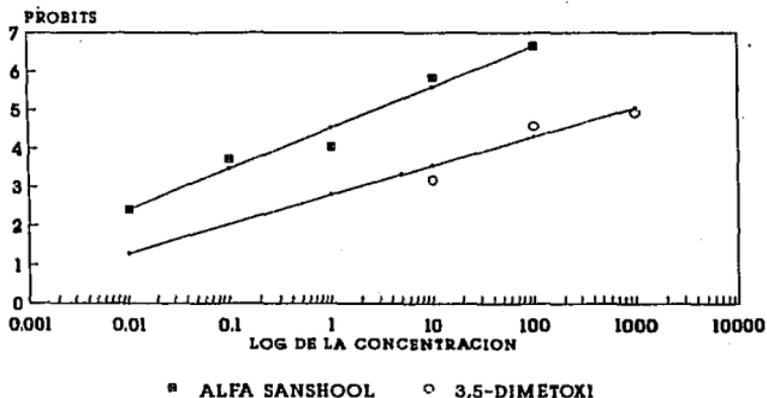


FIG. 16

IX. ANALISIS DE RESULTADOS

9.1. SINTESIS DE LAS AMIDAS.

Se sintetizaron 11 N-isobutilcinamamidas, metoxiladas en diferentes posiciones del anillo aromático y la N-isobutilcinamamida. La síntesis se realizó de acuerdo al esquema presentado en la sección de materiales y métodos. Para 5 amidas; la 2,4-dimetoxi, 2,5-dimetoxi, 3,5-dimetoxi, 2,4,5-trimetoxi y la 3,4,5-trimetoxi, se hizo una modificación al procedimiento para la formación del cloruro de ácido, fué necesario utilizar benceno como disolvente (Chemical Abstracts, 1979); ya que al adicionar el cloruro de tionilo se observaba una reacción violenta y al ponerla a reflujo, se formaba una masa negra y pegajosa que al adicionarle la N-isobutilamina no se disolvía y no reaccionaba.

Las reacciones fueron seguidas por cromatografía en capa fina, en donde por lo general se utilizó una mezcla de acetato de etilo-hexano como eluyente, para las amidas trimetoxiladas se utilizó solo el acetato de etilo. La reacción se paró cuando ya no se observó la presencia de la materia prima en la mezcla de reacción.

La purificación de las amidas sintetizadas se realizó por cristalización simple, utilizando en algunos casos un solo disolvente y en otros una mezcla de disolventes, esto se determinó realizando pruebas de solubilidad de cada uno. En general se utilizó una mezcla de acetato de etilo (70%) - hexano (30%). Para las amidas trimetoxiladas se utilizó etanol como disolvente.

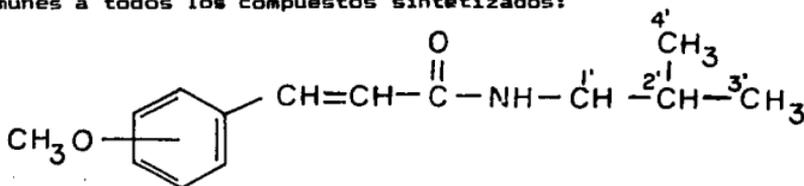
9.2. IDENTIFICACION.

Se determinó el punto de fusión de cada compuesto, en un aparato Fisher Jonhons (Tabla VI).

La identificación de las N-isobutylcinamamidas metoxiladas sintetizadas se realizó por medio de el Analisis espectroscopico, de resonancia magnética nuclear, de infrarojo, de ultravioleta y de masas.

9.2.1 RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR.

En los espectros de Resonancia Magnética (apéndice 1) se observaron las siguientes señales, las cuales fueron comunes a todos los compuestos sintetizados:



- a) Un doblete ($J = 9$ Hz) entre 0.9 - 1.0 ppm, correspondiente a los metilos de la cadena isobutilica ($C_{3'}$ y $C_{4'}$).
- b) La señal múltiple (hepteto), que aparece aproximadamente en 1.9 ppm que corresponde al metino del isobutilo ($C_{2'}$).
- c) El triplete que aparece a aproximadamente 3.2 ppm, corresponde al metileno ($C_{1'}$) del isobutilo. Esta banda se transformo en un doblete ($J = 6$ Hz) al adicionarle D_2O debido a la sustitución del hidrógeno del nitrógeno por deuterio.
- d) La señal del protón del nitrógeno aparece en un rango de 5.5 a 6.3 ppm de acuerdo al compuesto, como una señal ancha, que al adicionarle D_2O desaparece.
- e) Para el doble enlace se observan dos dobletes ($J = 15$ Hz), uno aparece entre 6.2 - 6.5 ppm y otro entre 7.5 - 7.9 ppm, el valor de acoplamiento confirma la geometría E.

- f) Las señales características del anillo aromático en general aparecieron entre 6.2 a 7.5 ppm. cada compuesto presentó el patrón de sustitución característico para el anillo bencénico.
- g) Las señales de los metoxilos aparecen de 3.5 a 4.0 ppm.

9.2.2. ESPECTROS DE INFRARROJO.

En los espectros de infrarrojo se encontraron las siguientes bandas correspondientes al grupo amida, la del nitrógeno, la del carbonilo, la del doble enlace en donde se confirmó la configuración trans y las correspondientes al esquema de sustitución del anillo aromático. Se indican en la tabla 3 de manera general debido a que los compuestos sintetizados tienen una estructura similar por lo que los espectros de infrarrojo son similares, solamente el esquema de sustitución del anillo aromático es diferente.

9.2.3. ESPECTROS DE ULTRAVIOLETA.

En los espectros de Ultravioleta se determinaron los máximos de absorción de cada una de las amidas sintetizadas, en la tabla 4 se indican estos máximos de absorción.

Estos máximos de absorción se deben a la presencia del anillo aromático el cual forma un sistema conjugado con el doble enlace y la amida.

9.2.4. ESPECTROMETRIA DE MASAS.

Con la espectrometria de masas confirmamos por medio del peso molecular la estructura de las amidas sintetizadas. En la tabla 2, se mencionan los pesos moleculares encontrados por espectrometria de masas.

9.3. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DE LAS N-isobutilcinamamidas.

9.3.1. ACTIVIDAD LARVICIDA SOBRE *Culex quinquefasciatus*.

La determinación de la Concentración letal 50 en larva de mosco común *Culex quinquefasciatus*, se realizó como se indica en la sección de métodos. Sin embargo, en algunos casos hubo la necesidad de utilizar menos cantidad de compuesto, por lo que se estandarizó una microtécnica en donde se utilizaron 10 larvas, se adicionaron 0.1 ml de las diluciones y se aforaron a 10 ml con agua. Para esta técnica se logró que con aproximadamente 200 mg de compuesto se calculará la concentración letal 50 probándose hasta 1000 µg/ml; en el bioensayo planteado inicialmente por lo menos se necesitaba 500 mg del compuesto. En ambos casos las diluciones se realizaron con acetona y para las amidas trimetoxiladas se utilizó etanol. Cada dilución se realizó por triplicado con tres muestras blanco que contenían la misma cantidad de disolvente que se adicionó en las diluciones de los compuestos.

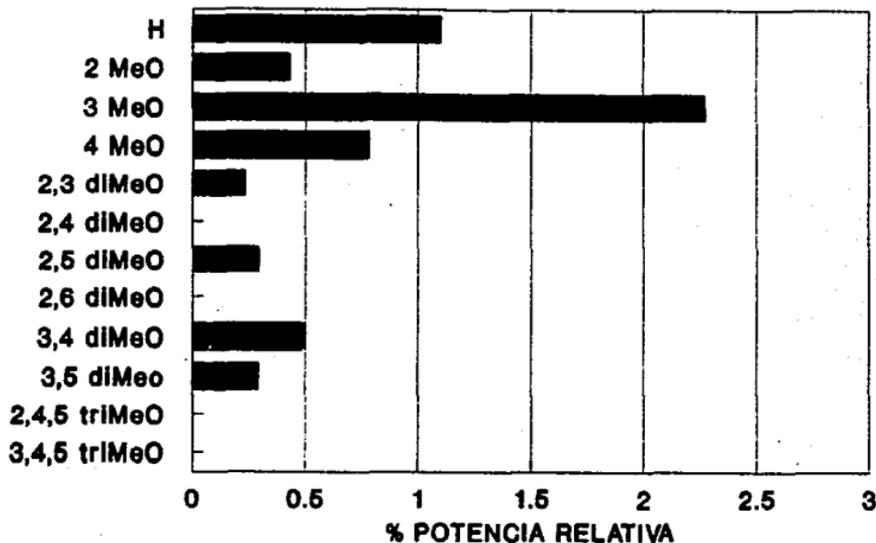
Para cada N-isobutilcinamamida sintetizada se construyó una curva dosis respuesta de su actividad larvicida en mosco común (Figuras 1 a 8). En todos los casos se utilizó como referencia la N-isobutilamida de origen natural, α -sanshool. Se presentan las curvas dosis respuesta de las amidas que tuvieron una concentración letal 50 menores 1000 µg/ml. Se encontró una relación lineal entre la concentración de las amidas y la respuesta transformada a unidades probits. En general los valores experimentales no presentaron una desviación significativa comparada con los valores calculados.

Se observó que las amidas 2-metoxi, 2,3-dimetoxi, 2,5-dimetoxi y 3,5-dimetoxi; presentan una pendiente similar a la amida α -sanshool, por lo que se puede esperar que presenten un mecanismo de acción similar. Se ha postulado que estas N-isobutilamidas actúan a nivel de los canales de sodio en la conducción nerviosa del axón. (Blade, 1990)

Ninguna de las amidas sintetizadas presentó una actividad larvicida igual o mayor que la amida α -sanshool. De las amidas probadas la que presentó mayor actividad es la N-isobutilcinamamida metoxilada en la posición 3, le sigue la N-isobutilcinamamida, 4 metoxi, 3,4-dimetoxi, 2-metoxi, 3,5-dimetoxi, 2,5-dimetoxi, y la 2,3-dimetoxi. Las amidas 2,4-dimetoxi, 2,6-dimetoxi, 2,4,5-trimetoxi y la 3,4,5-trimetoxi fueron inactivas hasta 1000 $\mu\text{g/ml}$. (Fig 9)

ACTIVIDAD LARVICIDA DE LAS AMIDAS SOBRE *Culex quinquefasciatus*

SUSTITUYENTE



•RESPECTO A ALFA SANSHOOOL
(CL50 = 1.82 μ g/l)

FIG. 17

9.4. ACTIVIDAD LARVICIDA SOBRE *Artemia salina*.

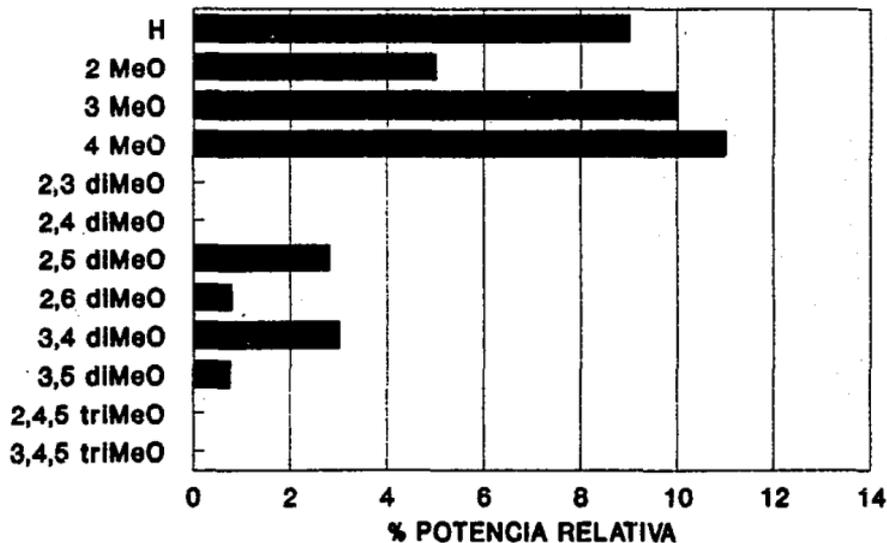
Este bioensayo se realizó de manera similar al del mosco común, también se determinó la concentración letal 50 hasta 1000 $\mu\text{g/ml}$. Para las amidas monometoxiladas, las dimetoxiladas y la N-isobutilcinamamida se utilizó acetona como vehiculo y para las trimetoxiladas etanol, para los controles se administraba el disolvente empleado para cada compuesto de prueba.

Se realizaron curvas dosis-respuesta de la actividad larvicida (Figuras 10 a 17), en este caso sobre *Artemia salina* comparando con la amida de origen natural α -sanshool.

Al igual que en mosco común, ninguna de las amidas sintetizadas presentó una actividad mayor que el α -sanshool. En este bioensayo (Fig. 18), la amida con mayor actividad fué la 4-metoxi ($CL_{50} = 22.5 \mu\text{g/ml}$), le sigue la 3-metoxi ($CL_{50} = 23.5 \mu\text{g/ml}$), que prácticamente presentó la misma actividad que la 4-metoxi; le sigue la N-isobutilcinamamida, la 2-metoxi, la 3,4-dimetoxi, la 2,5-dimetoxi, la 2,6-dimetoxi y la 3,5-dimetoxi. Las amidas restantes fueron inactivas hasta 1000 $\mu\text{g/ml}$. Las amidas inactivas fueron la 2,3-dimetoxi, la 2,4-dimetoxi, la 2,4,5-trimetoxi y la 3,4,5-trimetoxi.

ACTIVIDAD LARVICIDA DE LAS AMIDAS SOBRE *Artemia salina*

SUSTITUYENTE



•RESPECTO A ALFA SANSHOOOL
(CL50 = 2.58 μ g/l)
FIG. 18

9.5. CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD LARVICIDA EN *Culex quinquefasciatus* Y *Artemia salina*.

Se encontró una buena correlación entre actividad larvicida en mosco común y en larva de camarón. (Fig. 19) un coeficiente de 0.91. En esta gráfica también se puede observar que la actividad disminuye conforme aumenta el número de metoxilos en el anillo aromático. Por lo que las amidas monometoxiladas fueron más activas que las dimetoxiladas y las trimetoxiladas fueron inactivas hasta 1000 µg/ml. Tal vez la falta de actividad de las amidas trimetoxiladas abedezca a factores fisicoquímicos como solubilidad, la cual se hace necesario determinar y es objeto de una investigación adicional a la presente.

La correlación encontrada da la pauta para afirmar que determinando la actividad larvicida en *Artemia salina* es posible predecir la actividad larvicida en *Culex quinquefasciatus*. Esto es importante debido a que el bioensayo en larva de *Artemia salina* es mucho más sencillo que en larva de mosco. Los huevecillos de *A. salina* son fácilmente obtenidos en el comercio, permanecen viables por mucho tiempo y solo es necesario colocarlos en agua de mar artificial para obtener las larvas para el bioensayo. Sin embargo para obtener las larvas de mosco es necesario establecer su ciclo biológico, además que el desarrollo se ve afectado por condiciones ambientales, estacionales y los propios del ciclo biológico de este insecto.

Finalmente, cabe mencionar que este trabajo forma parte de una investigación más amplia, en la cual se están sintetizando un mayor número de N-isobutilcinamamidas con diferentes sustituyentes, y con los cuales se realizará un estudio de relación estructura-actividad, para el cual se considerarán algunos parámetros fisicoquímicos como momento dipolar, afinidad electrónica, coeficiente de reparto, etc.

CORRELACION ENTRE LA ACTIVIDAD EN A.salina y C. quinquefasciatus.

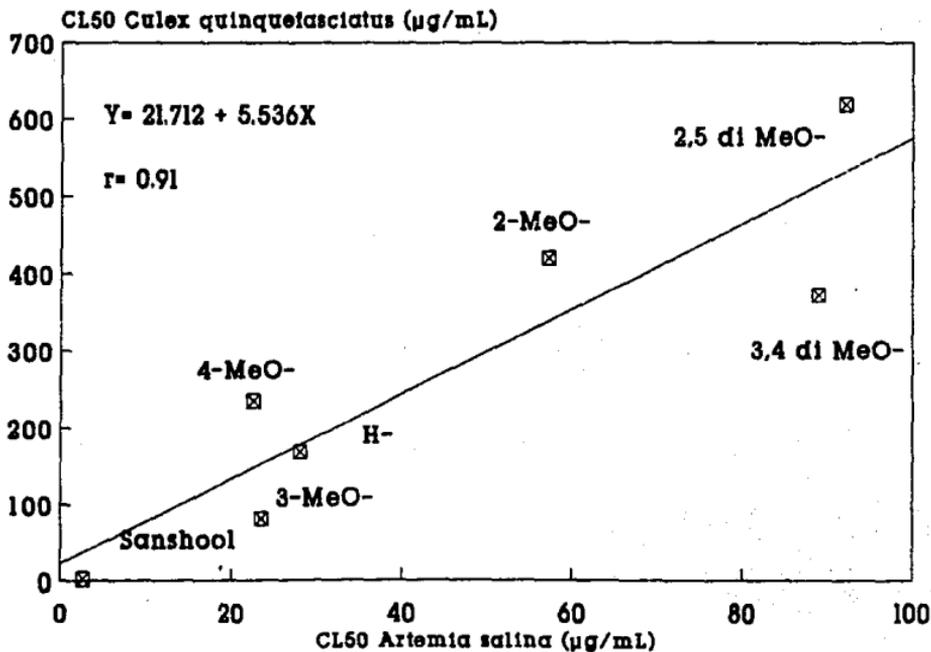


FIG. 19

X. CONCLUSIONES.

Las conclusiones que se desprenden de la presente investigación son:

1. Se sintetizaron 12 N-isobutilamidas; la N-isobutilcinamamida y 11 N-isobutilcinamamidas metoxiladas con rendimientos entre 55 y el 90 por ciento. De las amidas metoxiladas 3 fueron monometoxilas, 6 dimetoxiladas y 2 trimetoxiladas.

2. De las doce N-isobutilcinamamidas sintetizadas las siguientes 8 no se encuentran descritas en la literatura.

- N-isobutil-3-(2-metoxifenil)-2(E)-propenamida.
- N-isobutil-3-(3-metoxifenil)-2(E)-propenamida.
- N-isobutil-3-(2,3-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
- N-isobutil-3-(2,4-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
- N-isobutil-3-(2,5-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
- N-isobutil-3-(2,6-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
- N-isobutil-3-(3,5-dimetoxifenil)-2(E)-propenamida.
- N-isobutil-3-(2,4,5-trimetoxifenil)-2(E)-propenamida.

3. Para cada amida se determinaron los puntos de fusión y se confirmó su estructura por medio del análisis espectroscopico en donde se determinaron los espectros de RMN, IR, UV y masas.

4. Ninguna de las amidas presentó una actividad mayor igual que el α -sanshool en los bioensayos empleados (*Culex quinquefasciatus* CL_{50} = 1.82 μ g/ml; *Artemia salina* CL_{50} = 2.6 μ g/ml). De las amidas sintetizadas la más activa en ambos bioensayos fué la metoxilada en la posición 3 (*C. quinquefasciatus* CL_{50} = 80.4 μ g/ml y *A. salina* CL_{50} = 23.5

$\mu\text{g}/\text{ml}$): la amida 4-metoxi presentó una actividad prácticamente igual ($\text{CL}_{50} = 22.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) a la amida metoxilada en 3 sobre *A. salina*.

5. Se encontró una buena correlación entre la actividad larvicida de los compuestos, en *Culex quinquefasciatus* y en *Artemia salina*, con un coeficiente de 0.91. Lo que indica que determinando la actividad larvicida en *Artemia salina* es posible predecir la actividad larvicida en *Culex quinquefasciatus*.

6. Se logró optimizar la cantidad de compuesto para determinar la CL_{50} en *Culex quinquefasciatus*, utilizandose como máximo 200 mg de compuesto.

XI. SUGERENCIAS.

- Se sugiere determinar el coeficiente de partición n-octanol/agua de cada compuesto y relacionarlo con la actividad larvicida.

- Profundizar sobre el mecanismo de acción mediante el estudio de sinérgismo y antagonismo, tanto en este sistema como en algunos otros que permitan saber si al igual que las N-isobutilamidas de cadena larga, los compuestos sintetizados afectan la conducción nerviosa en el axón.

XII. BIBLIOGRAFIA.

- Blade, J. R. (1990). Some Aspects of Synthesis and Structure-Activity in Insecticidal Lipid Amides. Recent Advances in the Chemistry of Insect Control. The Royal Society of Chemistry, 151-169.
- Borror, D., Triplehorn, C. A. y Johnson, N. F. (1989). An Introduction to the Study of Insects. 6a. edición. Sounders College Publishing. E.U.A. 541-545.
- Carballo, P. J. y Melchor, M. P. (1993). Síntesis y Actividad Larvívica de algunas Cinamamidas. Tesis de Licenciatura, G.F.B. Escuela de Ciencias Químicas. Universidad de Veracruz, Mexico.
- Chemical Abstracts. Vol. 90, 1979. 90:76576w.
- Crombie, L. y Fisher, D. (1985). Synthon: For general Routes to natural insecticidal Lip. Isobutylamides. *Tetrahedron Letters*, 26 (20), 2477-2480.
- Crombie, L. y Fisher, D. (1985). Synthesis of Natural polyene isobutylamides. Stereochemistry of the Wittig Reactions. *Tetrahedron Letters*. 26 (20), 2481-2484.
- Elliott, M., Farnham, A., Janes, N.F., Johnson, D.M. y Pulman, D. (1987). Synthesis and Insecticidal Activity of lipophilic Amides. Part 1: Introductory Survey, and Discovery of an Active Synthetic Compound. *Pestic Sci.* 18, 191-201.

- Elliott, M., Farnham, A., Janes, N.F., Johnson, D. M. y Pulman, D. (1987). Synthesis and Insecticidal Activity of Amides. Part II. *Pestic Sci.* 18, 203-209.
- Elliott, M., Farnham, A., Janes, N. F., Johnson, D. M. y Pulman, D. (1987). Synthesis and Insecticidal Activity of Amides. Part III *Pestic Sci.* 18, 211-221.
- Gilotra, J. (1973). Determination of susceptibility levels of mosquitoes to nonpersistent insecticides by microinjections. *Mosquito News.* 32 (3), 358-63. Chemical Abstracts 78:53830n.
- Gallegos, G. (1982). Análisis de Acción conjunta de insecticidas en el Mosquito *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Chapingo, México.
- Georghiou, G. y Gidden, E. (1965). Contact toxicity of insecticide on deposits on filter paper to adult mosquitoes. *Mosquito News.* 25 (2), 201-8.
- Haral, G. (1984). Alkamides: Structural Relationship, Distribution and Biological Activity. *Planta Médica.* 80, 366-375.
- Harwood, R. F. y James, M. T. (1987). Entomología Médica y Veterinaria. Limusa. México D.F. 9-25, 61-93, 139-169, 201-270, 343-485.

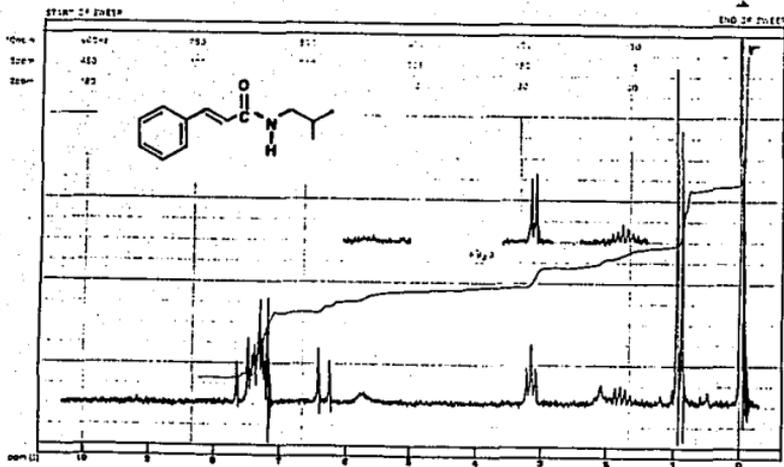
- Infante, Said y Zarate de Lara, Guillermo. (1984). Métodos Estadísticos. Trillas. México. 181-236.
- Klocke, James A. (1989). Plant Compounds as Sources and models of Insect-Control Agents. Economic and medicinal Plant Research. Vol. 3. Academic Press. 103-144.
- Kubo, I. (1991). Screening Techniques for Plant-Insect Interactions. Methods in Plant Biochemistry. 6, 179-193.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L., Nichols D. E. y McLaughlin, J. (1982). Brine Shrim: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta médica*. 45. 31-34.
- Metcalf, C. L. y Flint, W. P. (1982). Insectos destructivos e insectos útiles. 4a. edición. Continental. México, D. F. 359-409.
- Miyakado, Nakayama y Ohno. (1989). Insecticidal Unsaturates isobutylamides. Insecticides of Plant Origin. Chapter 13, *Am. Chem. Soc.*
- Morris y Rockstein. (1978). Biochemistry of Insects. Academic Press. New York. 515-539.
- Morrison, Robert y Neilson, Robert. (1970). Química Orgánica Fondo Educativo Interamericano. México, D. F. 684-692, 730-735.
- Mundy, P.E. (1985). Name Reactions and Reagentes in Organic Synthesis. A Wiley-Interscience Publication. 120-121, 158-159.

- Mulla, M. S. (1964). Persistence of mosquito larvicides in water. *Mosquito News*. 23 (3), 234-7. Chemical Abstracts 60:2271f.
- Nakatani, N. y Inatani, R. (1981). Isobutyl Amides from Pepper (*Piper nigrum* L) *Agric. Biol. Chem.* 45(6), 1473-1476.
- Pine, Stanley., Hendrickson., James, Cram., Donald y Hammond,
George. (1984). *Química Orgánica*. 4a. edición. McGrawHill. México D. F. 62-64, 344-348.
- Reyes, Benito., Navarrete, Andrés., Sixtos, Carmen., Aguirre Estela, Jimenez, Sabino y Estrada, Erick. (1991) Constituyentes químicos de *Zanthoxylum liebmannianum* (encl) p. wilson "Coloapahtle", una planta medicinal Mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 21(5), 30-34.
- Rodriguez, H. C. (1986). Actividad tóxica de *Cestrum spp* (Solanaceae) en larvas del mosquito casero, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Tesis de maestría. Colegio de Posgraduados. Chapingo, México. 3-10.
- Service, M. W. (1986). Blood-Sucking Insects: Vectors of Disease. Edward Arnold. E.U.A. 1-29.
- Thorton, M.R. (1970). *Química Orgánica*. Fondo Educativo Interamericano, S.A. México, D.F. 684-686, 690-692.
- Wingrove, A. y Caret, R. (1984). *Química Orgánica*. Harla. México, D.F, 1984. pag. 108, 113-114, 1124.

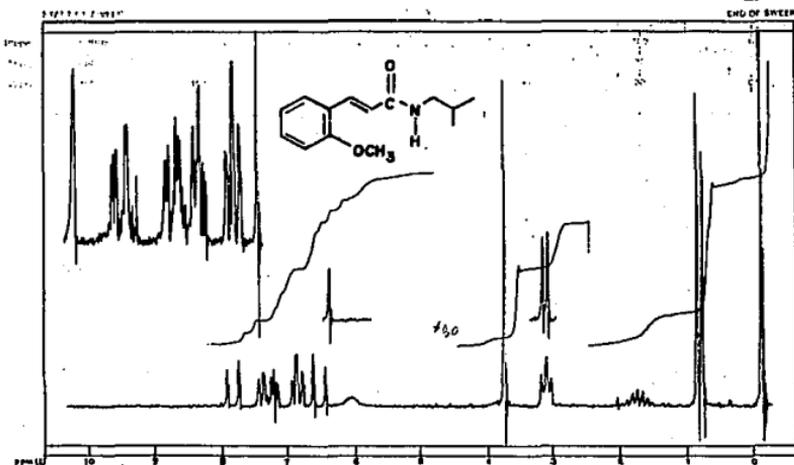
APENDICE

INDICE DE ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

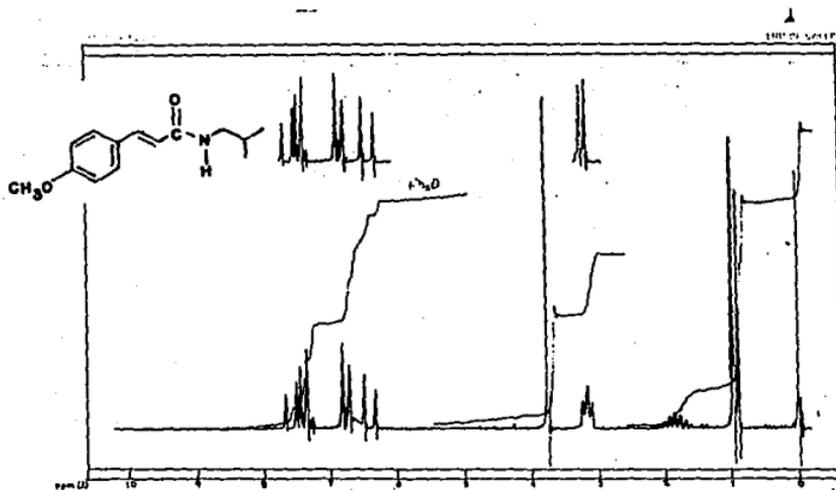
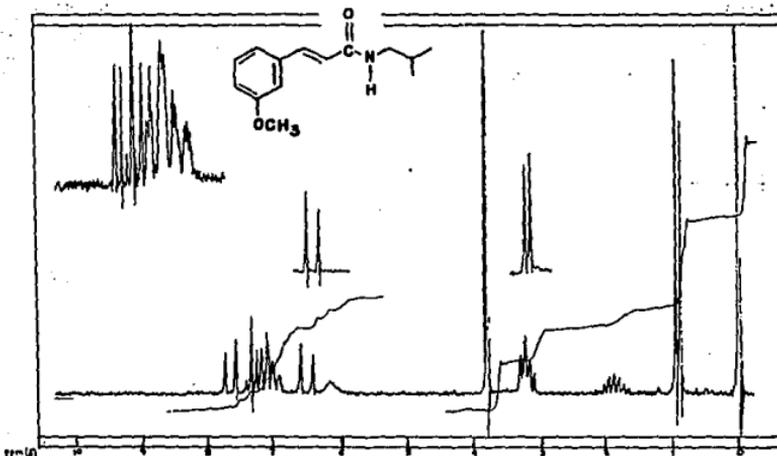
	Página
Espectro 1.	
N-isobutil-3-fenil-2(E)propenamida. -----	89
Espectro 2.	
N-isobutil-3-(2-metoxifenil)-2(E)propenamida. -----	89
Espectro 3.	
N-isobutil-3-(3-metoxifenil)-2(E)propenamida. -----	90
Espectro 4.	
N-isobutil-3-(4-metoxifenil)-2(E)propenamida. -----	90
Espectro 5.	
N-isobutil-3-(2,3-dimetoxifenil)-2-(E)propenamida. -----	91
Espectro 6.	
N-isobutil-3-(2,4-dimetoxifenil)-2-(E)propenamida. -----	91
Espectro 7.	
N-isobutil-3-(2,5-dimetoxifenil)-2-(E)propenamida. -----	92
Espectro 8.	
N-isobutil-3-(2,6-dimetoxifenil)-2-(E)propenamida. -----	92
Espectro 9.	
N-isobutil-3-(3,4-dimetoxifenil)-2-(E)propenamida. -----	93
Espectro 10.	
N-isobutil-3-(3,5-dimetoxifenil)-2-(E)propenamida. -----	93
Espectro 11.	
N-isobutil-3-(2,4,5-trimetoxifenil)-2-(E)propenamida. --	94
Espectro 12.	
N-isobutil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2-(E)propenamida. --	94

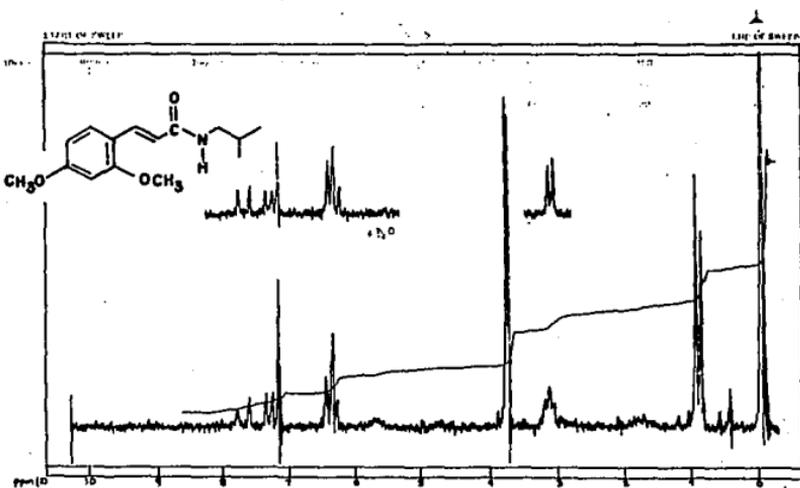
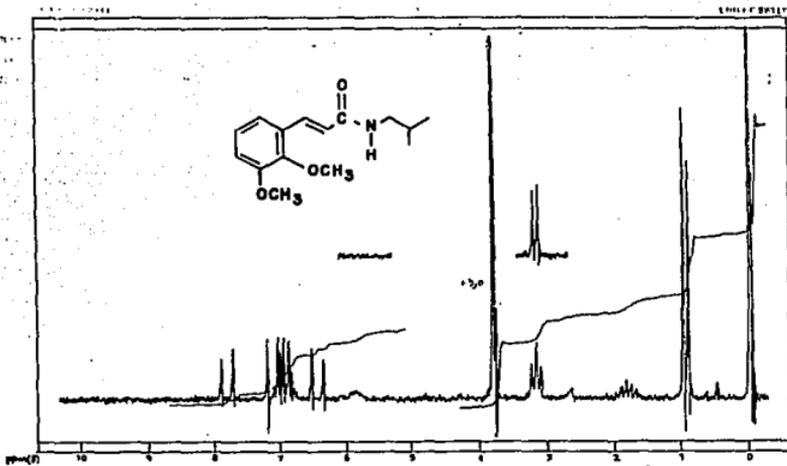


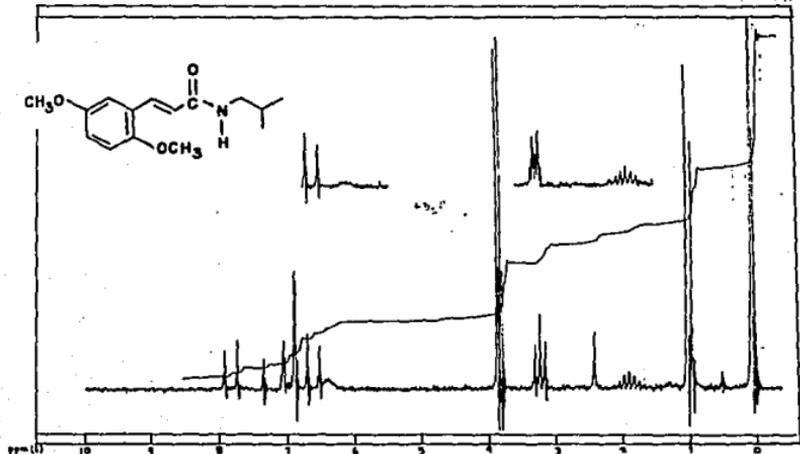
ESPECTRO 1. Espectro de RMN de N-isobutil-3-fenil-2(R)propenamida



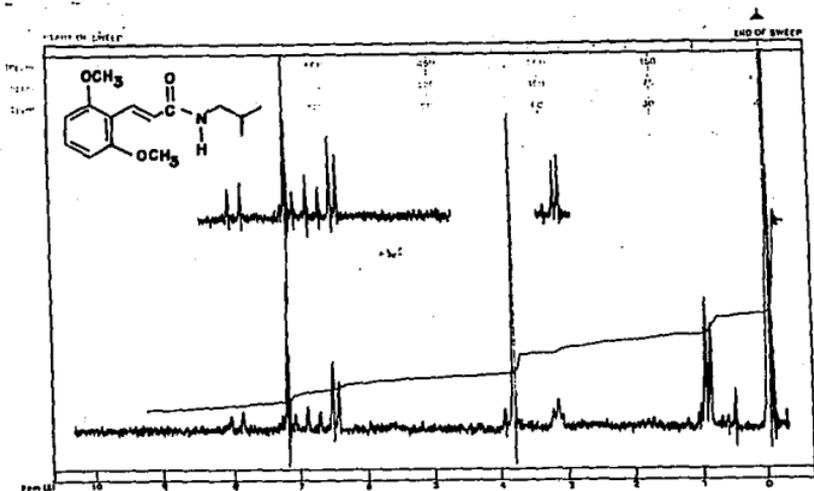
ESPECTRO 2. Espectro de RMN de N-isobutil-3-(2-metoxifenil)-2(R)propenamida



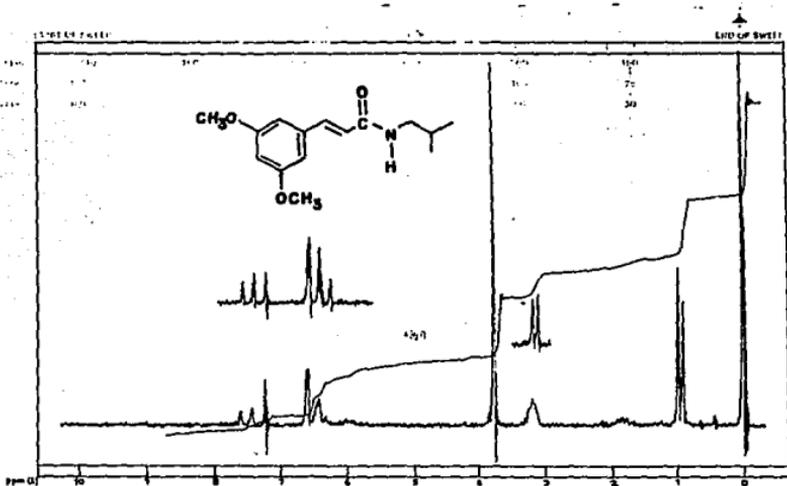
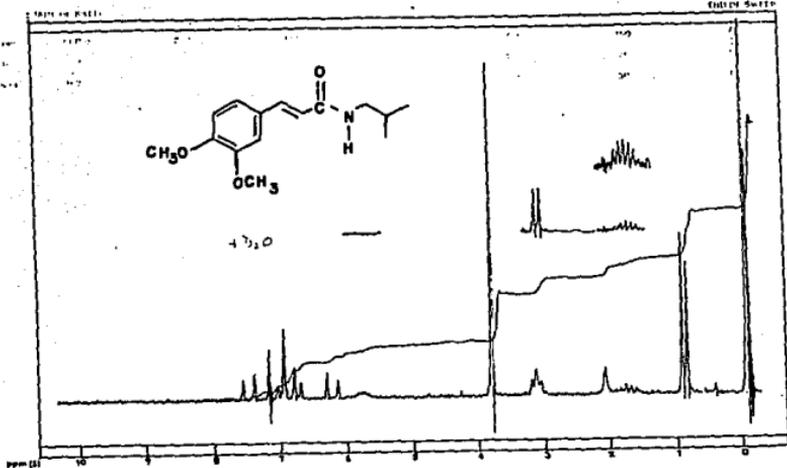


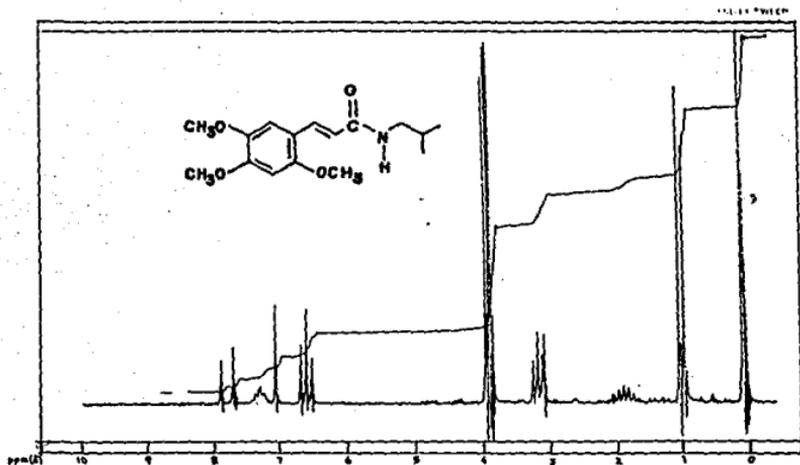


ESPECTRO 7. Espectro de RMN de N-isobutil-3-(2,5-dimetoxifenil)-2(E)propenamida

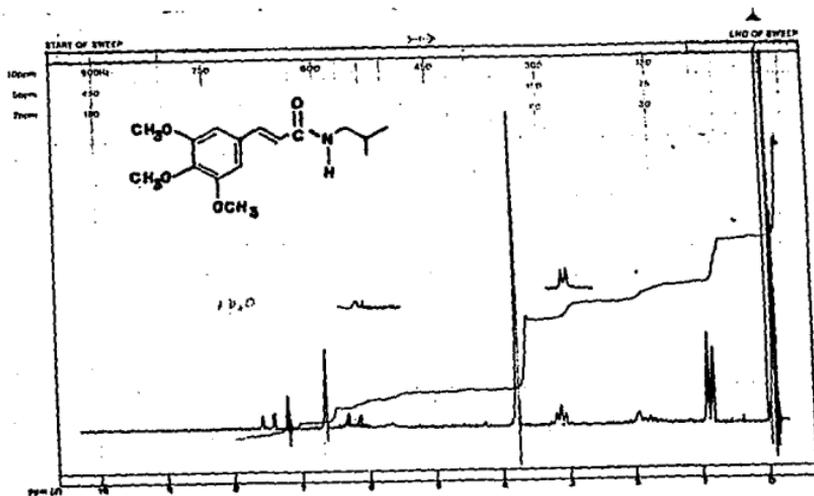


ESPECTRO 8. Espectro de RMN de N-isobutil-3-(2,6-dimetoxifenil)-2(E)propenamida





ESPECTRO 11. Espectro de RMN de N-isobutil-3-(2,4,5-trimetoxifenil)-2(E)propenasaída



ESPECTRO 12. Espectro de RMN de N-isobutil-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-2(E)propenasaída