



24

201

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

SINERGISMO DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA DEL  
α-SANSHOOL SOBRE *Culex quinquefasciatus* Y *Artemia*  
salina POR COMPUESTOS METILENODIOXIFENILOS.

FALLA DE ORIGEN

**T E S I S**

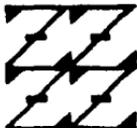
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

ALEJANDRO FLORES GALINDO

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



LO FUNDÓ EN  
SU ÚNICA DEPENDENCIA

MEXICO, D. F.

1995



## **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:**

<b>PRESIDENTE</b>	<b>BIOL.</b>	<b>MANUEL RICO BERNAL</b>
<b>VOCAL</b>	<b>M. en C.</b>	<b>ANDRES NAVARRETE CASTRO</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>M. en C.</b>	<b>BENITO REYES TREJO</b>
<b>SUPLENTE</b>	<b>Q. F. B.</b>	<b>ADELFO N. REYES RAMIREZ</b>
<b>SUPLENTE</b>	<b>Q. F. B.</b>	<b>ARTURO E. CANO FLORES</b>

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:**

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

**FES ZARAGOZA UNAM, MEXICO, D.F., 1995.**

**SUSTENTANTE: ALEJANDRO FLORES GALINDO.**

**DIRECTOR DEL TRABAJO: M. en C. ANDRES NAVARRETE CASTRO.**

## AGRADECIMIENTOS

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

SE AGRADECE AL M. EN C. BENITO REYES TREJO POR LA AYUDA BRINDADA PARA EL MEJOR DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO.

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

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

AGRADEZCO A DIOS POR PERMITIRME TERMINAR ESTE TRABAJO, QUE SIN SU AYUDA JAMAS LO HUBIERA LOGRADO.

## DEDICATORIAS

ESTE TRABAJO ESTA DEDICADO A:

MIS HERMANOS ALMA, MARIBEL, CLAUDIA Y MIGUEL A. QUE ME APOYARON DURANTE TODA LA CARRERA.

MIS PADRES POR BRINDARME LA OPORTUNIDAD DE ESTUDIAR Y SUPERARME Y QUE EN TODO MOMENTO ME DIERON SU APOYO.

MI ABUELITA Y A MI TIA ROSA MARIA.

ROSA MARIA RUIZ ALVAREZ POR SU APOYO.

MIS AMIGOS POR BRINDARME LA OPORTUNIDAD DE SU AMISTAD DURANTE LA CARRERA.

## INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	1
INDICE DE TABLAS.....	iii
INDICE DE ESQUEMAS.....	v
RESUMEN.....	vi
I. INTRODUCCION.....	1
II. FUNDAMENTO DEL TEMA.....	4
2.1. ENTOMOLOGIA MEDICA.....	4
2.1.1. ARTRÓPODOS COMO AGENTES DIRECTOS DE ENFERMEDADES O MOLESTIAS.....	4
2.2. CONTROL DE ARTRÓPODOS.....	8
2.2.1. BARRERAS QUIMICAS.....	8
2.2.2. INSECTICIDAS Y ACARICIDAS.....	7
2.2.2.1. Compuestos de origen vegetal.....	7
2.3. MODELOS DE ACTIVIDAD INSECTICIDA.....	8
2.3.1. MOSQUITOS ADULTOS Y LARVAS.....	9
2.3.2. METODOS DE MICROINYECCION.....	10
2.3.3. BIOENSAYO POR ALIMENTACION CON DIETA ARTIFICIAL.....	10
2.3.4. INHIBIDORES ALIMENTARIOS. Ensayo en disco.....	11
2.3.5. ENSAYO EN PAPEL FILTRO.....	11
2.4. MOSQUITOS (Culicidae).....	12
2.4.1. <i>Culex</i> .....	12
2.4.2. <u>Características de <i>Culex</i></u> <u><i>quinque fasciatus</i></u> .....	13
2.4.3. <u>Ciclo biológico</u> .....	15
2.4.4. LARVA DE MOSQUITO <i>Culex quinquefasciatus</i> COMO MODELO.....	17
2.5. <i>Artemia salina</i> .....	17

2.5.1. BIOENSAYO GENERAL. ( <i>Artemia salina</i> ).....	19
2.6. ISOBUTILAMIDAS.....	20
2.6.1. ESTRUCTURA GENERAL.....	20
2.6.2. PRESENCIA EN LA NATURALEZA.....	21
2.6.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS ISOBUTILAMIDAS.....	26
2.6.4. ACTIVIDAD INSECTICIDA.....	27
2.6.4.1. Relación estructura-actividad.....	27
2.6.4.2. Mecanismo de acción.....	28
2.7. GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>Zanthoxylum</i> .....	29
2.7.1. TAXONOMIA.....	29
2.7.2. DISTRIBUCION.....	30
2.7.3. FITOQUIMICA.....	30
2.7.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA QUE PRESENTA EL GÉNERO <i>Zanthoxylum</i> .....	32
2.8. ACCION COMBINADA DE COMPUESTOS.....	32
2.8.1. SINERGISMO.....	32
2.8.1.1. Sinérgicos de acción insecticida.....	34
III. JUSTIFICACION DEL TEMA.....	39
IV. OBJETIVOS.....	40
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	40
4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	40
V. HIPOTESIS.....	41
VI. MATERIAL.....	42
6.1. MATERIAL VEGETAL.....	42
6.2. MATERIAL PARA LAS EXTRACCIONES.....	42
6.2.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS.....	42
6.2.2. EQUIPO.....	42

6.2.3. MATERIAL DE VIDRIO.....	42
6.3. MATERIAL PARA LOS BIOENSAYOS.....	43
6.3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	43
6.3.2. MATERIAL DEL LABORATORIO.....	43
6.3.3. SUSTANCIAS.....	43
6.3.4. DISOLVENTES.....	43
6.3.5. EQUIPO.....	44
VII. METODOS.....	44
7.1. ESTABLECIMIENTO DEL CICLO BIOLÓGICO DE LA LARVA DE <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	44
7.2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA SOBRE <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	44
7.2.1. DETERMINACION DEL SINERGISMO.....	45
7.3. PRODUCCION DE <i>Artemia salina</i> .....	45
7.3.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA SOBRE <i>Artemia salina</i> .....	45
7.3.2. DETERMINACION DEL SINERGISMO.....	47
7.4. DETERMINACION DE LA CL <sub>50</sub> .....	47
7.4.1. Determinación de la CL <sub>50</sub> del $\alpha$ -sanshool sobre ratones.....	47
7.5. METODO DE EXTRACCION.....	49
7.5.1. EXTRACCION DEL MATERIAL VEGETAL.....	49
7.5.2. SEPARACION CROMATOGRÁFICA DEL $\alpha$ -sanshool .....	50
7.5.3. PURIFICACION DE LA SESAMINA Y ASARININA DEL <i>Zanthoxylum liebmannianum</i> .....	50
7.5.4. EXTRACCION DE LA PIPERINA.....	51
7.5.5. SINTESIS DE LA FAGARAMIDA.....	51
VIII. RESULTADOS.....	54
8.1. OBTENCION DE COMPUESTOS.....	54
8.2. DETERMINACION DEL SINERGISMO.....	54

8.3. DISCUSION DE RESULTADOS.....	77
8.3.1. DETERMINACION DEL SINERGISMO EN <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	77
A) EFECTO SINERGISTA DE LA SESAMINA.....	77
B) EFECTO SINERGISTA DE LA ASARININA.....	79
C) EFECTO SINERGISTA DE LA FAGARAMIDA.....	79
D) EFECTO SINERGISTA DE LA PIPERINA.....	82
8.3.2. DETERMINACION DEL SINERGISMO EN <i>Artemia salina</i> .....	84
A) EFECTO SINERGISTA DE LA SESAMINA.....	84
B) EFECTO SINERGISTA DE LA ASARININA.....	84
C) EFECTO SINERGISTA DE LA FAGARAMIDA.....	85
D) EFECTO SINERGISTA DE LA PIPERINA.....	85
IX. CONCLUSIONES.....	97
X. SUGERENCIAS.....	98
XI. BIBLIOGRAFIA.....	99
XII. APENDICE.....	107

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Mosquito común ( <i>Culex</i> ), en su fase de adulto....	13
FIGURA 2: Caracteres diferenciales de los tres principales generos de Culicidae.....	14
FIGURA 3: A) Fase larvaria y B) fase de pupa del mosquito común ( <i>Culex quinquefasciatus</i> ).....	15
FIGURA 4: <i>Artemia salina</i> , en su fase de adulto.....	18
FIGURA 5: Localización del municipio de Tehuacán Puebla.....	40
FIGURA 6: Curva concentración - Respuesta en <i>Culex quinquefasciatus</i> del $\alpha$ -sanshool solo y en presencia de varias concentraciones de sesamina. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la sesamina.....	78
FIGURA 7: Curva concentración - Respuesta en <i>Culex quinquefasciatus</i> del $\alpha$ -sanshool solo y en presencia de varias concentraciones de asarinina. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la asarinina.....	80
FIGURA 8: Curva concentración - Respuesta en <i>Culex quinquefasciatus</i> del $\alpha$ -sanshool solo y en presencia de varias concentraciones de fagaramida. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la fagaramida.....	81
FIGURA 9: Curva concentración - Respuesta en <i>Culex quinquefasciatus</i> del $\alpha$ -sanshool solo y en presencia de varias concentraciones de piperina. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la piperina.....	83
FIGURA 10: Curva concentración - Respuesta en <i>Artemia salina</i> del $\alpha$ -sanshool solo y en presencia de varias concentraciones de sesamina. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la sesamina.....	86
FIGURA 11: Curva concentración - Respuesta en <i>Artemia salina</i> del $\alpha$ -sanshool solo y en presencia de varias concentraciones de asarinina. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la asarinina.....	87

FIGURA 12: Curva concentración - Respuesta en *Artemia salina* del  $\alpha$ -sanshool solo y en presencia de varias concentraciones de fagaramida. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la fagaramida.....88

FIGURA 13: Curva concentración - Respuesta en *Artemia salina* del  $\alpha$ -sanshool solo y en presencia de varias concentraciones de piperina. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la piperina.....89

FIGURA 14: Comparación sinérgica de la potencia larvívica entre *Artemia salina* y *Culex quinquefasciatus* de la Sesamina y el  $\alpha$ -Sanshool.....90

FIGURA 15: Comparación sinérgica de la potencia larvívica entre *Artemia salina* y *Culex quinquefasciatus* de la Asarinina y el  $\alpha$ -Sanshool.....93

FIGURA 16: Comparación sinérgica de la potencia larvívica entre *Artemia salina* y *Culex quinquefasciatus* de la Fagaramida y el  $\alpha$ -Sanshool.....94

FIGURA 17: Comparación sinérgica de la potencia larvívica entre *Artemia salina* y *Culex quinquefasciatus* de la Piperina y el  $\alpha$ -Sanshool.....95

FIGURA 18: Curva dosis - respuesta del  $\alpha$ -sanshool administrado por vía intra peritoneal en ratones. Obteniéndose una DL<sub>50</sub> de 54.77 mg/Kg....96

LAMINA 1: Fotografía de *Zanthoxylum liebmannianum*.....29

## INDICE DE TABLAS

TABLA 1: METABOLITOS AISLADOS DEL GENERO <i>Zanthoxylum</i> .....	31
TABLA 2: ACTIVIDAD BIOLÓGICA QUE PRESENTA EL GENERO <i>Zanthoxylum</i> .....	33
TABLA 3: Valores de CLso (ppm) del $\alpha$ -sanshool solo y combinado con varias concentraciones de sesamina y los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	56
TABLA 4: Valores de CLso (ppm) del $\alpha$ -sanshool solo y combinado con varias concentraciones de asarinina y los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	57
TABLA 5: Valores de CLso (ppm) del $\alpha$ -sanshool solo y combinado con varias concentraciones de fagaramida y los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	58
TABLA 6: Valores de CLso (ppm) del $\alpha$ -sanshool solo y combinado con varias concentraciones de piperina y los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de <i>Culex quinquefasciatus</i> .....	59
TABLA 7: Número de veces que aumenta la potencia larvicida sobre <i>Culex quinquefasciatus</i> del $\alpha$ -sanshool al adicionarle la sesamina en las concentraciones indicadas.....	60
TABLA 8: Número de veces que aumenta la potencia larvicida sobre <i>Culex quinquefasciatus</i> del $\alpha$ -sanshool al adicionarle la asarinina en las concentraciones indicadas.....	61
TABLA 9: Número de veces que aumenta la potencia larvicida sobre <i>Culex quinquefasciatus</i> del $\alpha$ -sanshool al adicionarle la fagaramida en las concentraciones indicadas.....	62
TABLA 10: Número de veces que aumenta la potencia larvicida sobre <i>Culex quinquefasciatus</i> del $\alpha$ -sanshool al adicionarle la piperina en las concentraciones indicadas.....	63

TABLA 11: Valores de CL<sub>50</sub> (ppm) del  $\alpha$ -sanshool sólo y combinado con varias concentraciones de sesamina y los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de *Artemia salina*....64

TABLA 12: Valores de CL<sub>50</sub> (ppm) del  $\alpha$ -sanshool sólo y combinado con varias concentraciones de asarinina y los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de *Artemia salina*....65

TABLA 13: Valores de CL<sub>50</sub> (ppm) del  $\alpha$ -sanshool sólo y combinado con varias concentraciones de fagaramida y los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de *Artemia salina*....66

TABLA 14: Valores de CL<sub>50</sub> (ppm) del  $\alpha$ -sanshool sólo y combinado con varias concentraciones de piperina y los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de *Artemia salina*....67

TABLA 15: Número de veces que aumenta la potencia larvicida sobre *Artemia salina* del  $\alpha$ -sanshool al adicionarle la sesamina en las concentraciones indicadas.....68

TABLA 16: Número de veces que aumenta la potencia larvicida sobre *Artemia salina* del  $\alpha$ -sanshool al adicionarle la asarinina en las concentraciones indicadas.....69

TABLA 17: Número de veces que aumenta la potencia larvicida sobre *Artemia salina* del  $\alpha$ -sanshool al adicionarle la fagaramida en las concentraciones indicadas. ....70

TABLA 18: Número de veces que aumenta la potencia larvicida sobre *Artemia salina* del  $\alpha$ -sanshool al adicionarle la piperina en las concentraciones indicadas.....71

TABLA 19: Asignación de las señales en RMN para el  $\alpha$ -sanshool.....72

TABLA 20: Asignación de las señales en RMN para la sesamina.....73

TABLA 21: Asignación de las señales en RMN para la asarinina.....74

TABLA 22: Asignación de las señales en RMN para la fagaramida.....75

TABLA 23: Asignación de las señales en RMN para la piperina.....76

## INDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA ( <i>Culex quinquefasciatus</i> ).....	39
ESQUEMA 2. DETERMINACION DE LACTIVIDAD BIOLOGICA EN <i>Artemia salina</i> .....	41
ESQUEMA 3: ESQUEMA DE SINTESIS DE LA FAGARAMIDA.....	83

## RESUMEN

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

Un grupo de compuestos de origen natural que cobran importancia en el control de los insectos son las N-isobutilamidas de cadena lineal poliinsaturadas de 8 a 20 carbonos, uno de estos compuestos es el  $\alpha$ -Sanshool, que presenta buena actividad insecticida, sin embargo es poco estable lo que limita su uso.

En este trabajo se evaluó el efecto sinérgico de los compuestos metilendioxifenilos: sesamina, asarinina, piperina y fagaramida sobre el  $\alpha$ -Sanshool, aislado y caracterizado de la corteza de *Zanthoxylum liebmannianum* en larvas de *Culex quinquefasciatus* y *Artemia salina* es diferente.

El  $\alpha$ -Sanshool presentó una CL<sub>50</sub> de 3.97 en larvas de *Culex quinquefasciatus* y de 5.96 ppm en larvas de *Artemia salina*. Estos valores fueron potenciados por los compuestos metilendioxfenilos: Sesamina (53 veces), Asarinina (47 veces), Fagaramida (229 veces) y Piperina (98 veces) sobre larvas de mosco (*Culex quinquefasciatus*). En larvas de *Artemia salina* la actividad larvicida del  $\alpha$ -Sanshool fue aumentada 27 veces con Sesamina, 8 veces con Asarinina, 151 veces con fagaramida y 98 veces con Piperina.

Adicionalmente se encontró que el  $\alpha$ -Sanshool tiene una toxicidad relativamente baja en mamíferos, si se administra por vía oral, mientras que la administración intraperitoneal tiene una DL<sub>50</sub> de 54.77 mg/Kg en ratones.

## I. INTRODUCCION.

El control de los insectos es necesario desde varios puntos de vista, sobre todo en lo económico y en salud. En relación a esto último, los insectos son transmisores de diversas enfermedades y en algunos casos son los agentes causantes directos de enfermedades en el hombre y otros animales (Biagi, 1986).

Los primeros insecticidas utilizados por el hombre para el control de los insectos fueron obtenidos de las plantas, así Dioscartes menciona el uso del opium, colchicum, aconita, veratrum y otras plantas que fueron utilizadas como medicamentos y como insecticidas (McIndoo, 1945). Los romanos conocían bien la medicina y los insecticidas. Durante la antigüedad clásica del periodo medieval, algunas semillas de plantas fueron utilizadas como insecticidas (Klocke, 1989). Otros insecticidas y repelentes de insectos mencionados de plantas por los escritores clásicos incluyen el Ajenjo (*Artemisa absinthium*), Ballica (*Lolium multiflorum* Lam.), Cedra (*Cupressus lindleyi* Klotch), Ajo (*Allium sativum*), Higo (*Ficus lepathifolia*), Rable (*Tabebuia pentaphylla* L.), Granada (*Punica granatum*) (Smith and Secoy, 1975).

Hoy en día se conocen más de 2000 especies de plantas con alguna actividad insecticida (Crosby, 1966; Ahmed et al., 1984). Muchos de los cuales tienen una historia de uso como remedio medicinal en diferentes sociedades del mundo en donde también utilizan algunas plantas para matar o repeler a los insectos (Secoy and Smith, 1983).

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 mosquitos 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 *Helianthus helianthoides* entre otras. El aislamiento e identificación de los principios activos de las plantas es de gran importancia ya que apartir 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  $\alpha$ -sanshool, como el principio activo larvícida. El  $\alpha$ -sanshool es una N-isobutilamida de 12 átomos de carbono, que tiene actividad larvícida con una concentración letal 50 de 1.82 ppm ( Pineda, 1994 ).

La efectividad insecticida de ciertas sustancias (como las piretrinas e isobutilamidas) puede aumentarse por la adición de compuestos llamados Sinergistas o Adjuvantes, los cuales pueden o no ser insecticidas. Los sinergistas más importantes son: Piperonil, Butóxido, y otros relacionados a los compuestos Metilenedioxifenil o Benzodioxoles, como la Sesamina hallada en el aceite de *Sesamum indicatum*

L. (Klocke, 1989). La Sesamolina es otro sinergista de la Piretrina del *S. indicatum* (Beroza, 1954). Otros sinergistas aislados de plantas incluye la Miristicina como insecticida y sinergista aislada de *Pastinaca sativa* L. (Lichtenstein and Casida, 1963), y Affinina, como insecticida y sinergista del *Heltopsis longipes*. Son compuestos metilendioxfenilos que inhiben la función de la enzima oxidasa de función mixta, provocando con ello que haya intoxicación en el insecto (Miyakado, et al., 1984).

En este trabajo se evaluó el efecto sinergista de 4 compuestos metilendioxfenilos: Sesamina, Asarinina, Fagaramida y Piperina sobre la actividad del  $\alpha$ -Sanshool sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* y *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 *et al.*, 1987 ;Biagi, 1986).

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

#### 2.1.1. ARTRÓPODOS COMO AGENTES DIRECTOS DE ENFERMEDADES O MOLESTIAS.

Hay artrópodos que parasitan al hombre y le provocan enfermedades como la sarna y pediculosis. Otros causan cuadros alérgicos de importancia (ácaros domésticos) o inoculan venenos (arañas, escorpiones) (Biagi, 1986).

Algunos otros son totalmente inofensivos, causan frecuentemente molestias y repercusiones que pueden llevar a un desequilibrio nervioso, en ocasiones con alucinaciones sensoriales. Algunos causan molestias y pérdida de sangre, daño accidental a los órganos de los sentidos, envenenamiento por las sustancias químicas que secretan, Dermatitis por irritación en la piel, miasis e infestación asociadas, al igual que alergia y condiciones asociadas (Harwood et al., 1987).

Los artrópodos pueden transmitir algunas enfermedades como: La malaria, que tiene como vector al mosquito *Anopheles*. El patógeno pertenece a los Protozoa, las especies de mayor importancia son *Plasmodium falciparum*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. vivax*. El hombre es la principal víctima. Las filarias parásitas del humano transmitidas por mosquito son *Wuchereria bancrofti*, conocida únicamente para el hombre. Los huéspedes vertebrados de varias filarias transmitidas por mosquito, incluyen mamíferos carnívoros y herbívoros domésticos y silvestres, insectívoros, aves, monos, ranas y lagartijas. Un estudio en Ceilán indicó que *Culex pipiens quinquefasciatus*, transmite *W. bancrofti*; el cual es un mosquito de actividad diurna. Esta distribuida principalmente en los trópicos húmedos y alrededor del mediterráneo. Se han aislado alrededor de 90 virus de mosquitos en la naturaleza, la mayoría de éstos de la familia *Culicínæ*. Ejemplos de algunos virus: el virus de la encefalitis equina, virus de la fiebre amarilla, virus de la viruela aviar (en aves) y virus de la hepatitis B (Pumarola, 1980).

La mosca doméstica actúan como vector de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* patógenas transmiten diversas especies de *Shigella*, alrededor de 30 serotipos, que ocasionan frecuentemente disentería y diarrea principalmente en niños; Son vectores del bacilo de la fiebre tifoidea

especifica del hombre, *Salmonella typhi* y de varios serotipos patógenos de *Escherichia coli*. También pueden ser vectores en la transmisión de la bacteria del Cólera, *Vibrio cholerae*.

## 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 las siguientes:

### 2.2.1. BARRERAS QUIMICAS.

Son preparaciones que repelen a los artrópodos que atacan, cuando se aplican a los huéspedes vertebrados o a la ropa. Deben tener las siguientes características: a) altamente repelentes para los artrópodos hematófagos, pero no desagradables al ser humano; b) duraderos; c) no tóxicos o irritantes para la piel; d) no deben manchar. El compuesto deet (N,N-dietil-m-toluamida) es el ingrediente activo en muchos productos.

## 2.2.2. INSECTICIDAS Y ACARICIDAS.

Los insecticidas y acaricidas que se utilizan con frecuencia con características tóxicas agudas contra los artrópodos, tienen una toxicidad potencialmente peligrosa para el hombre y otros vertebrados. Debido a que los plaguicidas ponen en peligro una gran variedad de vida animal, se necesita que los fabricantes efectúen pruebas bastante elaboradas sobre toxicidad, mutagenicidad u oncogenicidad de los compuestos.

Se encuentran también los insecticidas de hidrocarburos clorados, compuestos organofosforados, carbamatos, además, de compuestos inorgánicos, aceites larvicidas con base de petróleo y los insecticidas sistémicos.

### 2.2.2.1. 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 (Diclorodifeniltricloro etano), el control se hizo a base de insecticidas sintéticos, como la aletrina y la resmetrina por mencionar algunos, 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 propició 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. ( Klocke, 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 ( $\beta$ -cissarona) 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 solo 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. (Klocke, 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 artrópodos y las características que tienen es que derriban a los insectos rápidamente. Las piretrinas tienen uso contra ectoparasitos y plagas domésticas (Klocke, 1989).

### 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 los 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 insecto 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 podría aprovechar y asociarlo 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*, *Panstrongylus megistus*

(los dos últimos vectores de la enfermedad de Chagas), entre otros.

### 2.3.2. METODO DE MICROINYECCION.

En 1973, Gilotra describe 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. BIOENSAYO POR ALIMENTACION CON DIETA ARTIFICIAL.

En este bioensayo se utiliza como disolvente metanol y acetona; casi todas las sustancias orgánicas son solubles en esos disolventes y además son fácilmente evaporados. Se manejan extractos de plantas en concentraciones de 0.1 a 1%. La muestra en solución es adicionada a  $\alpha$ -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 periodo 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 1 cm de la hoja de algodón. Estos discos (12 discos por recipiente) son colocados, en un círculo de papel filtro humedecido dentro de una caja de petri. Los discos son tratados en su superficie con 25  $\mu$ l de acetona ó con 1 a 100  $\mu$ g de una substancia disuelta con 25  $\mu$ l 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 este ensayo se emplea papel filtro Whatman No. 2, se aplica el insecticida problema y se pone en contacto con insectos por lo general adultos. Con este procedimiento se ha observado una baja toxicidad en comparación con otros métodos, ya que se presenta una adsorción en las fibras de celulosa. (Georghiou y Gidden, 1965)

## 2.4. MOSQUITOS (Culicidae).

Los Culicidos o mosquitos son dípteros de la familia Culicidae. Las larvas de todos los Culicidos son estrictamente acuáticas, lo que quiere decir que la oviposición debe llevarse a efecto en el agua; algunas especies tienen gran agudeza para seleccionar lugares de oviposición donde habrá de colectarse agua al llover. El periodo de desarrollo dura generalmente unas cuatro semanas, pero en algunos casos, el invierno es causa de que se acelere la metamorfosis y en 4 ó 5 días emerge el adulto ( Biagi, 1986 ).

Hay seis géneros de Culicidos, pero para la medicina los importantes son *Culex*, *Anopheles*, *Aedes* y *Haemagogus*.

### 2.4.1. *Culex*.

Todos los adultos tienen un escutelo trilobado con sedas en cada lóbulo pero con áreas desnudas entre los lóbulos ( figura 1). 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 )

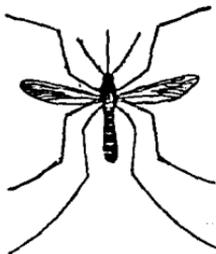


Figura 1: Mosquito común (*Culex*), en su fase de adulto.

Las especies *Culex pipiens* y *Culex 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 del verano; la etapa de huevecillo de 14 a 36 horas, la larva de 7 a 10 días y la de pupa aproximadamente 2 días.

#### 2.4.2. 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 (Figura 2). 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, 1993 ).

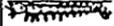
	ANOFELIDOS	CULICIDOS	
	ANOPHELES	AEDES	CULEX
HUEVOS			
LARVAS			
PIUPAS			
ADULTO HEMBRA			
POSICION DE DESCANSO			

Figura 2: Caracteres diferenciales de los tres principales géneros de Culicidae.

### 2.4.3. CICLO BIOLÓGICO DEL *Culex quinquefasciatus*.

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. Las larvas salen de los huevecillos después de un periodo de incubación 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 en el abdomen hay pelos laterales tanto dobles como sencillos, éste está 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 están redondeados hacia un solo 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 (Pineda, 1993).

Cuando las larvas han alcanzado su madurez (de 7 a 10 días), dejan de alimentarse y después de un periodo 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 sencibles a agentes externos por lo que se dirigen repentinamente hacia aguas más profundas con movimientos circulares para después regresar a la superficie con pocos movimientos (Figura 3).

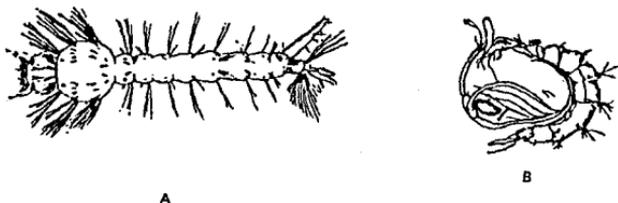


Figura 3: A) Fase larvaria y B) fase de pupa del mosquito común (*Culex quinquefasciatus*).

Su aparato respiratorio esta constituido por un par de traqueobranquias en forma de trompetas o sifones largos y delgados, situados dorsalmte en el cefalotorax, con los cuales rompen la pelicula superficial. Después de un periodo 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 *et al.*, 1993)

#### 2.4.4. 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.

En este bioensayo se prepararon una serie de diluciones en acetona que van de 1000 ppm hasta 0.0001 ppm de la muestra a analizar. Se colocan 10 larvas de mosco en el cuarto instar en vasos desechables, se adiciona 0.1 ml de las diluciones, cada dilución se realiza por triplicado y se añoran a 10 ml con agua de la llave. Después de 24 horas se cuentan las larvas muertas y se calcula la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>), (Pineda, 1994).

#### 2.5. *Artemia salina*.

Son de cuerpo ligero, con una característica que es la ausencia de caparazón, desarrollan una clara segmentación y son evidentes tres regiones : Cabeza, Torax y Abdomen (Figura 4).

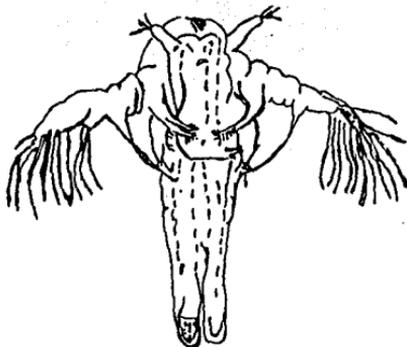


Figura 4: *Artemia salina*, en su face de adulto.

La *Artemia* madura mide entre 10-12 mm de largo, pero estas dimensiones dependen de la especie y del medio que las rodea, además de que son afectadas grandemente por la temperatura. La *Artemia* es grande aunque la velocidad de crecimiento es lento debido a las condiciones del medio y en comparación a la forma bisexual ( Gilchrist, 1960; Amat, 1979 ). El color es usualmente un rojo claro en agua con poco oxígeno, pero en medio con oxigenación tienden a tener un color rojo palido para hembras y un rosa palido para machos.

La cabeza del adulto es larga y posee una barba y ojos prominentes. Un notable dimorfismo sexual se desarrolla en esta área, con antenas en el macho que tienden a alargarse en forma de una serie de ganchos con los cuales se agarran a la hembra durante la copulación.

El tórax contiene 11 segmentos cada uno de los cuales sirve como locomoción, alimentación y de respiración, 8 segmentos componen el abdomen, la transmisión entre el tórax y el abdomen es muy clara, los primeros dos segmentos abdominales contienen al útero en las hembras y en los machos la vesícula seminal y una pareja de penes.

*Artemia* es el nombre de el Anostracan crustaceans (comunmente es llamado camarón hada), perteneciendo a la subclase *Branchiopoda* ( los Filópodos). Esta *Artemia* es también comunmente llamada camarón salmuera y su referencia antigua en la literatura es debido a Schlosser (1956) quien notifico el acontecimiento de un curioso animal en " BAL de CAZO" cerca de Lymington, Inglaterra. Después en 1958, Linneus introduce este animal en su sistema natural con el nombre de *Cancer salinus*.

En la *Artemia* han sido observados dos formas de reproducción bisexual y la Partenogenesis pero estas dos formas al parecer han sido exclusivas de este grupo.

## 2.5.1. BIOENSAYO GENERAL, (*Artemia salina*).

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

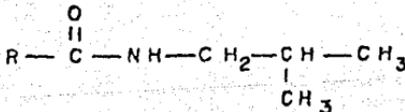
Los huevecillos de *Artemia salina* son fácilmente obtenidos, permanecen viables por años en lugares secos. Los huevecillos son colocados en agua de mar artificial, se incuban por 48 horas, se cubren y se les coloca una lámpara de luz. Después de este tiempo las larvas emergen y están listas para ser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

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

## 2.6. ISOBUTILAMIDAS.

### 2.6.1. ESTRUCTURA GENERAL.

Las isobutilamidas son compuestos con la siguiente estructura química:

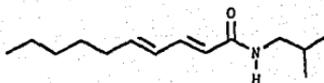


En donde R puede ser una cadena poliinsaturada de 8 a 20 átomos de carbono con o sin anillo aromático.

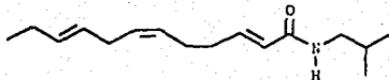
## 2.6.2. PRESENCIA EN LA NATURALEZA.

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

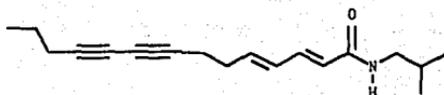
Se han encontrado isobutilamidas alifáticas y aromáticas. De las alifáticas la primera estructura identificada fué la decadienamida pellitorina (a); después se aislaron e identificaron otras dos más, la neoherculina (b) y anaciclina (c). (Blade, 1970)



(a) pellitorina

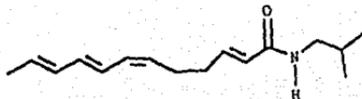


(b) Neoherculina



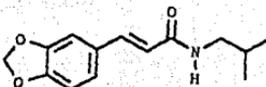
(c) Anaciclina.

De la corteza y el 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  $\alpha$ -sanshool (d).



d)  $\alpha$ -sanshool

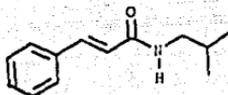
En cuanto a las isobutilamidas aromáticas, se han aislado 36 amidas de la raíz de *Piper amalago*. (Nakatani *et al.*, 1981). Esta planta es conocida en la India y América Central por ser un remedio eficaz en malestares estomacales. Algunas de estas amidas son: Fagaramida (e), Piperlongumina (f), N-isobutilcinamamida (g) y N-isobutil-3,4-dimetoxicinamamida (h) (Pineda, 1974).



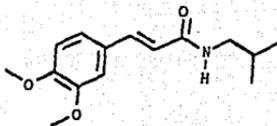
(e) Fagaramida.



(f) Piperlongumina

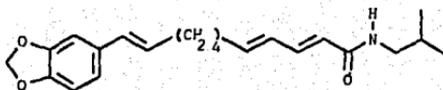


(g) N-isobutylcinamamida.

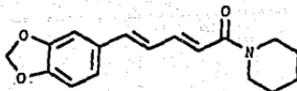


(h) N-isobutil-3,4-dimetoxicinamamida

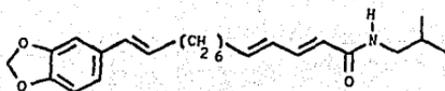
El grupo de Miyakado (Miyakado, et al., 1989) aisló isobutilamidas aromáticas de la planta *Piper nigrum*, tales como (i) Piperacida, (j) Piperina y (k) Guineensina.



(i) Piperacida



(j) Piperina



(k) N-isobutil-13-(3,4-metilendioxiifenil)-2E,4E-tridecatrinamida. Guineensina.

### 2.6.3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS ISOBUTILAMIDAS.

Las isobutilamidas presentan una gama amplia de actividades biológicas como antibacterianos, piscicidas, molusquicidas, antiinflamatorios, antitusivos, anestésicos locales, insecticidas, larvicidas, inhibidores de la germinación y antialimentarios en insectos fitófagos, entre otras. (Pineda, 1994).

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 sustancias. 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 impuro por Berber, que lo designó como "Espilantol". Este material se ha reportado efectivo contra la larva de mosquito *Anopheles* y *Culex*. Jacobson, encontró que el espilantol es idéntico a la Afinina. La cual fué obtenida originalmente de la raíz de *Heliopsis 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 neumonía. La Afinina, tiene actividad biológica contra el caracol de agua dulce *Physa occidentalis*. (Haral, 1984)

Se ha encontrado que varias especies del género *Zanthoxylum* poseen actividad insecticida. El material activo esta acumulado en la corteza del tallo, en la raíz y en su fruto. Por otro lado, la corteza de *Z. piperitum* ha sido empleada como antihelmintico. La Neoherculina fue aislada de la corteza de *Z. clavaherulis*, componente altamente insecticida. La Neoherculina se encontró que era idéntica al  $\alpha$ -sanshool aislado de *Z. piperitum*. (Crombie y Fisher, 1985).

Dos isobutilamidas de 18 carbonos (escabrina, y heliopsina) fueron aisladas de *Heliopsis helianthoides*, los cuales poseen actividad insecticida considerable. Ha sido descrito que una pizca de escabrina en la lengua provoca una parálisis y una quemadura, efecto que dura cerca de dos horas (Haral, 1984).

## 2.6.4. ACTIVIDAD INSECTICIDA.

### 2.6.4.1. Relación estructura-actividad.

Los estudios de la relación estructura actividad insecticida de las N-isobutilamidas fueron iniciados en 1985 por Michael Elliott, quien 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 (Elliott, et al., 1987).

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 fue encontrada solamente en isobutilamidas que presentan

conjugación del doble enlace con el grupo carbonílico de la amida. Ha sido reportado por estudios que en el sistema decadienisobutilamida la configuración 2E,4E es diez veces más activa que la 2E,4Z contra la mosca doméstica. (Haral, 1984).

Otra parte de los estudios de M. Elliott (1987), se enfocó en 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) amida 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 .

#### 2.6.4.2. 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 (Blade, 1990).

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).

## 2.7. GENERALIDADES DEL GENERO *Zanthoxylum*

### 2.8.1. TAXONOMIA.

El género *Zanthoxylum* comprende alrededor de 900 especies. Este género pertenece a la familia de las Rutaceas, la cual está relacionada con cuatro familias; Rutoidae, Todaloidae, Rhabdoideae y Aurenuloideae (Heywood, 1979).

Las especies del género *Zanthoxylum* más comunes son las siguientes: *Z. arborescens*, *Z. fagara*, *Z. limoncello* y *Z. caribeum* (Heywood, 1979).

Una descripción general de *Zanthoxylum* la hace Maximino Martínez como sigue:

Hay variedad en la forma en que se presenta este género, se puede encontrar como arbusto ó como árbol, el arbusto llega a tener hasta 3m., el árbol va desde 3-4.5m. Los arbustos presentan espinas; Hojas imparipidas, algunos con flores pequeñas y frutos foliculados (Martínez, 1969).

La descripción encontrada en la literatura para *Z. Liebmannianum* señala las siguientes características (Stanley, 1920).

Es un arbusto o árbol pequeño de 3-4.5 m. de altura, y es con espinas esparcidas, folíolos de 1.3 cm. de largo, verde amarillento y granulados, con dientes muy pequeños, semillas negras lustrosas brillantes, originalmente fue descrita de Sn. Juan municipio del estado de Oaxaca. (Stanley, 1920).

### 2.7.2. DISTRIBUCION.

El género *Zanthoxylum* se encuentra ampliamente distribuido, al sur de América; en E.U.A., Africa y Australia ( Heywood, 1979 ).

En México se localiza al norte y centro de la república hasta llegar al sur de Oaxaca, en Michoacan, Hidalgo, Puebla y Chiapas ( Stanley, 1920 ).

### 2.7.3. FITOQUIMICA.

Del género *Zanthoxylum* se tienen muchos antecedentes fitoquímicos, en los que se describen una gran variedad de metabolitos secundarios tales como: alcaloides, esteroides, lignanos, amidas ácidas insaturadas, fenilpropanoides, monoterpenos, triterpenos y sesquiterpenos. En la Tabla 1 se muestran algunos compuestos aislados de este género, la fuente natural de donde provienen, el tipo de metabolito secundario y además la referencia correspondiente. Por otro lado la corteza del Colopahtle ( *Z. Liebmannianum* ), se tiene un reporte previo donde se aislaron; un lignano (Sesamina), un esteroide ( $\beta$ -sitosterol), un sesquiterpene (1- $\beta$  hidroxijunennol) y una isobutilamida ( $\alpha$ -banshool) ( Reyes et al., 1987 ).

TABLA 1: METABOLITOS AISLADOS DEL GENERO Zanthoxylum

FUENTE NATURAL				
TIPO DE METABOLITOS	COMPUESTO	ESPECIE	REFERENCIA	
TRITERPENOS	Lupeol	<u>parvifolium</u>	Waterman, (1975).	
		<u>rubescens</u>	Waterman, (1975).	
LIGNANOS	Podotoxina	<u>scanthopodium</u>	Checrabarty, (1979).	
		<u>diklangai</u>	Waterman, (1975).	
	Sesamina	<u>liebmannianum</u>	Navarrete, Reyes, (1987).	
		<u>rubescens</u>	Waterman, (1976).	
	Asarinina	<u>clava-herculis</u>	Rao, Davies, (1986).	
		<u>clava-herculis</u>	Rao, Davies, (1986).	
		<u>scanthopodium</u>	Ren, Xia, (1986).	
	AMIDAS INSATURADAS	Eudesmina	<u>oulantrillo</u>	Swinehart, Stermitz, (1980).
		$\gamma$ -Sanshool	<u>ailanthoides</u>	Jacobus, (1982).
		Hidroxi- $\gamma$ -sanshool	<u>ailanthoides</u>	Jacobus, (1982).
$\alpha$ -Sanshool		<u>liebmannianum</u>	Navarrete, Reyes, (1987).	
Hidroxi- $\gamma$ -sanshool		<u>berberum</u>	Berhaid, (1978).	
		<u>integrifolium</u>	Jacobus, (1982).	
$\alpha$ -Sanshool		<u>ailanthoides</u>	Ichiro Y, (1981).	
$\beta$ -Sanshool	<u>ailanthoides</u>	Ichiro Y, (1981).		
SESQUITERPENOS	Fagaramida	<u>tessmannii</u>	Adesina, (1986).	
	D-spathuleno]	<u>leprieurii</u>	Ekundayo, (1986).	
	Cariofileno	<u>leprieurii</u>	Ekundayo, (1986).	
	Farneseno	<u>Rigidifilium</u>	Reisch, (1986).	
	Cadinano	<u>leprieurii</u>	Ekundayo, (1986).	
	D-ladol	<u>leprieurii</u>	Ekundayo, (1986).	
ALCALOIDES	N-metilooridina	<u>punctatum</u>	Hegnayer, (1973).	
	Flindersina	<u>ooco</u>	Munos, (1982).	
	8-Metoxiflindersina	<u>monophyllum</u>	Fish, (1975).	
	Hordenina	<u>oulantrillo</u>	Caolo, Anderson, (1979).	
	Zanthophilina	<u>monophyllum</u>	Hegnayer, (1973).	
	Candicina	<u>fagara</u>	Kuck, Sem, M, (1967).	
	Sinefrina	<u>fagara</u>	Kuck, Sem, M, (1967).	
	Chelerytrina	<u>coriaceum</u>	Swinehart, Stermitz, (1980).	
		<u>williamsii</u>	Takahashi, Nakayama, (1966).	
	Nitidina	<u>monophyllum</u>	Hegnayer, (1973).	
	Alfilerasina	<u>coriaceum</u>	Swinehart, Stermitz, (1980).	
	Fagaranina	<u>monophyllum</u>	Fish, (1975).	
		<u>senegalense</u>	Pezzuto, John, (1982).	
	Culantraminina	<u>procerum</u>	Schoender, (1968). <sup>1</sup>	
Decarina	<u>thomense</u>	Simeray, (1985).		
Integrinamina	<u>integrifolium</u>	Hisashi, (1985).		
Berberina	<u>caribeum</u>	Casas, D, (1967).		

#### 2.7.4. ACTIVIDAD BIOLÓGICA QUE PRESENTA EL GÉNERO *Zanthoxylum*.

El género *Zanthoxylum* presenta actividad biológica en hojas y corteza. En la tabla 2, se muestran algunos de los usos terapéuticos que este género presenta.

#### 2.8. ACCIÓN COMBINADA DE COMPUESTOS.

Cuando el efecto combinado de dos compuestos es igual a la suma algebraica de las acciones individuales se le denomina efecto aditivo. En realidad una forma más adecuada para considerar esta actividad es en términos de dosis y no de efectos. Si una cierta dosis del compuesto A y una cierta dosis del compuesto B producen cuantitativamente el mismo efecto ( es decir, son equiefectivas), se considera que los compuestos son aditivos si la mitad de cada una de estas dosis administradas simultáneamente provocan el mismo efecto que la dosis completa de cualquiera de los compuestos . El sinergismo se define de distinto modo, si bien más precisamente indica un efecto mayor que el aditivo, para algunos implica aditividad. Otros especialistas reservan el termino para aquellos casos en que un compuesto incrementa la potencia de otro interfiriendo con su destrucción o disposición, aumentando así el efecto de una dosis dada. Sin embargo, potenciación es un termino más adecuado para este último caso en el cual un compuesto que aparentemente no tiene ninguna acción cuando se administra solo, aumenta la potencia de un segundo compuesto ( Goth, 1990 ).

**TABLA 2: ACTIVIDAD BIOLÓGICA QUE PRESENTA EL GÉNERO  
Zanthoxylum**

<u>ESPECIE</u>	<u>USO</u>	<u>REFERENCIA</u>
<u>Zanthoxylum</u> <u>liebmannianum</u>	Se han sometido extractos a ensayos para evaluar su efecto anestésico. Estudio que determino la actividad enzimática de <i>Entamoeba histolytica</i> se encontró que esta especie tiene actividad sobre dos enzimas, hexosaminasa y fosfoglucomutasa en la ameba. La dodecatrietanolamida aislada de corteza de <i>Colopatria</i> posee efecto insecticida en larvas de mosco doméstico. La corteza misma se ha usado como anestésico local.	Ramirez y Montesinos, (1985). Tamayo, (1985).  Navarrete, (1986).
<u>Zanthoxylum</u> <u>zanthoxyloide</u>	Se ha reportado que en las raíces existen compuestos con actividad punyente.	Ishire Vezuda, (1986).
<u>Zanthoxylum</u> <u>retulosum</u>	Repelente de insectos.	Adewole, (1985).
<u>Zanthoxylum</u> <u>fasara</u>	Del extracto de raíces, se encontró propiedades antimicrobianas. Además devuelve el color al agar sangre.	Sofowora, (1974).
<u>Zanthoxylum</u> <u>auconae</u>	En Hong Kong, lo usan como desinflamatorio de la garganta y para la ictericia.	Francisco, Fish, (1975).
<u>Zanthoxylum</u> <u>caribaeum</u>	Astringente, dolor de cabeza, epustico, diarrea, entumecimiento de labios y lengua, provoca inflamaciones, para tratar la lepra, reumatismo, dolor, sarna, vulnerario.	Del Amo, (1981).
<u>Zanthoxylum</u> <u>pirota</u>	Anticoagulantes, antipireticos, eripisela, resfriado, tónico.	Del Amo, (1981).
<u>Z. Ravense</u> , <u>Z. dipetalum</u> y <u>Z. hawaiiense</u>	Se usan como insecticidas; tienen componentes volátiles con poder insecticida.	Harr and Tang, (1992).
<u>Zanthoxylum</u> <u>olava-herculis l.</u>	Se usa como insecticida.	Laforge, (1942).

## 2.8.1. SINERGISMO.

### 2.8.1.1. Sinérgicos de acción insecticida.

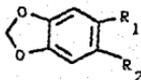
El efecto denominado sinérgico, no tiene una definición exacta y aceptada de modo unánime por todos los autores. A fin de no incurrir en errores de terminología se definirá por sinérgico y por potenciación lo siguiente:

Cuando se mezclan dos productos A y B de los que uno al menos es insecticida, pueden ocurrir tres posibilidades: que la eficacia de la mezcla puede ser mayor, menor o igual que las sumas de las eficacias individuales. Si hay aumento de eficacia y el segundo producto es inactivo como insecticida el fenómeno se conoce como sinérgico. Pero si hay aumento de eficacia debido a la adición de un producto que es también insecticida, es preferible denominar a este fenómeno potenciación. Si hay disminución de eficacia, entonces y en cualquier caso se denomina como antagonismo (Barberá, 1976).

Así pues, siguiendo esta definición, para que una sustancia pueda ser denominada sinérgica es preciso que no posea actividad insecticida *per se*, pero que, en cambio, aumente la eficacia de un producto insecticida.

Los sinérgicos han sido muy empleados unidos a piretrinas naturales o sintéticas, y al DDT y otros productos. Quizás en un futuro próximo puedan desarrollarse combinaciones sinérgicas con insecticidas agrícolas destinadas a resolver problemas determinados.

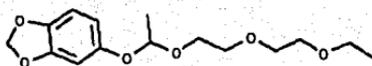
Desde el punto de vista químico los sinérgicos más empleados pertenecen en gran parte a derivados de metilendioxifenilos, a los que corresponde la estructura general:



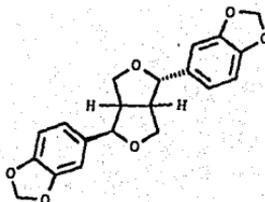
Siendo R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> sustituyentes independientes, o unidos, o de carácter complejo. A este extenso grupo pertenecen Sesamex (1), Sesamina (2), Safroxan, Sulfóxido (3) y otros más.

Esta clase de derivados metilendioxfenil presentan una marcada actividad sinérgica sobre piretrinas, carbamatos, fosfóricos y derivados clorados; así, el butóxido de piperonilo, tan empleado como sinérgico de piretrinas, también sinergiza al Carbaril, Isolan, Malatión, DDT y Metoxicloro con factores de sinergia de 3 a 20 veces sobre moscas resistentes a dichos insecticidas. Uno de los sinérgicos más estudiados sobre varios insecticidas es el sesamex, cuyo efecto de sinergismo en Azodrin, Paratión, EPN y análogos está comprobado ( Barberá, 1976 ).

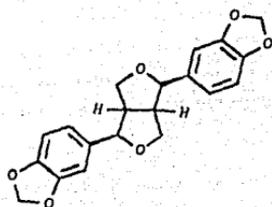
Una preparación de Asarinina al igual que la Sesamina incrementa el efecto insecticida de las soluciones de Pyretrum, la observación se hizo con extractos de éter de petróleo de la corteza de *Zanthoxylum clava-herculis* L. ( Haller, et al., 1942 ).



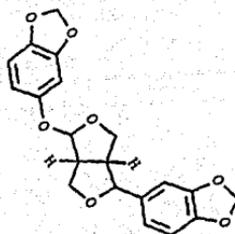
Sesamox(1)



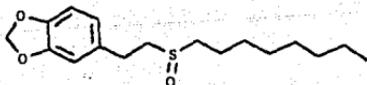
Asarinina(4)



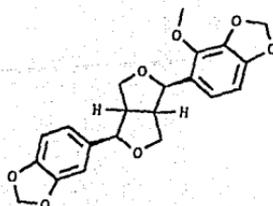
Sesamina(2)



Sesamolina(5)



Sulfoxido(3)



Sesangolina(6)

Un segundo grupo de sinérgicos está formado por una serie de compuestos distintos y no incluidos en los metilendioxfenilados. A ellos pertenece el Anti-resistant DDT, cuya aplicación repetida conduce al desarrollo de resistencia. Su modo de acción es por inhibición del DDT deshidroclorasa. Otros sinérgicos son el S-150 de montecatini, el Octacide, el SKF-525 A, cuya acción sinérgica se extiende a Phorate, Emiton, EPN, pero es antagonista de Azinfos, Dimetoato, Schradan, Dimefox, Mipafox, etc., demostrándose así, que la acción de cada sinérgico debe ser estudiada de acuerdo con el insecticida al que sinérgiza, ( Barberá, 1976 ).

Un número de isobutilamidas, N-(2-metilpropil)amida de ácidos alifáticos poliinsaturados de cadena larga de C<sub>8</sub> a C<sub>20</sub>, han sido extraídos de plantas de las familias *Asteraceae*, *Piperaceae* y *Rutaceae* ( Jacobson ,1971; Su,1985). Al menos 28 de estos compuestos aislados de varias especies como *Heliopsis*, *Echinacea*, *Zanthoxylum*, *Anacyclus*, *Spilanthes*, *Fagara* y *Piper* poseen actividad insecticida (Elliott, 1985; Su, 1985). Por ejemplo, la Pellitorina la más ampliamente utilizada de las isobutilamidas conocidas, siendo activa en un número de especies de insectos (Kubo *et al.*, 1984; Su, 1985). Otro ejemplo de isobutilamida insecticida incluye a la Affininina (o espilanthol), que es una de las isobutilamidas más estables de origen vegetal (Jacobson, 1971; 1983; Su, 1985 ).

La efectividad insecticida de las isobutilamidas puede ser aumentada por la acción de compuestos llamados sinérgicos, los cuales pueden o no ser insecticidas. El más importante sinérgico sintético es el Butóxido de piperonilo y otros relacionados a los metilendioxfenilos o compuestos benzodioxoles, que se desarrollan en plantas prototipo. ( Klocke, 1989 ).

Otros sinergistas de origen natural incluyen a la Miristicina un insecticida y sinergista de *Psittacus salicun* L. ( Lichtenstein and Casida, 1963 ) y Affinina un insecticida y sinergista de *Melipotis longipes* A. (Windholz, et al., 1983). Este compuesto inhibe la función mixta de la unión enzima oxidasa.

La indicación inicial de que los compuestos metilendioxfenilos ejercen una inhibición del metabolismo oxidativo fue propuesto por Sun y Johnson (1960) y después revisado por Casida (1973), Hewlett (1968) y Wilkinson (1971). Los compuestos metilendioxfenilos actúan sobre el sistema enzimático de la oxidasa de función múltiple del citocromo P450 (Wilkinson, 1976). Este sistema enzimático ha sido demostrado en 17 especies de insectos (Hodgson y Philpot, 1974).

Hennessy (1965), Mansch (1968) y Ullrich y Schnabel (1973) proponen que los compuestos metilendioxfenilos forman iones carboxilos, radicales libres o carbaniones, los cuales interactúan con algún componente del sistema oxidasa de función mixta, lo que indica que la inhibición es no competitiva, formándose un complejo entre el citocromo P450 y los compuestos metilendioxfenilos (Wilkinson, 1976), lo que trae como consecuencia la intoxicación en el insecto debido a que se encuentra bloqueado el sistema enzimático que facilita la eliminación de metabolitos tóxicos del insecticida (Wilkinson, 1976).

### III. JUSTIFICACION DEL TEMA.

Se han encontrado que diversas plantas tienen principios activos contra insectos, como las especies del género *Zanthoxylum*, la flor de *Spilanthes oleracea*, *Crisanthemum cinerariaefolium* y *Helioopsis helianthoides* entre otras. El aislamiento, identificación y uso de los principios activos de las plantas es de gran importancia ya que por un lado se puede aprovechar su actividad insecticida y por otro son fácilmente biodegradables y no tóxicos para el hombre o los animales ( Harai, 1984; Kubo, 1991 ).

La actividad insecticida de ciertos compuestos como las Piretrinas e isobutilamidas pueden aumentarse por la adición de algún sinergista de los cuales, los más importantes son el Piperonil butóxido y otros compuestos metilendioxfenilos, como la Sesamina, la Sesamolina y algunos otros productos naturales como la Miristicina aislada de *Pectinaca sativa* y la Affinina aislada del *Helioopsis longipes* (Klocke, 1989).

De la corteza de *Zanthoxylum Liebmannianum* se identificó al  $\alpha$ -sanshool, una N-isobutilamida de 12 átomos de carbono, como el principio larvicida, (Reyes et al., 1991).

La actividad larvicida del  $\alpha$ -sanshool es moderada (CL50 1.82 ppm ) esta actividad es factible de aumentarla por la adición de compuestos metilendioxfenilos, estudio que hasta donde se sabe no se había realizado.

Por lo que en este trabajo se enfocó en la comprobación que el poder larvicida que posee el  $\alpha$ -Sanshool se aumenta por la adición de los compuestos metilendioxfenilos, Sesamina (2), Asarinina (4), Fagaramida (e) y Piperina (j) ( Hansch, 1968 ).

#### IV. OBJETIVOS.

##### 4.1. OBJETIVO GENERAL.

Realizar el estudio de sinergismo de los compuestos metilendioxfenilos, Sesamina, Asarinina, Piperina y Fagaramida, sobre la actividad larvica del  $\alpha$ -sanshool en *Culex quinquefasciatus* y *Artemia salina*.

##### 4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

4.2.1. Colecta de la corteza de *Zanthoxylum liebmannianum*.

4.2.2. Aislar de la corteza del *Zanthoxylum liebmannianum* la sesamina, la asarinina y el  $\alpha$ -sanshool.

4.2.3. Aislar de la pimienta negra a la piperina.

4.2.4. Determinar el efecto de la sesamina, la asarinina, piperina y de la fagaramida sobre la actividad larvica del  $\alpha$ -sanshool. Sobre *Culex quinquefasciatus* y *Artemia salina*.

## V. HIPOTESIS.

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

Los compuestos metilendioxifenilos (sesamina, asarinina, piperina y fagaramida) presentaran un efecto sinergista de la actividad larvícida del  $\alpha$ -sanshool sobre *Culex quinquefasciatus* y *Artemia salina*.

## VI. MATERIAL.

### 6.1. MATERIAL VEGETAL.

Corteza seca de Colopahitle (*Zanthoxylum liebmannianum*).  
Hojas secas de Colopahitle (*Zanthoxylum liebmannianum*).  
Pimienta negra (Marca Mc-kormic).

### 6.2. MATERIAL PARA LAS EXTRACCIONES.

#### 6.2.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS.

Cloroformo.  
Cloruro de metileno.  
Hexano.  
Metanol.  
Acetato de etilo.  
Agua.  
Eter etílico.  
Eter isopropílico.  
Benceno anhidro.  
Acido clorhídrico.  
Bicarbonato de sodio.  
Cloruro de tionilo.  
N-isobutilamina.  
Acido 3,4-metilendioxicinámico.  
Silica gel (Merck 70-230 malla ASTM).

#### 6.2.2. EQUIPO.

Rotavapor (Büchi 461).  
Aparato de RMN, FT-80.  
Balanza analítica (August Sauter GmbH D-7470 Alb Stadt  
1-Ebinge).  
Aparato para determinar el punto de fusión (Fisher  
Johns Mod. IL 684).  
Lampara de UV de doble haz (Hitachi 220s).  
Placas para calentamiento (Molda-agitherm, Nom-I).

#### 6.2.3. MATERIAL DE VIDRIO.

Matraces erlemeyer de 50 ml.  
Placas para cromatografía en capa fina de 3x8 cm..  
Columnas de vidrio para cromatografía de 2 tamaños  
diferentes en diámetro por longitud (10cm  
diámetro, 2.5 mm pared; 7 cm. diámetro, 2.2 mm  
pared y 2 cm. diámetro, 2.5 cm. pared).  
Matraces bola con boca esmerilada de 250, 125 ml de  
capacidad.

Vasos de precipitados. de 1000, 500, 250, 100 y 50 ml de capacidad.  
Probetas de 1000, 500, 250, 100 y 50 ml. de capacidad.  
Embudo de separación de 500, 250 y 60 ml. de capacidad.  
Espátulas de diferentes tamaños.  
Soporte universal  
Pinzas de tres dedos con nuez.  
vidrios de reloj.  
capilares.  
Matraces bola de 250 ml.  
Refrigerantes.  
Canastas de calentamiento.  
Sistema de reflujo.

### 6.3. MATERIAL PARA LOS BIOENSAYOS.

#### 6.3.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

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

#### 6.3.2. 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).  
Jaulas para ratones.  
Jeringas de 1 ml.

#### 6.3.3. SUSTANCIAS.

Sal marina.  
Agua destilada.  
 $\alpha$ -Sanshool (obtenida de *Zanthoxylum liebmannianum*).  
Sesamina (Obtenida de *Zanthoxylum liebmannianum*).  
Asarinina (Obtenida de *Zanthoxylum liebmannianum*).  
Fagaramida (Obtenida por síntesis).  
Piperina (Obtenida la pimienta negra).

#### 6.3.4. DISOLVENTES.

Acetona (grado R.A.)  
Etanol. (grado R.A.)  
Carboximetilcelulosa.

### 6.3.5. EQUIPO.

Balanza analítica. (August Sauter GmbH D-7470 Albstadt 1 Ebingen).  
caja grande para los bioensayos.  
lamparas eléctricas.

## VII. METODOS.

### 7.1. 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 cada 72 horas. El período larvario duró aproximadamente 15 días. Después de esto 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 depositara 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. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA SOBRE *Culex quinquefasciatus*.

Se prepararon diluciones de 0.0001 a 1000 ppm de los compuestos de prueba utilizandose como disolvente acetona. Se colocaron 10 larvas del cuarto instar en aproximadamente 5 ml de agua, se adicionaron 0.1 ml de cada una de las diluciones, se agitó y se aforaron a 10

ml con agua. se determinó la ventana biológica, que representa el rango de concentraciones en donde se encuentra el 100% y el 0% de mortalidad. La curva concentración-respuesta, se realizó en el rango de la ventana biológica, con por lo menos 4 concentraciones. Se registró el número de animales muertos en cada concentración y se calculó la CL<sub>50</sub> por el método Probits (Infante *et al.*, 1984). Cada concentración se evaluó por triplicado. Simultáneamente se corrió por triplicado con un grupo control tratado con 0.1 ml de acetona (esquema 1).

### 7.2.1. DETERMINACION DEL SINERGISMO.

La actividad sinergista de los compuestos metilendioxfenilos (sesamina, asarinina, piperina y fagañamida). Se desarrolló corriendo las curvas concentración-respuesta de la actividad larvicida del *A. salina*, en ausencia y en presencia de 1, 3, 10 y 100 ppm del compuesto sinergista. La curva se corrió en el rango de 0% y 100% de mortalidad para cada combinación.

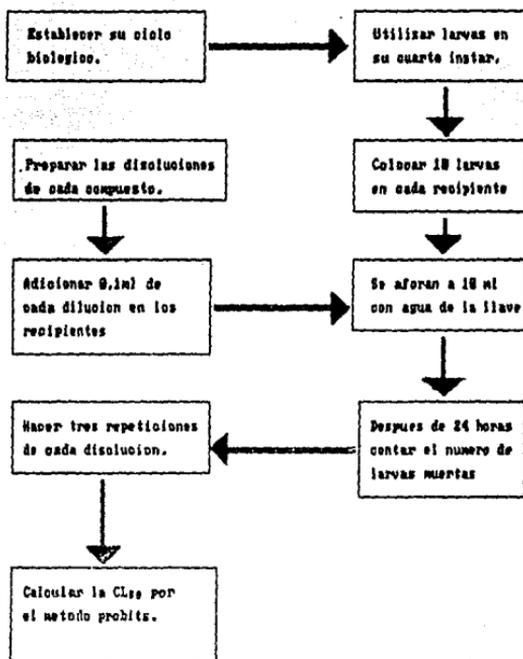
### 7.3. PRODUCCION DE *Artemia salina*.

Se preparó agua de mar artificial, mezclando 36.3 g. de sal marina comercial en un litro de agua. Se colocaron en un recipiente amplio y se le adicionaron 50 mg de huevecillos de *A. salina*. Se cubrieron y se colocaron bajo una lámpara de luz. Las larvas se utilizaron 48 horas después ( Meyer *et al.*, 1982 ).

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

Se colocaron 10 larvas de *Artemia* por vial y se adicionaron 0.5ml de cada dilución (conteniendo de 0.0001 a 100 ppm de cada compuesto), posteriormente se aforaron a

**ESQUEMA 1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA.**  
**( Culex quinquefasciatus )**



5ml con agua de mar artificial. Esto se hace por triplicado para cada concentración.

Para los controles se adicionó una solución de acetona al 0.01 % con agua de mar artificial.

Para contar las larvas se utilizó una pipeta pasteur, Después de 24 horas se contaron las larvas muertas (Esquema 2).

#### 7.3.2.DETERMINACION DEL SINERGISMO.

Procedimiento igual al seguido con *Culex quinquefasciatus*.

#### 7.4. DETERMINACION DE LA CL<sub>50</sub>.

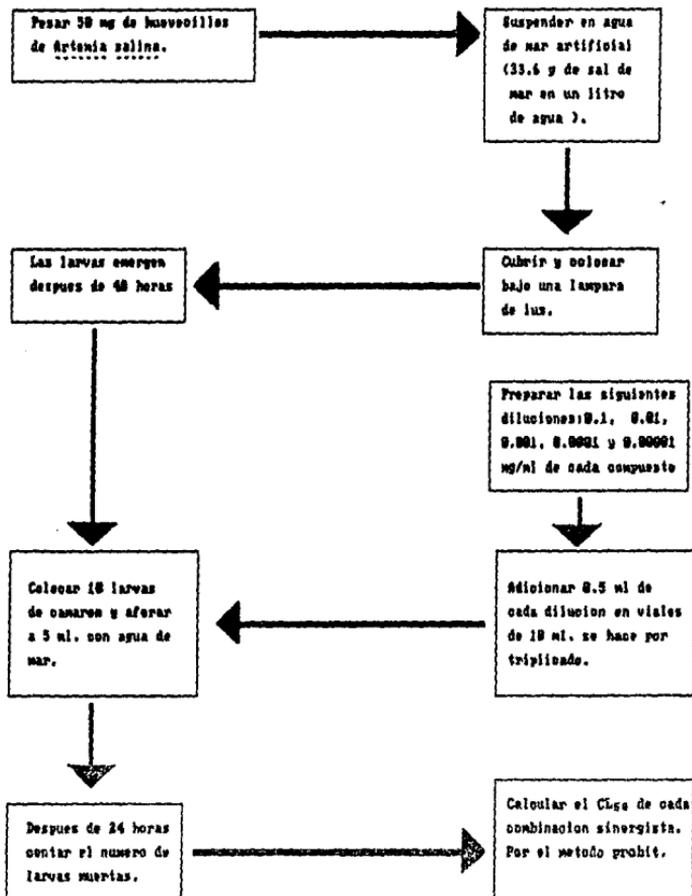
La concentración letal 50 ( CL<sub>50</sub> ) y el intervalo de confianza al 95 % se calcularon por el método Probits, utilizando un programa de computo ( Infante, et al., 1984 ) , para cada uno de los tratamientos, con los cuales se calcularon la potencia relativa ( Número de veces del sinergismo).

##### 7.4.1. DETERMINACION DE LA CL<sub>50</sub> DEL $\alpha$ -SANSHOOI SOBRE RATONES.

Los ratones se sometieron a un ayuno de 24 horas antes de iniciar el experimento. Se les administró a cada ratón  $\alpha$ -sanshool por vía intraperitoneal, suspendido en carboximetilcelulosa, ajustandose las concentraciones para administrar 10, 30, 100, 300, 1000 mg/Kg de peso. Se llevó a la par un control, se observó el efecto y se determino la CL<sub>50</sub> por el método probits.

## ESQUEMA 2. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN

### Artemia salina



## 7.5. METODO DE EXTRACCION.

### 7.5.1. EXTRACCION DEL MATERIAL VEGETAL.

La planta utilizada en este estudio fue recolectada en Sn. Andrés Cacaloapan, municipio de Tehuacán Puebla. La recolección se hizo en septiembre de 1993. Una muestra de referencia se depositó en el Herbario de Plantas Útiles, Efraim Hernández X., de la Universidad Autónoma Chapingo (Xolo-198126) y fue identificada por el M. en C. Erick Estrada del departamento de Fitotecnia de la misma Universidad. Tehuacán esta en una región semiárida, a 1676 msnm. 18° 28' latitud norte y 97° 23' longitud oeste; temperatura promedio: 18.6 °C; precipitación anual: 480 mm con lluvias de mayo a septiembre (Figura 5).



Figura 5: Localización del municipio de Tehuacán Puebla.

El material vegetal se descortezó y se secó a la sombra a temperatura ambiente, luego se pulverizó en un molino manual, resultando 2 Kg de corteza molida y seca. Se pesaron 2 Kg de corteza seca y molida y se extrajo en forma

sucesiva con hexano (8 l) y cloruro de metileno (8 l), a temperatura ambiente (20-22°C) tres veces por periodos de tres días. Después de eliminar los disolventes a presión reducida se obtuvieron 58 g de extracto hexánico; 141 g de extracto de cloruro de metileno.

#### 7.5.2. SEPARACION CROMATOGRAFICA DEL $\alpha$ -SANSHOOOL.

El  $\alpha$ -sanshool se obtuvo del extracto de cloruro de metileno por cromatografía en columna en pequeñas porciones de entre 4 y 6 g de extracto. Por cada gramo de extracto se utilizaron 10 g de sílica gel (Merck 70-230 Malla ASTM). La elución se hizo con cloruro de metileno y mezcla de cloruro de metileno y acetato de etilo.

El  $\alpha$ -sanshool se obtuvo en las fracciones eluidas con cloruro de metileno/acetato de etilo: 9:1, posteriormente se purificó en otra columna cromatográfica pequeña eluida con cloroformo/acetato de etilo: 9:2, con un rendimiento del 0.47 %.

#### 7.5.3. PURIFICACION DE LA SESAMINA Y ASARININA DEL *Zanthoxylum liebmannianum*.

Las hojas de *Zanthoxylum liebmannianum* (2.9 Kg) se extrajeron con hexano tres veces por periodos de tres días, después de evaporar el disolvente se obtuvieron 62 g de extracto hexánico de hojas.

62 g de este extracto fue cromatografiado en una columna de sílica gel (0.97 Kg) se inició la elución con hexano y se fue incrementando su polaridad con acetato de etilo hasta acetato de etilo puro. Se colectaron fracciones de 300 ml. De las fracciones 15-67, eluidas con hexano/acetato de etilo (9:1), fue obtenido un producto

cristalino, que por recristalización con éter isopropílico produjo 350 mg de d-(+)-asarina (0.012 % de rendimiento), Pf 117-118 °C. De las fracciones 93-103, eluidas también con hexano/acetato de etilo (9:1), cristalizaron 1.3 g de d-(+)-sesamina (0.044 % de rendimiento), Pf 117-118 (Reyes *et al.*, 1971).

#### 7.5.4. EXTRACCIÓN DE LA PIPERINA.

60 g de pimienta negra marca Mc-kormic y 120 ml de cloruro de metileno. Esta mezcla se calentó a reflujo durante 20 minutos en un baño maria. Se dejó enfriar a temperatura ambiente (20-25 °C), se filtró a vacío en un embudo buchner y el residuo se lavó varias veces con cloruro de metileno. El disolvente se evaporó en rotavapor a presión reducida obteniéndose un aceite negro, al cual se le adicionó éter etílico y se agitó lentamente para inducir la precipitación de la piperina. Se filtró a vacío, obteniéndose un precipitado amarillo, al cual se le hicieron varios lavados con éter etílico frío. Este precipitado se disolvió con una mínima cantidad de solución caliente de acetona, una vez disuelto se dejó precipitar por sí solo. Se filtró a vacío y se lavó con éter etílico frío, esto se repitió varias veces, obteniéndose 1.36 g de Piperina purificada.

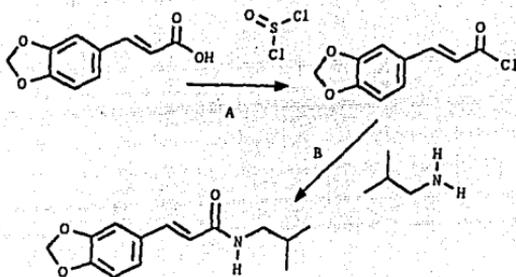
#### 7.5.5. SÍNTESIS DE LA FAGARAMIDA (Elliot, *et al.*, 1987).

En un matraz bola de 100 ml se colocaron 5.7 mmoles (1.1 g) del ácido 3,4-metilendioxicinámico con 27.3 mmoles (3.25 g) de cloruro de tionilo, se calentó a reflujo por 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.

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 etílico). 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, obteniéndose la N-isobutil-3-(3,4-metilendioxfenil)-2 (E) propenamida (Fagaramida), Pf 115°C y un rendimiento de 78 % (esquema 3).

Esquema 3: Esquema de síntesis de la Fagaramida.



- A) ácido 3,4-metilendioxicinámico más cloruro de tionilo en un reflujo por 5 horas.
- B) El cloruro de ácido resultante más la isobutilamina, por 20 horas a 25 °C.

## VIII. RESULTADOS.

### 8.1. OBTENCION DE COMPUESTOS.

Del extracto de cloruro de metileno de la corteza del Colopahtle (*Zanthoxylum Liebmannianum*), y después de fraccionarlo a través de una cromatografía en columna y posteriores cromatografías, se aisló e identificó el  $\alpha$ -Sanshool, con un rendimiento del 0.47 %. Por otro lado, del extracto hexánico de las hojas del Colopahtle, se aisló e identificó al lignano d-(+)-Asarinina (0.012 %) y d-(+)-Sesamina (0.044 %). Estos compuestos fueron aislados e identificados del colopahtle previamente por Reyes *et al.* (1991), y los datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H coinciden totalmente con lo descrito para estos compuestos.

La Fagaramida fue obtenida por síntesis con un rendimiento del 78 % y fue identificada por sus propiedades físicas y espectroscópicas, (Adesina, 1986). La Piperina se aisló de la pimienta negra, siguiendo el método descrito por Epstein *et al.* (1993).

### 8.2. DETERMINACION DEL SINERGISMO.

Una vez obtenidos los compuestos metilendioxfenilos ( Sesamina, Asarinina, Piperina y la Fagaramida ) y la N-Isobutilamida (  $\alpha$ -Sanshool ), se prosedió a realizar las pruebas biológicas sobre *Culex quinquefasciatus* y sobre *Artemia salina*. Se realizaron las curvas concentración-respuesta con el  $\alpha$ -Sanshool en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos metilendioxfenilos y se calcularon los valores de la concentración letal cincuenta (CL<sub>50</sub>), los resultados obtenidos de la CL<sub>50</sub> de la combinación del  $\alpha$ -Sanshool y las

diferentes concentraciones de Sesamina, Asarinina, Fagaramida y Piperina se presentan en las Tablas de la 3 a la 6 para larva de mosco y para Artemia de las tablas 11 a la 14.

En las tablas 7 a la 10 se presenta el número de veces que aumenta el efecto larvicida del  $\alpha$ -Sanshool en larva de mosco y en las tablas 15 a la 18, se presentan los resultados para *Artemia salina*.

A cada uno de los compuestos utilizados se les determino un espectro de RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C, las cuales se muestran en el apendice y la asignación de las señales se dan en las tablas 19 a la 23.

TABLA 3: Valores de CL50 (ppm) del  $\alpha$ -sanshool solo y combinado con varias concentraciones de sesamina y los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de *Culex quinquefasciatus*.

COMBINACION SIMULTANEA	<i>Culex quinquefasciatus</i>	
	CL50 <sup>a</sup>	LIMITES
SESAMINA	377.40	21.5 - 3575.1
ALFA SANSHOOOL	3.97	2.78 - 5.6
(-SAN/1ppm SES	1.59	0.78 - 3.2
(-SAN/3ppm SES	0.51	0.20 - 1.2
(-SAN/10ppm SES	0.07	0.04 - 0.1
(-SAN/100ppm SES	0.15	0.001 - 0.0018

NOTA: ALFA SANSHOOOL (SAN) Y SESAMINA (SES).

<sup>a</sup> EXPRESADO EN ppm

TABLA 4: Valores de CL50 (ppm) del  $\alpha$ -sanshool solo y combinado con varias concentraciones de asarinina y los limites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de *Culex quinquefasciatus*.

COMBINACION SINERGISTA	<i>Culex quinquefasciatus</i>	
	CL50 <sup>n</sup>	LIMITES
ASARININA	69.95	20.15-242.83
ALFA SANSHOOOL	3.97	2.78- 5.67
<-BAN/1ppm ASA	0.83	0.33- 2.10
<-BAN/3ppm ASA	1.02	0.49- 2.13
<-BAN/10ppm ASA	0.08	0.02- 0.29
<-BAN/100ppm ASA	0.14	1.62- 1.31

NOTA:ALFA SANSHOOOL (BAN) Y ASARININA (ASA).

<sup>n</sup> EXPRESADO EN ppm

TABLA 5: Valores de CL50 (ppm) del  $\alpha$ -sanshool sólo y combinado con varias concentraciones de fagaramida y los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de *Culex quinquefasciatus*.

COMBINACION SINCRONISTA	<u>Culex quinquefasciatus</u>	
	CL50 <sup>a</sup>	LIMITES
FAGARAMIDA	7.92	5.1 - 12.2
ALFA SANSCHOOL	3.97	2.78 - 5.6
(-BAN/1ppm FAG	1.24	0.4 - 3.2
(-BAN/3ppm FAG	1.33	0.3 - 4.9
(-BAN/10ppm FAG	0.017	0.004 - 0.06
(-BAN/100ppm FAG	0.28	0.09 - 0.81

NOTA: ALFA SANSCHOOL (BAN) Y FAGARAMIDA (FAG)

<sup>a</sup> EXPRESADO EN ppm

TABLA 6: Valores de CL50 (ppm) del  $\alpha$ -sanshool sólo y combinado con varias concentraciones de piperina y los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de *Culex quinquefasciatus*.

COMBINACION SINERGISTA	<i>Culex quinquefasciatus</i>	
	CL50 <sup>a</sup>	LIMITES
PIPERINA	10.02	2.44- 41.1
ALFA SANSHOOOL	7.14	3.43- 14.8
<-SAN/1ppm PIP	2.89	1.58- 5.2
<-SAN/3ppm PIP	1.92	0.93- 3.9
<-SAN/10ppm PIP	0.72	0.32- 1.6
<-SAN/30 ppm PIP	0.07	0.01- 0.4

NOTA: ALFA SANSHOOOL (SAN) Y PIPERINA (PIP).

<sup>a</sup> EXPRESADO EN ppm

TABLA 7: Número de veces que aumenta la potencia larvicida sobre *Culex quinquefasciatus* del  $\alpha$ -sanshool al adicionarle la sesamina en las concentraciones indicadas.

COMBINACION SINERGISTA	* POTENCIA LARVICIDA <u>Culex quinquefasciatus</u>
SESAMINA	0.014
ALFA SANSHOOOL	1.000
(-SAN/1ppm SES	2.490
(-SAN/3ppm SES	7.766
(-SAN/10ppm SES	53.613
(-SAN/100ppm SES	25.200

NOTA: ALFA SANSHOOOL (SAN) Y SESAMINA (SES).

\* RESPECTO AL ALFA SANSHOOOL

TABLA B: Número de veces que aumenta la potencia larvicida sobre *Culex quinquefasciatus* del  $\alpha$ -sanshool al adicionarle la asarinina en las concentraciones indicadas.

COMBINACION SINERGISTA	* POTENCIA LARVICIDA <u>Culex quinquefasciatus</u>
ASARININA	0.098
ALFA BANSHOOL	1.000
←BAN/1ppm ASA	4.743
←BAN/3ppm ASA	3.868
←BAN/10ppm ASA	47.022
←BAN/100ppm ASA	27.191

NOTA: ALFA BANSHOOL (BAN) Y ASARININA (ASA).

\* RESPECTO AL ALFA BANSHOOL.

TABLA 9: Número de veces que aumenta la potencia larvicida sobre *Culex quinquefasciatus* del  $\alpha$ -sanshool al adicionarle la fagaramida en las concentraciones indicadas.

COMBINACION SINERGISTA	POTENCIA LARVICIDA <u>Culex quinquefasciatus</u>
FAGARAMIDA	0.502
ALFA SANSHOOOL	1.000
(-SAN/1ppm FAG	3.194
(-SAN/3ppm FAG	2.971
(-SAN/10ppm FAG	229.153
(-SAN/100ppm FAG	14.108

NOTA: ALFA SANSHOOOL (SAN) Y FAGARAMIDA (FAG)

= RESPECTO AL ALFA SANSHOOOL.

TABLA 10: Numero de veces que aumenta la potencia larvicida sobre *Culex quinquefasciatus* del  $\alpha$ -sanshool al adicionarle la piperina en las concentraciones indicadas.

COMBINACION SIMBIOTICA	* POTENCIA LARVICIDA <u>Culex quinquefasciatus</u>
PIPERINA	0.713
ALFA SANSHOOL	1.000
←BAN/1ppm PIP	2.472
←BAN/3ppm PIP	3.710
←BAN/10ppm PIP	9.883
←BAN/100ppm PIP	98.385

NOTA: ALFA SANSHOOL (BAN) Y PIPERINA (PIP).

\* RESPECTO AL ALFA SANSHOOL.

TABLA 11: Valores de CL50 (ppm) del  $\alpha$ -sanshool sólo y combinado con varias concentraciones de sesamina y los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de *Artemia salina*.

COMBINACION SINCRGISTA	<u>Artemia</u>	<u>salina</u>
	CL50 <sup>a</sup>	LIMITES
SESAMINA	61.89	33.7 - 113.6
ALFA SANSHOOL	3.38	1.98 - 15.7
<SAN/1ppm SES	6.41	2.9 - 14.1
<SAN/3ppm SES	4.82	2.4 - 9.7
<SAN/10ppm SES	2.43	0.7 - 7.4
<SAN/100ppm SES	0.29	0.08 - 0.58

NOTA: ALFA SANSHOOL (SAN) Y SESAMINA (SES).

<sup>a</sup> EXPRESADO EN ppm

TABLA 12: Valores de CL50 (ppm) del  $\alpha$ -sanshool sólo y combinado con varias concentraciones de asarinina y los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de *Artemia salina*.

CONDICION SINKINGISTA	<u>Artemia</u>	<u>salina</u>
	CL50 <sup>a</sup>	LIMITES
ASARININA	115.93	20.56-207.22
ALFA SANSCHOOL	5.26	2.44- 11.37
←BAN/1ppm ASA	8.97	2.86- 28.11
←BAN/3ppm ASA	3.31	2.26- 4.84
←BAN/10ppm ASA	7.00	2.26- 21.67
←BAN/100ppm ASA	0.63	0.18- 11.37

NOTA:ALFA SANSCHOOL (SAN) Y ASARININA (ASA)

<sup>a</sup> EXPRESADO EN ppm

TABLA 13: Valores de CL50 (ppm) del  $\alpha$ -sanshool sólo y combinado con varias concentraciones de fagaramida y los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de *Artemia salina*.

COMBINACION SIMBIOTICA	<u>Artemia salina</u>	
	CL50 <sup>a</sup>	LIMITES
FAGARAMIDA	274.37	169.1 - 445.0
ALFA SANSHOOOL	5.58	1.98 - 15.7
<-SAN/1ppm FAG	7.70	3.0 - 11.8
<-SAN/3ppm FAG	5.57	3.0 - 10.3
<-SAN/10ppm FAG	4.01	2.3 - 6.9
<-SAN/100ppm FAG	0.034	0.01 - 0.07

NOTA: ALFA SANSHOOOL (SAN) Y FAGARAMIDA (FAG)

<sup>a</sup> EXPRESADO EN ppm

TABLA 14: Valores de CL50 (ppm) del  $\alpha$ -sanshool sólo y combinado con varias concentraciones de piperina y los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza al 95 % obtenido en larvas de *Artemia salina*.

COMBINACION SINERGISTA	<u>Artemia</u>	<u>salina</u>
	CL50 <sup>n</sup>	LIMITES
PIPERINA	15.93	7.6 - 33.4
ALFA SANSHOOOL	6.37	3.3 - 12.0
<-SAN/1ppm PIP	5.17	1.9 - 14.0
<-SAN/3ppm PIP	3.19	1.3 - 7.4
<-SAN/10ppm PIP	1.80	0.6 - 4.7
<-SAN/30 ppm PIP	0.06	0.02 - 0.18

NOTA: ALFA SANSHOOOL (SAN) Y PIPERINA (PIP).

<sup>n</sup> EXPRESADO EN ppm

TABLA 15: Número de veces que aumenta la potencia larvicida sobre *Artemia salina* del  $\alpha$ -sanshool al adicionarle la sesamina en las concentraciones indicadas.

COMBINACION SINERGISTA	* POTENCIA LARVICIDA <u>Artemia salina</u>
SESAMINA	0.090
ALFA SANSHOOOL	1.000
←-SAN/1ppm SES	0.871
←-SAN/3ppm SES	1.157
←-SAN/10ppm SES	2.295
←-SAN/100ppm SES	27.933

NOTA: ALFA SANSHOOOL (SAN) Y SESAMINA (SES).

\* RESPECTO AL ALFA SANSHOOOL.

TABLA 10: Número de veces que aumenta la potencia larvívica sobre *Artemia salina* del  $\alpha$ -sanshool al adicionarle la asarinina en las concentraciones indicadas.

COMBINACION SIMBIÓTICA	POTENCIA LARVICIDA	
	<u>Artemia</u>	<u>salina</u>
ASARININA		0.043
ALFA SANSHOOOL		1.000
←BAN/1ppm ASA		0.387
←BAN/3ppm ASA		1.591
←BAN/10ppm ASA		0.752
←BAN/100ppm ASA		0.335

NOTA: ALFA SANSHOOOL (BAN) Y ASARININA (ASA).

\* RESPECTO AL ALFA SANSHOOOL.

TABLA 17: Número de veces que aumenta la potencia larvica sobre *Artemia salina* del  $\alpha$ -sanshool al adicionarle la fagaramida en las concentraciones indicadas.

COMBINACION SIMBIOTICA	POTENCIA LARVICIDA
	<u>Artemia</u> <u>salina</u>
FAGARAMIDA	0.019
ALFA SANSHOOOL	1.000
←SAN/1ppm FAG	0.603
←SAN/3ppm FAG	0.945
←SAN/10ppm FAG	1.311
←SAN/100ppm FAG	151.858

NOTA: ALFA SANSHOOOL (SAN) Y FAGARAMIDA (FAG)

\* RESPECTO AL ALFA SANSHOOOL.

TABLA 18: Numero de veces que aumenta la potencia larvicida sobre *Artemia salina* del  $\alpha$ -sanshool al adicionarle la piperina en las concentraciones indicadas.

COMBINACION SINERGISTA	* POTENCIA LARVICIDA	
	<u>Artemia</u>	<u>salina</u>
PIPERINA		0.399
ALFA SANSHOOOL		1.000
←BAN/1ppm PIP		1.230
←BAN/3ppm PIP		1.991
←BAN/10ppm PIP		3.529
←BAN/30 ppm PIP		98.005

NOTA:ALFA SANSHOOOL (BAN) Y PIPERINA (PIP).

\* RESPECTO AL ALFA SANSHOOOL.

TABLA 19: Asignación de las señales en RMN para el  $\alpha$ -sanshool.

RMN- <sup>1</sup> H (CDC1a)		
$\delta$	Señal	Asignación
0.87	d	6H, H-3', H-4'
1.75	d	1H, H-12
1.80	m	1H, H-2'
2.25	m	4H, H-4, H-5
3.10	dd	1H, H-1'
6.20	sa	HN
6.36-5.37	m	H-6, H-7, H-8, H-9, H-10, H-11
6.82	dt	2H, H-2, H-3

RMN- <sup>13</sup> C (CDC1a)		
$\delta$	Señal	Asignación
105.00	s	C-1
124.22	d	C-2
143.38	d	C-3
32.09	t	C-4
20.54	t	C-5
129.02	d	C-6
129.59	d	C-7
129.27	d	C-8
133.45	d	C-9
131.70	d	C-10
130.10	d	C-11
18.29	q	C-12
45.88	t	C-1'
28.59	d	C-2'
20.13	q	C-3', C-4'

NOTA:  $\delta$  en ppm.

**TABLA 20: Asignación de las señales en RMN para la  
 , sesamina.**

RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> )		
δ	Señal	Asignación
3.04	m	2H, H-i H-l
3.85	dd	2H, H-m, H-j
4.22	dd	2H, H-n, H-jβ
4.70	d	2H, H-h, H-k
5.90	s	4H, H-g
6.70	m	6H, H-b, H-e, H-f

NOTA: δ en ppm.

TABLA 21: Asignación de las señales en RMN para la  
asarina

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)

δ	Señal	Asignación
2.85	m	1H, H-1
3.30	m	1H, H-1, H-mα
3.85	m	2H, H-jβ, H-mβ
4.15	d	1H, H-jα
4.35	d	2H, H-k, H-h
5.03	s	4H, H-g
6.79	m	6H, H-b, H-e, H-f

NOTA: δ en ppm.

TABLA 22: Asignación de las señales en RMN para la fagaramida.

RMN- <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> )		
δ	Señal	Asignación
0.96	d	6H, H-C, H-D
1.84	m	1H, H-B
3.22	dd	1H, H-A
5.98	s	2H, H-g
6.26	dt	1H, H-i
6.77	d	2H, H-e
6.80	dd	1H, H-f
7.30	s	1H, H-b
7.56	d	1H, H-h

RMN- <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> )		
δ	Señal	Asignación
129.38	s	C-a
106.37	d	C-b
148.24	s	C-c
148.99	s	C-d
108.52	d	C-e
123.71	d	C-f
101.40	t	C-g
140.60	d	C-h
118.95	d	C-i
110.05	s	C-j
47.11	t	C-A
28.68	d	C-B
20.16	q	C-C, C-D

NOTA: δ en ppm.

TABLA 23: Asignación de las señales en RMN para la piperina

RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>)

δ	Señal	Asignación
1.02	m	0H, H-A, H-B
3.57	m	4H, H-C
5.93	s	2H, H-12
6.43	d	1H, H-2
6.75	dd	1H, h-11
6.80	d	1H, H-10
7.05	d	1H, H-7
7.40	m	2H, H-3, H-4

RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)

δ	Señal	Asignación
105.37	s	C-1
120.14	d	C-2
142.35	d	C-3
125.38	d	C-4
138.10	d	C-5
131.01	s	C-6
105.67	d	C-7
148.18	s	C-8
148.10	s	C-9
108.43	d	C-10
122.41	d	C-11
101.25	t	C-12
24.85	t	C-A
27.80	t	C-B
47.90	t	C-C, C-D

NOTA: δ en ppm.

## 8.1. DISCUSION DE RESULTADOS.

### B.1.1. DETERMINACION DEL SINERGISMO EN *Culex quinquefasciatus*

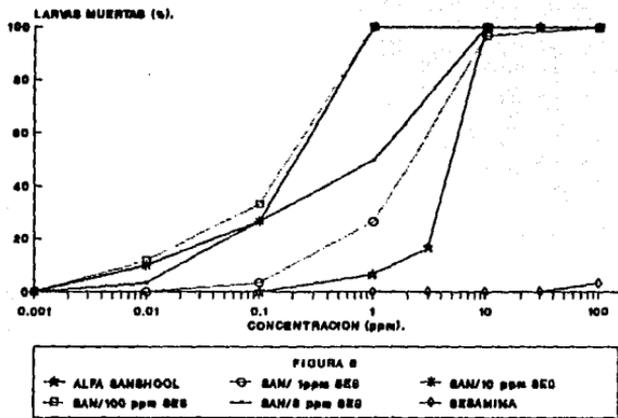
#### A) EFECTO SINERGISTA DE LA SESAMINA.

La Sesamina presento un claro efecto sinergista de la actividad larvicida del  $\alpha$ -Sanshool desplazando la curva dosis respuesta a la izquierda (Figura 1), el desplazamiento esta relacionado con la concentración adicionada (Tabla 3), aumentandose la potencia del  $\alpha$ -Sanshool 25.20 veces a la concentración de 100 ppm, 53.6 veces a la concentración de 10 ppm, 3.86 veces a la concentración de 3 ppm y 2.5 veces a la concentración de 1 ppm. La Sesamina presento una CL<sub>50</sub> de 277.4 ppm (Tabla 7).

Estos resultados apoyan el postulado de que la actividad insecticida de las N-Isobutilamidas es similar a la de los piretroides, en los cuales se sabe muy bien que la Sesamina potencia la actividad de estos compuestos por la inhibición de la enzima oxidasa de función mixta (Wilkinson, 1976). cuando se inhibe la enzima oxidasa de función mixta se aumenta la actividad del  $\alpha$ -Sanshool, ya que su degradación queda inhibida.

Por otro lado desde el punto de vista ecológico, toma interes el hecho de que el  $\alpha$ -sanshool y la sesamina se encuentran en la corteza del colopahtle. De hecho, en la placa de cromatografía en capa fina, el  $\alpha$ -Sanshool y la Sesamina se encuentran muy próximos con Rf de 0.7692 y 0.8974 respectivamente con un sistema de elución de cloruro de metileno, y en la purificación del  $\alpha$ -Sanshool, la Sesamina es el último compuesto que se separa.

Esto de alguna manera representa un sinergismo natural ya que en la misma planta y aun más en la misma fracción se



ALFA SANSHOOL (SAN) Y SESAMINA (SES)

FIGURA 5: Curva concentración - Respuesta en *Culex quinquefasciatus* del  $\alpha$ -sanshool sólo y en presencia de varias concentraciones de sesamina. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la sesamina.

# ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

encuentra el principio activo ( $\alpha$ -Sanshool) y el agente sinergista (Sesamina), lo que resulta muy importante, ya que en el caso de los piretroides se adiciona la Sesamina para aumentar su actividad.

## B) EFECTO SINERGISTA DE LA ASARININA.

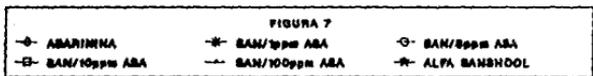
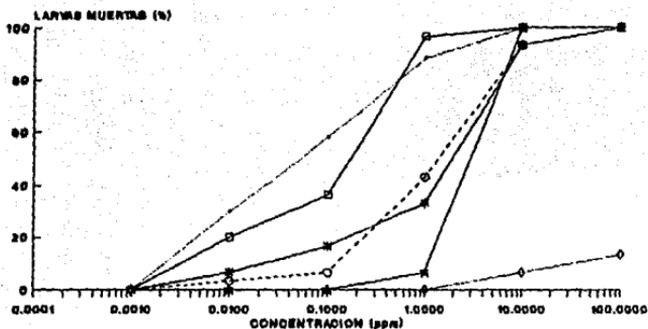
Del estudio fitoquímico del colopahle (*Zanthoxylum liebmannianum*), además de la Sesamina que es un compuesto metilendioxfenilo se aisló otro lignano de las hojas de esta planta, la Asarinina (Reyes *et al.* 1991), que es un estereoisomero de la Sesamina. A la Asarinina se le evaluó en los mismos niveles de concentraciones que la Sesamina (Figura 2).

La Asarinina aumenta la potencia del  $\alpha$ -Sanshool 4.7 veces a la concentración de 1, 3.8 a 3 ppm, 47 veces a la concentración de 10 y 27.19 veces a la concentración de 100 ppm (Tabla 8).

Se observan diferencias del efecto sinergista entre asarinina y sesamina lo que. Esto indica que existen factores de estereoisomerismo para que se presente la actividad sinergista.

## C) EFECTO SINERGISTA DE LA FAGARAMIDA.

La fagaramida es una N-isobutilamida que contiene un grupo metilendioxfenilo y de la cual también se sabe posee actividad larvicida en *Culex*; Kubo I. *et al.* (1984) demostró la actividad insecticida de la Fagaramida sobre *Culex pipiens*, encontrando una CL<sub>50</sub> de 15 ppm, mientras que en *Culex quinquefasciatus* tiene una CL<sub>50</sub> de 7.92 ppm (Tabla 5). Considerando la Fagaramida como un compuesto metilendioxfenilo se evaluó como sinergista del  $\alpha$ -Sanshool (Figura 3).



ALFA SANSHOOL (SAN) Y ASARININA (ASA)

FIGURA 7: Curva concentración - Respuesta en *Culex quinquefasciatus* del  $\alpha$ -sanshool sólo y en presencia de varias concentraciones de asarinina. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la asarinina.

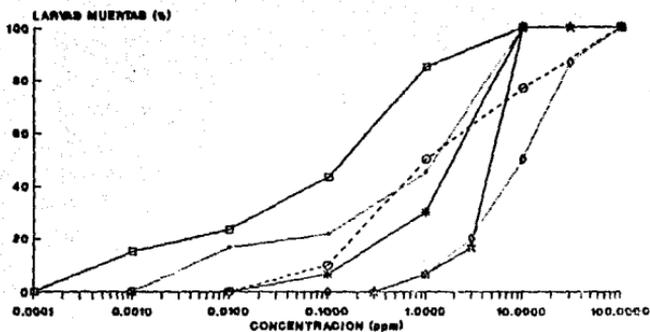


FIGURA 8

-○- FAGARAMIDA	-■- BAN/1 ppm FAG	-○- BAN/5 ppm FAG
-□- BAN/10 ppm FAG	-■- BAN/100 ppm FAG	-■- ALFA BANSHOOL

ALFA BANSHOOL(BAN) Y FAGARAMIDA(FAG)

FIGURA 8: Curva concentración - Respuesta en *Culex quinquefasciatus* del  $\alpha$ -sanshool sólo y en presencia de varias concentraciones de fagaramida. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la fagaramida.

La Fagaramida presenta actividad por sí sola, por lo que al combinarse con el  $\alpha$ -Sanshool produce un sinergismo de potenciación, ya que el efecto de la mezcla es superior a la suma de los efectos individuales, así, la Fagaramida tiene una potencia de 0.50 respecto al  $\alpha$ -Sanshool, en tanto que la combinación del  $\alpha$ -Sanshool con la Fagaramida a la concentración de 10 ppm aumenta la potencia del  $\alpha$ -Sanshool 229.15 veces (Tabla 8).

A la concentración de 100 ppm de Fagaramida se observa una disminución del efecto que puede atribuirse a que la acción que predomina es la Fagaramida que la del  $\alpha$ -Sanshool.

#### D) EFECTO SINERGISTA DE LA PIPERINA.

La Piperina es otro compuesto metilendioxfenilo, extraído de la pimienta negra ( Epstein *et al.* 1993 ) con una amida cíclica, a la cual también se consideró para evaluar su efecto sinergista sobre  $\alpha$ -Sanshool (Figura 4), observándose que la Piperina tiene efecto larvicida por sí sola, como se observa en la Tabla 6 y al igual que la fagaramida presenta un sinergismo de potenciación.

La actividad aumento 98.30 veces a la concentración de 100 ppm, 9.88 veces a la concentración de 10 ppm, 3.71 veces a la concentración de 3 ppm y 2.47 veces a la concentración de 1 ppm (Tabla 10).

Estos resultados sobre *Culex quinquefasciatus*, demuestran que cada uno de los compuestos metilendioxfenilos, Sesamina, Asarinina, Fagaramida y Piperina, actúan como sinergistas de la acción larvicida del  $\alpha$ -Sanshool, tal vez debido a que actúan por inhibición de la enzima oxidasa de función mixta.

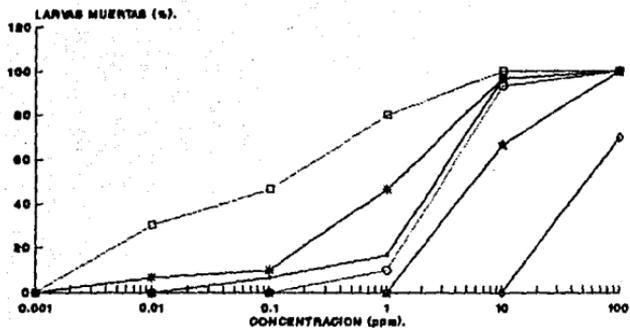


FIGURA 9

-★- ALPHA SANSHOOL	-○- SAN/ 100ppm PIP	-●- SAN/10 ppm PIP
-□- SAN/100 ppm PIP	-×- SAN/5 ppm PIP	-◇- PIPERINA

ALFA SANSHOOL (SAN) Y PIPERINA (PIP)

FIGURA 9: Curva concentración - Respuesta en *Culex quinquefasciatus* del  $\alpha$ -sanshool sólo y en presencia de varias concentraciones de piperina. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la piperina.

### 8.3.2. DETERMINACION DEL SINERGISMO EN *Artemia salina*.

La *Artemia salina* utilizada para las pruebas con insecticidas, demostró tener una correlación con la larva de *Culex quinquefasciatus* (Pineda, 1994) con un coeficiente de correlación de 0.91. Lo que representa una gran ayuda para esta clase de pruebas, por la rapidez de su obtención y su utilización durante todo el año, ventajas que tiene sobre la larva de mosco (*Culex*), por ello también se evaluó el efecto sinergista de los compuestos metilendioxfenilos sobre la acción larvicida del  $\alpha$ -Sanshool en este sistema.

#### A) EFECTO SINERGISTA DE LA SESAMINA.

En la Tabla 11, se muestran las CL<sub>50</sub> del  $\alpha$ -Sanshool sólo y combinado con Sesamina, (Tabla 19), con la concentración de 3 ppm la potencia relativa fue de 1.1. A la concentración de 10 ppm, se aumentó la potencia relativa 2.29 veces y por último con la concentración de 100 ppm aumentó la potencia relativa del  $\alpha$ -Sanshool 27.9 veces.

El efecto sinergista observado, demuestra que a concentraciones altas (100 ppm) se da el sinergismo mientras que a concentraciones bajas, no hubo efecto o inclusive disminuyó un poco la actividad del  $\alpha$ -Sanshool, lo que indica que el  $\alpha$ -Sanshool ejerce la acción larvicida sobre *Artemia salina* por un mecanismo diferente al observado en *Culex quinquefasciatus* (Figura 5).

#### B) EFECTO SINERGISTA DE LA ASARONINA.

Siendo la Asarinina un estereoisomero de la Sesamina (Figura 6), el efecto sinergista fue menor al de su estereoisomero sobre *Artemia salina* y solo aumentó la potencia del  $\alpha$ -Sanshool 8.3 veces a la concentración de 100 ppm, con un CL<sub>50</sub> de 0.63 ppm (Tabla 12). A las otras

concentraciones hubo una disminución ligera en la potencia (Tabla 18).

#### C ) EFECTO SINERGISTA DE LA FAGARAMIDA.

La Fagaramida presentó un efecto sinergista solo a la concentración de 100 ppm sobre la actividad larvícida del  $\alpha$ -Sanshool, similar al de la Sesamina y con concentraciones menores inclusive disminuye la potencia del  $\alpha$ -Sanshool (Figura 7).

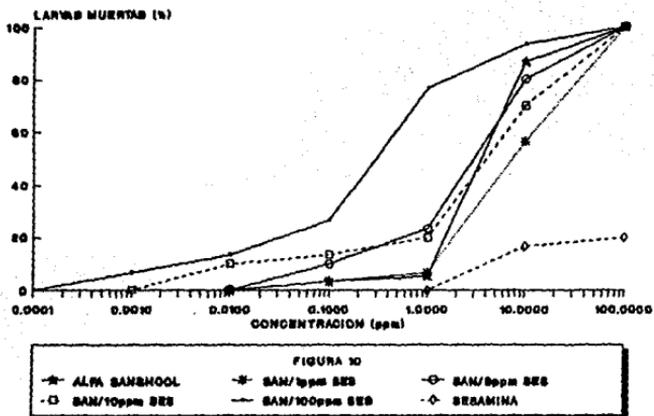
#### D ) EFECTO SINERGISTA DE LA PIPERINA.

La Piperina aislada de la pimienta negra tiene una actividad larvícida apreciable (Tabla 18), y al igual que los otros compuestos metilendioxfenilos evaluados en *Artemia salina* (Tabla 14), sólo se observó el efecto sinergista a la concentración de 30 ppm (Figura 8).

Por otra parte comparando la actividad larvícida entre *Artemia salina* y *Culex quinquefasciatus* de cada combinación sinergista, se observó que en el mosquito hubo mayor efecto sinergista de cada uno de los compuestos probados, lo que indica que el mecanismo por el cual se aumenta el efecto larvícida es diferente.

La Sesamina aumento 53.61 veces la actividad larvícida en *Culex quinquefasciatus* a la concentración de 10 ppm, mientras que en *Artemia salina* fue de 27.93 veces a la concentración de 100 ppm, considerandose la Sesamina sola inactiva en ambos casos debido a que su CL<sub>50</sub> es muy alto (Figura 9).

La Asarinina aumentó la actividad larvícida en *Culex* 47.0 veces a la concentración de 10 ppm, mientras que en *Artemia* aumento solo 8.33 veces a la concentración de 100



ALFA Sانشool(SAN) Y SESAMINA (SES)

FIGURA 10: Curva concentración - Respuesta en *Artemia salina* del  $\alpha$ -sانشool sólo y en presencia de varias concentraciones de sesamina. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la sesamina.

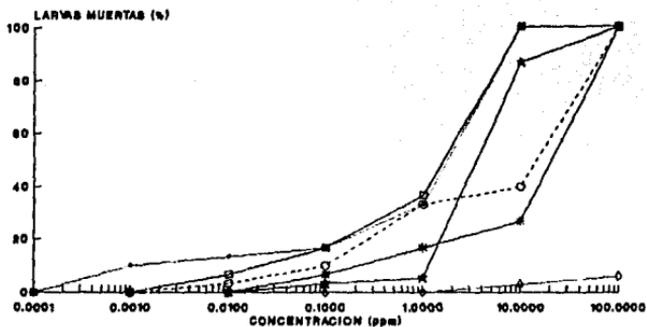
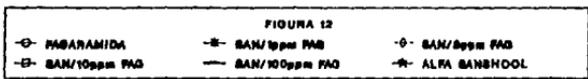
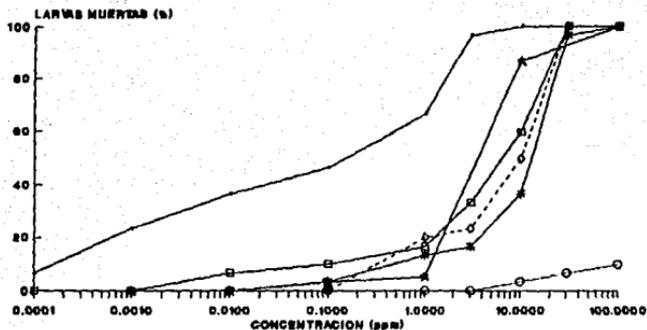


FIGURA 11

○- ASARININA	-x- SAN/1ppm ASA	○- SAN/10ppm ASA
□- SAN/100ppm ASA	-x- SAN/100ppm ASA	-x- ALFA SANSHOOL

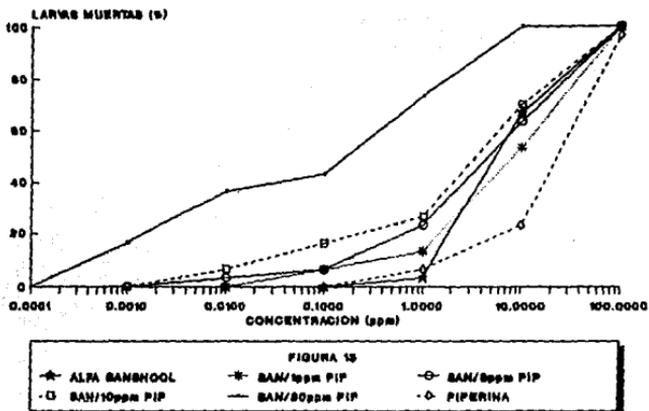
ALFA SANSHOOL (SAN) Y ASARININA (ASA)

FIGURA 11: Curva concentración - Respuesta en *Artemia salina* del  $\alpha$ -sanshool sólo y en presencia de varias concentraciones de asarinina. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la asarinina.



ALFA SANSHOOL (SAN) Y FAGARAMIDA (FAG)

FIGURA 12: Curva concentración - Respuesta en *Artemia salina* del  $\alpha$ -sanshool sólo y en presencia de varias concentraciones de fagaramida. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la fagaramida.



ALFA BANSHOOL(BAN) Y PIPERINA (PIP)

FIGURA 13: Curva concentración - Respuesta en *Artemia salina* del  $\alpha$ -sanshoool sólo y en presencia de varias concentraciones de piperina. Se observa un desplazamiento de la curva a la derecha cuando esta presente la piperina.

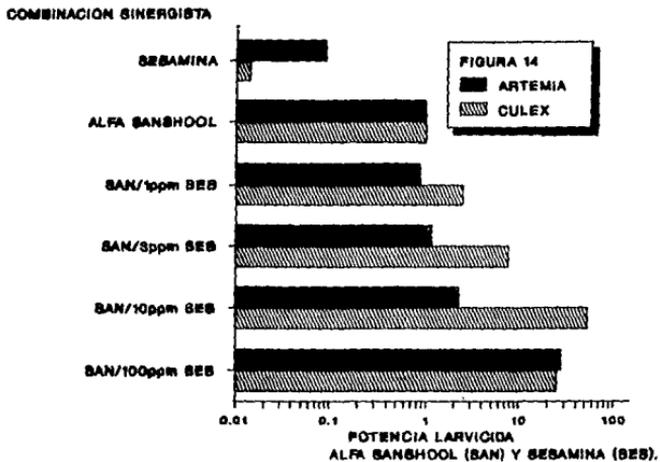


FIGURA 14: Comparación sinergista de la potencia larvicida entre *Artemia salina* y *Culex quinquefasciatus* de la Sesamina y el  $\alpha$ -Sanshool.

ppm, y en ambos casos la Asarinina se consideró inactiva (Figura 10).

Con la Fagaramida se observó que sobre *Culex* aumentó 229.1 veces a la concentración de 10 ppm, mientras que en *Artemia* aumentó 151.8 veces a la concentración de 100 ppm, además de que en *Artemia salina* se consideró inactiva la Fagaramida sola. (Figura 11).

La Piperina presentó actividad larvívica en *Culex* y en *artemia* además de que aumento la actividad larvívica del  $\alpha$ -Sanshool hasta 98.3 veces a la concentración de 100 ppm en *Culex* y 98 veces a la concentración de 30 ppm en *Artemia* (Figura 12), lo que parece indicar que es la actividad de la Piperina es la que se esta midiendo y no la del  $\alpha$ -Sanshool.

Se observa que la combinación sinérgica entre el  $\alpha$ -Sanshool y los compuestos metilendioxifenilos tiene mayor efecto larvívica sobre *Culex*, al menos en lo que respecta a la Sesamina, Fagaramida y Asarinina. Por otro lado, la Piperina muestra igual actividad larvívica sobre *Artemia salina* y sobre *Culex quinquefasciatus*. La Fagaramida es el compuesto metilendioxifenilo en donde se observó el mayor efecto sinérgico sobre ambos sistemas biológicos utilizados, seguido por la Piperina y después la Sesamina y por último la Asarinina.

Por medio de este estudio se observó que el efecto larvívica del  $\alpha$ -Sanshool, es aumentado por la presencia de los compuestos metilendioxifenilos (Sesamina, la Asarinina, la Fagaramida y la Piperina).

Por otro lado en un estudio adicional del  $\alpha$ -Sanshool tiene una DL<sub>50</sub> de 54.77 mg/Kg, cuando se administra por vía intraperitoneal, en ratones con un intervalo de confianza de 21.53 a 139.34 mg/Kg (Figura 13). En tanto que por vía

oral el  $\alpha$ -Sanshool hasta concentraciones mayores a 1000 mg/Kg no presento efecto en estos animales, esto indica de alguna manera que el  $\alpha$ -Sanshool posee una toxicidad relativamente baja si se ingiere por via oral, tal vez debido a que no se absorbe o que se metaboliza rápidamente en el tubo digestivo.

COMBINACION SINERGISTA

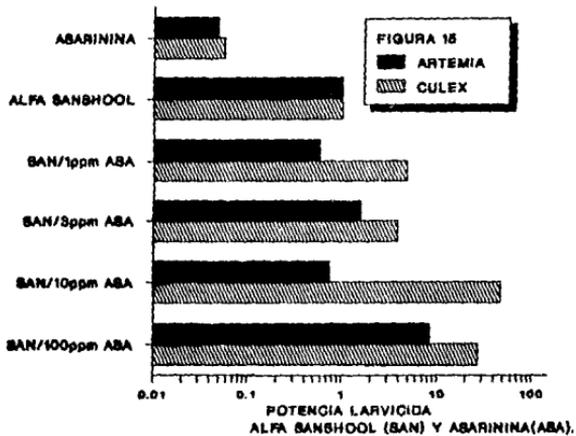


FIGURA 18: Comparación sinérgica de la potencia larvífica entre *Artemia salina* y *Culex quinquefasciatus* de la Asarinina y el  $\alpha$ -Sanshool.

COMBINACION SINERGISTA

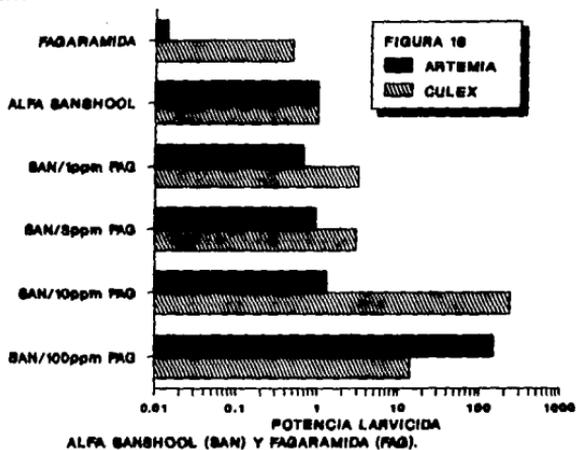


FIGURA 10: Comparación sinérgica de la potencia larvicida entre *Artemia salina* y *Culex quinquefasciatus* de la Fagaramida y el  $\alpha$ -Sanshool.

COMBINACION SINERGISTA

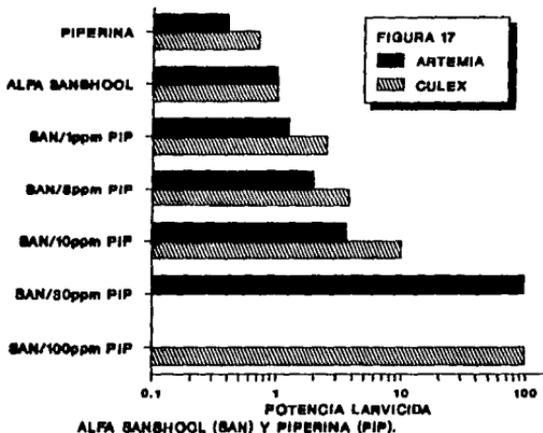


FIGURA 17: Comparación sinérgica de la potencia larvicida entre *Artemia salina* y *Culex quinquefasciatus* de la Piperina y el  $\alpha$ -Sanshool.

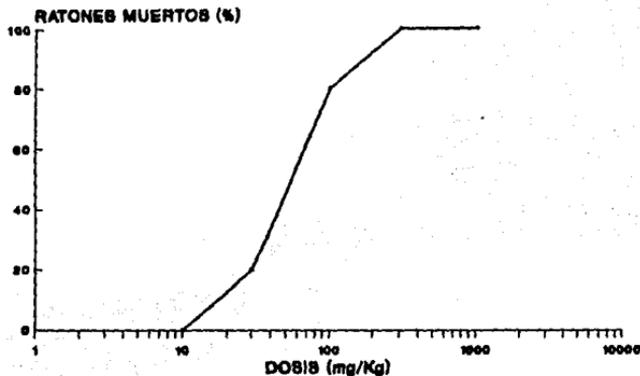


FIGURA 18  
 — ALFA SANSHOOOL

VIA INTRA PERITONEAL

FIGURA 18: Curva dosis - respuesta del  $\alpha$ -sanshool administrado por vía intra peritoneal en ratones. Obteniéndose una DL<sub>50</sub> de 54.77 mg/Kg.

## IX. CONCLUSIONES.

Las conclusiones que se desprenden de este estudio son las siguientes:

El  $\alpha$ -sanshool presentó una CL<sub>50</sub> de 3.97 ppm en larvas de *Culex quinquefasciatus* y de 5.96 ppm en larvas de *Artemia salina* estos valores fueron potenciados por los compuestos metilendioxfenilos: sesamina (53 veces), asarinina (47 veces), fagaramida (229 veces) y piperina (98 veces) sobre larvas de mosco común (*Culex quinquefasciatus*). En larvas de *Artemia salina* la actividad larvicida del  $\alpha$ -sanshool fue aumentada 27 veces con sesamina, 8 veces con asarinina, 151 veces con fagaramida y 98 veces con piperina.

Los resultados obtenidos indican que el mecanismo de acción de los compuestos metilendioxfenilos, tales como la Sesamina, Asarinina, Fagaramida y Piperina, son diferentes en *Culex quinquefasciatus* y en *Artemia salina* por lo que podría estar ó no relacionados con la enzima oxidasa de función mixta presente en artrópodos.

Adicionalmente se encontró que el  $\alpha$ -Sanshool tiene una toxicidad relativamente baja cuando se administra por vía oral, a ratones, en tanto que por vía intra peritoneal tiene una DL<sub>50</sub> de 54.77 mg/Kg, con un intervalo de confianza de 95 % de 21.53 a 139.34 mg/Kg.

## X. SUGERENCIAS.

Se sugiere profundizar sobre el mecanismo de acción de el  $\alpha$ -Banshool y de los compuestos metilendioxfenilos, tanto en estos sistemas biológicos como en algunos otros que permitan saber, si afectan la conducción nerviosa en el axón y sobre la enzima oxidasa de función mixta, respectivamente, y que relación puede haber cuando estos compuestos se unen para que se lleve a cabo el sinergismo.

## XI. BIBLIOGRAFIA.

- Adesina, S. K., (1986). Further Novel Constituents of *Zanthoxylum zanthoxyloides* roots and pericarps. *J. Nat. Prod.* 49(4), pp.715.
- Adesina, S.K., Akinwusi, D.D., (1986). New constituents of *Zanthoxylum lessmannii* ayafo root. *J. High. Resolut. Chromatogr. Commun.* 9 (7). pp. 412-414.
- Adewole, L., Okunade, D. F., (1985). (-)-linalolide, An ant-repelent coomound from *Zanthoxylum setulosum*. *J. Nat. Prod.* 48(3).
- Ahmed, S., Grainge, M., Hylin, J. W., Mitchel, W. C. y Litsinger, J. A., (1984). In natural pesticides from the neem tree and other tropical plants, Ed. H. Schmutterer and K.R.S. Ascher, GTZ, Eschborn, pp. 565-580.
- Amat, F., (1979). Diferenciación y distribución de las poblaciones de *Artemia* (Crustáceo, Branquiopodo) de España. Ph.D. Thesis, Universidad de Barcelona, España.
- Babajide, P., El-Alfy, T., (1985). Volatile oils of *Zanthoxylum rigidifolium* and *Zanthoxylum guilleitii*. *Fitoterapia*. LVI, (4) pp.240.
- Bannerman, H.R.,(1980) Organization and cooperation for development of studies of plant used in tradicional medicine: Some guide lines for research and studies. *J. of Ethnopharmacology*. 2, pp.189.
- Barberá, C.,(1976)., *Pesticidas agrícolas*. 3ra. edición, Ed. Omega s.a., Barcelona, pp.45-50.
- Biaqi, F.,(1988)., *Enfermedades parasitarias*. La prensa médica mexicana, México. pp. 300.
- Blade, J. R.(1990). Some Aspects of Synthesis and Structure-Activity in Insecticida Lipid Amides. Recent Advances in the Chemistry of Insect Control. The Royal Society of Chemistry, 151-169.
- Bernhaid,H.O., (1978). Alkaloids and other coomounds of *Z. berberu*, *Helv. Chim. Acta.* 61 pp. 2269.
- Borror, D, Triplehorn, C. A. y Johnson, N. F. (1989). An Introduction to the Study of Insects. 6a. edición. Saunders College Publishing. E.U.A. 541-545.
- Bulhoes, Castro, G.C., Silvia., (1946). Phytochemical screening of plants native to North Heaster Brazil. *Am. Fac. Quim. Universidad. Fed. Penabuco.* 15.pp.3940.
- Caolo, P.M., Anderson, P. And Stermitz, F.R., (1979)., *Z. punctatum wahl*. The cristal and molecular structure of isocalfileramine dihidrobromide. *Tetrahedron* 35 (1942).

- Carballo, P. J. y Melchor, M. P. (1993). Síntesis y Actividad Larvídica de algunas Cinamamidas. Tesis de Licenciatura, Q.F.B. Escuela de Ciencias Químicas. Universidad de Veracruz, México.
- Casas, D.D. y Sojo, C.M., (1967). Characterization of *Zanthoxylum caribaeum*. *J. Chem. Soc.* 6 pp. 2155.
- Casida, J. E., (1973). *Pyrethrum*, the natural insecticide. Academic Press, New York.
- Casida, J. E., (1983). In natural products for innovative pest management, Ed. D.L. Whitehead and W.S. Bowers, Pergamon Press, New York, pp. 109-125.
- Casida, J. E., (1987). In industrial chemistry: Proc. 31st int. Congr. International Union of pure and applied chemistry, 13-18 July 1987, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria, pp. 53-62.
- Casida, J. E., Engel, J. L., Esaac, E. G., Kamienski, F. X., and Kuwatsuka, S., (1966). Methylene-C<sup>14</sup>-dioxyphenyl compounds: Metabolism in relation to their synergist action, *Science* 151:1130.
- Chakraborty, D.P., Groy, y Sinha, S.P., (1979)., Padiotoxin and germination inhibitor lignan from *Z. acanthopodium*. *D.C. Chemistry and Industry* . 19 (19). pp. 67.
- Crombie, L. y Fisher, D. (1985). Synthon: For general Routes to natural insecticidal Lip. Isobutylamides. *Tetrahedron Letters*. 26 (20). pp. 2477-2480.
- Crosby, D. G., (1966). In natural pest control agents, Ed. D.G. Crosby, American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 1-16.
- Crosby, D. G., (1971). In naturally occurring insecticides, Ed. M. Jacobson and D.G. Crosby, Marcel Dekker, New York. pp. 177-242.
- Della, C.D., Marcano, M., (1972)., Neutral compounds and alkaloids. *Phytochemistry of Zanthoxylum ocumarensis*. *J. Chem. Soc.* 11 pp. 1531.
- Dominguez, X.A., Benavides, C., (1974)., *Zanthoxylum fagara* o *Z. Pterota*. *Phytochemistry*. 19. pp. 630.
- Drill, M., (1971)., *Farmacología médica*, Ed. La prensa medica mexicana, México. pp. 1239-50.
- David, L., Dreyes. Brener, R.C., (1980)., Alkaloids of some Mexican *Zanthoxylum species*. *Phytochemistry*. 19 (5). pp. 935.
- Egeui, K., Tiaari, P., (1964)., Study of root of *Z. oxyphyllum*. *J. Ind. Chem. Soc.* 41 pp. 837.

- Ekundayo, P., Oguntimeint, B., Adeoye, A., (1986)., Volatile constituents of the esencial oils of *Zanthoxylum leproeurit*. *Fitoterapia*. LVII 4. pp. 267.
- Elliott, M., (1985). In recent advances in the Chemistry of insect Control, Ed. N.F. Janes, The royal Society of Chemistry, London. pp. 73-102.
- Elliott, M., Farnham, A., Janes, N.F., Johnson, D.M. y Pulman, D. (1987). Synthesis and Insecticidal Activity of lipophilic Amides. Part I: 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.
- Epstein, W., Nettz, F. D. y Beidel, L. J., (1973). Isolation of piperin from black pepper. *J. Chem. Educ.* 7(70). pp. 598-599.
- Estrada, L.E., (1979)., Estudio biológico y cotejo experimental de la yerba del sapo ( *Eryngium heterophyllum Engelm* ) en la prevención y curación de los cálculos biliares inducido en el jamster dorado ( *Mesonicotus aratus* ). Tesis de Maestría centro de botánica. Colegio de Postgraduados. México.
- Estrada, L.E., (1985)., Avances en las investigaciones sobre plantas medicinales en la universidad Autónoma Chapingo, Edo. de México, Mineógrafo. Departamento de fitotécnia, Sección Plantas Medicinales. Universidad Autónoma Chapingo.
- Fish, F.A., Gray, I., Watterman, P., (1975)., Coumarin and lignans from the bark of *Zanthoxylum avicennae*. *Phytochemistry*. 14. pp. 841.
- Fish, F.A., Gray, I., Watterman, P.G. and in Part. Donachie, F. (1975)., Alkaloids and coumarins from North American *Zanthoxylum avicennae*. *Phytochemistry*. 14. pp.841.
- Fish, F. A., Gray, I., Watterman, P.G. and Part. Domachie, F. (1975)., Alkaloids and coumarins from north American *Zanthoxylum species*. *J. Nat. Prod.* 38 (3). pp.248.
- Gilotra, J. (1973). Determination of susceptibility levels of mosquitoes to nonpersistent insecticides by microinjections. *Mosquito News*. 32 (3), 358-63.

- 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). pp. 201-8.
- Gilchrist, C., (1960). Osservazioni general: Sull' *Artemia salina* leach delle saline di cagliari. *Zool. Anz.* 29. pp. 284-291.
- Goth, C.W., (1970)., *Farmacología clínica*, 12va edición, Ed. Médica panamericana, Montevideo. pp. 47-50.
- Haller, H. L., Laforae, F.B. y Sullivan W. N., (1942), The presence of an insecticidal principles in the bark of southern prickly ash. *J. Am. Chem. Soc.* 64 (187).
- Hansch, C., (1968)., The use of homolytic, steric, and hydrophobic constants in structure- activity study of 1,3-benzodioxole synergists. *J. Med. Chem.* 11 pp.921-927.
- Haral, G. (1984). Alkamides: Structural Relationshipsp, Distribution and Biological Activity. *Planta Médica*. 80, pp. 366-375.
- Harwood, R. F. y James, M. T. (1987). *Entomología Médica y Veterinaria*. Limusa. México D.F. pp. 9-25, 61-93, 139-169, 201-270, 343-485.
- Hegnauer, R., (1973)., *Zanthoxylum punctatum*, magnoflorina chemo taxonomie. *Der. Flasen.* 6. pp.231.
- Hennessy, D. J., (1965), Hydride transferring ability of methylenedioxybenzenes as a basis of synergistic activity. *J. Agr. Food Chem.* 13:218.
- Heywood, V.H., ed. (1978,1979)., *Flowering plants of the world* University Press. london.
- Hisashi., Ishi., Tsutomu, I, (1982)., Estudios on the chemical constituents of rutaceus. *J. Chem. Soc. Perkins Trans I* pp 2051.
- Hisashi, i., Kazuo, K., Ih-Sheng, C., (1982)., Estudios on the chemical constituents of *Z. integrifolium*. *Chem. Pharm. Bull.* 30 (6) pp.1992.
- Hodgson, E., (1974). *Comparative studies of cytochrome P-450 and its interaction with pesticides, in: Survival in toxic environments*, Academic Press, New york.

- Hodgson, E. y Philpot, R. M., (1974). Interaction of methylenedioxyphenil (1,3- benzodioxole) compounds with enzymes and their effect, in vivo, on animals. *Drug Metabol. Revs.* 3. pp. 231-301.
- Ichiro, Y. y Takeyda, K., (1981). Two new pungent principles isolated from the pericarps of *Z. allantoides*. *Chem. Pharm. Bull.* 29 (6). pp. 1791.
- Ichiro, Y., Koichi, T. y Hitokawa, H., (1982). Distribution of unsaturated alifatic acid amides in Japanese *Zanthoxylum species*. *Phytochemistry*. 21 (6). pp. 1295.
- Infante, Said y Zárate de Lara, Guillermo. (1984). Métodos Estadísticos. Trillas. México. pp. 181-236.
- Jacobson, M., (1971). In naturally Occurring insecticides, Ed. M. Jacobson and D.G. Crosby, Marcel Dekker, New York. pp. 137-176.
- Jacobson, M., (1983). In plants: The potentials for extracting protein, medicines and other useful chemicals: Workshop proceedings, Congressional office of technology assessment, Washington, D.C., pp. 138-146.
- Jacobus, J.B., Phillip, M., Viviers, D.F. y Roux, D.G., (1982). Condensed tanins: Competing nucleophilic centers in biometric condensation reaction. *Phytochemistry* 21 (6). pp. 1289.
- Jimenez, S.H., (1989)., Estudio químico de plantas medicinales mexicanas: Constituyentes de *Cecropia obtusifolia* (Guarumbo) y *Zanthoxylum liebmannianum*. (Colopahitís). Tesis de licenciatura Q.F.B. FES Zaragoza, UNAM, México.
- Klocke, J. A.. (1989), Plant compounds as sources and models of sect-control agents, Academia press, Limited economic medicinal plant, research, Volumen 1.
- Kuck, S.M., Albónico, A.M., Deuloteu and Escalante, M.G., (1967)., Alkaloides from Argentina *Fagara species*. *Phytochemistry*. 6. pp. 1541.
- Kubo, I. (1991). Screening Techniques for Plant-Insect Interactions. *Methods in Plant Biochemistry*. 6, 179-193.
- Kubo, I., Matsumoto, T., Klocke, J. A. and Kamikawa, T. (1984). In host plant resistance to pests. *Experientia*. 40:340.
- Laforge, F. B., Haller, H.L. y Sullivan, W. N., (1942). Presence of an insecticidal principles in the bark of southern prickly ash. *J. Am. Chem. Soc.* 64. pp. 187.

- Lichtenstein, E.P. and Casida J. E., (1963). In naturally occurring insecticides. *J. Agric. Food. Chem.* 11, pp. 410.
- Litter, M. *Farmacología experimental y clínica*, 7ma. Edición, Ed. Limusa. 1986, México.
- McIndoo, N. E., (1945). Plants of possible insecticidal value: a review of the literature up to 1941. E-661, Agricultural research administration, Bureau of Entomology and plant Quarantine, U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C.
- Marr, K.L. y Tang, C.S., (1992). Volatile insecticidal compounds and chemical variability of Hawaiian *Zanthoxylum* (rutaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 20 (3), pp. 209-217.
- Marcos, M., Jiménez, C., Villaverde, C.M., Riguera, R., Castedo, L. and Sternitz F., (1988). Lignans and other constituents from south and central American *Zanthoxylum* species. *Planta Medica*. 56. pp. 89-91.
- Martínez, M., (1969). *Plantas medicinales de México*. Ed. Botas, México.
- Martínez, M., (1979). *Plantas Mexicanas, nombres vulgares y científicos*. Ed. Fondo de cultura Económica, México.
- 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. 359-489.
- Miyakado, M., Nakayama, L., Inoue, A., Ohno, N. and Yoshioka, H., (1982). In abstract Pap., 5th int. Cong. of pesticides chemistry, 29 Aug- 4 Sept., 1982. Kyoto, Abstract IIIc-28.
- Miyakado, M., Nakayama, I., Ohno, N. and Yoshioka, H., (1983). In natural products for innovative pest management, Ed. D.L. Whitehead and W.S. Bowers, Pergamon Press, New York, pp. 369-382.
- Miyakado, M., Nakayama, I., y Ohno, N., (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.
- Muñoz, A. M., Torres, R., (1982). Auriapten and flindersine from *Zanthoxylum coco*. *J. Nat. Prod.* 45 pp. 367.

- Mulla, M. S. (1964). Persistence of mosquito larvicides in water. *Mosquito News*. 23 (3), 234-7. Chemical Abstracts 60:22711.
- Najjar, S., Geoffrey, A., (1982). Alkaloids and coumarins from *Zanthoxylum belizense*. *Phytochemistry*. 14 pp. 2307-2310.
- Nakatani, N. y Inatani, R. (1981). Isobutyl Amides from Pepper (*Piper nigrum* L) *Agric. Biol. Chem.* 45(6), pp. 1473-1476.
- Navarrete, C.A., (1986). Estudio químico de las plantas medicinales usadas en medicina tradicional. Tesis de maestría en ciencias químicas, Fac. Química. UNAM.
- Navarrete, C.A., Reyes, T.B., Aguirre, E., y Estrada, E., (1987). Estudio químico de *Zanthoxylum liebmannianum* (colopahtle), XVI Simposium internacional de química de productos naturales Monterrey N. León, México, 28-30, abril pp. 3-7.
- Pine, Stanley., Hendrickson, James, Cram., Donald y Hammond, George. (1984). *Química Orgánica*. 4a. edición. McGrawHill. México D. F. 62-64, 344-348.
- Pineda, G. P., (1974). Síntesis de N-isobutilamidas metoxiladas y determinación de su actividad larvicida en *Culex quinquefasciatus* (Culicidae) y en *Artemia salina* (leanch)
- Peineman., (1986). Description of structure of Sesamin, *Arch. Pharm.* 234 pp. 238.
- Pumarola, A., (1980). Microbiología y parasitología médica. Editores salvat, Barcelona, pp. 831.
- Ramirez, Z.R., Montesinos, J.G., (1985). Estudio químico y pruebas farmacológicas preliminares de *Zanthoxylum liebmannianum* (colopahtle). Tesis de licenciatura FEZ Zaragoza, UNAM, México.
- Rao, K.V. y Davies, R., (1986). The ichthiotoxic principles of *Zanthoxylum clava-herculis*. *J. Of Nat. Prod.* 49 (2) pp. 340.
- Reyes, B., Navarrete, A., Sixtos, C., Aguirre E., Jimenez, S. y Estrada, E. (1991) Constituyentes químicos de *Zanthoxylum liebmannianum* (engl) p. wilson "Colopahtle", una planta medicinal Mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 21(5), 30-34.
- Resich, J. y Dieter, B., (1986). Constituents of *Fagara macrophylla* and *Zanthoxylum rigidifolium*. *Pericarps*. *J. of Nat. Prod.* 49 (60) pp. 1167.

Rodríguez, 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.

Secoy, D. M. y Smith, A. E., (1983). In natural products for innovative pest management. *Ecom Bot.* 37(28).

Schlosser, G. T., (1956). Salt migration to the northwest body of great salt lake, *Science.* 143. pp. 1027-1029.

Schöberder, D.R., (1968)., Two alkaloids optically active. *J. of Nat. Prod.* 45 pp. 367.

Simeray, J. y Chamount, P., (1985)., Zanthoxamidas: and aromatic amide from *Zanthoxylum thomense*. *Phytochemistry.* 11 (24) pp. 2720.

Sofowora, A.E., (1971)., Reversal of sking and cremation in Erythrocytes by the root of *Fagara zanthoxyloides*. *Lloydia* 34 (4) pp.383.

Stanley, P.C., (1920)., Trees and shrubs of México. Washington Government printing office. pp. 503.

Su, H. C. F., (1985). In comprehensive insect physiology, Biochemistry and Pharmacology, Ed. G.A., Kerkut and L.I. Gilbert, Vol. 12, Pergamon Press, New York. pp. 273-258.

Sun, Y. P. y Johnson, E. R., (1960). Synergistic and antagonistic action of insecticide synergist combinations and their mode of action. *J. Agr. Food Chem.* 8 (261).

Swinehart, J.A., Stermitz, F.R., (1980)., Alkaloids and other constituents of *Z. williamsii*, *Z. monophyllum* and *Z. fagara*. *Phytochemistry.* 19 (7-9) pp. 1469.

Swinehart, J.A., Stermitz, F.R., (1980)., Bishordenyl terpene alkaloids and other constituents of *Z. cullantrillo* and *Z. ciriacum*. *Phytochemistry.* 19. pp. 1219.

Takahashi, K. y Nakagawa, K., (1966). Studies on constituents of medicinal plants. The stereochemistry of plawlomisan isopawllowin. *Chem. Pharm. Bull.* 14. pp. 641.

Tamayo, A.D., (1985)., Determinación de la actividad enzimática de *Entamoeba histolytica* después de adicionar colopahitle (*Z. liebmannianum*). Tesis de licenciatura Q.F.B. FES Zaragoza, UNAM, México.

Ullrich, V. y Schnabel, K. H., (1973). Formation and binding of carbanions by cytochrome P-450 of liver microsomes. *Drug Metab. Disposition.* 1:176.

- Watterman, P.G., (1975)., Alkaloids from the root bark of *Z. myriacantum*. *Phytochemistry* . 14 pp.2530.
- Watterman, P.G., (1976)., Chemiosistemática in the rutaceae comparative studie on the alkaloid of *Zanthoxylum leprieurii*, *Z. rubescens*. *Biochem. Syst. Ecol.* 4 (4).
- Watterman, P.G., Fish, F., (1975)., Alkaloids and Triterpes and lignans from the bark of *Z. diaklangel*. *Phytochemistry* 14 pp. 2094.
- Windholz, M., Budavari, S., Blumetti, R. F. and Otterbein, E. S., (1983). The Merck Index, 10th edn., Merck and Co., Rahway, New Jersey, pp. 27, 665, 1191-1192.
- Wingrove, A. y Caret, R., (1984). *Química orgánica*. Harla, México, D. F. pp. 108-113.
- Wilkinson, C. F., (1976). Correlations of biological activity with chemical structure and physical properties, in: *Pesticide formulations* (W. van valkenburg ed.) . Marcel dekker, New York. pp. 1-64.
- Velazquez, L., (1987)., *Farmacología y su proyección a la clínica*, 15va edición, Ed. Oteo, Madrid, pp.73-78.
- Zhing, Ch., Teng, L., (1981)., Estudios on the chemical constituents of the *Zanthoxylum simulans*. Skimianine, (-)-Eduiline, (-)-ribaline, (-)-aralicpsine. *Yao xue xuebao*. 16(5). pp. 394.

## XII. APENDICE.

### INDICE DE ESPECTROS DE RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

#### A). $\alpha$ -SANAHOOL.

ESPECTRO 1: RMN-<sup>1</sup>H.....99

ESPECTRO 2: RMN-<sup>13</sup>C.....99

#### B). SESAMINA.

ESPECTRO 3: RMN-<sup>1</sup>H.....100

#### C). ASARININA.

ESPECTRO 4: RMN-<sup>1</sup>H.....100

#### D). FAGARAMIDA.

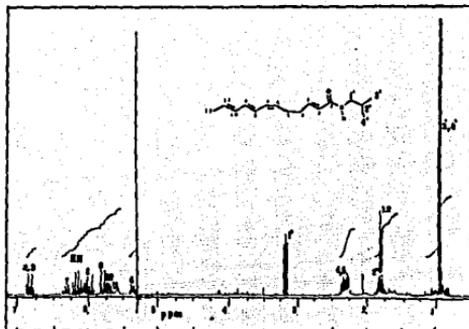
ESPECTRO 5: RMN-<sup>1</sup>H.....101

ESPECTRO 6: RMN-<sup>13</sup>C.....101

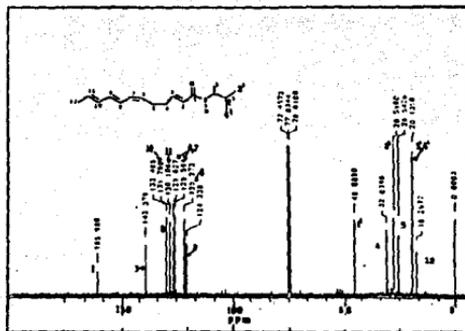
#### E). PIPERINA.

ESPECTRO 7: RMN-<sup>1</sup>H.....102

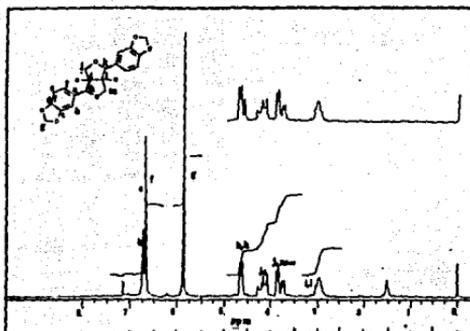
ESPECTRO 8: RMN-<sup>13</sup>C.....102



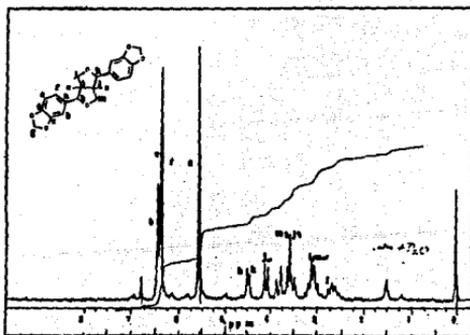
ESPECTRO 1: RMN-<sup>1</sup>H DEL  $\alpha$ -SANSHOO.



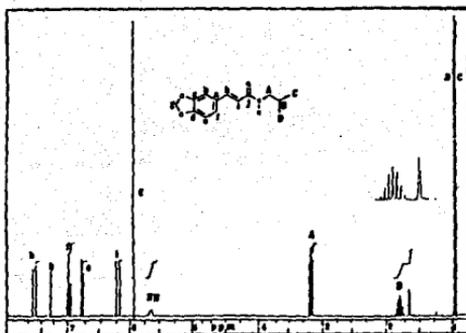
ESPECTRO 2: RMN-<sup>13</sup>C DEL  $\alpha$ -SANSHOO.



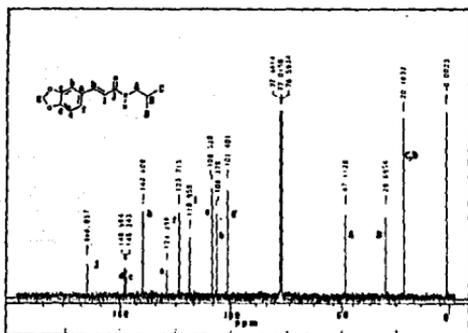
ESPECTRO 3: RMN-<sup>1</sup>H DE LA SESAMINA



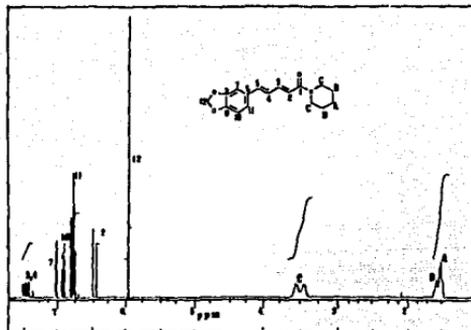
ESPECTRO 4: RMN-<sup>1</sup>H DE LA ASARIMINA



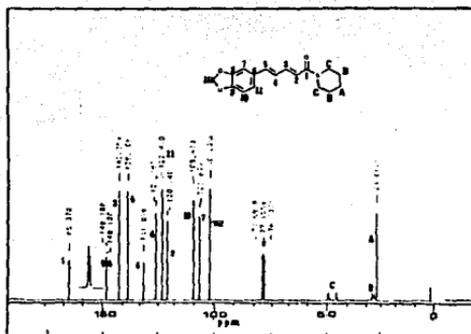
ESPECTRO 5: RMN-<sup>1</sup>H DE LA FAGARAMIDA



ESPECTRO 6: RMN-<sup>13</sup>C DE LA FAGARAMIDA.



ESPECTRO 7: RMN-<sup>1</sup>H DE LA PIPERINA.



ESPECTRO 8: RMN-<sup>13</sup>C DE LA PIPERINA.