

## Investigación

# Análisis isobolográfico de la interacción entre $\alpha$ -sanshool, sesamina, asarinina, fagaramida y piperina sobre la actividad larvícida en *Culex quinquefasciatus* Say

Andrés Navarrete,<sup>1,\*</sup> Alejandro Flores,<sup>2</sup> Carmen Sixtos<sup>3</sup> y Benito Reyes<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México D.F.; Fax: +5622-5329; E-mail: anavarrrt@servidor.unam.mx

<sup>2</sup> Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Guelatao 66, Colonia Ejercito de Oriente, Iztapalapa 09230, México D.F., México.

<sup>3</sup> Laboratorio de productos Naturales. Área de Química, Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco 56230, Estado de México, México

Recibido el 29 de abril del 2003; aceptado el 25 de junio del 2003

Dedicado al Dr. Alfonso Romo de Vivar

**Resumen.** Se realizó el análisis isobolográfico de la interacción larvícida entre  $\alpha$ -sanshool con sesamina, asarinina, fagaramida y piperina en *Culex quinquefasciatus*. El  $\alpha$ -sanshool fue el compuesto más activo ( $CL_{50} = 3.97 \pm 0.61$  ppm) seguido de fagaramida ( $CL_{50} = 7.92 \pm 1.22$  ppm), piperina ( $CL_{50} = 10.02 \pm 2.44$  ppm), asarinina ( $CL_{50} = 69.95 \pm 15.00$  ppm) y sesamina ( $CL_{50} = 277.4 \pm 35.75$  ppm). La sesamina y la asarinina presentaron una interacción sinérgica con el  $\alpha$ -sanshool, en tanto que con fagaramida y con piperina se observó un efecto aditivo.

**Palabras clave:** Análisis isobolográfico, actividad larvícida,  $\alpha$ -sanshool, sesamina, asarinina, fagaramida piperina, *Culex quinquefasciatus*.

**Abstract.** An isobolographic analysis of larvicidal interactions between  $\alpha$ -sanshool with sesamin, asarinin, fagaramide and piperine on *Culex quinquefasciatus* was performed.  $\alpha$ -Sanshool was the most active compound ( $LC_{50} = 3.97 \pm 0.61$  ppm) followed by fagaramide ( $LC_{50} = 7.92 \pm 1.22$  ppm), piperine ( $LC_{50} = 10.02 \pm 2.44$  ppm), asarinin ( $LC_{50} = 69.95 \pm 15.00$  ppm) and sesamin ( $LC_{50} = 277.4 \pm 35.75$  ppm). Synergistic interaction between  $\alpha$ -sanshool and sesamin or asarinin was observed, whereas with fagaramide or piperine produced an additive effect.

**Keywords:** Isobolographic analysis, larvicidal activity,  $\alpha$ -sanshool, sesamin, asarinin, fagaramide, piperine, *Culex quinquefasciatus*.

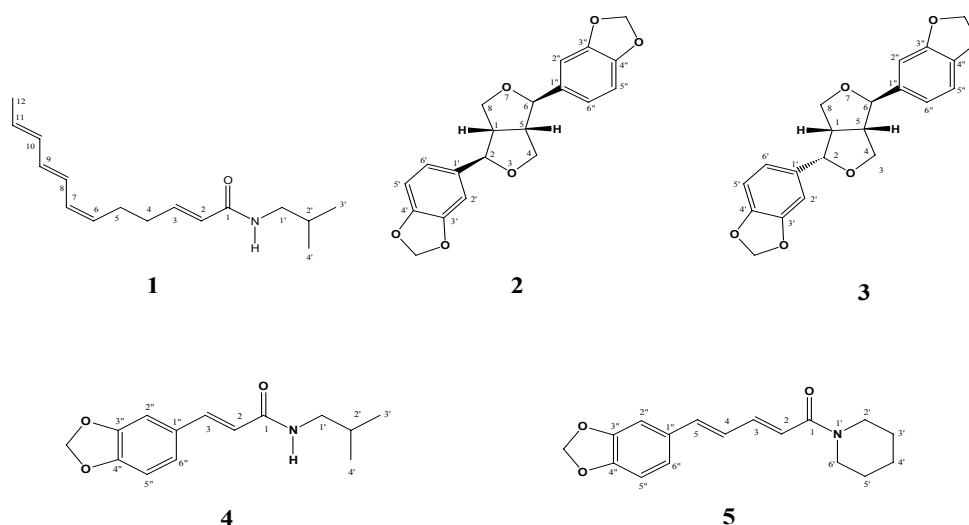
## Introducción

Los mosquitos son transmisores de varias enfermedades entre los que se encuentran la malaria, la filariasis, la encefalitis y el dengue [1]. Los insecticidas sintéticos son los recursos más importantes en la actualidad para el control de los mosquitos, sin embargo, su uso indiscriminado ha tenido un efecto negativo sobre el medio ambiente y muchas especies de mosquitos han creado resistencia a ellos [2]. Estos factores han dado lugar a investigaciones dirigidas a encontrar agentes de control de los mosquitos que sean biodegradables, específicos y en armonía con la ecología. Los productos derivados de las plantas cumplen con algunas de estas características, y han sido utilizados tradicionalmente por comunidades humanas en muchas partes del mundo en contra de las especies de insectos vectores y plagas por sus propiedades larvicidas, reguladoras del crecimiento, repelentes y por sus efectos sobre la ovoposición en insectos [2]. La investigación en los productos naturales para el control de los insectos vectores de enfermedades sigue siendo una actividad prioritaria y aún no agotada. Una estrategia en esta área es la búsqueda de nuevas estructuras bioactivas, otra puede ser la utilización de los compuestos bioactivos en combinaciones estratégicas que mejoren sus

efectos individuales y que puedan dar lugar a productos de más pronto uso.

El  $\alpha$ -sanshool **1** (Fig. 1) es una isobutilamida con actividad larvícida aislada de la corteza de *Zanthoxylum liebmannianum* [3]. El  $\alpha$ -sanshool pertenece a un grupo de compuestos de origen natural con propiedades insecticidas importantes, cuyas fuentes principalmente de obtención son las plantas de las familias Piperaceae, Aristolochiaceae y Rutaceae [4-9]. Las isobutilamidas causan la caída rápida y la muerte de insectos voladores [5], sin embargo, la mayoría de ellas son poco estables al medio ambiente y son oxidadas rápidamente por los insectos. Se sabe que las isobutilamidas afectan a los canales de sodio [9] y que bloquean a los canales de calcio [10], pero en realidad, se conoce muy poco de su mecanismo de acción insecticida y menos aún se conoce la forma en la cual causan una variedad de actividades en diversos organismos, incluyéndose a los mamíferos en donde provocan anestesia local y convulsiones [11-15].

En la formulación de insecticidas comerciales es común la adición de otras sustancias para mejorar su efecto. Entre estas sustancias se encuentran aquellas que inhiben a las enzimas responsables de la oxidación microsomal como la sesamina **2** (Fig. 1) [16] o la combinación con otros compuestos que



**Fig. 1.** Estructura de los compuestos evaluados.  $\alpha$ -Sanshool **1**, sesamina **2**, asarinina **3**, fagaramida **4** y piperina **5**.

tienen actividad insecticida, como la asarinina **3**, que se sabe incrementa la actividad de las piretrinas [17]. En los últimos años el estudio de la interacción entre dos sustancias activas se ha realizado utilizando el análisis isobolográfico [18], una estrategia utilizada en farmacología que ha dado lugar a la combinación óptima de fármacos de uso clínico [19]. Este método ofrece una evaluación rigurosa de la interacción entre dos sustancias activas, ya que permite definir una simple adición de los efectos individuales (*efecto aditivo*), una atenuación (*efecto subaditivo*) o un sinergismo (*efecto superaditivo*) entre ellas [20]. Mediante la construcción de un *isoblograma* (Fig. 2), que es una gráfica en coordenadas rectangulares de pares de dosis o concentraciones ( $z_1$ ,  $z_2$ ) de las sustancias respectivas que producen un nivel determinado de efecto (por ejemplo 50 % del efecto) cuando se aplican en forma conjunta. En esta gráfica los interceptos ( $Z_1^*$ , 0) y (0,  $Z_2^*$ ) corresponden a la concentración del compuesto menos activo ( $Z_1^*$ ) y del compuesto más activo ( $Z_2^*$ ) que producen individualmente el mismo nivel de efecto (muerte del 50 % de las larvas). La línea que une a estos dos puntos define a la *línea de aditividad* y todos los puntos sobre esta línea, que tienen las coordenadas ( $z_1$ ,  $z_2$ ), teóricamente representan los pares de *dosis aditivas* ( $Z$  teo) de los constituyentes administrados en forma conjunta que provocan el mismo nivel de efecto que los compuestos individuales. En la Fig. 2 los puntos *A* y *B* corresponden a las concentraciones teóricas aditivas ( $Z$  teo) para dos proporciones fijas de las dos sustancias activas. Si al realizar el experimento, las concentraciones para provocar el mismo efecto ( $Z$  exp) son menores que las teóricas aditivas ( $Z$  teo) indicará que existe un *efecto superaditivo* o *sinergista* entre ambas sustancias (puntos *P* y *R* en la Fig. 2) pero por el contrario, si las concentraciones experimentales ( $Z$  exp) son mayores a las concentraciones teóricas aditivas ( $Z$  teo) indicará que existe un *efecto subaditivo* entre ambas sustancias (puntos *Q* y *S* en la Fig. 2). En el análisis isobolográfico de la interacción de dos sustancias activas se demuestra estadísticamente si existe diferencia significativa entre las concentraciones teóricas aditivas ( $Z$  teo) y las concentraciones experimentales

( $Z$  exp) que provocan el mismo nivel de efecto en una proporción determinada de dichas sustancias, si no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre  $Z$  teo y  $Z$  exp indicará una *interacción aditiva* entre estas dos sustancias, es decir que el efecto resultante será la suma de los efectos individuales de las dos sustancias activas [20]. Por el contrario, si no hay diferencia entre  $Z$  teo y  $Z$  exp, esto indicará que el mecanismo de acción por el cual actúan las dos sustancias es similar [20]. En el presente trabajo se realizó el estudio de la interacción del  $\alpha$ -sanshool con diferentes proporciones de sesamina, asarinina, fagaramida **4** o piperina **5** (Fig. 1) a través del análisis isobolográfico, con el propósito de conocer de una manera objetiva las combinaciones que permitan mejorar el efecto larvicida del  $\alpha$ -sanshool. Un segundo objetivo de este trabajo fue definir, mediante este análisis, qué tipo de interacción se presenta entre estos compuestos bioactivos de origen natural, a fin de proporcionar información dirigida hacia encontrar las combinaciones que permitan el desarrollo de productos larvicidas eficaces en el control de vectores transmisores de enfermedades importantes para el hombre y los animales. Para alcanzar esta meta se determinó el efecto

**Cuadro 1.** Valores de la  $CL_{50} \pm EEM$  del efecto larvicida de los compuestos individuales sobre larvas de mosquito común en su cuarto instar.

Compuesto	$CL_{50} \pm EEM$ (ppm) <sup>1</sup>	Potencia relativa <sup>2</sup>
$\alpha$ -Sanshool	$3.97 \pm 0.61$	1.0
Sesamina	$277.4 \pm 35.75$	69.8
Asarinina	$69.95 \pm 15.00$	17.6
Fagaramida	$7.92 \pm 1.22$	1.99
Piperina	$10.02 \pm 2.44$	2.51

<sup>1</sup> EEM = error estándar de la media para 4 niveles de concentración con  $n = 30$  en cada nivel y un valor de  $r > 0.9$  del análisis probit.

<sup>2</sup> Respecto al valor de  $\alpha$ -sanshool:  $CL_{50}$  del compuesto/ $CL_{50}$  de  $\alpha$ -sanshool, e indica el número de veces que debe incrementarse la concentración del compuesto para que se presente el mismo nivel del efecto larvicida que el  $\alpha$ -sanshool.

**Cuadro 2.** Concentraciones equiefectivas teóricas ( $Z_{teo}$ ) y experimentales ( $Z_{exp}$ )  $\pm$  EEM de las combinaciones que provocan el 50 % de la muerte de las larvas de *C. quinquefasciatus*<sup>a</sup>.

Combinación	Proporción	$Z_{teo} \pm EEM$	$Z_{exp} \pm EEM$	Fracción totalb
$\alpha$ -Sanshool: sesamina	1: 24.45	$14.722 \pm 1.52$	$2.19 \pm 0.31^*$	0.31
	1: 6.48	$40.44 \pm 4.80$	$3.512 \pm 0.127^{**}$	0.14
	1: 0.32	$210.96 \pm 27.06$	$10.074 \pm 0.012^{**}$	0.05
	1: 0.11	$250.40 \pm 32.16$	$100.15 \pm 0.018$	$^{**}0.39$
$\alpha$ -Sanshool: asarinina	1: 15.7	$7.95 \pm 1.07$	$1.84 \pm 0.13^{**}$	0.22
	1: 6.4	$12.95 \pm 2.1$	$4.03 \pm 0.29^*$	0.30
	1: 0.13	$62.45 \pm 13.3$	$10.08 \pm 0.03^{**}$	0.16
$\alpha$ -Sanshool: fagaramida	1: 2.5	$5.11 \pm 0.56$	$4.51 \pm 0.47$	0.88
	1: 0.9	$6.07 \pm 0.71$	$4.34 \pm 0.56$	0.72
$\alpha$ -Sanshool: piperina	1: 7.3	$4.7 \pm 0.61$	$3.89 \pm 0.58$	0.82
	1: 1.6	$6.3 \pm 1.00$	$4.93 \pm 0.6$	0.78

<sup>a</sup>Las concentraciones son el total en la combinación expresadas en ppm. <sup>b</sup>De acuerdo a la ecuación 1 descrita en la parte experimental, los valores cercanos a 1 indican aditividad y los valores  $< 1$  indican superaditividad o sinergismo [36]. Diferencia significativa con un valor de  $*p < 0.05$  o  $^{**}p < 0.01$  respecto al valor teórico correspondiente [19, 36].

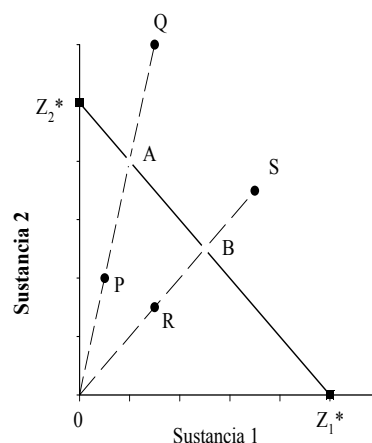
letal de diferentes concentraciones de los compuestos puros y en diferentes combinaciones sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* en su cuarto instar [21].

## Resultados y discusión

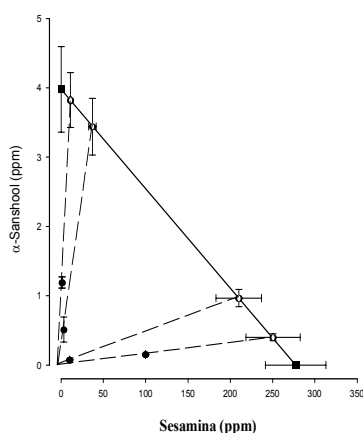
EL  $\alpha$ -sanshool, la sesamina, la asarinina, la fagaramida y la piperina en forma individual presentaron efecto larvicida sobre *Culex quinquefasciatus* dependiente de la concentración ( $p < 0.05$ ). En el Cuadro 1 se presentan los valores de la concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ) de cada una de estas sustancias determinadas por el método probit [22]. El  $\alpha$ -sanshool presentó el efecto larvicida más potente, seguido en orden descendente por fagaramida, piperina, asarinina y sesamina (Cuadro 1).

Las proporciones y los valores teóricos y experimentales de la concentración equiefectiva de las diferentes combinaciones evaluadas se proporcionan en el Cuadro 2. El isoblograma de la combinación  $\alpha$ -sanshool-sesamina en las cuatro diferentes proporciones evaluadas indica que existe una interacción superaditiva entre estas dos sustancias (Fig. 3). La combinación con 10 ppm de sesamina presentó el efecto sinergista mayor, ya que incrementó la actividad del  $\alpha$ -sanshool que pasó de una  $CL_{50} = 3.97$  ppm (Cuadro 1) a sólo 0.07 ppm en la combinación (Fig. 3). La administración simultánea de  $\alpha$ -sanshool + asarinina también indican una interacción superaditiva en las tres combinaciones evaluadas y también la combinación con 10 ppm de asarinina presentó el efecto sinergista mayor (Fig. 4). En contraste, los isoblogramas resultantes de la administración simultánea de  $\alpha$ -sanshool + fagaramida (Fig. 5) y  $\alpha$ -sanshool + piperina (Fig. 6) presentaron una interacción aditiva, a pesar de que los puntos de las concentraciones experimentales que provocan la muerte del 50 % de las larvas de *C. quinquefasciatus* se encontraron en la zona de superaditividad, las diferencias no fueron lo suficientemente grandes para que existieran diferencias estadísticamente significativas con respecto a las concentraciones teóricas para provocar el mismo efecto como resultado de la adición de los efectos individuales (Cuadro 2).

La interacción superaditiva o sinergista de la sesamina con el  $\alpha$ -sanshool apoyan la propuesta de que las isobutilamidas actúan de manera similar a las piretrinas; en efecto, se sabe que la sesamina aumenta la actividad insecticida de las piretrinas al inhibir el sistema enzimático oxidante de función mixta [23], en particular el proceso de oxidación dependiente de la isoforma CYP3A [24]. Las propiedades sinérgicas de la asarinina para incrementar la actividad de las piretrinas fue descrito desde 1942 por Haller y sus colaboradores [18]; sin embargo, no se ha descrito cual es su mecanismo de acción por el que se produce el sinergismo. En el análisis isoblográfico (Fig. 4) se observó un comportamiento similar con la



**Fig. 2.** Isoblograma en donde se muestra la línea de aditividad (línea continua) para las sustancias 1 y 2, determinada por las concentraciones equiefectivas individuales  $Z_1^*$  y  $Z_2^*$ . Las líneas radiales discontinuas representan las combinaciones de dos proporciones fijas de las dos sustancias. La línea radial OS representa las combinaciones de las sustancias 1 y 2 que guardan una proporción fija  $0.5 Z_1^* : 0.5 Z_2^*$ . La línea radial OQ representa las combinaciones de las sustancias 1 y 2 que guardan otra proporción de  $Z_1^*$  y  $Z_2^*$ . Los puntos A y B representan las cantidades teóricas aditivas ( $Z_{teo}$ ), los puntos P y R representan las cantidades experimentales ( $Z_{exp}$ ) con un efecto superaditivo y los puntos Q y S representan las cantidades experimentales ( $Z_{exp}$ ) con un efecto subaditivo.



**Fig. 3.** Isoblograma de la interacción entre  $\alpha$ -sanshool y sesamina en las cuatro proporciones de concentraciones evaluadas. Los círculos vacíos sobre la línea oblicua entre los ejes  $x$  y  $y$  representan los valores teóricos de aditividad, en tanto que los círculos llenos sobre las líneas radiales discontinuas representan los valores experimentales encontrados. Las barras horizontales y verticales indican el error estándar de la media. Los puntos experimentales cayeron muy por debajo de la línea de aditividad, indicando un sinergismo significativo ( $p < 0.05$ ) en las cuatro proporciones de concentración evaluadas.

sesamina, lo que podría indicar que la asarinina, que es un estereoisómero de la sesamina, actúe también inhibiendo el sistema oxidante de los insectos [23]. Cabe señalar que la sesamina y la asarinina presentaron el efecto larvicida más bajo cuando se evaluaron en forma individual (Cuadro 1).

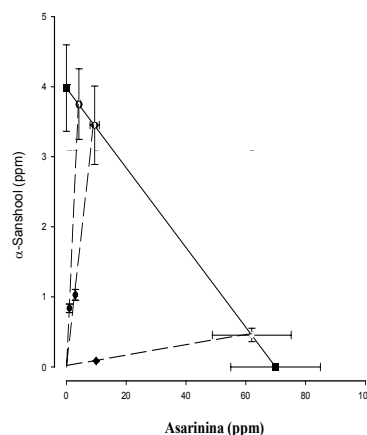
La  $CL_{50}$  ( $7.92 \pm 1.22$  ppm) de la fagaramida encontrada en este trabajo, es cercana a la encontrada por Kubo y sus colaboradores, quienes reportan un valor de la  $CL_{50}$  de 15 ppm en *Culex pipiens* [13]. De acuerdo a la información que proporciona el análisis isobolográfico, el efecto aditivo observado en la interacción entre  $\alpha$ -sanshool y fagaramida (Fig. 5), indica que estos dos compuestos actúan por un mecanismo de acción similar [25]. Este efecto aditivo puede deberse a que ambos compuestos pertenecen a la familia de las isobutilamidas, aunque una es alifática y la otra es aromática de cadena corta. La interacción  $\alpha$ -sanshool-piperina también resultó en una interacción aditiva (Fig. 6). El análisis isobolográfico permite postular que el efecto larvicida de la piperina se realiza por un mecanismo de acción similar al de las isobutilamidas. La baja actividad antioxidante descrita para la piperina [26] debido más bien a su efecto inhibidor selectivo por las isoformas CYP1A1 y CYP2B1 [27-29] ponen de manifiesto que el  $\alpha$ -sanshool no se oxida por estas enzimas o que dichas isoformas del citocromo P450 no existen en las larvas de *C. quinquefasciatus*. Existe contradicción respecto a un trabajo en el cual, de una manera indirecta, demuestran que la piperina inhibe a la isoforma CYP3A4 en células hepáticas de seres humanos [30], de ser así se esperaría que la piperina presentara un efecto sinérgico similar al de la sesamina, sin embargo, lo que se observó fue un efecto aditivo. Se requiere de mayor trabajo experimental para definir la importancia de las diferentes isoformas del citocromo P450 en la inhibición de las enzimas oxidantes de las isobutilamidas.

En conclusión, el análisis isobolográfico de la interacción del  $\alpha$ -sanshool con sesamina y con asarinina, permitió definir una interacción sinérgica entre las mezclas binarias de  $\alpha$ -sanshool con estos dos lignanos, atribuida probablemente al efecto inhibidor del sistema oxidante en las larvas de *Culex quinquefasciatus*; en tanto que la interacción con fagaramida y con piperina presentó un efecto aditivo, que indica que estos dos insecticidas actúan por un mecanismo de acción similar al del  $\alpha$ -sanshool. El incremento importante en la actividad larvicida del  $\alpha$ -sanshool por sesamina y por asarinina puede considerarse para el desarrollo de un larvicida con estos productos naturales, ya que supera la actividad larvicida de otros productos naturales individuales y la formación de mezclas binarias que presenten sinergismo puede ser una buena estrategia a considerar para obtener agentes útiles en el control de los mosquitos vectores de enfermedades importantes y que puedan constituirse en productos comercialmente rentables. Por otro lado, la aplicación del análisis isobolográfico en el campo de los biocidas puede representar una estrategia útil para optimizar la actividad de sustancias bioactivas.

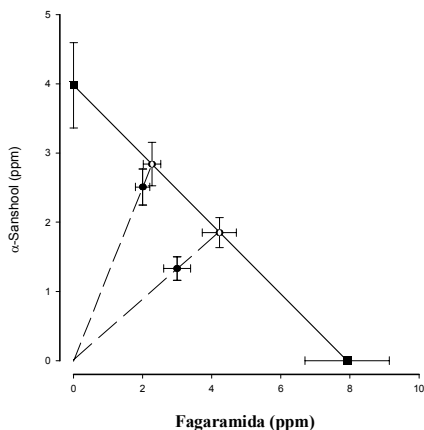
## Parte experimental

**Material vegetal.** Las hojas y la corteza del tronco de *Z. liebmannianum* fueron colectadas en de 1995 en San Andrés Cacaloapan del municipio de Tehuacán, Puebla. Una muestra de referencia se encuentra depositada en el Herbario de Plantas Útiles Efraim Hernández X de la Universidad Autónoma Chapingo con el registro XOLO19822126.

**Procedimientos Generales.** Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Electrothermal Digital IA9100 y no están corregidos. Los espectros de IR se registraron en un espectrómetro Perkin Elmer modelo 599. Los espectros de RMN- $^1H$  (300 MHz) y de RMN- $^{13}C$  (75MHz) se obtuvieron en un



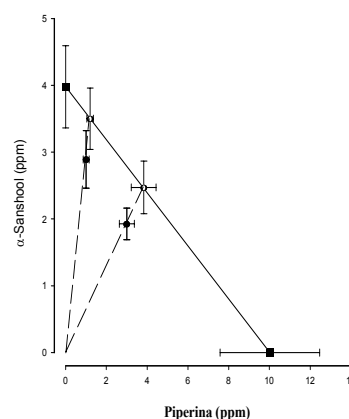
**Fig. 4.** Isoblograma de la interacción entre  $\alpha$ -sanshool y asarinina en las tres proporciones de concentraciones evaluadas. Los puntos experimentales (círculos llenos) cayeron por debajo de la línea de aditividad, indicando un sinergismo significativo ( $p < 0.05$ ) en las tres proporciones de concentración evaluadas.



**Fig. 5.** Isoblograma de la interacción entre  $\alpha$ -sanshool y fagaramida en las dos proporciones de concentraciones evaluadas. Los valores experimentales (círculos llenos) no fueron estadísticamente diferentes de los valores teóricos (círculos vacíos) representados sobre la línea de aditividad, lo que indica un efecto aditivo entre estas dos sustancias.

espectrómetro Varian VXR-3005 en  $\text{CDCl}_3$ , utilizándose TMS como estándar interno. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro Hewlett-Packard modelo 5890 a 70 eV. La rotación óptica se midió en un polarímetro Perkin-Elmer 241 utilizándose cloroformo como disolvente.

**Extracción e identificación de los compuestos.** La corteza seca y molida (2 kg) se extrajo por maceración por períodos de tres días en forma sucesiva con hexano (8 LX3) y con cloruro de metileno (8LX3). Después de eliminar el disolvente a presión reducida se obtuvieron 58 g de extracto de hexano y 141 g de extracto de cloruro de metileno. Una fracción del extracto de cloruro de metileno (31 g) fue separado por cromatografía en columna preparativa (5 d.i.  $\times$  80 cm), utilizándose 300 g de gel de sílice (Merck 70-230 mallas). La elución de la columna se realizó con cloruro de metileno y mezclas de cloruro de metileno y acetato de etilo (9:1; 8:2 y 1:1). Se colectaron un total de 80 fracciones de 100 mL cada una. Se reunieron las fracciones 29-46 de la elución con cloruro de metileno/acetato de etilo (9:1). El total de este conjunto de fracciones (4 g) se separaron en una segunda columna de gel de sílice (Merck 70-230 mallas, 40 g, 2.5 d.i.  $\times$  80 cm) utilizándose como mezcla de elución cloruro de metileno / acetato de etilo (9:2, 20 mL por fracción) de las fracciones 14-65 se obtuvo el  $\alpha$ -sanshool **1** en forma de aceite de color amarillo (0.635 g, 0.144 % de rendimiento, considerando la cantidad que se obtendría del total del extracto), el cual fue identificado por comparación de sus espectros de IR, masas, RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) y RMN- $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) con los datos espectroscópicos descritos previamente para esta amida [4, 31]: IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 3448, 2872, 1674, 1638, 1518, 994, 970; EMIE:  $m/z$  (int.rel): 247 ( $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}$ , 29), 204 ( $[\text{M}-\text{C}_3\text{H}_7]^+$ , 5), 167(20), 147(10), 141(97), 107(100), 98(12), 91(46), 79(70); RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz),  $\delta$ : 0.86 (s, 3H,



**Fig. 6.** Isoblograma de la interacción entre  $\alpha$ -sanshool y piperina en las dos proporciones de concentraciones evaluadas. Los valores experimentales (círculos llenos) no fueron estadísticamente diferentes de los valores teóricos (círculos vacíos) representados sobre la línea de aditividad, lo que indica un efecto aditivo entre estas dos sustancias.

H-3') 0.88 (s, 3H, H-4'), 1.75 (d, 3H,  $J=6\text{Hz}$ , H-12), 1.80 (m, 1H, H-2'), 2.25 (m, 4H, H-4, H-5), 3.10 (dd, 2H, 6.4, 12.9 Hz, H-1'), 6.20 (sa, H-N), 6.36-5.37 (m, H-6-H-11), 6.82 (m, H-2, H-3); RMN- $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)  $\delta$ : 165.98 (C-1), 124.22 (C-2), 143.38 (C-3), 32.05 (C-4), 26.54 (C-5), 129.62 (C-6), 129.59 (C-7), 125.27 (C-8), 133.46 (C-9), 131.79 (C-10), 130.10 (C-11), 18.29 (C-12), 46.88 (C-1'), 28.59 (C-2'), 20.13 (C-3', C-4').

Para obtener la sesamina **2** y la asarinina **3**, 2.9 kg de hojas secas y molidas de *Z. liebmannianum* se extrajeron por maceración con hexano (7L  $\times$  3) por períodos de tres días. Después de eliminar el disolvente se obtuvieron 62 g de extracto. El total del este extracto se separó por cromatografía en columna de gel de sílice (Merck 70-230 mallas, 970 g, 10 d.i.  $\times$  120 cm) iniciándose la elución con hexano y después con mezclas de hexano y acetato de etilo (9:1, 8:2, 1:1) y acetato de etilo. Se colectaron un total de 270 fracciones de 250 mL cada una. De las fracciones 15-67, eluidas con hexano/acetato de etilo (9:1), se obtuvo un sólido cristalino, que después de recrystalizarlo de éter isopropílico se obtuvieron 350 mg (0.012 %) de asarinina (p.f. 117-118  $^{\circ}\text{C}$ ). De las fracciones 93-103, eluidas también con hexano/acetato de etilo (9:1), cristalizaron 1.3 g (0.044 %) de sesamina (p.f. 121-122  $^{\circ}\text{C}$ ). La identificación de estos compuestos se realizó por comparación de sus espectros de IR, masas y RMN con las descritas previamente [4]. d(+)-Sesamina **2**:  $[\alpha]_D^{20} = +68$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ); IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 3022, 2881, 1488, 1245, 1041, 935, 810; EMIE:  $m/z$  (int.rel): 354 ( $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$ , 92), 203 (32), 150 (45), 149 (100), 135 (45), 121 (20), 103 (12), 65 (8); RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.04 (m, 2H, H-1, H-5), 3.85 (dd, 2H,  $J=4, 9\text{Hz}$ , H-4e, H-8e), 4.22 (dd, 2H,  $J=8, 9\text{Hz}$ , H-4a, H-8a), 4.70 (d, 2H,  $J=5\text{Hz}$ , H-2, H-6), 5.90 (s, 4H, O-CH<sub>2</sub>-O), 6.76 (m, 6H, H-2', H-5', H-6'). (+) Asarinina **3**:  $[\alpha]_D^{20} = +120$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ); IR  $\nu_{\text{max}}$  ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 3010,

2985, 1500, 1475, 1435, 1250, 1030, 925, 790, 630; EMIE: m/z (int.rel): 354 ( $M^+$ ,  $C_{20}H_{18}O_6$ , 25), 203, (15), 179 (10), 150 (26), 149 (100), 135 (49), 121 (15); RMN- $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 3.3 (m, 2H, H-1, H-8e), 4.81 (d,  $J = 6.43$  Hz, 1H, H-2), 3.85 (m, 2H, H-4a, H-8a), 4.08 (d,  $J = 6.9$  Hz, 1H, H-4e), 2.85 (m, 1H, H-5), 4.38 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H, H-6), 6.88 (m, 3H, H-2', H-5', H-6'), 5.93 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O), 5.95 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O); ); RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 75 MHz)  $\delta$ : 54.6 (d, C-1), 82.0 (d, C-2), 70.9 (t, C-4), 50.10 (d, C-5), 87.6 (d, C-6), 69.6 (t, C-8), 132.2 (s, C-1'), 135.1 (s, C-1''), 106.3 (d, C-2'), 106.5 (d, C-2''), 146.5 (s, C-3'), 147.1 (s, C-3''), 147.6 (s, C-4'), 147.9 (s, C-4''), 108.1 (d, C-5', C-5''), 118.6 (d, C-6'), 119.5 (d, C-6''), 100.9 (t, O-CH<sub>2</sub>-O), 101.0 (t, O-CH<sub>2</sub>-O).

La piperina **5** se obtuvo de la pimienta negra comercial, siguiendo la metodología descrita por Epstein y colaboradores [32]. Brevemente, 60 g de pimienta negra se calentaron a reflujo durante 20 minutos con 120 mL de cloruro de metileno. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente ( $22 \pm 2$  °C), se filtró al vacío y el residuo se lavó varias veces con cloruro de metileno. Después de eliminar el disolvente a presión reducida se obtuvo un aceite oscuro al cual se le adicionó éter etílico para inducir la precipitación de la piperina. El filtrado dejó un residuo amarillo en el papel filtro, el cual se lavó varias veces con éter etílico frío y posteriormente se recrystalizó de acetona, obteniéndose finalmente 1.36 g de piperina pura. P.f. 130-131 °C, IR v max (KBr)  $cm^{-1}$ : 1633, 1611, 1583, 1491, 1447, 1252, 1133, 1031, 996, 927; EMIE: m/z (int.rel): 285 ( $M^+$ ,  $C_{17}H_{19}O_3N$ , 86), 201 (100), 173 (26), 115 (45), 84 (10); RMN- $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 1.62 (m, 6H, H-3', H-4', H-5'), 3.58 (m, 4H, H-2', H-6'), 5.98 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O), 6.43 (d, 1H,  $J = 15$  Hz, H-2), 6.74 (m, 2H, H-5'', H-6''), 6.89 (m, 1H, H-5), 6.98 (s, 1H, H-2''), 7.41 (m, 2H, H-3, H-4). RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 75 MHz)  $\delta$ : 165.36 (C-1), 119.99 (C-2), 142.43 (C-3), 125.30 (C-4), 138.15 (C-5), 46.26 (C-2'), 26.09 (C-3'), 24.60 (C-4'), 26.09 (C-5'), 46.26 (C-6'), 130.95 (C-1''), 105.60 (C-2''), 148.12 (C-3''), 148.05 (C-4''), 108.41 (C-5''), 122.43 (C-6''), 101.21 (O-CH<sub>2</sub>-O).

La fagaramida **4** se obtuvo por síntesis siguiendo la técnica descrita por Elliot y colaboradores [33]. Brevemente, Se calentaron a reflujo por 5 h 5.7 mmol de ácido 3-(1,3-benzodioxol-5-il)-2*E*-propenóico (Aldrich) con 27.3 mmol de cloruro de tionilo en 20 mL de benceno anhidro. Al término de este tiempo se destiló el exceso de cloruro de tionilo. Al cloruro de ácido así obtenido se le agregaron 13 mmol de isobutilamina disuelta en 50 mL de éter etílico anhidro. La mezcla de reacción se dejó con agitación por 20 h a temperatura ambiente. Después de eliminar el éter etílico, la mezcla de reacción se disolvió en acetato de etilo a la cual se le realizaron extracciones sucesivas con ácido clorhídrico al 10% (p/v), bicarbonato de sodio y agua destilada hasta obtener un pH neutro en la fase acuosa. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se eliminó a presión reducida; de esta forma se obtuvo la fagaramida, la cual después de recrystalizarla de etanol presentó un pf de 115-116 °C. Sus datos espectroscópicos de RMN coincidieron con los descritos previamente [34]: RMN- $^1H$  (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 0.95 (s, 1H, H-3'), 0.97 (s, 1H, H-4'),

1.84 (m, 1H, H-2'), 3.22 (dd,  $J = 6.4, 12.9$ , 2H, H-1'), 5.66 (sa, 1H, NH), 5.98 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-O), 6.26 (m, 1H, H-2), 6.77 (m, 1H, H-5''), 6.80 (m, 1H, H-6''), 7.3 (s, 1H, H-2''), 7.56 (d,  $J = 15$  Hz, 1H, H-3); RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 75 MHz)  $\delta$ : 166.05 (C-1), 118.95 (C-2), 140.60 (C-3), 47.11 (C-1'), 28.68 (C-2'), 20.16 (C-3'), 20.16 (C-4'), 129.38 (C-1''), 106.37 (C-2''), 148.24 (C-3''), 148.99 (C-4''), 108.52 (C-5''), 123.71 (C-6''), 101.40 (O-CH<sub>2</sub>-O).

**Determinación de la actividad larvica.** Los huevecillos de *Culex quinquefasciatus* se colectaron en estanques de agua del "Campo Experimental El Ranchito" de la Universidad Autónoma Chapingo. Los huevecillos se mantuvieron en recipientes con agua y alimento vegetal, la cual se cambió cada 72 h hasta que emergieron los insectos. Los insectos adultos se mantuvieron en una jaula entomológica en condiciones óptimas para que continuaran su ciclo biológico. Como fuente de sangre para la hembras se utilizaron pollos de aproximadamente 15 días de edad, los cuales se introdujeron a la jaula sólo por las noches. Se colocaron recipientes con agua dentro de la jaula entomológica para que las hembras ovopositaran. Diariamente se colectaron los huevecillos y se mantuvieron en recipientes con agua y alimento vegetal. Este procedimiento se siguió hasta la tercera generación, para evitar efectos residuales de la posible exposición a insecticidas. Los huevecillos de la tercera generación se dejaron desarrollar hasta el cuarto instar para realizar los experimentos.

Se colocaron 10 larvas de *C. quinquefasciatus* del cuarto instar en 5 mL de agua, se adicionaron 100  $\mu$ L de las soluciones de los compuestos de prueba y se aforaron a 10 mL con agua, 24 h después se determinó el número de larvas muertas. En experimentos preliminares se determinó la ventana de actividad biológica de cada uno de los compuestos, ensayándose concentraciones de 1 a 1000 ppm, en espacios logarítmicos. Cada una de las concentraciones de los compuestos de prueba disueltos en acetona se evaluaron por triplicado. Se ajustó el rango de concentraciones de manera tal que al menos existieran 4 niveles de concentración para determinar la Concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ) por el método probit [22]. Paralelamente se evaluaron lotes controles tratados con 100  $\mu$ L de acetona [21].

Para el estudio de la interacción, los compuestos se adicionaron en las proporciones definidas en el Cuadro 2 en el mismo volumen de acetona utilizado en la evaluación de los compuestos individuales.

**Análisis de la interacción.** Para caracterizar la interacción entre  $\alpha$ -sanshool con sesamina, asarinina, fagaramida y piperina se utilizó un análisis isobolográfico [20]. De acuerdo a este método sólo se consideraron para el análisis las concentraciones equiefectivas ( $CL_{50}$ ) de cada compuesto y sus combinaciones obtenidas de las curvas concentración-respuesta. Las concentraciones teóricas aditivas ( $Z_{teo}$ ) se calcularon de las concentraciones equiefectivas ( $CL_{50}$ ) de los compuestos individuales de acuerdo al método descrito por Tallarida [35]. La comparación de las concentraciones teóricas ( $Z_{teo}$ ) y experi-

mentales ( $Z_{exp}$ ) permite definir la naturaleza de la interacción (subaditividad o superaditividad) o concluir que no hay interacción (aditividad).

Los isobologramas se construyeron de acuerdo al procedimiento descrito por Tallarida y colaboradores [19]. Brevemente, las concentraciones equiefectivas ( $CL_{50}$ ) de cada compuesto se graficó sobre los ejes  $x$  y  $y$ . En  $x$  se graficó el compuesto menos activo y en  $y$  el más activo ( $\alpha$ -sanshool). Los interceptos con coordenadas ( $Z_1^*, 0$ ) y ( $0, Z_2^*$ ) corresponden a la  $CL_{50}$  del compuesto menos activo y a la  $CL_{50}$  del compuesto más activo, respectivamente. La línea que se forma por la unión de los dos interceptos corresponde a la línea de aditividad. Todos los puntos sobre esta línea con coordenadas ( $z_1, z_2$ ), representa el par de concentraciones teóricas aditivas ( $Z_{teo}$ ) para los compuestos administrados juntos que dan el mismo nivel de efecto que los compuestos administrados individualmente [19]. Las coordenadas de los puntos experimentales de la combinación ( $Z_{exp}$ ), que caen por debajo de la línea de aditividad indicarán una superaditividad o sinergismo y si caen por arriba de la línea de aditividad indicarán una subaditividad o que uno de ellos está disminuyendo el efecto del otro [21].

Para describir la magnitud de la interacción se calculó el valor de la fracción total (Cuadro 2) de la concentración equiefectiva del compuesto A, del compuesto B y su combinación, de acuerdo a la Ecuación 1 [36]:

$$\text{Fracción total} = \left( \frac{\text{Concentración del compuesto A}}{\text{en la combinación/Concentración del compuesto A solo}} + \frac{\text{Concentración del compuesto B}}{\text{en la combinación/Concentración del compuesto B solo}} \right) \quad (1)$$

El valor de esta fracción total indica la divergencia entre la concentración equiefectiva experimental ( $Z_{exp}$ ) de la combinación y la concentración teórica aditiva ( $Z_{teo}$ ). Valores cercanos a 1 indican aditividad; valores menores de 1 implican una interacción sinérgica; y un valor mayor de 1 indica una interacción subaditiva o de atenuación del efecto [36]. La fracción total se calculó con los valores de las concentraciones de los compuestos solos o en la combinación que provocan la muerte del 50 % de las larvas de *C. quinquefasciatus* (Cuadro 2).

**Análisis estadístico.** Los valores de la  $CL_{50} \pm EEM$  de los compuestos individuales o en las combinaciones en las diferentes proporciones se calculó por el método probit [22]. Para determinar que el efecto es dependiente de la concentración, se realizó el análisis de varianza de la regresión lineal entre probits y logaritmo de la dosis [20]. Para distinguir una interacción sinérgica de un efecto aditivo entre los valores experimentales de las concentraciones que provocan el 50 % de la muerte de las larvas en las diferentes combinaciones ( $Z_{exp}$ ) y las concentraciones aditivas teóricas ( $Z_{teo}$ ), se utilizó la prueba  $t$  de Student, siguiendo el procedimiento para el análisis isobolográfico [19, 36].

## Agradecimientos

Se agradece a Q. Marisela Gutierrez, Q. Georgina Duarte, QFB Margarita Guzmán, QFB Rosa Isela Del Villar Morales y QFB Oscar S. Yañes, USAI Facultad de Química UNAM, por el registro de los espectros de IR, Masas y RMN. El presente trabajo fue financiado parcialmente por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM a través del Proyecto IN 203902.

## Referencias

- Service, M.W. in *Pest and Vectors Management in Tropics*. Youdeowei, A.; Service, M.W. **1983**, 265-280.
- Sukuman, K.; Petrich, M.J.; Boobar, L.R. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **1991**, 7, 210-237.
- Reyes, B.; Navarrete, A.; Sixtos, C.; Aguirre, E.; Jiménez, S.; Estrada, E. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **1991**, 21, 30-34.
- Haral, G. *Planta Med.* **1984**, 80, 366-375.
- Blade, R.J. in *Recent Advances in Chemistry of Insect Control II*. The Royal Society of Chemistry. USA **1990**, 151-169.
- Crombie, L. *J. Chem. Soc.* **1955**, 995-999.
- Jacobson, M. in *Naturally Occurring Insecticides*. Jacobson, M. y Crosby, D.G. Marcel Decker Inc., New York **1971**, 139-176.
- Miyacado, M.; Nakayama, I.; Yoshioka, H.; Nakatani, N. *Agric. Biol. Chem.* **1979**, 43, 1609-1611.
- Nakatani, N.; Inatani, R. *Agric. Biol. Chem.* **1981**, 45, 1473-1476.
- Benner, J.P. *Pest. Sci.* **1993**, 39, 95-102.
- Elliott, M.; Farnham, A.W.; James, N.F.; Johnson, D.M.; Pulman, D.A. *Pestic. Sci.* **1987**, 18, 191-201.
- Kubo, I.; Matsumoto, T.; Klocke, J.A.; Kimikawa, T. *Experientia* **1984**, 40, 340-341.
- Oriowo, M.A. *Planta Med.* **1982**, 44, 54-56.
- Yasuda, I.; Takeya, K.; Itokawa, H. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, 63, 395-398.
- Navarrete, A.; Hong, E. *Planta Med.* **1996**, 62, 250-251.
- Klocke, J.A. in *Economic and Medicinal Plant Research*, Vol 3, Wagner, H., Hikino, H., Farnworth, N.R., Eds. Academic Press, London, **1989**, 103-114.
- Haller, H.L.; Laforae, F.B.; Sullivan, W.N. *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, 64, 187-188.
- Tallarida, R.; Kimmel, H.L.; Holtzman, S.G. *Phycopharmacol.* **1997**, 133, 378-382.
- Vinik, H.R.; Bradley, E.L.; Kissin, I. *Anesth. Analg.* **1999**, 88, 667-670.
- Tallarida, R. *Drug synergism and dose-effect data analysis*. Chapman & Hall / CRC, Florida, **2000**.
- Vahita, R.; Venkatachalam, M.R.; Murugan, K.; Jebanesan, A. *Biores. Tech.* **2002**, 82, 203-204.
- Infante, S.; Calderón, L.C.; Manual de análisis probit. Colegio de Posgraduados. Centro de Estadística y Cálculo. Chapingo Estado de México. México **1989**.
- Wilkinson, C.F., in *Pesticides formulation*, Vankenburg, W., Ed., Marcel Dekker, New York, **1976**, 1-64.
- Parker, R.S.; Sontag, T.J.; Swanson, J.E. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **2000**, 277, 531-534.
- Vinik, H.R.; Bradley, E.L.; Kissin, I. *Anesth. Analg.* **1999**, 88, 667-670.
- Naidu, K.A.; Thippeswamy, N.B. *Mol. Cel. Biochem.* **2002**, 229, 19-23.
- Liu, H.; Bigler, S.A. *Kidney Int.* **2002**, 62, 868-876.
- Reen, R.K.; Wiebel, F.J.; Singh, J. *J. Ethnopharmacol.* **1997**, 58, 165-173.

29. Reen, R.K.; Roesch, S.F.; Keifer, F.; Wiebel, F.J.; Singh, J. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **1996**, 218, 562-569.
30. Bhardwaj, R.K.; Glaeser, H.; Becquemont, L.; Klotz, U.; Gupta, S.K.; Fromm, M.F. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, 302, 645-650.
31. Yasuda, Yakeya, K.; Itokawa, H. *Phytochem.* **1982**, 21, 1295-1298.
32. Epstein, W.; Netzt, F.D.; Seidel, L. J. *J. Chem Educ.* **1993**, 7, 598-599.
33. Elliot, M.; Farnham, A.W.; James, N.F.; Johnson, D.M.; Pulman, D.A. *Pestic. Sci.* **1987**, 18, 211-221.
34. Adesina, S.K. *J. Nat. Prod.* **1986**, 49, 715.
35. Tallarida, R. *J. Pain* **1992**, 49, 93-97.
36. Tallarida, R.J.; Stone, D.J.; Raffa, R.B. *Life Sci.* **1997**, 61, PL417-425.