

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE
HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Efecto del extracto alcohólico de las hojas de
Oenothera rosea “yawar suqu” frente al anti antígeno de
superficie del virus del Hepatitis B. Ayacucho, 2011**

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE:

BIÓLOGO – MICROBIÓLOGO

PRESENTADO POR:

Bach. HUAMÁN SÁNCHEZ, ROGER

AYACUCHO-PERÚ

2011

*Rindiendo acción de gracia a Dios
dador de todo bien. A mis padres y
hermanos que me guiaron por el
camino de la virtud y los valores
morales. Y a la mujer que me
llena por dentro y consigue un
equilibrio, gracias mi Emperatriz.
Nunca les podre estar
suficientemente agradecidos.*

AGRADECIMIENTO

Especial agradecimiento a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, a la Facultad de Ciencias Biológicas y todos los docentes que laboran en ella por su invaluable apoyo académico favor de presentar ante la sociedad a excelentes profesionales.

Mi agradecimiento sincero a mí asesor de tesis el Blgo. Mg. José Alarcón Guerrero de la mejor manera posible, por su esfuerzo y dedicación.

A mi familia por su apoyo incondicional y paciencia en todo momento de mi vida. Ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración, así como sentirme en deuda por todo lo recibido durante mi vida.

Y por último, pero no menos importante, estaré eternamente agradecido a mis amigos y amistades los que han pasado y los que han quedado, porque todos ustedes han sido tantas veces parte de mi vida, han marcado mi vida de alguna forma y me han abierto mi ojos al mundo. Un especial recuerdo al grupo los cuates mis amigos gracias por considerarme y brindarme su amistad, no todo el mundo puede decir lo mismo de sus amigos, por todo ello, muchas gracias.

INDICE

RESUMEN	v
I.INTRODUCCION	1
II.MARCO TEORICO	3
2.1. La <i>Oenothera rosea</i>	3
2.1.1 Antecedentes	3
2.1.2 Aspectos botánicos	3
2.1.3 Distribución y hábitat	5
2.1.4 Composición química	8
2.2 Virus	13
2.2.1 Características	13
2.2.2 Virus de la Hepatitis B	14
2.3 Antígeno y anticuerpo	14
2.4 Prueba de ELISA	15
III.MATERIALES Y METODOS	18
3.1 Ubicación	18
3.2 Materiales	18
3.3 Diseño Metodológico	19
3.3.1 Recolección de la muestra	19
3.3.2 Preparación de la muestra	19
3.4 Bioelisa HBsAg para el virus del Hepatitis B	20
3.5 Determinación de la actividad viral	21
3.6 Análisis estadístico	26
IV RESULTADO	27
V DISCUSION	35
VI CONCLUSION	43
VII RECOMENDACIÓN	44
VIII REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	45
ANEXO	49

Título: Efecto del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* “yawar suqu” frente al anti antígeno de superficie del virus del Hepatitis B. Ayacucho, 2011

Autor: Bach. Roger Huamán Sánchez.

Asesor: Blgo. José Alarcón Guerrero.

RESUMEN

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga y el Laboratorio de Referencia Regional Ayacucho, durante los meses abril a septiembre del 2011, con el objetivo de determinar a qué concentración el extracto alcohólico tiene efecto antiviral y compara la actividad viral del extracto Alcohólico en las diferentes concentraciones. Se realizó un estudio in vitro para demostrar la actividad viral frente a la especie de las hojas de *Oenothera rosea* “yawar suqu”; se trabajó con el antígeno de superficie del virus del hepatitis B, el cual se mezcló con la especie a las concentraciones de 100%, 50%, 25% y 12.5% y se incubó durante 24 y 48 horas, y posteriormente se evaluó la disminución de la antigenicidad in vitro por un ensayo inmunoenzimático directo que se utilizó para cuantificar el antígeno de superficie del virus del hepatitis B. Se apreció una disminución a partir de las 24 horas para toda las concentraciones probadas, pero a partir de 48 horas se encontró una significativa disminución; también se realizó la medición de la media inhibitoria (CMI50) del extracto alcohólico que es el 34.28%, se reportó que, a concentraciones mayores el extracto alcohólico tiene efecto en el antígeno. Los resultados fueron analizados mediante el análisis de varianza con un nivel de confianza del 95% y la prueba de Tukey mostrando diferentes tratamientos de ensayo. Se concluye que a mayor concentración del extracto y tiempo de reacción con el antígeno de superficie del virus del hepatitis B, menor es la antigenicidad. Al realizar la comparación de la concentración del extracto se halló que hay diferencia estadística ($p < 0.05$).

Palabra clave: *Oenothera rosea*, actividad antiviral, antigena, hepatitis B.

INTRODUCCION

Las plantas tienen valor debido a sus principios activos contenidos en las mismas. Estos pueden ser extraídos de la planta por: infusión, cocimiento, maceración, etc. Son extractos líquidos y sólidos, obtenidos mediante técnicas específicas. Así se facilita la administración y el aprovechamiento del principio curativo y hace más cómodo el traslado de la hierba. También permite conservar el producto por más tiempo y tener una exacta dosificación. Este aprendizaje le demandó el nombre largo tiempo y no todos estaban preparados por igual manera para llevarlo a la práctica. Los continuos éxodos de muchos pueblos debido a las constantes guerras conspiraron contra la adaptación del hombre a su medio o hábitat (Kuklinsky, 2004).

La Organización Mundial de Salud (OMS) a mediados de los años de los 80, promovió la aceptación y puesta en práctica de las llamadas medicinas alternativas, brindando especial interés a la investigación y el uso de las plantas medicinales (Pro- Vida, 2005).

En la actualidad las plantas medicinales están teniendo un renacimiento, tal es así que uno de cuatro personas alrededor del mundo utiliza la medicina tradicional en la prevención y tratamiento de las enfermedades, dándole al organismo armas para curarse, al contrario de la mayoría de los productos farmacéuticos que solo combaten los síntomas de la enfermedad (Lock, 1994). Este presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga y el Laboratorio de Referencia Regional Ayacucho teniendo los siguientes objetivos.

Objetivo general:

Determinar el efecto del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar suqu" frente al anti antígeno de superficie del virus del Hepatitis B Ayacucho – 2011"

Objetivo específico:

- Determinar el efecto del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* frente al anticuerpo y conjugado del anti antígeno de superficie del virus del Hepatitis B.
- Determinar el efecto del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* a diferentes concentraciones frente al anti antígeno de superficie del virus del Hepatitis B.
- Determinar el efecto del extracto de las hojas de *Oenothera rosea* a diferentes tiempos de exposición frente al anti antígeno de superficie del virus del Hepatitis B.

II. MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes.

En los últimos años se han descubierto en las plantas una amplia gama de moléculas que inhiben la infección viral, al actuar sobre diferentes etapas del ciclo de replicación viral, desde las fases tempranas del ciclo de replicación viral. Se considera que la absorción de la partícula viral y la fusión a la célula diana constituyen las etapas tempranas del ciclo de la replicación viral. Se han identificado compuestos que son capaces de actuar sobre dichas fases inhibiendo así la entrada del virus a la célula hospedera. (Okatami, 2007).

Se evaluó las propiedades antivirales de los extractos vegetales derivados a partir de las plantas: *Calendula officinalis* L., *Psidium uajava* L., *Eucaliptos* spp. Y *Phyllanthus orbicularis*, contra el virus de la hepatitis B. Se llevó a cabo a concentraciones sub tóxicas en el sistema in vitro, líneas celulares que expresan constitutivamente el antígeno de superficie del virus (AgS_{Hb}). El parámetro de viabilidad celular se midió mediante el cálculo de los valores de concentración citotóxica: *Eucalyptus* spp. Mostró una menor toxicidad en la célula, seguido de

Psidium guajava L., *Phyllanthus orbicularis*, y finalmente *Calendula officinalis* que una toxicidad mucho mayor que los extractos anteriores. Posteriormente se estudio el comportamiento de la producción de AgsHb intracelular y extra celular de las células a diferentes concentraciones de los extractos durante 48 horas de tratamiento. Los datos mostraron actividad inhibitoria en el caso de de *Phyllanthus orbicularis*, así como para el extracto de *Eucalyptus spp.* Con el extracto de guayaba la actividad fue menor que en él los dos casos anteriores, mientras que la *Calendula* no mostró ninguna inhibición a las concentraciones ensayadas, lo que indica la ausencia de la actividad buscada en el extracto. (González y col., 2006).

El extracto crudo de las hojas de *P. aduncum* posee actividad antiviral contra el virus de la polio. (Desmarchelier, 2003).

Los modelos in vitro, que los extractos crudos de *Oenothera rosea* poseen actividad antibacteriana, anti fúngica, antiviral, cito tóxica, anti inflamatoria y parasiticida. Los diversos estudios fotoquímicas reportan que esta especie contiene una gran variedad de metabolitos secundarios que se puede agrupar en: cumarinas, triterpenos, esteroides, flavonoides, taninos, y quinonas (González y col. 2006).

Un principio antiviral presente en extracto semi purificados de hojas de *Melia Azedarach* L., inhibe la multiplicación del virus ADN Y ARN in vitro, provoca la basificación de vesículas ácidas intracelulares, presenta actividad inmunomoduladora e impide el desarrollo de la queratitis estromal herpética murina. El 1-cinnamoil-3,11-dihidroxi meliacarpina aislado a partir de dichos extractos, es el tetranortriterpenoide responsable de la actividad antiviral in vitro

contra el virus de la estomatitis vesicular y el virus herpes simple tipo 1 (Coto, 2004).

La investigación de *Croton lecheri*, el latex que contiene dentro de sus principales componentes es el alcaloide denominado taspina y sustancias como: piridona aporfina, quinoleína y proantocianina oligomérica (flavonoides) de acción antiviral. En el experimento *in vitro* muestra que esta proantocianidina inhibe diferentes virus de la hepatitis (A y B), el virus de la influenza A y el virus de la para influenza. También es efectivo contra el virus sincitial respiratorio. La actividad viral contra los dos tipos de virus herpes simple, incluye también el tipo I timidinaquinasa deficiente, ya que impide la penetración del virus en la célula. (Wallace, 2008).

2.2. Aspectos botánicos

Es una planta herbácea, perenne, de más o menos 30 centímetros de alto, aunque existen arbustos que miden un metro o más, de raíz tuberosa. Tallo, herbáceo, erecto o ascendente y uniformemente decumbente delgado, simple o ramificado, coloreado de rojo violáceo, más intensamente en la base, presenta pelos blanquecinos. Hojas, oblongo, lanceoladas, subenteras o groseramente sinuadas, irregularmente dentadas, de dos a cinco centímetros de longitud con pecíolo delgado. Las hojas de la parte superior están reducidas a brácteas verdosas en cuyas axilas nacen las flores. De color verde oscuro en el haz, un poco más claro en el envés. Flores, agrupadas en inflorescencias racimosas. Son hermafroditas, heteroclamídeas, pedunculadas y períginas; presenta hipanto que encierra al ovario ínfero, cuya parte externa presenta ocho estrías (cuatro más prominentes). Cáliz tetrámero, gamosépalo, los sépalos son reflexos durante

la antesis, pubescente, con lóbulos largos y decumbentes. Corola tetrámera, dialipétala, constituida por cuatro pétalos aovados de color rosado o rojo violeta. Androceo diplostémono constituido por ocho estambres con anteras dorsifijas, alargadas ditésicas, con dehiscencia longitudinal, filamento de color blanco, granos de polen de forma tetraédrica. Gineceo completo, ovario ínfero, tetracarpelar, tetralocular, multiovular, óvulos anátropos, epítropos, péndulos, de placentación central y axial, estilo desarrollado, estigma formado por cuatro ramas estigmáticas coloreadas de rosado. Fruto, cápsula ovoide de 8 a 10 mm de longitud, extraídos con ocho costillas longitudinales y caras arrugadas, poseen como base un pedúnculo hueco. Semillas de forma oblonga, aovada y asimétrica, de color marrón (Aguilar, 2004).

Observar en el (Anexo N° 11)

Clasificación sistemática de *Oenothera rosea* “yawar suqu”.

Clasificación sistemática: según Cronquist, A 1988.

Siendo esta como sigue:

División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Subclase	: Rosidae
Orden	: Myrtales
Familia	: Onagraceae
Género	: <i>Oenothera</i>
Especie	: <i>Oenothera rosea</i> Ait.
Nombre vulgar	: “yawar suqu”, “chupa sangre”

Fuente: Certificado emitido por el Herbarium Huamangensis de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga (Anexo N° 01)

2.3. Descripción:

La familia Onagraceae se observa hierbas y arbustos. Las hojas filotaxis alterna u opuestas, hojas enteras, pecioladas o sésiles; inflorescencia y polinización: flores perfectas, solitarias axilares o agrupadas en cimas. La flor presenta cáliz de cuatro sépalos libres, hipanto con tubo epígino, poco a muy prolongado; corola vistosa de cuatro pétalos libres. Presenta el androceo en diplostemono o isotémono. El gineceo es ínfero, gamo carpelar, tetrámero, cuatro lóculos y numerosos ovulos de placentación axilar por lóbulo. el fruto en forma de capsula. (Zevallos 2004)

La *Oenothera rosea* que es una planta nativa cosmopolitas especialmente en regiones frías y templadas de América. En Perú crece en forma silvestre o domestica en la costa, sierra y selva; hasta los 3000 msnm. (Brack, 2009)

La *Oenothera rosea* "yawar suqu" , "chupa sangre" y es utilizado tradicionalmente como una sustancia antitrombótica par el tratamiento de contusiones hemorrágicas, heridas fracturas. Se conoce su composición química destacando principalmente la presencia de flavonoides, taninos y polifenoles a los que se atribuye dicha propiedad. Así como se ha demostrado in vivo, su actividad antiinflamatoria, hepatoprotectora y toxico aguda, e in vitro su actividad inhibitoria de formación de radicales libres. Es una especie medicinal herbácea que crece en nuestra región y son comercializados es de uso muy difundido por sus propiedades medicinales.

2.4. Distribución y hábitat:

Esta familia agrupa 17 generos y 675 especies, la mayoría de las especies son americanas. La *Oenothera rosea* crece en forma silvestre en las orillas de acequias y en el contorno de terrenos cultivados de climas templados o sub tropicales, así en zonas altoandinas entre 1500 a 4,000 m.s.n.m., con mayor frecuencia crecen en los valles interandinos de Cuzco, Puno, Apurímac, Cajamarca, Amazonas, Junín y Huánuco: estas especies se extienden desde sur oeste de Estados Unidos, México, Costa Rica , Bolivia , registrándose una menor cantidad en centro América, también se puede encontrar en la India(Alvarez,2000; Palacios, 1999).

2.5. Usos medicinales

Se usan las plantas, flores y raíces en infusión como depurativo, sudorífica, en caso de infecciones respiratorias, afecciones renales, el reumatismo, la ciática dolor de cabeza, otros dolores como vermífugo y machacado como cataplasma, para el tratamiento de contusiones traumáticas, lesiones, heridas y fracturas. (Rodríguez, 2002).

En la medicina popular su uso se ha generalizado por que se ha demostrado que estos preparados aplicados como cataplasma disuelve la sangre molida aglomerada, cuando recién empieza a formarse el apostema, con la repetición de esos cataplasmas, desaparecerá rápidamente la lesión y no dejará señal alguna sobre la piel.(Rodríguez, 2002).

Las ramas frescas son utilizadas en el tratamiento de la hemorragia durante el periodo menstrual, en el tratamiento de infertilidad, dismenorrea, en heridas y contusiones. La cocción de la planta entera es usada para el tratamiento de la diarrea.

Se evaluó el efecto hepatoprotector del extracto acuoso de *Oenothera rosea* "yawarsoqo" y concluye que muestra mejor efecto hepatoprotector, afirmando que los grupos fenólicos y los flavonoides podrían ser los responsables del efecto hepatoprotector (rojas 2006).

2.6. Composición química

Catequinas, resinas, lactonas, triterpenos, esteroides, taninos, quinonas y flavonoides son compuestos químicos de estructura relativamente compleja y de distribución más restringida y más características de fuentes botánicas específicas (plantas medicinales), estos no son indispensables en las plantas que ocurren; mejor dicho, no se ha descubierto aun una función metabólica en la cual ellos intervienen; son considerados como "artículo de lujo" en la planta (Núñez, 1999).

Wolof(1983) en el trabajo titulado New Sources of Gamma-Linoleic Acid en las semillas de *Oenothera rosea* determino la presencia de ácido graso insaturados como: ácido linoleico, linolénico, palmítico y oleico. Anexo N°15

Palacios (1999) reporta la presencia de sustancias fenólicas: ácidos elálgico, galico, cafeico, o-cumarico, m-digálgico, noeclorogénico, kaemferol, quercetina, cianidina del finidina y glicósidos flavónicos mayormente presentes en las hojas.

Aguilar (2004) presencia de compuestos fenólicos y flavonoides presentes en las hojas de *Oenothera rosea*.

Averett (2007), en el trabajo titulado Flavonoid survey of *Oenothera rosea*, determino la presencia de flavonoides en las hojas identificándolos como glucósidos flavónicos.

Tinco (2002), reportó la presencia de taninos, flavonoides, azúcares reductores, saponinas, mucilagos, principios amargos, catequinas, resinas, lactonas,

esteroides y triterpenos en los diferentes extractos: etéreo, alcohólico y acuoso de *Oenothera rosea*.

2.6.1 triterpenos y esteroides.

Compuestos de treinta carbonos procedentes de la ciclación del escualeno, los triterpenos poseen una estructura siempre policíclica normalmente tetra o pentacíclica. Casi siempre hidroxilados, al contrario de los demás terpenos, una unidad estructural bastante fuerte, siendo excepcionales las modificaciones profundas del esqueleto básico. No existe una diferencia fundamental entre los triterpenos y esteroides, considerándose estos últimos triterpenos y tetracíclicos que han perdido, como mínimo tres metilos (Bruneton, 2001) (Zevallos, 2004)

Anexo N° 12

2.6.2 Fenólicos

Los compuestos fenólicos se refieren a un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, y que se encuentran frecuentemente como glicósidos, combinados con unidades de azúcar. Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua, pudiendo ser detectados por el intenso color verde, púrpura, azul o negro que producen cuando se les agrega una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro férrico. Dada la naturaleza aromática de estos compuestos fenólicos ellos muestran intensa absorción en la región UV del espectro, siendo éste método espectral especialmente importante para su identificación y análisis cuantitativo. (Aguilar, 2004) (López, 2009)

La estructura química Anexo N° 15

2.6.3 Flavonoides

Se encuentran ampliamente distribuidos como constituyentes naturales, conocidos algunas veces como antoxantinas. Se conocen como 10 clases de flavonoides, todos contienen 15 átomos de carbono en su núcleo básico y están arreglados bajo un sistema $C_6-C_3-C_6$, en el cual dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo, que en caso de existir es llamado anillo C. Cada uno de los flavonoides suele encontrarse bajo la forma de glicósidos con una a tres unidades de azúcar, siendo los azúcares más comunes la glucosa, galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa.

En muchos casos debido a la complejidad de la mezcla es más frecuente el estudio de estos compuestos en forma de agliconas en extractos de plantas previamente hidrolizados. Se hallan presentes en todas las partes de las plantas, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas. (Aguilar, 2004)

Como características generales de estos compuestos se debe señalar su solubilidad en agua y en etanol, Su carácter fenólico y su intensa absorción en la región U.V y Visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos conjugados. (López, 2009).

La estructura química Anexo N° 14

2.6.4 Taninos

Son productos naturales de estructura polifenólica, tiene la propiedad de precipitar a los alcaloides, gelatina y otras proteínas, dan coloraciones con las sales férricas, las cuales varían desde azul negruzco, negro, hasta verde (Zevallos, 2004).

2.6.5 Saponinas

Las saponinas son metabolitos ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se caracterizan por la diversidad de sus actividades biológicas, tales como su acción anti micótica, antiviral, anti cáncer, hipolesterolémica, hipoglicaémica, antitrombotica, diurética, antiinflamatoria y molusquicidad. (Lincoln y Zeiger, 2006).

Las saponinas son glucósidos de esteroides o de triterpenoides, llamadas así por sus propiedades como las de jabón: cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o triterpenoides) y un elemento soluble en agua (azúcar), y forman una espuma cuando don agitadas en el agua. (Lincoln y Zeiger, 2006).

Las espumas son tóxicas, se cree que su toxicidad proviene de su habilidad para formar complejos con esteroides: las saponinas podrían interferir en la asimilación de esteroides por el sistema digestivo, o romper las membranas de las células luego de ser absorbidas hacia la corriente sanguínea. (Lincoln y Zeiger, 2006).

La composición fito química de las hojas de *Oenothera rosea* .

2.7. Virus

2.7.1. Características

Son parásitos intracelulares submicroscopicas, compuestos por ARN o por acido desoxirribonucleico (ADN) nunca ambos y una capa protectora de proteína o de proteína combinada con componentes lipídicos o glucídicos. En general, el acido nucleído es una molécula única de hélice simple o doble; sin embargo, ciertos virus tienen el material genético segmentado en dos o más partes. La cubierta externa de proteína se llama capsida y las sub unidades que la componen, capsomeros. Se denomina núcleo cápside, al conjunto de todo los elementos

anteriores. Algunos virus poseen una envuelta adicional que suelen adquirir cuando la nucleocapside sale de la célula hospedera. La partícula viral compleja se llama virión. Los virus son parásitos intracelulares obligados, es decir: solo se replica en células con metabolismo activo, y fuera de ellas se reducen a macromoléculas inertes (Morales y Botero, 2009).

El tamaño y forma de los virus son muy variables. Hay dos grupos estructurales básicos: isométricos, con forma de varilla o alargados, y virus complejos, con cabeza y cola. Los virus más pequeños son icosaedricos (polígono de 20 lados). Los de mayor tamaño son las alargadas; algunos miden varios micrómetros de longitud, pero no suelen medir más de 100 nanómetros de ancho. Así los virus más largos tienen una anchura que está por debajo de los límites de resolución del microscopio óptico. (Morales y Botero, 2009).

Muchos virus son estructuras helicoidales interna presentan envoltas externas (también llamadas cubiertas) compuestas de lipoproteínas, glicoproteínas o ambas. Estos virus se asemejan a esferas, aunque pueden presentar formas variadas, y su tamaño oscila entre 60 a más de 300 nanómetros de diámetro. Los virus complejos tienen cabeza y una cola tubular que se une a la bacteria huésped. Los poxvirus tienen forma de ladrillo y una composición compleja de proteínas. Sin embargo, estos últimos tipos de virus son excepciones y la mayoría tienen una forma simple. (Morales y Botero, 2009).

2.7.2. Virus de la Hepatitis B

El virus de la hepatitis B (VHB), es un virus pequeño (42 nm) de diámetro, de la familia Hepadnaviridae, causante de la Hepatitis B. Fue descubierto por el médico Baruch Samuel Blumberg en 1963. El virus tiene un virión envuelto que contiene

un genoma de ADN circular, parcialmente bicatenario, se replica mediante un ARN intermediario circular. El virus codifica y lleva una transcriptasa inversa, codifica varias proteínas HBsAg que comparten secuencias genéticas, pero con distintos codones de inicio. El VHB tiene un tropismo tisular estricto por el hígado, las células infectadas por VHB producen y segregan grandes cantidades de partículas de HBsAg que carecen de ADN y el genoma del VHB se puede integrar en el cromosoma de la célula anfitriona. (Patrick,ken,M 2006)

La replicación del virus de la Hepatitis B, después de entrar en el hepatocito y desenvolver el centro vírico del núcleo cápside, el genoma del ADN bicatenario parcial se completa con enzimas con enzimas de centro vírico y se transfiere al núcleo de la célula. La transcripción del genoma da lugar a cuatro ARN mensajeros, entre los que se encuentran una molécula de ARNm de longitud mayor que el genoma. A continuación, el ARNm pasa al citoplasma y se sintetiza una proteína, la proteína del centro vírico se ensambla alrededor del ARNm y se sintetiza el ADN de sentido negativo mediante la actividad de una transcriptasa inversa del centro vírico. El ARN se degrada cuando se sintetiza el ADN de sentido positivo. El núcleo adquiere su envoltura antes de finalizar el ADN de sentido positivo y luego se desprende por exocitosis. (Patrick,ken,M 2006)

2.8. Antígeno y anticuerpo.

2.8.1 Antígenos.

Llamadas también inmunogenos que son sustancias capaces de inducir una respuesta inmunitaria posee propiedades de inmunogenicidad que es la propiedad de estimular una respuesta inmune, presenta la propiedad de

especificidad de reaccionar únicamente con el respectivo anticuerpo. (Ango, Carrasco, 2005).

2.8.2. Anticuerpo

Son glucoproteínas especializados, denominadas también inmunoglobulinas y están compuestos por polipéptidos y carbohidratos; producidos por las células plasmáticas y tienen como principal característica el de reaccionar específicamente con el antígeno que dio lugar a su formación. (Ango, Carrasco, 2005)

2.9. Enzaimmunoanálisis

Es la técnica inmunoenzimática ELISA forma parte de aquellas reacciones serológicas que utilizan conjugados para poder visualizar la reacción antígeno – anticuerpo. El ELISA, se basa en el uso de los anticuerpos marcados con una enzima (generalmente la peroxidasa), de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo)insolubilizados en la placa la reacción antígeno anticuerpo quedará inmovilizada y por tanto, podrán fácilmente ser revelados mediante la acción del sustrato, que al actuar sobre la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante un colorímetro.

Existen bastantes KITS comerciales disponibles y por tanto pueden realizar estudios serológicos sin la necesidad de grandes medios.

Basada en el uso de anticuerpos marcados con enzimas (unión covalente) que se une al antígeno específico y para su puesta en evidencia es necesaria la presencia de sustrato correspondiente y un cromógeno (Ango, Carrasco, 2005)

2.9.1. ELISA directo Las placas ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Indican la presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo de las analizadas (sangre, orina,...) pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado). (Ango, Carrasco, 2005)

2.9.3. El ELISA indirecto es el método de elección para detectar la presencia de anticuerpos séricos contra el virus de la inmunodeficiencia humana. Según esta técnica, proteínas recombinantes de la envoltura y el núcleo se absorben como antígenos en fase sólida a los pocillos. Las personas afectadas producen anticuerpos séricos contra epítomos en estas proteínas víricas. En general, el ELISA indirecto permite detectar anticuerpos séricos. (Ango, Carrasco, 2005)

2.9.4. ELISA *sándwich* Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unido a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo. (Ango, Carrasco, 2005).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Ubicación.

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga y el Laboratorio de Referencia Regional Ayacucho durante el periodo comprendido entre abril a octubre del 2011.

3.2. Materiales.

3.2.1. Población

Planta de *Oenothera rosea* "yawar suqu" del Distrito de Jesús Nazareno Provincia de Huamanga.

3.2.2. Muestra

5.0 kg. De hoja fresca de *Oenothera rosea* "yawar suqu"

3.3. Diseño Metodológico

3.3.1. Recolección de la muestra

Las hojas de *Oenothera rosea* "yawar suqu", fueron recolectadas durante el mes de abril de del 2011, en el valle de Muyurina, jurisdicción del Distrito de Jesús

Nazareno de la Provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, que se encuentra en una altitud promedios de 2350 m.s.n.m. la cual se llevó al laboratorio de botánica para su identificación taxonómica.

3.3.2. Preparación de la muestra.

Para el tratamiento inicial de la muestra se siguieron los siguientes procedimientos:

-Se recolectó y seleccionó las hojas de *Oenothera rosea* "yawar suqu" .

-Se secó a temperatura ambiental.

-Con ayuda de un molino se procedió a pulverizar la muestra y se procedió a la obtención del extracto y a realizar los análisis y ensayos para evaluar la actividad viral.

3.4. Obtención del extracto

3.4. 1.Extracto alcohólico.

Se utilizó 440g de pulverizado de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar suqu" y se deposito en un recipiente con tapa rosca y se le agregó alcohol absoluto la cantidad de 440 ml, tapó la boca del recipiente para su maceración por 5 días, se filtró para obtener el primer filtrado y luego se realizó el mismo procedimiento para la obtención del segundo y tercer filtrado, se recuperó a sequedad en estufa el solvente hasta obtener un extracto fina, utilizados para los análisis respectivos.

3.4.2. Extracto acuoso.

El pulverizado de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar suqu" se llevó a pesar la cantidad de 10g esta se agregó en un vaso precipitado con 300 ml. De agua hirviendo y constantemente se homogenizó con una bagueta por 10 a 15 minutos, luego del enfriado se llevó a cabo el filtrado de este modo para recuperar 100ml de

extracto acuoso en una fiola y finalmente se midió en el refractómetro los sólidos solubles obtenidos 1.5mg/ml.

3.5. bioelisa HBsAg para el virus de la Hepatitis B

Se utilizó el método inmunoenzimático directo, en el que los pocillos de una micro placa han sido recubiertos con anticuerpo de cobaya anti-HBs que actúa como anticuerpo de captura y que se utilizó como conjugado anticuerpo de cabra anti-HBs marcado con peroxidasa. La muestra se analizó se incubó en uno de los pocillos de la micro placa. Si la muestra contiene HBsAg éste se fijará al anticuerpo anti-HBs unido a la placa. Después se lavó para extraer el material no fijado, se añadió el anticuerpo de cabra anti-HBs conjugado con peroxidasa, que reaccionó con el posible complejo antígeno-anticuerpo formado en la primera incubación. Después de esta segunda incubación y posterior lavado se procedió a la adición del sustrato enzimático que contiene un cromógeno, lo que dará como resultado la aparición de color azul si la muestra es positiva para HBsAg. El color azul cambia a amarillo después de parar la reacción con ácido sulfúrico. La intensidad del color es proporcional a la concentración de HBsAg en la muestra.

3.6. Determinación de la actividad viral

3.6.1. Reacción sobre los anticuerpos.

Se realizó las concentraciones sucesivas del extracto alcohólico de "yawar suqu" en concentraciones de (0.750mg/ml), (0.375mg/ml), (0.187mg/ml) y (0.094mg/ml). Para cada concentración se utilizó pocillos de ELISA Directa, donde se agregó y reposó el extracto alcohólico en diferentes periodos de tiempos (24y 48) horas, luego se lavó cada pocillo seis veces en tampón de fosfato, luego se corrió el

procedimiento de análisis de ELISA para la obtención de un resultado positivo o negativo.

Se realizó los controles positivo y negativo en cada procedimiento para la comparación de los resultados.

Los procedimientos de análisis para la reacción de los anticuerpos se realizaron por tres veces

3.6.1.1. Procedimiento de análisis para la reacción de los anticuerpos.

-Se preparó el portatiras con la cantidad necesaria de para cada una de las concentraciones.

-Se añadió a las portatiras 100ul del extracto alcohólico en diferentes concentraciones y periodos de tiempo (24 y 48) horas.

-Se lavó cada pocillo 4 veces en tampón de fosfato.

-Se pipeteó 100 ul de muestra (antígeno estándar AgHBs) en los pocillos asignados.

-Se incubó a 37 °C durante 60 minutos más o menos 5 minutos.

-Se lavó cada pocillo 4 veces en tampón de fosfato.

-Se agregó 100ul de solución de conjugado en cada pocillo.

-Se incubó a 37 °C durante 30 minutos más o menos 5 minutos.

-Se lavó cada pocillo 4 veces en tampón de fosfato.

-Se pipeteó 100ul de sustrato de TMB en cada pocillo.

-Se incubó las tiras a temperatura ambiente entre durante 30 minutos, más o menos, 2 minutos en la oscuridad.

-Para la reacción se añadió 100ul de ácido sulfurico 1 mol/l a cada pocillo.

-Se efectuó la lectura de la placa (a una longitud de onda 450 a 630NM).

-Par la validez de la prueba y la concentración de los HBsAg en las muestras a analizar se determina relacionando el valor de la absorbancia de cada muestra entre el valor umbral.

3.6.2. Reacción sobre el antígeno.

Se realizó concentraciones sucesivas del extracto alcohólico de "yawar suqu" en concentraciones de (0.750mg/ml), (0.375mg/ml), (0.187mg/ml) y (0.094mg/ml). Para cada concentración se utilizará antígeno estándar AgHBs del virus de la hepatitis B mezclado con el extracto alcohólico en diferentes concentraciones y periodos de tiempo (24 y 48) horas y luego se correrá el procedimiento de análisis de ELISA para la obtención de un resultado positivo o negativo.

Se realizó los controles positivo y negativo en cada procedimiento para la comparación de los resultados.

Los procedimientos de análisis para la reacción de los antígenos se realizaron por tres veces

3.6.2.1. Procedimiento de análisis para la reacción del antígeno.

-Se preparó el portatiras con la cantidad necesaria para cada una de las concentraciones.

-Se preparó 100ul de de antígeno estándar AgHBs mezclado con 100ul. del extracto alcohólico, para cada uno de las concentraciones y periodos de tiempos de (24 y 48) horas.

-Se pipeteó 100 ul de muestra (extracto mas antígeno estándar AgHBs en concentraciones y tiempos ya mencionados).

-Se incubó a 37 °C durante 60 minutos más o menos 5 minutos.

-Se lavó cada pocillo 4 veces en tampón de fosfato.

- Se agregó 100ul de solución de conjugado.
- Se incubó a 37 °C durante 30 minutos más o menos 5 minutos.
- Se lavó cada pocillo 4 veces en tampón de fosfato.
- Se pipeteó 100ul de sustrato de TMB en cada pocillo.
- Se incubó las tiras a temperatura ambiente entre durante 30 minutos, más o menos, 2 minutos en la oscuridad.
- Para la reacción se añadió 100ul de ácido sulfúrico 1 mol/l a cada pocillo.
- Se efectuó la lectura de la placa (a una longitud de onda 450 a 630NM).
- Par la validez de la prueba y la concentración de los HBsAg en las muestras a analizar se determina relacionando el valor de la absorbancia de cada muestra entre el valor umbral.

3.6.3. Reacción sobre el conjugado.

Se realizó las concentraciones sucesivas del extracto alcohólico de "yawar suqu" en concentraciones de (0.750mg/ml), (0.375mg/ml), (0.187mg/ml) y (0.094mg/ml). Para cada concentración se utilizará conjugado mezclado con el extracto alcohólico en diferentes concentraciones y periodos de tiempo (24 y 48) horas y luego se correrá el procedimiento de análisis de ELISA para la obtención de un resultado positivo o negativo.

Se realizó los controles positivo y negativo en cada procedimiento para la comparación de los resultados.

Los procedimientos de análisis para la reacción de los conjugados se realizaron por tres veces.

3.6.3.1. Procedimiento de análisis para la reacción del conjugado.

-Se preparó el portatiras con la cantidad necesaria de para cada una de las concentraciones.

-Se pipeteó 100 ul de muestra (antígeno estándar AgHBs) en los pocillos asignados.

-Se incubó a 37 °C durante 60 minutos más o menos 5 minutos.

-Se lavó cada pocillo 4 veces en tampón de fosfato.

-Se preparó 100ul de conjugado mezclado con 100ul. del extracto alcohólico en diferentes concentraciones de (0.750mg/ml), (0.375mg/ml), 25% (0.187mg/ml) y (0.094mg/ml)

-Se incubó a 37 °C durante 30 minutos más o menos 5 minutos.

-Se lavó cada pocillo 4 veces en tampón de fosfato.

-Se pipeteó 100ul de sustrato de TMB en cada pocillo.

-Se incubó las tiras a temperatura ambiente entre durante 30 minutos, más o menos, 2 minutos en la oscuridad.

-Para la reacción se añadió 100ul de ácido sulfurico 1 mol/l a cada pocillo.

-Se efectuó la lectura de la placa (a una longitud de onda 450 a 630NM).

-Par la validez de la prueba y la concentración de los HBsAg en las muestras a analizar se determina relacionando el valor de la absorbancia de cada muestra entre el valor umbral.

3.6.4. Interpretación de resultados

Abreviatura

Control negativo= Absorbencia de control negativo.

Control de antígeno (AgHBs)= Absorbencia de control positivo.

La interpretación está relacionada a cada pocillo individual utilizado.

Un resultado no reactivo indica que la muestra analizada bien no contiene AgHBs o bien contiene AgHBs a concentraciones inferiores a los límites de detección de Biokit HBsAg.

Un resultado reactivo indica que las muestras analizadas contienen AgHBs.

Control negativo (CN).

CN < 0,120 de absorbancia

Control positivo (CP).

CP ≥ 0,700 de absorbancia

Valor umbral

Calcular el valor umbral añadiendo 0,040 al control negativo.

Valor umbral = CN + 0,040

Resultados

La presencia y concentración de HBsAg en las muestras a analizar se determina dividiendo la absorbancia de la muestra por el valor umbral para cada una de las muestras donde se obtendrán resultados que se compararon con el cuadro de parámetros que es:

Positivo: relación absorbancia/valor umbral ≥ 1,0

Negativo: relación absorbancia/valor umbral < 0,9

Dudoso: relación absorbancia/valor umbral ≥ 0,9 < 1,0

3.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó a través del análisis de varianza a un nivel de confianza del 95% y la prueba de Tukey, representado en histogramas y gráficos.

IV.RESULTADOS.

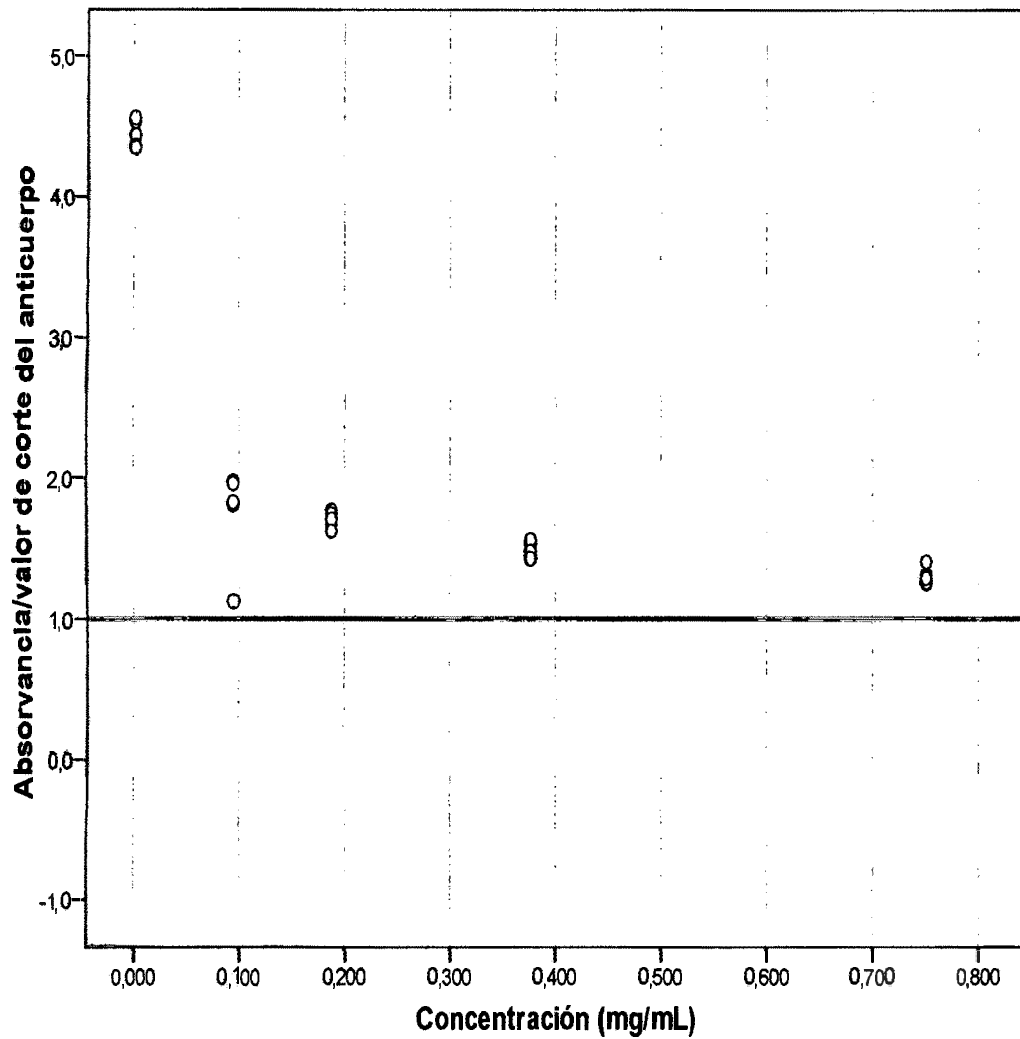


Gráfico 01.- Efecto de las cuatro concentraciones del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* frente al anticuerpo del virus del Hepatitis Ayacucho – 2011

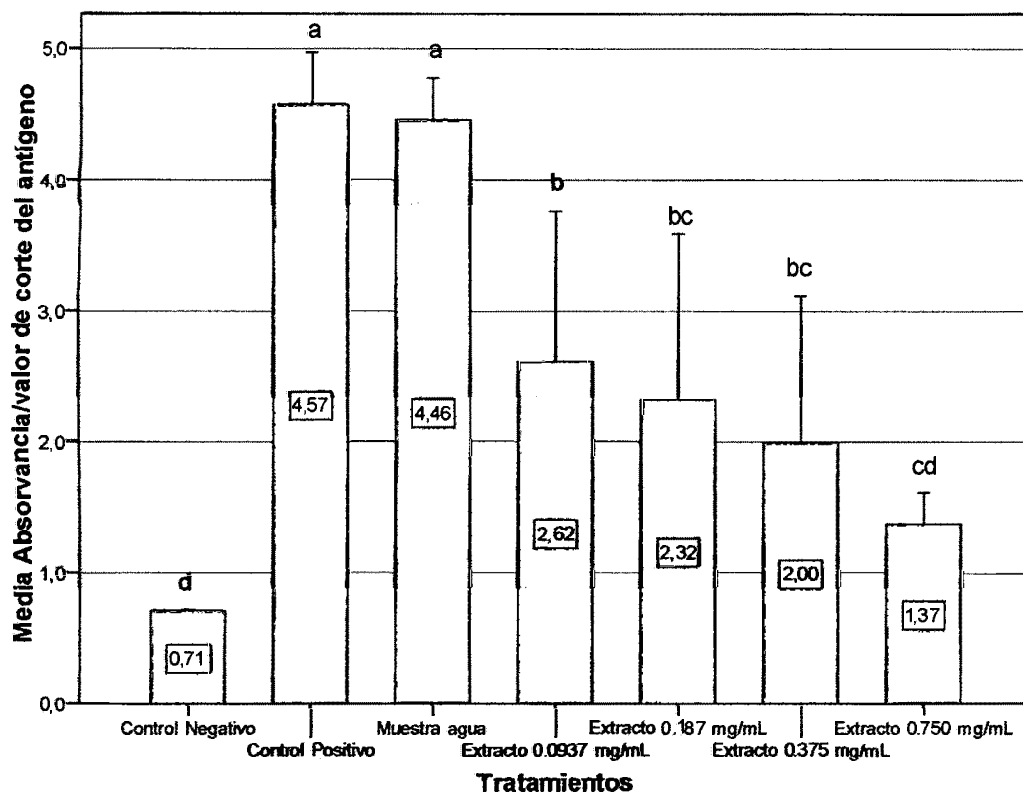


Gráfico 04.- Valores promedios de dos controles, una muestra de agua y cuatro concentraciones del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* frente al anti antígeno del virus de Hepatitis B a las 24 horas. Ayacucho – 2011.

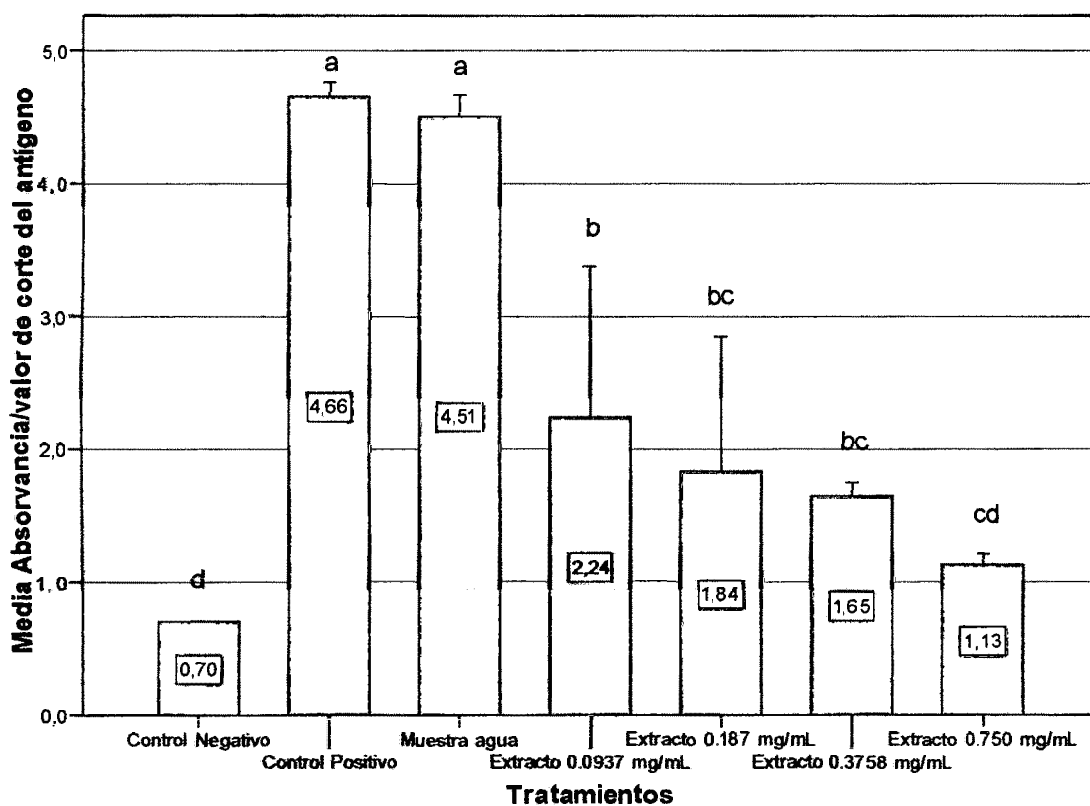


Gráfico 05.- Valores promedios de dos controles, una muestra de agua y cuatro concentraciones del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* frente al anti antígeno del virus de Hepatitis B a las 48 horas. Ayacucho–2011.

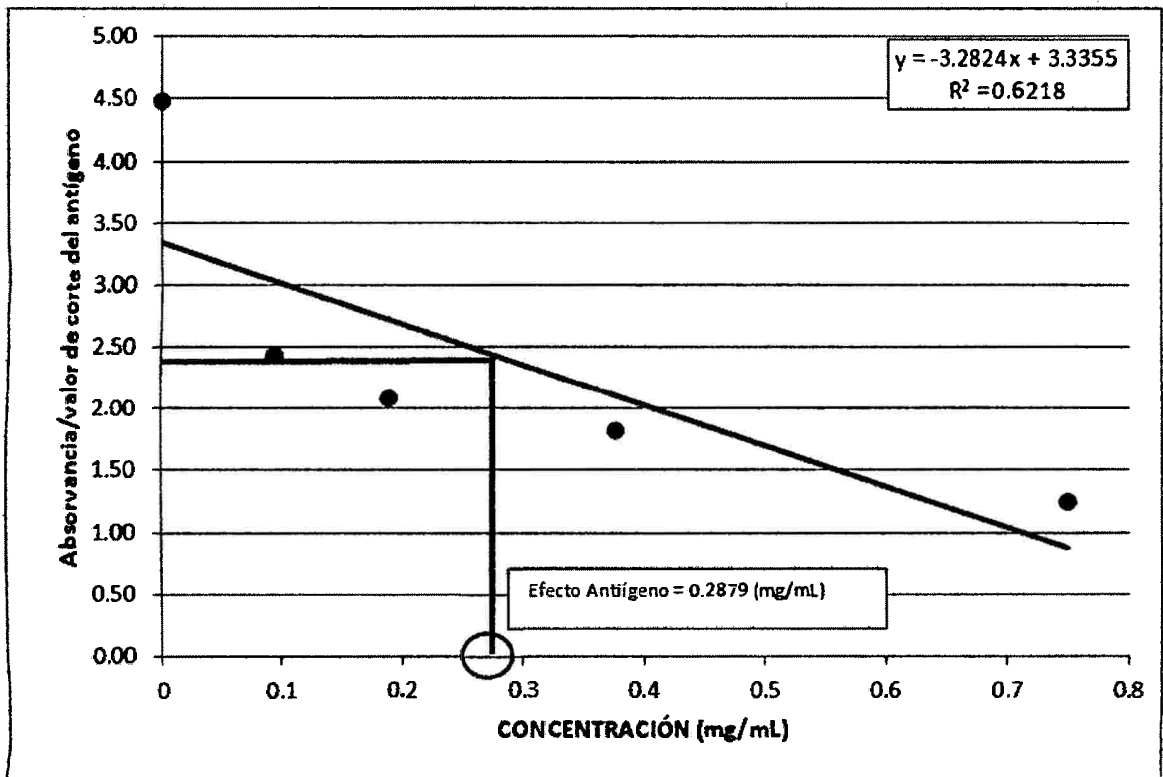


Gráfico 06.- Tendencia y ajuste lineal de las cuatro concentraciones del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* frente al anti antígeno de superficie del virus de Hepatitis B Ayacucho – 2011.

V.DISCUSIONES

Las investigaciones que se realizan en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga y el Laboratorio de Referencia Regional de Ayacucho respecto a las plantas medicinales van teniendo importancia científica que corrobora el conocimiento popular y terapéutico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar suqu", como un agente antiviral. No se han encontrado trabajos específicos de la actividad antiviral de *Oenothera rosea* "yawar suqu", sin embargo existen trabajos relacionados a la actividad antiviral de diversas especies vegetales.

En el Anexo N° 1 observamos las características de la *Oenothera rosea* "yawar suqu" para su identificación y clasificación taxonómica, dicha planta fue identificada y certificada en el laboratorio de botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Según el sistema de clasificación de CRONQUIST, A. en 1988.

En la gráfica N° 1, tenemos los efectos del anticuerpo, virus del Hepatitis B frente a las concentraciones del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar suqu" que todos los ensayos se encuentran en el rango de los

positivos es decir la relación absorbancia/valor umbral $\geq 1,0$. Se observó los valores promedios de las absorbancias / valor de corte del anticuerpo frente a los tratamientos, en el que se observa la existencia de diferentes valores, así se obtuvo los mayores valores para la muestra de agua y para la concentración 0.094 mg/mL, siendo 4.563 y 1.976 respectivamente, mientras que el menor valor fue la muestra de la concentración 0.750mg/mL, con valores de 1.250 hallándose que la muestra del agua son los que muestran los mayores valores de absorbancia/ valor de corte, seguida de los extractos de 0.750mg/mL, 0.375mg/mL. 0.187mg/mL y 0.094mg/mL. el que mostró los menores valores.

En la gráfica N° 2, tenemos los efectos del conjugado, frente a las concentraciones de los extractos alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar suqu" que todos los ensayos se encuentran en el rango de los positivos es decir la relación absorbancia/valor umbral $\geq 1,0$. Se observó los valores promedios de las absorbancias / valor de corte del conjugado frente a los tratamientos, en el que se observa la existencia de diferentes valores, así se obtuvo los mayores valores para la muestra de agua y para la concentración 0.094 mg/mL, siendo 4.578 y 1.988 respectivamente, mientras que el menor valor fue la muestra de la concentración 0.750mg/mL, con valores de 1.437 hallándose que la muestra del agua son los que muestran los mayores valores de absorbancia / valor de corte, seguida de los extractos de 0.750mg/mL, 0.375mg/mL. 0.187mg/mL y 0.094mg/mL. el que mostró los menores valores.

En la gráfica N° 3 tenemos los efectos del antígeno, frente a las concentraciones del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar suqu" que todos los ensayos se encuentran en el rango de los positivos es decir la relación absorbancia/valor umbral $\geq 1,0$. Se observó los valores promedios de las absorbancias / valor de corte del antígeno frente a los tratamientos, en el que se observa la existencia de diferentes valores, así se obtuvo los mayores valores para la muestra de agua y para la concentración 0.094 mg/mL, siendo 4.578 y 3.006 respectivamente, mientras que el menor valor fue la muestra de la concentración 0.750mg/mL, con valores de 1.259 hallándose que la muestra del agua son los que muestran los mayores valores de absorbancia / valor de corte, seguida de los extractos de 0.750mg/mL, 0.375mg/mL. 0.187mg/mL y 0.094mg/mL. el que mostró los menores valores. Lo cual podría deberse a la presencia de metabolitos secundarios presentes en la planta, como son los triterpenos y flavonoides y otros. En estudios realizados por Litter (1998) el extracto crudo de las hojas de *P. aduncum* posee actividad antiviral contra el virus de la polio, antibacteriana y anti fúngica. Por otro lado el estudio de Coto(2004), es un principio antiviral presente en extracto semi purificado de hojas de *Melia azadarach*, que inhibe la multiplicación de virus ADN y ARN in vitro . el 1-cinnamoil,3,11-dihidroximeliacarpina aislado a partir de dichos extractos, es el tetranortriterpenide responsable de actividad antiviral in vitro contra el virus de la estomatitis vesicular y el virus herpes simple.

En el Anexo N°2 de resultados de sólidos solubles obteniendo una concentración máxima de 1.5 mg/mL como concentración madre, a partir de esta se realizó las

diluciones siguientes 0.750 mg/mL que representa el 100%, 0.375 mg/mL que representa el 50%, 0.187 mg/mL que representa el 25% y el 0.094 mg/mL que representa el 12.5%.

En el anexo N° 4. Encontramos en el primer ensayo entre el conjugado y el antígeno frente a las concentraciones de 1.5mg/mL, 0.750mg/mL, 0.375mg/mL. Y 0.187mg/mL, para obtener los valores de absorbancia / valor de corte a las 24 horas así se obtuvo los mayores valores para el anticuerpo en la muestra de agua y en la concentración 0.187mg/mL, siendo 4.619 y 1.463 respectivamente, mientras que el menor valor fue la muestra de la concentración 1.5mg/mL, con valores de 0.663. y los valores para el antígeno de absorbancia / valor de corte a las 24 horas es obtuvo los mayores valores en la muestra de agua y en la concentración 0.187mg/mL, siendo 4.539 y 2.785 respectivamente, mientras que el menor valor fue la muestra de la concentración 1.5mg/mL, con valores de 0.834. La absorbancia / valor de corte que es 0.663 que pertenece al anticuerpo en una concentración de 1.5mg/mL se encuentra dentro del valor negativo, por lo tanto el anticuerpo es más susceptible el cual recomendamos desarrollar el trabajo de la tesis a partir de la concentración de 0.750mg/mL con la intención que el anticuerpo, y antígeno partan en una concentración que no sean afectados por el grado de concentración.

Los valores de referencia para el positivo y negativo son:

Positivo: relación absorbancia /valor umbral $\geq 1,0$

Negativo: relación absorbancia /valor umbral $< 0,9$

Dudoso: relación absorbancia/valor umbral $\geq 0,9 < 1,0$

En el gráfico 04 se observa los valores promedios de las absorbancias/ valor de corte del anti antígeno del virus de Hepatitis B, frente a siete tratamientos, en el que se observa la existencia de diferentes valores, así se obtuvieron los mayores valores para el control positivo y muestra de agua con 4.57 y 4.46 respectivamente, mientras que los menores valores en control negativo y muestra de 0.750mg/mL, con valores de 0.71 y 1.37 respectivamente. Al realizar el análisis de varianza respectivo (Tabla 04 del anexo) se halló significancia estadística ($p < 0.05$), lo que nos indica que por lo menos uno de los tratamientos presenta un valor diferente de absorbancia, por lo que se procedió a realizar el test de Tukey (Tabla 05 del anexo), hallándose que estadísticamente que el control positivo y la muestra de agua son los que muestran los mayores valores de absorbancia, seguida de los extractos de 0.094mg/mL, 0.187mg/mL, 0.375mg/mL. y 0.750mg/mL, siendo el tratamiento del control negativo el que mostró los menores valores. Quiere decir que a mayor concentración de extracto, menor será la absorbancia/valor de corte, que a concentraciones altas, los metabolitos secundarios están más concentrados e inhibe el crecimiento de partículas virales. El estudio realizado por Lock (1994) se ha logrado comparar, en modelos in vitro, que los extractos crudos de la *P. aduncum* posee actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, citotóxica y parasítica. Los diversos fotoquímicos reportan que el *P. aduncum* contiene una gran variedad de metabolitos secundarios que se pueden agrupar en fenil propanoides, derivados Benzoicos, cromenos y flavonoides, las cuales actúan en dichas actividades mencionadas.

En el gráfico 05 se observa los valores promedios de las absorbancias de respuesta anti antígeno del virus de Hepatitis B, frente a siete tratamientos, en le que se observa la existencia de diferentes valores, así se obtuvieron los mayores valores para el control positivo y muestra de agua con 4.66 y 4.51 respectivamente, mientras que los menores valores en control negativo y muestra al 100%, con valores de 0.70 y 1.13 respectivamente. Al realizar el análisis de varianza respectivo (Tabla 07 del anexo) se halló significancia estadística ($p < 0.05$), lo que nos indica que por lo menos uno de los tratamientos presenta un valor diferente de absorbancia, por lo que se procedió a realizar el test de Tukey (Tabla 08 del anexo), hallándose que estadísticamente que el control positivo y la muestra de agua son los que muestran los mayores valores de absorbancia, seguida de los extractos de 0.094mg/mL, 0.187mg/mL, 0.375mg/mL. y 0.750mg/mL, siendo el tratamiento del control negativo el que mostró los menores valores.

En el gráfico 06 se muestra la tendencia lineal de las absorbancias de la respuesta anti antígeno del virus de la hepatitis B frente a cuatro concentraciones del extracto de *Oenothera rosea* "yawarsuqu", observándose que el índice de determinación tienen un valor de 0.6218, lo que quiere decir que el 62.18% de la variación de las absorbancias está explicado por la variación de las concentraciones de los extractos. En estudios realizados por González y col. (2006) se evaluaron las propiedades antivirales de los extractos vegetales derivados a partir de las plantas : *Calendula officinalis* L., *Psidium guajava* L., *Eucaliptos* spp. Y *Phyllanthus orbicularis* contra el virus de la hepatitis b, se llevó a

cabo a concentraciones sub tóxicas en el sistema invitro, PLC/PRF/5 o células Alexander, línea celular que expresa constitutivamente el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B . el parámetro de viabilidad celular se midió mediante los cálculos de los valores de concentración citotóxica media: *Eucaliptos spp* mostró una menor toxicidad en la célula, seguido por *Psidium guajava L.*, *Phyllanthus orbiculari*, y finalmente *Calendula officinalis L* que tuvo una toxicidad mayor que los extractos anteriores. Posteriormente se estudió el comportamiento de la producción de AgsHB intracelular y extra celular de las células a diferentes concentraciones de los extractos durante las 48 horas de tratamiento. Los datos obtenidos mostraron actividad inhibitoria en el caso de *Phyllanthus orbicularis* asi como para el extracto de eucalito. Con el extracto de guayaba la actividad fue menor que en los dos casos anteriores, mientras que la caléntula no mostró ninguna inhibición a las concentraciones ensayadas, lo que indica la ausencia de la actividad buscada en el extracto.

Se muestra también la concentración media inhibitoria (CMI 50) que tiene un valor de 0.2879mg/mL de extracto, esto es que para inhibir la 50% de la totalidad del antígeno del virus del hepatitis B es necesario esta concentración. Al respecto rojas A, 2006 , afirma que los grupos fenolicos y flavonoides podrían ser los responsables del efecto hepatoprotector . se puede concluir que a mayores concentraciones del extracto y mayor tiempo de exposición se va inhibiendo la multiplicación viral.

En estudios realizados por la investigación de Wallace (2008) de *Croton lecheri*, el latex de sangre de grado que contiene dentro de sus principales componentes el alcaloide denominado *taspina* y sustancias como: *piridonas*, *aporfina*, *quinoleína*, y el principio de SP-303 que es una sustancia proantocianidina oligomérica (flavonoide) de acción antiviral realizados experimentos invitros muestran que esta proantocianidina inhibe diferentes virus DNA y ARN, incluyendo el virus de herpes dañando o destruyendo sus diferentes proteicos incluyendo el virus de la hepatitis (A y B), el virus de la influenza y el virus de la parainfluenza. También es efectivo para el virus sincitial respiratorio. La actividad viral contra los dos tipos del virus herpes simple, incluye también el tipo I timidinaquinasa deficiente, ya que impide la penetración del virus en la célula.

En el Anexo N° 16 respecto Tinco (1998) reportó la presencia de taninos, flavonoides, azúcares reductores, saponinas, mucilagos, principios amargos, catequinas, resinas, lactonas, esteroides y triterpenos en diferentes extractos entre ellos el alcohólico. Estos metabolitos como flavonoides, saponinas y triterpenos podrían estar interviniendo en la actividad antiviral. Si bien es cierto que todavía no existen trabajos de esta naturaleza con la planta en estudio.

VI.CONCLUSIONES

1. Se llegó a determinar que el extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar suqu" tiene efecto con el anti antígeno de superficie del virus del Hepatitis B se halla que hay diferencia estadística ($p < 0.05$) siendo la concentración 0.750mg/mL el que mayor efecto tuvo.
2. Se llegó a determinar el efecto del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* frente al anticuerpo y conjugado del anti antígeno de superficie del virus del Hepatitis B.
3. Se determinó el efecto anti antígeno de superficie del virus del Hepatitis B, a diferentes concentraciones del extracto, que a mayor concentración del extracto menor es el antígeno de superficie del virus del hepatitis B y mayor es el efecto anti viral. El valor de corte y la concentración media inhibitoria (CM_{50}) para el extracto alcohólico fue de 0.2879 mg/mL.
4. Se determinó el efecto anti antígeno del virus del Hepatitis B a diferentes tiempos de exposición, que a mayor tiempo menor es el numero de absorbancia / valor umbral.

VII.RECOMENDACIONES

- 1.- Se recomienda aislar los principios activos responsables de la actividad antiviral y determinar su mecanismo de acción presentes en la *Oenothera rosea*.
- 2.- Se recomienda formular un preparado galénico utilizando como principios activos el extracto alcohólico de *Oenothera rosea* como agente antiviral.
- 3.- Realizar este tipo de trabajos utilizando diferentes tipos de extracto y con metabolitos secundarios mas purificados y utilizando virus de la célula animal.

VIII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 **Aguilar Felices, E.** 2004. Aspectos Etnobotánicos, químicos y farmacológicos de *Oenothera rosea* "chupasangre". UNMSM. Lima.
- 2 **Ango A., Carrasco V.** 2005 inmunología ed. 1ra. Ed. Mercantil Edit. UNSCH – Ayacucho- Perú.
- 3 **Alarcón J, Huaman R.** 2008. Guía de prácticas de virología. UNSCH. Ayacucho.
- 4 **Alarcón J.** 2009. Actividad citotóxica e inmunoestimulante del extracto acuoso de *Oenothera rosea* "chupasangre". UNSCH. Ayacucho.
- 5 **Betalleluz B.** 2007. Actividad hipoglucemiante del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea*. Ayacucho.
- 6 **Brack, A.** 2009. Diccionario Enciclopédico de plantas útiles del Perú. PNUD – Centro de Estudios Bartolomé de la Casas. Cusco – Perú.
- 7 **Brumeton, J.** 2001. Elementos de la Fotoquímica y Farmacología. 2da Ed. Edit. Acribia S.A. Zaragoza – España.
- 8 **Cabieses, F.** 2003 Ayer y Hoy. Plantas Medicinales. 1ra Ed. Edit. Universidad Científica del Perú.
- 9 **Cornejo, V.** 1986. Las plantas medicinales y su correcta utilización Facultad de Ciencias Biológicas. UNSCH. Ayacucho – Perú.
- 10 **Coto, E.** 2004. Principio antiviral presente en los extractos semipurificados tesis Facultad de ciencias Exactas y Naturales URLhttp://www.rec.uba.ar/ubacyt_2004-7/archivos/X046.doc.Argentino.
- 11 **Desmarchelier, C.** 2003. Sesenta plantas medicinales de la Amazonia Peruana. Ed.Juan Castr, Perú.

- 12 **De La Cruz E.** 2009. Efecto antiviral del extracto alcohólico y acuoso de *Piperelongatum* L "matico" Ayacucho 2009. Tesis UNSCH. Ayacucho. 2009.
- 13 **Espinoza, I.** 2002 Determinación de la toxicidad del tallo y de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo". Tesis UNSCH. Ayacucho.
- 14 **Fernandez, M.** 1997. Medicina Tradicional. 3ra Ed. Edit. Rencar, UNMSM. Lima.
- 15 **Gamazo C.** 2005. Manual práctico de Microbiología. Edit. Elsevier. España.
- 16 **González, R;Roque, A; Morier, L y Rodriguez, L** 2006. Evaluación de la actividad anti viral de plantas medicinales frente al virus de la Hepatitis B en Células PLC /PRF/5/. Rev.Cuba.med.trop.mayo-agosto.
- 17 **Gonzales, J.** 2005 Estudio fitoquímico comparativo de *Oenothera rosea* y *Oenothera multicaulis* (yawar chonq'a).
- 18 **Kuklinski, C.** 2004. Farmacología estudio de las drogas y medicamentos de origen natural.2da Edit. Omega Barcelona- España.
- 19 **Lincoln, T. y Zeiger, E.** 2006. Secondary metabolites and plant defense plant physiology, fourth Edition. Sinauer associates, Inc, disponible en : URLhtt://es.Wikipedia.org/wiki/saponina.
- 20 **Lok, O.** 1994 Investigación Fitoquímica. Metodos en el studio de productos naturales.2da Ed. Fondo Editorial PUCP. Lima – Perú.
- 21 **Litter. M.** 1998. Compendio de farmacología 4ta Edc. Edit. Ateneo Buenos Aires- Argentina.
- 22 **López, A.** 2009. Antioxidant activity of flavonoids. Rev. N° 0042. Departamento de Farmacia, Facultad de Química. Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 23 **Luria E, Darnell, J.** Virología General. Ediciones Omega. Barcelona. 1991.

- 24 **Morales, A y Botero, L.** 2009. ESTUDIO DE LOS VIRUS. Unidad de Investigación de Microbiología Ambiental. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad de Zulia. Venezuela.
- 25 **Mostacero, J.** 1993. Taxonomía de Fanerógamas peruanas. 1ra Ed. Edit. CONCYTEC, La Libertad- Perú.
- 26 **Murray, S.** 2009. **Virología Básica: replicación de los virus.** In **Microbiology.** 3ra ed. Santiago, Republica Dominicana, Disponible en:
URL <http://www.microbiología.com.ar/virología/procariontes.htm>.
- 27 **Okatami, M.** 2007. **Mecanismos de acción de compuestos antivirales en plantas, el virus de la inmunodeficiencia humana como modelo.** VITAE- Academia Biomédica digital. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Abril- JUNIO 2007 N| 31, disponible en:
URL http://pdfs/VITAE__614.pdf.
- 28 **Palacios, J.** 1999. Plantas medicinales nativas del Perú. CONCYTEC. Lima Perú.
- 29 **Patrick, Ken ,M** 2006 **Microbiología Médica** 5ta edic. Elsevier España- Madrid
- 30 **Pro-vida** 2005. Servicio de medicina. Guía de plantas de uso medicinal. 1ra ed. Servicio de medicina Pro- Vida. Lima Perú.
- 31 **Wallace, J.** 2008. La sabia del árbol de América de Sur es analgésico, antiinflamatorio, antiviral y antibiótico. Ciencias Naturales de la University de Calgarys Faculty of Medicine.
- 32 **Rojas A.** 2006. Evaluación del efecto hepatoprotector de extractos acuosos de *Oenothera rosea* Ait "chupasangre". UNMSM. Tesis. UNMSM. Ayacucho.
- 33 **Rodriguez,** 2002 **Aspectos Etnobotánicos, químicos y farmacológicos de**

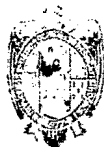
Oenothera rosea.

- 34 **Tinco A.** 1998. Estudio fotoquímico y determinación de la actividad antiinflamatoria de *Oenothera rosea* "yawarsoqo". Tesis UNSCH. Ayacucho.
- 35 **Mayta, H.** 1996 Manual de Prácticas del Curso de Virología. U.N.M.S.M. Lima.
- 36 **Márquez, Y.** 2009. Actividad antiinflamatoria de los extractos acuoso y metabólico de *Oenothera rosea* L' Her. Ex Ait en la rata. Rev Mexicana de ciencias farmacéuticas. 2009.
- 37 **Zevallos, O.** 2004. Tamizaje fotoquímica y evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso. tesis UNSCH Ayacucho- Perú.

ANEXOS

ANEXON° 1

Clasificación taxonómica de *Oenothera rosea* Ait. "yawar suqu



EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

C E R T I F I C A

Que, el Bach. en Biología, Sr. Roger HUAMÁN SÁNCHEZ, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de CRONQUIST, A (1988), y es como sigue

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	MYRTALES
FAMILIA	:	ONAGRACEAE
GENERO	:	<i>Oenothera</i>
ESPECIE	:	<i>Oenothera rosea</i> Ait.
N.V.	:	"yawar suqu", "chupa sangre"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para lo fines que estime conveniente

Ayacucho, 043 de Agosto del 2011.

ANEXON°2

Tabla N°1: Resultados de sólidos solubles de acuerdo a la dilución del extracto obtenido de las hojas de *Oenothera rosea* “yawar suyu”.

Dilución del extracto	Sólidos Solubles (mg/mL)
Concentración madre	1.5mg/mL
100.00%	0.750
50.00%	0.375
25.00%	0.187
12.50%	0.094

ANEXON°5

Tabla 03.- Estadísticos descriptivos de las absorbancias / valor de corte a las 24 horas de respuesta anti antígeno del virus de Hepatitis B frente a dos controles, una muestra de agua y cuatro concentraciones del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* “yawarsuqu” Ayacucho – 2011.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control Negativo	3	.70533	.005508	.003180	.69165	.71901	.700	.711
Control Positivo	3	4.57267	.198807	.114781	4.07880	5.06653	4.385	4.781
Muestra agua	3	4.45633	.159654	.092176	4.05973	4.85294	4.277	4.583
Muestra 0.094mg/mL	3	2.61567	.572867	.330745	1.19259	4.03875	1.958	3.006
Muestra 0.187 mg/mL	3	2.32367	.632166	.364981	.75328	3.89406	1.608	2.806
Muestra 0.375 mg/mL	3	1.99533	.559881	.323247	.60451	3.38615	1.349	2.331
Muestra 0.750 mg/mL	3	1.36967	.121698	.070262	1.06735	1.67198	1.259	1.500
Total	21	2.57695	1.429692	.311984	1.92616	3.22774	.700	4.781

ANEXON°6

Tabla 04.- Análisis de varianza para las absorbancias / valor de corte a las 24 horas de respuesta anti antígeno del virus de Hepatitis B frente a dos controles, una muestra de agua y cuatro concentraciones del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawarsuqu" Ayacucho – 2011.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	38.638	6	6.440	40.207	.000
Intra-grupos	2.242	14	.160		
Total	40.880	20			

ANEXON°7

Tabla05.- Test de Tukey para las Absorbancias / valor de corte a las 24 horas del virus de respuesta anti antígeno del virus de Hepatitis B comparando dos controles, una muestra de agua y cuatro concentraciones del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawarsuqu" Ayacucho – 2011.

HSDdeTukey

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa= .05			
		1	3	4	1
Control Negativo	3	.70533			
Muestra 0.750 mg/mL	3	1.36967	1.36967		
Muestra 0.375 mg/mL	3		1.99533	1.99533	
Muestra 0.187 mg/mL	3		2.32367	2.32367	
Muestra 0.094mg/mL	3			2.61567	
Muestra agua	3				4.45633
Control Positivo	3				4.57267
Sig.		.437	.118	.512	1.000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
 a Usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

ANEXON°8

Tabla 06.- Estadísticos descriptivos de las absorbancias / valor de corte a las 48 horas de respuesta anti antígeno del virus de Hepatitis B frente a dos controles, una muestra de agua y cuatro concentraciones del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawarsuqu" Ayacucho – 2011.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Control Negativo	3	.70233	.002517	.001453	.69608	.70858	.700	.705
Control Positivo	3	4.65500	.052564	.030348	4.52442	4.78558	4.601	4.706
Muestra agua	3	4.50667	.079601	.045958	4.30893	4.70441	4.417	4.569
Muestra 0.094mg/mL	3	2.24300	.566847	.327270	.83487	3.65113	1.589	2.593
Muestra 0.187 mg/mL	3	1.83567	.505939	.292104	.57884	3.09249	1.258	2.200
Muestra 0.375 mg/mL	3	1.64900	.049669	.028676	1.52562	1.77238	1.615	1.706
Muestra 0.750 mg/mL	3	1.13033	.039954	.023068	1.03108	1.22958	1.098	1.175
Total	21	2.38886	1.515771	.330768	1.69889	3.07883	.700	4.706

ANEXON°9

Tabla 07.- Análisis de varianza para las absorbancias / valor de corte a las 48 horas de respuesta anti antígeno del virus de Hepatitis B frente a dos controles, una muestra de agua y cuatro concentraciones del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawarsuqu" Ayacucho – 2011.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	44.770	6	7.462	88.460	.000
Intra-grupos	1.181	14	.084		
Total	45.951	20			

ANEXON° 10

Tabla 08.- Test de Tukey para las absorbancias / valor de corte a las 48 horas de respuesta anti antígeno del virus de Hepatitis B comparando dos controles, una muestra de agua y cuatro concentraciones del extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* “yawarsuqu” Ayacucho – 2011.

HSDdeTukey

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa= .05			
		2	3	4	1
Control Negativo	3	.70233			
Muestra 0.750 mg/mL	3	1.13033	1.13033		
Muestra 0.375 mg/mL	3		1.64900	1.64900	
Muestra 0.187 mg/mL	3		1.83567	1.83567	
Muestra 0.094mg/mL	3			2.24300	
Muestra agua	3				4.50667
Control Positivo	3				4.65500
Sig.		.566	.108	.229	.995

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica= 3.000.

ANEXON° 11



Fotografía N° 1: hojas *Oenothera rosea* "yawar suqu" del Valle de Muyurina del Distrito de Jesús Nazareno Provincia de Huamanga. Ayacucho 2011

ANEXON° 12

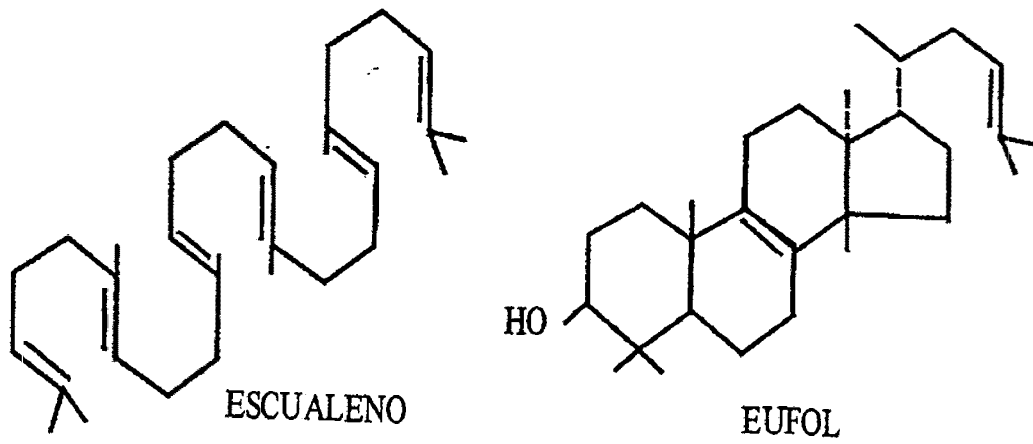
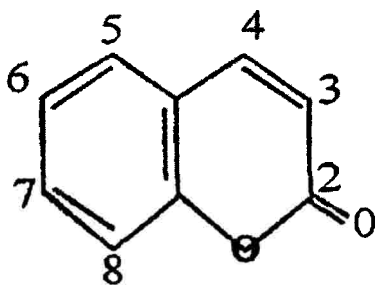
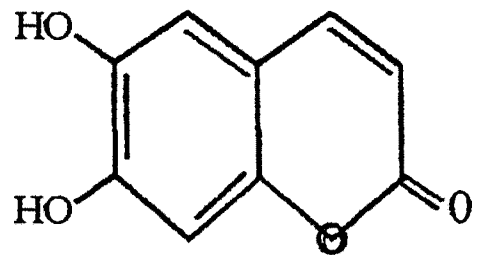


Figura N° 2 estructura química de un triterpeno y esteroides el cual No existe una diferencia considerándose a los esteroides como triterpenos tetra cíclicos. (Lck; 1994).

ANEXON° 13



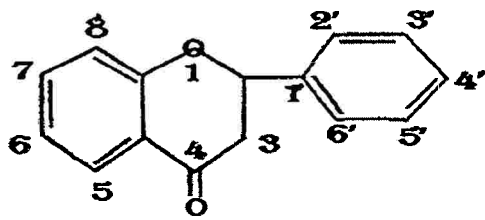
CUMARINA



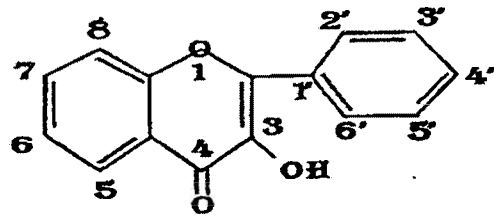
ESCULETOL

Figura N° 3 estructura química de de las cumarinas y el esculetos. (Lck; 1994).

ANEXON° 14



NUCLEO BASICO DE UN
FLAVONOIDE

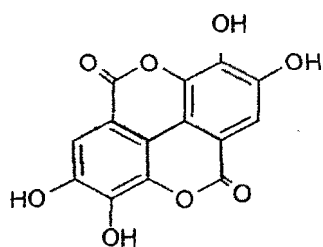


FLAVONOL

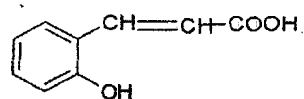
Figura N° 4. Estructura química del núcleo básico de un flavonoide y un flavonol .

ANEXON° 15

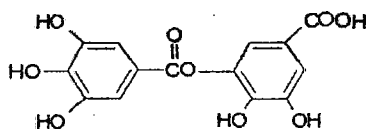
Compuestos fenólicos y flavonoides presentes en la hoja de *Oenothera rosea* según Aguilar (2004).



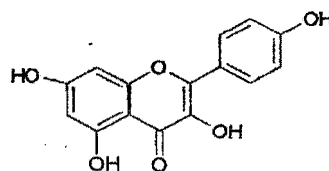
Ácido elágico



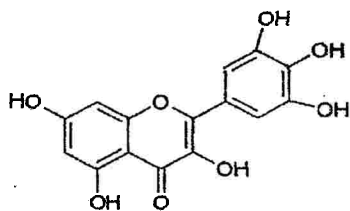
Ácido o-cumárico



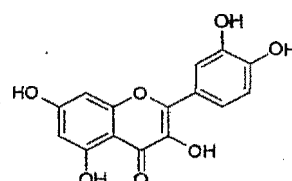
Ácido m-digálico



Kaempferol



Miricetina



Quercetina

En las semillas de *Oenothera rosea*, Wolf (1983), en su trabajo titulado *New sources of γ-linolenic acid*, determinó la presencia de ácidos grasos insaturados: ácido linoleico y linolénico.



Figura N° 5. Compuestos químicos en las hojas y semillas de la *Oenothera rosea* "yawar suqu"

ANEXON° 16

Ensayos	Metabolitos	Resultados
Dragendorff	Alcaloides	-
FeCl ₃	Taninos y/o polifenoles	+++
Kedde	Cardenólidos	+
Liebermann	Triterpeno y/o Esteroides	++
Shinona	Flavonoides	+++
Benedict	Azucares Reductores	+
Espuma	Saponinas	++
Ninhidrina	Aminoácidos	++
Baljet	Lactonas y/o Cumarinas	+
KMnO ₄	Sustancias Reductoras	+++

Cuadro N° 1. Reportó la presencia de taninos flavonoides, azucares reductores, saponinas, mucilagos, principios amargos, catequinas, resinas, lactonas, esteroides y triterpenos en el extracto alcohólico de las hojas de *Oenothera rosea*.

ANEXON° 17



Fotografía N° 2: Pulverizado de las hojas *Oenothera rosea* "yawar suqu" en condiciones estériles, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho 2011

ANEXON° 18



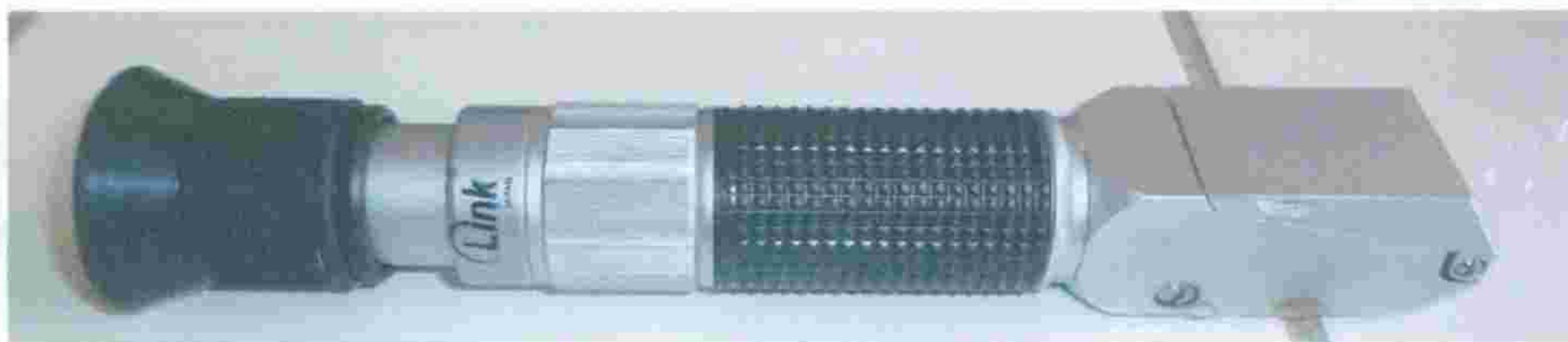
Fotografía N° 3: Medición de la muestra, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho 2011

ANEXON° 19



Fotografía N° 4: Procesamiento para obtener el extracto alcohólico, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho 2011

ANEXON°20



Fotografía N° 5: Procesamiento para obtener el extracto alcohólico, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho

2011

ANEXO N°21



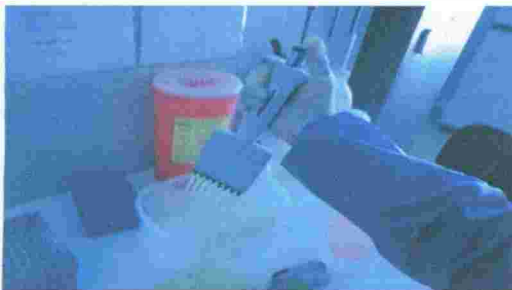
Fotografía N° 6: Diluciones de la muestra madre del extracto alcohólico en 100%, 50%, 25% y 12.5%, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho 2011

ANEXON°22



Fotografía N° 7: Biokit de ELISA de antígeno de superficie del virus de Hepatitis B, en el Laboratorio de Referencia Regional Ayacucho. Ayacucho 2011

ANEXON°23



Fotografía N° 8: Procedimiento de la reacción de los antígenos, anticuerpos y conjugados a través de la ELISA, en el Laboratorio de Referencia Regional Ayacucho. Ayacucho 2011