

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN  
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Efecto antiviral del extracto acuoso y etanólico de  
las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal".**

**Ayacucho, 2010.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
BIÓLOGA - MICROBIÓLOGA**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. HINOSTROZA HUAMANI, NORI MIRTHA**

**AYACUCHO-PERÚ**

**2011**

A mis padres Jesús Hinojosa García y  
Zaragoza Huamani Quispe, por su  
apoyo constante en la culminación de  
mi carrera universitaria.

A mis hermanos Rolando,  
Raúl, Carlos y Danny por su  
apoyo incondicional y  
paciencia en todo momento de  
mi vida estudiantil.

A mi añorable tierra Cangallo, ciudad  
histórica y cuna de grandes hombres.

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, forjadora de grandes profesionales.

A la Escuela de Formación Profesional de Biología y especialmente a los docentes que laboran en ella, los cuales me brindaron sus conocimientos y experiencias a lo largo de estos años.

Al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas por ser testigo mudo del desarrollo experimental de mi trabajo de investigación.

Al MCs. José Alarcón Guerrero, docente de la Escuela de Formación Profesional de Biología, por el constante apoyo en el asesoramiento y culminación del presente trabajo.

A la MCs. Martha Romero Viacava por su asesoramiento.

Al MCs. Carlos Carrasco Badajoz por el asesoramiento en la parte estadística.

## INDICE

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	v
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	01
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	03
2.1. Antecedentes	03
2.2 Nogal ( <i>Juglans neotropica</i> Diels)	04
2.3 Clasificación sistemática de <i>Juglans neotropica</i> Diels "nogal"	04
2.4 Descripción botánica	04
2.5 Composición química y acción farmacológica	05
2.6 Formas de utilización	06
2.7 Bacteriofagos	07
2.8 Estructura de los bacteriófagos	08
2.9 El proceso de infección viral	10
2.10 Bacteriófago lisogénico	14
2.11 Cuantificación de bacteriófagos	15
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	17
3.1 Ubicación	17
3.2 Materiales	17
3.2.1 Muestra biológica	17
3.3 Diseño metodológico	17
3.3.1 Recolección de la muestra	17
3.3.2 Preparación de la muestra	18
3.3.3 Obtención del extracto acuoso: por infusión	18
3.3.4 Obtención del extracto etanólico: por maceración	18
3.3.5 Aislamiento de virus (bacteriófagos)	18
3.3.6 Determinación de la actividad antiviral	19
3.4 Análisis estadístico	20
<b>IV. RESULTADOS</b>	21
<b>V. DISCUSIÓN</b>	29
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	35
<b>VII. RECOMENDACIONES</b>	36
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	37
<b>ANEXOS</b>	



**TITULO:** Efecto antiviral del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal”. Ayacucho, 2010.

**AUTORA:** Bach. Nori Mirtha Hinojosa Huamani

**ASESORES:**

**Asesor:** MCs. José Alarcón Guerrero

**Coasesora:** MCs. Marta Romero Viacava

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación experimental se realizó en la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Facultad de Ciencias Biológicas, Área Académica de Microbiología y tuvo como objetivos: Realizar la identificación taxonómica de *Juglans neotropica* Diels “nogal”, determinar a qué concentración del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” tiene efecto antiviral y comparar cual de los dos extractos posee mayor actividad antiviral. La obtención de los extractos se realizó por maceración y filtración, para el aislamiento de virus (bacteriófagos) se utilizó *Escherichia coli* ATCC 13706 y la determinación del efecto antiviral se realizó de acuerdo al número de Unidades Formadoras de Placas de lisis (UFP/mL). Con los resultados obtenidos se confeccionaron gráficos, además se realizó el análisis de varianza y la prueba de Tukey. Se tuvo los siguientes resultados: se formaron 748.81 y 544.05 UFP/mL para el extracto acuoso y etanólico respectivamente, el extracto acuoso formó 887.5 y 354.2 UFP/mL para una concentración de 1.25 mg/mL y 20.0 mg/mL respectivamente; el extracto etanólico formó 841.7 y 4.2 UFP/mL para una concentración de 1.25 mg/mL y 20.0 mg/mL siendo la Concentración Media Inhibitoria (CMI<sub>50</sub>) de 10.7mg/mL y una CMI<sub>50</sub> de 4.20 mg/mL para el extracto acuoso y etanólico respectivamente. Se concluye que se logró identificar taxonómicamente a la especie *Juglans neotropica* Diels “nogal”, el extracto acuoso tuvo un efecto antiviral a una Concentración Media Inhibitoria (CMI<sub>50</sub>) de 10.7 mg/mL respectivamente y el extracto etanólico a una CMI<sub>50</sub> de 4.2 mg/mL respectivamente, notándose que el extracto etanólico posee mejor actividad antiviral.

**Palabras clave:** *Juglans neotropica* Diels, efecto antiviral, extracto acuoso, extracto etanólico.

## I. INTRODUCCION

El resurgimiento del interés mundial por las plantas medicinales nos lleva a reflexionar sobre la necesidad de revalidar nuestra medicina natural utilizado por los "médicos" indígenas o curanderos peruanos.

Son numerosas las plantas a las que la farmacopea popular adjudica propiedades curativas, entre ellas *Juglans neotropica* Diels "nogal" a cuyo estudio esta orientado el presente trabajo. Esta especie ampliamente distribuida, es común en muchas partes de América y especialmente en los Andes del Perú. Su rango altitudinal va desde los 1000 a los 3000 msnm, no resiste fríos intensos ni heladas, exige suelos profundos y sueltos. (Font Quer, 1981).

Las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal" presenta como metabolitos secundarios en extracto acuoso y etanólico la presencia de aceites, alcaloides, aminoácidos, azúcares reductores, flavonoides, lactonas y cumarinas, saponimas, taninos y fenoles, triptenos y esteroides (Carhuallanqui, 2003; Chanhuala, 2005). Los principios activos más importante son los taninos, que le confieren una acción astringente, antidiarreica y antimicrobiana. Su contenido en vitamina C disminuye con la desecación. Las hojas son también hipotensoras e hipoglucemiantes. Parece ser que posee una acción antitumoral por su fracción ácida (Bhargava y Westfall, 1968). Por estos componentes se presume que

también podrían tener efecto antiviral.

Los virus son agentes infecciosos más pequeños, varían de 20 a 300 nm de diámetro aproximadamente y sólo contienen un solo tipo de ácido nucleico (ARN o ADN) como genoma. Dentro de los virus tenemos a un grupo denominado bacteriófagos (o fagos) que son virus que atacan a bacterias y dentro de ellos se encuentran a los fagos que atacan a células de *Escherichia coli* denominados colifagos, los que están frecuentemente en el tracto gastrointestinal del hombre y de los animales en consecuencia pueden aislarse de las heces y aguas residuales (Aranda, 1998; Mins, 1995), por lo cual se pueden utilizar como modelos de virus para determinar la actividad antiviral.

En este sentido, para este trabajo, se consideraron los siguientes objetivos:

- Realizar la Identificación taxonómica de *Juglans neotropica* Diels "nogal".
- Determinar a qué concentración el extracto acuoso de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal" tiene efecto antiviral.
- Determinar a qué concentración el extracto etanólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal" tiene efecto antiviral.
- Comparar cual de los dos extractos posee mayor actividad antiviral.

## II. MARCO TEORICO

### 2.1. ANTECEDENTES

Es común el empleo popular de partes vegetales con la finalidad de obtener variados efectos medicamentosos. Varios estudios han comprobado científicamente la eficacia de numerosos casos de tales usos. Entre las variadas aplicaciones terapéuticas de los vegetales, se incluyen aquellas con finalidad antimicrobiana y antiviral.

Carhuallanqui (2003), realizó estudios de la actividad antimicrobiana de *Juglans neotropica* Diels "nogal" en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga encontrando actividad antibacteriana sobre cepas de *Salmonella spp.*

Chanhualla (2005) comprobó la existencia de actividad antibacteriana de bacterias Gram positivas causantes de infecciones respiratorias de extractos hidroalcohólicos de *Juglans neotropica* Diels "nogal".

En cuanto a la determinación del efecto antiviral de plantas tenemos el de Castellanos (2002), quien determinó el efecto antiviral de tinturas de *Hypericum spp* cultivadas en Cuba, el cual trabajó con el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B utilizando el kit tipo ELISA, demostrando que la planta mencionada presenta efecto antiviral contra estos antígenos.

De la Cruz (2009), demostró el efecto antiviral de extractos de *Piper elongatum* "matico", utilizando como modelo de virus a bacteriófagos de *Escherichia coli* ATCC 13706, notándose la disminución de formación de Unidades Formadoras de Placas de lisis (UFP/mL) cuando la concentración de los extractos aumentaba.

## **2.2 NOGAL (*Juglans neotropica* Diels)**

Esta planta es nativa de los Andes, su rango altitudinal va desde los 1000 a los 3000 msnm, no resiste fríos intensos ni heladas, exige suelos profundos y sueltos. (Font Quer, 1981).

## **2.3 CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA DE *Juglans neotropica* Diels "nogal"**

Según el sistema de clasificación de Engler y Prantl, tenemos:

DIVISIÓN	:	ANTOPHYTA (ANGIOSPERMAE)
CLASE	:	DICOTILEDONEAE
SUBCLASE	:	ARCHYCLAMIDEAS
ORDEN	:	JUGLANDALES
FAMILIA	:	JUGLANDACEAE
GÉNERO	:	<i>Juglans</i>
NOMBRE CIENTÍFICO	:	<i>Juglans neotropica</i> Diels
NOMBRE COMÚN	:	"nogal", "tocte"

Fuente: certificado del Herbarium Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (Anexo N° 08).

## **2.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA**

Normalmente alcanza unos 20 metros de altura. Es usual que la mitad del

fuste sea limpio, de porte recto. Su copa es irregular, con tendencia a ser proporcionalmente reducida, de ramas gruesas. Las hojas son compuestas, alternas pinnadas, de 25 a 40 cm de largo, sin estípulas, con 9 a 17 folíolos lanceolados de 6 a 10 cm de largo y 2.5 a 4 cm de ancho, borde aserrado, ápice acuminado, haz verde oscuro glabro y envés verde pubescente. Las flores masculinas aparecen en las ramas del tallo anterior, en las axilas de las cicatrices foliares. Estas flores son numerosas y dispuestas en espiga. Las flores femeninas se ubican, en grupos de 2 a 4, en el extremo de las ramas. Frutos de drupa redonda, de color pardo a negro, con pedúnculo corto. Al disgregarse el mesocarpo del fruto, queda la nuez o semilla con su cubierta característica (Font Quer, 1981; Rojas, 2008).

## **2.5 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACCIÓN FARMACOLÓGICA**

Carhuallanqui (2003), Chanhualla (2005) y Huamaní (2005) en sus respectivos trabajos realizados en nuestra localidad, encontraron que las hojas presenta metabolitos secundarios en el extracto acuoso y etanólico, tales como aceites, alcaloides, aminoácidos, azúcares reductores, flavonoides, lactonas y cumarinas, saponimas, taninos y fenoles, triperenos y esteroides.

La pulpa del fruto es rica en ácido málico y oxálico, además contiene una naftaquinona: la juglona que es fungistático citotóxico. La almendra de la semilla del nogal sirve de alimento, contiene entre 60% y 65% de aceites (Kuklinski, 2000).

Los principios activos más importante son los taninos y los flavonoides. Los taninos le confieren propiedades astringentes (antidiarreico, hemostático local, cicatrizante, antisudoral) y antisépticas, que además es aperitivo, antihelmíntico y queratolítico. Los flavonoides tienen efecto antioxidante, son bien conocidas sus actividades contra la fragilidad capilar, dilatadores de las

coronarias, espasmolítica, antihepatotóxica, actividad antimicrobiana, son diuréticas. (Lock de Ugaz, 1994, Muñoz, 1994). Las hojas son también hipotensoras e hipoglucemiantes. Parece ser que posee una acción antitumoral por su fracción ácida (Bhargava y Westfall, 1968).

Sus hojas por ser astringentes se han recomendado por años para controlar la diarrea. Estudios han comprobado que las juglonas encontradas en los tejidos del nogal poseen cualidades irritantes, antifúngicas y queratinizantes, por lo cual es utilizado en muchos productos para la piel. Es también utilizado en afecciones como es el caso del acné, el eczema y la dermatitis. Por su acción antiséptica y reductora del sarro es utilizada en pasta para dientes, y por su acción tonificante es recomendada para la pérdida del cabello y la alopecia. El uso del pericarpio resulta beneficioso para tratamientos de irritación de la garganta o flujo vaginal, gracias a sus propiedades astringentes (URL: <http://www.plantasparacurar.com/propiedades>, Muñoz, 1994).

## **2.6 FORMAS DE UTILIZACIÓN**

La semilla (nuez) constituye importante alimento humano. Debido a su contenido en tanino, tanto la corteza como las hojas, el mesocarpio de los frutos y aún las raíces, se utilizan para teñir (color nogal, es decir, marrón oscuro) tejidos de algodón y lana. Por ser astringente, la infusión de hojas de nogal se usa para cortar diarreas, lavar heridas, contra la tos y para teñir de negro el cabello. También debido a dicha propiedad, el jugo de los frutos tiernos mezclado con miel de abeja es usado como cicatrización en el tratamiento de heridas y llagas. (URL: <http://www.plantasparacurar.com/propiedades>).

En Colombia la infusión de hojas y frutos sirve para teñir las canas y prevenir la caída del cabello. La infusión de las hojas se toma como depurativo de la sangre. La infusión de las raíces se toma para tratar afecciones del hígado.

Los frutos verdes sirven para obtener un tinte amarillo y los maduros para un tinte negro (Muñoz, 1994).

En el Perú se toma la infusión de las hojas para curar las diarreas y contra la tos, también se utiliza para lavar heridas y para teñir de negro el cabello. El jugo de los frutos tiernos se mezcla con miel de abejas y se usa como cicatrizante de llagas y heridas. Esta planta se utiliza para la tos, como desinfectante y como colorante. Las hojas se estrujan en leche y sirve para la tos, se toma tres veces al día. El agua del nogal es un buen desinfectante. La corteza y las hojas se utilizan también para teñir (CIED, 2004).

## **2.7 BACTERIOFAGOS**

En 1915 Twort publicó una nota donde describía la destrucción infecciosa de colonias de micrococcos por un agente que parecía ser viral porque atravesaba los filtros que retenían bacterias, era inactivo por calentamiento a 60°C durante una hora y no podría proliferar de forma autónoma. Muy pronto D' Herelle, quien descubrió este fenómeno de manera independiente, demostró la naturaleza particulada de lo que él denominó bacteriófago. El carácter viral del bacteriófago fue confirmado por el trabajo de Burnet y de Schlesinger en la década de 1930 y posteriormente por un gran grupo de investigadores que trabajan en estrecho contacto, entre ellos Delbrück, Luria, Hershey y S.S. Cohen. Estos investigadores más recientes concentraron su atención especialmente en los fagos "de tipo T de número par" de *Escherichia coli* ( T2, T4, T6), que se consideraban los "microorganismos" mas simples posibles. De hecho resultaron ser virus altamente complejos, pero su complejidad fue decisiva para muchos descubrimientos y los resultados pudieron extenderse, con algunas variaciones a otros muchos fagos (Joklik y col., 1994).

Los bacteriófagos son virus bacterianos. Estos elementos genéticos



pueden sobrevivir fuera de la célula del hospedero porque el genoma de ácido nucleico (que puede ser ARN o ADN) está protegido por una capa de proteínas. Los bacteriófagos infectan las células bacterianas y/o se replican hasta un número elevado que ocasiona la lisis de la célula (infección lítica) o, en algunos casos, se integran en el genoma del hospedero sin producir su muerte (el llamado estado lisogénico) (Murray y col., 2002, Prats, 2006).

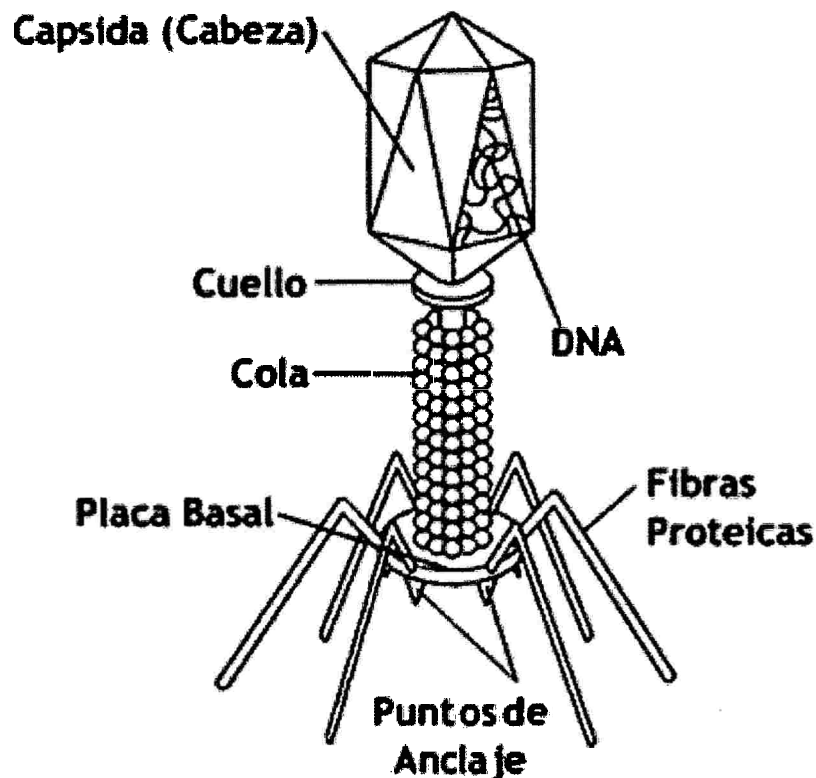
La interacción bacteriófago-bacteria se ha utilizado como sistemas de modelos adecuados para la investigación de la biología molecular y la genética de la replicación vírica. (Gamazo, 2005; Madigan y col., 1999).

Los bacteriófagos son miembros importantes de ecosistemas terrestres y acuáticos. De hecho, podrían ser la forma de vida más abundante del planeta y son agentes importantes en la evolución microbiana. Se estima que cada especie bacteriana es infectada por numerosas especies de bacteriófagos. Los bacteriófagos más estudiados son los de *Escherichia coli*, reciben el nombre de series T (tipo), integrados por siete tipos designados: T1, T2,.... T7. Estos bacteriófagos se encuentran frecuentemente en el tracto intestinal del hombre y de los animales y pueden aislarse de las heces y aguas residuales. *Escherichia coli* esta sometida a la infección por más de 20 especies de fagos (Willey y col., 2009; Aranda, 1998).

## **2.8 ESTRUCTURA DE LOS BACTERIÓFAGOS**

Los fagos de tipo T- par están formados básicamente por una cabeza y una cola. La cabeza contiene el ADN asociado con poliaminas, varias proteínas internas y pequeños péptidos. Tiene la forma de dos mitades de un icosaedro conectadas por un prisma hexagonal corto. En otros fagos, como los fagos P1 y P2 de salmonella y otros colifagos, la cabeza es totalmente isoédrica. Las colas de diferentes fagos varían considerablemente en sus dimensiones y estructura.

La cola del fago T-par se compone de un tubo helicoidal central (a través del cual pasa el ADN vírico durante la infección celular), rodeado de una vaina helicoidal capaz de contracción. La vaina esta conectada con un disco delgado o collar en el extremo de la cabeza y con una placa basal en el extremo de la punta. La placa es hexagonal y de una estructura compleja; tiene una espícula en cada ángulo y esta conectada con seis largas fibras de cola delgadas que son los órganos que le sirven para adherirse a la pared de la célula hospedera. Los colifagos T1 y T5 tienen una cola sin vaina; los fagos T3 y T7, así como el fago P22 de salmonella, poseen una cola corta y rechoncha que termina en una estructura parecida a la placa basal con seis fibras cortas (Joklik y col., 1994).

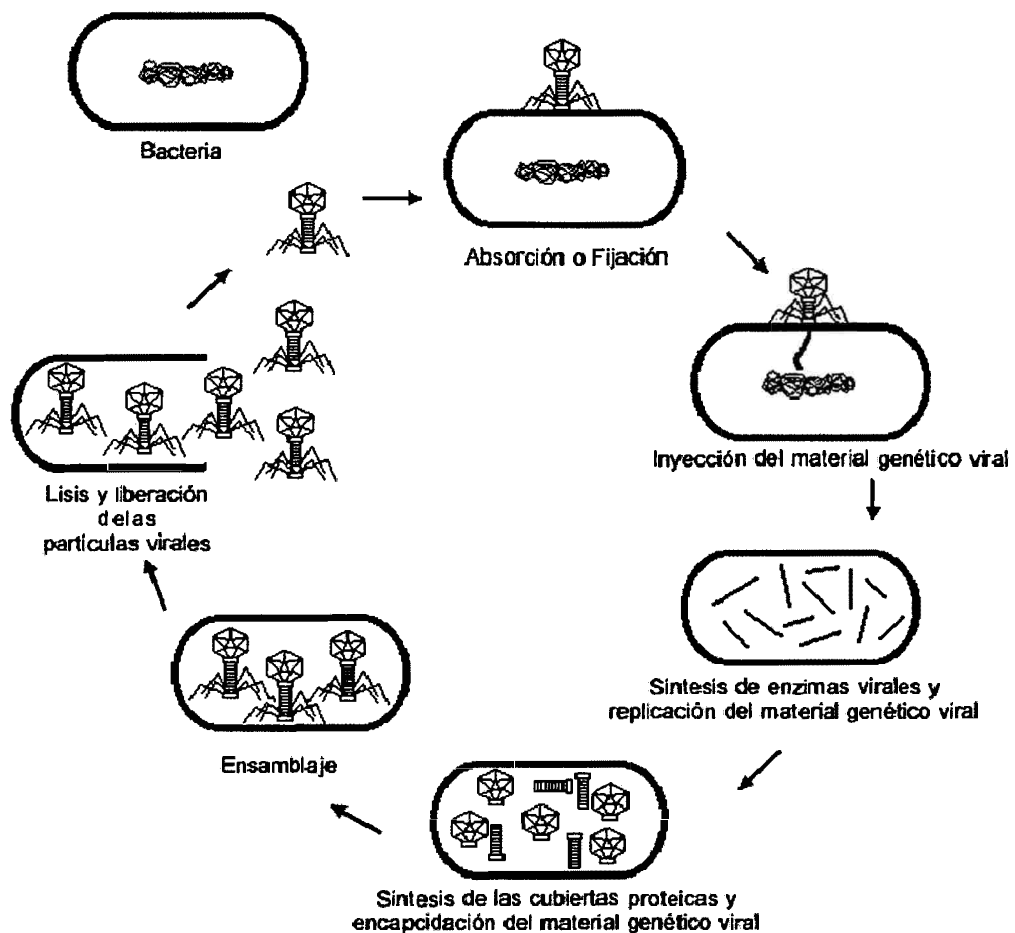


**Figura N° 01:** Estructura de un bacteriófago (URL: [http://3.bp.blogspot.com/\\_SVIEzhR3WNY/S1SUYgqCx9I](http://3.bp.blogspot.com/_SVIEzhR3WNY/S1SUYgqCx9I)).

## 2.9 EL PROCESO DE INFECCIÓN VIRAL

El proceso de infección de un bacteriófago se puede dividir esquemáticamente en distintas etapas, las que son comunes a otros virus bacterianos y eucarióticos.

- a) Adsorción
- b) Inyección del material genético viral
- c) Replicación del material genético viral
- d) Síntesis de las envolturas proteicas
- e) Ensamblaje
- f) Lisis y liberación de las partículas viral



**Figura Nº 02:** Infección Viral (URL: [http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioBacteriofagos\\_archivos/image002.gif](http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioBacteriofagos_archivos/image002.gif)).

## a) ADSORCIÓN

Al igual que los demás virus, los bacteriófagos no se unen al azar a la superficie de las células hospedera; en vez de ello, se fijan a estructuras superficiales específicas denominadas receptores. La naturaleza de estos receptores varía según el fago; lipopolisacáridos y proteínas de la pared celular, ácidos teicoicos, flagelos, y pili pueden servir como receptores. Los fagos T de *E. coli* utilizan lipopolisacáridos o proteínas de la pared celular como receptores. Las variaciones en las propiedades de los receptores son, al menos en parte responsables de las preferencias hospedera de los fagos. (Willey y col., 2009)

En la adsorción de los fagos T-par participan varias estructuras de la cola. La unión del fago empieza cuando una fibra de la cola contacta con el receptor apropiado, a medida que hacen contacto más fibras de la cola, la placa base se acerca a la superficie. La unión probablemente se debe a interacciones electrostáticas y se ve influida por el pH y la presencia de iones como el magnesio ( $Mg^{+2}$ ) y el calcio ( $Ca^{+2}$ ). Después de que la placa base está firmemente asentada sobre la superficie celular, se producen cambios conformacionales en la placa base y en la vaina, reorganizándose esta última de manera que se acorta y pasa a ser un cilindro de 24 anillos a una de 12 anillos. Es decir, la vaina se vuelve más corta y más ancha, empujando el tubo central o core a través de la pared bacteriana. La placa base contiene la proteína gp5, que tiene actividad lisozima. Esto ayuda en la penetración del tubo a través de la capa de peptidoglicano. Finalmente, el DNA lineal es expulsado de la cabeza, a través del tubo de la cola, y al interior de la célula hospedera. El tubo puede interaccionar con la membrana plasmática formando un poro a través del cual pasa el DNA. (Willey y col., 2009).

## **b) PENETRACIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO**

Cuando el fago ha logrado atravesar la envoltura bacteriana el ácido nucleico que se encuentra en la cabeza pasa a través de la cola hueca y penetra la célula bacteriana. Usualmente el único componente del fago que realmente penetra la célula es el ácido nucleico. Los remanentes del fago permanecen en el exterior de la bacteria. Penetra en las células, aparentemente por lugares en los que las membranas externa e interna están en contacto, y permanece asociado con la membrana. El ADN liberado de los viriones está protegido de las nucleasas de membrana por las proteínas asociadas y por las codificaciones del ADN (Joklik y col., 1994).

## **c) REPLICACIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO VIRAL**

El material genético viral que ingresa en una célula contiene bases modificadas que evitan la degradación por nucleasas bacterianas. Esta modificación consiste en la glicosilación y/o metilación de algunas determinadas bases. En el caso del fago T4 se glucosila la base 5'-hidroximetilcitosina. Para lograr una efectiva replicación del genoma viral se deben sintetizar algunas proteínas ni bien el material genético ingresa en la célula. Estas proteínas tempranas reparan el poro de la membrana citoplasmática por donde ingresó el genoma viral, degradan el DNA bacteriano lo que proporciona una fuente de precursores, evita la síntesis de RNA y proteínas bacterianas, y proporciona ribosomas para la síntesis de proteínas del fago. Además algunas de estas proteínas tempranas participan en la síntesis de las bases inusuales. La forma de replicación del genoma viral es dependiente del tipo de material genético (si es RNA o DNA, si es simple o doble cadena). En el caso del fago T4, las moléculas replicadas se aparean en los extremos y formando una molécula de DNA más larga denominada concatámero. Después una enzima corta esta larga

molécula lineal en moléculas más pequeñas de igual longitud. Las moléculas de DNA del T4 se caracterizan por estar permutadas circularmente (el DNA del T4 es lineal) de esta forma todas las moléculas de DNA resultantes contienen genes completos y funcionales. La enzima del T4 que corta al concatámero produce moléculas de DNA de tamaños similares pero no reconoce sitios específicos sobre la molécula, en cambio la enzima del T7 reconoce sitios específicos sobre el DNA (Aranda, 1998).

#### **d) SÍNTESIS DE LAS ENVOLTURAS PROTEICAS**

Las proteínas de la envoltura (cápside, vaina, fibras, etc) son proteínas tardías que se sintetizan después de iniciada la replicación del material genético. La síntesis de cada componente proteico se realiza separadamente. En el caso del fago T4, el material genético es encapsidado antes del ensamble del resto de los componentes (Aranda, 1998).

#### **e) ENSAMBLAJE**

Todas las proteínas de la envoltura se ensamblan para formar una partícula viral madura capaz de infectar a otra célula cuando sea liberada. El ensamblaje de nuevas partículas virales consiste en la asociación del ácido nucleico replicado con capsómeros sintetizados recientemente para formar una nueva nucleocápside. Esto puede tener lugar en el citoplasma o en núcleo de la célula hospedadora. En las células infectadas por virus tanto las proteínas como los ácidos nucleicos virales son sintetizados por separado y posteriormente ensamblados para formar nuevas partículas virales. Los virus pueden autoensamblarse en un proceso similar a la cristalización, ya que las partículas virales, al igual que los cristales, constituyen estructuras que se encuentran en un estado mínimo de energía libre (Aranda, 1998).

## **f) LISIS Y LIBERACIÓN DE LA PARTÍCULA VIRAL**

En esta fase la célula bacteriana se lisa de forma abrupta, razón por la cual libera la totalidad de la progenie. La lisis de *Escherichia coli* por el fago T4 tiene lugar después de que se hayan acumulado en la célula hospedadora unas 150 partículas fágicas. En el caso de este fago la lisis de la célula es consecuencia de la función de por lo menos de dos enzimas codificadas por el fago, una es la bien caracterizada lisozima que hidroliza la pared celular y la otra es una lipasa que ataca la membrana de la célula (Joklik y col., 1994; Willey y col., 2009).

### **2.10 BACTERIÓFAGO LISOGÉNICO**

No todas las infecciones por fagos conducen a la producción de progenie y a la lisis de la célula hospedera de forma inmediata. Existen muchos fagos que una vez que ingresan en una célula sensible experimentan un ciclo lítico como el que se ha descrito o, de manera alternativa, entran en una relación benigna con sus hospederos. Mientras dura este estado benigno solo uno o unos pocos genes virales se expresan y el genoma del virus existe insertado en el cromosoma del hospedero o bien en la forma de un plásmido libre en la célula bacteriana. En este estado el genoma del fago, llamado profago, se replica junto con el cromosoma de la bacteria ya sea que el ADN viral esté integrado o en forma de plásmido. Es importante comprender que éste es un medio legítimo de reproducción para un bacteriófago; el profago se está multiplicando a la misma velocidad que la célula en la que reside. La célula bacteriana con un profago resistente parece perfectamente normal, con sólo una o muy pocas propiedades alteradas. En ocasiones, sin embargo, el profago integrado es escindido del DNA de la bacteria, lo que conduce a la multiplicación del fago y a la consiguiente lisis

de la célula. Es por eso que este fenómeno fue denominado lisogenia; las bacterias que alberga el profago reciben el nombre de *lisógenas* y el fago capaz de inducir esta respuesta se conoce como bacteriófago lisogénico o temperado.

Cuando se descubrió que ciertos virus animales podían entrar en una relación con sus hospederos, la analogía entre ellos y los fagos lisogénicos se reconoció con rapidez. Si bien es cierto que existen diferencias en la forma en que interactúan los virus tumorales y los fagos lisogénicos con sus respectivos hospederos, los conceptos surgidos de los estudios de los fagos lisogénicos han ejercido una influencia profunda sobre nuestros enfoques de los virus tumorales (Joklik y col., 1994).

## **2.11 CUANTIFICACIÓN DE BACTERIÓFAGOS**

Hace más de 50 años se desarrolló un método rápido y confiable para la cuantificación de virus de bacterias, lo que dio lugar al comienzo de un enfoque cuantitativo dirigido a la comprensión del ciclo vital de los virus. En este ensayo en placa un número moderado de partículas de bacteriófagos se mezcla con una suspensión de células bacterianas y una pequeña cantidad de agar fundido, luego la mezcla se extiende sobre una placa de Petri con agar nutritivo. El agar fundido se solidifica con rapidez y, durante la incubación que dura toda la noche, las bacterias hospedadoras proliferan hasta formar una capa concluyente. Sin embargo, la continuidad de la capa se ve interrumpida por cierto número de agujeros llamados placas o calvas de lisis, cada una de las cuales se origina a partir de una única partícula viral presente en la mezcla inicial. Cada partícula de fago única infecta una bacteria y desarrolla un ciclo de infección que después de un período corto mata a la célula hospedadora y libera muchos fagos hijos. Entonces las partículas de fago hijas se difunden hasta encontrar nuevos hospederos y el proceso se repite. Por lo tanto, varios ciclos de infección por



fagos conducen a la formación de una placa que contiene numerosos fagos, todos ellos descendientes directos de la misma y única partícula de fago de la mezcla inicial. La placa se visualiza como un agujero traslúcido en la capa bacteriana continúa porque la propagación del fago ha destruido la mayor parte de las células bacterianas dentro de esa área (Joklik y col., 1994).

En el ensayo en placa habitualmente se realiza efectuando diluciones seriadas de stock de fagos y evaluando las muestras diluidas para determinar el número de unidades formadoras de placas (UFP). De esta manera se establece el título de UFP/mL en el stock original de fago. Es importante destacar que el caso de muchos bacteriófagos el título de UFP/mL es igual al título de partículas virales visibles con el microscopio electrónico (Joklik y col., 1994).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. UBICACIÓN**

El presente trabajo se realizó en las instalaciones de los laboratorios del Area Académica de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, entre julio de 2010 a febrero de 2011.

#### **3.2. MATERIALES**

##### **3.2.1. Muestra biológica:**

Se tomó 10 kilos de hojas frescas de *Juglans neotropica* Diels "nogal" procedentes del distrito de Cangallo, provincia de Cangallo, departamento de Ayacucho, que se encuentra a una altitud promedio de 2556 m.s.n.m.

#### **3.3. DISEÑO METODOLÓGICO**

##### **3.3.1. Recolección de la muestra**

Las hojas frescas de *Juglans neotropica* Diels "nogal", se recolectaron durante los meses de agosto y setiembre de 2010 del lugar mencionado. Las muestras fueron recolectadas a tempranas horas de la mañana antes de que los rayos solares iluminen la planta, se recolectaron hojas en buen estado de

conservación, para luego ser llevadas al Herbarium Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para su respectiva identificación (Anexo N° 08) y procesamiento en el laboratorio.

### **3.3.2 Preparación de la muestra**

Las hojas fueron sometidas a limpieza y luego desecadas a la sombra por dos semanas para después ser llevadas a una estufa a 37 °C. Con ayuda de un mortero y pilón se procedió a pulverizar la muestra que fueron guardadas en frascos de boca ancha.

### **3.3.3 Obtención del extracto acuoso: por infusión**

En 250 mL de agua hirviendo se agregó 10 gramos de muestra seca pulverizada dejándola por 10 minutos, con agitación constante con una bagueta, luego se filtró con un embudo y papel filtro hasta obtener una cantidad de 100 mL del extracto, posteriormente se midió en un refractómetro los sólidos solubles en un porcentaje de 2% y una concentración de 20 mg/mL.

### **3.3.4 Obtención del extracto etanólico: por maceración**

Se pesó una cantidad de 500 g. del pulverizado y se depositó en un frasco con tapa rosca para luego agregarle etanol absoluto en una cantidad de 1 litro, se tapó el frasco y luego se dejó macerar por 5 días, después de este tiempo se filtró y se concentró utilizando un baño maría y estufa para su secado.

### **3.3.5. Aislamiento de virus (bacteriófagos)**

- Para el aislamiento de virus (bacteriófagos) se utilizó agua residual procedente de la zona de Perico Huaycco, los cuales se filtraron utilizando

filtros de membrana y una bomba de vacío, este filtrado se distribuyó en viales estériles en una cantidad de 1mL por vial. Estos viales se guardaron en refrigeración.

- Se sembró la cepa receptora de *Escherichia coli* ATCC 13706, en caldo nutritivo y se incubó a 35°C/18-24h hasta obtener una concentración de 10<sup>8</sup> Bac/mL. equivalente al estándar 0.5 de Mc. Farland.
- Se mantuvo el agar nutritivo licuado a 45°C en baño maria.
- En un matraz estéril de 50 mL se añadió 1.0 ml de la cepa de *E. coli* ATCC 13706, y 0.1 mL de agua residual, se agitó haciendo movimientos ondulatorios y se agregó agar nutritivo a una temperatura de 45°C para luego verter en placas de Petri de 15x100 mm.
- Se dejó enfriar hasta que solidifique e incubó a 37°C/ 18 a 24 horas.
- Se contó las placas de lisis formadas y se reportó como UFP/mL (Unidades formadoras de placa de lisis por mL). (Gamazo, 2005; Alarcón, 2006).

### 3.3.6. Determinación de la actividad antiviral

Se realizó el siguiente procedimiento para tiempos de 10, 20, 40 y 80 minutos (Anexo N° 07):

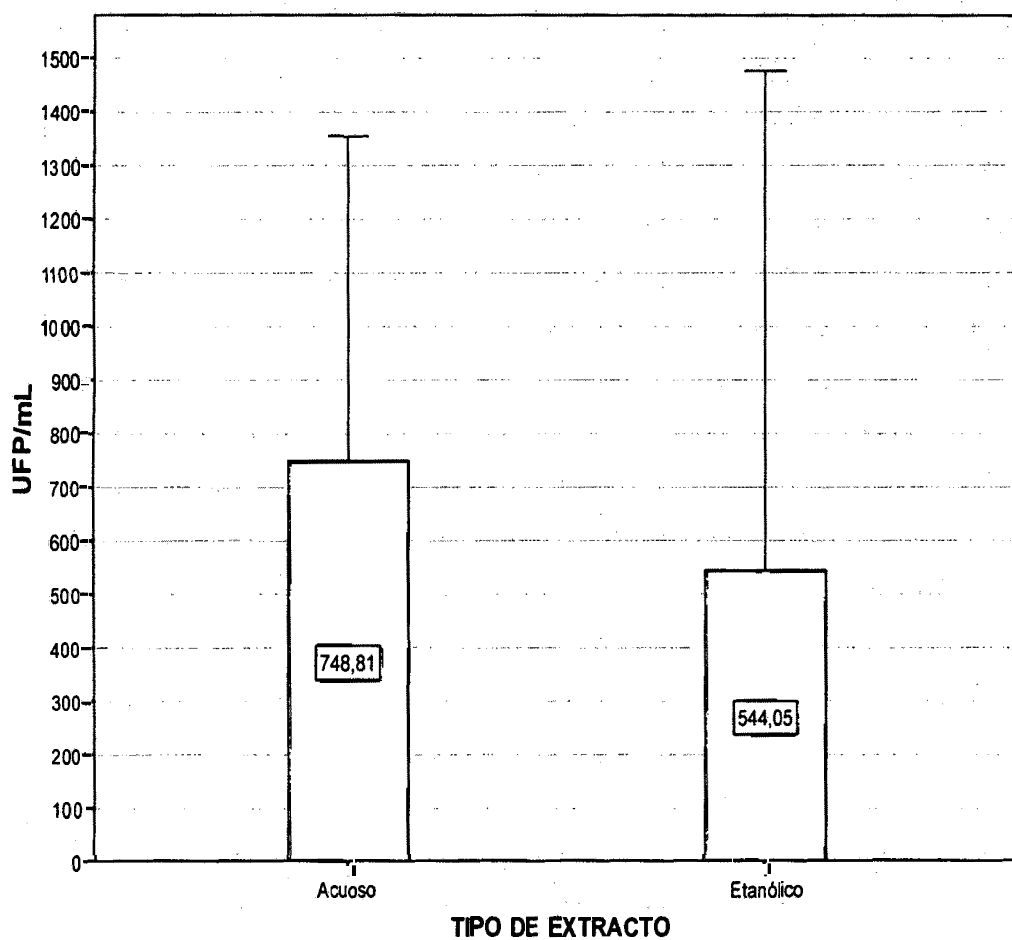
- Se realizaron diluciones sucesivas del extracto acuoso y etanólico en concentraciones de 100% (20 mg/mL), 50% (10 mg/mL), 25% (5 mg/mL), 12.5% (2.5 mg/mL) y 6.25% (1.25 mg/mL), en diferentes tubos en una cantidad de 0.8 mL por cada tubo, a cada uno se adicionó 0.2 ml. del filtrado del virus.
- Se realizó el mismo procedimiento, en otros dos tubos, pero esta vez no se utilizó el extracto, sino agua destilada que sirvió como control.

- Se controló el tiempo de reacción en todos estos tubos (por 10, 20, 40 y 80 minutos) a temperatura ambiental. Transcurrido los tiempos se hizo una dilución de 1 en 1 (para esto se tomó el mililitro de la mezcla extracto-virus en 1 ml de agua destilada) para luego inocular 0.2 ml de cada tubo en matraces de 50 mL que contenían 1.0 ml de cultivo joven de *E. coli* ATCC 13706, se agitó haciendo movimientos ondulatorios y se agregó agar nutritivo a una temperatura de 45 °C para luego verter en placas de Petri de 15x100 mm..
- Se incubó a 37 °C por 24 horas y se observó la formación de Unidades Formadoras de Placa de lisis por mL (UFP/mL). El recuento de calvas se llevó a cabo en placas expuestas con ayuda del cuenta colonias. A continuación se determinó la concentración media inhibitoria (CMI<sub>50</sub>) (Gamazo, 2005; Alarcón, 2006).

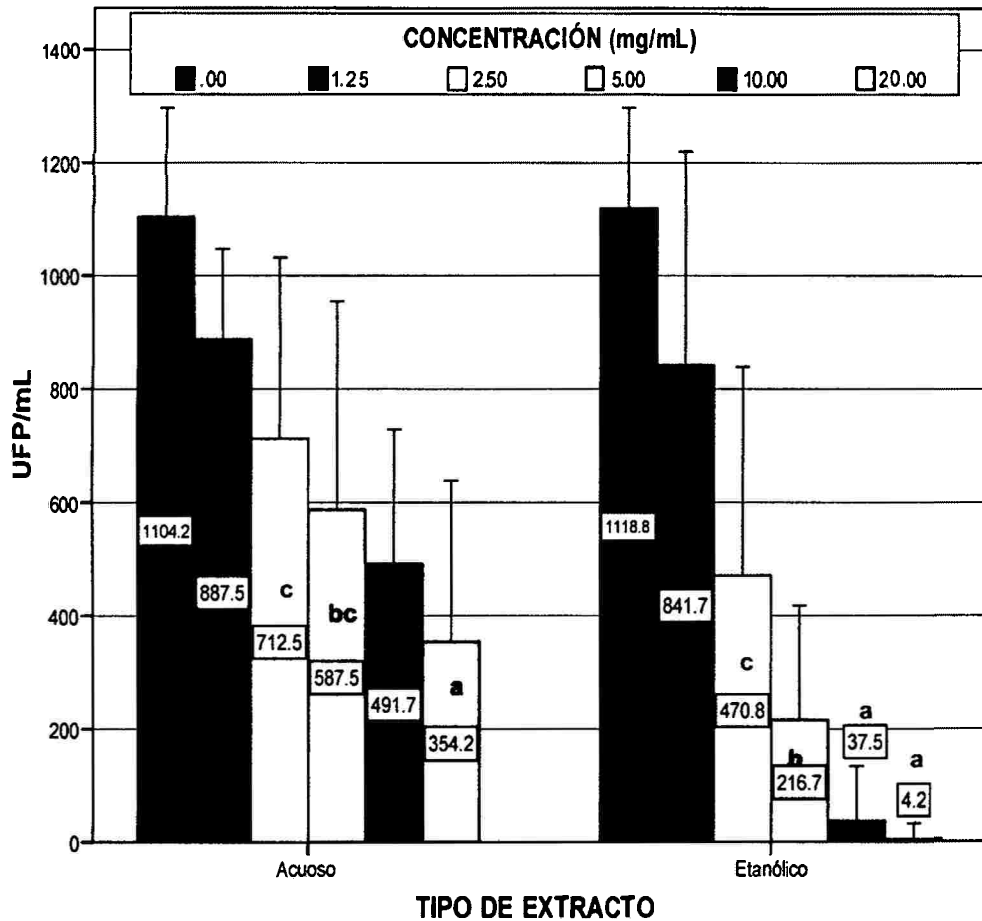
#### **3.4. Análisis Estadístico.**

Los resultados se presentaron en gráficos. El análisis estadístico se realizó a través del análisis de varianza a un nivel de confianza del 95% y la Prueba de Tukey. Además se realizó el análisis de regresión lineal.

## **IV RESULTADOS**

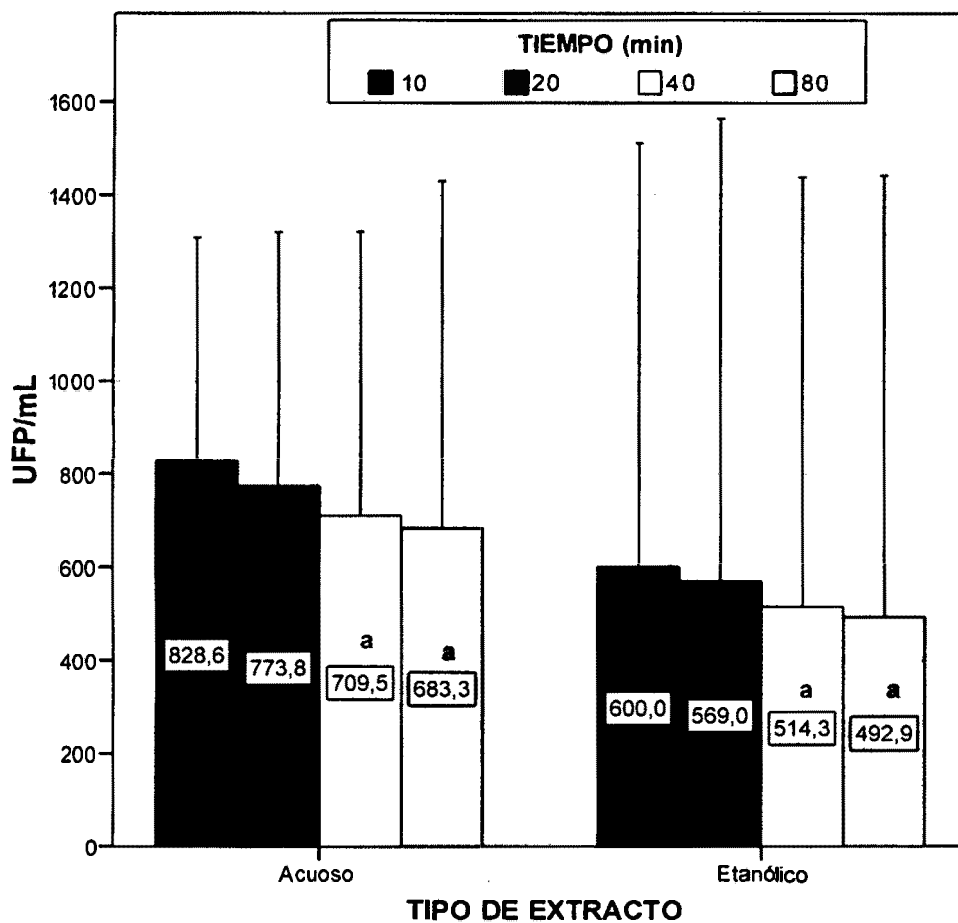


**Gráfico N° 01.-** Promedio de unidades formadoras de placas de lisis (UFP/mL) por efecto del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal". Ayacucho, 2010.



**Gráfico N° 02.-** Promedio de unidades formadoras de placas de lisis (UFP/mL) según la concentración del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal". Ayacucho, 2010.





**Gráfico 03.-** Promedio de unidades formadoras de placas de lisis (UFP/mL) según el tiempo de reacción en extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal". Ayacucho, 2010.

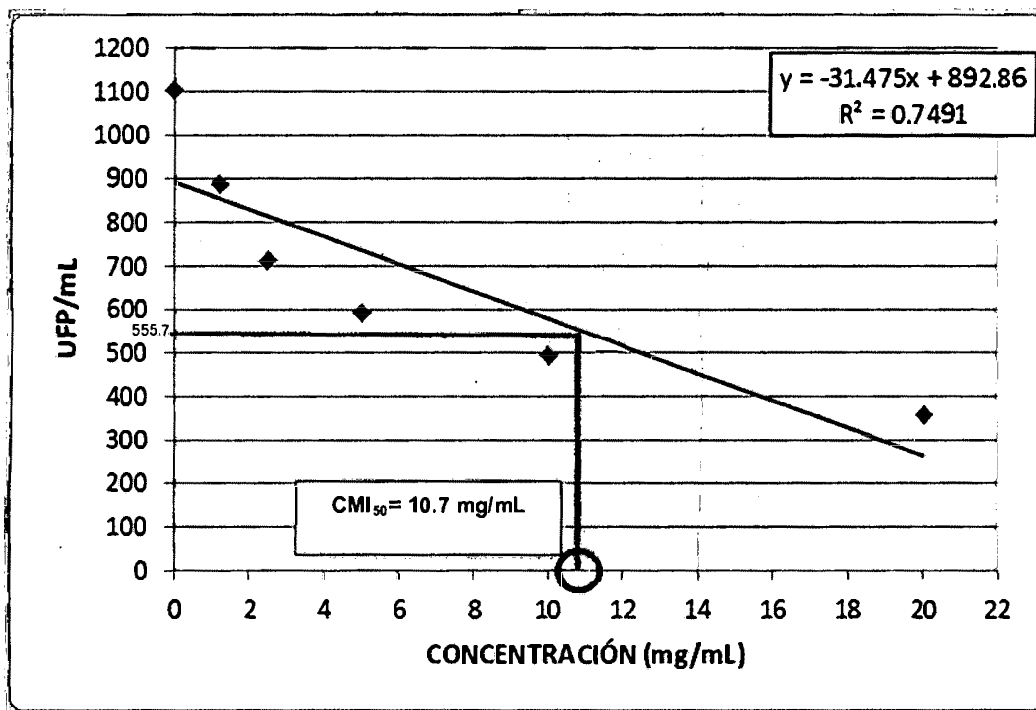
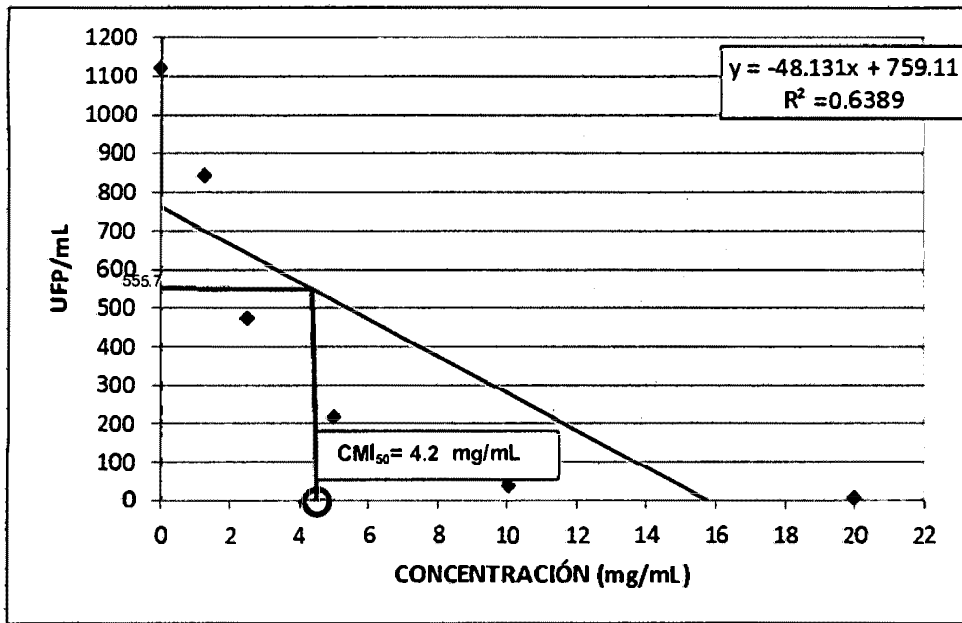
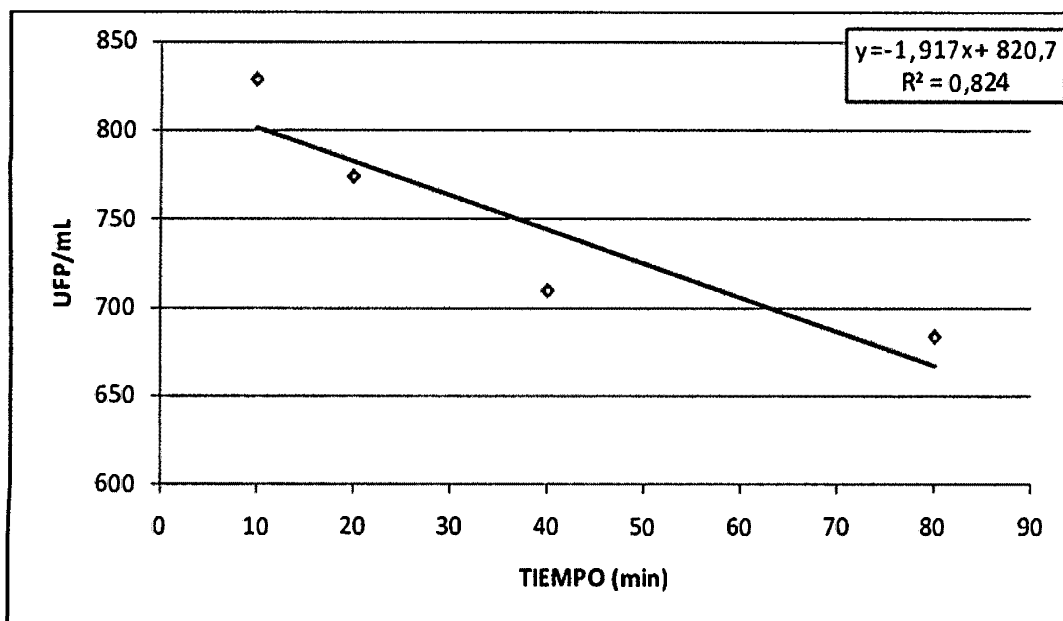


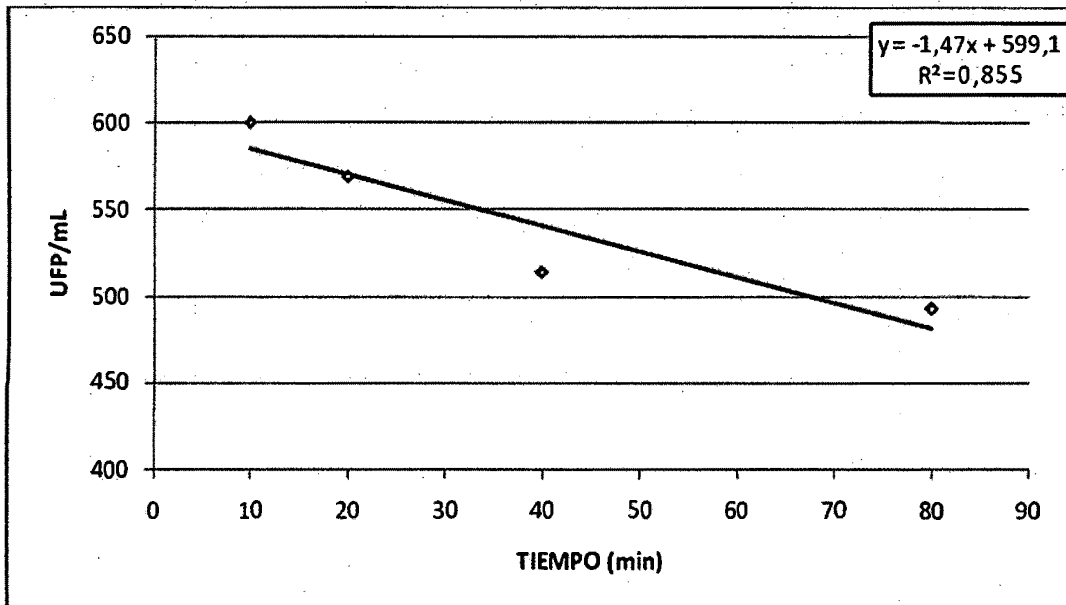
Gráfico 04.- Regresión lineal del número de unidades formadoras de placas de lisis (UFP/mL) y determinación de la CMI<sub>50</sub> según la concentración del extracto acuoso de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal". Ayacucho, 2010.



**Gráfico N° 05.-** Regresión lineal del número de unidades formadoras de placas de lisis (UFP/mL) según la concentración del extracto etanólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal". Ayacucho, 2010.



**Gráfico N° 06.-** Regresión lineal del número de unidades formadoras de placas de lisis (UFP/mL) según el tiempo transcurrido del extracto acuoso de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal". Ayacucho, 2010.



**Gráfico 07.-** Regresión lineal del número de unidades formadoras de placas de lisis (UFP/mL) según el tiempo transcurrido del extracto etanólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal". Ayacucho, 2010.

## V DISCUSIÓN

En el Anexo N° 09 (Fotografía N° 01 y 02), tenemos las características de *Juglans neotropica* Diels "nogal" para la identificación taxonómica, la que fue identificada y certificada (Anexo N° 08) en el Herbarium Huamangensis de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga según la clasificación de Engler y Prantl realizada por la Biga Laura Aucasime Medina. Esta planta normalmente alcanza unos 20 metros de altura. De porte recto, su copa es irregular y de ramas gruesas. Las hojas son compuestas, alternas pinnadas. Las flores son numerosas y dispuestas en espiga, los frutos de drupa redonda, de color pardo a negro, con pedúnculo corto (Font Quer, 1981; Rojas 2008).

En el Gráfico N° 01, se observa el promedio de Unidades Formadoras de Placa (UFP/mL) en los tipos de extractos de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal", observándose un promedio de 748.81 y 544.05 UFP/mL para los extractos acuoso y etanólico respectivamente. Al realizar el análisis de varianza respectivo (Anexo N° 01) se halló que existe diferencia significativa para el tipo de extracto, en donde se puede observar que el extracto etanólico presentó mayor actividad antiviral debido a la menor formación de UFP lo que puede deberse a la presencia de metabolitos secundarios presentes en la planta, que

según los trabajos realizados por Carhuallanqui (2003), y Chanhualla (2005) encontraron que *Juglans neotropica* Diels presenta como metabolitos secundarios en extracto acuoso y etanólico la presencia de aceites, alcaloides, aminoácidos, azúcares reductores, flavonoides, lactosas y cumarinas, saponinas, taninos y fenoles, triptenos y esteroides. Destacándose de estos trabajos la presencia de taninos y flavonoides en mayor cantidad en los extractos etanólicos de las hojas de la planta en estudio lo que estaría explicando la diferencia del efecto antiviral entre los dos tipos de extractos.

Harrison, (1991), menciona que los taninos tienen la capacidad de precipitar las proteínas formando tanatos de proteínas insolubles, originando un efecto antibacteriano, antifúngico y antiséptico. Kuklinski (2000), hace referencia sobre el poder antimicrobiano de los taninos así mismo refiere las propiedades antivírica y antifúngicas de este principio activo. Asimismo, Lock de Ugaz, (1994), menciona que los flavonoides poseen mayor actividad antimicrobiana incluida la viral. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Martínez, 2002).

En la adsorción de los fagos T-par participan varias estructuras de la cola. La unión del fago empieza cuando una fibra de la cola contacta con el receptor apropiado, a medida que hacen contacto más fibras de la cola, la placa base se acerca a la superficie celular. Después de que la placa base está firmemente asentada sobre la superficie celular, se producen cambios conformacionales en la placa base y en la vaina, reorganizándose esta última de manera que se acorta y pasa a ser un cilindro de 24 anillos a una de 12 anillos. Es decir, la vaina se vuelve más corta y más ancha, empujando el tubo central o core a través de la pared bacteriana. La placa base contiene la proteína gp5, que tiene actividad

lisozima. (Willey y col., 2009). La propiedad antiviral, en nuestro caso, sobre los bacteriófagos se puede explicar debido a que estos agentes víricos están constituidos básicamente de proteínas de manera que estos metabolitos secundarios estarían interfiriendo a nivel de éstas de manera que se impide el proceso de adsorción.

Los taninos de *Juglans neotropica* Diels "nogal", le confieren propiedades astringentes (antidiarreico, hemostático local, cicatrizante, antisudoral) y antisépticas, efecto reforzado por la acción de la juglona, que además es aperitivo, eupéptico, colagogo ligeramente hipoglucemiante, antihelmíntico y queratolítico. Los flavonoides producen un efecto protector capilar y diurético (Chanhualla, 2005).

En el Gráfico Nº 02 se presenta el promedio de UFP/mL según la concentración del extracto acuoso y etanólico de la planta en estudio, observándose, existiendo de acuerdo al análisis de varianza (Anexo Nº 02, tabla Nº 02) diferencia significativa para las concentraciones en ambos tipos de extracto ( $p < 0.05$ ). Con la prueba de Tukey (Anexo Nº 03, Tabla Nº 03 y Anexo Nº 04, Tabla Nº 04) se observa que a medida que aumenta la concentración del extracto sea acuoso o etanólico disminuye el número de placas de lisis o calvas llegando en el extracto acuoso hasta 354.2 UFP/mL y en el etanólico hasta 4.2 UFP/mL a una concentración de 20 mg/mL con respecto al control que sobrepasó las 1,000 UFP/mL, esto se explica que a medida que aumenta la concentración del extracto los metabolitos secundarios mencionados anteriormente (taninos y flavonoides) aumentan su efecto antiviral lo que se nota por la formación de menor número de UFP o partículas virales.

En lo referente al tiempo de reacción de los extractos y bacteriófagos, en el Gráfico Nº 03 se observa el promedio de UFP/mL en tiempos de 10, 20, 40 y 80 minutos, notándose que cuanto mayor es el tiempo de reacción el número de



transcurrido del extracto etanólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal". Se observa que la relación entre el tiempo y UFP/mL es negativa, es decir que a medida que va transcurriendo el tiempo el número de UFP/mL va disminuyendo presentando un índice de determinación de 0.855, lo que quiere decir que la variación de UFP/mL está explicado en un 85.5% por la variación del tiempo.

En trabajo similares Castellanos (2002), al realizar su trabajo del efecto antiviral de tinturas de *Hypericum spp* cultivadas en Cuba utilizando concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 30 mg/mL y enfrentarlo a un estándar de antígeno de hepatitis B en tiempos de 24, 48 y 72 horas reveladas por un ensayo inmunoenzimático, demostró que a mayor tiempo de reacción de las concentraciones de estas tinturas disminuía la antigenicidad del antígeno de superficie de la hepatitis B. Lo mismo encontró De la Cruz (2009) ya mencionado anteriormente.

Este trabajo nos permite afirmar el por qué *Juglans neotropica* Diels "nogal" es utilizada en la medicina tradicional y en otros campos del que hacer humano. Se ha demostrado, con las falencias del caso que el extracto acuoso y etanólico de *Juglans neotropica* Diels "nogal" posee actividad antiviral la cual va depender de la concentración y el tiempo de reacción.

## VI CONCLUSIONES

1. Las plantas de nogal que crecen en el distrito de Cangallo pertenecen taxonómicamente a la especie *Juglans neotropica* Diels "nogal", las que fueron identificadas en el Herbarium Huamangensis de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga según el Sistema de Clasificación de Engler y Prantl modificado por Melchior.
2. El extracto acuoso de *Juglans neotropica* Diels "nogal" tiene efecto antiviral a una Concentración Media Inhibitoria (CMI<sub>50</sub>) de 10.7 mg/mL notándose que a mayor concentración y mayor tiempo de reacción del extracto mayor es el efecto antiviral.
3. El extracto etanólico de *Juglans neotropica* Diels "nogal" tiene efecto antiviral a una Concentración Media Inhibitoria (CMI<sub>50</sub>) de 4.2 mg/mL y que también, como en el caso anterior, está en función a la concentración y tiempo de reacción del extracto.
4. El extracto etanólico de *Juglans neotropica* Diels "nogal" posee mayor actividad antiviral demostrado porque existe una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) en comparación con el extracto acuoso que presentó una menor actividad.

## VII RECOMENDACIONES

1. Se recomienda aislar y cuantificar el principio activo de *Juglans neotropica* Diels "nogal" responsable de la actividad antiviral y su mecanismo de acción y evaluar la toxicidad de esta planta.
2. Trabajar en forma conjunta y coordinada para la elaboración de productos en base a formulaciones de *Juglans neotropica* Diels "nogal" de manera que se emplee científicamente esta planta y de este modo la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga contribuya al desarrollo de la Región.

## VIII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Aranda, A.** 1998. En la frontera de la vida: los virus. Edit. La ciencia. México D.F. México.
2. **Alarcón, J; Huamán, R.** 2006. Guía de Prácticas de Virología. Ayacucho-2006. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho. Perú.
3. **Beneficios del Nogal.** URL: <http://www.plantasparacurar.com/> propiedades del nogal.
4. **Bacteriófago.** URL: [http://3.bp.blogspot.com/\\_SVIEzhR3WNY/S1SUYgqCx9I](http://3.bp.blogspot.com/_SVIEzhR3WNY/S1SUYgqCx9I)). Bacteriófago.
5. **Bacteriófagos.** URL: <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioBacteriofagosarchivos/image002.gif>. Bacteriófagos.
6. **Bhargava, U. y Westfall, B.** 1968. Antitumor activity of *Juglans nigra* (black walnut) extractives. University of Montreal. Canada.
7. **Carhuallanqui, R.** 2003. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y acuoso de *Juglans neotropica* Diels "nogal" sobre cepas de *salmonella spp.* Ayacucho – 2003. Tesis UNSCH. Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho. Perú.
8. **Chanhualla, W.** 2005. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal" en bacterias Gram positivas causantes de infecciones respiratorias agudas. Tesis UNSCH. Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho. Perú.
9. **Castellanos, E. et all.** 2002. Efecto antiviral de tinturas de *Hypericum spp.* Cultivadas en Cuba, Rev Cubana Plant Med.; 7(3):1144-145.
10. **Centro de Investigación, Educación y Desarrollo (CIED).** 2004. Nogal. URL: <http://www.ciedPerú.org/productos/nogal.htm>.

11. **De la Cruz, E.** 2009. Efecto antiviral del extracto alcohólico y acuoso de *Piper elongatum* L "matico". Ayacucho, 2009. Tesis UNSCH. Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho. Perú.
12. **Font Quer.** 1981. Plantas Medicinales Séptima edición, Editorial Labor. Barcelona. España.
13. **Gamazo, C.** 2005. Manual Practico de Microbiología Edit. Elsevier. España.
14. **Harrison's, J.** 1991. Principios de la Medicina Interna. Editorial Nueva Interamericana S.A. México.
15. **Huamaní, M.** 2005. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 Departamentos del Perú. Tesis Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima. Perú.
16. **Joklik, W; Willett, H; Amos, D; Wilfert, C.** 1994. Microbiología de Zinsser. 20 ava edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina.
17. **Kuklinski C.** 2000. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. Editorial Ediciones Omega S.A. Barcelona España.
18. **Lock de Ugaz, O.** 1994. Investigación Fitoquímica. Segunda Edición, Editorial Fondo UPCP. Perú.
19. **Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J.** 1999. Brock, Biología de los Microorganismos. 8 ava edición. Editorial Prentice Hall Iberia. Madrid. España.
20. **Martinez, S.** 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Rev. Nutrición Hospitalaria. XVII (06) 271-278.
21. **Mins, C. et al.** 1995. Microbiología Médica. Edit. Doyma Libros. Barcelona – España.
22. **Muñoz, A.** 1994. Plantas Medicinales. Edit. Tercer Mundo. S.A. Colombia.

23. **Murray, P; Rosenthal, K; Kobayashi, G; Pfaller, M.** 2002. Microbiología Médica. 4 ta edición editorial Elsevier Science. Madrid. España.
24. **Rojas, F.** 2008. Arboles del Valle Central de Costa Rica. ReV. Forestal. 5(13)  
URL: [http:// www.tec.cr/sitios/ Docencia/forestal/ Revista\\_Kuru/ antiores/antior13/ pdf/solucion%204.pdf](http://www.tec.cr/sitios/Docencia/forestal/Revista_Kuru/antiores/antior13/pdf/solucion%204.pdf).
25. **Prats, G.** 2006. Microbiología Clínica. Edit. Médica Panamericana. Argentina.
26. **Wiley, J.; Sherwood, L., Woolverton, Ch.** 2009. Microbiología de Prescott, Harley y Klein. Edit. Mac Graw Hill Interamericana. 7 ma Edic. Madrid. España.

## **ANEXOS**

## ANEXO N° 01

**Tabla N° 01.-** Análisis de varianza para las unidades formadoras de placas de lisis (UFP/mL) en los dos tipos de extractos, seis concentraciones de extracto de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal", registrados en cuatro tiempos.

### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: UFP/mL

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	23940126,488(a)	9	2660014,054	123,877	,000
Intersección	50846254,735	1	50846254,735	2367,918	,000
EXTRACTO	1760952,381	1	1760952,381	82,008	,000
TIEMPOmin	412619,048	3	137539,683	6,405	,000
CONCENTRACIÓN	21766555,060	5	4353311,012	202,734	,000
Error	3392730,655	158	21472,979		
Total	97535000,000	168			
Total corregida	27332857,143	167			

a R cuadrado = ,876 (R cuadrado corregida = ,869)



## ANEXO Nº 02

**Tabla Nº 02.-** Análisis de varianza para las unidades formadoras de placas de lisis (UFP/mL) según el extracto acuoso y etanólico, en cinco concentraciones de extracto de las hojas de *Juglans neotropica* Diels “nogal” registrados en cuatro tiempos.

### Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: UFP/mL

TIPO DE EXTRACTO	Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Acuoso	Modelo corregido	6521130,952(a)	8	815141,369	58,573	,000
	Intersección	37350340,909	1	37350340,909	2683,857	,000
	TIEMPOmin	269166,667	3	89722,222	6,447	,001
	CONCENTRACIÓN	6251964,286	5	1250392,857	89,849	,000
	Error	1043750,000	75	13916,667		
	Total	54665000,000	84			
	Total corregida	7564880,952	83			
Etanólico	Modelo corregido	17069419,643(b)	8	2133677,455	170,675	,000
	Intersección	15782964,015	1	15782964,015	1262,497	,000
	TIEMPOmin	152500,000	3	50833,333	4,066	,010
	CONCENTRACIÓN	16916919,643	5	3383383,929	270,641	,000
	Error	937604,167	75	12501,389		
	Total	42870000,000	84			
	Total corregida	18007023,810	83			

a R cuadrado= ,862 (R cuadrado corregida= ,847)

b R cuadrado= ,948 (R cuadrado corregida= ,942)

**ANEXO Nº 03**

**Tabla Nº 03.-** Prueba de Tukey para las unidades formadoras de placas de lisis (UFP/mL) según cinco concentraciones del extracto acuoso de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal".

**TIPO DE EXTRACTO=Acuoso**

DHSde Tukey

CONCENTRACIÓN (mg/mL)	N	Subconjunto				
	1	2	3	4	5	1
20	12	354,17				
10	12		491,67			
5	12		587,50	587,50		
2.5	12			712,50		
1.25	12				887,50	
0	24					1104,17
Significación		1,000	,310	,085	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error)= 13916,667.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 13,091

b Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c Alfa= ,05.

## ANEXO N°04

**Tabla N° 04.-** Prueba de Tukey para las unidades formadoras de placas de lisis (UFP/mL) según cinco concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal".

**TIPO DE EXTRACTO=Etanólico**

DHS de Tukey

CONCENTRACIÓN (mg/mL)	N	Subconjunto				
	1	2	3	4	5	1
20	12	4,17				
10	12	37,50				
5	12		216,67			
2..5	12			470,83		
1.25	12				841,67	
0	24					1118,75
Significación		,973	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 12501,389.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica= 13,091

b Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c Alfa= ,05.

## ANEXO N° 05

**Tabla N° 05.-** Prueba de Tukey para las unidades formadoras de placas de lisis (UFP/mL) registradas en cuatro tiempos para el extracto acuoso de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal".

### TIPO DE EXTRACTO=Acuoso

DHS de Tukey

TIEMPO (min)	N 1	Subconjunto	
		2	1
80	21	683,33	
40	21	709,52	
20	21	773,81	773,81
10	21		828,57
Significación		,070	,440

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error)= 13916,667.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 21,000

b Alfa= ,05.

## ANEXO N°06

**Tabla N° 06.-** Prueba de Tukey para las unidades formadoras de placas de lisis (UFP/mL) registradas en cuatro tiempos para el extracto etanólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal".

### TIPO DE EXTRACTO=Etanólico

DHS de Tukey

TIEMPO (min)	N	Subconjunto	
		2	1
80	21	492,86	
40	21	514,29	514,29
20	21	569,05	569,05
10	21		600,00
Significación		,130	,071

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

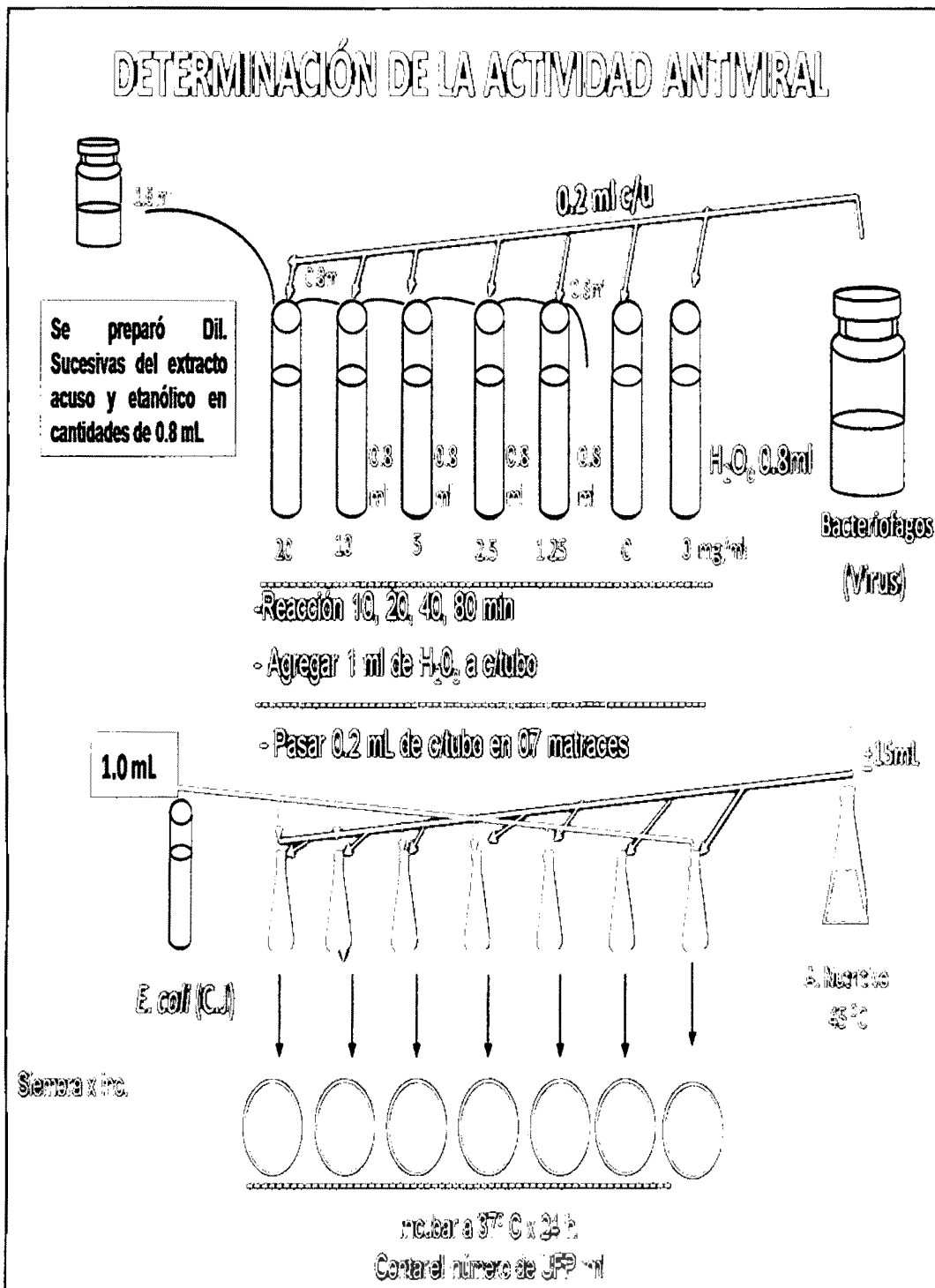
El término error es la Media cuadrática (Error) = 12501,389.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica= 21,000

b Alfa= ,05.

ANEXO N°07

# DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL



## ANEXO N° 08



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

### CERTIFICA

Que la Señorita Bach. Nori Mirtha HINOSTROZA HUAMANI, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido determinada según el Sistema de Clasificación de Engler y Prantl, modificado por Melchior, y es como sigue:

DIVISIÓN	:	ANTOPIIYA (ANGIOSPERMAE)
CLASE	:	DICOTILEDONEAE
SUBCLASE	:	ARCHYCLAMIDEAS
ORDEN	:	JUGLANDALES
FAMILIA	:	JUGLANDACEAE
GÉNERO	:	Juglans
Nombre científico	:	<i>Juglans neotropica</i> Diels
Nombre común	:	"nogal".

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 09 de agosto del 2010.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
*[Firma]*  
Bach. Laura Villalobos Medina  
JEFE

ANEXO Nº 09



Fotografía Nº 01.- Hojas y fruto de *Juglans neotropica* Diels "nogal".



Fotografía Nº 02.- Frutos de *Juglans neotropica* Diels "nogal".



ANEXO N° 10



Fotografía N° 03.- Recolección de muestras de *Juglans neotropica* Diels "nogal".



Fotografía N° 04.- Hojas pulverizadas de *Juglans neotropica* Diels "nogal".

## ANEXO Nº 11



Fotografía Nº 05.- Obtención del extracto acuoso de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal"

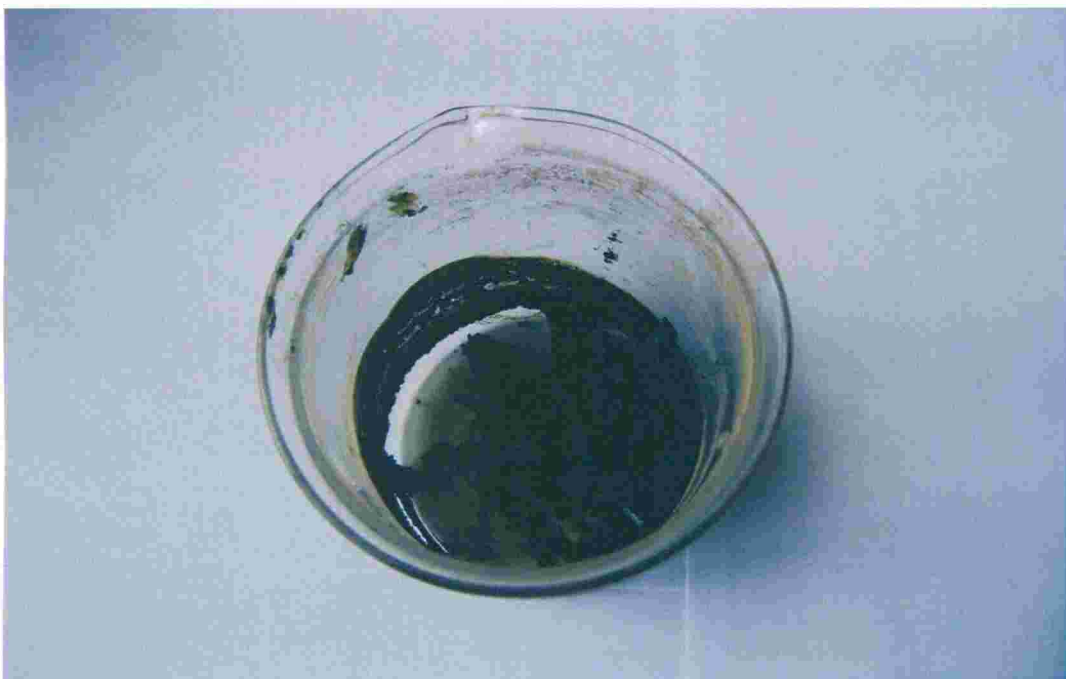


Fotografía Nº 06.- Extracto acuoso de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal".

ANEXO Nº 12



Fotografía Nº 07.- Filtrado del extracto etanólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal".



Fotografía Nº 08.- Extracto etanólico de las hojas de *Juglans neotropica* Diels "nogal".

## ANEXO Nº 13



Fotografía Nº 09.-Toma de muestra de aguas residuales para la obtención de bacteriófagos de *Escherichia coli*.



Fotografía Nº 10.- Obtención de bacteriófagos de *Escherichia coli* mediante el uso de filtros bacteriológicos.



## ANEXO Nº 14

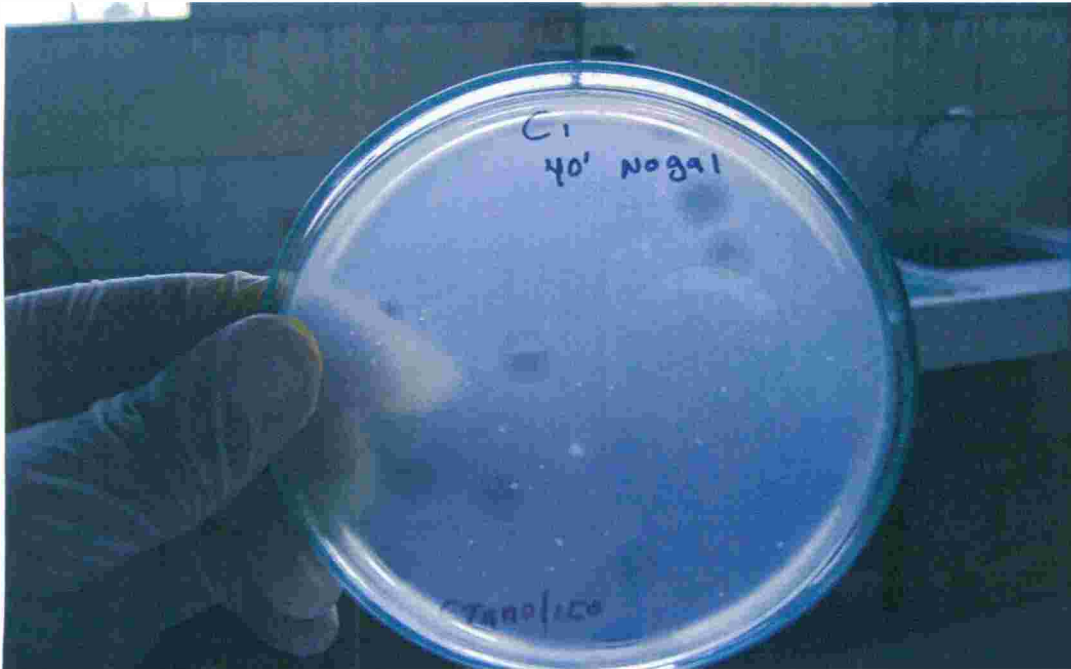


Fotografía Nº 11.- Actividad antiviral de las diferentes concentraciones del extracto de *Juglans neotropica* Diels “nogal”.



Fotografía Nº 12.- Placas con las diferentes concentraciones de extracto *Juglans neotropica* Diels “nogal” y virus en soporte de agar nutritivo.

ANEXO Nº 15



Fotografía Nº 13.- Placa control con la observación de Unidades Formadoras de Placas de lisis.



Fotografía Nº 14.- Actividad antiviral de una de las concentraciones de *Juglans neotropica* Diels "nogal".