



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

**“ EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y
HEMOAGLUTINANTE DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR
DE *Juglans neotropica* Diels ”**

Trabajo de titulación

Tipo: Trabajo Experimental.

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: LESLY KATHERINE MOYÓN RIVERA

DIRECTOR: Lic. KAREN LISSETH ACOSTA LEÓN, MSc

Riobamba – Ecuador

2020

©2020, Lesly Katherine Moyón Rivera

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Lesly Katherine Moyón Rivera, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados de los mismos son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citadas y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación. El patrimonio intelectual del trabajo de titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 28 de Agosto del 2020.

Lesly Katherine Moyón Rivera

C.I. 060405681-2

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE BIOQUIMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de titulación: Tipo Experimental: “ **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y HEMOAGLUTINANTE DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE JUGLANS NEOTROPICA DIELS**”, realizado por la Señorita Lesly Katherine Moyón Rivera, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de trabajo de titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Renato Vinueza Tapia, Ms,C

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Lic. Karen Lisseth Acosta León, Ms,C

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE
TITULACION**

BQF. Gisela Alexandra Pilco Bonilla, Ms.c

MIEMBRO DE TRIBUNAL.

DEDICATORIA

A Dios por haber significado mi guía de vida, fortaleza y sabiduría para cumplir esta meta.

A mis padres Norma Rivera y William Moyón por ser los promotores de mis sueños y que siempre me apoyaron incondicionalmente en la parte moral y económica por nunca haber dudado y puesto su confianza en mí. A mi hermano Cristian por estar pendiente de lo que me faltaba directa o indirectamente apoyarme en todo momento.

A mis tíos Guido y Rosa por ser mis consejeros permanentes y un apoyo incondicional.

A mí enamorado John y amigos con quienes tuve el privilegio de compartir experiencias gratas en esta vida estudiantil y estar pendientes y apoyarme durante todo ese tiempo.

Lesly

AGRADECIMIENTO

Doy gracias a Dios por haberme dado vida, sabiduría y fortaleza para no rendirme en los obstáculos en el camino.

A mi familia por ser la fuente de motivación en cumplir todas las metas, especialmente a mi madre y padre por ser mis apoyos morales incondicionales en todo momento y por nunca hacerme pasar necesidades.

A mí enamorado John por estar conmigo incondicionalmente y apoyarme en todo momento.

A mis amigas por el apoyo y aventuras vividas en toda la etapa universitaria que compartimos.

A la Lic. Karen Acosta Ms. C y BQF. Gisela Pilco Ms. C por haber confiado en mí y especialmente por haberse arriesgado juntamente conmigo a realizar este trabajo y ser guías a lo largo del desarrollo de esta investigación, por la paciencia y consejos brindados.

Al BQF. Diego Vinueza por su colaboración, amistad y apoyo del laboratorio en el transcurso de la investigación.

Al Dr. Gerardo Medina por el apoyo y asesoría a distancia, compartiendo su conocimiento en el tema.

A BQF. Yolanda Buenaño, responsable del laboratorio de Análisis bioquímico y bacteriológico por su asesoría, colaboración y amistad brindada en todo momento de la investigación.

A la Ing. Erika Cazorla, Responsable del laboratorio de Productos Naturales por su colaboración y amistad brindada en la investigación.

Lesly

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGRAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN..	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.	2
Objetivo General.....	2
Objetivos Específicos.....	2
CAPÍTULO I.....	3
1. MARCO TEÓRICO	3
<i>1.1. Actividad antimicrobiana</i>	<i>3</i>
1.1.1. Actividad antimicrobiana de las plantas	4
1.1.2. Clasificación de los agentes antimicrobianos.	5
1.1.3. Métodos para la determinación de actividades antimicrobianas.	8
1.1.4. Infecciones Bacterianas.....	9
<i>1.2. Actividad hemoaglutinante.....</i>	<i>12</i>
1.2.1. Tipos de Reacciones de aglutinación según Cepeda 2017:.....	13
1.2.2. Lectinas vegetales.	13
1.3. <i>Juglans neotropica</i> Diels.....	14
1.3.1. Historia.....	14
1.3.2. Descripción botánica.....	15
1.3.3. Nombre común.....	16
1.3.4. Clasificación taxonómica	16
1.3.5. Usos medicinales.....	16
CAPÍTULO II	17
2. MARCO METODOLÓGICO.....	17
2.1. Tipo y diseño de investigación	17
2.1.1. Muestra de análisis.....	17
2.1.2. Población de la muestra de estudio.....	17

2.2. Lugar de investigación	17
2.3. Lugar de recolección de la especie vegetal.....	17
2.4. Materiales, equipos y reactivos	18
2.4.1. Materiales.....	18
2.4.2. Equipos	19
2.4.3. Reactivos.....	19
2.4.4. Microorganismos.....	21
2.5. Selección de la muestra vegetal.....	21
2.6. Acondicionamiento y tratamiento del material vegetal	21
2.7. Preparación de extractos vegetales.....	21
2.8. Concentración de los extractos alcohólicos.....	22
2.9. Tamizaje fitoquímico en extractos alcohólicos.....	22
2.9.1. Determinación de alcaloides.....	22
2.9.2. Determinación de quinonas	23
2.9.3. Determinación de triterpenos y/o esteroides.....	23
2.9.4. Determinación de flavonoides.....	24
2.9.5. Determinación de aminoácidos libres o de aminas.....	24
2.9.6. Determinación de azúcares.....	24
2.9.7. Determinación de compuestos fenólicos y/o taninos.....	25
2.9.8. Determinación de grupos lactónicos – cumarinas.....	25
2.9.9. Determinación de Saponinas.....	25
2.9.10. Determinación de resinas	25
2.9.11. Determinación de catequinas.....	25
2.9.12. Determinación de compuestos grasos.....	26
2.10. Tamizaje Fitoquímico en extractos acuosos.....	26
2.10.1. Determinación de saponinas.....	26
2.10.2. Determinación de Polisacáridos	26
2.10.3. Determinación de principios amargos y astringentes.....	27
2.11. Evaluación de la actividad hemoaglutinante	27
2.11.1. Preparación de suspensión de glóbulos rojos.....	27
2.11.2. Estimación de la potencialidad de la aglutinación de los extractos acuosos.....	27
2.12. Determinación de la actividad antibacteriana en los extractos alcohólicos.....	28
2.12.1. Reactivación de los microorganismos monitores.....	28
2.12.2. Aislamiento de los microorganismos activados.....	29
2.12.3. Preparación del estándar de McFarland.....	29
2.12.4. Preparación del medio de cultivo sólido Agar Müller Hinton	30
2.12.5. Determinación de la sensibilidad bacteriana por el método de difusión en discos.....	30

2.12.6. Siembra de Controles positivos y negativos	31
CAPÍTULO III.....	32
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
3.1. Resultados del tamizaje fitoquímico.....	32
3.2. Resultados de la Actividad hemoaglutinante.....	34
3.2.1. Análisis estadístico de la actividad hemoaglutinante de los extractos con los diferentes grupos sanguíneos.....	35
3.3. Resultados de la Actividad Antibacteriana.....	37
3.3.1. Análisis estadístico de la actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos concentrados y diluidos con los microorganismos monitores.....	38
CONCLUSIONES.....	42
RECOMENDACIONES.....	43
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Clasificación de los agentes antimicrobianos según su efecto bacteriano	5
Tabla 2-1: Clasificación de los antimicrobianos según su mecanismo de acción	6
Tabla 3-1. Taxonomía de <i>Juglans neotropica</i> Diels	16
Tabla 1-2: Materiales utilizados en cada procedimiento	18
Tabla 2-2: Equipos para la preparación de los extractos	19
Tabla 3-2: Reactivos utilizados	21
Tabla 4-2: Microorganismos monitores evaluación de la actividad antimicrobiana	33
Tabla 1-3: Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólicos de los órganos de <i>Juglans neotropica</i> Diels.....	34
Tabla 2-3: Tamizaje fitoquímico de los extractos acuosos de los órganos de <i>Juglans neotropica</i> Diels.....	35
Tabla 3-3: Resultados de la actividad Hemoaglutinante de los extractos de <i>Juglans neotropica</i> Diels.....	36
Tabla 4-3: Matriz de Anova para la actividad hemoaglutinante con respecto a cada factor ...	39
Tabla 5-3: Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de <i>Juglans neotropica</i> Diels mediante el método de Kirby Bauer.....	40
Tabla 6-3: Anova factorial multivariante de las pruebas de los efectos inter sujetos	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Estructura de la pared bacteriana de los Gram positivos y negativos	10
Figura 2-1. Tipos de lectinas vegetales de acuerdo a la estructura y especificidad.....	13
Figura 3-1. Distribución del Género <i>Juglans</i> en el mundo	15
Figura 4-1. Morfología de <i>Juglans neotropica</i> Diels	15
Figura 1-2: Esquema de tamizaje fitoquímico para extractos alcohólicos.....	22
Figura 2-2: Esquema de tamizaje fitoquímico para extractos acuosos	26

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Gráfica de intervalo de confianza de 95% de Tukey de la Actividad hemoaglutinante.....	37
Gráfico 2-3: Gráficos de las medias marginales de la actividad hemoaglutinante con respecto a la interacción de los factores.	38
Gráfico 3-3: Gráfica de intervalo de confianza de 95% de Tukey de la Actividad Antibacteriana de los extractos concentrados y diluidos	41
Gráfico 4-3: Gráficos de las medias marginales entre los extractos concentrados y microorganismo con respecto a la inhibición del crecimiento bacteriano.	42
Gráfico 5-3: Gráficos de las medias marginales entre los extractos diluidos y microorganismo con respecto a la inhibición del crecimiento bacteriano.	43

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A Actividades para la obtención de los órganos *Juglans neotropica* Diels

ANEXO B Actividades para la obtención de los extractos alcohólico y acuoso de los órganos de *Juglans neotropica* Diels

ANEXO C Caracterización fitoquímica de los extractos alcohólico y acuoso de los órganos de *Juglans neotropica* Diels

ANEXO D Actividad Hemoaglutinante

ANEXO E Actividad Antibacteriana

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana y hemoaglutinante de los extractos obtenidos a partir de *Juglans neotropica* Diels. Los extractos acuosos y alcohólicos de flores masculinas, corteza, hojas y fruto se obtuvieron mediante maceración, posteriormente, se realizó el tamizaje fitoquímico para determinar los metabolitos secundarios presentes en cada parte de la especie vegetal. Los extractos alcohólicos fueron concentrados en el rotavapor y estos a su vez fueron diluidos para evaluar la actividad antibacteriana de los dos extractos por el método de Kirby-Bauer en 5 cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. La actividad de los extractos fue comparada con un control positivo: gentamicina y con controles negativos: agua destilada, etanol al 98% y etanol al 49%. Los extractos acuosos fueron utilizados para evaluar la actividad hemoaglutinante a diferentes diluciones sobre una solución de glóbulos rojos al 5% de tres grupos sanguíneos O Rh +, A Rh + y B Rh +. Para el análisis estadístico de la actividad hemoaglutinante se utilizó el modelo UNIANOVA, el cual mostró que existe diferencia significativa entre los extractos a diferentes diluciones. Los extractos presentaron actividad frente a los grupos sanguíneos, con mayor potencia sobre O y con menor potencia en A RH +. El extracto de la corteza presentó mayor actividad respecto al extracto de las hojas. Para actividad antibacteriana se usó MANOVA el cual mostró que existe diferencia significativa entre los extractos concentrados y diluidos aplicados a cada bacteria, observando que mayor actividad presentó el extracto concentrado; también se evidenció que las flores masculinas, fruto y corteza obtuvieron medias similares al control positivo, presentando una mayor potencia inhibitoria frente a *E. coli* y *S. aureus* y una menor inhibición en *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.

Palabras Claves: <PRODUCTOS NATURALES> <NOGAL (*Juglans neotropica* Diels)> <TAMIZAJE FITOQUIMICO> <ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA> < *Staphylococcus aureus* > <*Proteus mirabilis*> <*Klebsiella Pneumoniae*> < *Pseudomona aeruginosa* > <*Escherichia coli*> <ACTIVIDAD HEMOAGLUTINANTE>

Firmado digitalmente
por LUIS ALBERTO
CAMINOS VARGAS
Nombre de
reconocimiento (DN):
c=EC, o=RIOBAMBA,
serialNumber=0602766
974, cn=LUIS ALBERTO
CAMINOS VARGAS
Fecha: 2020.09.18
12:16:07 -05'00'



0301-DBRAI-UPT-2020

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antibacterial and haemagglutinating activity of the extracts obtained from *Juglans neotropica* Diels. The aqueous and alcoholic extracts of male flowers, bark, leaves and fruit were obtained by maceration, subsequently, phytochemical screening was carried out to determine the secondary metabolites present in each part of the plant species. The alcoholic extracts were concentrated in the rotary evaporator and these in turn were diluted to evaluate the antibacterial activity of the two extracts by the Kirby-Bauer method in 5 bacterial strains *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. The activity of the extracts was compared with a positive control: gentamicin and with negative controls: distilled water and ethanol 98%, and ethanol and 49%. The aqueous extracts were used to evaluate the haemagglutinating activity at different dilutions on a 5% solution of red blood cells from three blood groups O Rh +, A Rh + and B Rh +. For the statistical analysis of haemagglutinating activity, the UNIANOVA model was used, which revealed that there is a significant difference between the extracts at different dilutions. The extracts showed activity against blood groups, with higher potency on O and with lower potency on A RH +. The extract of the bark showed greater activity compared to the extract of the leaves. For antibacterial activity, MANOVA was used, which presented that there is a meaningful difference between the concentrated and diluted extracts applied to each bacterium, noting that the concentrated extract presented greater activity; it was also evidenced that male flowers, fruit and bark obtained means similar to the positive control, presenting a higher inhibitory potency with regard to *E. coli* and *S. aureus* and a lower inhibition in *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*.

Key Words: <NATURAL PRODUCTS> <WALNUT (*Juglans neotropica* Diels)> <PHYTOCHEMICAL SCREENING> <ANTIBACTERIAL ACTIVITY> <*Staphylococcus Aureus*> <*Proteus Mirabilis*> < *Klebsiella Pneumoniae*> <*Pseudomona Coli*aginoso> <*Escherichia Coli* > < HAEMAGGLUTINATING ACTIVITY >

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) mencionó que, en el año 2016 se produjeron 56 millones de defunciones en todo el mundo, siendo la tercera causa la presencia de enfermedades respiratorias con un 6.5 % y la octava causa las enfermedades diarreicas en un 3%. Los agentes etiológicos de estas enfermedades son: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, responsables de infecciones respiratorias altas/bajas y *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, etc., causantes de infecciones diarreicas. (OMS 2016) (Ritchie, 2019, p.1) Estas bacterias son promotoras de infecciones leves a graves que son tratadas con diferentes antibióticos y con el tiempo se han vuelto resistentes haciendo que los antibióticos dejen de funcionar en las personas y convirtiéndose en una gran amenaza para la salud pública (OMS 2016)

La segunda causa de muerte en el mundo, es el cáncer ocasionando en el año 2016 una cantidad de 8,8 millones de defunciones (OMS 2016), es así que diversos estudios *in vitro* e *in vivo* han establecido el papel importante que juegan las lectinas, en la mediación de la metástasis en el cáncer y en la apoptosis, siendo muy importante para el análisis de los eventos bioquímicos para la estimulación de los linfocitos, también han demostrado ser herramientas muy útiles en la investigación biomédica utilizándolas para la tipificación de los grupos sanguíneos y bacterianos. (Mendoza 2008, pp.21-22)

Por esta razón, el presente estudio se interesa en investigar la capacidad de inhibir o eliminar el crecimiento de bacterias mediante los extractos de diferentes partes del árbol *Juglans neotropica*, como también identificar la posible presencia de lectinas mediante la hemoaglutinación en tres tipos de sangre A,B,O Rh+ permitiendo inferir, que de ser una aglutinina de tipo lectina, uno de los compuesto responsable de esta actividad, podría estar reconociendo algún carbohidrato de la membrana de los tres grupos sanguíneos.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.

Objetivo General

- Evaluar la actividad antibacteriana y hemoaglutinante de los extractos obtenidos a partir de los órganos de *Juglans neotropica* Diels

Objetivos Específicos

- Obtener extractos acuosos y alcohólicos de los órganos (corteza, hojas, fruto y flores) mediante maceración.
- Identificar cualitativamente la presencia de metabolitos en *Juglans neotropica* a través de la realización de tamizaje fitoquímico.
- Evaluar la actividad hemoaglutinante de los extractos acuosos de los órganos (corteza, hojas, fruto y flores) del árbol *Juglans neotropica* frente a los grupos sanguíneos O, A, B (RH +).
- Determinar la actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos de los órganos (corteza, hojas, fruto y flores) del árbol *Juglans neotropica* frente a microorganismos monitores.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Actividad antimicrobiana

Las infecciones han sido durante muchos años la principal causa de muerte debido a diferentes microorganismos como virus, bacterias y parásitos. En 1928, inició una nueva era de la medicina cuando Alexander Fleming descubrió casualmente la penicilina en una placa de Petri contaminada por el hongo *Penicillium*. Este compuesto natural demostró ser tóxico para las bacterias, pero seguro para el ser humano. El uso de la penicilina permitió salvar cientos de miles de vidas durante la Segunda Guerra Mundial y tras este descubrimiento se inició una búsqueda intensa de otros compuestos naturales o sintéticos que pudieran utilizarse para tratar otros microorganismos patógenos. (OMS, 2016b)

Un agente antimicrobiano es un compuesto químico, sintético o natural que mata o inhibe el crecimiento de los microorganismos. Dentro de los agentes que matan los microorganismos se encuentran los bactericidas, fungicidas y virucidas, estos siempre llevarán en su nombre el prefijo *-cida*. Dentro de los agentes que no matan sino solo inhiben el crecimiento de los microorganismos se encuentran los agentes bacteriostáticos, fungistáticos y virustáticos. Estos agentes varían de acuerdo a su toxicidad selectiva, aquellos que actúan de forma no selectiva tienen efectos sobre todo tipo de células, mientras que los que tienen toxicidad selectiva son útiles para enfermedades infecciosas sin ningún daño al huésped. (Madigan, et al, 2009, p. 873)

Dentro de los antimicrobianos más utilizados, se encuentran los antibacterianos que son denominados antibióticos y según Mateos, 2014 lo definen como sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) o sintetizados por métodos de laboratorio que suprimen o inhiben el crecimiento de bacterias que pueden eventualmente destruirlos. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano.

1.1.1. Actividad antimicrobiana de las plantas

Actualmente, el empleo de plantas medicinales está aumentando debido al conocimiento ancestral que ha constituido un recurso necesario de curación de enfermedades, dolencias pues presentan la capacidad de combatir microorganismos llegando a destruirlos o inhibirlos empleando directamente la planta o como extracto. En la actualidad, este uso se fundamenta en numerosos ensayos farmacológicos y de laboratorio que han permitido conocer la composición química avalando la utilización de las plantas. (Azuero et al. 2016, p.12)

1.1.1.1. Compuestos químicos con actividad antimicrobiana en plantas.

Las drogas vegetales presentan una diversidad de sustancias químicas (metabolitos primarios y secundarios) de distinta estructura, para cuya determinación se realiza un tamizaje fitoquímico, el cual evidencia la presencia de metabolitos secundarios que proceden de rutas biosintéticas como la ruta del ácido shikímico, ruta de los policétidos y ruta del ácido mevalónico.

Fenoles y Ácidos fenólicos

Proceden de la ruta metabólica del ácido shikímico o del acetato, los fenoles sencillos son pocos frecuentes mientras que los ácidos fenólicos pueden ser derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico presentan en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos. (Kuklinski, 2009, pp. 94-96) Estos compuestos tienen propiedades bactericidas o bacteriostáticas, dependiendo de la concentración a la que se use, algunos compuestos fenólicos actúan como fungicidas, su actividad se reduce a un pH alcalino y por material orgánico. (Silva, 2013, p. 12)

Flavonoides

Proceden de la ruta metabólica del ácido shikímico y policétidos, se encuentra en todas las plantas superiores sobre todo en las hojas, flores y fruto; las agliconas son insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos como etanol (polar) y éter (apolar), mientras que los heterósidos son solubles en agua y solventes hidroalcohólicos. Existen compuestos que se relacionan con los flavonoides entre ellos están las antocianidinas, catequinas y leucoantocianidinas. Poseen actividades muy diversas como antibacteriano, antivírico, antimicótico, antiinflamatorio, anti arrítmico, diurético y antiespasmódico. (Kuklinski, 2009, pp. 106-109)

Taninos

Son un grupo de compuestos hidrosolubles y condensados, entre las principales acciones terapéuticas son astringentes, cicatrizantes, antisépticos (bactericida y bacteriostático), anti fúngico y antioxidante.(Kuklinski, 2009, pp. 112,116)

Isoprenoides

Son metabolitos secundarios formados por la ruta del ácido mevalónico, se pueden encontrar compuestos de estructuras diversas formando mezclas complejas. Se clasifican de acuerdo al número de carbonos y es la siguiente:

Triterpenos

Son compuestos con C₃₀ son muy importantes aquellos que forman parte de las saponinas y de los heterósidos cardiotónicos. (Kuklinski, 2009, pp. 127, 131)

Saponinas

Son heterósidos que se encuentran tanto en vegetales inferiores como superiores son solubles en el agua como en solventes orgánicos, presentan propiedades terapéuticas como tensoactivo, expectorante y antitusivo, poder diurético, cicatrizante, antimicrobiano, antivírico, antifúngico y molusquicida. (Kuklinski, 2009, p. 146)

1.1.2. Clasificación de los agentes antimicrobianos.

El termino antimicrobiano es el más aceptado que incluye a los antibióticos y existen diferente criterios para agruparlos así por su efecto antibacteriano es decir cuando su acción ejerce al llegar al foco infeccioso y este penetra en las bacterias por difusión o transporte activo (Mateos, 2014, p.5) dentro de este grupo están los:

- a) *Bacteriostáticos* si inhibe la multiplicación y desarrollo de forma reversible las bacterias sin llegar a matarlas.
- b) *Bactericidas* si tiene un efecto letal produciendo lisis bacteriana con efectos irreversibles.

Dentro de estos grupos se encuentran los antibióticos (tabla 1-1) que actúa preferentemente de una forma u otra dependiendo hacia que microorganismo actúa. (Picazo, et al, 2016, p. 42)

Tabla 1-1: Clasificación de los agentes antimicrobianos según su efecto bacteriano

BACTERICIDAS	BACTERIOSTATICO
Beta-lactámicos	Tetraciclinas
Glucopéptidos	Macrólidos
Aminoglucósidos	Cloranfenicol
Quinolonas	Sulfamidas

Fuente:(Grau, S. Alvarez, F. Campany, 2012, p.166): Antimicrobianos

Realizado por: Moyón Lesly, 2020

También se pueden clasificar de acuerdo a su mecanismo de acción (tabla 2-1):

- Inhiben la síntesis de la pared celular: tiene habitualmente un efecto bactericida y se da en tres procesos.
- Inhiben la síntesis proteica: es decir se da la inhibición de la traducción del material genético de la bacteria actuando sobre el ribosoma 30s o 50s.
- Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos: Actúan sobre las enzimas responsables de la transcripción y traducción del ARN. (Paredes y Roca, 2014, p.118)

Tabla 2-1: Clasificación de los antimicrobianos según su mecanismo de acción.

I. Inhibición de la síntesis de la pared celular	Penicilinas
	Cefalosporinas
	Vancomicina
	Fosfomicina
	Bacitracina
II. Inhibición de la síntesis proteica	Cloranfenicol
	Tetraciclina
	Aminoglucósidos
	Lincomicinas
III. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	Eritromicina
	Quinolonas
	Sulfonamidas
	Rifampicina
	Trimetropín

Fuente:(Paredes y Roca, 2014, p.118): Acción de los antibióticos.

Realizado por: Moyón Lesly, 2020

1.1.2.1. Resistencia de las Bacterias a los antimicrobianos

Según Alos, J 2014 define la resistencia bacteriana a los antibióticos como la capacidad de una bacteria para sobrevivir a concentraciones de antibiótico que inhiben/matan a otras de la misma especie.

Los antibióticos han salvado millones de vidas pero al poco tiempo después que se introdujo la penicilina en la práctica clínica la gran mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* eran sensibles, actualmente lo son menos del 5-10%. De la misma manera cuando se introdujo la cefotaxima a principios de la década de los ochenta del siglo xx todas la cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* eran sensibles; hoy son resistentes el 13 y el 16%, respectivamente según estudios. Las fluoroquinolonas a finales de la década de los ochenta prácticamente todas

las cepas de *E. coli* eran sensibles; hoy son resistentes el 34%. El problema se agrava por los escasos recursos que dedica la industria farmacéutica a la investigación en antibióticos, lo que ha resultado en pocos con nuevos mecanismos de acción y que sean diferentes en los últimos años. Ese desinterés se debe a varias cosas, que pueden resumirse en la poca rentabilidad de este grupo de fármacos en comparación con otros usados en terapia de enfermedades crónicas como la diabetes donde se han incorporado fármacos muy caros. (Alós, 2015, p. 693)

La lucha contra la resistencia a los antibióticos reviste alta prioridad para la OMS. La Asamblea Mundial de la Salud aprobó en mayo de 2015 un plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos y antibióticos cuya finalidad es asegurar que se pueda seguir previniendo y tratando enfermedades infecciosas por medio de fármacos eficaces y seguros. (OMS 2018)

1.1.2.2. Mecanismo de resistencia de las bacterias a los antimicrobianos.

Las bacterias para evitar que las destruyan disminuyen o evaden la presencia del antibiótico en su interior ya sea modificando su permeabilidad, alterando su mecanismo de transporte activo en la membrana celular o generando mecanismos de eliminación activa del antibiótico. La resistencia puede ser:

a. Natural o intrínseca: es la que presenta algunas especies bacterianas de forma preestablecida en función de sus estructuras y son conocidas de antemano.

b. Adquirida: Surgen a lo largo del tiempo en bacterias que eran sensibles dando lugar a fallos en el tratamiento terapéutico este tipo de resistencia se le debe por la mutación genética producida por generaciones. (Picazo, et al, 2016, pp. 51-55)

- Producción de enzimas por parte de las bacterias modificando la estructura del antibiótico e inactivándolo por ejemplo las betalactamasas que destruyen el anillo betalactámico de las penicilinas y cefalosporinas, o las fosforilasas y acetilasas que inactivan a los aminoglicósidos.
- Cambios en los puntos de unión para los antibióticos, evitando así que el antibiótico pueda ejercer su acción sobre la bacteria; por ejemplo el *estafilococo* meticilino resistente SARM, el *pneumococo* penicilino resistente y el *enterococo* multirresistente.
- Alteraciones en la penetración ocasionando que el antibiótico no pueda llegar a su diana ya sea por falta de difusión o disminución de porinas. (Picazo, et al, 2016, pp. 51-55)

1.1.3. Métodos para la determinación de actividades antimicrobianas.

Diferentes métodos pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos, pero estos no se basan en los mismos principios, permitiendo que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado. (Ramirez y Marin, 2009, p. 263)

1.1.3.1. Método de difusión o método de Kirby-Bauer

La prueba de difusión por disco ha sido utilizada por más de 70 años en los laboratorios de microbiología. Alexander Fleming utilizó una variante de esta técnica cuando trabajaba con la penicilina en los años cincuenta. Los doctores Bauer, Kirby, Sherris y Turck probaron minuciosamente todas las variables involucradas en el proceso, tales como los medios de cultivo, la temperatura y el espesor del agar y es así como en 1966, ellos publicaron su estudio describiendo la prueba que se usa en la actualidad. (Coyle et al. 2016, p.39)

Este método es altamente reproducible y se fundamenta en determinar cuantitativamente, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayadas individualmente, sobre las cepas bacterianas aisladas en un agar estandarizado (McFarland) determinándose mediante un halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar, y el método está diseñado específicamente para bacterias de crecimiento rápido como los *Staphylococcus sp.* o los integrantes de la familia Enterobacteriaceae. (Ramirez y Marin 2009).

1.1.3.2. Método de suspensión directa de colonias McFarland

El método de suspensión directa de colonias se lo realiza mediante el patrón de McFarland el cual proveerá resultados precisos para obtener suspensiones estandarizadas de microorganismos. Es un patrón de turbidez de una concentración 0,5 M el cual es la equivalencia de aproximadamente $1,5 \times 10^{-8}$ UFC/ml). Este patrón se prepara añadiendo ácido sulfúrico a una solución acuosa de cloruro de bario que procede la formación de un precipitado de sulfato de bario suspendido. Las suspensiones ajustadas deben utilizarse como inóculo dentro de los 15 minutos siguientes. (Coyle et al. 2016, p.39)

1.1.4. Infecciones Bacterianas

Una infección es considerada como la multiplicación de microorganismos patógenos (bacterias) dentro del organismo. Dentro de las características de las bacterias para ocasionar daño al ser humano está el potencial de ser transmisibles, su adherencia e invasión a la célula y tejidos del hospedador, su toxigenicidad y capacidad para evadir el sistema inmunitario, todo esto provoca la aparición de los signos y síntomas de la enfermedad sin embargo muchas infecciones producidas permanecen ocultas y asintomáticas. (Brooks, et al., 2011, p.145)

Las infecciones han sido durante muchos años la principal causa de muerte debido a diferentes microorganismos como virus, bacterias y parásitos. En 1928, inició una nueva era de la medicina cuando Alexander Fleming descubrió casualmente la penicilina en una placa de Petri contaminada por el hongo *Penicillium*. Este compuesto natural demostró ser tóxico para las bacterias, pero seguro para el ser humano. El uso de la penicilina permitió salvar cientos de miles de vidas durante la Segunda Guerra Mundial y tras este descubrimiento se inició una búsqueda intensa de otros compuestos naturales o sintéticos que pudieran utilizarse para tratar otros microorganismos patógenos recibiendo el nombre de antibióticos. (OMS, 2016b)

1.1.4.1. Bacterias

Las bacterias son organismos microscópicos, procariotas, unicelulares que se reproducen por división asexual, presentan mecanismos propios para la producción de energía usado para su crecimiento y desarrollo, la gran mayoría tienen una vida libre, la membrana que los rodea es compleja, la pared celular Gram negativa con una delgada capa de peptidoglucano y la pared celular Gram positiva presenta una capa gruesa de peptidoglucano (Murray, et al, 2009, p.4)

Existen tipos diferentes de bacterias que pueden vivir en todos los ambientes del mundo y muchas de estas también viven en el cuerpo de los humanos o de los animales sin causar ningún daño y siendo útiles para las personas. Sin embargo existen también otras bacterias que son perjudiciales y son conocidas como patógenas las cuales producen sustancias nocivas (toxinas) llegando a invadir los tejidos.

Las bacterias patógenas a pesar de ser tratadas con antibióticos son capaces de defenderse mediante varios mecanismos volviéndose cada vez más resistentes a los tratamientos lo que ha provocado uno de los problemas de salud pública más apremiantes en el mundo, puesto que las infecciones que antes se trataban fácilmente con antibióticos se han ido convirtiendo en peligrosas provocando incluso a la muerte. (CDC, 2015, p. 2)

Entre las bacterias que causan la mayoría de infecciones comunes y que actualmente se están volviendo resistentes a uno o varios antibióticos son las que ocasionan infecciones del tracto urinario, digestivo, infecciones cutáneas, infecciones del torrente sanguíneo, neumonías y diarreas.

La clasificación de las bacterias por una primera propuesta se basa en la tinción de su pared es decir se puede teñir color rosa (Gram negativas) o color morado (Gram positivas). (Picazo, et al, 2016, p.17)

Las bacterias Gram positivas están formadas por peptidoglucano o mureína un polímero de azúcares y aminoácidos.

Las bacterias Gram negativas presentan una capa de peptidoglucano muy delgada, exteriormente presente la capa de mureína y una membrana bilaminar. (Picazo, et al, 2016, pp. 23-26)

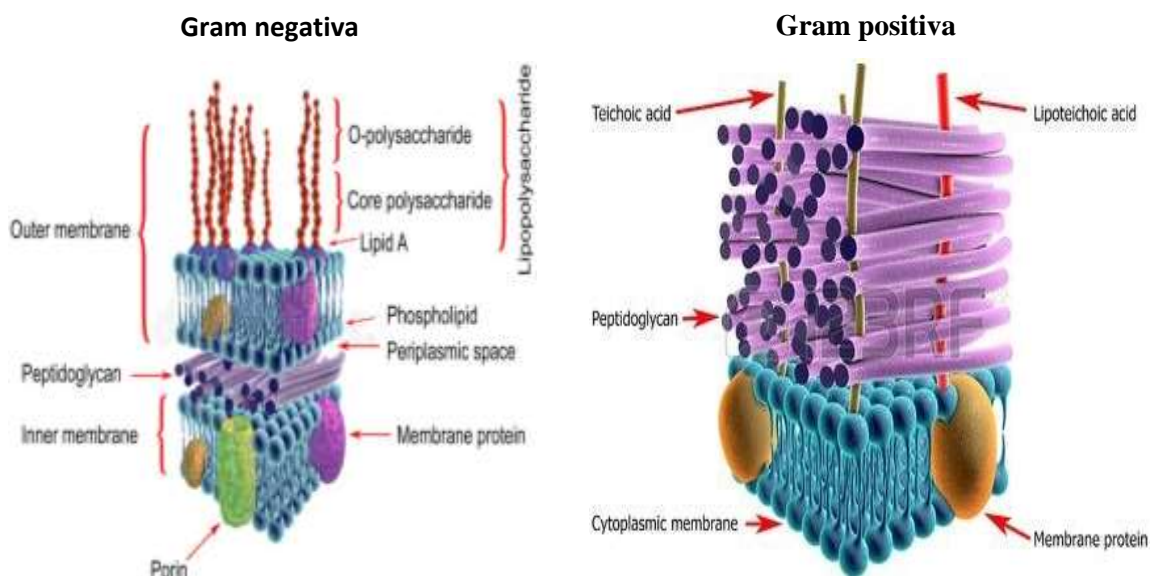


Figura 1-1: Estructura de la pared bacteriana de los Gram positivos y negativos.

Fuente: Vílchez, H. 2010

1.1.4.2. *Staphylococcus aureus*.

Son bacterias esféricas de aproximadamente 1 **um** de diámetro y están dispuestas en racimos irregulares, son anaerobios facultativos; es decir, pueden crecer aerobia y anaerobiamente, es el agente más virulento en el ser humano. Las colonias de esta bacteria son doradas como consecuencia de los pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento, es la única especie que produce en la persona la enzima coagulasa. Presenta once serotipos de los cuales el 5 y 7 son los responsables de la mayor parte de infecciones humanas. La capsula protege a las bacterias al inhibir la fagocitosis de estos microorganismo por los leucocitos polimorfonucleares. Causan enfermedades mediante la producción de toxinas o mediante la invasión directa y destrucción de los tejidos. Las manifestaciones clínicas de algunas

enfermedades se deben a la actividad de la toxina como síndrome de piel escaldada, intoxicación alimentaria y síndrome de shock, mientras que otras afecciones por consecuencia de proliferación estas infecciones cutáneas, endocarditis, neumonía, empiema, osteomielitis y artritis séptica. (Murray, et al, 2009, pp.209-219)

1.1.4.3. Escherichia coli

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae son bacilos Gram negativos de tamaño 1-6 **um** y es el miembro más frecuente e importante de género *Escherichia*. Se encuentran de forma universal en el suelo, agua y vegetales y son parte de flora microbiana normal de los seres humanos; ocasionan infecciones oportunistas y se convierten en patógenas cuando adquieren genes con factores de virulencia presentes en plásmidos, bacteriófagos.

Este microorganismo se asocia a múltiples enfermedades como la gastroenteritis, infecciones extra intestinales, urinarias (ITU), meningitis neonatal y sepsis y algunos serotipos son capaces de producir colitis hemorrágica provocando deshidratación aguda, diarrea infantil, diarrea del viajero. (Murray, et al, 2009, pp.301-307)

1.1.4.4. Klebsiella pneumoniae

Son cocobacilos Gram negativos inmóviles que en el año 1882 produjo la neumonía lobular presentan un tamaño de 0.5-1,5 **um**, posee una cápsula doble, muy a menudo son confundidos con los diplococos del neumococo. Se desarrollan fácilmente en todos los medios de cultivo y se presentan como colonias blanco-grisáceas de tamaño pequeño con aspecto mucoso semilíquido. (Paciel et al. 2011, pp. 4-5)

Estas bacterias son causantes de infecciones intrahospitalarias a pacientes inmunodeprimidos especialmente presenta manifestaciones clínicas como infecciones respiratorias como neumonía Infección del tracto urinario, infecciones de tejidos blandos, infecciones de herida quirúrgica.

1.1.4.5. Proteus mirabilis

Es un bacilo gram negativo, facultativamente anaeróbico causante de las infecciones urinarias una enfermedad frecuente debido a que causa grandes cantidades de ureasa, que escinde la urea en dióxido de carbono y amonio proceso que eleva el pH urinario, precipita el magnesio y el calcio en forma de cristales provocando los cálculos renales, produce hasta seis tipos de fimbrias que se adhieren al urotelio. (Murray, et al, 2009, pp. 313-314)

1.1.4.6. *Pseudomonas aeruginosa*.

Son bacilos Gram negativos que están rodeados de una envoltura polisacárido, es un patógeno ubicuo, oportunista y bastante persistente en el medio ambiente. Esta bacteria tiene forma de bastón aproximadamente de 0,5-1 μm in diámetro y de 1,5-5 μm de largo. Cuentan con un flagelo polar que le confiere la motilidad necesaria. Estas tienen 3 tipos de colonias rugosa, lisa y mucoide, produce pigmento piocianina que es fluorescente color verdosa de olor aromático dulzón. En estado vegetativo son más resistentes que otras bacterias por lo general son sensibles a los fenoles, sales de plata, ácido acético. Están distribuidos ampliamente sobre el suelo agua, plantas y animales; colonizan zonas húmedas como el periné, axilas y oído. (Paz Zarza et al. 2019, pp. 180-181)

Se encuentra entre los microorganismos que con mayor frecuencia producen infecciones intrahospitalarias a pacientes inmunodeficientes, es el primero en neumonías, el tercero en ITU y primera causa de infección invasiva en pacientes quemados. Dentro de las manifestaciones clínicas más importantes están las infecciones de las vías respiratorias, infecciones urinarias, osteoarticulares, oculares, óticas, cutáneas, bacteriemia, endocarditis, infecciones meníngeas y gastrointestinales. (Picazo, et al, 2016, pp. 140-145)

1.2. Actividad hemoaglutinante

A finales del siglo XIX, se encontró la presencia en la naturaleza de proteínas que tenían la capacidad de aglutinar eritrocitos. Estas proteínas fueron llamadas hemaglutininas o fitohemaglutininas, porque fueron encontradas originalmente en algas. (Reyes y Gallegos 2011) El primer trabajo realizado con el propósito de detectar la presencia de sustancias aglutinantes de eritrocitos humanos en algas, lo realizaron Boyd y colaboradores en 1966 donde reportaron las propiedades hemaglutinante de extractos de algas de Puerto Rico, encontrando que 20 especies aglutinaban eritrocitos de los grupos sanguíneos O, Ay/o B. (Lopez, Fariñas y Amaro 2011)

La hemoaglutinación (HA) es la unión de los eritrocitos por las lectinas que son producidas por ciertos organismos como virus, bacterias, hongos y plantas. El resultado visible es un patrón formado en el fondo del pozuelo por los eritrocitos unidos por la hemaglutinina (lectina). (IPK, 2013, p.45)

1.2.1. Tipos de Reacciones de aglutinación según Cepeda 2017:

- Neutralización: mediante anticuerpos específicos se pueden neutralizar toxinas, virus o enzimas. Los anticuerpos neutralizantes requieren un solo tipo de combinación con el antígeno para poder actuar
- Precipitación: la reacción de precipitación ocurre cuando se combina un anticuerpo por lo menos divalente, con un antígeno soluble y esto conlleva a la formación de agregados que precipitan.
- Aglutinación: cuando un antígeno articulado reacciona con su anticuerpo específico (divalente por lo menos) se observa la formación de grumos o agregados que precipitan esto se conoce como aglutinación en estas reacciones el determinante antigénico está sobre la superficie de una partícula o de una célula.

1.2.2. Lectinas vegetales.

Entre el elevado número de sustancias con propiedades bioactivas, se cuenta comúnmente con las lectinas que son proteínas o glicoproteínas (Figura 2-1) capaces de aglutinar células glicoconjugados, además, las lectinas presentan un sitio de reconocimiento a carbohidratos, no poseen actividad enzimática y no son producto de una respuesta inmune. (Cepeda, 2017, pp.10-14)

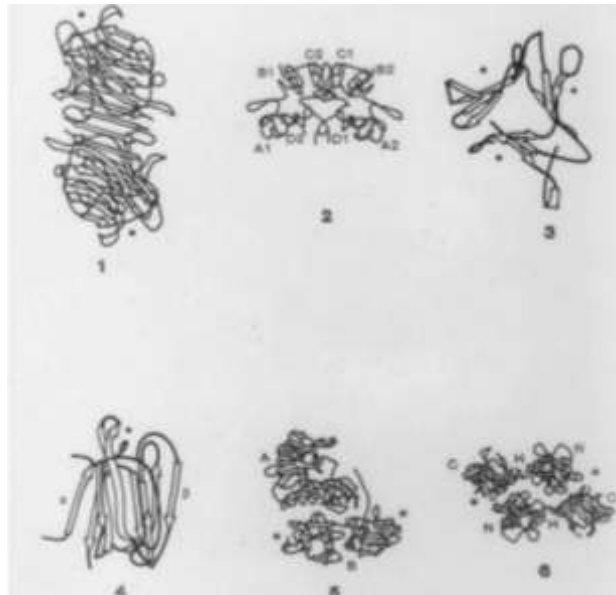


Figura 2-1. Estructuras tridimensionales en lectinas vegetales

Fuente: (Mendoza 2008) Lectinas

1.2.2.1. Aplicaciones terapéuticas de las lectinas.

Las lectinas pueden tener diversas funciones muy útiles en la inmunohematología asociadas con transfusiones de sangre, debido a la identidad que presentan ante los azúcares específicos en la membrana de los eritrocitos clasificados como grupos sanguíneos A, B y O. Poseen efecto protector frente a ciertos microorganismos, otros ayudan al reconocimiento y eliminación de glicoproteínas del sistema circulatorio, así como de células envejecidas y células tumorales mediante un proceso de opsonización, también ayudan a reconocer y eliminar bacterias debido a los carbohidratos presentes en su membrana. (Hernández, et al., 2005, p. 22)

1.2.2.2. Implicación de las lectinas en el cáncer.

La vigilancia inmunológica juega un papel muy importante ante las alteraciones que conllevan a una serie de mutaciones que producen una proliferación celular anormal generando tumoraciones y es a partir de ella que el sistema inmune reconoce y elimina las células transformadas. Diversos estudios han demostrado que ante la presencia de lectinas existe un aumento en la actividad fagocítica de granulocitos y en la actividad antitumoral de las células NK contra células tumorales. (Reyes y Gallegos, 2011, pp. 179-180)

Algunas lectinas pueden activar a la caspasa-8, una proteína esencial en los procesos de apoptosis, e inducir una muerte celular programada en las células cancerígenas. La inducción de apoptosis se debe a que la lectina inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas en células malignas, este tipo de respuesta no se observa en células normales, lo cual sugiere un resultado diferencial en el reconocimiento de una lectina frente a células malignas. (Reyes y Gallegos, 2011, pp. 180-181)

1.3. *Juglans neotropica* Diels

1.3.1. Historia

Juglans es un género que se ha distribuido en latitudes que van de los 44° N a 28° S, y desde hace 56 millones de años, aparecieron en el continente asiático las primeras especies (Figura 3-1) *Juglans ailantifolia*, *J. regia* y *J. mandshurica*. *Juglans regia* ha sido la más plantada desde su aparición, tanto en el viejo como en el nuevo mundo, por sus frutos altamente alimenticios y su madera valiosa. Hace 23 millones de años, surgió el resto de nueces de América conservando los rasgos físicos migrando de América del Norte a América Central (México) con la especie *J. olanchana*. Dichas especies son nativas o endémicas de la vegetación propia de cada país,

encontrándose rasgos similares, aunque con diferencias taxonómicas en sus flores y en la madera, Entre estas especies están *J. boliviana* (Bolivia), *J. australis* (Argentina) y *J. neotrópica* esta última también está presente en Perú y aproximadamente en el siglo XV fue encontrada en Ecuador por el botánico Alemán Friedrich Ludwig Emil Diels. (Vanegas y Roldán, 2018, p.2)

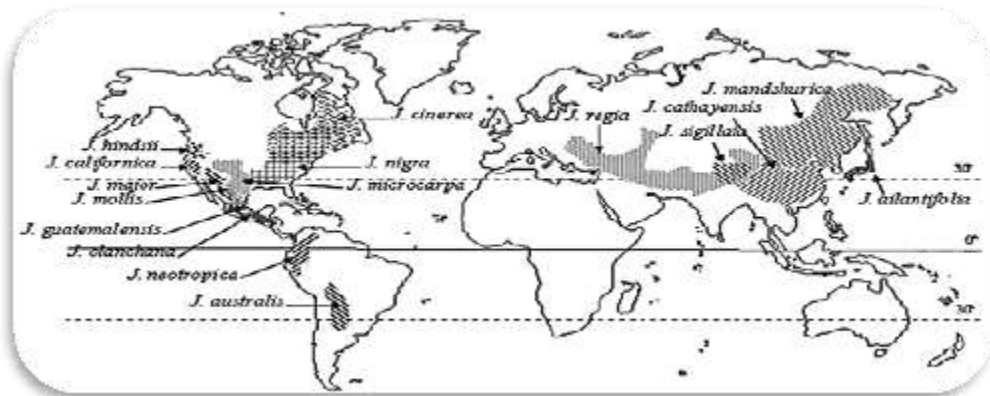


Figura 3-1. Distribución del Género Juglans en el mundo.

Fuente: Mallikarjuna et al. 2007

Actualmente, la especie *Juglans neotropica* Diels (1906) ha sido ampliamente explotada, por lo que ha sido categorizada en peligro (EN) según el libro rojo de plantas maderables, eso se debe principalmente por la excelencia de su madera y por sus múltiples usos ha sido utilizada indebidamente sin ningún uso técnico. (Rave, et al., 2013, p.2)

1.3.2. Descripción botánica

Habitualmente alcanza unos 20 m de altura. Es de porte recto, tiene una copa irregular, con predisposición a ser proporcionadamente reducida y de ramas gruesas. Las flores masculinas surgen en las ramas del año anterior, en las axilas de las cicatrices foliares. Son dispuestas en espiga y numerosas. Las flores femeninas se sitúan, en grupos de 2 a 4, en el extremo de las ramas. Los frutos son de drupa redonda, con pedúnculo cortó y de color pardo a negro. (Ver figura 4-1) Al romperse el mesocarpio del fruto, queda la semilla con su cubierta característica. (Albán, 2015, pp. 4-5)



Figura 4-1. Morfología de *Juglans neotropica* Diels.

Fuente: Lesly Moyón.

1.3.3. Nombre común

Juglans neotropica es conocido como nogal, tocte o cedro negro.

1.3.4. Clasificación taxonómica

Tabla 3-1. Taxonomía de *Juglans neotropica* Diels

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fagales
Familia	Juglandaceae
Género	Juglans
Nombre Científico	<i>Juglans neotropica</i> Diels 1906

Fuente: (Ecuadorforestal 2010): Ficha técnica No 2 Nogal

Realizado por: Lesly Moyón, 2019

1.3.5. Usos medicinales.

El aprovechamiento del nogal es integral, muy útil desde sus hojas hasta su fruto de los cuales se han evidenciado utilidades medicinales, cosméticas y textiles.

Según conocimientos ancestrales, se usa como antiséptico, hipoglucemiante, cicatrizante de heridas, antihelmíntico, en hipotiroidismo (antiguamente desconocido), problemas de la piel, sangre, expectorante, alopecia e infecciones de la garganta los cuales eran tratados con infusiones de las hojas o emplastos de las mismas. (Permatree, 2016, p.1)

El pericardio es usado en el ámbito textil como colorantes, en la gastronomía en la elaboración de platos ricos en omega 3 y su madera es muy codiciada por industrias madereras

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Tipo y diseño de investigación

Esta investigación es de tipo y diseño experimental, está basada en el análisis de la actividad antibacteriana y hemoaglutinante de *Juglans neotropica* Diels.

2.1.1. Muestra de análisis

Extractos alcohólicos y acuosos de *Juglans neotropica* Diels.

2.1.2. Población de la muestra de estudio

Las muestras en estudio fueron las hojas, fruto inmaduro, flores masculinas y corteza de *Juglans neotropica* Diels, perteneciente a la familia Juglandaceae.

2.2. Lugar de investigación

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Productos Naturales y en el Laboratorio de Análisis Bioquímico y Bacteriológico de la Facultad de Ciencias en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.3. Lugar de recolección de la especie vegetal

La especie fue recolectada en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en la Facultad de Ciencias, en la provincia de Chimborazo, Ecuador.

2.4. Materiales, equipos y reactivos

2.4.1. Materiales

Tabla 1-2: Materiales utilizados en cada procedimiento.

PROCEDIMIENTO	MATERIAL	CANTIDAD
Preparación de los extractos	Papel aluminio	1
	Frascos ámbar esterilizados de 500 ml	10
	Frascos ámbar 3 ml esterilizados	20
	Órganos de la planta seca	1
	Balones de rotavapor	2
	plastilina	1
	Kitasato	1
	Embudo Buchner	1
	Papel Filtro	1 pliego
	mangueras	2
Tamizaje fitoquímico	Tubos de ensayo	25
	Gradilla	1
	Pipetas de 5 ml	5
	Pera de succión	2
	Vasos de precipitación	5
	Reverbero	1
Determinación de la Actividad Hemoaglutinante	Tubos de ensayo	112
	gradillas	4
	vacutainer	1
	Agujas para vacutainer	3
	Tubos con EDTA	9
	torniquete	1
	Algodón	1
	Pipeta automática 200 uL	1
	Pipeta automática 1000 uL	1
	Puntas azules	10
	Puntas amarillas	30
	Jeringuillas de 10 ml	3
	Jeringuillas de 3 ml	3
	Balón de aforo 100 ml	1
	parafilm	3
	Determinación de la Actividad Antibacteriana	Tubos de ensayo
gradilla		1
Papel absorbente		1
Aluminio		1
Cajas Petri vidrio		60
Asa bacteriológica		1
Pipeta automática 100 uL		1
Puntas amarillas		120
Erlenmeyer 100 ml		2
Erlenmeyer 500 ml		2
Gasa		1
Hisopos estériles		60
Algodón		1
Mecheros	2	

	Fósforo	1
	Cinta adhesiva	1
	rotulador	1

Realizado por: Moyón Lesly, 2020

2.4.2. Equipos

Tabla 2-2: Equipos para la preparación de los extractos.

PROCEDIMIENTO	EQUIPO	FUNCIÓN
Preparación de los extractos	Molino	Disminución del tamaño de la muestra seca.
	Rotavapor	Eliminación lenta y eficiente de solventes.
	Bomba al vacío	Filtración al vacío de los extractos.
	Autoclave	Esterilización con vapor de agua.
	Congelador	Conservación de muestras a temperaturas bajo cero.
Tamizaje fitoquímico	Extractor de gases	Limita la exposición a gases producidos por sustancias químicas corrosivas.
Determinación de la actividad hemoaglutinante	Centrífuga	Separación de componentes por movimiento de rotación.
	Baño maría	Incubar muestras en agua a temperatura constante.
Determinación de la actividad antibacteriana	Cámara de Flujo laminar	Mantiene la zona de trabajo limpio libre de partículas.
	Incubadora	Mantener cultivos microbiológicos.
	Autoclave	Esterilización con vapor de agua.
	Refrigeradora	Conservación de muestras a temperatura de 2-6 °C

Realizado por: Moyón Lesly, 2020

2.4.3. Reactivos

Tabla 3-2: Reactivos utilizados.

PROCEDIMIENTO	REACTIVOS	DESCRIPCIÓN
Preparación de los extractos	Agua destilada	Solvente para las drogas secas y de limpieza.
	Alcohol potable	
	Agua mineral	
	Reactivo Dragendorff	Ensayo de Dragendorff
	Reactivo de Mayer	Ensayo de Mayer
	Reactivo de Wagner	Ensayo de Wagner
	Reactivo para catequinas	Ensayo de catequinas
	Tricloruro férrico 5%	Ensayo para compuesto fenólicos
	Acetato de Sodio	
	Ácido clorhídrico	Ensayo de Shinoda

Tamizaje fitoquímico	Cloruro de sodio	Ensayo de Mayer
	Cloroformo	Ensayo de Borntrager.
	Hidróxido de sodio 5%	
	Anhídrido acético	Ensayo de Lieberman Burchard
	Ácido sulfúrico	
	Alcohol amílico	Ensayo de Antocianidinas
	Sudan III	Ensayo de Sudan
	Solución de Ninhidrina 2%	Ensayo de Ninhidrina
	Reactivo de Benedict	Ensayo de Benedict
	Cinta de Magnesio metálico	Ensayo de Shinoda
	Reactivo de Baljet	Ensayo de Baljet
	Agua destilada	Ensayo de Espumas y mucilagos
	Extractos acuosos y alcohólicos	
Determinación de la actividad hemoaglutinante	Sangre O Rh +	
	Sangre A Rh +	
	Sangre B Rh +	
	Solución salina 0.9%	
	Agua destilada	
	Extractos acuosos de cada órgano	
	Solución de glóbulos rojos	
	Reactivo anti A	
	Reactivo anti B	
Reactivo anti D		
Determinación de la actividad antibacteriana	Agar Müller Hinton	Medio de cultivo sólido para antibiogramas
	Agar Saboraund	Medio enriquecido específico para hongos.
	Caldo nutritivo	Medio de cultivo líquido universal para microorganismos
	Caldo Müller Hinton	Medio de cultivo líquido nutritivo para microorganismos
	Ácido sulfúrico 0.36M	Reactivo para preparar el estándar de Mcfarland
	Cloruro de bario 0.048M	Reactivo para preparar el estándar de Mcfarland
	Extractos alcohólicos concentrado en rota vapor	
	Alcohol potable	Limpieza de materiales
	Agua destilada	Limpieza de materiales y preparación de agares.
	Cloro	Limpieza de la zona de trabajo

Realizado por: Moyón Lesly, 2020

2.4.4. Microorganismos.

Tabla 4-2: Microorganismos monitores evaluación de la actividad antimicrobiana.

PROCESO	Microorganismo	ATCC
Determinación de la actividad antibacteriana	<i>Escherichia coli</i>	25922
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
	<i>Proteus mirabilis</i>	25933
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2342

Realizado por: Moyón Lesly, 2020

2.5. Selección de la muestra vegetal

Las muestras fueron recolectadas en el mes de noviembre en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo de la ciudad de Riobamba y se utilizó como material vegetal las hojas, corteza, flores masculinas y frutos. En buenas condiciones macroscópicas sin ningún tipo de daño o contaminación de plagas.

2.6. Acondicionamiento y tratamiento del material vegetal

- a) El material vegetal recolectado fue lavado con agua destilada.
- b) Se colocó en la estufa con circulación de aire a 40 °C durante 3 días en el Laboratorio de Bromatología.
- c) Transcurrido el tiempo de secado primero se limpió con alcohol potable el molino, después se trituró en el molino el material vegetal seco para tener un tamaño pequeño de la muestra.

2.7. Preparación de extractos vegetales.

Para la preparación de los extractos alcohólicos y acuosos se tomó en cuenta una relación 1:10 en masa: volumen para lo cual se tomó como solvente agua destilada y alcohol.

- a) Se procedió a pesar en una balanza analítica un peso no mayor a 50 g de las drogas vegetales y se colocaron en los envases ámbar previamente rotulados y estériles
- b) Se puso el solvente (agua, alcohol) en una relación por 10 ml al peso y se cubrió el envase
- c) Se dejó en reposo en un lugar oscuro por dos días y transcurrido el tiempo se filtró al vacío.
- d) Una parte del extracto filtrado se dejó para el tamizaje fitoquímico, y la parte sobrante de los extractos acuosos se colocaron por alícuotas en pequeños envases estériles guardándose en congelación para los procesos siguientes.

2.8. Concentración de los extractos alcohólicos.

La parte sobrante de los extractos alcohólicos se concentraron en el rotavapor a una temperatura no mayor a 40°C y después se colocaron por alícuotas en envases estériles y se guardaron en congelación para los procesos siguientes.

2.9. Tamizaje fitoquímico en extractos alcohólicos.

Para determinar de manera cualitativa los metabolitos secundarios presentes se procedió a realizar un tamizaje fitoquímico de los extractos acuosos y alcohólicos de acuerdo a los ensayos que corresponden a cada caso.

A continuación, se representa de forma esquemática los ensayos utilizados en el tamizaje fitoquímico de Extracto alcohólicos.

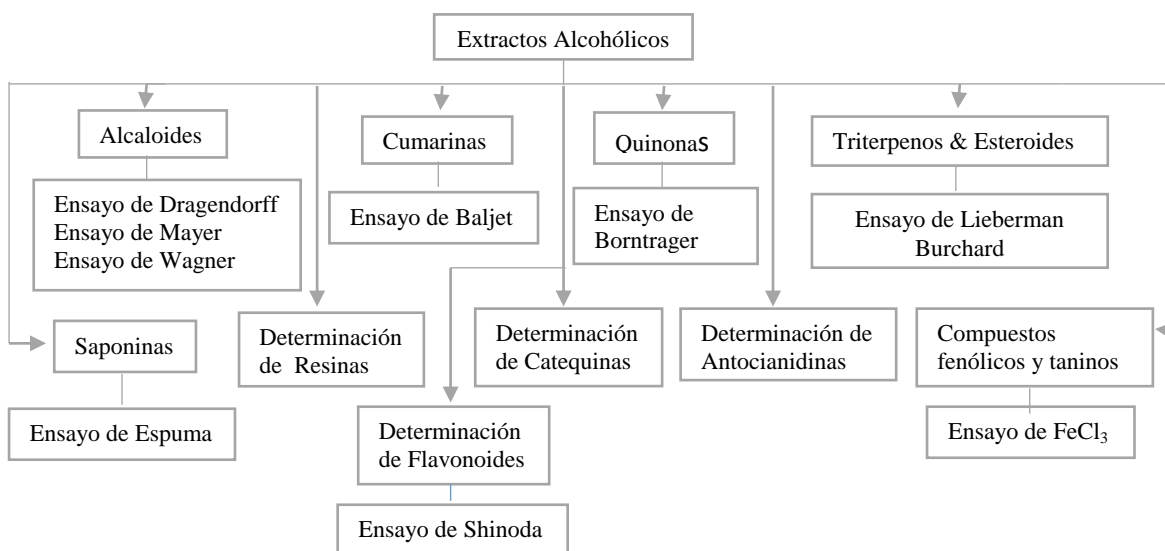


Figura 1-2: Esquema de tamizaje fitoquímico para extractos alcohólicos.

Realizado por: Lesly Moyón, 2020

2.9.1. Determinación de alcaloides.

- *Ensayo de Dragendorff.*

Se tomó unos 2 ml de los extractos alcohólicos y fueron colocados en los tubos previamente rotulados, el solvente fue evaporado en baño maría y el residuo se redisolvió en 1 ml de HCl 1%, en el caso del extracto acuoso se colocó una alícuota y adicióno 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, se calentó suavemente y dejo enfriar hasta acidez, luego se añadió 3 gotas del

reactivo de Dragendorff y los resultados se reportaran de acuerdo a lo siguiente: opalescencia (+), turbidez (++) y formación de precipitado (+++). (Miranda, 2002, pp. 18-22)

- *Ensayo de Mayer*

Se tomó unos 2 ml de los extractos alcohólicos y fueron colocados en los tubos previamente rotulados, el solvente fue evaporado en baño maría y el residuo se redisolvió en 1 ml de HCl 1%, en el caso de los extractos acuosos se procede de la forma descrita en Dragendorff hasta obtener la solución acuosa acida se adiciono una pizca de sal yodada y después de la mezcla se añadió 3 gotas de reactivo de Mayer, los resultados fueron reportados de la misma manera que el ensayo de Dragendorff. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

- *Ensayo de Wagner*

Se tomó unos 2 ml de los extractos alcohólicos y fueron colocados en los tubos previamente rotulados, el solvente fue evaporado en baño maría y el residuo se redisolvió en 1 ml de HCl 1%, en los extractos acuosos se procedió de la misma manera que los casos anteriores hasta obtener la solución acuosa acida y luego se añadió 3 gotas del reactivo de Wagner y los resultados se reportaran de acuerdo a el ensayo de Dragendorff. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

2.9.2. Determinación de quinonas

- *Ensayo de Borntrager.*

Se tomó una alícuota del extracto y se evaporó el solvente en baño maría luego se re disolvió en 1 ml de cloroformo y se adicionó 1 ml de NaOH al 5%, se agitó hasta mezclarlo y se dejó en reposo hasta la separación de sus fases. Si la fase superior se colorea de rosado (++) o rojo (+++) el ensayo se considera positivo. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

2.9.3. Determinación de triterpenos y/o esteroides

- *Ensayo de Lieberman Burchard*

Se tomó una alícuota del extracto y se evaporó el solvente en baño maría luego se re disolvió en 1 ml de cloroformo y se adicionó 1 ml de anhídrido acético y se mezcló. Por el tubo se dejó resbalar 2 o 3 gotas de H₂SO₄ concentrado y para reportar el resultado un ensayo positivo es el

cambio rápido de coloración empieza con un rosado a azul reacción rápida luego verde intenso menos rápido y verde oscuro – negro final de la reacción. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

2.9.4. Determinación de flavonoides.

- *Ensayo de Antocianidinas.*

Se colocó 2 ml de extracto más 1 ml de HCl concentrado y se calentó por 10 minutos. Luego se dejó enfriar y se adicionó 1 ml de agua y 2 ml de alcohol amílico, se agitó y se dejó en reposo hasta separar sus fases. Es positivo si la fase superior presenta una coloración roja a marrón. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

- *Ensayo de Shinoda*

Se colocó 2 ml del extracto y se diluyó con 1 ml de HCl concentrado y colocho un pedazo de cinta de magnesio metálico, se espera 5 min y después de la reacción se añadió 1 ml de alcohol amílico, se mezcla las fases y se deja en reposo hasta separación, se considera positivo cuando la fase amílica se colorea amarillo o naranja, carmelita o rojo intenso. Se procede de la misma manera en el caso de extractos acuosos. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

2.9.5. Determinación de aminoácidos libres o de aminos.

- *Ensayo de Ninhidrina.*

Se tomó unos 2 ml de extracto y se mezcló con ninhidrina al 2%, la mezcla se calentó 10 minutos en baño maría. El ensayo es positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

2.9.6. Determinación de azúcares

- *Ensayo de Benedict*

Se añadió 1 ml de extracto y se colocó 2 ml de reactivo Benedict y se calentó en baño maría por 5 minutos. El ensayo es positivo si presenta un precipitado rojizo, amarillo o verde. Se procede de la misma manera para los extractos acuosos. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

2.9.7. Determinación de compuestos fenólicos y/o taninos

- *Ensayo de Cloruro Férrico.*

Se tomó una alícuota de extracto alcohólico al que se le adiciono 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5%. En los extractos acuosos se tomó una alícuota a la cual se le añadió unas gotas de acetato de sodio y 3 gotas de FeCl₃ al 5%. El ensayo es positivo en tres casos cuando presenta una coloración rojo-vino si hay la presencia de compuestos fenólicos en general, una coloración verde intensa cuando presenta taninos de tipo pirocatecólicos y una coloración azul en caso de taninos tipo pirogalactónico. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

2.9.8. Determinación de grupos lactónicos – cumarinas

- *Ensayo de Baljet*

Se tomó una alícuota de 2 ml de extracto al cual se le adiciono 1 ml de reactivo de Baljet y se considera el ensayo positivo la aparición de coloración (++) o precipitado rojo (+++). (Miranda, 2002, pp. 18-22)

2.9.9. Determinación de Saponinas.

- *Ensayo de Espumas*

Se colocó una alícuota de 2 ml de extracto al cual se le adicionó 10 ml de agua destilada, se agito fuertemente por 5 minutos y se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido y persiste por más de 2 minutos. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

2.9.10. Determinación de resinas

A una alícuota de extracto colocar 10 ml e agua destilada en el caso del ensayo positivo aparece un precipitado. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

2.9.11. Determinación de catequinas.

Con un capilar se tomó el extracto y se aplicó sobre papel filtro, y encima de la mancha se aplicó con otro capilar una solución de carbonato de sodio y se observa a través de la luz UV y el ensayo es positivo si aparece una mancha verde carmelita. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

2.9.12. Determinación de compuestos grasos.

Se coloca una alícuota de extracto se le añadió 1 ml de Suda III o Suda IV, Se calentó en baño maría hasta evaporar el solvente y se considera positivo cuando aparece gotas o una película roja en las paredes del tubo. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

2.10. Tamizaje Fitoquímico en extractos acuosos.

A continuación, se muestra los ensayos de caracterización fitoquímica en extractos acuosos.

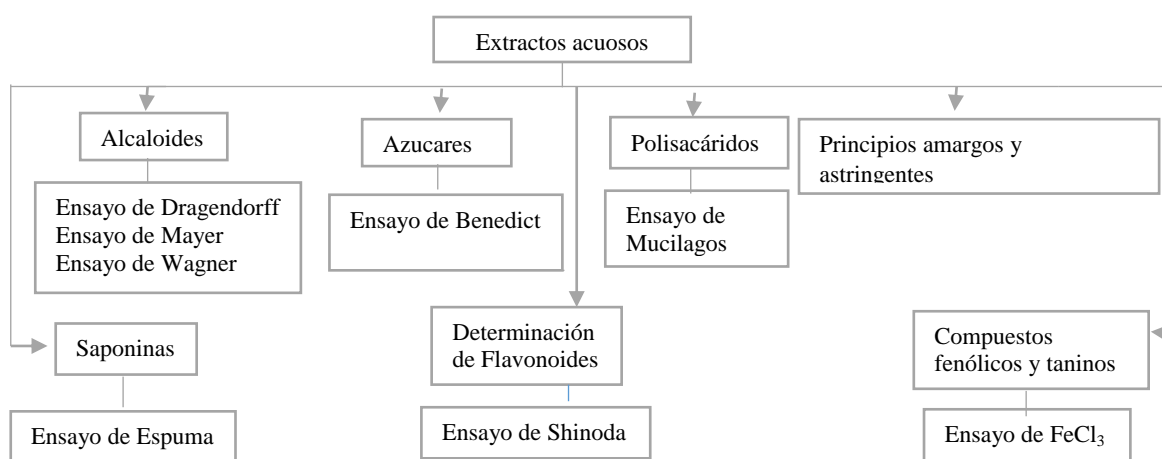


Figura 2-2: Esquema de tamizaje fitoquímico para extractos acuosos.

Realizado por: Lesly Moyón, 2020

2.10.1. Determinación de saponinas

- *Ensayo de espumas*

Se colocó una alícuota de 5 ml de extracto se agito fuertemente por 5 minutos y se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido y persiste por más de 2 minutos. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

2.10.2. Determinación de Polisacáridos

- *Ensayo de Mucilagos*

A una alícuota del extracto se le dejo en refrigeración de 0 – 5 °C y si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

2.10.3. Determinación de principios amargos y astringentes.

Se basa en saborear 1 gota del extracto acuoso y reconocer si es amargo o no. (Miranda, 2002, pp. 18-22)

2.11. Evaluación de la actividad hemoaglutinante

Para determinar la actividad hemoaglutinante se utilizaron tubos de vidrio 5x0.5 cm de fondo redondo, una suspensión de glóbulos rojos al 5 % con solución salina de los distintos grupos sanguíneos A, B y O Rh positivo y se siguió la siguiente metodología:

2.11.1. Preparación de suspensión de glóbulos rojos 5%

- a) Se extrajo una muestra de sangre de cada uno de los grupos sanguíneos en un tubo lila con anticoagulante EDTA.
- b) Se colocó la sangre homogenizada en tubos de vidrio 10x1cm limpios y secos y se añadió 5 ml de solución salina al 0.9 %
- c) Se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos, y se descartó el sobrenadante, se vuelve a colocar la misma cantidad de solución salina al 0.9 % y se mezcló para proceder a centrifugar y sacar el sobrenadante nuevamente. Este proceso se repitió por 4 veces hasta que el sobrenadante quede totalmente translúcido, es decir, que no tenga plasma.
- d) Con el pellet de glóbulos rojos se procedió a medir y preparar una solución al 5 % utilizando como solvente solución salina al 0.9 %, por lo que se hizo los cálculos pertinentes de acuerdo a la cantidad de glóbulos rojos.

2.11.2. Estimación de la potencialidad de la aglutinación de los extractos acuosos.

- a) Los tubos 5x0.5 cm se rotularon y ordenaron en la gradilla de acuerdo al siguiente orden de dilución 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, un blanco y un positivo.
- b) A cada tubo ordenado y rotulado se colocó 200 uL de solución salina.
- c) Al primer tubo (1/2) se adicionó 200 uL del extracto acuoso, se mezcló hasta homogenizarlo y de este tubo se tomó nuevamente 200 uL y se colocó en el tubo dos (1/4), se homogenizo y se tomó 200 uL y se colocó en el tubo tres (1/8), se siguió esa misma secuencia hasta llegar al último tubo (1/512).

d) Se colocó 200 **uL** de la solución de glóbulos rojos al 5 % en cada tubo hasta la última disolución (1/512) y se homogeniza bien.

e) El control negativo se realizó con 200 **uL** de solución salina al 0.9 % y 200 **uL** de solución de glóbulos rojos al 5 %.

f) El control positivo fue realizado con 200 **uL** de solución de glóbulos rojos al 5 % más 200 **uL** de reactivo Anti A, B y D respectivamente para cada tipo de sangre.

g) La gradilla con tubos se dejó reposar en baño maría por 60 minutos a 37 °C, después del tiempo se procedió a la lectura de cada tubo con el criterio de más abajo.

f) Para mejorar la sensibilidad del ensayo de hemoaglutinación se centrifugaron los tubos a 100 rpm por 10 minutos.

g) Se agitó suavemente cada tubo y se evaluó el resultado de acuerdo al siguiente criterio:

3+	Abundante Hemoaglutinación	Se forma una masa compacta no se observan eritrocitos libres
2+	Mediana Aglutinación	Se observa grumos grandes
1+	Leve Aglutinación	Existe flóculos muy pequeños un aspecto de arenilla
0	Ausencia de hemoaglutinación	Cuando al agitar se disuelve rápidamente

h) El ensayo se realizó para cada tipo de sangre y se efectuó por triplicado.

2.12. Determinación de la actividad antibacteriana en los extractos alcohólicos.

Para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos alcohólicos de los distintos órganos del árbol *Juglans neotropica* se toma en cuenta los siguientes procedimientos:

2.12.1. Reactivación de los microorganismos monitores.

a) Los medios de cultivo caldo Müller Hinton y Caldo Nutritivo se prepararon de acuerdo a las especificaciones de cada fabricante en agua destilada, luego de eso se procedió a auto clavar por 30 minutos a 121 °C y 15 psi.

b) Luego de ese tiempo se sacó y dejó en la cámara de flujo laminar por unos minutos hasta que se enfriase y se colocó el agar líquido en tubos previamente esterilizados y rotulados.

c) Se tomó los microorganismos monitores que se encuentran preservados en tubos pico de flauta y caldos refrigerados con un asa de platino previamente flameada y se colocó en los tubos preparados con los medios de cultivo con movimientos suaves y circulares.

d) Se taparon todos los tubos y se procedió a incubar por 24 a 48 horas a 37 °C.

2.12.2. Aislamiento de los microorganismos activados.

a) Se preparó el medio de cultivo Agar Nutritivo de acuerdo a las especificaciones del fabricante se auto clavo por 20 min a 121 °C y 15 psi.

b) Una vez transcurrido el tiempo se sacó y se colocó en la cámara de flujo laminar y se dejó enfriar hasta que el Erlenmeyer soporte la palma de la mano.

c) Se vertió el agar en cajas Petri de vidrio hasta las tres cuartas partes y se dejó enfriar y solidificar en la cámara de flujo laminar por unos 20 minutos.

d) Con un asa flameada y estéril se tomó la muestra de los tubos con los microorganismos activados y se procedió a sembrar en el medio sólido con el método de estriado.

e) Se codificó cada caja Petri, se selló y se colocó en la incubadora de forma invertida por 24 horas.

d) Después del tiempo de incubación observar y en el caso de existir alguna contaminación se vuelve a repetir el procedimiento hasta tener colonias puras.

2.12.3. Preparación del estándar de McFarland.

a) Para preparar el estándar se procedió a realizar una solución de ácido sulfúrico al 0.18 M y una solución de cloruro de bario 0.048 M.

b) Se le añadió 2 ml del H₂SO₄ 0.18 M a 2 ml de la solución de BaCl₂ 0.048 M se agitaron y mezclaron las soluciones.

c) Se tomó una colonia aislada del agar nutritivo con un asa de platino flameada estéril y se colocó en un tubo con 2 ml de solución salina estéril 0.9 % y se mezcló.

d) La mezcla de los microorganismos fue comparada con el patrón de McFarland el cual dio un indicativo de 1.5×10^8 UFC por ml^3 y es usado para determinar la sensibilidad bacteriana.

2.12.4. Preparación del medio de cultivo sólido Agar Müller Hinton

- a) El agar Müller Hinton se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante en agua destilada, luego se autoclavó por 20 min a 15 psi y 121 °C.
- b) Luego del tiempo de esterilización se llevó a la cámara de flujo laminar y se dejó enfriar hasta que en el Erlenmeyer soporte la palma de la mano.
- c) Se colocó el medio en las cajas Petri de vidrio previamente esterilizadas y secas hasta las tres cuartas partes dando un volumen cercano de 20 ml.
- d) Se dejaron reposar en la caja de flujo laminar por unos 15 minutos y se guardaron en refrigeración para el uso posterior.

2.12.5. Determinación de la sensibilidad bacteriana por el método de difusión en discos.

- a) Se colocaron todos los materiales ya codificados dentro de la cámara de flujo laminar para la determinación de la sensibilidad bacteriana.
- b) Con hisopos estériles se tomaron los inóculos bacterianos preparados con el estándar de McFarland y se sembraron en el medio sólido Müller Hinton.
- c) Las placas sembradas se dejaron reposar por 5 minutos, luego de ese tiempo se procedió a colocar los discos de antibiograma en blanco y el disco de antibiótico con una pinza estéril por la superficie del medio.
- d) Sobre cada disco en blanco se colocaron 20 **uL** de los extractos a evaluar.
- e) Se dejaron reposar las cajas por un lapso de 10 minutos y luego se selló e incubó en posición invertida a 37 °C por 24 horas.
- f) Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a determinar el crecimiento bacteriano para lo cual se midió el diámetro de cada halo permitiendo ver el efecto bactericida.

2.12.6. Siembra de Controles positivos y negativos

- a) Como control positivo se empleó el antibiótico de gentamicina para microorganismo Gram positivos y negativos colocándoles un disco en cada caja Petri sembrada.
- b) Como control negativo se usó 20 **uL** de agua destilada y para determinar que el solvente usado no sea el agente bactericida se ocupó etanol potable puro y al 50 %.
- c) De igual manera fueron colocados en los discos en blanco y se observó los halos de inhibición después de 24 horas de incubación.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados del tamizaje fitoquímico

Tabla 1-3: Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólicos de los órganos de *Juglans neotropica* Diels.

Extractos Ensayos	Flores Masculinas	Hojas	Corteza	Fruto
DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES				
<i>Dragendorff</i>	++	++	++	++
<i>Mayer</i>	++	++	++	++
<i>Wagner</i>	++	++	++	+
DETERMINACIÓN DE QUINONAS				
<i>Borntrager</i>	-	-	+	+
DETERMINACIÓN DE TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES				
<i>Lieberman- Buchard</i>	+	+	-	+
DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES				
<i>Antocianinas</i>	+	+	+	+
<i>Shinoda</i>	+	+	+	-
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS GRASOS				
<i>Sudan</i>	++	+	+	-
DETERMINACIÓN DE AMINOACIDOS LIBRES O AMINAS				
<i>Ninhidrina</i>	-	-	-	-
DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES				
<i>Benedict</i>	+	++	+	+
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENOLICOS Y/O TANINOS				
<i>Cloruro Férrico</i>	Azul	Verde intenso	Verde intenso	Azul
DETERMINACIÓN DE GRUPOS LACTONICAS-CUMARINAS				
<i>Baljet</i>	-	-	+	+
DETERMINACIÓN DE SAPONINAS				
<i>Espumas</i>	-	-	-	+
<i>Determinación de Resinas</i>	-	-	-	-
<i>Determinación de Catequinas</i>	+	+	+	-

Realizado por: Lesly Moyón, 2020.

Los extractos alcohólicos de cada uno de los órganos del árbol, fueron evaluados bajo los ensayos correspondientes como se observa en la tabla 1-3. Las hojas evidenciaron la presencia de triterpenos/esteroides, antocianidinas; la corteza quinonas, antocianidinas y cumarinas y el fruto quinonas, triterpenos /esteroides, antocianidinas, cumarinas y saponinas. De igual forma, las flores masculinas, hojas y corteza presentaron catequinas y compuestos grasos; en general todos los extractos mostraron alcaloides, flavonoides, azúcares reductores y taninos de tipo pirogalotánicos y pirocatecólicos.

Los datos que presenta la matriz concuerda con los estudios realizados por Ruiz et al., 2013 (p. 33), el cual mostró que el extracto alcohólico de la corteza de *Juglans neotropica* por cromatografía de capa fina presenta flavonoides. Un estudio de Quiroz, 2013 (p.80) en el que realizó el tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico de las hojas mostró la presencia de flavonoides, azúcares reductores, triterpenos, compuestos fenólicos, catequinas, antocianidinas y alcaloides, concordando con los resultados obtenidos.

Tabla 2-3: Tamizaje fitoquímico de los extractos acuosos de los órganos de *Juglans neotropica* Diels

Extractos Ensayos	Flores Masculinas	Hojas	Corteza	Fruto
DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES				
<i>Dragendorff</i>	+	+	++	++
<i>Mayer</i>	+	+	++	++
<i>Wagner</i>	+	+	++	++
DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES				
<i>Shinoda</i>	+	+	+	+
DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES				
<i>Benedict</i>	+	+	+	+
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y/O TANINOS				
<i>Cloruro Férrico</i>	Azul	Verde intenso	Verde intenso	Verde Intenso
DETERMINACIÓN DE SAPONINAS				
<i>Espumas</i>	-	+	+	++
DETERMINACIÓN DE POLISACÁRIDOS				
<i>Mucílagos</i>	-	-	-	-
<i>Principios amargos astringentes</i>	++	+	+	+

Realizado por: Moyón, Lesly. 2020

Los extractos acuosos fueron evaluados bajo los ensayos pertinentes para este solvente como se observó en la tabla 2-3. En general todos los extractos presentaron alcaloides, flavonoides, azúcares reductores, principios amargos astringentes y taninos del tipo pirogalotánicos y pirocatecólicos. Además, en las hojas, corteza y fruto se evidenciaron saponinas.

Los datos que presenta la matriz concuerda con los estudios realizados por Aranda et al, 2017 (p.22) y por Quiroz, 2013 (p.82) en la cual muestra que el extracto acuoso de las hojas presenta compuestos fenólicos, flavonoides, azúcares reductores y saponinas.

Numerosos estudios químicos y biológicos han demostrado la capacidad antibacteriana que presentan los fenoles especialmente los flavonoides, sin embargo, los requerimientos estructurales para determinar exactamente como se efectúa esta actividad aún no han sido bien definidas, aunque hay un acuerdo de que está relacionada con la cantidad de grupos OH y de los dobles enlaces en las estructuras, (Modak y Torres 2002) los cuales reaccionan químicamente con los sistemas sensitivos de las enzimas y las vuelve catalíticamente inactivas pudiendo determinar que afectan especialmente a las enzimas que aportan en la síntesis de peptidoglucano dando de esta manera una actividad bactericida o bacteriostática. (Saldívar et al. 2003, p.218)

3.2. Resultados de la Actividad hemoaglutinante

Tabla 3-3: Resultados de la actividad Hemoaglutinante de los extractos de *Juglans neotropica* Diels.

Grupo sanguíneo	Extractos	Diluciones								
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
O+	Hojas	3+	2+	2+	2+	1+	0	0	0	0
	Corteza	3+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	0	0
	Flores Masculinas	3+	3+	3+	3+	2+	1+	0	0	0
	Fruto	3+	3+	3+	2+	1+	0	0	0	0
	Control positivo	3+								
	Control negativo	0								
A+	Hojas	3+	3+	3+	2+	1+	0	0	0	0
	Corteza	3+	3+	2+	1+	1+	0	0	0	0
	Flores Masculinas	3+	3+	3+	2+	1+	0	0	0	0
	Fruto	3+	3+	3+	2+	1+	1+	0	0	0
	Control positivo	3+								
	Control negativo	0								
B+	Hojas	3+	3+	3+	2+	2+	1+	1+	0	0
	Corteza	3+	3+	2+	2+	2+	1+	1+	1+	0
	Flores	3+	3+	2+	1+	1+	1+	0	0	0

	Masculinas									
	Fruto	3+	3+	3+	2+	1+	1+	0	0	0
	Control positivo	3+								
	Control negativo	0								

Equivalencia: 3+ Abundante hemoaglutinación, 2+ Mediana hemoaglutinación, 1+ Leve hemoaglutinación, 0 ausencia hemoaglutinación.

Realizado por: Moyón, Lesly. 2020

En la tabla 3-3 se muestra los resultados de la actividad hemoaglutinante de los extractos acuosos sobre los tres grupos sanguíneos. Se utilizó un control positivo y negativo para la evaluación de cada ensayo los cuales fueron el reactivo anti A, B, D y agua destilada correspondientemente; se evidenció que todos los grupos sanguíneos aglutinaron para todos los extractos, mencionando que hubo una menor actividad hemoaglutinante a medida que se bajó la concentración del extracto, es decir, la presencia de metabolitos fue disminuyendo. Estos resultados permiten suponer la posible presencia de aglutinas de tipo lectinas deduciendo que son específicas para un determinado carbohidrato común que esté presente en la membrana de los eritrocitos las cuales se unen reversiblemente y sin alterar la estructura covalente de los ligandos glicosídicos. (Lopez, Fariñas y Amaro, 2011, p.117)

3.2.1. Análisis estadístico de la actividad hemoaglutinante de los extractos con los diferentes grupos sanguíneos.

Tabla 4-3: Matriz de Anova para la actividad hemoaglutinante con respecto a cada factor

Pruebas de efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: Actividad Hemoaglutinante					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	506,000 ^a	107	4,729	7438580903416680000 0000000000,000	,000
Intersección	676,000	1	676,000	1063334849616501400 000000000000,000	,000
Extractos	2,444	3	,815	1281687852923688400 0000000000,000	,000
Grupo Sanguíneo	3,167	2	1,583	2490552532385696000 0000000000,000	,000
Diluciones	445,000	8	55,625	8749704291407719000 0000000000,000	,000
Extractos * Grupo Sanguíneo	15,056	6	2,509	3947016001617146000 0000000000,000	,000
Extractos * Diluciones	10,556	24	,440	6918201478849229000 0000000000,000	,000
Grupo Sanguíneo * Diluciones	11,333	16	,708	1114194553962032500 0000000000,000	,000
Extractos * Grupo Sanguíneo *	18,444	48	,384	6044323397310386500 0000000000,000	,000

Diluciones					
Error	1,373E-27	216	6,357E-30		
Total	1182,000	324			
Total corregido	506,000	323			

a. R al cuadrado = 1,000 (R al cuadrado ajustada = 1,000)

Realizado por: Moyón, Lesly, 2020

Se realizó un análisis de Anova, en la cual se pudo identificar que todos los factores e interacciones presentaron una significancia de $p = 0.000$, rechazando la hipótesis nula y aceptando la hipótesis alternativa ($p < 0.05$), indicando que existe diferencia significativa en la variable respuesta (actividad hemoaglutinante) por efecto de los factores aplicados. Notándose que cada extracto presentó actividad hemoaglutinante frente a cada grupo sanguíneo.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

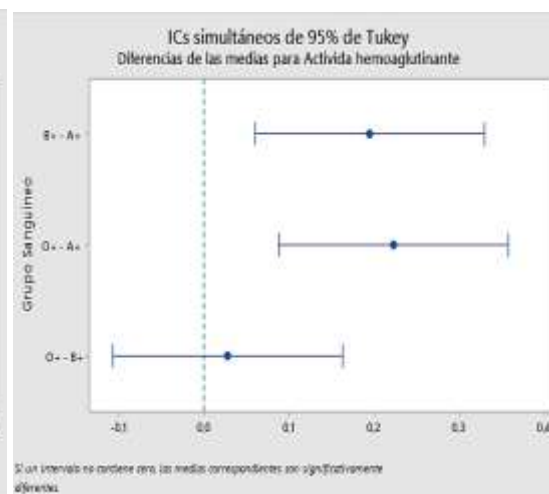
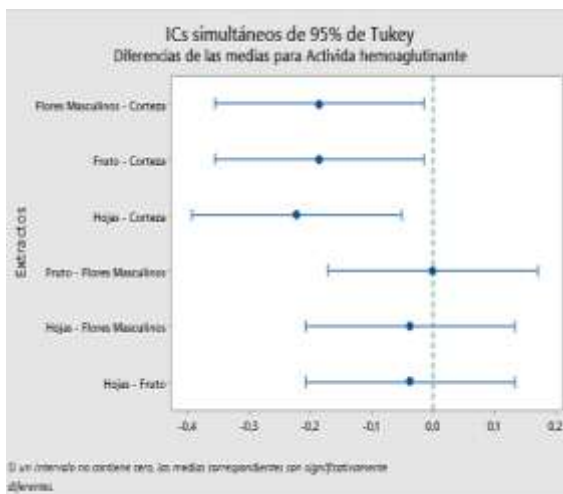
Extractos	N	Media	Agrupación
Corteza	81	1,58299	A
Flores Masculinas	81	1,48741	B
Fruto	81	1,48741	B
Hojas	81	1,37937	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Grupo Sanguíneo	N	Media	Agrupación
O+	108	1,52778	A
B+	108	1,50000	A
A+	108	1,30556	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



a) Actividad de acuerdo a los extractos

b) Actividad de acuerdo a los grupos sanguíneos.

Gráfico 1-3: Gráfica de intervalo de confianza de 95% de Tukey de la Actividad hemoaglutinante

Realizado por: Moyón, Lesly, 2020

Se determinó en qué grupos se produce una diferencia significativa aplicando el método de Tukey con un nivel de confianza del 95%, por lo tanto, para la actividad hemoaglutinante

(Gráfica 1-3 a.), en el extracto de la corteza con relación a las flores masculinas, fruto y hojas se evidenció una mayor diferencia significativa; en el caso del fruto – flores masculinas su significancia fue igual basándonos a que el intervalo contiene cero. De acuerdo a los resultados se mostró que el extracto de la corteza fue el que mayor actividad presentó, mientras que el extracto de las hojas fue el de menor actividad. En cuanto a los grupos sanguíneos (Gráfica 1-3 b.) se mostró que el tipo A+ es significativamente diferente en relación al grupo B y O Rh +, siendo en el que menor actividad hemoaglutinante se observó. En los grupos O+ y B+ presentaron significancias que tienden a ser similares, pero con mayor potencia en el grupo O+.

Estos señalamientos permiten inferir que de ser una lectina el compuesto responsable de la actividad hemaglutinante observada en los extractos acuosos, estas podrían estar reconociendo los azúcares que conforman a la sustancia H de los grupos sanguíneos. Entendiéndose que las lectinas reconocen de manera específica y forman enlaces de tipo puente de hidrógeno o iónico con los carbohidratos fucosa (grupo O), acetyl galactosamina (grupo A) y D - galactosa (grupo B) que conforman las especificidades antigénicas (sustancia H). También se tiene en cuenta que el grupo sanguíneo A tiene varios subtipos y menos sustancia H que el grupo O, siendo la posible causa de la menor actividad que se presentó en grupo sanguíneo A+ (Arbeláez 2009, pp.331-336).

Cabe resaltar que existen otros factores capaces de provocar la aglutinación de los eritrocitos (polifenoles), los cuales están considerados como compuestos pseudoaglutinantes, ya que no provocan hemaglutinación sino una aglomeración, por acercamiento de las células sanguíneas. En este caso los extractos acuosos de la especie en estudio, exhibieron la presencia de fenoles (Tabla 4), lo cual permite reconocer la posibilidad que la actividad hemaglutinante exhibida por los extractos acuosos evaluados, sea producto de la presencia de compuestos fenólicos. (Lopez, Fariñas y Amaro 2011, p.117)

Esta actividad concuerda con estudios realizados por López, L y Rosas; M. 2014; los cuales evaluaron la actividad hemoaglutinante de *Lupinus mutabilis* (chocho) bajo el factor tiempo de cocción dando como resultado una alta capacidad aglutinante a concentraciones altas.

3.3. Resultados de la Actividad Antibacteriana

Tabla 5-3: Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos de *Juglans neotropica* Diels mediante el método de Kirby Bauer.

Microorganismos	Extractos al 100% (mm)				Extractos al 50% (mm)				Control Positivo	Controles negativos		
	H	FM	F	C	H	FM	F	C		H ₂ O Dest	Et 49%	Et 98%
<i>S. aureus</i>	0	11,7	14,0	13,3	0	10,3	12,0	11,3	25,0	0	0	0
<i>P. mirabilis</i>	0	10,7	11,3	11,0	0	8,3	8,7	10,3	19,0	0	0	0

<i>E. coli</i>	0	19,3	11,7	15,3	0	11,0	12,3	13,3	19,0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	7,3	7,7	10,7	11,3	6,7	8,3	0,0	8,3	20,0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	12,7	10,7	9,7	0	11,3	12,0	7,7	13,0	0	0	0

H: Hojas; FM: Flores Masculinas; F: Fruto; C: Corteza; H₂O Dest. = Agua destilada estéril; Et 98%= Etanol potable al 98%, Et 49%: Etanol diluido; mm= milímetros

Realizado por: Moyón, Lesly, 2020

La tabla 5-3 indica las medias de los resultados obtenidos por triplicado de la actividad antibacteriana de los extractos concentrados y diluidos de cada órgano del árbol con respecto a cada microorganismo monitor y fue evaluado mediante el ensayo de Kirby Bauer, en la cual se apreciaron los halos de inhibición y se observaron diferencias importantes.

Se realizó el ensayo con extractos etanólicos concentrados por rotavapor y con extractos diluidos (1/2), observándose de forma macroscópica, que el extracto concentrado tuvo mayor actividad frente a los microorganismos monitores; de igual forma, los extractos de las hojas concentrados y diluidos mostraron pequeños halos frente a *Klebsiella pneumoniae*, y no exponiendo actividad en ninguno de los otros microorganismos. El control positivo utilizado fue la gentamicina siendo un antibiótico de amplio espectro indicado para tratar infecciones producidas por bacterias Gram negativas e infecciones de vías respiratorias producidas por estafilococos, es así que en todos los casos presentaron halos de inhibición grandes. (Ficha Técnica, 2007, p.1) Los controles negativos utilizados en todos los casos no presentaron halos de inhibición demostrando de esa manera que el alcohol no es el responsable de la actividad y comprobando que se debe a los metabolitos presentes en cada órgano del árbol.

Estos resultados concuerdan con Ruiz, J. et al. 2013 (p.35) cuyo estudio demostró que los extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de la corteza de *Juglans neotropica* presentan actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* determinado por el método de concentración mínima inhibitoria y en el mismo estudio lo relacionan a la cantidad de flavonoides y terpenos presentes. Por otro lado, López, A. et al. 2001, (p.195) evidenció que el extracto metanólico de la corteza de *Juglans* tiene actividad para *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium phlei*.

3.3.1. Análisis estadístico de la actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos concentrados y diluidos con los microorganismos monitores.

Tabla 6-3: Anova factorial multivariante de las pruebas de los efectos inter sujetos

Pruebas de efectos inter-sujetos

Origen	Variable dependiente	Tipo III de suma de	gl	Media cuadrática	F	Sig.
--------	----------------------	---------------------	----	------------------	---	------

		<i>cuadrados</i>				
Modelo corregido	V. Resp. Concentrado	3068,213 ^a	24	127,842	141,002	,000
	V. Resp. Diluido	3142,187 ^b	24	130,924	158,376	,000
Intersección	V. Resp. Concentrado	9701,453	1	9701,453	10700,132	,000
	V. Resp. Diluido	7380,480	1	7380,480	8928,000	,000
Microorganismos	V. Resp. Concentrado	158,613	4	39,653	43,735	,000
	V. Resp. Diluido	120,587	4	30,147	36,468	,000
Extracto	V. Resp. Concentrado	2416,747	4	604,187	666,382	,000
	V. Resp. Diluido	2411,653	4	602,913	729,331	,000
microorganismos * Extracto	V. Resp. Concentrado	492,853	16	30,803	33,974	,000
	V. Resp. Diluido	609,947	16	38,122	46,115	,000
Error	V. Resp. Concentrado	45,333	50	,907		
	V. Resp. Diluido	41,333	50	,827		
Total	V. Resp. Concentrado	12815,000	75			
	V. Resp. Diluido	10564,000	75			
Total corregido	V. Resp. Concentrado	3113,547	74			
	V. Resp. Diluido	3183,520	74			

a. R al cuadrado = ,985 (R al cuadrado ajustada = ,978) b. R al cuadrado = ,987 (R al cuadrado ajustada = ,981)

Realizado por: Moyón, Lesly. 2020

Se realizó un análisis de Anova factorial multivariante (MANOVA) presente en la tabla 6-3, de manera que se evidenció que todos los factores y sus interacciones presentaron una significancia de $p = 0.000$, aceptando de esta manera la hipótesis alternativa ($p < 0.05$), lo cual indica que existe diferencias en la actividad antibacteriana por efecto de los extractos. Notándose que los extractos diluidos y concentrados presentaron actividad antibacteriana frente a cada uno de los microorganismos comparado con un control positivo y negativo.

**Método de Tukey y una confianza de 95%
Con respecto a los extractos concentrados.**

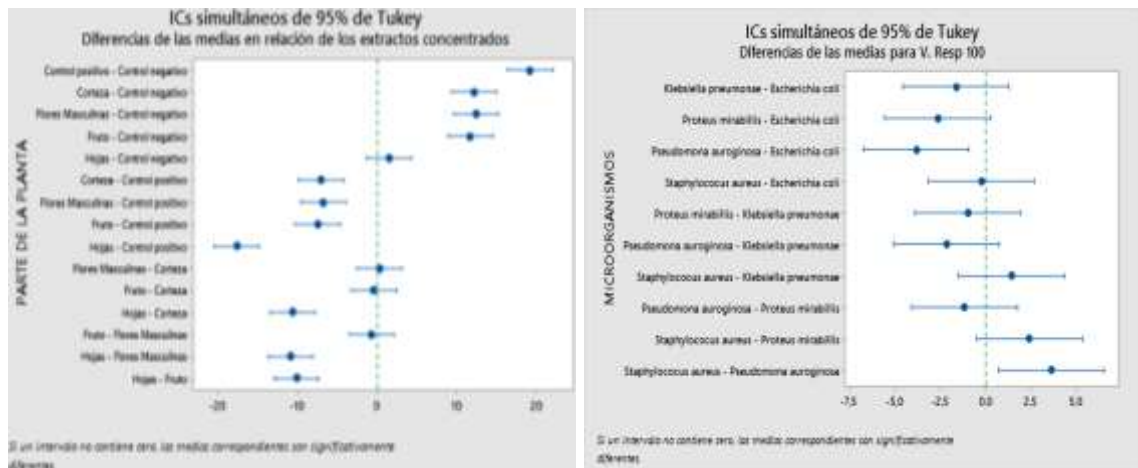
PARTE DE LA PLANTA	N	Media	Agrupación
Control positivo	15	19,2000	A
Flores Masculinas	15	12,4000	B
Corteza	15	12,1333	B
Fruto	15	11,6667	B
Hojas	15	1,4667	C
Control negativo	15	0,0000	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

**Método de Tukey y una confianza de 95%
con respecto al extracto concentrado**

MICROORGANISMOS	N	Media	Agrupación
<i>Escherichia coli</i>	15	13,0667	A
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	12,8000	A
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15	11,4000	A B
<i>Proteus mirabilis</i>	15	10,4000	A B
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	9,2000	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



a) Actividad de los extractos concentrados b) Actividad de los microorganismos con extractos concentrados

Gráfico 2-3: Gráfica de intervalo de confianza de 95% de Tukey de la Actividad Antibacteriana de los extractos concentrados y diluidos.

Realizado por: Moyón, Lesly, 2020

El método de Tukey con un nivel de confianza del 95% determinó en qué grupos de los extractos concentrados se produce una diferencia significativa, de forma que se evidenció que el control positivo y el extracto de hojas son significativamente diferentes frente al resto de extractos. Los extractos de fruto, corteza y flores masculinas tienden a ser significativamente similares, siendo el caso de flores masculinas – corteza semejantes. Observando que el control positivo fue el que mayor actividad demostró al tratarse del antibiótico, sin embargo, los extractos de las flores masculinas y corteza presentaron una media superior significativa evidenciando una actividad antibacteriana considerablemente mayor a los demás extractos.

Con respecto a los microorganismos se evidenció que (Gráfica 2-3 b.) todos son significativamente diferentes, teniendo en cuenta que el microorganismo *E. coli* fue el que tuvo mayor inhibición en su crecimiento y presentó una similar actividad con *S. aureus* y en el caso de *P. aeruginosa* obtuvo una menor inhibición en comparación a los otros microorganismos.

Método de Tukey y una confianza de 95% Con respecto a los extractos diluidos.

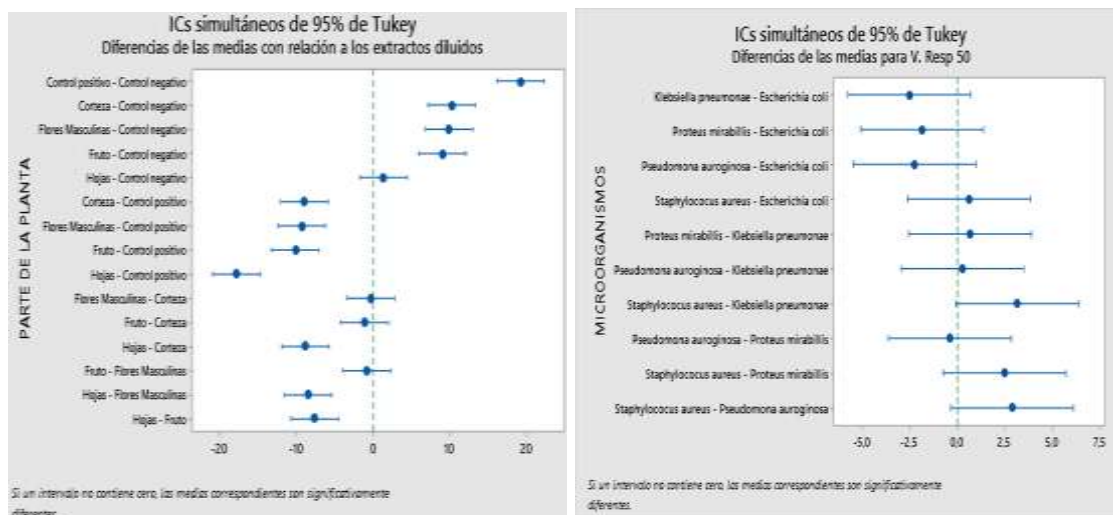
PARTE DE LA PLANTA	N	Media	Agrupación
Control positivo	15	19,2000	A
Corteza	15	10,2000	B
Flores Masculinas	15	9,8667	B
Fruto	15	9,0000	B
Hojas	15	1,3333	C
Control negativo	15	0,0000	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Método de Tukey y una confianza de 95% Con respecto a los extractos diluidos

MICROORGANISMOS	N	Media	Agrupación
Staphylococcus aureus	15	11,7333	A
Escherichia coli	15	11,1333	A
Proteus mirabilis	15	9,2667	A
Pseudomonas aeruginosa	15	8,8667	A
Klebsiella pneumoniae	15	8,6000	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



a) Actividad de los extractos diluidos 1/2 b) Actividad de los microorganismos con extractos diluidos 1/2

Gráfico 3-3: Gráficos de las medias marginales entre los extractos concentrados y microorganismo con respecto a la inhibición del crecimiento bacteriano

Realizado por: Moyón, Lesly, 2020

El método de Tukey con un nivel de confianza del 95% permitió la comparación múltiple de medias de los extractos diluidos (Gráfica 3-3 a), evidenciándose que el control negativo y las hojas tienden a ser significativamente iguales, es decir, no presentan actividad, los casos del fruto, corteza y flores masculinas son significativamente diferentes al control positivo. Observando que el control positivo fue el que mayor actividad demostró al tratarse del antibiótico, y sin embargo los extractos de las flores masculinas y corteza obtuvieron una media superior significativa demostrando una actividad antibacteriana considerablemente mayor a los demás extractos. Esta actividad se la relaciona a la presencia de flavonoides y terpenos presentes tanto en las flores masculinas como la corteza a los cuales se les atribuye esta capacidad. (Kuklinski 2009)

Con respecto a los microorganismos se evidenció que (Gráfica 3-3 b.) todos son significativamente diferentes, teniendo en cuenta que el microorganismo *S. aureus* fue el que tuvo mayor inhibición en su crecimiento y presentó una similar actividad con *E. coli* y en el caso de *K. pneumoniae* obtuvo una menor inhibición en comparación a los otros microorganismos.

Un estudio de Martínez, A. 2011 (p.91) muestra la actividad antibacteriana por el método de Kirby Bauer del extracto metanólico de hoja, tallo y fruto de *Juglans regia* dando como resultado un alto potencial antibacteriano sobre *E. coli* y evidenciándose resistencia frente a *K. pneumoniae* y *S. aureus*. Comparando estos datos con los obtenidos de los extractos etanólicos de *Juglans neotropica* que si presentaron actividad frente a *E. coli* y *S. aureus*.

La situación actual de la resistencia antibacteriana muestran como los antibióticos carbapenémicos ya no son eficaces en más de la mitad de los pacientes con infecciones por *K. pneumoniae* (una bacteria intestinal común que puede causar infecciones potencialmente mortales), las fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación presentan resistencia frente a *E. coli* causantes de infecciones urinarias y la resistencia a los fármacos de primera línea para el tratamiento de las infecciones por *S. aureus* (causante de infecciones graves en los centros sanitarios y en la comunidad). (OMS, 2020)

CONCLUSIONES

Se evaluó la actividad antimicrobiana y hemaglutinante de los extractos obtenidos a partir de los órganos de *Juglans neotropica* Diels teniendo resultados positivos en base a los metabolitos secundarios encontrados que podrían ser de gran utilidad farmacéutica.

A través de la caracterización Fitoquímica de los extractos alcohólicos de *Juglans neotropica* se determinó cualitativamente que las hojas poseen triterpenos, antocianidinas; la corteza quinonas, antocianidinas, cumarinas y el fruto quinonas, triterpenos, antocianidinas, cumarinas y saponinas. De igual forma, las flores masculinas, hojas y corteza presentaron catequinas y compuestos grasos; y en general todos los extractos mostraron alcaloides, flavonoides, azúcares reductores y taninos de tipo pirogalotánicos y pirocatecólicos. Los extractos acuosos en general presentaron alcaloides, flavonoides, azúcares reductores, principios amargos astringentes y taninos del tipo pirogalotánicos y pirocatecólicos. Además, en las hojas, corteza y fruto se evidenciaron saponinas.

Los cuatro extractos acuosos de los órganos del árbol *Juglans neotropica* demostraron tener actividad hemoaglutinante frente a los grupos sanguíneos A, O y B RH + con mayor potencia sobre O y con menor potencia en A RH +, notándose que el extracto de la corteza fue el que mayor actividad presentó y el de menor actividad fue el extracto de las hojas; evidenciándose, que de ser una aglutinina de tipo lectina, uno de los compuestos responsable de esta actividad, podría estar reconociendo los carbohidratos de la membrana de los eritrocitos.

Se demostró que los extractos alcohólicos del árbol *Juglans neotropica* tanto concentrados como diluidos ($\frac{1}{2}$) presentaron efecto antibacteriano *in vitro* contra las bacterias monitores; teniendo en cuenta que hubo mayor actividad en los extractos concentrados. Evaluando que las flores masculinas y corteza obtuvieron medias similares al control positivo, presentando una mayor potencia inhibitoria frente a *E. coli* y *S. aureus* y con una menor inhibición en *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*.

RECOMENDACIONES

Realizar una cuantificación, purificación y aislamiento para la identificación de los principios activos, esencialmente en las flores masculinas, corteza y fruto ya que presentaron mayor actividad y no existen estudios.

Se recomienda realizar estudios más profundos para la identificación y caracterización de posibles lectinas que pueden encontrarse en los órganos de *Juglans neotropica* y podrían ser utilizados terapéuticamente.

Se recomienda el uso de bacterias y hongos de interés clínico e incluso probar con virus para obtener posibles principios activos útiles en la industria farmacéutica.

BIBLIOGRAFIA

ALBÁN, G. "Extracción mecánica y nanoencapsulación del aceite de *Juglans neotropica* mediante spray drying". Infoplc.Net [en línea], 2015, pp. 2-145. [Consulta: 16 enero 2020] Disponible en: http://www.infoplc.net/files/descargas/schneider/infoplc_net_18t00436.pdf.

ALÓS, J., "Resistencia bacteriana a los antibióticos : una crisis global" Antibiotic resistance : A global crisis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [en línea], 2015, vol. 33(10), pp. 692-699. ISSN 0213-005X. DOI 10.1016/j.eimc.2014.10.004. [Consulta: 16 enero 2020], Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>.

ARBELÁEZ, C. *Sistema de grupo sanguíneo ABO*. Programa de Educación Médica Continua Certificada Universidad de Antioquia, Edimeco, vol. 15(3), 2009, pp. 329-347. ISSN 00347264.

AZUERO, A., et al, "Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador". *Ciencia Unemi*, vol. 9, no. 20, 2016. pp. 11-18. ISSN 1390-4272. DOI 10.29076/issn.2528-7737vol9iss20.2016.

CDC, C. "Para el control y la prevención de enfermedades, preguntas y respuestas sobre la resistencia a los antibióticos", Community Antibiotic Use. [en línea]. 2015, p.1, [Consulta: 9 junio 2020]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/community/sp/about/antibiotic-resistance-faqs.html>.

CEPEDA, M., "Inhibición de la actividad hemaglutinante de algunas macroalgas marinas de las costas de México". *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, [en línea], 2017, México, vol. 6, pp. 5-9. [Consulta: 09 febrero 2020]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/314313334_Inhibicion_de_la_actividad_hemaglutinante_de_algunas_macroalgas_marinas_de_las_costas_de_Mexico.

COYLE, M., et al, *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana* [en línea]. 2016, S.l.: s.n. [Consulta: 10 marzo 2020]. ISBN 155581347X. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>.

ECUADORFORESTAL, *Ficha tecnica nogal*. [en línea]. 2010. S.l.: s.n. [Consulta: 20 marzo 2020]. Disponible en: <http://ecuadorforestal.org/wp-content/uploads/2010/08/NOGAL.pdf>.

FICHA_TÉCNICA, 2007. Gentamicina. [en línea], pp. 2007. [Consulta: 15 julio 2020]. Disponible en: <https://www.normon.es/files/ES-Gentamicina.pdf>.

GRAU, S. ALVAREZ, F. CAMPANY, D, 2012. "Principios Generales para el Uso Racional de los Antibióticos". Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. [en línea], pp. 166-172. [Consulta: 5 junio 2020]. Disponible en: <https://www.sefh.es/bibliotecavirtual/fhtomo1/cap1315.pdf>.

HERNÁNDEZ, et L., "Las Lectinas Vegetales Como Modelo de estudio de las interacciones proteina-carbohidrato. Redalyc Red [en línea], 2005. vol. 24, pp. 21-27. [Consulta: 20 marzo 2020]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/490/49024104.pdf>.

IPK, DIAGNÓSTICO Y LA CARACTERIZACIÓN Instituto de Medicina Tropical “ Pedro Kourí ”. [en línea], 2013. [Consulta: 20 marzo 2020]. Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/2013-cha-tecnicas-laboratorio-dengue-IPK.pdf>.

KUKLINSKI, C., *Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. 2009. Ediciones. S.l.: s.n.

LOPEZ, L., FARIÑAS, M. y AMARO, M.E., "Evaluación de la Actividad Hemaglutinante y Hemolítica de las Esponjas Marinas *Niphates erecta* (Duchassaing y Michelotti, 1864) Y *Callyspongia vaginalis*". *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*, 2011. vol. 23, no. 2, pp. 113-119. ISSN 1315-0162.

MALLIKARJUNA, A., et al, Molecular phylogeny of Juglans (Juglandaceae): A biogeographic perspective. *Tree Genetics and Genomes*, 2007. vol. 3, no. 4, pp. 363-378. ISSN 16142942. DOI 10.1007/s11295-006-0078-5.

MARTINEZ, A., Actividad biológica de *Azadirachta indica*, *Juglans regia*, *Tecoma stans*, *Magnolia grandiflora* y su aplicación en formulaciones a base de biopolímeros. [en línea], 2011. vol. 52, no. 81, pp. 83. [Consulta: 13 junio 2020]. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/16684/1/1080290316.pdf>.

MATEOS, P.F., Agentes antimicrobianos y microorganismos. [en línea], pp. 1-9. 2014. [Consulta: 20 marzo 2020]. Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/a3-agentes_antimicrobianos_y_microorganismos.pdf.

MENDOZA, W., Glucoproteínas de defensa vegetal: Lectinas. [en línea]. 2008. [Consulta: 9 junio 2019]. Disponible en: <https://es.slideshare.net/wermen/lectins-16819879>.

MODAK, B. y TORRES, R., "Flavonoides Aislados Del Exudado Resinoso De *Heliotropium Sinuatum*". *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* [en línea], 2002, vol. 47, pp. 19-23. [Consulta: 18 agosto 2020]. DOI 10.4067/S0366-16442002000100005. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-16442002000100005&lng=es&nrm=iso&tlng=es.

OMS, El primer informe mundial de la OMS sobre la resistencia a los antibióticos pone de manifiesto una grave amenaza para la salud pública en todo el mundo. *WHO* [en línea], 2014, [Consulta: 16 julio 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>.

OMS, Los microorganismos y los antimicrobianos. *WHO* [en línea], 2016. [Consulta: 16 mayo 2019]. Disponible en: https://www.who.int/drugresistance/Microbes_and_Antimicrobials/es/.

OMS, Resistencia a los antibióticos. [en línea]. 2018. [Consulta: 9 junio 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>.

PACIEL, D.D., et al, Enterobacterias productoras de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa). *Revista de infectología*, [en línea], 2011. vol. 2011. [Consulta: 20 marzo 2020]. Disponible en: http://www.infectologia.edu.uy/images/stories/pdf/publicaciones/biomedicas/tendencias/KPC_pacieletal.pdf.

PAREDES, F. y ROCA, J.J., "Acción de los antibióticos". *Revista de la oficina de Farmacia (OFFARM)* [en línea], 2014. vol. 23, no. 3, pp. 116-124. [Consulta: 12 abril 2020]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-accion-antibioticos-perspectiva-medicacion-antimicrobiana-13059414>.

PAZ ZARZA, V.M., et al, "Pseudomonas aeruginosa: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria". *Revista chilena de infectología* [en línea], 2019. vol. 36, no. 2, pp. 180-189. ISSN 0716-1018. DOI 10.4067/s0716-10182019000200180. [Consulta: 23 junio 2020]. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182019000200180.

PERMATREE, Juglans neotropica planta medicinal de Ecuador, [en línea]. 2016. [Consulta: 11 junio 2019]. Disponible en: <https://permatree.wordpress.com/2016/06/19/juglans-neotropica/>.

RAMIREZ, L. y MARIN, D., "Methodologies for evaluating the In vitro antibacterial activity of natural compounds of plant origin". *Scientia et Technica* [en línea], 2009. no. 42, pp. 263-268. ISSN 0122-1701. DOI 10.22517/23447214.2687. [Consulta: 18 junio 2020]. Disponible en:

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>.

RAVE, S., MONTENEGRO, M. y MOLINA, L., Caida y descomposición de hojarasca Juglans. 2013. , vol. 35, no. 98, pp. 33-43.

REYES, B. y GALLEGOS, R., "Lectinas Vegetales : Una Alternativa Terapéutica para el Cáncer". *Desarrollo Científico Enfermería* [en línea], 2011. vol. 19, pp. 179-182. [Consulta: 23 junio 2020]. Disponible en: <http://www.index-f.com/dce/19pdf/19-179.pdf>.

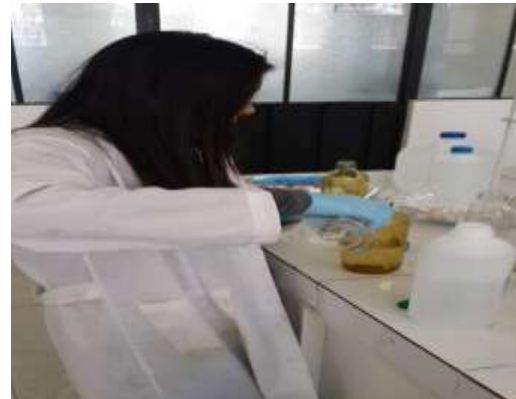
SALDÍVAR, L., et al., Estado Actual del Conocimiento sobre las Propiedades Biocidas de la Gobernadora. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 2003. vol. 21, no. 2, pp. 214-222. ISSN 2007-8080.

VANEGAS, E. y ROLDÁN, I., State of the art, propagation and conservation of juglans neotropica diels., in andean zones. *Madera Bosques* [en línea], 2018. vol. 24, no. 1, pp. 1-15. ISSN 14050471. DOI 10.21829/myb.2018.2411560. [Consulta: 20 marzo 2020]. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/mb/v24n1/1405-0471-mb-24-01-e2411560.pdf>.

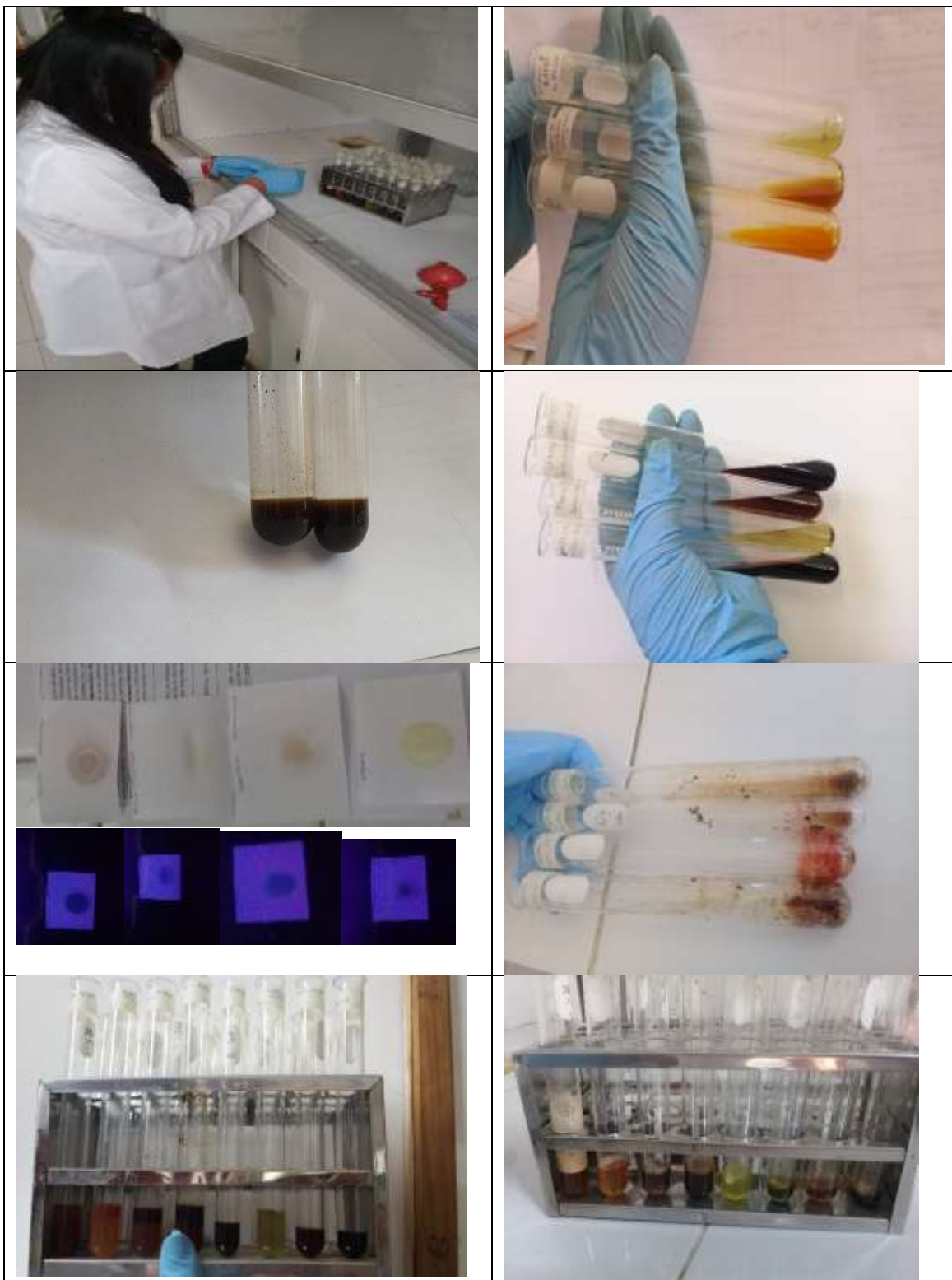
ANEXO A: Actividades para la obtención de los órganos de *Juglans neotropica* Diels



ANEXO B: Actividades para la obtención de los extractos alcohólico y acuoso de los órganos de *Juglans neotropica* Diels



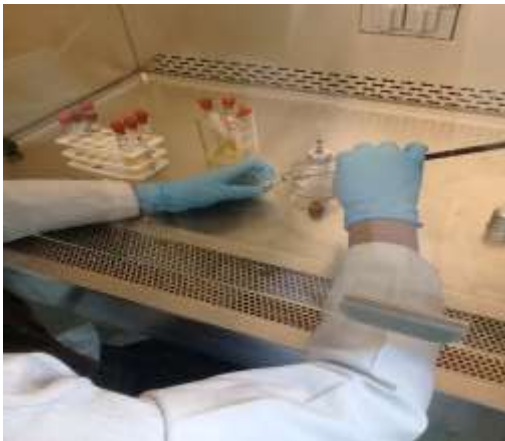
ANEXO C: Caracterización fitoquímica de los extractos alcohólico y acuoso de los órganos de Junglas neotropica Diels



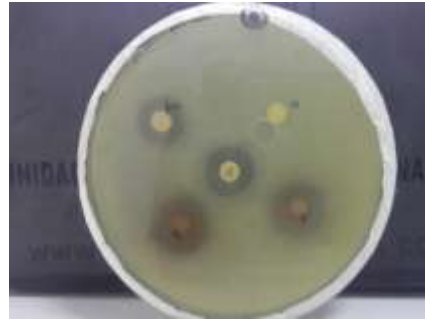
ANEXO D Actividad Hemoaglutinante



ANEXO E: Actividad Antibacteriana.









ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS PARA EL
APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN



UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 26 / 10 / 2020

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres - Apellidos: Lesly Katherine Moyón Rivera
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímica Farmacéutica
E. Analista de Biblioteca responsable: Lic. Luis Caminos Vargas Mgs.



LUIS ALBERTO
CAMINOS
VARGAS



0301-DBRAI-UPT-2020