

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

MENCIÓN: BIOTECNOLOGÍA

TESIS:

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE PAPAÍNA, DETERMINACIÓN DEL SEXO Y METODOLOGÍA PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE TRES ESPECIES DE Carica.

Para optar el Grado Académico de

MAESTRO EN CIENCIAS

Presentada por:

Bachiller: BERTHA CECILIA GARCÍA CIENFUEGOS

Asesor:

Dr. BERARDO ESCALANTE ZUMAETA

Cajamarca - Perú

2019

COPYRIGHT © 2019 by
BERTHA CECILIA GARCÍA CIENFUEGOS
Todos los derechos reservados

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

ESCUELA DE POSGRADO



UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

MENCIÓN: BIOTECNOLOGÍA

TESIS:

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE PAPAÍNA, DETERMINACIÓN DEL SEXO Y METODOLOGÍA PARA LA PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE TRES ESPECIES DE *Carica*.

Para optar el Grado Académico de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presentada por:

Bachiller: BERTHA CECILIA GARCÍA CIENFUEGOS

JURADO EVALUADOR

Dr. Berardo Escalante Zumaeta
Asesor

Dr. Juan Chávez Rabanal
Jurado Evaluador

Dra. Consuelo Plasencia Alvarado
Jurado Evaluador

Dr. Marcial Mendo Velásquez
Jurado Evaluador

Cajamarca - Perú

2019



Universidad Nacional de Cajamarca
LICENCIADA CON RESOLUCIÓN DE CONSEJO DIRECTIVO N° 080-2018-SUNEDU/CD
Escuela de Posgrado
CAJAMARCA - PERU



PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS

ACTA DE SUSTENTACIÓN PÚBLICA DE TESIS

Siendo las ...¹⁵... horas del día 03 de octubre de dos mil diecinueve, reunidos en el Auditorio de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, los integrantes del Jurado Evaluador presidido por el **Dr. JUAN EDMUNDO CHÁVEZ RABANAL** y **Dra. CONSUELO BELANIA PLASENCIA ALVARADO**, **Dr. MARCIAL HIDELSO MENDO VELÁSQUEZ**, en calidad de Asesor el **Dr. SEGUNDO BERARDO ESCALANTE ZUMAETA**; actuando de conformidad con el Reglamento Interno y el Reglamento de Tesis de Maestría de la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, se dio inicio a la **SUSTENTACIÓN PÚBLICA** de la tesis titulada **EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE PAPAÍNA, DETERMINACIÓN DEL SEXO Y METODOLOGÍA PARA LA PROPAGACIÓN IN VITRO DE TRES ESPECIES DE Carica.**, presentada por la Bach. Agronomía **BERTHA CECILIA GARCÍA CIENFUEGOS**.

Realizada la exposición de la Tesis y absueltas las preguntas formuladas por el Jurado Evaluador, y luego de la deliberación, se acordó..... **APROBAR**..... la mencionada Tesis con la calificación de **EXCELENTE (18)**.....; en tal virtud la Bach. Agronomía **BERTHA CECILIA GARCÍA CIENFUEGOS**, está apta para recibir en ceremonia especial el Diploma que la acredita como **MAESTRO EN CIENCIAS**, en la Unidad de Posgrado de la Facultad de **Ciencias de la Salud**, con Mención en **BIOTECNOLOGÍA**.

Siendo las ^{16:30}... horas del mismo día, se dio por concluido el acto.

Dr. Segundo Berardo Escalante Zumaeta
Asesor

Dr. Juan Edmundo Chávez Rabanal
Jurado Evaluador

Dra. Consuelo Belania Plasencia Alvarado
Jurado Evaluador

Dr. Marcial Hidelso Mendo Velásquez
Jurado Evaluador

DEDICATORIA

A Dios, Ser Supremo que guía mi camino en todo momento y me colma de bendiciones.

A la memoria de mis padres Eloy y Elena (††), gracias por darme la vida, los mejores ejemplos y enseñanzas.

A mis hermanos, gracias por brindarme vuestro cariño y apoyo.

A Félix Enrique, mi esposo y principal motor de mi vida; a mis hijos Merelyn Viviana, Félix David y Eliana Antonela; con su grata presencia, me cambiaron la vida y constituyen la principal fuente de inspiración.

AGRADECIMIENTO

A la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de Cajamarca, por abrirme sus puertas, a su Director y staff de docentes que le acompañan en el cometido de generar ciencia.

A los Doctores del Comité Científico: Berardo Escalante Zumaeta, Juan Chávez Rabanal, Consuelo Plasencia Alvarado, Marcial Mendo Velásquez, por el bagaje y rigor científico que siempre me inculcaron y por su alta predisposición para conmigo.

A mi asesor, Dr. Berardo Escalante Zumaeta, distinguido profesional investigador que, con sus grandes virtudes de Maestro, ha sabido guiarme en todo momento. Gracias por sus enseñanzas y orientaciones recibidas, especialmente en el desarrollo y aporte científico de la presente investigación.

A la Universidad Nacional de Tumbes, autoridades y colegas por permitirme articular entornos de la actividad investigativa, gracias por el apoyo logístico para la realización del presente trabajo.

Mi profundo agradecimiento y reconocimiento a las personas que me han acompañado de diferentes formas, en este proceso; con el cariño de siempre a mis compañeros de Promoción Maestría en Recursos Naturales, Línea Biotecnología.

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1. Problema de investigación	3
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Formulación del problema	4
1.3. Justificación de la investigación	5
2. Objetivos de la investigación	6
3. Hipótesis	7
4. Diseño de contrastación de las hipótesis	8
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	9
2.1. Caracterización biosistemática <i>Carica</i> sp	9
2.2. Contenido de papaína	17
2.3. Contenido de fenoles totales en <i>Carica papaya</i>	26
2.4. Propagación <i>in vitro</i> de las tres Caricáceas en estudio	35

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	51
3.1. Ubicación del experimento	51
3.2. Materiales	51
3.3. Evaluación del contenido de papaína	53
3.4. Determinación del sexo en <i>Carica papaya</i>	56
3.5. Metodología para la propagación <i>in vitro</i>	57
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
4.1. Evaluación del contenido de papaína	60
4.1.1 Caracterización del látex	60
4.2. Contenido de fenoles totales en <i>Carica papaya</i>	69
4.3. Propagación <i>in vitro</i> de las tres especies de <i>Carica</i> en estudio	72
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	79
Conclusiones	79
Recomendaciones	81
CAPÍTULO VI: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
APÉNDICE	92

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Formas florales descritas para <i>Carica pubescens</i>	13
Tabla 2. Análisis de látex fresco de <i>Carica papaya</i> L	21
Tabla 3. Categorías de fruto establecidas para extracción de látex	54
Tabla 4. Medios de cultivo para Caricáceas en estudio	59
Tabla 5. Determinación contenido látex líquido y seco de <i>C. papaya</i> L.	60
Tabla 6. Determinación contenido látex líquido y seco de <i>C. pubescens</i>	62
Tabla 7. Determinación contenido látex líquido y seco de <i>C. pentagona</i>	64
Tabla 8. Contenido de látex líquido (g) en las tres Caricáceas	65
Tabla 9. Análisis de varianza para látex líquido	65
Tabla 10. Resultados prueba Duncan 5% contenido de látex líquido	66
Tabla 11. Contenido de látex líquido (g) en las tres Caricáceas	66
Tabla 12. Análisis de varianza para látex seco	66
Tabla 13. Resultados prueba Duncan 5% contenido de látex seco	67
Tabla 14. Determinación contenido papaína cruda y pura de <i>C. papaya</i> L	67
Tabla 15. Determinación contenido papaína cruda y pura de <i>C. pubescens</i>	67
Tabla 16. Determinación contenido papaína cruda y pura de <i>C. pentagona</i>	68
Tabla 17. Absorbancia en ratios fenoles totales en hojas de <i>C. papaya</i> L	71
Tabla 18. Respuesta de los explantas (y. apicales, y. axilares) <i>C. papaya</i>	72
Tabla 19. Respuesta explantas combinación factores crecimiento <i>C. papaya</i>	73
Tabla 20. Respuesta de los explantas (y. apicales, y. axilares) <i>C. pubescens</i>	74
Tabla 21. Respuesta explantas combinación factores crecimiento <i>C. pubescens</i>	75
Tabla 22. Respuesta de los explantas (y. apicales, y. axilares) <i>C. pentagona</i>	76
Tabla 23. Respuesta explantas combinación factor crecimiento <i>C. pentagona</i>	77

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura propuesta para la papaína	19
Figura 2. Proceso obtención de papaína	93
Figura 3. Flores masculinas, femeninas y hermafroditas de <i>C. papaya</i>	27
Figura 4. Contenido látex líquido y seco en <i>Carica papaya</i>	62
Figura 5. Contenido látex líquido y seco en <i>Carica pubescens</i>	63
Figura 6. Contenido látex líquido y seco en <i>Carica pentagona</i>	65
Figura 7. Constancia de identificación de especies vegetales	94
Figura 8. Incisiones fruto inmaduro de <i>C. papaya</i>	96
Figura 9. Frutos inmaduros de <i>C. pubescens</i>	96
Figura 10. Frutos inmaduros de <i>C. pentagona</i>	96
Figura 11. Acondicionamiento muestras papaína cruda para centrifuga	97
Figura 12. Acondicionamiento muestras para determinación de fenoles	97
Figura 13. Preparación extracto hojas frescas	97
Figura 14. Peso de las muestras	98
Figura 15. Filtrado de las muestras	98
Figura 16. Determinación de la absorbancia. Espectrofotómetro	98
Figura 17. Acondicionamiento en vivero para selección plantas madres	99
Figura 18. Medios de cultivo para propagación <i>in vitro</i>	99
Figura 19. Equipos: autoclave y cámara flujo laminar	99
Figura 20. Siembra de explantas	100

RESUMEN

En la presente investigación se determinó el contenido de papaína, técnica de micropropagación *in vitro* de *C. papaya*, *C. pubescens*, *C. pentagona*, y contenido de fenoles totales en plantas de *C. papaya* como indicador del sexo. La fase experimental se desarrolló en los Laboratorios de Química y Cultivo de Tejidos Vegetales de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Tumbes. Para evaluar contenido de papaína, el látex fue extraído a partir de 12 frutos inmaduros de cada una de las especies en estudio, se siguió la metodología de Calzada 1987, se obtuvo papaína cruda y papaína pura. Mediante metodología fotoquímica se determinó el contenido de fenoles totales en *C. papaya*, como indicador del sexo, se siguió el método de Cejudo, 1978, citado por Bernal, 1988, se utilizó extractos de hojas en estado fresco, adicionándole un agente cromogénico hasta la formación del complejo Azul de Prusia, se leyó absorbancia a 254 y 275 nm; luego se desarrolló la propagación *in vitro* de las especies en estudio, se probó dos tipos de explanta, yemas apicales y yemas axilares; y dos combinaciones de reguladores de crecimiento. Como resultado se obtuvo 16,50 g de papaína pura de *C. papaya*; 13,40 y 8,90 para *C. pubescens* y *C. pentagona*, respectivamente; si bien difieren cuantitativamente en el contenido de este metabolito secundario, ambas son buenas portadoras. Hubo una marcada diferencia en cuanto a la proporción y cantidad de fenoles totales en los tejidos analizados de *C. papaya*, 1,20 µg para hojas de plantas femeninas y 2,11 µg para hojas de plantas masculinas. El factor más importante para las respuestas morfogénicas fue el tipo de explanta. Para *C. papaya* se obtuvo 77% de plantas enraizadas, en tanto que 68% y 65% para *C. pubescens* y *C. pentagona*, respectivamente. La combinación Ácido naftaleno acético (ANA) y Benzil amino purina (BAP) a 0,1 y 0,2 mg/L favoreció la formación de callo blanquecino y rizogénesis. Finalmente, en *C. pentagona*, la mejor proliferación de yemas se obtuvo a los 40 días, en un medio Murashige y Skoog (1962), suplementado con vitaminas Schenck-Hildebrandt, ANA y BAP a 0,2 y 0,5 mg/L.

Palabras clave: *C. papaya*, *C. pubescens*, *C. pentagona*, papaína, fenoles, propagación *in vitro*.

ABSTRACT

In the present investigation, the content of papain, *in vitro* micropropagation technique of *C. papaya*, *C. pubescens*, *C. pentagona*, and total phenolic content in *C. papaya* plants as an indicator of sex was determined. The experimental phase was developed in the Laboratories of Chemistry and Cultivation of Vegetable Tissues of the Faculty of Agricultural Sciences, National University of Tumbes. To evaluate papain content, the latex was extracted from 12 immature fruits of each of the species under study, it followed the Calzada 1987 methodology, raw papain and pure papain were obtained. The content of total phenols in *C. papaya*, as an indicator of sex, was determined by photochemical methodology, it followed the method of Cejudo, 1978, cited by Bernal, 1988, it was used fresh leaf extracts, adding a chromogenic agent until the formation of the Prussian Blue complex, absorbance was read at 254 and 275 nm; then the *in vitro* propagation of the species under study was developed, it was tested two types of explant, apical buds and axillary buds; and two combinations of growth regulators. As a result, 16,50 g of pure papain from *C. papaya* was obtained; 13,40 and 8,90 for *C. pubescens* and *C. pentagona*, respectively; Although they differ quantitatively in the content of this secondary metabolite, both are good carriers. There was a marked difference in the proportion and amount of total phenols in the analyzed tissues of *C. papaya*, 1,20 µg for leaves of female plants and 2,11 µg for leaves of male plants. The most important factor for morphogenic responses was the type of explant. For *C. papaya* 77% of rooted plants were obtained, while 68% and 65% for *C. pubescens* and *C. pentagona*, respectively. The combination Naphthalene acetic acid (ANA) and Benzyl amino purine (BAP) at 0,1 and 0,2 mg/L favored the formation of whitish callus and rhizogenesis. Finally, in *C. pentagona*, the best buds proliferation was obtained at 40 days, in a Murashige and Skoog medium (1962), supplemented with vitamins Schenck-Hildebrandt, ANA and BAP at 0,2 and 0,5 mg/L.

Keywords: *C. papaya*, *C. pubescens*, *C. pentagona*, papain, phenol, *in vitro* propagation

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

En Perú, país megadiverso, los frutales constituyen cultivos de gran importancia. Dentro de éstos, las Caricáceas, *Carica papaya*, *Caricapubescens* y *Caricapentagona*, particularmente la papaya (*C. papaya* L.), por su alto contenido de proteínas y vitaminas, es una de las especies cultivadas de gran interés para la alimentación humana. Sin embargo, la revalorización de frutas nativas, poco conocidas fuera de sus regiones de origen, caso específico *C. pubescens* y *C. pentagona*, es un reto técnica, económica y socialmente importante, pues representan fuentes alternativas de vitaminas, azúcares, pectinas, antioxidantes y fundamentalmente enzimas, entre las que destaca la papaína, la cual se ha convertido en la proteasa de origen vegetal de mayor uso.

No obstante, la papaína que caracteriza a las especies de *Carica*, dispone de un elevado potencial comercial, escasos son los estudios realizados sobre sus propiedades, Por tanto, una vez superada esta brecha cognitiva, es posible fortalecer la diversificación de la producción nacional, con la consecuente generación de divisas para el Perú (Carbajal y Remuzgo, 2010).

La producción comercial a nivel mundial de *C. papaya* L., es de 13 millones de toneladas, siendo Latinoamérica el sector geográfico que aporta con el 50% de esta producción (FAOSTAT, 2017). Por lo general, las áreas cultivadas con *C. papaya* L. se instalan con semilla botánica, lo que tiene como desventaja la heterogeneidad de las plantas producidas (Khuspe and Hender, 1980; Giacometti y Torres, 1997). Asimismo, *C. papaya* L. presenta tres tipos de plantas, sexualmente distintas: femeninas, masculinas y hermafroditas, de las cuales, los machos son improductivos, las femeninas son

productoras continuas y las hermafroditas pueden ser productoras continuas y temporales (Chaverri, 1986; Mora y Bogantes, 2004).

Diferentes estudios morfológicos, citológicos, isoenzimáticos y de contenido de fenoles han sido conducidos para el establecimiento de un sistema temprano de determinación del sexo en plantas de papaya (Magdalita y Mercado, 2003). Hoy se confía que la diversidad sexual de la papaya está asociada al contenido de fenoles. Desde ésta perspectiva, no es posible cambiar el sexo del papayo, como algunos agricultores creen, con el abonamiento, descopado (eliminación de la copa), corte de raíces o con el cambio de luna. Además, tampoco es posible conocer el sexo de la planta sino hasta la floración. En consecuencia, la determinación del sexo de plantas de papaya en etapas tempranas de su desarrollo, permitiría el ahorro de recursos y facilitaría el inicio de un programa de clonaje *in vitro* tendiente a la producción masiva de plantas hermafroditas selectas.

Aun cuando desde el punto de vista comercial, el uso de semilla sexual es el más generalizado para la propagación de *C. papaya* y *C. pubescens*, es necesario considerar que especies como *C. pentagona* presentan frutos partenocárpicos, fenómeno que obliga a propagarla vegetativamente a través de estacas o injertos. Sin embargo, las primeras son de lento desarrollo y las segundas, degeneran y no mantienen sus características. En consecuencia, la micropropagación *in vitro* constituye una herramienta práctica que permite superar estas limitaciones y puede producir masivamente individuos de *Carica* sp, genéticamente idénticos, libres de virus en un espacio reducido y sin ser afectado por las variaciones de las condiciones ambientales.

En este contexto, a través de la presente investigación realizó una evaluación del contenido de papaína de *C. papaya*, *C. pubescens* y *C. pentagona*, se determinó el contenido de fenoles totales en plantas de *C. papayac* como indicador del sexo, y se

desarrolló la metodología para la micro propagación *in vitro* de las tres especies de *Carica* en estudio.

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1.Planteamiento del problema

La familia Caricácea pertenece al orden Brassicales, superorden Rosanae, subclase Magnoliidae y clase Magnoliopsida. Esta familia se distribuye en regiones tropicales del mundo, consta de 4 géneros: *Carica*, *Coccinia*, *Jacaratia* y *Cyliconaorfa*, de los cuales, el de mayor importancia es *Carica*, en el que se agrupan 21 especies. Para el Perú se registran 3 géneros y 14 especies, de las cuales 4 son endémicas. Dentro de estas especies, destacan *C. papaya* “papaya”, *C. pubescens* “papayuela” y *C. pentagona* “babaco” (Brako et al., 1993).

C. papaya es la especie de mayor uso, tanto por su elevada demanda como por sus características físico-químicas que la hacen atractiva para su consumo en fresco, sin embargo, después de ser propagada por semilla botánica, muestra marcadas variaciones morfológicas en la descendencia, la misma que se compone de plantas machos improproductivas, femeninas productoras continuas y hermafroditas que pueden ser productoras continuas y temporales. Todas estas formas sexuales son indistinguibles en el estado vegetativo ya que no existen diferencias embriológicas ni morfológicas entre los individuos en etapas tempranas antes de la prefloración y éste se reconoce solo cuando se inicia la floración (Giacometti 1997), por ello, la determinación del sexo en plantas de *C. papaya* es considerado un sistema intrigante, y constituye una limitante para el cultivador de papaya, puesto que implica costos adicionales y dificultades en la planeación del cultivo.

A diferencia de *C. papaya*, en la cual se han desarrollado numerosos estudios, las especies nativas *C. pubescens* y *C. pentagona* demandan de una mayor atención agronómica, no solo para mejorar sus aspectos productivos reflejados en su rendimiento y calidad de fruta sino también, por su aptitud para la producción de látex como fuente de papaína, un insumo de alta demanda en las industrias cárnica, cervecera, cosmética y farmacéutica.

Existen diversas formas de propagarlas Caricáceas en estudio, sin embargo, el uso de semilla sexual es el más generalizado en *C. papaya* y *C. pubescens*, más no en *C. pentagona*, la cual presenta un fruto partenocárpico. La propagación vegetativa de estas Caricáceas, por medio de estacas o injertos no brinda los efectos deseados, pues las primeras son de lento desarrollo y las segundas degeneran y no mantienen las características (Posada, 2005), en este contexto, surge la necesidad de utilizar las herramientas biotecnológicas y específicamente las técnicas de micro propagación *in vitro* a fin de obtener descendencias clonales sin restricciones de ninguna naturaleza.

1.2. Formulación del Problema

Problema general

¿Cuál es el contenido de papaína y de fenoles totales, como medio para la determinación del sexo, y la metodología para la micro propagación *in vitro* de tres especies de *Carica*?

Problemas específicos

¿Cuál de las tres especies de *Carica* en estudio tiene mayor contenido de papaína?

¿Cuál es el contenido de fenoles totales en plantas de *C. papaya* como indicador del sexo?

¿Cuál es la técnica apropiada para la micro propagación *in vitro* de plantas de estas tres Caricáceas en estudio?

1.3. Justificación de la investigación

En nuestro país, los frutales nativos dentro de los cuales destacan *C. papaya*, *C. pubescens* y *C. pentagona*, constituyen un valioso recurso genético, con tendencia natural a la producción de “látex”, del cual se obtiene la enzima papaína, de amplia aplicación en la tenderización y ablandamiento de carne, en la clarificación de cerveza, así como en la industria farmacéutica, por sus propiedades digestivas y en la industria cosmética por su poder desmanchador y cicatrizante (Muñoz, 2006).

C. papaya L. es una especie heterossexual, pero importante en la economía de la población, debido a su fruta de alto rendimiento y valor nutritivo (Carbajal y Remuzgo, 2010). Si el sexo de plantas dioicas de *C. papaya* se identificaría en el estado de plántula, permitiría obtener antes del trasplante a campo, la proporción adecuada de plantas con el sexo deseado, lo que contribuiría al ahorro de ingentes cantidades de recursos como suelo, fertilizantes y agua (Chaves-Bedoya y Núñez, 2007).

Una planta hembra de papaya produce alrededor de 100 frutos en su ciclo de vida y cerca de 250 g de papaína cruda por año; en plantaciones derivadas de semillas en donde aún existen machos. En consecuencia, un incremento en el número de árboles de papaya hembra y hermafroditas por hectárea guarda relación directa con la producción de frutos y papaína, haciendo de este cultivo, uno de los más rentables. Asimismo, el conocimiento del sexo en plantas de *C. papaya* es importante en la selección de padres en trabajos de hibridación. Por lo tanto, la

identificación temprana del sexo seguida de la micropropagación *in vitro* de estas plantas, asegura que los individuos componentes de la generación clonal sean 100% hembras o hermafroditas.

Con el estudio de los procesos que ocurren en el cultivo de tejidos de la papaya se han desarrollado técnicas de micropropagación por organogénesis y embriogénesis somática (Posada, 2005; Escalante, 2016); por ello, el desarrollo de una metodología de micropropagación a partir de meristemas apicales es importante para conocer el comportamiento *in vitro* de estas especies y apoyar la multiplicación de plantas élite de sexo femenino previamente seleccionadas. Además, se puede realizar una cuidadosa selección del material genético, manejar grandes volúmenes de plántulas en espacios reducidos y mantener un stock de plantas libres de enfermedades.

2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

Determinar el contenido de papaína y de fenoles totales, como medio para la determinación del sexo, y la metodología para la micro propagación *in vitro* de tres especies de Carica

Objetivos específicos

1. Evaluar el contenido de papaína presente en las tres especies en estudio, como una alternativa para la producción comercial de este metabolito secundario.
2. Determinar el contenido de fenoles totales en plantas de *C. papaya* con fines de predicción de sexo.
3. Determinar la técnica apropiada para la micropropagación asexual *in vitro* de plantas selectas de las tres especies en estudio.

3. HIPÓTESIS

Hipótesis General

El contenido de papaína y de fenoles totales, como medio para la determinación del sexo, y la metodología para la micro propagación *in vitro*, es variable en función a la especie de Carica.

Hipótesis específicas:

1. El contenido de papaína de *C. papaya* es inferior al de las especies *C. pubescens* y *C. pentagona*.
2. El contenido de fenoles totales en plantas de *C. papaya*, *C. pubescens* y *C. pentagona* es un indicador confiable en la predicción de sexo.
3. La micropropagación *in vitro* de plantas selectas de las tres especies en estudio es una técnica apropiada para la obtención de poblaciones clonales de plantas de papaya.

Variables

Variable independiente

Especies de Carica

Variables dependientes

Contenido de papaína

Contenido de fenoles totales

Metodología de micro propagación *in vitro*

4. DISEÑO DE CONTRASTACION DE LAS HIPÓTESIS

4.1. Definición operacional de las variables

Es importante conocer el inmenso potencial económico de *C. papaya*, *C. pubescens* y *C. pentagona*, así como el beneficio de su explotación, para ello se evaluó el contenido de papaína, se determinó el contenido de fenoles totales en *C. papaya* con fines de predicción de sexo, y se evaluó la propagación *in vitro* de las tres Caricáceas en estudio.

4.2 Unidad de análisis, universo y muestra

a) Unidad de análisis

Plántula *in vitro*

b) Universo

Población de *Carica papaya*, *Carica pubescens* y *Carica pentagona*

c) Muestra

Frutos inmaduros de *C. papaya*, *C. pubescens* y *C. pentagona*

Hojas tiernas de *C. papaya*

Explantas de *C. papaya*, *C. pubescens* y *C. pentagona*.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. CARACTERIZACIÓN BIOSISTEMÁTICA DE LAS CARICÁCEAS

Según la revisión hecha por Badillo (1983), el subgénero *Carica* sp tiene 21 especies, siendo la más importante la especie *Carica papaya* Linneo. En el Perú, además de esta especie, hay reportadas las siguientes:

C. candicana, A Gray

C. glandulosa, Pavón

C. posaposa, Linn

C. pubescens, Soms

C. weberbaueri, Harms

C. monoica, Desf

C. pentagona, Heilborn

C. pyriformis, Willd

C. paniflora, A. DC Solms

C. augusti, Harms

C. heterophylla, PA eppetEnd

Carica papaya Linneo, crece en los trópicos del mundo, se cree que su origen corresponde a las laderas occidentales de los Andes Peruanos.

2.1.1. *Carica papaya* Linneo “papaya”

C. papaya se cultiva actualmente como un cultivo anual debido al problema del virus de la mancha anular de la papaya (PRSV). La papaya hermafrodita exhibe reversibilidad sexual dependiendo de las condiciones ambientales predominantes. La selección del tipo hermafrodita productivo (es decir, elongata) con forma de fruta deseable es necesaria para asegurar un cultivo productivo.

La propagación de la papaya por la semilla sigue siendo el método más práctico de levantar el cultivo, porque es eficiente y económico. (Badillo 1983, Franciosi, 1992). Existen métodos vegetativos de propagación, tales como el uso de estacas, injertos y materiales cultivados en tejidos, pero son laboriosos y costosos. Los productores de papaya comerciales y la mayoría de pequeños cultivadores dependen únicamente de las semillas como materiales de siembra. Hay varias razones por las cuales un tipo sexual deseable de la planta de la papaya sea sabido al cultivador antes de plantar.

C. papaya suele florecer 3-6 meses después del trasplante, y produce frutos maduros a la edad de 9-14 meses. El tiempo de espera de la siembra a la cosecha es largo, por lo que los productores necesitan estar seguros de que una plántula es una hembra o una planta hermafrodita productiva, cualquiera de las cuales dará una buena cosecha. La determinación del tipo de sexo de las plántulas de papaya antes de la etapa de floración evitaría la necesidad de eliminar los tipos de sexo no deseados (por ejemplo, los hombres del campo, ahorrando así mano de obra, tiempo y otros recursos). Calzada, 1985.

El látex es extraído de frutas completamente desarrolladas, pero no maduras, cuya piel contiene numerosos laticíferos. La fruta de papaya madura no contiene látex posiblemente porque las células productoras de látex dejan de funcionar o se averían con la edad.

2.1.2. *Carica pubescens* L “papayuela”

En los Andes, a altitudes donde no se puede cultivar *C. papaya* crecen algunas especies de *Carica* que pueden constituir cultivos promisorios. Entre estas especies está *Carica pubescens*, cultivada en huertos familiares desde Colombia hasta Bolivia. Es probable que esta especie haya sido extraída de los bosques perennifolios andinos y puesta en cultivo en los huertos como plantas de adorno y por sus frutos, que en estado maduro se consumen crudos o cocinados (Sánchez, 1992).

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Violales

Familia: Caricaceae

Género: *Carica*

Especie *Carica pubescens* L (A.DC.) SolmsLaubach

Nombre común: Es conocida como "Papayuela", "Papaya de los Andes", "Papaya de Altura", "Papaya Arequipeña" o "Papaya Andina"

Distribución

Esta planta pertenece al género *Carica*, originario de América tropical y subtropical, compuesto por más de 40 especies nativas, entre las que se destaca la papaya (*Carica papaya*) por ser la más conocida y distribuida en las zonas tropicales. La papayuela (*Caricapubescens* L) es una especie frutal nativa de América tropical que se cultiva en altitudes entre 2400 y 2800 m. (Duque et al., 2005). Es una planta originaria de las alturas de Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú (Arequipa, Apurímac, Cusco, Huánuco y Junín) crece entre los 2,000 y 3,000 m.s.n.m. (Chávez et al., 2007); se distribuye desde Panamá hasta Chile y Argentina alrededor de los pueblos montañosos. La especie andina *Caricapubescens* L se cultiva con éxito en las huertas caseras debido a sus cualidades ornamentales (Duque et al., 2005).

Descripción

La papayuela (*Caricapubescens* L. Lenne & Koch) tiene una apariencia similar a la de la papaya (*Carica papaya*), es una planta arborescente que alcanza hasta 10 m de alto, sus hojas grandes se distinguen de las de la papaya por su forma y por la presencia de una pubescencia que cubre las hojas y las flores. El fruto es muy aromático, de color amarillo claro, oblongo-elíptico, truncado en la base y agudo en el ápice, de 7 a 11 cm de largo y 5 a 6 cm de diámetro, con cinco costillas muy pronunciadas. La pulpa, ligeramente amarilla, constituye cerca del 60 % del peso total de la fruta y contiene numerosas semillas en la cavidad central cubiertas por una membrana dulce, transparente y gelatinosa. Antes de alcanzar la madurez, el fruto exuda un látex, al que se le han atribuido propiedades medicinales para el tratamiento de la micosis y otras enfermedades de la piel. Generalmente, no se consume al natural, sino procesada en forma de jugos o conservas (Duque et al., 2005).

Usos

Por su alto contenido de papaína, esta fruta tiene gran aceptación en los mercados internacionales para uso en la industria farmacéutica y en la de alimentos como ablandador de carne; estas consideraciones sugieren su cultivo como una alternativa de desarrollo en las zonas más deprimidas de los Andes. (Duque et al., 2005) Es un alimento natural, cuyo fruto es apreciado por su olor característico y agradable, posee altos beneficios por sus cualidades nutritivas, presencia de enzimas, proteínas y vitaminas A, B y C y minerales. (Chávez, 2007).

Componentes

Caricapubescens L contiene papaína y carpaína; nutrientes tales como proteínas (0,7%) carbohidratos (3,9%), grasas (0,1%), agua (93,5%), fibra (1,2%), vitamina A (100 UI),

vitamina C (70mg/100g), calcio, fósforo, tiamina, riboflavina y niacina. (Muñoz, 2006)

Para las hojas de la planta se describen los siguientes componentes químicos: Fenilpropanoides: ácido cafeico; esteroides: β -sitosterol; alcaloides: carpaína (hasta 1500 ppm) dihidrocarpaína I y II, pseudocarpaína, cotinina, miosmina, nicotina, colina. También contiene pequeñas cantidades de glicósidos cianogénicos (Cuéllar et al., 2012). Sánchez (1992), reporta que *Carica pubescens* es un arbusto de 1 a 2 m, tallo principal poco ramificado, base ancha con cicatrices foliares conspicuas; apariencia de una pequeña palmera. Hojas pecioladas, peciolo de 17 a 34 cm de longitud, lámina dentolobulada de contorno pentagonal, de 20 - 26 cm de longitud y 30 a 40 cm de ancho. Lóbulo medio con 3 a 5 lobulillos laterales, oblongo - acuminados. La mayoría de las plantas son dioicas, la tabla 1, describe las diferentes formas florales para *C. pubescens*.

Tabla 1. Formas florales descritas para *Carica pubescens*

Tipo de flor	Características			
	corola	tubo	estambres	pistilo
femenina	dialipétala	ausente	ausentes	presente, ovario bien desarrollado
pistilada carpeloide (frutos deformes)	gamopétala	corto o nulo	1 a 5 (4 carpeloides)	Ovario alto, estilo corto, estigma con 1 a 4 ramas
estaminada carpeloide (no fructifica)	gamopétala	presente	10, 5-9 libres, el resto fusionado	Ovario sin tejido esporògeno y estigma filiforme infértil
masculina	gamopétala	presente	10 estambres	rudimentario

Adaptado de Badillo, 1971

Los frutos en estado verde de *Carica pubescens* constituyen un recurso para la obtención de látex. Este, por su alto contenido de papaína, al igual que el de *C. papaya*, tiene aceptación en el mercado internacional, para uso en la industria farmacológica y como ablandador de carnes.

En el área geográfica de distribución de *C. pubescens* no se reconocen cultivares, pero se puede asumir que el mayor centro de diversidad se ubica en el Ecuador y en el norte del Perú.

Por su parte, National Research Council, 1989 indica que *Caricapubescens*, llamada también papaya de la sierra, papayita arequipeña o papaya de monte, requiere de climas templado - cálido. El fruto es una baya, de pericarpio delgado, jugoso, de color amarillo (pulpa y piel), pasando por color verde durante la madurez, el centro es hueco y se encuentra totalmente ocupado por las semillas envueltas en un tejido mucilaginoso; presenta una forma oblongo - ovoide de 5 a 10 centímetros de largo por 3 a 6 centímetros de ancho y tiende a ser ovalada, con los extremos aguzados.

2.1.3. *Caricapentagona* “babaco”

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Clase: Magnoliopsida

División: Magnoliophyta

Subclase: Dycotyledonae

Orden: Parietales

Familia: Caricaceae

Género: *Carica*

Especie: *pentágona*

Distribución

El babaco (*C. pentagona*) es una planta que presenta sus orígenes en las zonas altas de Ecuador y Colombia, es un híbrido natural proveniente del cruce de las especies *C. pubescens* (chamburo) y *C. stipulata* (toronchi). Posee un fruto partenocárpico (sin semilla), limitando su propagación a una forma asexual. En condiciones de invernadero el babaco inicia a dar frutos a los 9 o 12 meses después de su plantación, durante el periodo vegetativo de la planta, esta produce alrededor de 60 a 100 frutos por planta (Montenegro, 2009).

Sepúlveda, 2000, sostiene que *C. pentagona*, en su hábitat natural (Ecuador), crece con temperaturas medias que fluctúan entre 12 y 20°C, con una amplitud térmica diaria de hasta 18°C, pero no resiste heladas. La producción de flores se presenta todo el año, aunque durante períodos fríos se produce aborto de éstas; indica que, de flor a fruto apto para cosecha se ha necesitado en promedio ocho meses, de allí que, si se considera que las plantas inician su producción de flores mínimo a los seis meses, se tiene que se necesitan al menos 14 meses, desde la plantación hasta el inicio de la cosecha.

La fruta se considera apta para la cosecha cuando a lo menos un 25 por ciento de su superficie presenta un color amarillo pálido. El peso promedio del fruto durante igual período fluctúa entre 750 y 1 200 gramos. El rendimiento anual por hectárea del “babaco” sobrepasa las 40 toneladas, pudiendo incluso incrementar según la densidad de plantación. En Ecuador, por ejemplo, las explotaciones comerciales se hacen con densidades que fluctúan entre tres mil y ocho mil plantas por hectárea. Precisa, asimismo, que una característica del fruto, lo constituye la presencia de látex, rico en papaína, enzima usada como ablandador de carnes y, más recientemente, en la industria cosmética. Establece que al cortar o “zajar” el fruto, “se produce abundante exudación de látex, cuya actividad enzimática está siendo determinada para establecer su real potencial; la operación tiene el inconveniente de dejar dañada la epidermis del fruto que, aunque cicatriza sin dificultad, desmejora su apariencia externa.

Descripción

Caguana et al 2003, indica que *C. pentagona* es una planta arbustiva, cultivo semi perenne, de tallo de más de 2 m, creciendo en invernadero hasta 3 m. Sistema radicular conformado por raíces carnosas verticales de las cuales se desprenden raíces absorbentes superficiales y delicadas encargadas de la absorción de nutrientes. El sistema radicular del babaco es susceptible a labores de remoción del suelo posterior a su plantación. El

tronco es recto, cilíndrico, no leñoso, verde cuando joven para tornarse de tono castaño grisáceo en edad adulta. Tiene hojas insertadas al tronco alternadamente, limbo lobulado con cinco a siete lóbulos, nervadura marcada de pecíolo largo. Su verde cambia de tonalidades, según la fase de desarrollo.

Las flores son femeninas, solitarias, pétalos blanco-amarillento-verdoso y sépalos verde oscuros, aparecen de manera continua en las axilas de las hojas, un mes después del trasplante si ha existido una adecuada fertilización y riego.

El babaco es un híbrido natural que al presentar un fruto partenocárpico posee una reproducción de forma asexual o vegetativa (Sánchez, 1992). El fruto es una baya sin semilla, no necesita de polinización para desarrollarse, es alargado de sección pentagonal, mediana de unos 30 cm de largo por 10 a 15 cm de diámetro, los obtenidos dentro de invernadero. En una misma planta pueden encontrarse frutos de diferentes tamaños; se puede propagar por medio de estacas, injertos, o brotes tiernos; las estacas se deben obtener de plantas con años de producción y sin problemas sanitarios (Caguana et al., 2003), deben presentar una longitud de 20 a 30 centímetros, su corte superior debe ser de forma biselada, con el fin de evitar la acumulación de agua en el interior de la estaca en el momento de riego de la misma, y su corte inferior debe ser de forma horizontal para tener un mayor contacto y la formación de raíces. (Montenegro, 2009).

C. pentagona Heilborn, se caracteriza por sus grandes frutos partenocárpicos, no tiene semilla, pero se reproducen fácilmente por estacas, crece en alturas entre 1400 y 2500 msnm. (Sánchez, 1992).

Aunque la planta funciona como un híbrido estéril, parece que la polinización incrementa la producción y frecuentemente los frutos contienen semillas viables. El “toronchi” hibridiza fácilmente con el “siglagon” (*Carica stipulata*), produciendo muchas formas intermedias con diferentes sabores y cantidades variables de semillas.

Componentes nutritivos

Shaw, 1985, citado por Muñoz, 2006, reportan que una de las ventajas de comercialización que tiene el babaco aparte de su forma, color, olor y sabor, es su contenido de sustancias elementales para la nutrición humana, tales como proteínas (0,9%), carbohidratos (6%), grasa (0,2%), humedad (93%), fibra (0,7%), carotenos (0,09 mg/100 g), vitamina C (31 mg/100g), sodio (1,3mg/100g), potasio (220mg/100g), calcio (12mg/100g), fósforo (17mg/100g), azufre (12mg/100g), riboflavina (0,03mg/100g), piridoxina (0,05mg/100g) y tiamina (0,02mg/100g); aportando 29,4 kcal/100g.

Asimismo, identificaron por GC-MS en *Carica pentagona* 32 componentes volátiles, los cuales fueron aislados a bajas temperaturas y alto vacío mediante extracción con éter dietílico. De los compuestos identificados destacan etilhexanoato y etilbutanoato característicos en el aroma del fruto.

2.2. CONTENIDO DE PAPAÍNA

Papaína

Toda la planta de papaya, y en especial sus frutos, al estado verde contienen un jugo lácteo muy abundante de color blanco (látex), que encierra un principio denominado por Pecklot (1972), papayotina, y por A. Wurtz (1975), citados por Dubey, 2007; papaína, principio muy semejante a la pepsina animal, por la acción transformadora de las sustancias azoadas en peptona.

El látex es un fluido lechoso compuesto por un suero líquido que contiene en suspensión o en solución, una mezcla compleja de componentes. Los botánicos designan el látex como el citoplasma de los laticíferos (las células vivas especializadas que lo contienen) y por lo tanto, éste presenta una variedad de organelos celulares, como núcleos, mitocondrias, ribosomas, plastidios, vacuolas, aparato de Golgi, retículo endoplasmático

y moléculas orgánicas como enzimas, terpenos, alcaloides, vitaminas, carbohidratos, lípidos y aminoácidos libres. Los laticíferos se encuentran bajo presión positiva, por lo cual, una incisión sobre éstos, resulta en una rápida emisión del látex hacia el exterior. (El Moussaoui et al., 2001).

Importancia

La papaína contiene varias enzimas, una o más enzimas proteolíticas entre las cuales se encuentra la peptidasa I (capaz de convertir las proteínas en polipéptidos y dipéptidos), una enzima coagulante semejante a la renina (actúa sobre la caseína de la leche), una enzima amilolítica, otra enzima coagulante (similar a la pectasa) y una enzima que posee débil actividad sobre las grasas . Es muy evidente que contiene más de una enzima proteolítica, porque una sola muestra de papaína da resultados variables según la proteína que se utilice.

En la actualidad, el uso de las enzimas en gran cantidad de industrias ha adquirido gran relevancia, pues las ventajas de las enzimas en la producción industrial son evidentes frente a los catalizadores no biológicos, principalmente porque tienen la capacidad de acelerar reacciones químicas energéticamente posibles sin que se consuman en la reacción, no alteran el balance energético de las reacciones en que intervienen, ni modifican, por lo tanto, el equilibrio de la misma, pero consiguen acelerar el proceso incluso millones de veces.

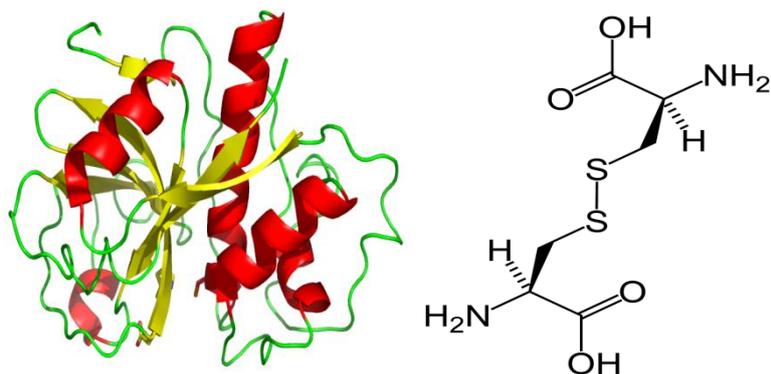


Figura 1. Estructura propuesta para la papaína
Fuente: Mark, 2007

Liggieri et al., 2004, reporta que los principios activos del látex, responsable de su valor en muchas aplicaciones industriales, son las enzimas proteolíticas papaína y quimopapaína; se ha demostrado que la conversión de la forma inactiva a la activa, ocurre cuando el látex es expelido y alcanza un máximo de actividad proteolítica en menos de dos minutos, después del corte o pinchazo en la superficie del fruto. Paralelamente a este proceso, se hacen visibles los síntomas de coagulación del látex, lo que evidencia que este elemento es un factor de primera línea de defensa en plantas, pues los coágulos de látex sellan las heridas y evitan el ingreso de patógenos. El látex desecado constituye lo que se denomina papaína cruda constituida por una mezcla de enzimas proteolíticas, papaína propiamente dicha, quimopapaínasy en menor proporción papaya proteinasa.

Propiedades de la papaína

La papaína es una endoproteína semejante a la pepsina humana, la cual posee actividad bactericida, bacteriostática y antiinflamatoria, proveniente del látex de las hojas y frutos de la papaya verde madura, *Carica papaya*, cultivada en los países tropicales como: Brasil, India, Ceilán, África del Sur y Hawaii. En relación a las otras enzimas naturales, la papaína posee algunas ventajas como: calidad y actividad enzimática; estabilidad en condiciones desfavorables de temperatura, humedad y presión atmosférica;

encontrándose en alta concentración en el látex extraído de la cáscara de la papaya y conteniendo un elevado valor comercial debido a la diversidad de usos que presenta (Chaverri, 19886; Stoschek, 1990; Yugcha, 2013).

Kaarsholm, 2005 y WorthingtonBiochemical Corporation, 2016, coinciden en indicar que la papaína pura, es una proteína constituida de 212 residuos aminoacídicos, estos residuos se encuentran enrollados en dos partes separadas por un puente que tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre de un residuo de cisteína, de ahí su nombre de cisteín-proteasa (ver figura 1). Esta molécula, similar a la proteasa humana, se estabiliza gracias a la presencia de puentes disulfuro generados por enlace de aminoácidos cisteína en su estructura; estos puentes disulfuro le confiere alta resistencia al calor presentando una alta estabilidad a temperaturas de 60°C hasta 90°C siendo la temperatura óptima de acción de la papaína 65°C. Asimismo indican que la papaína es una enzima de baja especificidad que hidroliza tanto las proteínas como los péptidos de pequeño tamaño, amidas y ésteres; preferentemente actúa sobre los aminoácidos básicos, leucina, glicina, así como sobre arginina, lisina y fenil-alanina (son en enlaces próximos al grupo carboxilo de la fenilalanina). Esta enzima, al revés de la pepsina, actúa en medio neutros o alcalino, el pH óptimo de esta proteasa se encuentra entre 6 y 7; mientras que su punto isoeléctrico corresponde a un pH de 9,6. Es activada por la cisteína (aa), el tiosulfato (compuesto de azufre) y el glutatión; es inhibida o inactivada por iones metálicos (zinc, cadmio, hierro, plomo), oxidantes (H₂O₂, radicales libres, etc.) y por agentes que reaccionan con los tioles (ácido ascórbico).

Morton (1987) describe que *C. papaya* contiene sustancias bioactivas tales como alcaloides (1,3-4 ppm), ácido butanoico (aprox. 1,2mg/kg en pulpa del fruto), metilbutanoato (< 18% de los componentes volátiles), carpaína(1-1,5 ppm), dehidrocarpaína(aprox.1 ppm), pseudocarpaína (100 ppm), taninos (5,000-6000 ppm),

alfa-terpineno (fruto), gama terpineno (fruto), metil-isotiocianato, bencil-isotiocianato, carotenoides (13,8 mg/100 g de pulpa deshidratada), glucotropeolina (fruto), papaína, quimopapaína, pectina, ácidos grasos y otras sustancias.

El látex del fruto de *Carica papaya* contiene una mezcla de cisteína endopeptidasas como quimopapaína A y B, papaya endopeptidasa III y IV y papaya endopeptidasa.

Las enzimas de *C. papaya* son del tipo de las cisteína-proteasas como la papaína, una verdadera pepsina vegetal denominada papayotina. Sus hojas la contienen en una proporción de un 4%. La papaína refinada es un polvo amorfo, de color blanco o discretamente amarillento de sabor y olor casi imperceptibles.

Aunque su potencia difiere de acuerdo con el método de obtención, la papaína digiere 35 veces su peso de carne magra. Por esta razón se usa para tiernizar carnes. La papaína de mejor calidad digiere 300 veces su peso de albúmina de huevo (Tyler, 1979, citado por Bernal, 1988).

En la tabla 2, se reportan los resultados de análisis de látex fresco de *Carica papaya* Linneo en muestras de 100 gramos.

Tabla 2. Análisis de látex fresco de *Carica papaya* L

SUSTANCIA	MASA EN GRAMOS
Agua	74,975
Papayotina pura	5,303
Sustancias análogas al caucho	4,525
Resina	0,100
Materia extractiva, pectina, etc.	0,443
Glucósidos	1,059
Ácidos orgánicos, málicos, etc.	0,443
Ácidos inorgánicos	7,100

Pocklet, 1972, citado por Bernal 1988

La acción vermícida y digestiva del jugo mencionado fue divulgada desde el año 1756 por Endlicher y Vauquelin. Se acostumbra distinguir con el nombre de papaína, el zumo concentrado del fruto, mientras que con el nombre de papayotina se reserva para la

papaína muy pura o principio activo del zumo: carpaína, que es un alcaloide extraído de las hojas de *C. papaya*.

Para Dubey et al., 2007, la papaína está constituida por 212 aminoácidos que se encuentran enrollados en dos partes separadas por un puente que tiene un lugar activo con un grupo tiol (SH) libre; es una enzima de baja especificidad que hidroliza tanto las proteínas como los péptidos de pequeño tamaño, amidas y ésteres.

Preferentemente actúa sobre los aminoácidos básicos, leucina, glicina, arginina, lisina y fenil-alanina en enlace próximo al grupo carboxilo de la fenilalanina. Es activada por la cisteína, el tiosulfato y el glutatión; es inhibida o inactivada por iones metálicos como zinc, cadmio, hierro, plomo, oxidantes (H₂O₂, radicales libres, etc.) y agentes que reaccionan con los tioles (ácido ascórbico).

Así mismo reporta que la papaína es usada ampliamente en la industria de la carne como un ablandante; Se usa en la industria textil para reducir el encogimiento de ciertos tipos de lana, en la industria cervecera para clarificar la cerveza y en la industria de curtiembres para separar las pieles. La papaína es un ingrediente importante en la medicina digestiva y se usa en el tratamiento de varias enfermedades; encuentra varias aplicaciones en la farmacia y los cosméticos.

Dubey et al., 2007, reporta que desde hace muchos años se sabe de la presencia de enzimas proteolíticas en el látex. La función de estas proteasas, en cambio, aún no ha sido elucidada; se ha planteado que intervienen en la degradación de proteínas durante el desarrollo de los laticíferos o como se mencionó anteriormente, en la promoción de la coagulación como un proceso vital para la defensa de la planta contra el posible ataque de patógenos

Las proteasas o peptidasas son un tipo de enzimas hidrolíticas (de la clase de las hidrolasas) capaces de escindir los enlaces peptídicos de las proteínas modificando su

estructura y en el caso de las enzimas, su actividad catalítica. La hidrólisis de un enlace peptídico es una reacción energéticamente favorable, pero extremadamente lenta. Generalmente, las proteasas son sintetizadas como proenzimas inactivas para evitar la degradación en el lugar y sitio equivocados.

Asimismo, de acuerdo con la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (UIBBM), las proteasas reciben el código EC 3.4, por ser hidrolasas que catalizan la ruptura de enlaces peptídicos. Se reconocen cinco clases catalíticas de proteasas determinadas por el rol primario llevado a cabo por un grupo serin, treonin, cistein, asparto o metal en la catálisis enzimática, por lo tanto, las proteasas se clasifican en serinproteasas, treoninproteasas, cisteinproteasas, aspartoproteasas y metaloproteasas.

Alarcón, 2009, indica que el látex de papaya contiene un complejo de enzimas proteolíticas pertenecientes al grupo de las cisteinproteasas (EC 3.4.22) también conocidas como proteasas sulfhidrúlicas o tiólicas, enzimas cuya actividad proteolítica depende del grupo tiol (-SH) de un residuo de cisteína en su sitio activo. Han sido reportadas varias enzimas cisteínicas vegetales extraídas del látex de *Carica papaya* una de las más importantes y la de mayor uso a nivel industrial es la papaína, de esta planta han sido también aisladas la quimopapaína, la caricaína y la glycilendopeptidasa; aunque la papaína es la enzima en menor proporción en el látex es la más estudiada ya que es la de más fácil purificación y mayor uso industrial.

Contreras-Esquivel et al., 1997, reportan que la pectina es una macromolécula de alto peso molecular (polisacárido) que se encuentra como uno de los principales constituyentes de la pared celular de las plantas superiores, es la responsable de proporcionar la textura característica de los vegetales. Las pectinas son usadas ampliamente en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética; principalmente como agente espesante y estabilizante. En estudios preliminares efectuados se demostró que la

papaína se estabiliza en las películas de pectina conservando su actividad por un periodo mayor de 6 meses.

Para la producción de látex, el más adecuado es un fruto de forma oblonga, que pese entre 800 a 1800 g; éste ofrece una mayor superficie para extracción de látex respecto a otros frutos. Las plantas que producen frutos en forma de globo o numerosos frutos pequeños o de tipo sexual, son polinizados libremente y son inferiores para la producción de látex. El látex colectado bajo condiciones óptimas contiene desde 1 parte de papaína cruda hasta 5 ó 6 partes de agua, o 1 kg de látex produce 200 gramos de papaína cruda, esta proporción puede cambiarse por condiciones desfavorables de 1 a 10. La papaína cruda después del proceso de secado debe tener aproximadamente 9 a 10% de contenido de humedad, con una consistencia migajosa, quebradiza, de color blanco cremosos o amarillo. (Bernal, 1988).

Factores que afectan la actividad proteolítica de la papaína

Chaverri, 1986, reporta varios factores que afectan la actividad proteolítica de la papaína, entre ellos:

Oxidación química: Agentes oxidantes como yodo, bromo, peróxido de hidrógeno, el oxígeno y los metales pesados inactivan la enzima. Esto se explica debido a la participación de sulfidrilos en la acción catalítica de la enzima, que se activa en estado reducido y se inactiva al oxidarse.

Coagulación: Debido a la naturaleza proteica y a la presencia de peptonas y albuminoides en el látex fresco, este tiende a coagular después de su extracción.

La coagulación es el proceso en el que el látex es desestabilizado coloidalmente de tal manera que sucede una agregación o unión de las partículas de la fase dispersa, separándose del medio de dispersión.

Cambios de pH: Una de las peculiaridades de la papaína, es que mantiene su actividad proteolítica en un amplio margen de pH, desde pH 3 hasta pH 12, presentando mayor actividad a pH entre 6 y 7. El pH óptimo para que la enzima actúe, depende del tipo de sustrato sobre el cual ejerce su acción, ya que coincide con el punto isoeléctrico del sustrato.

Oxidación por luz: Se inactiva con luz ultravioleta, oxidándose rápidamente por exposición a los rayos solares y el oxígeno.

Crecimiento microbiano: Debido a la naturaleza proteica del látex y a la forma de recolección, está propenso a contaminación por microorganismos, que realizan sobre éste acción putrefactiva.

Extracción de papaína

Los procesos destinados a la separación de la papaína del látex, purificación, concentración y estabilización aumentan significativamente el valor de la papaína cruda y le permite ingresar a mercados y procesos productivos más sofisticados. La tecnología de purificación de papaína, aún en proceso de optimización, le da un alto valor al producto, lo cual demuestra su gran rentabilidad y atractivo para los inversionistas del país. El látex (papaína cruda) es cotizado con un valor promedio aproximado de US\$35/kg, mientras que la papaína purificada puede llegar a costar US\$160/100 g o más para las preparaciones muy purificadas. El precio del kilo de papaya pagado al productor en el año 2002 fue de S/. 0,292 por kilogramo. Se estima que cada fruto produce unos 9 gramos de látex por kilo (Monti, Basilio et al., 2000), y cada cajón de papaya comercializada podría producir 108 g de látex.

Yugcha, et al., 2013, en un estudio de secado del látex de papaya por el método de aspersión para la obtención de papaína cruda; extrajeron el por medio de incisiones

longitudinales sobre la superficie de frutos con edad comprendida entre 2 y 3 meses. Luego fue sometido a un proceso de centrifugado para separar la porción no soluble del látex y así facilitar la deshidratación. Previo al secado realizaron la microencapsulación de la enzima para protegerla de daños producidos por el secado, en el cual se utilizó como agente microencapsulante goma arábica. Para el estudio del secado se evaluaron tres temperaturas (110 °C, 120 °C, 130°C), a un caudal de 10 mL/min y presión de 4 bares. El análisis de actividad proteolítica lo efectuaron mediante el método analítico de la unidad de tirosina, la cual se obtiene luego de la hidrólisis de la caseína. Al finalizar los análisis determinaron que la actividad enzimática del secado a 130 °C es inferior a la de sus contrapartes estudiadas y que no existe diferencia significativa entre 110 °C y 120 °C, sus valores de actividad proteolítica fueron $671,53 \pm 31,16$ TU/mg y $672,92 \pm 32,54$ TU/mg respectivamente.

2.3. CONTENIDO DE FENOLES TOTALES en *Carica papaya*

Calzada, 1985; Bernal, 1988; Mora y Bogantes, 2004, reportan que la papaya se propaga principalmente por medio de semillas; las flores de esta planta son de lo más interesantes y curiosas, ya que puede producir únicamente flores femeninas o flores masculinas, o flores hermafroditas. Las flores femeninas son grandes, solitarias y crecen en las axilas de las hojas, para que fructifiquen es indispensable la polinización cruzada.

Los frutos presentan en la base una cicatriz típica en forma de pentágono, que corresponde a la inserción de los 5 sépalos. Las flores masculinas se disponen en largos y colgantes racimos; las flores son tubulares con los pétalos unidos. Por tener el ovario atrofiado ordinariamente no dan fruto, a veces puede desarrollarse el ovario y producir frutos pequeños sin valor comercial. Las flores hermafroditas se desarrollan en racimos cortos, en número de 5 ó 6 en las axilas de las hojas; los frutos presentan en la base una cicatriz celular.

Debido a que la producción óptima del fruto de papaya se obtiene en huertos, generalmente es necesaria una planta masculina por cada 30 o más plantas femeninas para diseminar completamente las semillas y luego remover el exceso de plantas masculinas tan pronto como pueden ser diferenciados los tipos sexuales. (Bernal, 1988).

Tipos de flores

La papaya presenta tres tipos de plantas de acuerdo al sexo de las flores que produce: hembras, machos y hermafroditas (fig. 3) Diferentes hipótesis han sido planteadas para explicar la genética de la determinación del sexo en papaya, incluyendo el control por un solo gen con al menos tres alelos, el control por dos genes diferentes, un grupo de genes fuertemente ligados, la presencia de un sistema de cromosomas XY, balance génico de cromosomas sexuales sobre autosomas, elementos reguladores de la vía de desarrollo floral y el control ejercido por dos cromosomas Y levemente diferentes (Y y Yh). (Storey, 1976).

Las plantas con flores hermafroditas son las que producen frutos con las mejores características comerciales: forma alargada y piel gruesa, lo cual les permite resistir más

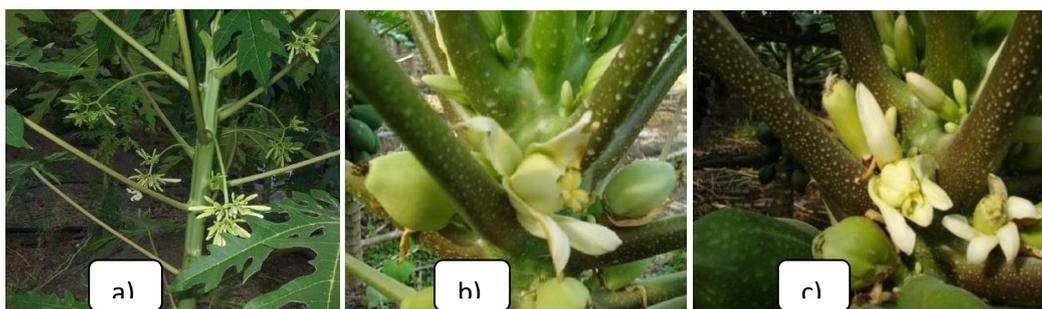


Figura 3. a) Flores masculinas, b) flores femeninas y c) flores hermafroditas, de *C. papaya* Carbajal y Remuzgo, 2010

Los daños mecánicos en poscosecha y una cavidad interna pequeña, es decir una mayor relación pulpa/semilla. Sin embargo, el sexo de las plantas de papaya solo puede ser determinado hasta que las plantas llegan a la floración (de dos a tres meses). Por lo tanto,

para obtener una plantación con plantas mayoritariamente hermafroditas, el productor debe sembrar de tres a cuatro plantas por punto de siembra y eliminar al momento de la floración los fenotipos no deseados (machos y hembras). Esta práctica resulta en un aumento de los costos de producción como consecuencia del mayor número de plántulas sembradas y el mantenimiento de las mismas hasta el momento de ser removidas.

Además, requiere de personal capacitado que conozca bien la morfología floral de la papaya y sepa distinguir las flores hermafroditas de las femeninas.

Por otro lado, existe siempre el inconveniente de obtener frutas con un menor valor comercial, ya que no siempre se elimina certeramente los genotipos indeseables y la constitución final de la plantación es de un 92 a un 94 % de plantas hermafroditas solamente, y no del 100 % deseado (Mora y Bogantes, 2004).

Determinación del sexo

La determinación del sexo de plantas de papaya en etapas tempranas de su desarrollo permite el ahorro de recursos, al facilitar la siembra de plantas 100 % hermafroditas.

Diferentes estudios han sido conducidos para el establecimiento de un sistema temprano para la determinación del sexo en papaya. Los mismos incluyen análisis morfológicos, citológicos, isoenzimáticos y de contenido de fenoles (Magdalita y Mercado, 2003).

Calzada (1985), informa que no se puede hacer cambiar el sexo del papayo como algunos agricultores creen, con el abonamiento, descopado (quitar la copa), corte de raíces o con el cambio de luna.

El sexo de una planta depende del progenitor de donde proviene el grano de polen (gameto masculino) y del óvulo de la planta (gameto femenino), que al unirse formarán la semilla.

El polen y el óvulo pertenecen a la fase haploide, y la semilla y la planta es la fase diploide ($2n=18$).

Asimismo, reporta que tanto el óvulo como el polen tienen $n = 9$ cromosomas, a los que al unirse dan la semilla con $n=18$ cromosomas. Un cromosoma del polen y uno del óvulo son los determinantes del sexo, el determinante de la femineidad es representado por “m”, el determinante de la masculinidad por “M1” y del hermafroditismo por “M2”. Las plantas femeninas tienen la constitución “mm”, o sea son homocigóticas. Las plantas masculinas tienen la constitución “mM1” y las hermafroditas “mM2”.

La presencia de las tres formas sexuales -macho, hembra y hermafrodita- en esta especie ofrece varias ventajas para estudios genéticos y evolutivos. Posee un genoma pequeño de 372 megabases (Mb), contenido en nueve pares de cromosomas, un tiempo corto de floración de 9 a 15 meses, numerosos tipos de flores y un intrigante sistema de determinación sexual, por lo que su diferenciación ha sido tema frecuente de análisis genéticos. La papaya posee un cromosoma Y primitivo, con una región macho específica, que corresponde aproximadamente al 10% del cromosoma, pero que ha pasado por una severa supresión de recombinación y degeneración de la secuencia de ADN (Storey, 1976).

Debido al estado polígamo de la papaya, el conocimiento del sexo de la misma es una herramienta para apoyar al agricultor, no sólo para la obtención de la semilla, sino también para el manejo del cultivo. En casos en que es necesario el uso de plantas macho, deben distribuirse, en relación con las hembras, adecuadamente para asegurar la polinización. Hasta ahora, la determinación del sexo no es posible antes de que la planta alcance el estado de floración, que ocurre cinco a ocho meses después de la siembra de la semilla, ya que no existen diferencias embriológicas ni morfológicas entre los tres tipos sexuales en etapas tempranas antes de la prefloración (Rojas, Ramos y Salazar, 1985). Por lo tanto, la diferenciación sexual se ha convertido en una limitante para el cultivador de papaya puesto que implica costos adicionales y dificultades en la planeación del

cultivo, especialmente en plantaciones donde se requiere solamente plantas hermafroditas. La semilla utilizada para plantaciones comerciales segrega en una proporción de 1:1 hembras y hermafroditas. Las plantas hembras producen frutas redondas, mientras que las hermafroditas producen frutas alargadas. Estas frutas alargadas son preferidas por los comercializadores debido a la mayor facilidad para el empaque. Es deseable y muy importante seleccionar plantas de sexo hermafrodita para obtener plantaciones de frutas alargadas en mayor proporción. Por lo tanto, la determinación del sexo de las plántulas antes de llevarlas a campo definitivo sería una ganancia considerable en tiempo, espacio y dinero para el productor. Una vez conocido el sexo, el agricultor determina con qué plantas obtendrá mayores rendimientos y podrá sembrarlas de acuerdo con las exigencias del mercado (Acosta y León, 2003). Por otro lado, la naturaleza dioica, la reversión ocasional del sexo de las flores masculinas y hermafroditas junto con la ausencia de un par heteromórfico de cromosomas sexuales hacen de las plantas de papaya un sistema interesante para estudiar la diferenciación sexual desde el punto de vista molecular (Magdalita y Mercado, 2003; Sánchez y Medina, 2003). Estas técnicas permiten una identificación rápida y confiable, son cómodas y algunas no requieren del conocimiento previo sobre la secuencia que se amplifica.

Compuestos fenólicos

Dentro de las variadas sustancias que se encuentran en los vegetales están los ácidos fenólicos, metabolitos secundarios procedentes de la vía del ácido shikímico, y de gran importancia en las plantas vasculares por ser precursores de las ligninas. (Gross, 1980, citado por Alonso, 1989), ya que estos son originados por polimerización oxidativa de alcoholes cinámicos: p-cumárico, felúrico y sinápico, que derivan de sus respectivos ácidos por reducción enzimática.

Los compuestos fenólicos se clasifican de acuerdo a la complejidad de su estructura en: polifenoles sencillos, benzoquinonas, ácidos polifenólicos, ácidos fenilacéticos, ácidos hidroxicinámicos, fenilpropanoides, cumarinas, isocumarinas, naftoquinonas, xanthonas, estilbenos, antraquinonas, flavonoides y lignanos. Los más conocidos y ampliamente distribuidos en las plantas es el grupo de los flavonoides y terpenos.

La estructura común de los flavonoides consiste en dos anillos aromáticos, se los encuentra en la naturaleza de manera glicosilada y derivados licosilados. Dentro del grupo de los flavonoides, se sabe que el rango máximo de absorción a ondas longitudinales: flavononas (280 - 290 nm), flavononas (304-350 nm), flavonoles (352 - 385 nm) (Harborne, 1985).

De acuerdo con Jindal & Singh, 1975; citado por Bernal (1988), los compuestos fenólicos de *Carica papaya*, fueron determinados en las hojas, peciolo y corteza de dos cultivares, el mismo tipo de fenólicos se aislaron de las plantas masculinas y femeninas. Sin embargo, se observó una marcada diferencia entre los órganos de las plantas de diferentes cultivares. Los importantes compuestos fenólicos libres y unidos extraídos después de la hidrólisis ácida y alcalina fueron el ácido cafeico, el ácido gentísico, el ácido m-cumárico, el ácido p-cumárico, el ácido salicílico y la quercetina. No se identificaron cuatro compuestos fenólicos. Las cantidades de compuestos fenólicos libres, ácidos hidrolizables y alcalinos hidrolizables fueron considerablemente mayores en las plantas masculinas.

Las frutas y hortalizas poseen un alto potencial nutricional y terapéutico, debido a la presencia de diferentes fotoquímicos, como los compuestos fenólicos que han sido relacionados con la actividad antioxidante, en efecto, Alonso, 1989, reporta que el término fenoles de las plantas debería ser el más adecuado, sin embargo, ha sido cambiado por polifenoles, debido a su utilización en el campo nutricional, la industria agrícola,

cosmética y de alimentos. Los polifenoles son estructuras complejas y son los antioxidantes de mayor consumo en la dieta de humanos.

Por su parte, Quideau, 2011, los compuestos polifenólicos son un grupo cercano a 8 000 sustancias que pueden ser clasificados de acuerdo con su estructura. Entre los más importantes están los flavonoides, que poseen una estructura básica C6-C3-C6, como las antocianinas, catequinas y epicatequinas. El subgrupo de los fenilpropanoides que incluye los derivados del ácido hidroxicinámico, como cafeico, ferúlico, sinápico y p-cumárico; estilbenoides, como el resveratrol, y derivados del ácido benzoico, como el gálico y algunos ácidos elágicos, entre otros. Además, hay un grupo de moléculas simples, como los ácidos fenólicos y más complejas, como los taninos. Los polifenoles se encuentran generalmente glicosidados y por eso son generalmente solubles en agua. Los polifenoles en las frutas y hortalizas muestran una actividad antioxidante mayor que las vitaminas C y E, y desempeñan un papel importante en la prevención de enfermedades crónicas, tales como desórdenes cardiovasculares y neurodegenerativos, cáncer, diabetes tipo 2, osteoporosis, antimutagénicos y antitumorales.

Métodos para determinar fenoles totales

Muñoz 2006, realizó un experimento para determinar compuestos fenólicos totales, según el método propuesto por Price y Buttlar (1977), que consistió en hacer reaccionar 1 mL del extracto etanólico (10 mg/mL) con 3 mL de FeCl_3 0,1 M en HCl 0,1N, dejándolo actuar durante unos minutos y posteriormente se adicionó 3 mL de ferricianuro de potasio $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ a una concentración de 0,008 M. Las lecturas fueron realizadas en el Espectrofotómetro Shimatzu modelo UV-1700, con interfase a PC, el detector UV-Vis trabajó a 720 nm de longitud de onda, los resultados fueron expresados en miligramos de quercetina equivalente.

Zapata et al 2014, determinaron el contenido de fenoles totales el método de Folin-Ciocalteu, este método cuantifica el poder reductor de los compuestos fenólicos sobre el reactivo Folin-Ciocalteu, mediante la formación de un complejo azul que se lee a 760 nm. En un tubo de reacción se adicionaron 50 μL del extracto hidrofílico, 425 μL de agua destilada y 125 μL del reactivo Folin-Ciocalteu (grado analítico, Merck). Se agitó y luego se dejó en reposo por 6 min. Posteriormente se adicionaron 400 μL de Na_2CO_3 al 7,1%. Después de una hora en la oscuridad se leyó la absorbancia a 760 nm. Se usaron soluciones de ácido gálico, entre 50-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para construir la curva de calibración. Los resultados se expresaron como mg de ácido gálico/100 g de muestra liofilizada en base seca.

El contenido de fenoles totales se determinó por el método colorimétrico de Singleton y Rossi, citado por Palomino et al., 2009 con algunas modificaciones. En un tubo de reacción se adicionaron 50 μL de solución etanólica de propóleo, 800 μL de agua y 100 μL de reactivo FolinCiocalteu; se agitó y luego se dejó en reposo por 8 minutos. Posteriormente se adicionaron 50 μL de Na_2CO_3 al 20%. Después de 1 hora en la oscuridad se leyó la absorbancia a 760 nm. Se usaron soluciones de ácido gálico entre 50 - 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para construir la curva de calibración ($r^2 = 0,995$). Los resultados se expresaron como mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de EEP; los valores se presentan como la media de los análisis realizados por triplicado \pm desviación estándar (DE). El contenido de flavonoides totales en los extractos etanólicos fue determinado por el método de Kumazawa et al, 2004. A una alícuota de 0,5 mL de solución de propóleo, se le adicionaron 0,5 mL de solución etanólica de AlCl_3 al 2%. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, la absorbancia fue medida a 420 nm. Se usaron soluciones de quercetina entre 5 - 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para construir la curva de calibración ($r^2 = 0,994$). El contenido de flavonoides totales fue calculado como mg equivalentes de

quercetina (QE)/g de EEP. Este procedimiento se efectuó con cada uno de los propóleos objeto de estudio por triplicado. Los valores presentados corresponden a la media \pm desviación estándar (DE).

Yábar, Chirinos y Campos, 2018, evaluaron el perfil HPLC-PDA de los compuestos fenólicos, su contenido y capacidad antioxidante en los extractos de los hipocótilos de maca amarilla, roja y negra durante las etapas de pre-cosecha, cosecha y secado natural post-cosecha. De la pre-cosecha al secado natural post-cosecha, en los tres ecotipos, se observó un incremento significativo de los compuestos fenólicos totales y su capacidad antioxidante. En la cosecha, la maca roja presentó la mayor concentración de compuestos fenólicos. Los análisis HPLC-PDA revelaron la prevalencia de 11 compuestos fenólicos, pero con diferentes concentraciones en cada ecotipo y en cada etapa de estudio, seis derivados del flavanol (flavan-3-ol), cuatro derivados del ácido benzoico y un derivado del ácido *o*-cumárico. El secado post-cosecha en condiciones naturales, generó una pérdida significativa (maca amarilla 89,90%, maca roja 82,49% y maca negra 66,31%) de compuestos fenólicos, principalmente derivados del ácido benzoico y *o*-cumárico, llegando a límites no detectables, toleraron estas condiciones dos derivados del flavanol (flavan-3-ol). Los resultados del estudio sugieren mejorar el manejo post-cosecha para preservar el contenido de compuestos fenólicos.

Metodología PCR para sexado

La mayoría de los sistemas evaluados distinguen plantas hembra de plantas macho pero no de plantas hermafroditas y no son aptos para el análisis de grandes grupos de muestras. Esto ha generado interés por desarrollar estrategias de identificación del sexo en papaya a través de marcadores moleculares, particularmente mediante la aplicación de técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés). Varios autores han diseñado iniciadores de PCR a partir de marcadores moleculares que permiten

el diagnóstico del sexo de plantas de papaya en estados tempranos de desarrollo (Chaves y Nuñez, 2007).

Saalau-Rofas et al., al 2009, identificaron mediante PCR el sexo de la papaya (*Carica papaya* L.), híbrido “Pococí”, utilizando el protocolo descrito por Deputy et al., 2002 con algunas modificaciones. Esta metodología emplea un PCR múltiple que permite la amplificación simultánea de dos fragmentos (1.300 y 800 pb respectivamente) para plantas hermafroditas y de un solo fragmento (1.300 pb) para plantas femeninas. El ADN se extrajo a partir de hojas de plantas de invernadero o campo con dos metodologías de extracción, CTAB y lisis alcalina (NaOH). La amplificación por PCR del ADN extraído de muestras foliares de papaya híbrido “Pococí”, con ambos métodos de extracción, produjo los fragmentos del tamaño esperado. La determinación del sexo de 1 500 plántulas en almácigo mostró un 46 % de plántulas hermafroditas y un 54 % de plantas femeninas. La proporción observada de plantas femeninas: hermafroditas no varió de la esperada (1:1) según la prueba de chi-cuadrado ($p= 0,4237$). Las plantas hermafroditas fueron llevadas al campo y al momento de la floración se determinó su sexo. La correspondencia entre el sexado por PCR y la expresión sexual en campo fue de un 98 %.

2.4. PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE *C. papaya*, *C. pubescens* y *C. pentagona*

Existen diversas formas de propagar *C. papaya*, sin embargo, desde el punto de vista comercial, el uso de semilla sexual es el más generalizado a pesar de las dificultades que se presentan al obtenerse plantas de diferente sexo y que a veces las plantas resultantes no reproducen exactamente las características de la planta originaria. La propagación vegetativa por medio de estacas o injertos no brindan los efectos deseados, las primeras son de lento desarrollo y las segundas degeneran y no mantienen las características. (Franciosi, 1992).

Una forma de obtener plantas libres de patógenos es a través del cultivo *in vitro* de meristemas que se fundamenta en el hecho de que la distribución de los microorganismos (virus, bacterias y micoplasmas) en los tejidos de la planta no es uniforme y su concentración tiende a disminuir progresivamente hacia el ápice del tallo (Jiménez 1998; Escalante 2016). Con el estudio de los procesos que ocurren en el cultivo de tejidos de la papaya se han desarrollado técnicas de micropropagación por organogénesis.

La micropropagación clonal permite obtener gran cantidad de plantas partiendo de un explanta inicial. Al ser pequeño dicho explanta no es necesario espacios grandes lo que permite la propagación de clones a escala comercial.

La micropropagación bajo condiciones asépticas es una de las mayores ventajas, porque una vez que la planta ha sido establecida *in vitro*, esta se puede multiplicar sin pérdidas por contaminación fúngica, bacteriana u otros microorganismos. Incluso los métodos de micropropagación son muy viables para obtener plantas libres de enfermedades causadas por virus, es decir plantas libres de virus certificadas (George et al., 2008).

Los factores como las sales, los reguladores de crecimiento, la luz, y la temperatura se pueden controlar, lo que permite obtener mayor cantidad de plantas, a diferencia de las condiciones en campo en donde su desarrollo se puede ver limitado. También es posible obtener clones de plantas que naturalmente tienen dificultades o un crecimiento muy lento para su propagación vegetativa (Talavera, 2009).

Debido al incremento de la población mundial, en los últimos años se ha acentuado el interés por la biotecnología vegetal con el propósito de producir alimentos, mejorar cultivares, adaptarlos a diferentes condiciones climáticas y edafológicas y obtener metabolitos de interés comercial (Pérez Ponce, 1998). En este contexto, el cultivo de tejidos vegetales ha merecido especial atención debido a que comprende un grupo heterogéneo de técnicas que permiten el cultivo en condiciones asépticas de órganos,

tejidos o células en un medio de composición química definida e incubados en condiciones ambientales controladas (Roca & Mroginski, 1991; Pérez Ponce, 1998; Talavera, 2009; Escalante, 2016). Las razones que determinan que el cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales constituya una tecnología interesante para la producción de plantas y productos naturales de interés, son las siguientes: 1) la producción de plantas de sanidad controlada, lo que permite incrementos en los rendimientos, 2) la independencia del clima, suelo, distribución geográfica y problemas socio-políticos, 3) la capacidad de establecer un sistema de producción definido, en relación a las demandas del mercado, 4) el cultivo de especies no domesticadas y/o difíciles de cultivar a campo, 5) la conservación del germoplasma de plantas de interés comercial o en vías de extinción, 6) la posibilidad de establecer programas de mejoramiento genético, más rápidos que en los cultivos tradicionales, por técnicas biotecnológicas e ingeniería genética, 7) la producción de compuestos químicos conocidos provenientes de plantas de crecimiento lento o difíciles de obtener por extracción o por síntesis química, 8) la síntesis de nuevos productos químicos expresados únicamente en los cultivos *in vitro*, 9) la obtención de enzimas y sistemas de biotransformaciones para ser usados solos o combinados con síntesis química y 10) la producción de plantas transgénicas resistentes a patógenos, a herbicidas o a estrés abiótico, con mejor calidad nutricional, que actúen como biorreactores en la producción de proteínas, carbohidratos o lípidos o que secuestren metales pesados de suelos contaminados, entre otras aplicaciones.

Técnicas de Cultivo *in vitro*

Aunque actualmente se cuenta con una literatura detallada de técnicas de cultivos vegetales *in vitro*, con los protocolos correspondientes a muchas especies vegetales (Conger, 1987, Roca & Mroginski, 1991; Talavera, 2009), existen especies en las cuales el establecimiento, multiplicación y cultivo *in vitro* de los cultivos es dificultoso y se

requiere una intensa tarea experimental para lograr su micropropagación o para obtener callos o suspensiones capaces de producir los metabolitos deseados. Los medios nutritivos para el cultivo de células y tejidos vegetales son, en general, menos complejos que los de cultivos microbianos y son formulados en forma más o menos empírica. Si bien se desarrollan periódicamente nuevas fórmulas comerciales, no existe hasta el presente un diseño racional que tenga en cuenta la composición centesimal de la célula vegetal y el conjunto de condiciones que controlan el crecimiento y la diferenciación. No obstante, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y complementarlo con diferentes componentes y reguladores de crecimiento para llegar empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido las mejores condiciones para su crecimiento y producción.

Medios de cultivo

Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales *in vitro* (Heller, 1953 y 1954; Murashige & Skoog, 1962; Gamborg, 1968 y 1970; Schenk & Hildebrandt, 1972; De Fossard, 1976). Estos medios de cultivo constan de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento. La composición mineral se define en forma precisa en cada uno de los medios y está dada tanto por los macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca) como por los microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe). Estos nutrientes deben estar en una concentración tal que permita el adecuado crecimiento celular. Los requerimientos de nitrógeno son generalmente provistos por una mezcla de nitrato y amonio en concentraciones variables entre 3 y 50 mM. Cuando estas fuentes son suplementadas en forma individual se afectan, generalmente en forma negativa, tanto el crecimiento del cultivo como la producción de metabolitos. Pero, dado que el uso de nitrato exige una mayor demanda energética para la asimilación del nitrógeno si se compara con el amonio, algunas explantas crecen mejor

si se les suministra nitrógeno reducido, recomendándose en este caso la adición de un ácido orgánico como el succinato como agente bufferante.

El medio 1)MS (Murashige& Skoog, 1962) presenta altas concentraciones de nitrato, potasio y amonio; 2) el medio B5 (Gamborg et al., 1968) se caracteriza por una alta concentración de nitrato de potasio; 3) los medios MS y SH (Schenk&Hildebrandt, 1972) presentan altas concentraciones de sales comparados con el medio de White (1963); 4) los medios MS y SH contienen hierro formando un quelato con EDTA, mientras que en los medios de White (1963) y de Heller (1953) está como sulfato y cloruro férrico, respectivamente. Si bien las plantas son autótrofas, puede ser necesario añadir al medio de cultivo algunas vitaminas hasta que los cultivos prosperen.

Las vitaminas favorecedoras del desarrollo de cultivos *in vitro* y que se añaden rutinariamente en la mayoría de los medios de cultivo son: tiamina (B1), piridoxina (B6) y ácido nicotínico (Roca y Mroginski 1993). Otras vitaminas que suelen ser útiles son ácido pantoténico, biotina, riboflavina (B2), colina, cianocobalamina (B12) y ácido fólico.

El ácido ascórbico (vitamina C) se considera benéfico en algunos casos, pero probablemente debido más a su capacidad reductora que a su papel como vitamina. Otro compuesto orgánico que promueve el crecimiento de algunos cultivos es el mio-inositol, que está involucrado en la síntesis de fosfolípidos y por lo tanto de sistemas de membranas.

En general se utiliza en una concentración 0,5 mM (Conger, 1987). El papel de los aminoácidos en la nutrición de los tejidos y células vegetales es complejo, ya que los tejidos responden en forma diversa a su suplemento. (Roca y Mroginski 1993). Debido a que las células cultivadas *in vitro* son generalmente heterotróficas respecto de la fuente de carbono, se deben agregar azúcares al medio de cultivo. Estos actúan como fuente energética y de carbono e incrementan el potencial osmótico del medio. La sacarosa, en

concentraciones del 2 al 4 % (p/v), constituye la fuente más utilizada. Otros azúcares capaces de sostener el crecimiento o incrementar la producción de metabolitos son glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y lactosa. En la influencia de la fuente de carbono en el crecimiento y la producción, se observa que el nivel de azúcar puede influenciar a ambos, pero no siempre es previsible su efecto.

En general, el incremento de los niveles de sacarosa favorece el crecimiento y la formación de productos, pero valores superiores al 10 % (p/v) pueden producir represión por catabolitos.

Medio Murashige-Skoog

Aunque la composición del medio de Murashige-Skoog da buenos resultados en el cultivo *in vitro* de la mayoría de las especies, se debe seleccionar una combinación de nutriente en función del conocimiento de la fisiología de la especie, de los resultados experimentales obtenidos, del tipo de cultivo a desarrollar (plántulas, callos, raíces, meristemas, embriones) o del objetivo del trabajo (crecimiento, diferenciación u obtención de metabolitos).

Los reguladores de crecimiento son componentes exclusivos de los medios de cultivos vegetales. El pH inicial de los medios de cultivo se regula, en general, entre pH 5,5 y 6,0, dado que afecta tanto el crecimiento como la producción. Los reguladores del crecimiento vegetal son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones internas, cercanas a 1 mM. A medida que se fueron identificando un mayor número de reguladores de crecimiento y se fueron estudiando sus efectos y concentraciones endógenas se hizo evidente que cada uno de ellos no sólo influye en las respuestas de muchas partes del vegetal, sino que tales respuestas dependen de la especie, del órgano del vegetal, del

estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y de diversos factores ambientales. Por lo tanto, es riesgoso generalizar acerca de los efectos de los reguladores de crecimiento sobre los procesos de crecimiento y desarrollo en un tejido u órgano vegetal en particular.

Reguladores de crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento vegetal son moléculas orgánicas difusibles que modulan procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo eficaces a bajas concentraciones internas, cercanas a 1 mM. A medida que se fueron identificando un mayor número de reguladores de crecimiento y se fueron estudiando sus efectos y concentraciones endógenas se hizo evidente que cada uno de ellos no sólo influye en las respuestas de muchas partes del vegetal, sino que tales respuestas dependen de la especie, del órgano del vegetal, del estado de desarrollo, de las concentraciones endógenas y exógenas, de las interacciones entre reguladores de crecimiento y de diversos factores ambientales. Por lo tanto, es riesgoso generalizar acerca de los efectos de los reguladores de crecimiento sobre los procesos de crecimiento y desarrollo en un tejido u órgano vegetal en particular (Salisbury & Ross, 1994). Los reguladores del crecimiento que resultan útiles para el establecimiento y crecimiento de los cultivos de tejidos vegetales, se agrupan en varias categorías, de acuerdo a su estructura.

Auxinas

Es una familia de sustancias químicas que tienen en común la capacidad de regular el crecimiento, la división celular y la diferenciación de raíces en los cultivos *in vitro*. En las plantas, las auxinas intervienen en el tropismo a la gravedad y a la luz, la dominancia apical, el crecimiento de las partes florales y la diferenciación de los tejidos vasculares (Davies, 1995). Las auxinas más utilizadas son el AIA (ácido indol-3-acético), el

ANA(ácido α -naftalenacético), el 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), el AIB (ácidoindolbutírico), el pCPA (ácido p-clorofenoxiacético) y el BTOA (ácido benzotiazol-2-oxiacético). En cuanto al mecanismo de acción de las auxinas, se conoce que ellas aumentan la plasticidad de la pared celular, lo que permite la expansión de la célula (Abel & Theologis, 1996). La elongación inducida por auxinas se inicia al unirse esta hormona al receptor, probablemente localizado en la cara externa de la membrana plasmática, lo que desencadena una cascada de eventos que determinan la secreción de protones por la célula. Como resultado de esta acidificación, se activan proteínas que rompen los enlaces cruzados entre las moléculas de celulosa y permiten la elongación cuando aumenta la presión de turgencia. Durante este proceso se han detectado cambios en las concentraciones del trifosfato de inositol y del calcio iónico citoplasmático, los que actuarían como segundos mensajeros (Cleland, 1999).

Citocininas

Son derivados de la adenina que promueven la división celular. Entre ellas cabe mencionar las siguientes: BA (bencil adenina), K (cinetina o 6-furfuril aminopurina), Zea (zeatina) y 2-iP (N-isopentenil adenina). Las dos primeras son citocininas sintéticas y las dos últimas naturales. Las citocininas incrementan la tasa de división celular, el transporte de solutos hacia las hojas, semillas, flores y frutos y producen un retardo de la senescencia de las hojas (Salisbury & Ross, 1994). La eficiencia comparativa de dos citocininas (BA y 2-iP) en igual concentración sobre la propagación *in vitro* de *Paeonia suffruticosa* fue estudiada por (Bouza et al., 1993). Los explantes cultivados en BA desarrollan nuevas hojas y yemas axilares asegurando una buena multiplicación vegetativa, mientras que el desarrollo de los explantes cultivados en 2-iP fue escaso. Las respuestas anteriores fueron correlacionadas con los niveles endógenos de AIA y ABA (ácidos abscísico), observando que altas concentraciones de BA se asociaron con baja producción de AIA y

que el ABAse produce más tardíamente en los explantas tratados con BA que en los cultivados con 2-iP. Estos resultados indican que un mismo tejido reacciona de modo diferente ante el estímulo hormonal, aun cuando se trate de compuestos relacionados. La inclusión de citocininas en el medio de cultivo permite formar callos en varias especies vegetales, aunque principalmente induce que regiones meristemáticas multicelulares se diferencien en estructuras organizadas. La proporción entre auxinas y citocininas permite regular la organogénesis o la diferenciación, por lo que se deben programar las concentraciones de auxinas y citocininas a través de diseños factoriales para cada especie y variedad vegetal y según el objetivo del trabajo. En general, cuando la relación auxina/citocinina es alta se forman raíces, cuando es baja se producen vástagos y con relaciones cercanas a 1 se producen callos (Krikorian, 1995). Además de las citocininas derivadas de adenina, se han detectado una serie de fenilureas sustituidas que tienen similar actividad y son utilizados como citocininas en algunos protocolos de cultivo de tejidos vegetales (Krikorian, 1995; Christianson & Hornbuckle, 1999). Tales compuestos son el tiazuron (TDZ), la N, N'-difenilurea (DPU) y la cloropiridilfenilurea (CPPU). El hecho que no se hayan obtenido mutantes de ninguna especie vegetal que sean auxina- o citocinina-deficientes indica que estos dos reguladores de crecimiento son indispensables para el crecimiento vegetal, lo que llevó a postular que tales mutantes serían embriogénica y/o gametofíticamente letales (Gray & Estelle, 1998).

Giberelinas

Las giberelinas (GAs) constituyen una familia de compuestos químicos tetracíclicos diterpenoides que regulan varios procesos del crecimiento y desarrollo como la germinación de semillas, la elongación de tallos, el desarrollo de raíces y la floración (Gray & Estelle, 1998). Se han identificado 64 GAs exclusivos de plantas superiores, 12 GAs que están presentes sólo en hongos del género *Gibberella* y 13 tipos de GAs que se

aíslan de ambos grupos. Tanto en Giberella como en angiospermas se han aislado varios tipos de GAs simultáneamente (Sponsel, 1995). Las GAs se sintetizan a partir de ácido mevalónico en tallos jóvenes y en semillas en desarrollo. Permiten superar la latencia de semillas y brotes, promueven la floración y retardan la senescencia. Los variados efectos de las giberelinas sugieren que tienen más de un sitio de acción primario. Así, si sólo se considera la elongación del tallo en plantas completas, ésta es el resultado de al menos tres acontecimientos coadyuvantes: 1) estímulo de la división celular de las células meristemáticas del ápice del tallo, 2) promoción de la hidrólisis de almidón, fructanos y sacarosa originando monosacáridos que proporcionen energía vía respiración, contribuyan a la formación de la pared celular y disminuyan el potencial hídrico de la célula y 3) incremento de la plasticidad de la pared celular, permitiendo la elongación celular (Salisbury & Ross, 1994). A pesar de la gran cantidad de efectos fisiológicos de las GAs, su uso en los medios de cultivo no está muy difundido. En algunos casos, como en cultivos de zanahoria, se ha demostrado que el GA afecta más la división que el crecimiento celular (Roca y Mroginski 1993).

Ácido Abscísico

El ácido abscísico (ABA) es un regulador de crecimiento cuya tasa de biosíntesis se modifica significativamente frente al estrés fisiológico ocasionado por falta de agua, salinidad del suelo, bajas o altas temperaturas, etc. El ABA provoca respuestas que ayudan a proteger a las plantas contra estos factores, como el cierre de estomas y la producción de proteínas protectoras. También participa en la embriogénesis normal y en la formación de proteínas de almacenamiento en semillas. Estas características pueden utilizarse en cultivo *in vitro* para producir metabolitos de reacción al estrés, para retrasar el crecimiento y para moderar los efectos de auxinas y citocininas (Salisbury & Ross, 1994).

Para Escalante 1989, la micropropagación o propagación clonal, es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*, a través de la micropropagación, a partir de un fragmento (explanta) de una planta madre, se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones.

El explanta más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas.

Los frascos que contienen las plantas se ubican en estantes con luz artificial dentro de la cámara de crecimiento, donde se fija la temperatura en valores que oscilan entre los 21 y 23°C, además de controlar la cantidad de horas de luz. Por su parte, el medio de cultivo se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas reguladoras de crecimiento, azúcar, agua y agar. La composición del medio depende de la especie vegetal y de la etapa del proceso de micropropagación.

El cultivo *in vitro* de plantas involucra varias técnicas para regenerar material vegetal en condiciones controladas, esto es factible por la totipotencia que presentan las células vegetales. La propagación de copias idénticamente genéticas de un determinado cultivo se denomina propagación clonal, y la población de plantas derivadas de un solo individuo se denomina clon. Una de las mayores ventajas de la propagación clonal o micropropagación de plantas, es la capacidad de obtener un gran número de plantas genéticamente idénticas en un tiempo y espacio corto partiendo de un genotipo selecto (Escalante, 2016).

Jiménez (1998) indica que los ápices y meristemos que son empleados como material inicial para el cultivo *in vitro*, son áreas de síntesis de auxinas por lo que la concentración endógena es alta y que normalmente cuando se emplean ápices no se adicionan auxinas al medio de cultivo, aunque estos pueden estimular el crecimiento, pero cuando se

emplean meristemas es frecuente que no exista suficiente auxina endógena siendo necesaria la adición exógena.

Según Lima (1991), en el cultivo de *C. papaya*, existe necesidad de un suministro constante de semillas certificadas para mantener las plantaciones activas en condiciones de campo, pero la poca homogeneidad de las plantas en cuanto a la producción de los frutos elongata para la extracción de la semilla constituye el principal problema. Por lo que se hace necesario buscar nuevas alternativas para la multiplicación de este cultivo que posibilite la obtención de un método de propagación masiva *in vitro* para garantizar la multiplicación de plantas *plus* hermafrodita.

Bases teóricas

Definición de términos básicos

LÀTEX: El látex es un fluido lechoso compuesto por un suero líquido que contiene en suspensión o en solución, una mezcla compleja de componentes; el látex de las Caricáceas es un fluido tixotrópico que se encuentra almacenado principalmente en vasos latíferos distribuidos debajo del exocarpo de la fruta (El Moussaoui y cols., 2001). Los laticíferos se encuentran bajo presión positiva, por lo cual, una incisión sobre éstos, resulta en una rápida emisión del látex hacia el exterior. (Bernal, 1988).

El látex de papaya consiste en una mezcla de proteasas o enzimas. Monti y Basilio, 2000 demostró la existencia de cuatro componentes principales con actividad proteolítica:

-papaína

-quimiopapaína

-lisozima

-material no caracterizado en las proteínas solubles del látex.

Juntas estas proteínas son más o menos el 64% de las proteínas solubles del látex.

CENTRIFUGAR: Someter una masa, un líquido, etc., a la acción de una centrifugadora. La centrifugación puede ser definida como el proceso de resolver sistemas de multicomponentes, con al menos una de las fases líquidas, por la aplicación de la fuerza centrífuga. (Domínguez, 1978; Lock, 1988)

ANTIOXIDANTE: El término antioxidante hace referencia a cualquier sustancia que, estando presente a una concentración baja, comparada con la de un sustrato oxidable, es capaz de retrasar o prevenir la oxidación de dicho sustrato (Domínguez, 1978).

Los antioxidantes son sustancias capaces de interrumpir la cadena de radicales cediendo un radical hidrogeno a un radical libre (Cheftel et al., 1988).

FENOLES: Los fenoles son metabolitos secundarios cuya concentración es variable a lo largo del ciclo vegetativo de los cultivos, estos participan de diversas funciones, tales como la asimilación de nutrientes, la síntesis proteica, la actividad enzimática, la fotosíntesis, la formación de componentes estructurales, la alelopatía y la defensa ante los factores adversos del ambiente (Robbins, 2003).

Los compuestos fenólicos son un grupo de sustancias encontradas en frutos y vegetales, caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. Estructuralmente están constituidos por un anillo aromático, bencénico, con uno o más grupos hidroxilos incluyendo derivados funcionales.

ABSORBANCIA: Cada sustancia tiene su propio espectro de absorción, el cual es una curva que muestra la cantidad de energía radiante absorbida, Absorbancia, por la sustancia en cada longitud de onda del espectro electromagnético, es decir, a una determinada longitud de onda de la energía radiante, cada sustancia absorbe una cantidad de radiación que es distinta a la que absorbe otro compuesto. (Domínguez, 1978).

La medida de la absorbancia de una solución es usada con mucha frecuencia en laboratorio clínico, para determinar la concentración de analitos tales como colesterol,

glucosa, creatinina y triglicéridos en sangre. Cada uno de estos analitos se hace reaccionar químicamente con determinados compuestos, a fin de obtener una solución coloreada. A mayor intensidad de color, mayor será la absorbancia de la solución en una determinada longitud de onda. La absorbancia es entonces directamente proporcional a la concentración del analito en sangre.

NANÓMETRO: El nanómetro es la unidad de longitud del Sistema Internacional de Unidades (SI) que equivale a unas mil millonésimas partes de un metro ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) o a la millonésima parte de un milímetro. El símbolo del nanómetro es nm, se utiliza para medir radiaciones (Cheftel, 2000).

MICROPROPAGACION *IN VITRO*: Es el conjunto de técnicas y métodos de cultivo de tejidos utilizados para multiplicar plantas asexualmente en forma rápida, eficiente y en grandes cantidades.

Se utiliza para multiplicar o propagar plantas nuevas, tales como aquellas creadas por la ingeniería genética, mutagénesis o mejoramiento genético; asimismo se emplea comúnmente la micropropagación para obtener plantas libres de enfermedades (tales como virosis) u obtener grandes cantidades de plantas que no se propagan eficientemente. (Roca y Mroginski, 1993; Baca, 2002)

EXPLANTA: Es la porción de tejido vivo separado de su órgano propio y transferido a un medio artificial de crecimiento, en el caso particular de la biotecnología vegetal, el explanta es un pequeño fragmento de una planta que se escinde y se prepara de forma aséptica para su cultivo en un medio nutritivo y que, por ende, funciona como generadora de nuevas plantas a través de cultivo de tejidos *in vitro*. (Escalante, 2016)

MEDIO DE CULTIVO: Constituyen un elemento fundamental para el cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos para lograr el desarrollo de los mismos *in vitro*. Los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia y

concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización (Escalante, 2016). Los medios de cultivo están constituidos por sustancias minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares, reguladores del crecimiento y otros elementos.

El cultivo de células, tejidos y órganos de la planta *in vitro* se realiza en medios de cultivos artificiales, lo cuales proporcionan los nutrientes necesarios que la planta toma de la tierra en su hábitat natural y precisamente el éxito de este tipo de cultivo está influenciado grandemente por la naturaleza del medio de cultivo utilizado y otros factores ambientales.

ORGANOGENESIS: La organogénesis consiste en la formación de un primordio unipolar a partir de una yema y el desarrollo de ese primordio en brotes vegetativos que luego enraízan vía la formación y proliferación de meristemas radicales. Los brotes pueden formarse directamente de la planta (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos (Jiménez, 1998). La organogénesis se desarrolla por inoculación de tejido meristemático estéril (yemas axilares o adventicias) en un medio suplementado con niveles óptimos de sales, de compuestos orgánicos y de reguladores de crecimiento. La calidad y cantidad de los componentes del medio dependerá de la especie y del explante que se quiera cultivar *in vitro* dado que la inducción de un tipo específico de órgano involucra señales aun poco conocidas.

CÁMARA DE FLUJO LAMINAR: Es un recinto que emplea un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro de alta eficiencia HEPA, capaz de no dejar pasar partículas mayores de 0,3 micrómetros, y clasificado metrológicamente hasta una eficiencia mínima del 99,97% según la norma europea EN1822 H12. Se puede llegar hasta una eficiencia mínima del 99,999%, en un filtro HEPA que cumpla la norma europea EN1822 H14.

La velocidad del ventilador es regulada por un controlador electrónico de forma que se alcance la velocidad del aire, y por tanto la presión adecuada, necesaria para que el flujo de aire en el área de trabajo sea laminar. El valor de la presión viene indicado en el manómetro instalado en el exterior de la cabina. (Reyes I, 2015).

Las cámaras de flujo laminar pueden tener una lámpara de rayos ultravioleta-C con acción germicida para esterilizar el recinto y su contenido.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

La fase experimental de la investigación correspondiente a evaluación del contenido de papaína en *C. papaya*, *C. pubescens* y *C. pentagona*, y determinación del contenido de fenoles totales en *C. papaya* como indicador de sexo, se desarrolló en el Laboratorio de Química y Suelos, Facultad de Ciencias Agrarias, en tanto, la propagación *in vitro* de las tres Caricáceas en estudio, se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Facultad de Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Tumbes, ubicado en el Campus Universitario La Cruz, Tumbes -Perú, entre los meses de febrero a setiembre del 2000.

3.2. MATERIALES

Material de laboratorio

- tubos de ensayo
- matraces
- erlenmeyer
- pinzas
- Papel Whatman N° 2
- bisturí,
- beakers
- placas Petri
- pizetas de 120 y 150ml
- gotero

- guantes de caucho
- probetas
- pipetas,
- tubos centrífuga
- centrífuga
- cuchillo de acero (incisor)
- recipientes de porcelana
- lienzo
- dispensador de medios
- algodón
- papel aluminio
- parafilm
- plumones marcadores de vidrio.

Material biológico

- Frutos al estado verde inmaduro de *C. papaya*, *C. pubescens* y *C. pentagona*
- Hojas al estado fresco de *C. papaya*
- Explantas (yemas apicales y axilares), obtenidas en plantas de *C. papaya*, *C. pubescens* y *C. pentagona*.

Reactivos

- Sulfito de sodio
- Citrato de sodio
- HCl 2N
- Etanol 95%
- Metanol

- Ferricianuro de potasio
- hipoclorito de sodio
- alcohol etílico
- medios de cultivo

Equipo de laboratorio:

- pH metro
- cámara de flujo laminar
- cámara de incubación *in vitro*
- centrifuga
- microscopio
- estereoscopio
- destilador de agua
- balanza analítica
- autoclave
- refrigeradora
- estufa
- agitador magnético.
- Baño María
- Espectrofotómetro

3.3. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE PAPAÍNA

En esta fase experimental de la investigación se evaluó el contenido de papaína en *C. papaya*, *C. pubescens* y *C. pentagona*.

Procedencia de las muestras

Para el caso de *C. papaya*, los frutos fueron procedentes del Vivero Frutícola de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Tumbes, se seleccionaron frutos de forma oblonga y de 800 a 1500 g. (fig. 8)

Los frutos de *C. pubescens* procedieron en Chimborazo (Ecuador) se seleccionaron los de forma oblonga acuminada y de peso fluctuante entre 700 y 900 g. (fig. 9)

Para el caso de *C. pentagona*, los frutos fueron procedentes de Ambato - Tungurahua (Ecuador), seleccionando los de forma elipsoidea, de 5 lados destacados y 600 a 900 g de peso. (fig 10).

Preparación de las muestras

Se examinaron 12 frutos de cada una de las especies en estudio (*C. papaya*, *C. pubescens*, *C. pentágona*) que presentaron características deseables (bien desarrollados, sanos y en estado inmaduro), seleccionados de acuerdo a la Clase I, categoría por peso y color, correspondiente a peso mayor de 500g y frutos inmaduros de color verde (tabla 3).

Tabla 3: Categorías de fruto establecidas para discriminar entre frutos aptos (Clase I) y no aptos (Clase II y III) para extracción de látex.

Características	Categoría		
	Clase I	Clase II	Clase III
Peso (g)	>500	<500	Cualquier peso
Color	verde	verde	verde con tonalidades amarillas

Adaptado de Vidal et al., 2009

Extracción del látex fresco del fruto

Antes de hacer las incisiones en cada fruto, se limpió la superficie con un lienzo mojado en una solución de 45 g de sulfito de sodio por medio litro de agua, y luego se hicieron 4 incisiones longitudinales largas de 3mm de profundidad, con un cuchillo de acero inoxidable, enseguida brotó el líquido lechoso (látex), Este látex, tal como fluye de las

vesículas abiertas, es un fluido viscoso incoloro que pronto se vuelve lechoso y coagula después de un minuto.

Se dejó que corra libremente durante unos segundos, el látex exudado fue recogido en un recipiente de porcelana, y luego transferido a una probeta graduada. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Química de la Universidad Nacional de Tumbes, el rendimiento de látex se determinó, luego, volumétricamente.

Extracción látex seco del fruto

Para la extracción de papaína (látex seco), al fruto en estado verde se le hicieron 8 cortes longitudinales superficiales en la cáscara de más o menos 5 mm de profundidad, con el objeto que exuden el látex o leche; aproximadamente 6 horas después, una vez que el látex se ha endurecido, se raspó el fruto.

Acondicionamiento de la muestra

Considerando que el látex es un líquido viscoso y fácilmente se puede deteriorar es conveniente usar aditivos que conserven su calidad, después de su extracción, para ello se adicionó:

- 2.81 g de sulfito de sodio por medio litro de agua, como regulador de pH y antioxidante.
- Citrato de sodio en concentración de 4% P/P, como agente amortiguador de pH, anticoagulante.

El látex se dividió en dos partes, parte acuosa y precipitado, la mayor parte de la papaína se encuentra en la parte acuosa.

En seguida se reguló el pH a 6,8, se centrifugó la muestra a 3000 rpm por 20 minutos.

La parte acuosa se evaporó al vacío y el producto obtenido se juntó con el precipitado para someter el conjunto a una concentración más fuerte por medio de calor suave y al vacío hasta el secamiento.

3.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FENOLES TOTALES EN *C. papaya* COMO INDICADOR DE SEXO

Metodología Espectrofotométrica

Determinación del contenido de fenoles utilizando hojas en estado fresco.

Para la identificación del contenido de fenoles totales en *Carica papaya*, como indicador de sexo, se utilizó el Protocolo introducido por Cejudo, 1978, citado por Alonso 1989; se efectuó determinando el contenido total de fenoles, este análisis se realizó en brotes vegetativos a las 15 semanas posteriores a la germinación.

A fin de obtener una información preliminar de predicción de sexo, se consideró a la Caricácea más importante y conocida, la monoica *C. papaya* L., en la que las plantas productoras de frutos son cultivadas por su rentabilidad.

En el presente experimento se realizó la determinación de fenoles empleando hojas al estado fresco, para ver la posibilidad de determinar plantas femeninas de importancia agrícola.

Acondicionamiento de la muestra

Para ello, se tomaron 5 g de tejido de hojas correspondiente a la variedad *C. papaya*.

Luego se adicionó 30 mL de HC1 2N (agente cromogénico).

Se mantuvo en baño maría en ebullición durante 40 minutos, una vez que alcanzó la temperatura ambiente se filtró a través del papel Whatman 2.

A 5 mL de cada uno de estos extractos se les agregó un mismo volumen de 0,1 mL de Hexaciano ferrato de potasio 0,008 M; se les dejó durante 10 minutos para la formación del Complejo Azul de Prusia.

Se leyó su absorbancia a 254 y 275 nm.

3.5. METODOLOGÍA PARA LA PROPAGACION *IN VITRO*

Método

Esta etapa está orientada a la búsqueda del medio de cultivo más apropiado para la propagación *in vitro* de *Carica sp.*

La primera fase de la micropropagación *in vitro* está determinada a la obtención de frutos de plantas selectas de *C. papaya*. De estos frutos se extrajeron las semillas a las cuales se les eliminó la sarcostesta; posteriormente, estas semillas fueron tratadas por inmersión con una solución de nitrato de potasio al 1,5%, por espacio de 24 horas.

Las semillas luego de haber sido secadas a la sombra fueron almacigadas en un sustrato poroso y desinfectado compuesto por una mezcla de tierra, arena gruesa lavada y estiércol en partes iguales. (fig. 17)

Cuando las plantas alcanzaron un promedio de 12 cm de altura, se procedió a aislar los explantas: yema apical y yemas axilares.

Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo consiste de una mezcla de:

macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca)

microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe,

vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento, azúcar al 2% y agar a 8 g/L.

El pH del medio es ajustado a nivel de 5,7 a 5,8 con KOH o HCl al 1 Normal en agitación.

(tabla 4).

Luego se dispersó 15 ml de medio por un tubo de ensayo (150 mm de longitud por 23 mm de diámetro) cubriéndolos con papel aluminio, enseguida se procedió a la esterilización del medio en autoclave a 120°C con una presión de 1 atmósfera.

Preparación de los explantas

Para el caso de yemas obtenidas de campo, se enjuagaron las yemas en agua corriente mediante una agitación vigorosa, luego en solución Rifamicina 300 mg/L por 24 horas a 100 rpm.

Luego, sumergirlas en hipoclorito (0,3% Cl₂) con Tween 20 (0,1%) por 10 minutos. Se enjuagaron con agua destilada estéril y en una solución estéril de ácido cítrico 2000 + ácido ascórbico 200 mg/L.

De las especies en estudio

En la variedad comercial *C. papaya*, los explantas fueron obtenidos de plantas madre de invernadero.

Para el caso específico de *C. pubescens* y *C. pentagona*, debido a que estas especies no constituyen una variedad comercial, se ha obtenido los explantas de especies del Jardín Botánico de Loja (estas plantas son procedentes de Chimborazo - Ecuador para *C. pubescens* y Ambato, Tungurahua - Ecuador para *C. pentagona*). La identificación de las muestras vegetales se efectuó en la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Tumbes (fig. 7 constancia de identificación de especies, en apéndice).

Para todos los casos se cultivaron las yemas en medio de cultivo en las siguientes condiciones:

- Luz: 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.
- Temperatura: 28°C.
- pH: 5,7

Tabla 4. Medios de cultivo para las tres Caricáceas en estudio

Ingredientes (mg/L)	Fase I	Fase II
Sales Murashige y Skoog	Componentes	Componentes
Vitaminas Schenk - Hildrebrandt		
- Tiamina	5	5
- Ac. Nicotínico	5	5
- Piridoxina	0,5	0,5
Caseína hidrolizada	800	800
Extracto de malta	500	500
Inositol	100	100
ANA	0,1	0,1
BAP	0,5	-
KIN	-	0,5
Sucrosa	30 g	30 g
Agar	8 g	8 g

Mejía, 1992

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación del contenido de papaína

4.1.1. Caracterización del látex

Se ha evidenciado el látex de *Carica* sp como una sustancia ligeramente acida, dado que el pH es de 6,10; este valor ratifica que la enzima papaína no se ha degradado porque está dentro de su rango óptimo 5,5 - 7 (Wong, 1995). Asimismo, los laticíferos se encuentran bajo presión positiva, por lo cual, una incisión sobre éstos, resultó en una rápida emisión del látex hacia el exterior, de acuerdo a lo corroborado por El Moussaoui et al., 2001.

Tabla 5. Determinación del contenido de látex líquido y seco por fruto de *C.papaya* L.

FRUTOS	LÁTEX LIQUIDO (g)	LÁTEX SECO (g)
1	6,70	5,90
2	6,80	6,00
3	7,00	5,80
4	6,90	5,80
5	6,80	6,30
6	7,00	6,20
7	7,00	6,10
8	6,90	5,90
9	6,70	5,70
10	6,80	6,30
11	7,10	6,10
12	6,80	5,90
TOTAL	82,50	72,00

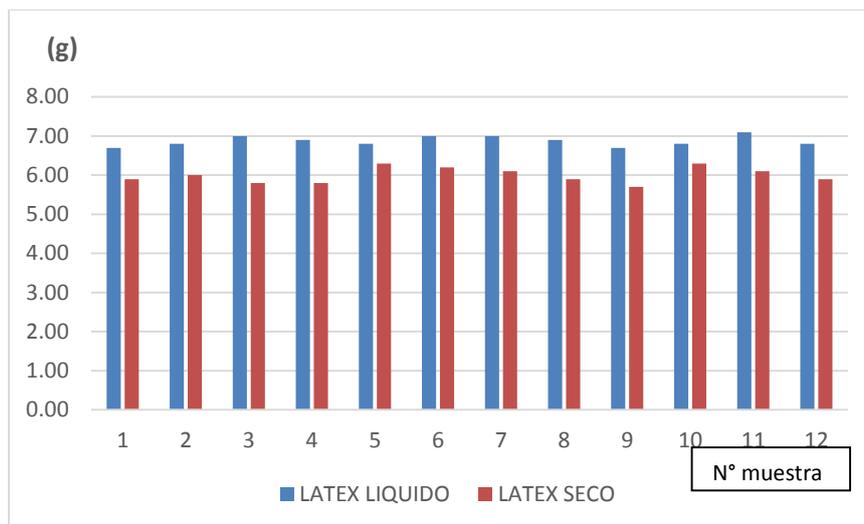


Figura 4. Contenido látex líquido y seco en *C. papaya*

El procedimiento habitual para obtener papaína, consiste en secar el zumo lechoso que exuda la corteza de la papaya verde, en efecto, las tablas 5, 6 y 7 y las figuras 4, 5 y 6, respectivamente, muestran los resultados obtenidos de las exudaciones de 12 frutos, tanto en forma de látex líquido y látex seco granulado “costra carmelita”, para el primer caso se dejó correr la excrecencia; para obtener el látex seco, con la ayuda de un cuchillo de acero inoxidable se raspó la superficie del fruto, para ambos casos se recolectó en recipientes de porcelana.

Los resultados muestran el contenido de papaína cruda obtenida de las tres Caricáceas en estudio, para lo cual se caracterizó y determinó el rendimiento del látex obtenido, en efecto, el rendimiento de látex resulta de la conjugación de dos factores: volumen de látex promedio por fruto y número de frutos verdes promedio; se puede observar que los resultados no presentan variabilidad en la determinación del contenido de látex líquido y látex seco, por fruto.

La papaína a partir de las tres caricáceas en estudio, regularmente se obtiene por purificación del zumo lechoso (látex) coagulado, proveniente de ligeras incisiones longitudinales que se practican en la superficie de los frutos; en efecto, de acuerdo con

Yugcha et al., 2013; la técnica empleada, pretende aportar una metodología que ayude a la obtención del látex conservando la actividad proteolítica de la enzima, toda vez que su potencialidad enzimática difiere con el método de obtención. Si bien en la tabla 5 y figura 4, para el caso de *C. papaya*, no hay diferencia significativa entre frutos, si la hay en la obtención de látex líquido y seco 82,50 g en el primer procedimiento y 72,00 g en el segundo procedimiento.

Tabla 6. Determinación del contenido de látex líquido y seco por fruto de *C. pubescens*

FRUTOS	LÁTEX LÍQUIDO (g)	LÁTEX SECO (g)
1	5,60	4,80
2	5,90	4,80
3	5,20	4,60
4	5,70	4,50
5	5,40	4,90
6	5,40	5,20
7	5,60	4,90
8	6,00	5,20
9	5,70	5,20
10	5,90	4,90
11	5,90	5,10
12	6,00	5,10
TOTAL	68,30	59,20

Igualmente para el caso de *C. pubescens*, no hay diferencia significativa entre el látex producido entre frutos, si hay diferencia entre látex líquido 68,30 g y látex seco 59,20 g. (tabla 6, fig. 5).

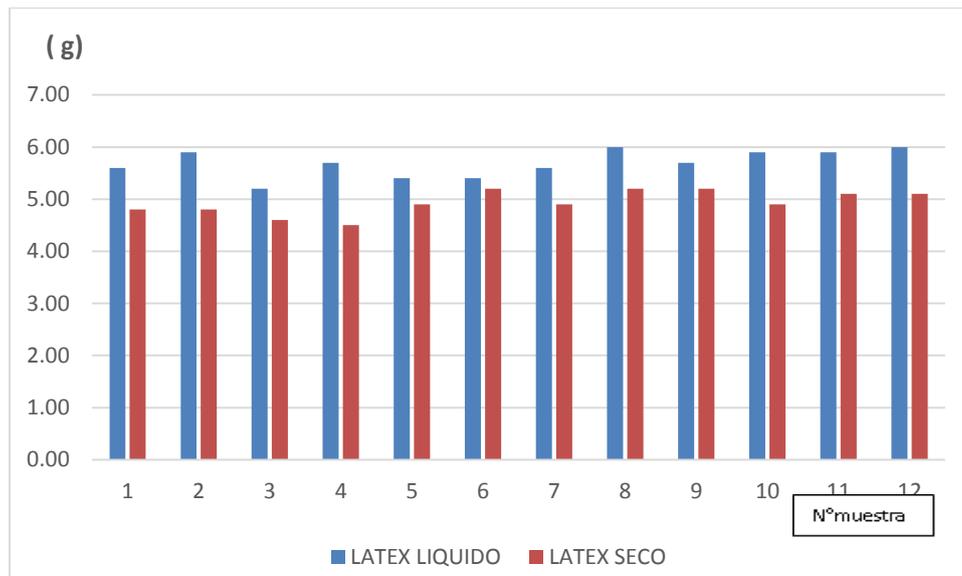


Figura 5. Contenido látex líquido y seco en *C. pubescens*

La mayor dificultad encontrada ha sido la ausencia de referencias a los aspectos esenciales de la naturaleza de la papaína que permiten diseñar procesos de purificación científicos, basado en la naturaleza y propiedades de la enzima.

La mejora de las técnicas de medición y la tecnología disponible han superado las expectativas; sin embargo la investigación realizada no puede ser sustituida y es una herramienta vital para el diseño de cualquier proceso de producción y purificación de papaína, en efecto, la conversión de papaína de la forma inactiva a la activa, ocurre cuando el látex es expelido y alcanza un máximo de actividad proteolítica en menos de dos minutos, después del corte o pinchazo en la superficie del fruto., de acuerdo a lo indicado por Liggieri et al., 2004.

Para el caso de *C. pubescens* (tabla 7, figura 6) si bien no hay diferencia significativa entre frutos, si la hay en la obtención de látex líquido y látex seco 43,60 g en el primer procedimiento y 33,40 g en el segundo procedimiento.

Tabla 7. Determinación del contenido de látex líquido y seco por fruto de *C. pentagona*

FRUTOS	LÁTEX LÍQUIDO (g)	LÁTEX SECO (g)
1	3,70	2,80
2	3,80	2,90
3	3,60	2,90
4	3,90	3,00
5	3,60	2,40
6	3,70	2,80
7	3,70	2,70
8	3,50	2,90
9	3,80	2,60
10	2,90	2,60
11	3,60	2,80
12	3,80	3,00
TOTAL	43,60	33,40

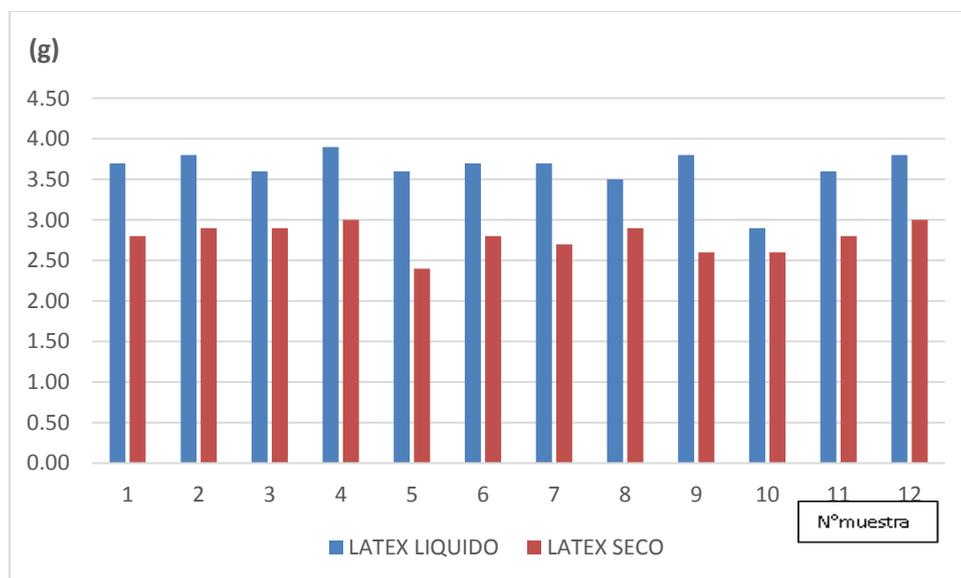


Figura 6. Contenido látex líquido y seco en *C. pentagona*

La adición de la solución antioxidante (bisulfito de sodio) permitió proteger la actividad enzimática del látex, mientras que la adición de solución anticoagulante (citrato de sodio)

permitió obtener látex con mayor fluidez, tanto durante las incisiones como durante el almacenamiento, hasta su tratamiento.

La centrifugación permitió separar el látex en tres fases: una sólida denominada material insoluble, una fase sólida de sobrenadante que comprende impurezas y una fase líquida casi completamente libre de impurezas de los componentes insolubles del látex.

La filtración de la fase líquida proveniente de la centrifugación permitió retirar las últimas fracciones de los compuestos insolubles del látex.

Tabla 8. Contenido de látex líquido (g) en las tres Caricáceas

Fruto	<i>C. papaya</i> L. (g)	<i>C. pubescens</i> (g)	<i>C. pentagona</i> (g)
1	6.70	5.60	3.70
2	6.80	5.90	3.80
3	7.00	5.20	3.60
4	6.90	5.70	3.90
5	6.80	5.40	3.60
6	7.00	5.40	3.70
7	7.00	5.60	3.70
8	6.90	6.00	3.50
9	6.70	5.70	3.80
10	6.80	5.90	2.90
11	7.10	5.90	3.60
12	6.80	6.00	3.80
PROMEDIO	6.88	5.69	3.63
DEVSTD	0.13	0.26	0.26
C.V	1.9%	4.6%	7.1%

Tabla 9. Análisis de varianza para látex líquido

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>GL</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>F 5%</i>	<i>Significancia</i>
Entre grupos	64.5817	2	32.2908	642.5714	3.7679E-27	3.285	Sig.
Dentro de los grupos	1.6583	33	0.0503				
Total	66.2400	35					
C.V. = 4.15%							

Tabla 10. Resultados de la prueba de Duncan 5% del contenido de látex líquido

Caricácea	Prom. Látex líquido (g)	Duncan 5 %
<i>C. papaya L.</i> (g)	6.88	a
<i>C. pubescens</i> (g)	5.69	b
<i>C. pentagona</i> (g)	3.63	c

En tabla 9, la prueba de ANOVA muestra que existe diferencia altamente significativa entre las tres caricáceas con respecto al contenido de látex líquido con un coeficiente de variación de 4,15%; estos resultados se corroboran con la prueba de Duncan la que indica que *C. papaya L.* es la mejor de las tres, con un contenido promedio de látex líquido de 6,88 g. seguida de *C. pubescens* promedio de látex líquido de 5,69 g.

Tabla 11. Contenido de látex seco (g) en las tres Caricáceas

Fruto	<i>C. papaya L.</i> (g)	<i>C. pubescens</i> (g)	<i>C. pentagona</i> (g)
1	5.9	4.8	2.8
2	6	4.8	2.9
3	5.8	4.6	2.9
4	5.8	4.5	3
5	6.3	4.9	2.4
6	6.2	5.2	2.8
7	6.1	4.9	2.7
8	5.9	5.2	2.9
9	5.7	5.2	2.6
10	6.3	4.9	2.6
11	6.1	5.1	2.8
12	5.9	5.1	2.9
PROMEDIO	6.00	4.93	2.78
DEVSTD	0.20	0.23	0.17
C.V	3.3%	4.8%	6.2%

Tabla 12. Análisis de varianza para látex seco

FV	SC	GL	CM	F	Probabilidad	F 5%	Significancia
Entre grupos	64.7872	2	32.3936	780.7590	1.6295E-28	3.285	Sig.
Dentro de los grupos	1.3692	33	0.0415				
Total	66.1564	35					

C.V. = 4.46%

Tabla13. Resultados de la prueba de Duncan 5% del contenido del látex seco

Caricácea	Prom. Látex seco (g)	Duncan 5 %
<i>C. papaya</i> L. (g)	6.00	a
<i>C. pubescens</i> (g)	4.93	b
<i>C. pentagona</i> (g)	2.78	c

En tabla 12, la prueba de ANOVA muestra que existe diferencia altamente significativa entre las tres caricáceas con respecto al contenido de látex seco con un coeficiente de variación de 4,46%. Estos resultados se corroboran con la prueba de Duncan la que indica que *C. papaya* L. es la mejor de las tres, con un contenido promedio de látex seco de 6,00 g. seguida de *C. pubescens* promedio de látex líquido de 4,93 g.

Las tablas 14, 15 y 16, reportan los contenidos de papaína cruda y papaína pura obtenida del látex líquido y seco de las tres caricáceas en estudio.

Tabla 14. Determinación del contenido de papaína cruda y papaína pura (en gramos) de *C. papaya* L

LÀTEX	PAPAÍNA CRUDA	PAPAÍNA PURA
Látex líquido	82,50	16,50
Látex seco	72,00	14,40

Tabla 15. Determinación del contenido de papaína cruda y papaína pura (en gramos) de *C. pubescens*

LÀTEX	PAPAÍNA CRUDA	PAPAÍNA PURA
Látex líquido	68,30	13,40
Látex seco	59,20	11,60

Tabla 16. Determinación del contenido de papaína cruda y papaína pura (en gramos) de *C. pentagona*

LÀTEX	PAPAÍNA CRUDA	PAPAÍNA PURA
Látex líquido	43,60	8,90
Látex seco	33,40	6,80

En las condiciones de laboratorio ensayadas, no se observó diferencias significativas en el producto final, papaína pura, tanto para el látex líquido como para la costra carmelita. Pero si podemos afirmar que hay una pequeña disminución en el contenido de látex seco, probablemente se debe a la manipulación y a que pudieran quedar residuos de las excrecencias en la superficie del fruto.

Se comprobó que los cortes superficiales de 3 mm aproximadamente, permite que las hendiduras cierren rápidamente, no afectando la calidad de la fruta que se cosechó, comercializó y consumió normalmente cuando madura, caso específico de *C. papaya*, obtenida del Vivero Frutícola de la Facultad de Ciencias Agrarias - Universidad Nacional de Tumbes, que luego se comercializó; lo cual es concordante con Yugcha, 2013.

Se carece de información precisa del contenido de este metabolito secundario en *Caricasp* lo que da lugar a un uso no adecuado de éste; asimismo es muy probable la existencia de diferencia cuantitativa en el látex de las especies en estudio. No obstante, los resultados obtenidos nos permiten afirmar que las tres son buenas portadoras de papaína.

Los resultados de papaína pura obtenidos, concuerdan con los análisis efectuados por Pecklot, 1972, citado por Bernal, 1988; quien reporta que un kilogramo de látex produce 200 gramos de papaína pura; sin embargo, los resultados mostrados en las tablas 5, 6 y 7, evidencian una cierta ventaja con el uso de látex líquido, obteniéndose una relativa diferencia en la producción de papaína cruda, 82,5 gramos, comparada con la costra carmelita, 72,0 gramos que contienen 16,50 y 14,40 gramos de papaína pura, para *C.*

papaya; 68,30 g y 59,20 g de papaína cruda, 13,40 y 11,60 g de papaína pura en *C. pubescens*. Para el caso de *C. pentagona*, se obtuvo 43,60 y 33,40 g de papaína cruda, 8,90 y 6,80 de papaína pura.

Es arriesgado sacar conclusiones por cuanto la manipulación necesaria para su extracción, hace difícil su interpretación, pudiendo afirmarse que el uso de látex líquido facilita los procedimientos, por su parte, el látex seco y granulado facilita que las hendiduras cierren más rápidamente no afectando la calidad del fruto.

Después de haber efectuado la evaluación, podemos corroborar que la operación exitosa de extracción de papaína, depende en gran medida de la incisión eficiente, coincidente con lo estudiado por Monti, 2000.

En el proceso de centrifugado, después del cambio de pH, se requiere elevadas aceleraciones, por lo que sería recomendable el uso de una centrifuga continua, si el proceso decide evaluarse a una escala mayor, lo cual es concordante con Stoschek 1999; Vidal 2009.

4.2 Determinación del contenido de fenoles totales en *Carica papaya*

Las Caricáceas y particularmente *C. papaya* presentan sistemas únicos de reproducción a través de los cuales se pueden estudiar la determinación del sexo, la expresión de la masculinidad o feminidad, en efecto, si bien esta Caricácea puede producir únicamente flores femeninas o flores masculinas, o flores hermafroditas, es preciso tener en campo una planta masculina por cada 30 o más plantas femeninas y luego remover el exceso de plantas masculinas tan pronto como puedan ser diferenciados los tipos sexuales, de acuerdo a lo precisado por Mora y Bogantes, 2004.

Asimismo, la investigación fitoquímica ha demostrado que el contenido de fenoles en las hojas se puede utilizar para separar machos de hembras en estado de prefloración, siendo efectivas las pruebas de azul de Prusia y fenoles totales para predecir el sexo de las

plántulas, (Jindal& Singh, 1975, citado por Bernal, 1988); sin embargo, el uso de algunos caracteres vegetativos (forma y tamaño de hojas, ángulo de orientación del pecíolo, longitud y grosor de la base del pecíolo) no han arrojado resultados satisfactorios como indicadores de sexualidad en prefloración, asimismo se ha planteado la existencia de relación entre la morfología y el sexo de la planta y la posibilidad de determinarla antes de la floración. Por otro lado, se somete a comprobación experimental para desterrar algunas de las creencias populares (que las plantas machos florecen primero, que las semillas de la parte media del fruto producen mayor porcentaje de hembras, que la poda de la raíz principal al momento del trasplante o el descope antes de la floración aumentan el porcentaje de plantas femeninas) sobre la relación del sexo en papaya. Una vez conocido el sexo, el agricultor determina con que plantas obtendrá mayores rendimientos y podrá sembrarlas de acuerdo con las exigencias del mercado, corroborado por Acosta y León, 2003.

Para la extracción cuantitativa de compuestos fenólicos en tejidos vegetales, no existe un método que sea totalmente satisfactorio; diversos métodos se han ensayado, Método Price y Buttler, 1997, citado por Muñoz 2006, y Método Folin-Cioalteau, ensayados por Zapata, 2014 y Palomino 2009.

La tabla 17, muestra la concentración de fenoles totales encontrados en 5 muestras de *C. papaya*, podemos apreciar que la mayor concentración corresponde a las plantas masculinas; en el presente experimento es muy probable que la presencia de algunos otros compuestos fenólicos (grupo de compuestos conspicuos) haya pasado inadvertido debido a su exclusión o a sus relativas bajas concentraciones en los extractos obtenidos.

Tabla 17. Absorbancia en ratios a 254 y 275 nm de fenoles totales en hojas *C. papaya* L

MUESTRA N°	PLANTA FEMENINA		PLANTA MASCULINA	
	ABSORBANCIA nm		ABSORBANCIA nm	
	254	275	254	275
1	0,83	1,17	1,70	2,08
2	0,86	1,24	1,68	2,08
3	0,82	1,21	1,62	2,10
4	0,85	1,20	1,60	2,20
5	0,83	1,17	1,61	2,09
Prom	0,84	1,20	1,64	2,11

Por consiguiente, tampoco se puede concluir que existan diferencias de naturaleza cualitativa respecto al contenido de compuestos fenólicos en plantas masculinas y femeninas. Después de haber efectuado estudios preliminares sobre contenido de ácidos fenólicos en *C. papaya*, podemos deducir que el mismo tipo de fenoles están presentes en hojas de plantas masculinas y femeninas, sin embargo, una marcada diferencia se encontró en cuanto a la proporción y cantidad de fenoles totales en los tejidos analizados, 1,20 µg para plantas femeninas y 2,11 µg para plantas masculinas, lo cual es coincidente con Jindal y Singh, 1975, citado por Bernal, 1988.

De confirmarse estas tendencias en futuras investigaciones, podemos asegurar que este método constituye un probable marcador fisiológico para identificación de sexo en hojas de esta caricácea; en efecto, la técnica empleada para la determinación de sexo en *C. papaya* puede tener aplicabilidad dentro de los programas de mejora genética del cultivo, para la determinación del sexo de las líneas utilizadas como padres en los cruzamientos para la obtención de híbridos y en la micropropagación, para evaluar la estabilidad de las líneas hermafroditas. En conclusión, la técnica validada para identificar el sexo de plantas

de papaya, sobre todo, en estados tempranos de su desarrollo, podría ser una herramienta efectiva para planificar la producción de la fruta y obtener mayor productividad por área su uso en la producción comercial depende de un análisis costo/beneficio.

4.3. Propagación *in vitro* de Caricasp

No se observó contaminación en la introducción *in vitro* de yemas apicales y axilares de *Caricasp*. El uso de rifamicina (300 mg/l) por 24 horas e hipoclorito (0,3% Cl₂) con Tween 20 (0,1%) durante 10 minutos resultó ser muy efectivo en la desinfección de explantas, pero es muy importante considerar que la introducción de yemas se hizo a partir de plántulas provenientes de invernadero.

Las tablas 18 y 19, reportan las respuestas de los explantas (yemas apicales, yemas axilares), así mismo su respuesta a las dos combinaciones de los factores de crecimiento en *C. papaya*.

Tabla 18. Respuesta de los explantas (yemas apicales, yemas axilares) *C. papaya*

<i>C. papaya</i>	EXPLANTAS			
	YEMAS APICALES	YEMAS AXILARES	TOTAL	PORCENTAJE
-Explantas sembrados.	30	30	60	100
-No viable.	0	0	0	0
-Explantas muertos.	2	2	5	8,30
-Callo escaso	5	6	11	18,30
-Callo totalmente diferenciado.	27	22	49	81,66
-Callo con 1 o más plántulas.	20	17	37	61,66
-Plántulas enraizadas.	24	22	46	76,66

Tabla 19. Respuesta de los explantas a la combinación de los factores de crecimiento *C. papaya*

<i>C. papaya</i>	EXPLANTAS				TOTAL	PORCENTAJE
	YEMAS APICALES		YEMAS AXILARES			
	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂		
-Explantas sembrados.	15	15	15	15	60	100
-No viable.	0	0	0	0	0	0,00
-Explantas muertos.	0	1	1	2	4	6,00
-Callo escaso	3	2	2	1	8	13,30
-Callo totalmente diferenciado.	16	12	14	10	52	86,66
-Callo con 1 o más plántulas.	7	10	6	12	35	58,33
-Plántulas enraizadas.	13	10	12	9	44	73,33

Dónde: C₁: Combinación ANA, BAP (0,1 - 0,2 mg/l)

C₂: Combinación ANA, BAP (0,2 - 0,5 mg/l)

Para el caso de *C. pubescens*, las respuestas de los explantas (yemas apicales, yemas axilares), asimismo su respuesta a las dos combinaciones de los factores de crecimiento en *C. pubescens*, se aprecian en las tablas 20 y 21 siguientes.

En lo que se refiere al método de propagación *in vitro*, se observó que el factor más importante para las respuestas organogénicas fue el del tipo de explanta inicial (yemas apicales, yemas axilares).

El número de plántulas enraizadas obtenido, tanto para determinar la respuesta de los explantas y en la combinación de los factores de crecimiento, fue muy semejante:

46 por cada 60 plantas y 44 por cada 60 plantas, para *C. papaya*, en tanto que para *C. pubescens* fue 41 por cada 60 plantas y 40 por cada 60 plantas, en tanto que para *C. pentagona* fue 39 por cada 60 plantas y 37 por cada 60 plantas; estos resultados pueden estar referidos a que en estas dos últimas especies los explantas provienen de árboles de campo.

Tabla 20. Respuesta de los explantas (yemas apicales, yemas axilares) *C. pubescens*.

<i>C. pubescens</i>	EXPLANTAS			
	YEMAS APICALES	YEMAS AXILARES	TOTAL	PORCENTAJE
-Explantas sembrados.	30	30	60	100,00
-No viable.	0	0	0	0,00
-Explantas muertos.	3	2	5	8,33
-Callo escaso	5	5	10	16,66
-Callo totalmente diferenciado.	28	23	51	85,00
-Callo con 1 o más plántulas.	19	17	36	60,00
-Plántulas enraizadas.	21	20	41	68,33

Después de dos semanas del cultivo, el 65% de los explantas procedentes de yemas apicales aumentaba de tamaño de un modo muy regular, mientras que esto sucedía más lentamente con las yemas axilares, lo cual es corroborado por Baca, 2002, quien determinó que el explantamás adecuado para el establecimiento *in vitro* de Caricáceas eran los meristemas, asimismo Jiménez, 1998, indica que los ápices y meristemas que son empleados como material inicial para el cultivo *in vitro*, son áreas de síntesis de auxinas, por lo que la concentración endógena es alta, y que normalmente cuando se emplean ápices no se adicionan auxinas al medio de cultivo aunque estos puedan estimular el crecimiento, pero cuando se emplean meristemas es frecuente que no exista suficiente auxina endógena, siendo necesaria la adición exógena.

En efecto, los resultados alcanzados desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo, indican 28 callos totalmente diferenciados, para yemas axilares y 23 para yemas axilares, coincidiendo con la misma concentración de los factores de crecimiento 15 para la concentración ANA, BAP (0,1 - 0,2 mg/L) y 13 para la concentración ANA, BAP (0,2 - 0,5 mg/L).

Tabla 21. Respuesta de los explantas a la combinación de los factores de crecimiento *C. pubescens*.

<i>C. pubescens</i>	EXPLANTAS				TOTAL	PORCENTAJE
	YEMAS APICALES		YEMAS AXILARES			
	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂		
-Explantas sembrados.	15	15	15	15	60	100
-No viable.	0	0	0	0	0	0
-Explantas muertos.	1	1	1	2	5	8,33
-Callo escaso	2	3	2	2	9	15,0
-Callo totalmente diferenciado.	15	12	13	10	50	83,33
-Callo con 1 o más plántulas.	8	10	7	10	35	58,33
-Plántulas enraizadas.	12	9	10	9	40	66,66

Dónde: C₁: Combinación ANA, BAP (0,1 - 0,2 mg/L)
 C₂: Combinación ANA, BAP (0,2 - 0,5 mg/L)

Las tablas 22 y 23 reportan las respuestas de los explantas (yemas apicales, yemas axilares), así mismo su respuesta a las dos combinaciones de los factores de crecimiento en *C. pentagona*.

El desarrollo posterior de los explantas derivó hacia la formación de callo blanco de escasa consistencia, con un aumento de diámetro se alrededor de 0,5 mm/día. El resto de las explantas en crecimiento evolucionaron hacia un callo con una plántula bien desarrollada formada a partir del ápice puesto en el cultivo. En ambos casos se constató la presencia de algunas plantas verdes con neoformaciones en general muy poco vigoroso de las que se aislaron también algunas plántulas.

Tabla 22. Respuesta de los explantas (yemas apicales, yemas axilares) *C. pentagona*.

<i>C. pentagona</i>	EXPLANTAS			
	YEMAS APICALES	YEMAS AXILARES	TOTAL	PORCENTAJE
-Explantas sembrados.	30	30	60	100,00
-No viable.	0	0	0	0
-Explantas muertos.	2	3	5	8,33
-Callo escaso	6	4	10	16,66
-Callo totalmente diferenciado.	28	21	49	81,66
-Callo con 1 o más plántulas.	21	17	38	63,33
-Plántulas enraizadas.	21	18	39	65,00

Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas a partir de meristemos, ápices o yemas. Usualmente en los meristemos y ápices la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de citoquininas en los medios de establecimiento es generalizada (Jiménez, 1998; Baca, 2002).

El tratamiento C₁, el cual resultó ser el más óptimo para el establecimiento *in vitro* de yemas apicales de las tres caricáceas en estudio, contiene en su formulación 0,2 mg/L de BAP, resultados congruentes a los obtenidos por Jiménez, 1998 quien reporta una mayor proliferación de brotes de *C. papaya* empleando BAP como fuente de citoquininas.

Tabla 23. Respuesta de los explantas a la combinación de los factores de crecimiento *C. pentagona*

<i>C. pentagona</i>	EXPLANTAS					
	YEMAS APICALES		YEMAS AXILARES		TOTAL	PORCENTAJE
	C ₁	C ₂	C ₁	C ₂		
-Explantas sembrados.	15	15	15	15	60	100,0
-No viable.	0	0	0	0	0	0,00
-Explantas muertos.	0	1	2	2	5	8,33
-Callo escaso	3	2	2	2	9	15,00
-Callo totalmente diferenciado.	14	13	12	10	49	81,66
-Callo con 1 o más plántulas.	8	9	7	10	34	56,66
-Plántulas enraizadas.	10	11	9	7	33	61,66

Dónde: C₁: Combinación ANA, BAP (0,1 - 0,2 mg/L)
C₂: Combinación ANA, BAP (0,2 - 0,5 mg/L)

El tratamiento C₁, el cual resultó ser el más óptimo para el establecimiento *in vitro* de yemas apicales de las tres caricáceas en estudio, contiene en su formulación 0,2 mg/L de BAP, resultados congruentes a los obtenidos por Jiménez, 1998 quien reporta una mayor proliferación de brotes de *C. papaya* empleando BAP como fuente de citoquininas.

Como se puede apreciar, el BAP a 0,5% causa crecimiento excesivo de las hojas y acortamiento de los entrenudos.

El análisis de los resultados nos indica que la combinación C₁ (ANA 0,1 y BAP 0,2 mg/L), presenta mayor cantidad de callo totalmente diferenciado y mayor número de plántulas enraizadas, a comparación de la combinación C₂ (tablas 21, 23 y 25), estos datos nos indican que la combinación de los reguladores de crecimiento empleados en C₁ son óptimos para el establecimiento *in vitro* de yemas apicales y axilares de *Carica* sp.

La contaminación bacteriana de las explantas no se ha presentado con mucha incidencia mediante la técnica empleada, solamente el 8% a lo largo de todo el experimento llegó a contaminarse.

En definitiva, el desarrollo de una metodología de micropropagación a partir de meristemas apicales es importante para conocer el comportamiento *in vitro* de estas especies en estudio, y apoyar la multiplicación de plantas élite de sexo femenino seleccionadas en campo por sus características fenotípicas especiales; además se puede realizar una cuidadosa selección del material genético, manejar grandes volúmenes de plántulas en espacios reducidos y mantener un stock de plantas libres de enfermedades.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

1. Existe diferencia altamente significativa entre las tres caricáceas con respecto al contenido de látex líquido. La prueba de Duncan indica que *C. papaya* L. es la mejor de las tres, con un contenido promedio de látex líquido de 6,88 g. seguida de *C. pubescens* promedio de látex líquido de 5,69 g.
2. Existe diferencia altamente significativa entre las tres caricáceas con respecto al contenido de látex seco, la prueba de Duncan indica que *C. papaya* L. es la mejor de las tres, con un contenido promedio de látex seco de 6,00 g. seguida de *C. pubescens* promedio de látex líquido de 4,93 g.
3. Con la metodología descrita se obtuvo 16,50; 13,40 y 8,90 g de papaína pura a partir de *C. papaya*, *C. pubescens* y *C. pentagona*, respectivamente. La producción exitosa de esta enzima depende de la aptitud técnica de la extracción, procesamiento y alto rendimiento de látex.
4. Las plantas de *C. papaya* L., mostraron una marcada diferencia en cuanto a proporción y cantidad de fenoles totales en los tejidos analizados, en función al sexo. Así, se determinó 1,20 µg para plantas masculinas y 2,11 µg para plantas femeninas.
5. Los ensayos de micropropagación in vitro muestran que el factor más importante para las respuestas morfogénicas fue el tipo de explanta, las yemas apicales manifestaron una mayor capacidad organogénica. Para *C. papaya* se obtuvo 77%

de plantas enraizadas, en tanto que 68% y 65% se obtuvo para *C. pubescens* y *C. pentagona*, respectivamente. Es preciso indicar que en *C. pentagona*, la mejor proliferación de yemas se obtuvo a los 40 días en un medio Murashige y Skoog, suplementado con vitaminas Schinck-Hildebrandt, ANA y BAP a 0,2 y 0,5 mg/L. La combinación de los factores de crecimiento más efectivo fue el ANA, BAP (0,1 - 0.2 mg/L).

5.2. RECOMENDACIONES

1. Efectuar investigaciones para medir el grado de acción proteolítica de las enzimas contenidas en la papaína, así como para determinar y aislar los diferentes tipos de fenoles de *C. papaya*.
2. Organizar un Banco de Germoplasma de las especies en estudio a fin de evitar la pérdida de cultivares o biotipos, generados por la selección de cultivos y por factores ecológicos.

CAPÍTULO VI

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel S & Theologis A.** 1996. Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* 111: 9-17.
- Acosta, N. y León, G. A.** 2003. Guía ilustrada. Enfermedades y plagas de la papaya Corpoica y Pronatta. Editorial Guadalupe, Bogotá, D. C.
- Alarcón, K.** 2009. Estudios de separación de las proteasas del cuaguayote (*Jacaratia mexicana* A. DC.). Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Yautepec - México
- Alonso, M.** 1989. Análisis comparativo del contenido de ácidos fenólicos libres en hojas y horizonte A del suelo de *Eucalyptus globulus*, *Pinus pinaster* y *Quercus robur*. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias, Madrid - España.
- Álvarez, C et al.** 1998. Algunos constituyentes de *Uncaria guianensis*. *Revista Química.* Vol. II (2): 98 - 104. Departamento de Ciencias. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima -Perú.
- Amirato, P.V., Evans, D.A.; Sharp, W.R. Yamada, Y.** 1984. Handbook of Plant Cell Culture. Mc Millan Publishing Company. New York. Vol 1.
- Baca A.** 2002. Optimización de la micropropagación *in vitro* de *Carica papaya*. Tesis para optar el Grado de Ing. Agrónomo. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima - Perú, 107 p.
- Badillo M.** 1983. Monografía de la familia Caricaceae. Publicada por la Asociación de profesores de la Universidad Central de Venezuela, Maracay, pág. 53,163
- Bernal, M. y Correa J.** 1988. Especies vegetales promisorias del Convenio Andrés Bello (SECAB). Editorial Guadalupe. Bogotá - Colombia, págs. 159 - 267.

- Bouza L, Jacques M, Sotta B & Miginiac E.** 1993. The differential effect of N⁶-benzyl-adenine and N⁶-(Δ^2 -isopentenyl)-adenine on *in vitro* propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. is correlated with different hormone contents. *Plant Cell Rep.* 12:593-596.
- Brako, L. and J. L. Zarucchi.** 1993. Catalogue of the flowering plants gymnosperms of Peru. (Monographs in Systematic Botany Vol. 45.) Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO. 1286 pp.
- Calzada, J.** et al. 1985. Cultivo del papayo. Boletín Técnico N^o 3. Programa de Frutales Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima - Perú, 50 pág.
- Caguana, M., Quindi, B., y Robayo, E.** 2003. El Cultivo de babaco en invernadero (*Caricapentagona*). Quito: AbyaYala.
- Carbajal T. & R. Remuzgo.** 2010. Guía técnica del cultivo del papayo. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. Programa de Biodiversidad. TingoMaría, Perú. 40 pp.
- Conger B.V.** 1981. Cloning Agricultural Plants Via *in vitro* Techniques. CRC. Press Inc. Boca Raton.
- Conover R. and R.E. Litz.** 1978. Progress in breeding papayas with tolerance to papaya rings pot virus. *Pro FlaxStateHort, soc.* 91: 182 - 184.
- Contreras-Esquivel JC, Hours RA, Aguilar CN, Reyes ML.** 1997. Revisión - Extracción microbiológica y enzimática de pectina. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. **47**: 37-45.
- Chaverri, A.** 1986. Comparación de la actividad proteolítica de la papaína secada por diferentes métodos. Tesis presentada para optar el grado de Licenciada en Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica- Costa Rica.
- Chaves-Bedoya, G. y Núñez V.** 2007. A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of *Carica papaya*. *Euphytica* 153, 215-220.

Doi: <https://doi.org/10.1007/s10681-006-9256-7>

Cheftel Jean-Claude. (2000). Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Edit Acribia , Zaragoza- España p. 278-289.

Christianson ML & Hornbuckle JS. 1999. Phenylurea cytokinins assayed for induction of shoot buds in the moss *Funaria Hygrometrica*. *Amer. J. Bot.* 86: 1645-1648.

Cleland R.E. 1999. Auxin and cell elongation. In: *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (PJ Davies, ed.), pp: 214-227. Kluwer Acad.Publ. The Netherlands.

Cuéllar Armando, Scull Ramón, Martínez Yuniel, Fernández Ayme, Monzote Lianet. 2012. Evaluación preliminar de la composición química de las hojas de *Carica papaya* L y del efecto anti protozoario de un extracto enriquecido en alcaloides a partir de la misma. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, Vol. 4, N°. 2, 2012, págs. 364-376.

Davies PJ. 1995. The plant hormones: their nature, occurrence and functions. In: *PlantHormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (PJ Davies, ed.), pp.:1-12. Kluwer Acad. Publ. The Netherlands.

Deputy, JC; Ming R; Ma, H; Fitch, M; Wang, MM; Manshardt, R; Shles, JI.2002 Molecular markers for sex determination in papaya *Carica papaya* L. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 107-111

Domínguez, X.A. 1973. *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Edit. Limusa. México, 281 pág.

Dubey V, Pande M., Singh B, Jagannadham M.2007. Papain-like proteases: Applications of their inhibitors. *Afr. J. Biotechnol.* Vol 6, N° 9: 1077-1086.

Duque B., Carmenza & Morales R., Alicia Lucía. 2005 El aroma frutal de Colombia Univ. Nacional de Colombia. P 135-155.

- El Moussaoui, Nijs M., Pul C. Wintjens R., Vinvetelli J. Azarkan M., Looze Y.** 2001. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defense mechanism. Cellular and Molecular Life Sciences. Apr, 58 (4): 556-70.
- Escalante-Zumaeta, Berardo** 1989. Cultivo *in vitro* de papa. Principios y metodología. Erradicación de patógenos y Micropropagación clonal. Vol I. Editorial e Imprenta El Rosario. Cajamarca - Perú, 107 pág.
- Escalante, Berardo.** 2016. Efecto de tres medios de cultivo y cuatro balances hormonales en la eficiencia del clonaje *in vitro* de orquídea (*Cyrtorchilum macranthum*). Trabajo de investigación, Universidad Nacional de Cajamarca, Perú.
- FAOSTAT, 2017.** Base de datos (en línea): Disponible en:
<http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Falconí C, Brito D.** 1998 Babaco. Proyecto SICA -BANCO MUNDIAL. Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. Quito, pp.12.
- Franciosi R.** 1992. El cultivo del papayo en el Perú. Ediciones Fundeagro. Lima, Perú. 87 pp.
- Freifelder, D.** 1991. Técnicas de bioquímica y Biología Molecular. Edit. Reverte S.A. págs. 179 - 234.
- George, E.F. et al.** 1987. Plant Culture Media. Vol 1: Formulations and uses in Plant Tissue Culture. First Edition. Eastern Press. Ltda. Great Britain.
- Gray WM & Estelle M.** 1998 Biochemical genetics of plant growth. Curr. Opin. Biotechnol. 9: 196-201.
- Giacometti, D.C.; Torres, R.M.** 1997. Mejoramiento genético del papayo. Revista ICA 2(4): 71 - 76.

- Guevara V, Rondon A, Maselli A, Salcedo F, Betancourt J.** 1993. Marchitez bacteriana del lechoso *Carica papaya* L en Venezuela. *Agronomía Tropical*, 43, 107-166.
- Gutiérrez W.** 2002. Efecto de la Densidad de Plantas, la Lámina de Riego y el Método de Control de Malezas sobre el Desarrollo del Lechoso *Carica papaya* L. bajo las Condiciones de la Planicie de Maracaibo. Trabajo de Ascenso. Universidad del Zulia. Venezuela. pp. 3-11
- Harborne, J.** 1985. Introducción a la Bioquímica Ecológica. Editorial Alambra., pág. 280 - 291.
- IBPGR Report. 1984.** Genetic Variability in tissue culture: Impact on Germoplasm. Conservation and utilization. October 1984. Roma - Italia.
- Jiménez González E.** 1998. Cultivo de ápices y meristemas. En J. Pérez (Ed.), Propagación y Mejora genética de plantas por biotecnología (pp. 45-56). Cuba. Ediciones GEO.
- Kaarsholm M., Shack P.** 2005. Characterization of papaya peptidase A as an enzyme of extreme basicity. Publication of U.S National Institutes of Health. 2005.
- Khuspe and Hendre, A.** 1980. Utilization of tissue culture to isolate interspecific hybridus in *Carica* L, pág. 198 - 205.
- Krikorian** 1991. Hormonas in tissue culture and micropropagation. In *Plant Hormones, Physiology Biochemistry and Molecular Biology*. Pp: 774-796. The Netherlands.
- Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T.** 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 84 (3): 329-339.
- Liggieri C., Arribere C., Trejo S., Canals F., Aviles & Priolo N.** 2004. Purification and biochemical characterization of Asclepain from the latex of *Asclepias curassavica* L the *Protein Journal*. 23 (6):403-411.

- Lima, H.**1991. Resultados obtenidos en las investigaciones de la Estación Nacional de frutales. Laboratorio de Cultivo *in vitro* diagnóstico del Instituto de Investigaciones de cítricos y otros frutales. Laboratorio. Informe para presentar al Ministerio de la Agricultura. La Habana. pp. 15-18.
- Lock, O** 1988. Investigación fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima - Perú, 213 pág.
- Magdalita, PM; Mercado, CP.** 2003. Determination the sex of papaya for improved produced. FoodFertilizer Technology Centre for theAsian and Pacific Region Los Baños College,Lagunas, Philippines.
- Disponible en: <http://ww.agnet.org/library/article/eb534html>.
- Mark J.** 2007. Bioquímica, Barcelona- España.
- Mejía, R.** 1992. Agrobiotecnología: Fundamentos y Aplicaciones. Propagación comercial de 312 especies de plantas por cultivo *in vitro*. Lima - Perú.
- Mejía, R. Vitorelli, C.** 1988. Cultivo *in vitro* de plantas de papa. Primera edición, Lima - Perú, 112 pág.
- Montenegro, F.** 2009. Cultivo de babaco (*Caricapentagona* H) bajo invernadero <https://www.engormix.com/agricultura/articulos/cultivo-babaco-carica-pentagona-t27813.htm>, consultado en julio 2014.
- Monti, R.; Basilio, C. A.** et al. (2000). “Purification of papain from fresh latex of *Carica papaya*”.Brazilian Archives of Biology and Technology 43, 2000.
- Mora, E; Bogantes, A.** 2004.Evaluación de híbridos de papaya (*Carica papaya* L.) en Pococí, Limón, Costa Rica. Agronomía Mesoamericana 15(1):39-44.
- Morales A, Duque C.**1987.Aroma constituents of fruit of the mountain papaya (*Caricapubescens*) from Colombia.J.Agric.Food Chem 1987; 35:538-40.

Morton, J. 1987. Papaya Fruits of warmclimates. NeglectedCrops; Miami, pag. 336 - 346.

Muñoz, Ana. 2006. Estudio químico-bromatológico del fruto de *Carica monoica* Desf. “chamburú” y los efectos de su ingesta en el crecimiento y el perfil bioquímico de las ratas, Tesis para optar al grado académico de doctora en Farmacia y Bioquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima -Perú.

Murashige T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologyplantarum*. 15: 473-497.

National Research Council. 1989. Lost Crops of the Incas: Little-Known Plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation. NationalAcademyPress, Washington, D.C. Pág. 23-56.

Palomino G. Lady R., García P. Carlos M, Gil G Jesús H., Rojano Benjamín A., Durango R. Diego L. 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). *VITAE*, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. Volumen 16 número 3. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. págs. 388-395

Pérez Ponce JN. 1998. Propagación y Mejora genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara. Cuba.

Ponce, P. 1984. Cambios en el contenido de compuestos fenólicos en citocultivos de *Saccharumofficinarum* L. *Agrociencia* N^o 55. Colegio de Post Graduados, Chapingo - México.

Posada L. 2005. Aplicaciones de la biotecnología a la propagación de la papaya. *Biotecnología Vegetal*. 5 (2): 67-79.

- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L. 2011.** Plant polyphenols: chemical properties biological activities, and synthesis. *AngewChemInt Ed.* 2011; 50:586-621.
- Reyes Y.** 2015. Implementación de un procedimiento de certificación de cabinas de flujo laminar y seguridad biológica. Informe de suficiencia para optar el título profesional de Ingeniero Físico. Universidad Nacional de Ingeniería. Lima - Perú.
- Robbins, R.** 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 51, 2866-2887.
- Roca, W. M. y Mroginski L.A.** Editores Técnicos. 1993. Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali - Colombia.
- RodriguesSilas, Da Cunha M., Ventura J., Fernandes P.** 2009. Effects of the Papaya melira virus on papaya latex structure and composition. *PlantCell Rep.* 2009. pág. 28:861-871.
- Rojas Y, Ramos R, Salazar R.** 1985. Posible relación del sexo con algunas características morfológicas y agronómicas de la papaya (*Carica papaya* L.). *Acta agronómica* 35(2): 20-33.
- Saalau-Rojas E, Barrantes-Santamaría W, Loría-Quirós C, Brenes-Angulo A, y Gómez-Alpízar L.** 2009. Identificación mediante PCR del sexo de la papaya (*Carica papaya* L.), híbrido "Pococi". *Agronomía Mesoamericana* 20(2):311-317. 2009.
- Salisbury FB & Ross CW.** 1994. *Fisiología Vegetal.* pp.: 395-451. Grupo Editorial Iberoamericana. México.
- Sánchez-Betancourt, E. y Núñez V.** 2008. Evaluación de marcadores moleculares tipo SCAR para determinar sexo en plantas de papaya (*Carica papaya* L.). *Rev. Corpoica* 9(2), 31-36.

Sánchez, Isidoro. 1992. Frutales Andinos. Publicado en Cultivos Marginados, otra perspectiva de 1492. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal N^o 26. Roma - Italia.

Sepúlveda R. G., Rojas P. N. Comportamiento del babaco, IV Región, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias -INIA Chile.

<http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/IPA/NR06753.pdf>

Sponsel VM. 1995. The biosynthesis and metabolism of gibberellins in higher plants. In: Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology (PJ Davies, ed.), pp.: 66-97. Kluwer Acad. Pub. The Netherlands.

Storey, WB. 1976. Papaya. Evolution of crop plants. Longman, San Francisco. p. 21-24.

Stoschek, CM. 1990. Quantitation of protein, en Deutscher, M.P. (ed). Guide to protein purification. San Diego: Academic Press.

Talavera, C., Espadas, F., Contreras, F., Fuentes, G., Santamaría, J. 2009. Acclimatization, rooting and field establishment of micropropagated papaya plants. In, Proc. IIIrd IS on Acclim. and Establ. of Micropropagated Plants. Acta Hort (ISHS), 812, 373-378.

Yábar Emilio, Chirinos Rosana, Campos David. 2018. Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en tres ecotipos de maca (*Lepidium meyenii* Walp.) durante la pre-cosecha, cosecha y secado natural post-cosecha. Scientia Agropecuaria. Scientific Journal. Vol 10 No 1. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.

Vidal L, Finot V, Mora K, y Venegas F. 2009. Características físico químicas del látex de papayuelo *Vasconcellea cundinamarcensis* Badillo, Caricaceae. Información Tecnológica Vol.20 N^o6. Universidad de Concepción, Chile.

Yugcha A, Kure J, Castillo P.2013. Estudio del proceso de secado del látex de papaya *C. papaya* deshidratado por aspersion. Facultad de Ingeniería Mecánica y Ciencias de la Producción. Escuela Superior Politécnica del Litoral, Guayaquil - Ecuador.

Worthington Biochemical Corporation Papain, I.U.B.: 3.4.22.2 [en línea].
<http://www.worthington-biochem.com/pap/default.html>. Consultado marzo, 2016.

Zapata S., Piedrahita, A. y Rojano B. 2014. Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspectiva Nutricional Humana*, 16 (1): 25-36.

APÉNDICE

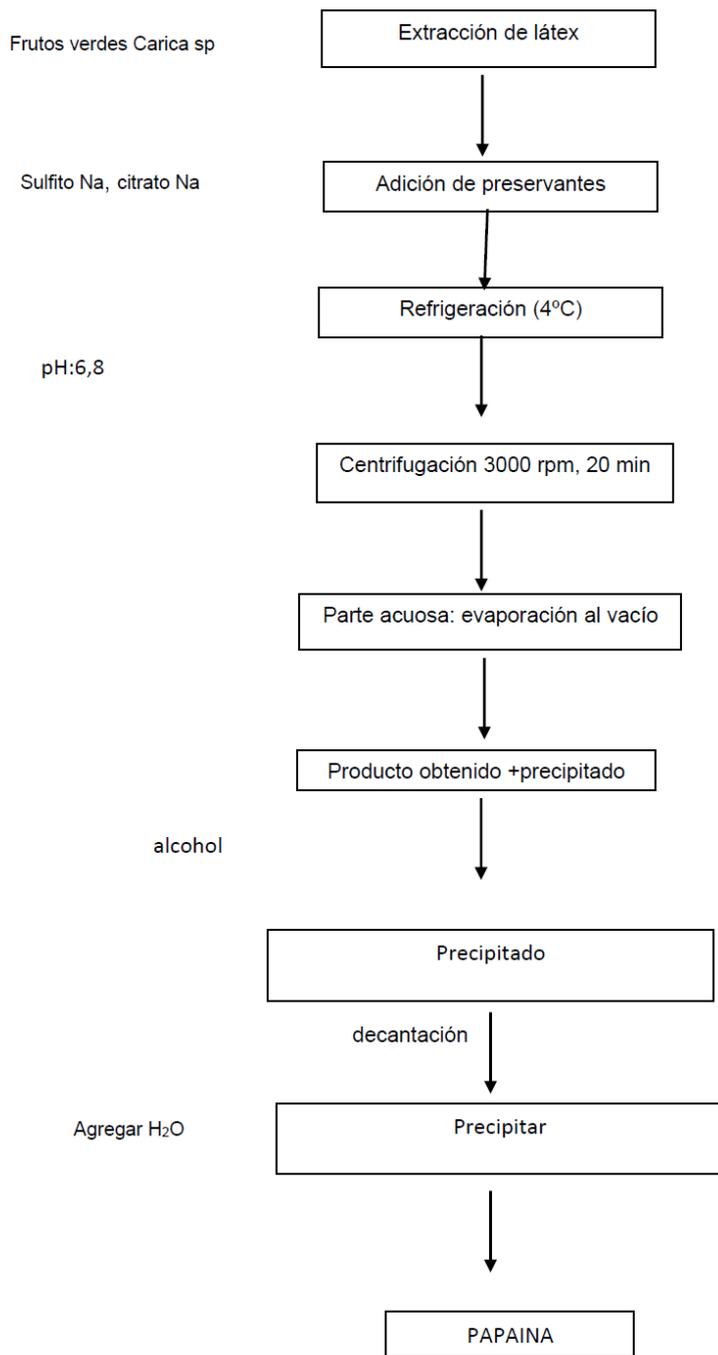


Figura 2. Proceso de obtención de papaína
Elaboración propia



CONSTANCIA DE IDENTIFICACION DE ESPECIE VEGETAL

Las muestras vegetales recibidas de la Ing. Bertha Cecilia García Cienfuegos, han sido determinadas según el Sistema de Clasificación de Engler & Prantl, modificado por Melchor en 1964, como sigue:

División	Angiospermae
Clase	Dicotyledoneae
Orden	Violales
Familia	Caricaceae
Género	<i>Carica pubescens</i>
Nombre común	"papayuela", "papaya de los andes"



Determinadas por Mg. Pedro Labán Labán,
Docente de la Cátedra Botánica Sistemática



Universidad Nacional de Tumbes
Facultad de Ciencias Agrarias
Campus Universitario S/N "La Cruz"



División	Angiospermae
Clase	Dicotyledoneae
Orden	Pariales
Familia	Caricaceae
Género	<i>Carica pentagona</i>
Nombre común	"babaco"



Determinadas por Mg. Pedro Labán Labán,
Docente de la Cátedra Botánica Sistemática

Se extiende la presente constancia a solicitud de la interesada, para los fines que estime conveniente.

Tumbes - Perú, 12 de marzo del 2000

Mg. Pedro Labán Labán
Docente Cátedra Botánica Sistemática



Fig. 8. Incisiones en fruto inmaduro *C. papaya*



Fig. 9. Frutos inmaduros de *C. pubescens*



Fig. 10. Frutos inmaduos de *C. pentagona*



Fig. 11. Acondicionamiento muestra papaína cruda para centrifugación



Fig. 12. Acondicionamiento muestra para determinación contenido fenoles



Fig. 13. Preparación del extracto hojas frescas



Fig. 14. Peso de las muestras



Fig. 15. Filtrado de las muestras



Fig. 16. Determinación de la absorbancia. Espectrofotómetro



Fig.17. Acondicionamiento en vivero para selección de plantas madre



Fig. 18. Medios de cultivo



Figura 19. Equipos: Autoclave y cámara de flujo laminar



Fig. 20. Siembra de explantas