

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



Efecto genotóxico *in vitro* de látex y extracto  
hidroalcohólico de semilla de *Carica papaya* L.  
“papaya” frente a ADN genómico humano.  
Ayacucho, 2016.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA EN LA ESPECIALIDAD DE MICROBIOLOGÍA

Presentado por la:  
Bach. QUISPE MEZA, Carmen Olga

AYACUCHO – PERÚ  
2017



A Dios por permitirme culminar una etapa más en el ámbito académico, a mi hijo por su paciencia, a mis padres por su apoyo incondicional, mis hermanos y amigas que estuvieron para apoyarme en los proyectos de mi vida.



## **AGRADECIMIENTO**

A mi *Alma Mater* la Universidad Nacional de “San Cristóbal de Huamanga” y a los docentes profesionales por su exigencia en el desarrollo profesional de los alumnos.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, al Centro de Investigación en Biología Molecular y a los docentes por el apoyo, conocimiento y orientación contribuido para culminar el presente trabajo.

El reconocimiento especial al Blgo, Tomás Yuret Miranda Tomasevich por el asesoramiento en el proyecto, ejecución y término del presente trabajo de investigación.

A toda las personas que han estado conmigo y me han brindado su amistad, apoyo y consejos



## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Antecedentes	3
2.2 Aspectos botánicos de <i>Carica papaya</i> L. “papaya”	8
2.2.1 Clasificación taxonómica de <i>Carica papaya</i> L. “papaya”	8
2.2.2 Descripción botánica	8
2.2.3 Hábitat y Distribución	9
2.2.4 Usos tradicionales	9
2.2.5 Composición química	10
2.2.6 Propiedades fitoquímicas	11
2.3 Actividad genotóxica	11
2.4 Espectrofotometría	12
2.5 Electroforesis en gel	13
III. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.1 Lugar de ejecución del trabajo de investigación para la recolección de datos	15
3.2 Definición de la Población y Muestra	15
3.2.1 Muestra	15
3.2.2 Material biológico	15
3.3 Procedimiento para la recolección de datos	15
3.3.1 Recolección de la muestra	15
3.3.2 Obtención del látex	16
3.3.3 Obtención del extracto hidroalcohólico de la semilla de <i>Carica papaya</i> L. “papaya”	16
3.3.4 Tamizaje fitoquímico del látex y extracto hidroalcohólico de semilla de <i>Carica papaya</i> L. “papaya”.	16

3.4	Extracción de ADN genómico humano	16
3.5	Cuantificación de ADN genómico humano	18
3.5.1	Por espectrofotometría	18
3.5.2	Por electroforesis	18
3.6	Ensayos de la genotoxicidad in vitro, “método Tomasevich”:	19
3.6.1	Fase de cuantificación y preparación de stock de ADN genómico obtenido para el ensayo.	19
3.6.2	Fase de ensayo de genotoxicidad in vitro del látex y extracto hidroalcohólico de <i>Carica papaya</i> L. “papaya”, sobre el ADN genómico humano.	19
3.6.3	Fase de electroforesis para la detección de genotoxicidad	20
3.6.4	Fase de radiación UV para la visualización de genotoxicidad	21
3.6.5	Fase de interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad	21
3.7	Análisis de datos	21
IV.	RESULTADOS	23
V.	DISCUSIÓN	33
VI.	CONCLUSIONES	37
VII.	RECOMENDACIONES	39
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
	ANEXOS	43

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Preparación de carga de ADN para visualización de banda en electroforesis. Ayacucho, 2016.	19
Tabla 2. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> de látex de <i>Carica papaya L.</i> “papaya”, sobre ADN genómico. Ayacucho, 2016.	20
Tabla 3. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i> de extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Carica papaya L.</i> “papaya”, sobre ADN genómico. Ayacucho, 2016.	20
Tabla 4. Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual. Ayacucho, 2016.	21
Tabla 5. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el látex de <i>Carica papaya L.</i> “papaya”. Ayacucho, 2016.	25
Tabla 6. Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de <i>Carica papaya L.</i> “papaya”. Ayacucho, 2016.	26



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Electroforesis del ADN genómico extraído de ADN genómico de linfocitos humanos. Ayacucho,2016	27
Figura 2. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de <i>Carica papaya L.</i> “papaya”. Ayacucho,2016	28
Figura 3. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de <i>Carica papaya L.</i> “papaya”. Ayacucho,2016	29
Figura 4. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Carica papaya L.</i> “papaya”. Ayacucho, 2016.	30
Figura 5. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las semillas de <i>Carica papaya L.</i> “papaya”. Ayacucho, 2016.	31
Figura 6. Prueba de Kruskal Wallis para evaluar el grado de genotoxicidad mediante fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano Ayacucho, 2016.	32



## ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1	Certificado de clasificación taxonómica de <i>Carica papaya</i> L. “papaya”. 44
Anexo 2.	Certificado de clasificación taxonómica de <i>Carica papaya</i> L. “papaya”. 45
Anexo 3.	Esquema de obtención de extracto hidroalcohólico, tamizaje fitoquímico y determinación del efecto genotóxico 46
Anexo 4.	Tabla de metabolitos secundarios presentes en látex y extracto hidroalcohólico de <i>Carica papaya</i> L. “papaya”. 47
Anexo 5.	Flujograma de Actividad Genotóxica “in vivo”. 48
Anexo 6.	Protocolo para la determinación del efecto genotóxico <i>in vitro</i> mediante electroforesis, propuesto por Miranda T. 49
Anexo 7.	Tamizaje fitoquímico del látex y extracto hidroalcohólico de semilla de <i>Carica papaya</i> L. “papaya” 50
Anexo 8.	Diseño metodológico, Obtención del extracto hidroalcohólico 51
Anexo 9.	Extracción de ADN genómico de linfocitos humano 52
Anexo 10.	Valores numéricas del grado de genotoxicidad de <i>Carica papaya</i> L. “papaya”, según la concentración del extracto hidroalcohólico de las semillas y el látex, frente a ADN genómico humano. 55
Anexo 11.	Prueba de Kruskal – Wallis para evaluar el grado de genotoxicidad de <i>Carica papaya</i> L. “papaya”. 56
Anexo 12.	Matriz de consistencia. 57



## RESUMEN

*Carica papaya* L. “papaya” es un árbol con muchas propiedades nutritivas y medicinales. Las flores, hojas, fruto y semillas son usados para preparar diferentes remedios caseros. Planteamos como objetivos determinar el efecto genotóxico *in vitro* de látex y extracto hidroalcohólico de semilla de *Carica papaya* L. “papaya” frente a ADN genómico humano e identificar los metabolitos secundarios presentes. Las muestras fueron tomadas en el distrito de San Francisco, provincia de La Mar, región de Ayacucho y el estudio experimental se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la UNSCH, durante los meses de abril a diciembre de 2016. El látex fue obtenido directamente de la planta y las semillas fueron secadas a temperatura ambiente, luego pulverizadas, para macerar en solución hidroalcohólica etanol : agua (3 :1), en frasco de vidrio color ámbar, se llevó a evaporación del solvente hasta obtener el producto con textura de “pasta/melaza”, a partir de éste extracto se realizó el tamizaje fitoquímico y ensayos de genotoxicidad a diferentes concentraciones, exponiéndose éstos sobre el ADN genómico de linfocito humano; la estimación del daño genotóxico “*in vitro*” fue determinado mediante electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% y visualizado en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra *UVsolo TS*. Los metabolitos secundarios identificados en el látex fueron: abundantes concentraciones de alcaloides y aminoácidos (+++), seguido de moderada concentración de lactonas y/o cumarinas (++) y leve presencia de saponinas (+); mientras que el extracto hidroalcohólico de la semilla se identificó: abundantes concentraciones de fenoles y/o taninos y saponinas (+++); seguidos de alcaloides, azúcares reductores, aminoácidos, quinonas y glicósidos cardiotónicos (++); con leve concentración flavonoides, catequinas y triperpenos-esteroides (+). El látex de “papaya” desde 5% al 100% de concentración, presenta un potente efecto genotóxico frente al ADN genómico humano; mientras que el extracto hidroalcohólico manifiesta una tendencia inversa, a mayor concentración del extracto la fragmentación del ADN es menor; y a menor concentración del extracto (5 mg/mL y 10 mg/mL), la fragmentación del ADN es mayor. Se concluye que el látex y el extracto hidroalcohólico de semilla, presentan efecto genotóxico *in vitro* frente a ADN genómico humano.

**Palabras clave:** genotoxicidad, *carica papaya* L.



## I. INTRODUCCIÓN

La humanidad ha enfrentado durante su existencia diversas afecciones a su salud, las mismas que han sido tratados con productos de origen vegetal. Sin embargo, el conocimiento de las propiedades medicinales de numerosas plantas, es bastante limitado, por lo que se formuló el presente trabajo de investigación científica referida al efecto genotóxico de los metabolitos secundarios, entre ellos aquel que puede causar daño a nivel del ADN de las células del organismo que está recibiendo el tratamiento directamente con estas plantas o con los productos procesados, por lo que es necesario conocer si estas pueden estar ejerciendo este efecto sobre el ADN y a qué concentraciones se puede presentar.<sup>1</sup>

La “papaya” es un árbol con muchas propiedades nutritivas, pero también medicinales. Las flores, hojas, fruto y semillas son usados para preparar diferentes remedios caseros.<sup>2</sup>

La especie *Carica candamarcensis* es originaria de los Andes de la América meridional (Colombia o Perú) y se distribuye desde Panamá hasta los Andes de Bolivia y parte de Chile, se utiliza normalmente para consumo humano y se han registrado muchas propiedades terapéuticas del látex de la planta como eliminación de hematomas y verrugas, en el tratamiento de arteriosclerosis y amigdalitis, se ha evidenciado actividad mitogénica tanto *in vitro* como *in vivo* (en recuperación de quemaduras en pacientes diabéticos), también actividad proteasa utilizada en procesos de extracción y purificación de ADN.<sup>3</sup>

En la región de Ayacucho, en tiempos actuales, sobre todo en las comunidades campesinas de Valle de Río Apurímac, Ene y Mantaro (VRAEM), el látex y las semillas de *Carica papaya*, es recurrida para el tratamiento de diversos males, dosificándose por vía oral y dérmica; si bien posee el efecto curativo, aún se desconoce muchos aspectos de sus principios activos, tampoco puede descartarse la posibilidad que a determinadas concentraciones genere toxicidad.

Aunque las plantas medicinales tienen propiedades terapéuticas, algunos de los extractos de las plantas superiores constituyen mezclas complejas que contienen un gran número de sustancias con propiedades mutagénicas y carcinogénicas, y su uso constante ha sido correlacionado con la ocurrencia de enfermedades en las poblaciones, de ahí el peligro potencial que encierra el consumo indiscriminado de fármacos de origen vegetal, debido a los escasos datos que se poseen sobre la acción mutagénica de las plantas medicinales consumidas por la población.<sup>1</sup>

Es por ello que el estudio de las plantas medicinales sugiere una ruta para su evaluación que consta de: selección de las plantas a investigar, identificación botánica correcta, características fitoquímicas mínimas, estudio farmacológico y estudio toxicológico, para decidir si se continúa o se abandona el uso tradicional.<sup>2</sup>

El propósito del presente trabajo de investigación va orientado a estudiar el efecto genotóxico *in vitro* de látex y extracto hidroalcohólico de semilla de *Carica papaya* L. “papaya” frente a ADN genómico humano.

**Objetivo General:**

Determinar el efecto genotóxico *in vitro* de látex y extracto hidroalcohólico de semilla de *Carica papaya* L. “papaya” frente a ADN genómico humano.

**Objetivos Específicos:**

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el látex y el extracto hidroalcohólico de semilla de *Carica papaya* L. “papaya”.
- Caracterizar el efecto de la genotoxicidad del látex y extracto hidroalcohólico de semilla de *Carica papaya* L. “papaya” frente a ADN genómico humano.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes.

Carballo et al<sup>2</sup>, las plantas medicinales son utilizadas por billones de personas en la mayor parte de los países en vías de desarrollo, debido a la falta de asistencia de los servicios de salud, su bajo costo y efectividad, así como las creencias y preferencias culturales.

Mena et al<sup>3</sup>, Estudiaron el extracto acuoso y aceite esencial de la pulpa de frutos maduros de *Carica candamarcensis* Hook. f. (1875) (chilacuán, papayuela de clima frío) que presentan actividad *in vitro* anti-*Helicobacter pylori*, por lo cual se consideran promisorios para realizar una terapia complementaria para controlar la infección gástrica por esta bacteria. Estudió estos extractos evaluando: a) citotoxicidad mediante análisis de viabilidad de linfocitos humanos aislados por el método tradicional en gradiente de Hystopaque<sup>®</sup> y en cultivo con medio RPMI-1640; b) mutagenicidad mediante el ensayo de Ames; c) genotoxicidad a través de electroforesis alcalina de células individuales [ensayo cometa (SGCE)]. Para extracto acuoso (EA) se evaluaron dosis desde el extracto concentrado original hasta 10<sup>-2</sup> (diluciones en agua destilada estéril) y para el caso de aceite esencial (AE) desde el extracto original diluido en DMSO al 1% hasta 10<sup>-6</sup>. Este estudio demuestra que según las pruebas utilizadas todas las concentraciones evaluadas son seguras a nivel mutagénico, genotóxico y citotóxico. Sin embargo, se requieren estudios adicionales con otros métodos de ensayo que permitan confirmar o descartar si los extractos inducen daños relevantes sobre el ADN, si tienen efectos antimutagénicos y antigenotóxicos para contemplar, así, su posterior inclusión en el desarrollo de un fitofármaco de *Carica candamarcensis* como tratamiento complementario en pacientes con antecedentes de infección de *Helicobacter pylori*.

Marchiori et al<sup>4</sup>, Realizaron un estudio sobre los efectos quimiopreventivos y antimutagénicos *in vivo* del extracto hidroetanólico de frutos de *Carica papaya* L.

y cuantificar las sustancias fenólicas. La actividad mutagénica evaluó por micronúcleos y las sustancias fenólicas analizaron por el método Folin-Ciocalteu (fenólica), y el método colorimétrico cloruro de aluminio (flavonoides). El extracto hidroetanólico de frutas de *Carica papaya* mostró efecto antimutagénico y quimioprotector (370 mg/100 g de peso corporal). El contenido de sustancias fenólicas de extracto hidroetanólico resultó inferior a 0,001 µg/mg. Concluyó que el efecto antimutagénico y quimioprotector observado en extractos de frutos de *Carica papaya* puede estar asociado con otras sustancias. Estudios químicos deben llevarse a cabo para identificar las sustancias que intervienen en la actividad.

Chang et al<sup>5</sup>, evaluaron la actividad citotóxica de los alcaloides de *Argemone mexicana* L. “cardo santo” El fraccionamiento del extracto de cloroformo de la parte aérea de *Argemone mexicana* llevó para el aislamiento de dos alcaloides de tipo benzofenantridina, N-demethyloxysanguinarine y pancorine; tres alcaloides de tipo benzyloisoquinoline, (+)-1,2,3,4-tetrahydro-1-(2-hidroximetil-3,4-dimethoxyphenylmethyl)-6,7-methylenedioxyisoquinoline, (+) - y higenamine (+) - Reticulina. Entre ellos, N-demethyloxysanguinarine es un nuevo compuesto, y (+)-1,2,3,4-tetrahydro-1-(2-hidroximetil-3,4-dimethoxyphenylmethyl)-6,7-metilendioxi-isoquinolina. Todos los compuestos se caracterizaron sobre la base de sus datos espectrales y evidencias químicas. Algunos alcaloides aislados de esta especie fueron evaluados por su citotoxicidad a carcinoma nasofaríngeo humano (HONE-1) y el cáncer gástrico humano (NUGC) en líneas celulares. Se encontró que la queleritrina presenta una actividad significativa contra la línea celular NUGC, mientras angoline inhibe ambos tipos. (+) – Argenaxine, mostró una actividad moderada contra la Línea celular NUGC.

Saranya et al<sup>6</sup>, evaluaron la actividad antibacterial *in vitro* y el análisis preliminar fitoquímico de extractos foliares de *Argemone mexicana* L. “cardo santo”. Se utiliza como una planta medicinal en varios países. En este estudio los extractos de las hojas de *Argemone mexicana* L. en metanol, cloroformo y éter de petróleo, se evaluaron para la actividad antibacteriana contra bacterias (ATCC) de las cepas. La actividad antibacteriana de estos extractos de plantas se realizó utilizando el método de difusión en disco de agar. La actividad antibacteriana de extractos de metanol mostró más eficacia, seguido por los extractos de cloroformo y éter de petróleo en contra de todas las cepas bacterianas. Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) mostradas por el extracto de

*Argemone mexicana* L. contra las cepas bacterianas oscilaban entre 125 mg / l para 1000µg / l.

Vega<sup>7</sup>, evaluó el efecto citostático del látex de *Euphorbia peplus* L.f. “leche leche” y *Ficus carica* L. “higo” en el meristemo radicular de *Allium cepa* L. “cebolla”. Tomaron como premisa que el látex de estas dos plantas medicinales, tradicionalmente son usadas para el tratamiento de las verrugas de la piel humana. En un modelo vegetal, utilizaron meristemos radiculares de bulbos de *Allium cepa* L., sometidos a tratamiento con los látex, a concentraciones de 1%, 1.5%, 2%, 3%, 5% y 10% de cada especie, evaluando el efecto citostático a las 4, 8, 12 y 24 horas, cortaron de 1 a 2 mm de la parte apical de la raíz, mediante la técnica de Deyson modificado.

Vega<sup>7</sup>, determinó la variación del índice mitótico, por efecto citostático del látex de *Euphorbia peplus* L. y *Ficus carica* L. sobre el meristemo radicular de *Allium cepa* L. “cebolla”, realizando la lectura entre 1000 a 3500 células por muestra.

Según la prueba de Tukey la especie que tiene mayor efecto citostático fue la *Euphorbia peplus* L.f. (IM=0,00%), seguido de *Ficus carica* L. (IM=0,32%). El tiempo de tratamiento de mayor actividad antimitótica fue a las 8 horas con látex al 3% de *Euphorbia peplus* L.f. “leche leche”, seguido del látex al 10% de “higo” a las 24 horas.

Pillaca<sup>8</sup>, En su estudio demostró el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antivirales *Ficus carica* “higo” y *Euphorbia peplus* “leche leche”. Los resultados revelan que el látex de estas dos plantas tienen efecto genotóxico sobre ADN genómico de linfocitos humano, donde el tiempo de incubación a una y cuatro horas, no influye en el efecto; mientras que las concentraciones de los extractos, sí influyen en el efecto genotóxico.

Rodriguez<sup>9</sup>, utilizó el método de Macrodilución a las concentraciones de 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 y 0,25 mg/mL, prueba que permite medir la susceptibilidad *in vitro* de los microorganismos patógenos. Utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922; Al analizar los resultados se observó que los extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (papayo) presentaron actividad antibacteriana a dichas concentraciones.

Rodrigo et al<sup>10</sup>, la electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa, es frecuentemente usada para medir el daño en el ADN de las células. En la mayoría de estudios, los linfocitos de sangre periférica son utilizados como modelo celular. Sin embargo, en los últimos años, la aplicación de esta técnica

se ha extendido a las células germinales, con el fin de evaluar la integridad del ADN espermático, las condiciones de estrés oxidativo en oocitos porcinos y en embriones bovinos; además, la muerte celular en embriones de ratón. Para la realización de la electroforesis de células individuales en un sistema como los oocitos bovinos se hace imprescindible superar dos grandes limitantes en la estructura complejo-cúmulo-oocito (CCOS): una, la degradación de las glicoproteínas de la zona pelúcida y dos, eliminar el nivel de compactación del genoma haploide bovino en metafase II. Dichas limitantes no permiten una migración adecuada del ADN dentro del gel de agarosa. En este estudio se demuestra que el uso de una solución de lisis con proteinasa K durante 3 h y 10 min de corrido electroforético, permite obtener cometas cuantificables de oocitos bovinos madurados in vitro que pueden ser utilizados en estudios genotóxicos en este sistema celular.

Alice et al<sup>21</sup>, Aunque las plantas medicinales tienen propiedades terapéuticas, algunos de los extractos de las plantas superiores constituyen mezclas complejas que contiene un gran número de sustancias con propiedades mutagénicas y carcinogénicas, y su uso constante ha sido correlacionado con la ocurrencia de enfermedades en las poblaciones, de ahí el peligro potencial que encierra el consumo indiscriminado de fármacos de origen vegetal, debido a los escasos datos que se poseen sobre la acción mutagénica de las plantas medicinales consumidas por la población.

Sánchez et al<sup>14</sup>, Es por ello que el estudio de las plantas medicinales sugiere una ruta para su evaluación que consta de: selección de plantas a investigar, identificación botánica correcta, características fitoquímicas mínimas, estudio farmacológico y estudio toxicológico, para decidir si se continúa o se abandona el uso tradicional.

Reynoso<sup>22</sup>, En su estudio de evaluación de la genotoxicidad de compuestos aislados (lupanina, esparteína y flavonoides) de *Lupinus mexicana* y *lupinus montaus*. Evaluó la genotoxicidad utilizando la prueba del cometa alcalino en linfocitos humanos y en los núcleos estaminales de *tradescantia* (*tradescantia subacaulis* y *tradescantia hirsuiflora*, clon 4430) a concentraciones de (0,01; 0,1; 0,5 y 1,0 Mm). La migración de la cauda en linfocitos humanos expuestos a los extractos de *Lupinus mexicana* (6,17 a 675u) lupanina (3,44 a 5,94u) flavonoides (2,54 – 2,68u) fue mayor estadísticamente al testigo negativo ( $p < 0,01$ ), y por tanto, mostraron actividad genotóxica, en todas las concentraciones de 0,01 a

1,0mM. El extracto de *Lupinus montanus* no presentó diferencia significativa en las concentraciones de 0,5mM (1,57u) y 1,0mM(1,95u) ( $p > 0,05$ ), comparados con el testigo negativo. El mismo caso para esparteína a la concentración de 1,0mM(2,96u) ( $p < 0,05$ ), comparados con el testigo negativo. La migración de la cauda en los nucleos estaminales de tradescandia expuestos a los extractos de *Lupinus monteus* (15,29 a 24,28u) y la lupanina (12,33 a 32,06u) mostraron significancia estadística ( $p < 0,01$ ) respecto al testigo negativo y por tanto, genotoxicidad en todas las concentraciones 0,01 a 1,0mM. La esparteína no presentó diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en las concentraciones 0,01mM (5,96u), 0,1mM (5,48u) y 1,0mM(5,44u), solo en las concentración de 0,5mM(7,01u) con respecto al testigo negativo. Los flavonoides tampoco fueron capaces de inducir actividad genotóxica (5,73u) ( $p > 0,05$ ) en la concentración de 1,0mM. Y el resto de las concentraciones si mostraron diferencia significativa con el testigo negativo.

Carballo et al<sup>2</sup>, Realizaron un estudio a nivel genotóxico de las plantas medicinales: *Chenopodium multifidum* L. (Chenopodiaceae); *Litheraea molleoides* Vell. Engl. (Anacardiaceae); *Styphnolobium japonicum* L. Schott. (Fabaceae); *Prosopis alba* Gris (Mimosaceae); *Schkuhria pinnata* (Lam) (Asteraceae); *Sysimbriifolium* Lam. (Solanaceae), mediante el ensayo de electroforesis de una sola célula. Se determinó que cuatro de ellas, *Chenopodium multifidum* (paico); *Schkuhria pinnata* (canchalagua), *Solanum sisymbriifolium* (espino colorado) y *Lithaea molleoides* (molle de beber), indujeron daño al ADN, induciendo roturas y cadena simple y doble.

Reyes<sup>23</sup>, A partir de estudios realizados, ha demostrado que el ácido maslínico posee un potente y selectivo efecto anticancerígeno, apoptótico y diferenciador sobre las células de carcinoma de colon, utilizando dos líneas celulares de cáncer de colon, HT29 y Caco-2, que difieren en la expresión de ciertos oncogenes y dos líneas celulares normales de intestino, IEC-6 e IEC-18. Este efecto cancerígeno se produce, fundamentalmente, a través de los eventos moleculares como es de citotoxicidad y genotoxicidad, esta última mediante un estudio de electroforesis en gel de agarosa del ADN.

Figueroa et al<sup>24, 25</sup>, Usos de *C. papaya*, estudiaron las propiedades insecticidas de los ácidos mirística y arachidico de las semillas de *C. papaya* variedad mamey sobre las larvas *S. frugiperda*. Estos compuestos fueron incorporados en una dieta artificial de este insecto, los resultados mostraron que estos ácidos no

fueron tóxicos contra *S. frugiperda* ya que a concentraciones de 50, 100 y 200 ppm provocaron una mortalidad menor del 50%.

Boomi et al<sup>26</sup>, Se evaluó la actividad anticonceptiva de semillas de *Carica papaya* en ratas albinas mediante un tratamiento a largo plazo con extracto de metanol de semillas de *C. papaya*, el cual se administró por vía oral a una concentración de 50 mg / Kg por día durante 360 días. Para establecer la seguridad y la eficacia de la actividad de *C. papaya*, se evaluó los parámetros de esperma, los niveles séricos de testosterona, la histología y la estructura de los testículos. Concluyendo con esta investigación que la fracción de metanol de semillas de *C. papaya* es seguro para el tratamiento a largo plazo y el mecanismo de anticoncepción se debe al efecto sobre la diferenciación de espermatida en los testículos, posiblemente mediada por los factores de Sertoli.

Franco et al<sup>27</sup>, observaron el efecto insecticida contra *S. frugiperda* de las semillas de las variedades Mamey, Marmol, Amarilla y Hawaiana de *C. papaya* presentando un 90 % de mortalidad (actividad insecticida), al evaluar el polvo de las semillas al 10% y 15% en una dieta artificial.

## **2.2. Aspectos botánicos de *Carica papaya* L. “papaya”.**

### **2.2.1 Clasificación taxonómica de *Carica papaya* L. “papaya”.**

La identificación de la muestra vegetal para trabajo de tesis, ha sido determinada según la Blga. Aucasime<sup>11</sup> de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH) (Anexo N° 01) y es como sigue:

División	: Magnoliophyta
Clase	: Magnoliopsida
Sub Clase	: Dilleniidae
Orden	: Violales
Familia	: Caricaceae
Género	: <i>Carica</i>
Especie	: <i>Carica papaya</i> L.
Nombre Vulgar	: “papaya”.

### **2.2.2 Descripción botánica <sup>11</sup>**

Árbol dioico de porte bajo y tronco erguido sin ramificación, succulento, fibroso, con presencia de cicatrices foliares prominentes en la corteza, presenta látex de un color blanco lechoso, las hojas son grandes largamente pecioladas, alternas y palmatilobuladas y palmatinervias que se forman en la parte apical del tallo.

Inflorescencias masculinas en panículas axilares colgantes y protegidas por brácteas, a veces puede estar acompañada de flores bisexuales: flores masculinas con 5 sépalos soldados de color verde amarillento, corola formada por 5 pétalos soldados de color amarillo, 10 estambres dispuestos en 2 ciclos. Flores femeninas solitarias o formando racimo de pocas flores, grandes, cáliz de 5 sépalos soldados verde amarillentos, corola de 5 pétalos libres de color blanco cremoso o amarillo pálido de ovario súpero unilocular conteniendo muchos óvulos de placentación parietal; fruto baya grande de color que varía entre amarillento, anaranjado y rojizo.<sup>11</sup>

### **2.2.3 Hábitat y Distribución**

Es originaria de América Central. Se cultiva en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, por sus frutos que son ampliamente utilizados en la alimentación.<sup>11</sup>

### **2.2.4 Usos tradicionales**

En la medicina popular se utiliza: como antihelmíntico bebiendo las semillas licuadas, como antiséptico aplicando las hojas estrujadas o el látex, como diurético en casos de infecciones urinarias y cólicos renales tomando el cocimiento de las hojas tiernas; como cicatrizante de heridas, aplicando el látex o el polvo de las semillas a las heridas; para tratamiento de la mastitis aplicando las hojas machacadas a los pezones.<sup>11</sup>

La “papaya” es un árbol con muchas propiedades nutritivas, pero también medicinales. Las flores, las hojas, el fruto y las semillas son usados para preparar diferentes remedios caseros. Para aprovechar los beneficios de la papaya se puede comerla cruda en ayunas o como postre luego de las comidas. Otra opción es preparar un zumo de la papaya que se puede aplicar directamente en la zona de la piel con alguna afección por 15 minutos. Después de este periodo se debe lavar bien el área con agua fría.<sup>12</sup>

Este remedio sirve para heridas, quemaduras entre otras patologías externas. También se puede preparar una infusión con las flores de la papaya. Se realiza con una cucharadita de flores por cada taza de agua hirviendo, se le agrega un poco de miel, se espera a que se entibie, se filtra y ya se puede tomar. Este preparado es para la tos, bronquitis y otras afecciones, se tiene que tomar varias veces al día. Además podemos realizar un cataplasma con las hojas machacadas de la “papaya” y colocarlas sobre la herida o zona lastimada ya que ayuda a limpiar y a cicatrizar las heridas, Para el estreñimiento se puede comer

crudo el fruto, cuando está maduro se puede elaborar un licuado de leche con “papaya”. Las semillas se pueden masticar bien o hacerlas polvo para poder consumirlas esta es para colitis o diarreas. Varias veces al día se debe consumir para que haga efecto. Todas estas formas de consumir la planta de “papaya” son efectivas, pero el tratamiento lleva algunos días porque los efectos son suaves y progresivos.<sup>12</sup>

Una costumbre de los indígenas, de la región centroamericana es la de envolver las carnes duras de los animales de caza con las hojas de esta planta que contienen papaína y actúa haciéndolas más suaves. El látex es utilizado también en la clarificación de la cerveza y otras bebidas, para suavizar la lana, en la curtiembre de pieles y en la preparación de medicamentos como base de diferentes preparados digestivos. La corteza se aplica para reducir los callos. A la savia se atribuyen propiedades vomitivas y antihelmínticas.<sup>12</sup>

El “mamón” es una fruta sabrosa, estimada por sus cualidades refrescantes debido a su alto contenido en agua, cerca del 90 %. Contiene entre 4 y 10 % de azúcares, vitamina A y C, algo de G y pequeñas cantidades de B1. Se consume fresco en tajadas o rodajas (a veces agregando jugo de limón), o en forma de batido merengada o como ingrediente de ensaladas de frutas. El fruto verde se cocina como un vegetal y se preparan diversos dulces. En Estados Unidos, se emplea su pulpa en la preparación de helados y bebidas refrescantes, gasificadas o no. Se usan en la preparación de cosméticos, productos de perfumería diversos, etc.<sup>12</sup>

### **2.2.5 Composición química**

*Carica papaya*, posee dentro de su composición varias sales minerales y vitaminas. El fruto de la planta de la papaya, también conocida como “papayero o papayo”, tiene en sus componentes una gran cantidad de vitaminas, las que más destacan por su importancia y abundancia son la vitamina C, el ácido fólico (B9), la niacina (B3) y la B2. Estas vitaminas se encuentran en una proporción de 60, 40, 0.4 y 0.05 miligramos por cada 100 gramos de papaya.<sup>12</sup>

La “papaya” tiene dentro de su composición una enzima que se denomina papaína, esta sustancia es la responsable de las propiedades digestivas que tiene el fruto de esta planta.<sup>12</sup>

El fruto de la papaya tiene sales minerales dentro de su composición, siendo las que más destacan por su abundancia en esta planta el potasio, calcio y magnesio. De hecho, se encuentran en una proporción de 250, 20 y 12 miligramos respectivamente por cada 100 gramos de fruto.<sup>12</sup>

Cerca del 90% del fruto de la papaya corresponde a agua, debido a esto posee propiedades diuréticas. Además, posee 2 gramos de fibras y 9 gramos de hidratos de carbono por cada 100 gramos de fruto.<sup>12</sup>

### **2.2.6 Propiedades fitoquímicas:**

La capacidad que tiene la papaína para descomponer la carne ha sido aprovechada en la medicina popular para eliminar las lombrices intestinales. La medicina China macera los frutos en vinagre de manzana que luego es bebido para eliminar los gusanos o las tenías.<sup>12</sup>

Además de la papaína, intervienen en esta propiedad otros compuestos químicos como son los alcaloides carpaina o la dehidrocarpaina presentes en todas las partes del vegetal. Para las hojas de la planta se describen los siguientes componentes químicos: Fenilpropanoides: ácido cafeico; esteroides:  $\beta$ -sitosterol; alcaloides: carpaina (hasta 1500 ppm) dihidrocarpaina I y II, pseudocarpaina, cotinina, miosmina, nicotina, colina. También contiene pequeñas cantidades de glicósidoscianogénicos.<sup>12</sup>

### **2.3 Actividad genotóxica**

La genética toxicológica estudia los efectos mutagénicos de sustancias químicas y radiaciones, así como las consecuencias para la salud humana de la exposición a mutágenos, considerando como tal a cualquier agente que induzca mutaciones génicas (cambio de uno o pocos pares de bases), aberraciones cromosómicas estructurales (cambios en la estructura) o numéricas (aneuploidías y poliploidías por afecciones en los componentes del aparato mitótico o meiótico) o alteraciones al ADN (formación de aductos, alquilación de bases, intercalamiento de bases), a los mecanismos de reparación (incrementando la sensibilidad a los efectos de muchos mutágenos), a los eventos de recombinación mitótica.<sup>13</sup>

Las plantas medicinales no llevan una indicación metodológica especial para su evaluación genotóxica, por lo que deben ser sometidas a las mismas regulaciones que rigen los fármacos en general. La evaluación genotóxica de extractos de plantas medicinales deben ser realizadas, en primera instancia, mediante ensayos *in vitro*, validados internacionalmente, que midan el daño en los niveles de mutaciones genéticas y cromosómicas.<sup>14</sup>

En el mundo las guías o rutas críticas para los estudios genotóxicos persiguen como objetivo fundamental evidenciar qué tipo o a qué nivel de organización del ADN opera el daño causado por el compuesto evaluado. En concordancia con

ello se reconocen cuatro niveles: mutación génica (nivel I), mutación cromosómica (nivel II), daño primario del ADN (nivel III), transformaciones celulares (nivel IV), entre otras alteraciones<sup>14</sup>. Los ensayos pertenecientes a los dos primeros niveles son muy variados y ampliamente utilizados, en especial las pruebas *in vitro* que se caracterizan por tener una alta sensibilidad y precisión.<sup>17</sup> En los últimos años las pruebas para medir daño a nivel primario del ADN, han alcanzado gran importancia entre los análisis de genotoxicidad.<sup>15</sup>

Si los resultados *in vitro* son negativos, debe continuarse, en segunda instancia, con ensayos *in vivo* que respondan a los mismos niveles de daño genético que se evaluaron *in vitro*. Una vez evaluados los niveles génico y cromosómico, con ensayos *in vitro* e *in vivo*, se deben incluir ensayos que midan daño primario al ADN y de acuerdo con el resultado obtenido, se debe tomar la decisión de realizar ensayos que midan otras alteraciones y carcinogenicidad. En cualquiera de los ensayos y niveles de daño evaluados se deben emplear protocolos estandarizados (validados internacionalmente) que tomen en consideración las dosis, el tipo de exposición y la vía de administración propuesta para el fármaco.<sup>14</sup>

Con el fin de detectar en sus etapas iniciales la acción sobre el material genético se utilizan las siguientes determinaciones *in vitro* que son muy utilizadas en el campo de la investigación científica para detectar genotoxicidad inicial: Aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas; micronúcleos, síntesis de ADN no programada y electroforesis de una célula (ensayo del cometa).<sup>15</sup>

#### **2.4 Espectrofotometría.**

La capacidad que tiene el ADN de absorber luz a una determinada longitud de onda (260nm) permite el cálculo de la concentración de ácidos nucleicos de la muestra. Si la densidad óptica (OD) es 1, corresponde a aproximadamente 50ug/ml de la cadena de ADN, entonces calculamos la concentración de ADN que tenemos en nuestras muestras, midiendo su absorbancia sin necesidad de una curva patrón.<sup>17</sup>

Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 (principalmente por residuos de triptófano), así la lectura muestra algún contaminante proteico. El cálculo se da entre las lecturas a 260nm y 280nm para hacer un estimado de la pureza o evaluar la contaminación de la preparación del ADN. Esta relación debe estar entre los valores de 1,8 y 2,0. Si la muestra es pura; el primer método comúnmente usado para la cuantificación es la espectrofotometría.<sup>17</sup>

## **2.5 Electroforesis en gel.**

La electroforesis en gel de agarosa es de las más utilizadas para analizar y caracterizar ácidos nucleicos de distintas procedencias. Los geles se comportan como un matiz molecular y permite separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de ADN de diferentes tamaños van emigrando de diferentes formas en una electroforesis en gel de agarosa. Además, si en la electroforesis llegara aplicarse marcadores moleculares con peso conocido (fragmentos de ADN con tamaño conocido), se podría calcular el tamaño aproximado de ADN en estudio.<sup>19</sup>

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas (aminoácidos, péptidos, nucleótidos, ácidos nucleicos) poseen grupos ionizables y están en solución ya cargadas, ya sea como cationes o aniones. Estas moléculas biológicas cargadas se van a separar en función de su carga cuando son aplicadas a un voltaje a través de electrodos.<sup>19</sup>



### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de ejecución del trabajo de investigación para la recolección de datos.

La obtención de las muestras de látex y los frutos de la planta en estudio se realizó en el distrito de San Francisco, provincia La Mar, región Ayacucho; el tamizaje fitoquímico en el Laboratorio de Farmacognosia de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud, y los ensayos de genotoxicidad se realizaron en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNSCH, durante los meses de Abril a diciembre de 2016.

#### 3.2 Definición de la Población y Muestra

**3.2.1 Población.** Plantas de *Carica papaya* L. “papaya”, que crecen en las chacras del distrito de San Francisco, provincia de La Mar, región de Ayacucho.

##### 3.2.1 Muestra.

- 20 mL de látex de *Carica papaya* L. “papaya”.
- 500 g de semilla, obtenida de los frutos maduros de *Carica papaya* L. “papaya”.
- Las muestras recolectadas de las chacras del distrito de San Francisco, provincia de La Mar, región de Ayacucho e inmediatamente transportadas a los laboratorios de la UNSCH en la ciudad de Ayacucho.

##### 3.2.2 Material biológico.

ADN genómico humano.

#### 3.3 Procedimiento para la recolección de datos

##### 3.3.1 Recolección de la muestra.

Las muestras de *Carica papaya* L. fueron recolectadas de las chacras del distrito de San Francisco, La Mar - Ayacucho, en las primeras horas de la mañana, y en el menor tiempo posible llevada al laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas para la identificación taxonómica de la muestra.

### **3.3.2 Obtención del látex<sup>17</sup>**

El látex para el estudio, fue obtenido realizando cortes de los frutos verdes de la planta de “papaya” dejando caer el látex en tubos eppendorf estériles de 2 mL y conservándolo en caja térmica con refrigeración.

### **3.3.3 Obtención del extracto hidroalcohólico de la semilla de *Carica papaya* L. “papaya”<sup>17</sup>**

Las semillas, fueron obtenidas realizando cortes en el fruto maduro de “papaya”, estas semillas fueron secadas a temperatura ambiente sobre papel graff, siendo removidas constantemente para evitar su deterioro, luego pulverizadas, para macerar en solución hidroalcohólica etanol : agua (3 :1), en frasco de vidrio color ámbar, cubrir a la muestra por lo menos con 1 cm de diferencia; durante siete días, se agitará el frasco por 15 minutos dos veces al día para que el solvente se distribuya homogéneamente en la muestra. Las muestras en maceración se mantuvieron en un lugar fresco y oscuro. Luego se procedió a filtrar con ayuda del papel filtro, se llevó a evaporación del solvente en baño maría marca Memmert a 37°C y se concentró a sequedad en una estufa Memmert a 37°C, hasta obtener el producto con textura de “pasta/melaza”. A partir de éste extracto se realizó el tamizaje fitoquímico y ensayos de genotoxicidad.<sup>14, 17</sup>

### **3.3.4 Tamizaje fitoquímico del látex y extracto hidroalcohólico de semilla de *Carica papaya* L. “papaya”.<sup>17</sup>**

Se realizó una marcha fitoquímica cualitativa al látex y extracto hidroalcohólico de las semillas obtenidos de “papaya”, y se determinó la presencia de los diferentes metabolitos secundarios tales como: alcaloides, lactonas, cumarinas, flavonoides, quinonas, catequinas, saponinas, azúcares reductoras, taninos, fenoles, aminas, cardenólidos y resinas.<sup>17</sup>

### **3.4 Extracción de ADN genómico humanos:**

Se realizó en el Centro de Investigación en Biología Molecular y Bioinformática, contando con seis unidades de bolsa colectora de sangre “cuádruple” fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos (para el desecho); las mismas que se consiguieron en donación del Banco de Sangre del Hospital Regional de Ayacucho “Miguel Ángel Mariscal Llerena”, para la obtención del ADN de linfocitos con el siguiente protocolo descrito en Miranda.<sup>18</sup>

1. Se transfirió 2 mL de sangre (paquete globular) a un tubo de centrifuga con tapa rosca y adicionó 8 mL del tampón Tris– HCL 50 mM (pH 7.7) precalentado a 37 °C.

2. Se homogenizó e incubó a 37 °C por 30 minutos, se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos para sedimentar los linfocitos.
3. Se descartó el sobrenadante aspirándolo con una pipeta Pasteur dejando el botón celular del centrifugado en la parte inferior del tubo.
4. Se repitió los procedimientos 2 y 3 (esta vez con 9 mL de tampón Tris – HCl 50 mM (pH 7.7), hasta tener un preparado claro.
5. Se Adicionó al botón celular, 9 mL de solución salina (NaCl al 0.85%) se homogenizó y centrifugó a 2500 rpm/ 10 minutos.
6. Se aspiró y descartó el sobrenadante dejando solo el sedimento (botón celular), se resuspendió el sedimento en 400ul de la solución HIGH TE (Tris-HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 100 mM). y transfirió a un tubo de microcentrífuga de 2 mL.
7. Se adicionó 400ul de solución de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0; EDTA 40 mM; SDS al 1%; NaCl 10 mM).precalentada a 50 °C.
8. Se adicionó 10 µL de la solución de proteinasa K (20 mg/mL) e incubó por una hora y media a 53 °C.

Se adicionó 750 ul de la solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), luego se homogenizó por inversión delicadamente durante 10 minutos.

9. Se centrifugó en la microcentrífuga por 10 minutos a 14 000 para separar las fases, luego se aspiró la fase superior acuosa que contiene el DNA y transferirla a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 mL.
10. Se adicionó a la fase acuosa 750ul de la solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se homogenizó por inversión durante 5 minutos. Se centrifugó en la microcentrífuga por 10 minutos a 14 000 rpm; luego se aspiró la fase acuosa que contiene el ADN y transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 2 mL.
11. Se repitió el procedimiento 11 hasta obtener una fase acuosa completamente clara.
12. Se agregó la solución de acetato de sodio 3M, pH 5.2. en cantidad igual a 1/10 del volumen de la fase acuosa.
13. Se adicionó un volumen de alcohol isopropílico helado y dejamos en reposo por una noche en refrigeración. Luego centrifugamos en la microcentrífuga por 15 minutos a 14 000 rpm.
14. Eliminamos cuidadosamente el sobrenadante y enjuagamos el sedimento con 1 mL de etanol al 70%.

15. Se centrifugó en la microcentrífuga por 10 minutos, eliminar el alcohol y dejamos secar el sedimento a medio ambiente.
16. Se resuspendió el sedimento con 400 µL de la solución low TE (Tris HCl 50 mM, pH 8.0; EDTA 1 mM) y se guardó en la nevera.

### **3.5 Cuantificación de ADN genómico humano:**

#### **3.5.1 Por espectrofotometría.<sup>18</sup>**

Procedimiento:

1. Se homogenizó lentamente las muestras de ADN, por diez veces, con la ayuda de una micropipeta de 100 µL.
2. Se preparó el espectrofotómetro UV marca Eppendorf Bio Photometer plus, con la opción de cuantificar el ADN.
3. Para limpiar la superficie del adaptador donde se coloca la muestra, se depositó 10 µL de agua bidestilada estéril, luego de un minuto, se retiró el agua utilizando papel "tissue", para mejor limpieza se repitió este paso.
4. Nuevamente se depositó 10 µL de agua bidestilada estéril sobre la superficie del adaptador, se colocó la tapa de factor 50 – Lp 0,2 mm y se presionó la opción BLANK (blanco) para calibrar y obtener "cero de absorbancia" (0.000 A°).
5. Se retiró el agua utilizando papel "tissue", luego se depositó 5 µL de la muestra de ADN, se colocó la tapa de factor 50 – Lp 0,2 mm y presionó la opción SAMPLE para ver el resultado de la cuantificación y pureza de ADN en la pantalla del equipo; luego se retiró la muestra con papel "tissue".
6. Se repitió los pasos 4 y 5 para la cuantificación de cada muestra de ADN.
7. Terminada la cuantificación de ADN, se depositó 10 µL de agua bidestilada estéril, sobre la superficie del adaptador, luego de un minuto, se secó con papel "tissue" y se apagó el equipo.

#### **3.5.2 Por electroforesis**

El ADN obtenido, fue visualizado en el gel de agarosa y corrido por electroforesis, realizando los siguientes pasos:

1. Para cada una de las muestras de ADN, se procedió a preparar volúmenes de carga para electroforesis en gel de agarosa al 1.0%, según la siguiente tabla:

Tabla 1. Preparación de carga de ADN para visualización de banda en electroforesis<sup>18</sup>.Ayacucho, 2016.

Nº de carril en gel de agarosa	ADN stock (µL)	Buffer Loading 6X (µL)	Volumen de agua PCR (µL)	Volumen final de carga (µL)
1	4	1	7	12

2. Se cargó todo el contenido de las mezclas a cada uno de los pocillos del gel de agarosa al 1.0%, en su respectivo carril por cada muestra de ADN.
3. Luego se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se dejó correr a 40 voltios por 40 minutos.
4. Se sumergió el gel de agarosa, en una fuente que contenía bromuro de etidio al 1%, durante veinte minutos y se realizó un enjuague suave con agua corriente; luego se visualizó por radiación en UV en el sistema de registrador de imágenes marca Biometra UV solo TS. Adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; en ambos casos para visualizar las bandas de ADN a diferentes concentraciones.<sup>18</sup>

### 3.6 Ensayos de la genotoxicidad *in vitro*, “método Tomasevich”:

Se desarrolló siguiendo el “método Tomasevich” propuesto por Miranda<sup>16</sup>; con las siguientes fases:

#### 3.6.1 Fase de cuantificación y preparación de stock de ADN genómico obtenido para el ensayo.

El ADN genómico obtenido, fue cuantificado por espectrofotometría UV marca Eppendorf BioPhotometer plus; luego se preparó un stock a concentración de 1500 ng/µL en volumen final de 150 µL, para cada muestra (látex y extracto hidroalcohólico de la semilla) de la “papaya”.<sup>18</sup>

#### 3.6.2 Fase de ensayo de genotoxicidad *in vitro* del látex y extracto hidroalcohólico de *Carica papaya L.* “papaya”, sobre el ADN genómico humano.

Se preparó las soluciones del látex a 5%, 10%, 50% y 100%, y del extracto hidroalcohólico de la semilla de *Carica papaya L.* “papaya”, a concentraciones de 5 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL y 100 mg/mL, con agua bidestilada estéril.

Se acondicionó las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* de ADN genómico humano, de acuerdo al detalle siguiente:

Tabla 2. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* de látex de *Carica papaya L.* “papaya”, sobre ADN genómico. Ayacucho, 2016<sup>18</sup>

Condiciones		Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>					
Nº de tubo		1	2	3	4	5	6
Stock de ADN (1 500 ng/µL) Volumen en µL		14	14	14	14	-	14
Látex	Concentración (%)	5	10	50	100	100	-
	Volumen (µL)	0.3	0.6	3	6	6	-
Agua bidestilada estéril		5.7	5.4	3	-	14	6
Volumen total (µL)		20	20	20	20	20	20
Incubación en baño María a 37°C		1 hora					

Tabla 3. Preparación de las mezclas para ensayo de genotoxicidad *in vitro* de extracto hidroalcohólico de las semillas de *Carica papaya L.* “papaya”, sobre ADN genómico.<sup>18</sup> Ayacucho, 2016

Condiciones		Mezclas para ensayo de genotoxicidad <i>in vitro</i>					
Nº de tubo		1	2	3	4	5	6
Stock de ADN (1 500 ng/µL) Volumen en µL		14	14	14	14	-	14
Extracto hidroalcohólico	Concentración (mg/mL)	5	10	50	100	100	-
	Volumen (µL)	6	6	6	6	20	-
Agua bidestilada estéril		-	-	-	-	-	6
Volumen total (µL)		20	20	20	20	20	20
Incubación en baño María a 37°C		1 hora					

Se realizaron cuatro repeticiones de los ensayos de genotoxicidad *in vitro*, de la planta medicinal en estudio, tanto con el extracto hidroalcohólico de las semillas, como con el látex.

### 3.6.3 Fase de electroforesis para la detección de genotoxicidad.

Se preparó el gel de agarosa a 1% y se colocó en una cámara de electroforesis Biometra.

Para el volumen de carga en gel de agarosa, se utilizó las siguientes cantidades: 1 µL de *loading* (colorante señalizador de migración de las bandas), 7 µL de la solución de la prueba de genotoxicidad *in vitro* y 2 µL de agua bidestilada estéril,

volumen final 10  $\mu$ L; se mezcló y se cargó en el respectivo pozo del gel de agarosa para electroforesis.

Se instaló la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se programó a 40 voltios (V) por cuatro horas.<sup>18</sup>

#### **3.6.4 Fase de radiación UV para la visualización de genotoxicidad.**

Luego del tiempo de corrido electroforético, se sumergió el gel de agarosa en una fuente que contenía bromuro de etidio al 1% durante veinte minutos aproximadamente, se enjuagó con agua corriente una vez y para visualizar las bandas y/o fragmentos de ADN productos de la genotoxicidad, se colocó el gel en radiación de luz ultra violeta, dentro del sistema de registrador de imágenes Biometra *UVsolo TS*.<sup>18</sup>

Adicionalmente se tomó fotografías con una cámara digital Canon 20x de 12,1 mega pixeles full HD, sobre un transiluminador UV marca Ultra Lum; en ambos casos para visualizar las bandas de ADN a diferentes concentraciones.<sup>16</sup>

#### **3.6.5 Fase de interpretación y clasificación del registro visual de genotoxicidad.**

La escala de los valores numéricos correspondientes a los niveles de fragmentación del ADN como producto de la genotoxicidad, visualizados en el registro fotográfico, están basados en la clasificación del “ensayo cometa” propuesto por Speit (1995) y Collins (2004).

Tabla 4. Clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual.

<b>Clase</b>	<b>Genotoxicidad</b>
0	fragmentación de ADN < 5%
1	fragmentación de ADN entre 5 a 20%
2	fragmentación de ADN entre 20 a 40%
3	fragmentación de ADN entre 40 a 95%
4	fragmentación de ADN > 95%

Fuente: Larrea Poma M., 2007

#### **3.7 Análisis de datos:**

Los datos se agruparon y presentaron en tablas, expresados en registros fotográficos y figuras que explican mejor los hallazgos. El daño genotóxico se evaluó mediante el paquete estadístico SPSS, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para más de dos muestras independientes. El valor de  $p \leq 0,05$ , se consideró como el nivel estadísticamente significativo, según Hernández<sup>16</sup>



#### **IV. RESULTADOS**



Tabla 5: Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en látex de *Carica papaya L.* "papaya". Ayacucho, 2016.

<b>Metabolitos secundarios</b>	<b>Ensayos</b>	<b>Resultados</b>	<b>Observaciones</b>
Alcaloides	Mayer	+++	Precipitado blanco
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	++	Precipitado naranja
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	-	Precipitado azul
Flavonoides	Shinoda	-	Anaranjado rojizo
Saponinas	Espuma	+	Espuma
Azúcares reductores	Benedict	-	Precipitado rojo
Catequinas	Carbonato de sodio	-	Mancha verde carmelita
Triterpenos y Esteroides	Lieberman	-	Verde intenso u oscuro
Aminoácidos	Ninhidrina	+++	Color azul violáceo
Quinonas	Borntrager	-	Coloración rosada
Glicósidos cardiotónicos	kedde	-	Coloración violáceo

Leyenda:

(+) : Leve

(++) : Moderada

(+++): Abundante

Tabla 6: Tamizaje fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios presentes en extracto hidroalcohólico de las semillas de *Carica papaya L.* "papaya". Ayacucho, 2016.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Alcaloides	Mayer	++	Precipitado blanco
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	-	Precipitado naranja
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	+++	Precipitado azul
Flavonoides	Shinoda	+	Anaranjado rojizo
Saponinas	Espuma	+++	Espuma
Azúcares reductores	Benedict	++	Precipitado rojo
Catequinas	Carbonato de sodio	+	Mancha verde carmelita
Triterpenos y Esteroides	Lieberman	+	Verde intenso u oscuro
Aminoácidos	Ninhidrina	++	Color azul violáceo
Quinonas	Borntrager	++	Coloracion rosada
Glicósidos cardiotónicos	kedde	++	Coloración violáceo

Leyenda:

- (+) : Leve
- (++) : Moderada
- (+++): Abundante

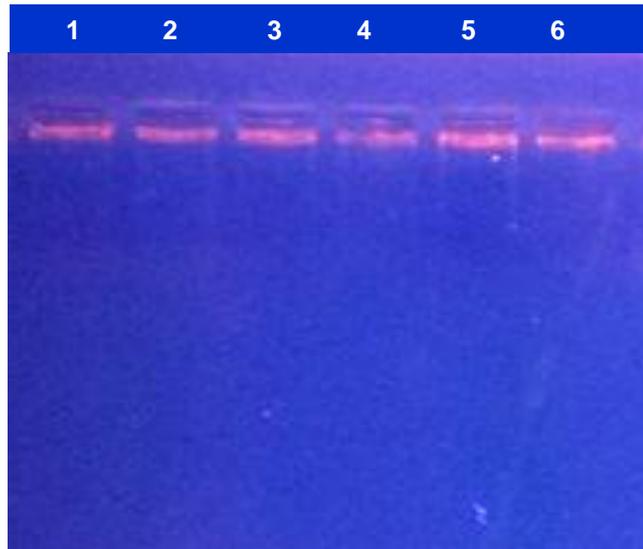


Figura N° 1. Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico de linfocitos humanos obtenido de seis muestras y coloreado con bromuro de etidio.

Leyenda:

Volumen de carga: Muestra 4  $\mu$ L + loading 6X 1  $\mu$ L + 7  $\mu$ L agua PCR.

Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante una hora.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante diez minutos.



Figura 2. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de *Carica papaya* L. "papaya" a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 %, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del primero y segundo ensayo, respectivamente.

Leyenda:

Carril N° 1: Con 5 %.

Carril N° 2: Con 10 %.

Carril N° 3: Con 50 %.

Carril N° 4: Con 100 %.

Carril N° 5: Con 100% de látex (blanco).

Carril N° 6: Con 100% de ADN (control).

Volumen de carga: Muestra (7 μL) + loading (1 μL) + agua PCR (2 μL) = 10 μL.

Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 3 horas.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos.

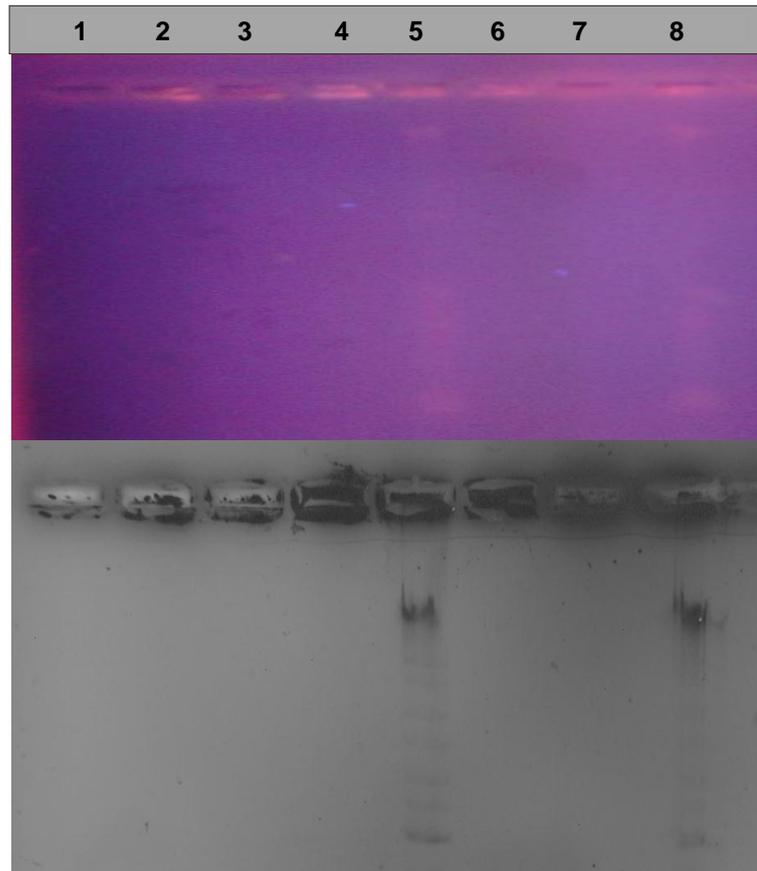


Figura 3. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de *Carica papaya* L. “papaya” a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 %, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/ $\mu$ L, durante una hora de incubación a 37°C, del tercero y cuarto ensayo, respectivamente.

Leyenda:

Carril N° 1: Con 5 %.

Carril N° 2: Con 10 %.

Carril N° 3: Con 50 %.

Carril N° 4: Con 100 %.

Carril N° 5: Con 100% de ADN (control).

Carril N° 6: Con 5% (prueba repetida).

Carril N° 7: Con 100% (prueba repetida).

Carril N° 8: Con 100% de ADN (control - prueba repetida).

Volumen de carga: Muestra (7  $\mu$ L) + loading (1  $\mu$ L) + agua PCR (2  $\mu$ L) = 10  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 3 horas.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos.

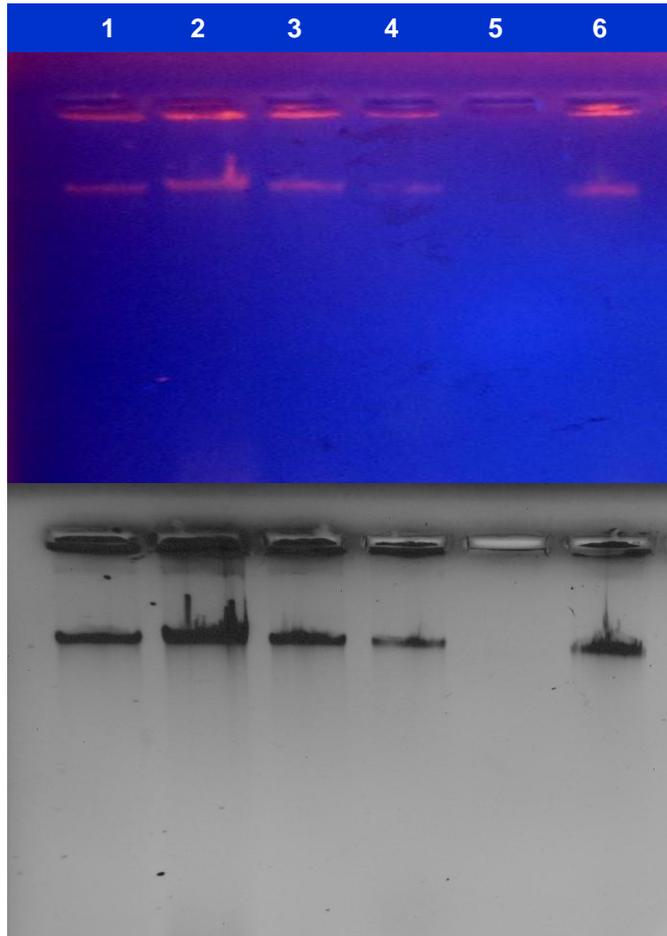


Figura 4. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Carica papaya* L. “papaya” a concentraciones de 100, 50, 10 y 5 mg/mL, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/ $\mu$ L, durante una hora de incubación a 37°C, del primero y segundo ensayo, respectivamente.

Leyenda:

Carril N° 1: Con 100 mg/mL.

Carril N° 2: Con 50 mg/mL.

Carril N° 3: Con 10 mg/mL.

Carril N° 4: Con 5 mg/mL.

Carril N° 5: Con 100% de extracto (blanco).

Carril N° 6: Con 100% de ADN (control).

Volumen de carga: Muestra (7  $\mu$ L) + loading (1  $\mu$ L) + agua PCR (2  $\mu$ L) = 10  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 3 horas.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos.

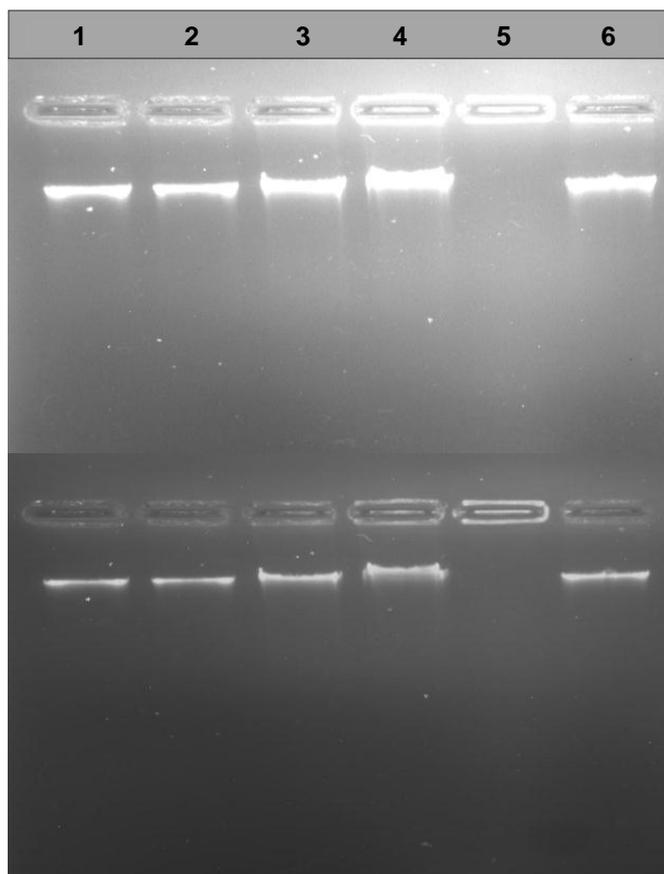


Figura 5. Electroforesis de los productos de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Carica papaya L.* “papaya” a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 mg/mL, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/ $\mu$ L, durante una hora de incubación a 37°C, del tercero y cuarto ensayo, respectivamente.

Leyenda:

Carril N° 1: Con 5 mg/mL.

Carril N° 2: Con 10 mg/mL.

Carril N° 3: Con 50 mg/mL.

Carril N° 4: Con 100 mg/mL.

Carril N° 5: Con 100% de extracto (blanco).

Carril N° 6: Con 100% de ADN (control).

Volumen de carga: Muestra (7  $\mu$ L) + loading (1  $\mu$ L) + agua PCR (2  $\mu$ L) = 10  $\mu$ L.

Condiciones de electroforesis: 40 voltios durante 3 horas.

Coloración de ADN: Bromuro de etidio al 1% durante 10 minutos.

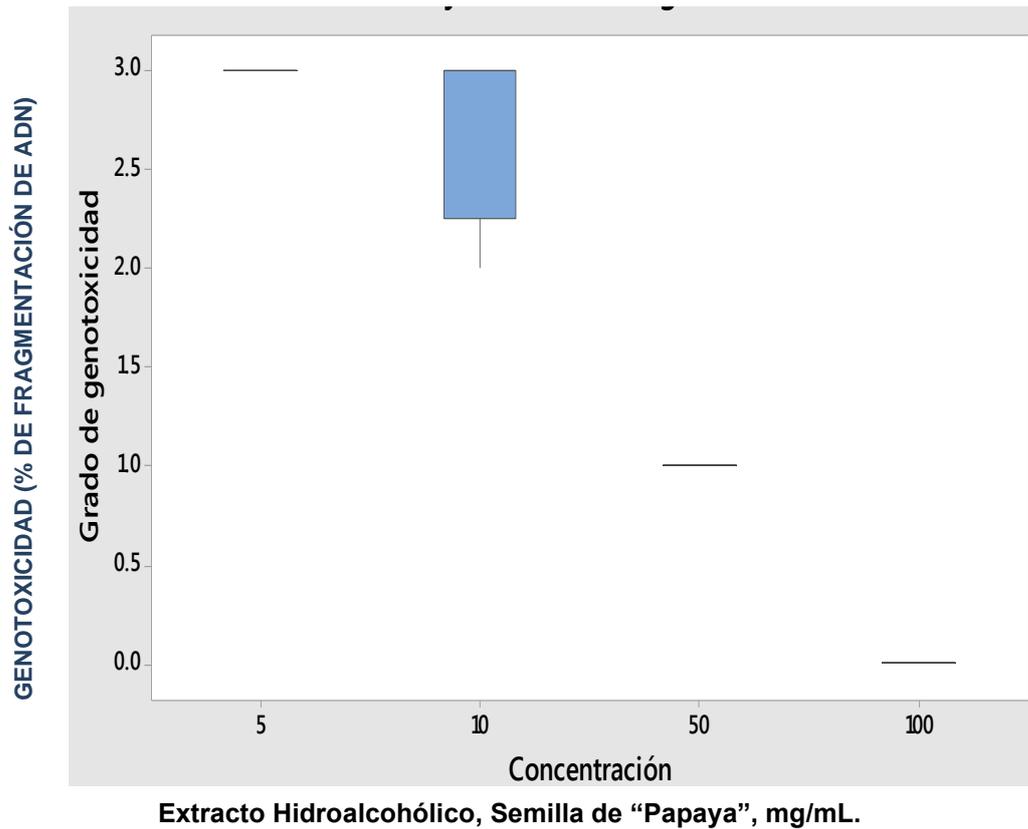


Figura 6. Prueba de Kruskal Wallis para evaluar el grado de genotoxicidad mediante fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, por efecto del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Carica papaya L.* "papaya" a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación a 37°C.

## V. DISCUSIÓN

Los diferentes ensayos específicos realizados para la detección de metabolitos secundarios presentes en el látex de *Carica papaya L.* “papaya”, se muestran la tabla N° 5 resaltando entre ellos abundantes concentraciones de alcaloides y aminoácidos (+++), seguido de moderada concentración de lactonas y/o cumarinas (++) , leve presencia de saponinas (+), y ausencia de fenoles y/o taninos, flavonoides, azúcares reductores, catequinas, triterpenos-esteroides, quinonas y glicósidos cardiotónicos.

Así mismo, en la tabla N° 6, muestra los resultados del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Carica papaya L.* “papaya, resaltando entre ellos abundantes concentraciones de fenoles y/o taninos y saponinas (+++); seguidos de alcaloides, azúcares reductores, aminoácidos, quinonas y glicósidos cardiotónicos (++) ; con leve concentración flavonoides, catequinas y triperpenos-esteroides (+); y ausencia de lactonas y/o cumarinas (-). Podemos apreciar que las semillas contienen diez de los once metabolitos que estudiamos, mostrando una gran diversidad en su composición, tal vez por la función que cumple las semillas de llevar y proteger en sus células, el material genético que dará origen a un nuevo individuo.

Estudios realizados por Pillaca<sup>8</sup> nos confirma la presencia de metabolitos secundarios del látex de *Ficus carica L.* “higo”, tales como: alcaloides, lactonas, y/o cumarinas y flavonoides; además de principios amargos y astringentes; a diferencia del látex de la “papaya” no se encontró flavonoides ni principios amargos y astringentes, pero sí alcaloides, lactonas, y/o cumarinas y aminoácidos.

La figura 1, muestra el registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico de linfocitos humanos obtenido de seis unidades de bolsa colectora de sangre “cuádruple” fraccionada, conteniendo el paquete de glóbulos blancos; corrido a 40 voltios durante una hora y coloreado con bromuro

de etidio al 1% durante diez minutos. Como se puede apreciar la refringencia del color rosado debido a la emisión de la luz del bromuro de etidio intercalado en el ADN, esto por efecto de los rayos ultra violeta, revela que todas las muestras contienen abundante ADN, entero y sin fragmentación, reuniendo óptimamente todas las condiciones necesarias para realizar los ensayos de genotoxicidad.

Los registros fotográficos de la figura 2, reflejan la electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de *Carica papaya L.* “papaya” a diferentes concentraciones, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del primero y segundo ensayo, respectivamente. Se puede verificar que los tratamientos con 5% (carril 1), 10% (carril 2), 50% (carril 3) y 100% (carril 4), la trayectoria de estos carriles no presentan bandas ni manchas que emitan la luz de color rosado del bromuro de etidio por efecto de los rayos ultravioleta, quiere decir que no muestran presencia de ADN íntegro ni fragmentado, esto debido a que los componentes presentes en el látex, han digerido o fragmentado al ADN, hasta sus unidades nucleotídicas, que impiden al bromuro de etidio intercalarse entre los espacios de una cadena polinucleotídica.

Se demuestra así, que el látex de *Carica papaya L.* “papaya” a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 %, presentan efecto genotóxico frente al ADN genómico humano, cabe resaltar que aún al 5% que es una concentración muy diluida del látex, esta ejerce igual acción que el de 100%, vale decir que este látex es un potente genotóxico.

Igualmente los registros fotográficos de la figura 3, muestran la electroforesis de los productos de la genotoxicidad del látex de *Carica papaya L.* “papaya” a concentraciones de 5% (carril 1), 10% (carril 2), 50% (carril 3) y 100% (carril 4), frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del tercero y cuarto ensayo, respectivamente; el carril 5, corresponde al ADN sin tratamiento que sirve como control, y los carriles 6 y 7 son repeticiones de las concentraciones de 100% y 5%, respectivamente, el carril 8 contiene ADN control. Se puede evidenciar que los resultados son los mismos de la figura 5, llegando a la conclusión que el látex de *Carica papaya L.* “papaya” desde 5% a 100%, tiene efecto genotóxico potente.

Vega<sup>7</sup>, determinó la variación del índice mitótico, por efecto citostático del látex de *Euphorbia peplus L.* y *Ficus carica L.* sobre el meristemo radicular de *Allium cepa L.* “cebolla”, realizando la lectura entre 1000 a 3500 células por muestra.

Según la prueba de Tukey la especie que tiene mayor efecto citostático fue la *Euphorbia peplus L.f.* (IM=0,00%), seguido de *Ficus carica L.* (IM=0,32%). El tiempo de tratamiento de mayor actividad antimitótica fue a las 8 horas con látex al 3% de *Euphorbia peplus L.f.* "leche leche", seguido del látex al 10% de "higo" a las 24 horas.

Pillaca<sup>8</sup>, En su estudio demostró el efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antivirales *Ficus carica* "higo" y *Euphorbia peplus* "leche leche". Los resultados revelan que el látex de estas dos plantas tienen efecto genotóxico sobre ADN genómico de linfocitos humano, donde el tiempo de incubación a una y cuatro horas, no influye en el efecto; mientras que las concentraciones de los extractos, sí influyen en el efecto genotóxico.

En la figura 4. Se muestran los registros fotográficos con cámara digital a colores y con registrador de imágenes, las electroforesis de los productos de la genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Carica papaya L.* "papaya" a concentraciones de 100, 50, 10 y 5 mg/mL, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C; como se puede apreciar el primero y segundo ensayo, revelan resultados semejantes y según la tabla N° 4 de la clasificación de los niveles de fragmentación del ADN por registro visual, el extracto a concentración de 100 mg/mL (carril 1) ocasiona una fragmentación menor al 5% del ADN, el de 50 mg/mL (carril 2) entre 5 a 20%, mientras que las concentraciones de 10% (carril 3) y 5% (carril 4), revelan una fragmentación de 40 al 95%, respectivamente; todos comparados con la concentración del ADN sin tratamiento (carril 6) que sirve como control. La ausencia del color rosado en el carril 5, demuestra que el extracto hidroalcohólico no contiene ningún tipo de ADN, el mismo que sirve de blanco en todos los ensayos.

La figura 5 revela la electroforesis de los productos de genotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Carica papaya L.* "papaya" a concentraciones de 5, 10, 50 y 100 mg/mL, frente al ADN genómico de linfocitos humanos a 1500 ng/μL, durante una hora de incubación a 37°C, del tercero y cuarto ensayo, respectivamente. Los resultados en ambos son muy similares así como con los dos primeros, con la tendencia que a mayor concentración del extracto hidroalcohólico, la fragmentación del ADN es menor; mientras que a menor concentración del extracto (5 mg/mL y 10 mg/mL), la fragmentación del ADN es mayor.

Sánchez<sup>22</sup>Esta manifestación, con tendencia inversa que a mayor concentración presente menor efecto genotóxico, puede ser porque hay presencia de muchos metabolitos secundarios, que aun estando presente el causante de la fragmentación, en este caso puede estar inhibido o bloqueado por otro compuesto también presente en el extracto. Si el extracto está más diluido, aumenta la probabilidad que los metabolitos secundarios se encuentren libres y pueden ejercer sus actividades.

La figura 6, muestra los resultados de la prueba de Kruskal Wallis que nos permite evaluar el grado de genotoxicidad tomando en cuenta la fragmentación del ADN genómico de linfocitos humano, por efecto del extracto hidroalcohólico de las semillas de *Carica papaya L.* "papaya" a diferentes concentraciones, durante una hora de incubación a 37°C.

La diferencia entre la concentración de 5 mg/mL y 10 mg/mL, no es significativo, en ambos, la degradación del ADN fue entre 40% a 95%, lo cual indica que la genotoxicidad a estas concentraciones es mayor. La degradación observada en la concentración de 50 mg/mL fue de 5% a 20%, siendo diferente significativamente al resto de las concentraciones. Finalmente en la concentración de 100 mg/mL, se observó una fragmentación menor al 5%, el cual también difiere significativamente al resto de las concentraciones; cabe destacar que en esta concentración la genotoxicidad es menor a pesar de ser la de mayor concentración del extracto estudiado.

## VI. CONCLUSIONES

1. El látex y el extracto hidroalcohólico de semilla de *Carica papaya* L. “papaya”, presentan efecto genotóxico *in vitro* frente a ADN genómico humano.
2. Los metabolitos secundarios identificados en el látex de *Carica papaya* L. “papaya”, fueron: abundante concentración de alcaloides y aminoácidos (+++), seguido de moderada concentración de lactonas y/o cumarinas (++) y leve presencia de saponinas (+); mientras que el extracto hidroalcohólico de la semilla se identificó: abundantes concentraciones de fenoles y/o taninos y saponinas (+++); seguidos de alcaloides, azúcares reductores, aminoácidos, quinonas y glicósidos cardiotónicos (++); con leve concentración flavonoides, catequinas y triperpenos-esteroides (+).
3. El látex de *Carica papaya* L. “papaya” desde 5% al 100% de concentración, presenta un potente efecto genotóxico frente al ADN genómico humano; mientras que el extracto hidroalcohólico manifiesta una tendencia inversa, a mayor concentración del extracto la fragmentación del ADN es menor; y a menor concentración del extracto (5 mg/mL y 10 mg/mL), la fragmentación del ADN es mayor.



## VII. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar trabajos de genotoxicidad de *Carica papaya* L. “papaya” en cultivos celulares con el “ensayo cometa” y ensayos *in vivo* para continuar con el conocimiento de estos efectos.
2. Identificar los metabolitos secundarios de los extractos que presentaron actividad genotóxica en este estudio.



## VIII. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Cueva, A. Plantas medicinales: Propiedades y usos. 1 edición, Editorial A.F.A., Lima Perú. 2003.
2. Carballo M, Cortada C, Gadano A. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. Revista teoría, historia y fundamentos de la Ciencia [revista en Internet] 2005 [acceso febrero 2014]; 14(2): 95-108. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=29914211>.
3. Mena-Huertas J. y col. Ausencia de efecto citotóxico, mutagénico y genotóxico de extracto acuoso y aceite esencial de *Carica candamarcensis* hook. (plantae: caricaceae). ActaBiol vol.33 nº 95 Medellín July/Dec. 2011.
4. Marchiori Mariani P. y Col. Efectos quimiopreventivos y antimutagénicos *in vivo* del extracto hidroetanólico de frutos de *Carica papaya* L. Rev. Cubana Plant Med vol 18 nº 3 Ciudad de La Habana jul.-set. 2013.
5. Chang Y-C, Chang F-R, Khalil A, Hsieh P-W, Wu Y-C. Cytotoxic Benzophenanthridine and Benzylisoquinoline Alkaloids from Argemone Mexicana.2003 [acceso 14 de agosto de 2015]; 521-526. Disponible en: <http://www.degruyter.com/view/j/znc.2003.58.issue-7-8/znc-2003-7-813/znc-2003-7-813.xml>.
6. Saranya M, Arun T, Iyappan P. Invitro Antibacterial Activity and Preliminary Phytochemical Analysis of Leaf Extracts of Argemone Mexicana Linn – a medicinal plant. International Journal of Current Pharmaceutical Research [revista en Internet]. Mayo 2012 [acceso 14 de agosto de 2015]; 4 (3): 85-87. Disponible en: <http://www.ijcpr.org/Issues/Vol4Issue3/547.pdf>.
7. Vega R. Efecto citostático del látex de *Euphorbia peplus* L.f “leche leche” y *Ficus carica* L.”higo” en el meristemo radicular de *Allium cepa* L. “cebolla”. Ayacucho, Perú. 2006.
8. Pillaca L. Efecto genotóxico *in vitro* de plantas medicinales antiverrucosas *Euphorbia peplus* “leche leche” y *Ficus carica* “higo”, Ayacucho - 2013.Tesis de Químico Farmacéutico. UNSCH.
9. Rodríguez M, “Actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólico e hidroalcohólico de hojas de *Carica papaya* (papayo), frente a *Staphylococcus aureus* *Escherichiacoli*, por el método de macrodilución” (tesis para optar título). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana. Iquitos, Perú. 2014.
10. Rodrigo A.Urrego, zoot; Andrés Pareja, zoot; Neil A Vásquez, Biol, MSc; María E Marquez1 ,Biol, MSc. “El Ensayo Cometa: una técnica para evaluar genotoxicidad en el ADN de oocitos bovinos” 2005 Revista colombiana de Ciencias Pecuarias.Grupo de Biotecnología Animal, Facultad de Ciencias Universidad Nacional de Medellín, Colombia. 2005.
11. Aucasime L. Plantas medicinales de la provincia de Huamanga- Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2007.
12. Font Q. Plantas medicinales. Editorial Labor S.A. Barcelona 1981.
13. Hoffmann G. Genetic Toxicology. En G. Hoffmann. Quinta Edición. Toxicology: *the basis science of poisons* (pp. 269-300). New York: Cassarett and DOULLS. 1996.
14. Sánchez A, Fonseca G, Capiro N, & Fernández D. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba. Revista Cubana de Farmacia, 34, 34-43. 2000.

15. Peña E, Barrueco C, Herrera A, & García P. Ensayos de genotoxicidad: una alternativa a la experimentación animal. *Revista de Experimentación Animal*, 1, 41-52. 1990.
16. Hernández R, Fernández C, Baptista P. *Metodología de la Investigación*. Quinta edición. Perú. Editorial Mc Graw Hill. 2010.
17. Lock de Ugaz, O. *Investigación Fitoquímica*. Segunda Edición. Lima: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 1994.
18. Miranda T, Valer G. *Protocolos de Biología Molecular*. Editorial Multiservicios Infante EIRL. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2013.
19. Monteith D. Vanstone J. Comparison of the microgel electrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of ADN damage. *Mutation Research* 345:97-103. 1995.
20. [sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/5\\_-\\_Produccion\\_de\\_metabolitos.pdf?sequence=7](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/5_-_Produccion_de_metabolitos.pdf?sequence=7)
21. Alice C, Vargas V, Silva G, de Sigueria N, chapoval E, Gleve J, Henriques A, Screening of plants used in South Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 35,p 165-171.1991.
22. Reynoso M. Evaluación de la genotoxicidad de compuestos aislados de *Lupinus mexicanus* y *Lupinus montanus*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas. Universidad de Guadalajara. Zapopan, Jalisco. México.2011.
23. Reyes F. Caracterización del efecto anticancerígeno del ácido maslínico, titerpeno pentacíclico de origen natural. [tesis doctotal]. Universidad de Granada. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Granada. 2007.
24. Figueroa, R. Evaluación de extractos vegetales contra el gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) en maíz. [Tesis de Maestría]. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 14-24. (2002).
25. Figueroa, R; M. Gutiérrez; L. Aldana; E. Valdés y C. Hernández, "Compuestos puros de *Carica papaya* contra *Spodoptera frugiperda*. Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Departamento de interacciones Planta e Insecto", Laboratorio de Entomología, Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, Morelos.27 (2002).
26. Boomi, M; M. Ruchi; G, Shipra; L, Nirmal, Spermcharacteristics and ultrastructure of testes of ratsafterlong –termtreatment with the methanol subfraction of *Carica papaya* seed. *Asian Journal of Andrology*. 11:583-599. (2009).
27. Franco S, A. Jiménez, C. Luna, y R. Figueroa. "Efecto tóxico de semillas de cuatro variedades de *C. papaya* (Caricaceae) en *S. frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)" *Folia Entomol. Méx.*, 45: 171-177 (2006)

## **ANEXOS**

## ANEXO 1.



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

### C E R T I F I C A

Que, la estudiante de Biología, **Srta. Carmen Olga, QUISPE MEZA**, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

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

DIVISIÓN : MAGNOLIOPHYTA  
CLASE : MAGNOLIOPSIDA  
SUB CLASE : DILLENIIDAE  
ORDEN : VIOLALES  
FAMILIA : CARICACEAE  
GENERO : *Carica*  
ESPECIE : ***Carica papaya L.***  
Nombre vulgar. : "papaya"

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

Ayacucho, 30 de Marzo del 2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
HERBARIUM HUAMANGENSIS  
  
Biga. Laura Aucosime Medina  
JEFE

## ANEXO 2.

### *Carica papaya*.L

**Nombre común** : " papaya "  
**Familia** : Caricaceae

#### DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Árbol dioico de porte bajo y tronco erguido sin ramificación, succulento, fibroso, con presencia de cicatrices foliares prominentes en la corteza, presenta látex de un color blanco lechoso; las hojas son grandes largamente pecioladas, alternas y palmati-lobuladas y palminérvias que se forman en la parte apical del tallo.

Inflorescencias masculinas en panículas axilares colgantes y protegidas por brácteas, a veces puede estar acompañado de flores bisexuales; flores masculinas con 5 sépalos soldados de color verde amarillento, corola formado por 5 pétalos soldados de color amarillo, 10 estambres dispuestos en 2 ciclos. Flores femeninas solitarias ó formando racimos de pocas flores, grandes, cáliz de 5 sépalos soldados verde amarillentos, corola de 5 pétalos libres de color blanco cremoso ó amarillo pálido de ovario súpero unilocular conteniendo muchos óvulos de placentación parietal; fruto baya grande de color que varía entre amarillento, anaranjado y rojizo.

#### Hábitat y Distribución

Es originaria de América central. Se cultiva en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo por sus frutos que son ampliamente utilizados en la alimentación.

#### Usos : Insecticida :

La savia del tallo se usa como plaguicida contra la sarna, ascarosis, verrugas y hongos de la piel.

#### Usos medicinales :

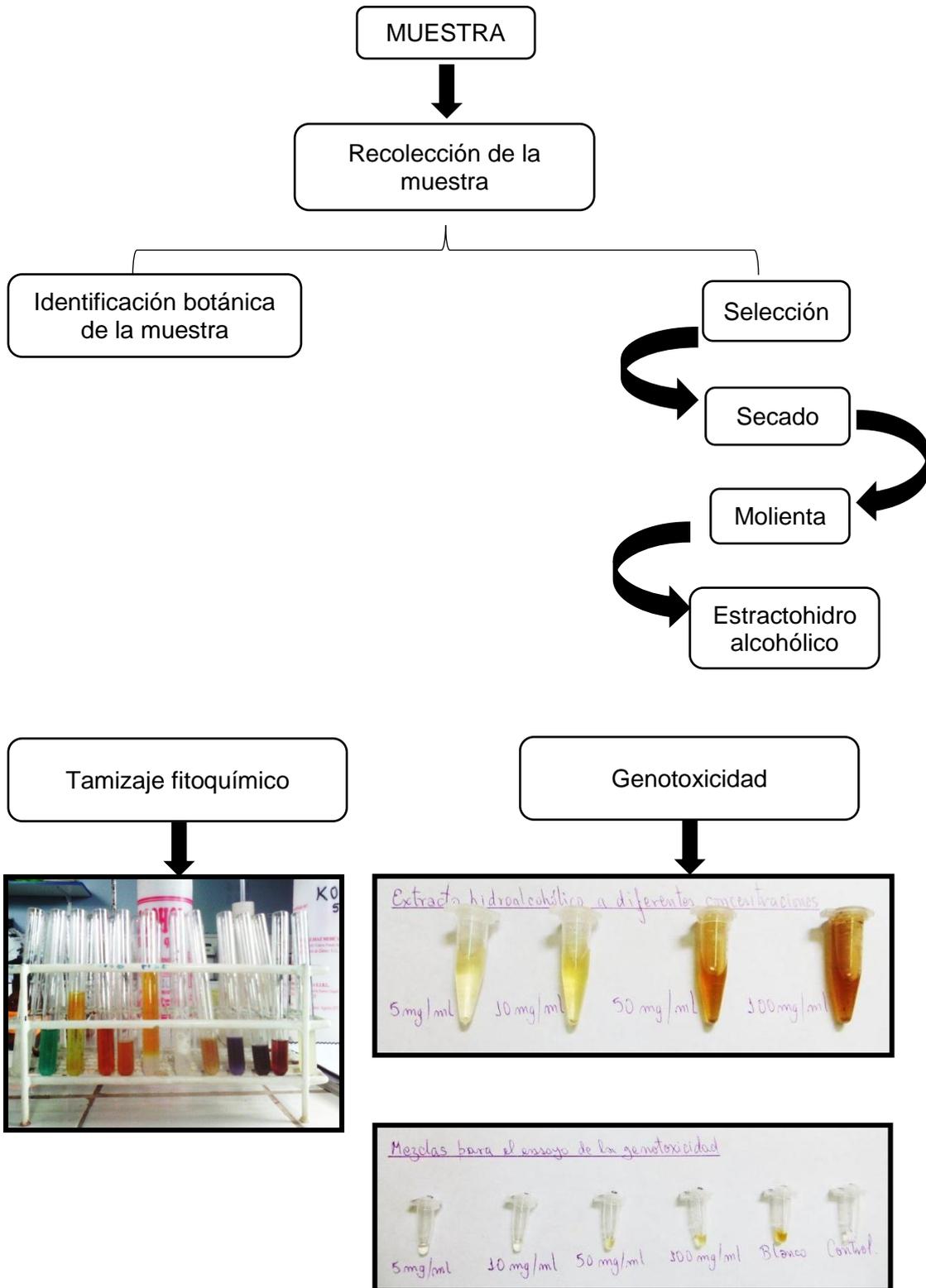
Antihelmíntico bebiendo las semillas licuadas, antiséptico aplicando las hojas estrujadas ó el látex, como diurético, infecciones urinarias y cólicos renales tomando el cocimiento de las hojas tiernas.; como cicatrizante de heridas, aplicando el látex ó el polvo de las semillas a las heridas; para la mastitis aplicando las hojas machacadas a los pezones

Ayacucho, Marzo del 2 016

UNIVERSIDAD NACIONAL DE  
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Diga. Laura Aucasime Medina  
JEFE

### ANEXO 3.

Esquema de obtención de extracto hidroalcohólico, tamizaje fitoquímico y determinación del efecto genotóxico.



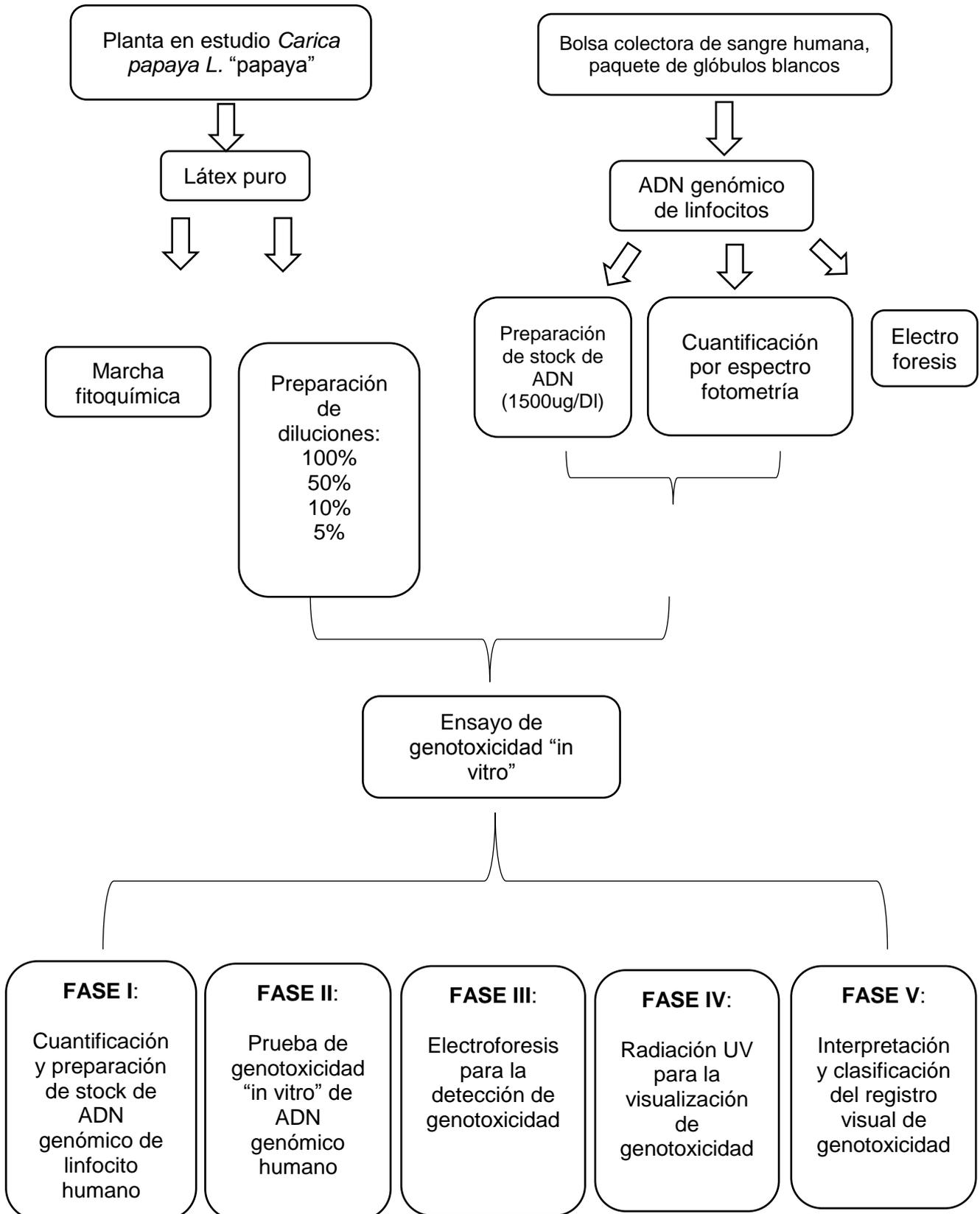
#### ANEXO 4.

Tabla de metabolitos secundarios presentes en látex y extracto hidroalcohólico de *Carica papaya* L. "papaya".

Metabolitos secundarios	Ensayos	Observaciones
Alcaloides	Mayer	Precipitado blanco en todas las reacciones.
Lactonas y/o cumarinas	Baljet	Precipitado naranja
Fenoles y/o taninos	Cloruro férrico	Precipitado azul oscura
Flavonoides	Shinoda	Anaranjado rojizo, carmelita o naranja.
Saponinas	Espuma	Formación de espuma
Azúcares reductores	Benedict	Precipitado rojo ladrillo.
Catequinas	Carbonato de sodio	Mancha verde carmelita a luz UV.
Triterpenos y Esteroides	Lieberman	Verde intenso u oscuro
Aminoácidos	Ninhidrina	Color azul violáceo
Quinonas	Borntrager	Coloración rosada o rojiza.
Glicósidos cardiotónicos	kedde	Coloración violáceo

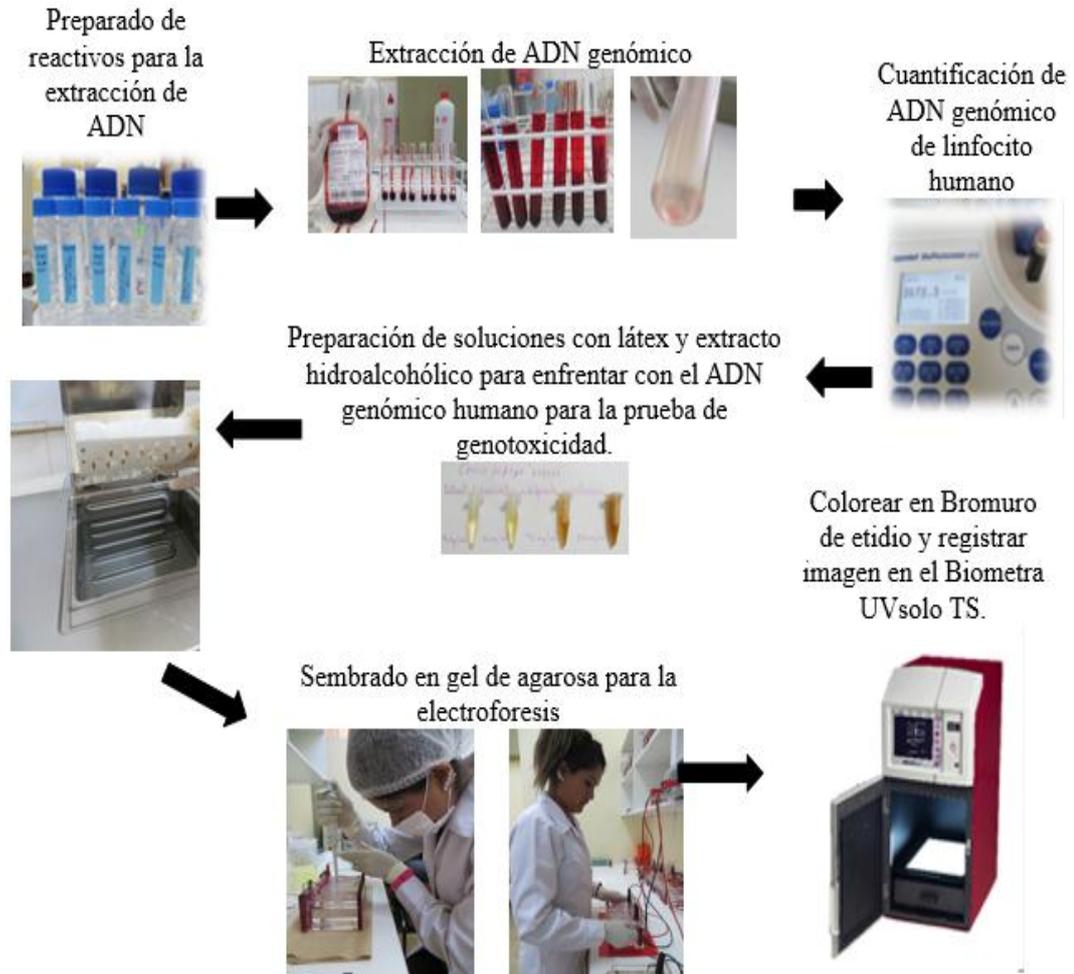
## ANEXO 5.

### Flujograma de Actividad Genotóxica "in vivo"



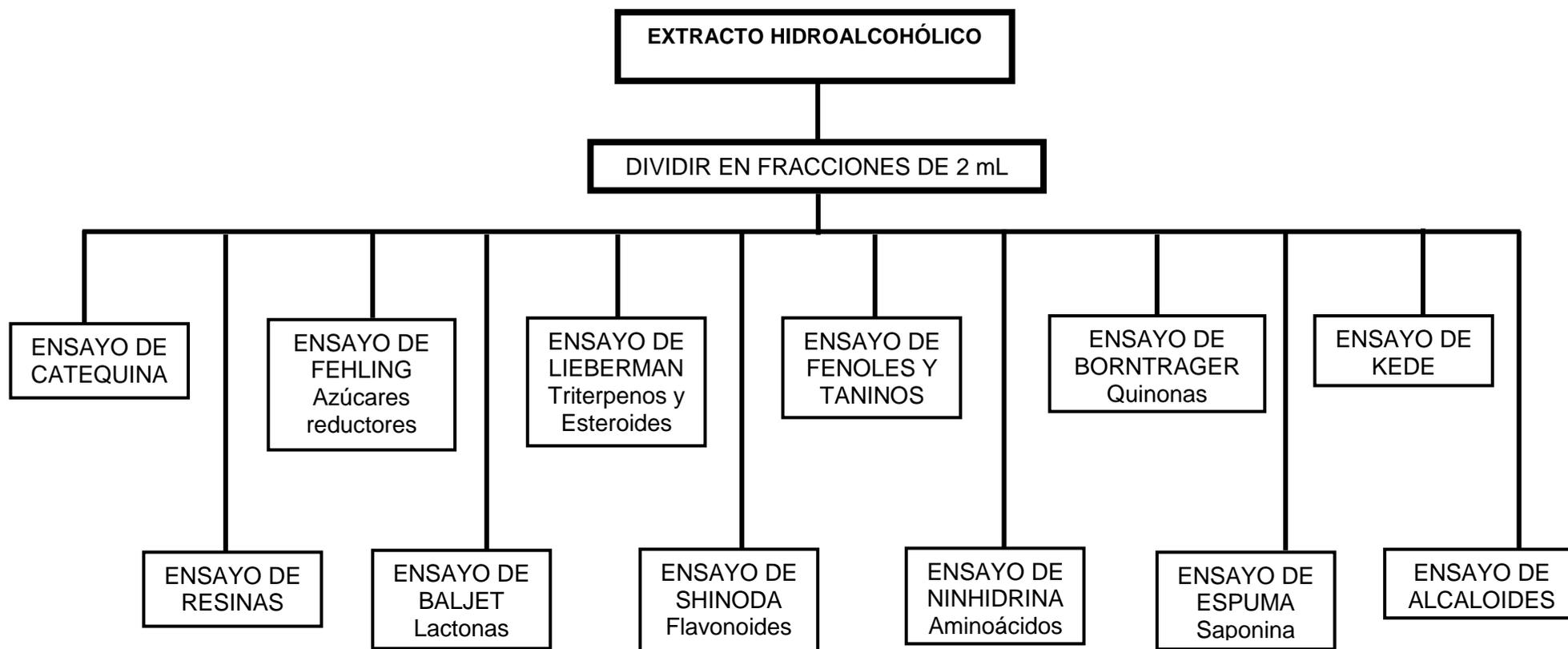
## ANEXO 6.

Protocolo para la determinación del efecto genotóxico *in vitro* mediante electroforesis, propuesto por Miranda T.



### ANEXO 7.

Tamizaje fitoquímico del látex y extracto hidroalcohólico de semilla de *Carica papaya* L. "papaya"



## ANEXO 8. Diseño Metodológico

### Obtención del extracto hidroalcohólico:



Semillas del fruto maduro de la "papaya", secadas a temperatura ambiente sobre papel craft, removidas constantemente.



Semillas pulverizadas para macerar en solución, hidroalcohólica. etanol: agua (2:1) se agitó durante una semana, por 15 minutos dos veces al día y se procedió a filtrar.



Llevar a evaporación el filtrado en una estufa a 37°C. Obtener un producto con textura pastosa, a partir de ahí realizar el tamizaje fitoquímico y ensayos de genotoxicidad.

### Obtención del látex:



## ANEXO 9.

### Extracción de ADN genómico de linfocitos humano



Unidad de sangre para transfusión, se transfirió 1ml de sangre en tubo de ensayo.



Se adicionó tampón tris-Hcl precalentado.



Homogenizar e incubar a 37°C por 30 min.



Se centrifugó por 10 minutos para sedimentar los linfocitos



Repetir los procedimientos hasta obtener botón celular claro.



Se aspiró y descartó el sobrenadante dejando solo el sedimento y se resuspendió con solución High TE.



Se Resuspendió el sedimento y tranfirió a tubos de microcentrífuga. Se adicionó solución de lisis precalentado y proteinasa K.



Incubar a 53°C por una hora.



Se adicionó solución cloroformo: alcohol isoamílico, se centrifugó, se aspiró la fase superior acuosa con ADN y se transfirió a otro tubo de microcentrifuga.



Se adicionó solución de acetato de sodio y alcohol isoamílico, se dejó reposar por una noche y se centrifugó.

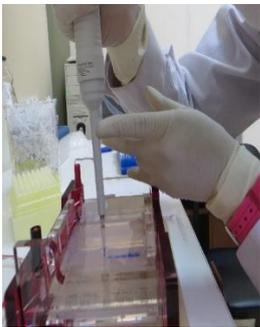


Se eliminó el sobrenadante y enjuagó el sedimento con etanol. Se centrifugó y eliminó el alcohol para dejar secar a medio ambiente. **Se** resuspendió el sedimento con solución low TE.

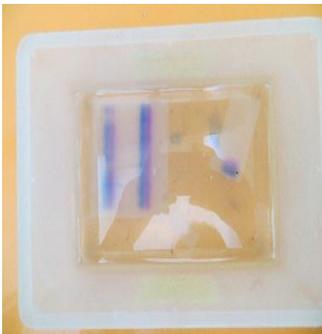
Cuantificación de ADN genómico de linfocito humano por electroforesis:



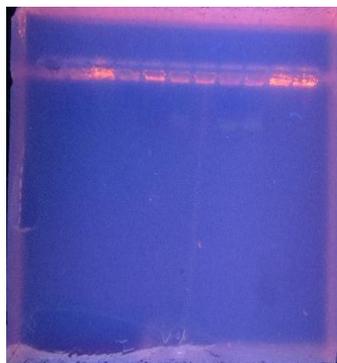
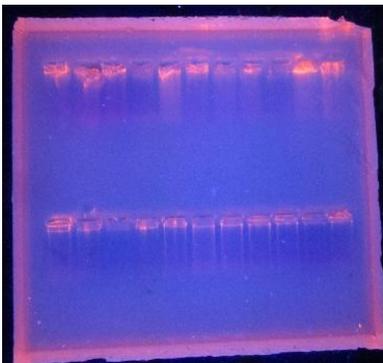
1. Sembrado de ADN de agarosa.
2. Preparación de carga de ADN para visualizar banda
1. Sembrado de ADN carga de ADN para visualizar banda



1. Sembrado de ADN
2. Electroforesis
3. Lavado con bromuro de Etidio.



1. Enjuagar con agua corriente.
2. Observación con rayos UV.



Observación presencia de ADN.

## ANEXO 10.

Tabla 7. Valores numéricas del grado de genotoxicidad de *Carica papaya L.* “papaya”, según la concentración del extracto hidroalcohólico de las semillas y el látex, frente a ADN genómico humano, incubado a 37°C durante una hora. Ayacucho, 2016.

Condiciones de la incubación		<i>Carica papaya L.</i> “papaya”							
		Extracto hidroalcohólico de las semillas.				Látex.			
Temperatura °C	Tiempo Hora	Concentración en mg/mL.				Concentración en %.			
		5	10	50	100	5	10	50	100
37	1	3	3	1	0	4	4	4	4
		3	3	1	0	4	4	4	4
		3	2	1	0	4	4	4	4
		3	3	1	0	4	4	4	4

## ANEXO 11.

Prueba de Kruskal – Wallis para evaluar el grado de genotoxicidad de *Carica papaya L.* “papaya”, según la concentración del extracto hidroalcohólico de las semillas, frente a ADN genómico humano, incubado a 37°C durante una hora. Ayacucho, 2016.

### Prueba de Kruskal-Wallis en Grado de genotoxicidad

Concentración	N	Clasificación Mediana	del promedio	Z
5	4	3.000000000	13.0	2.18
10	4	3.000000000	12.0	1.70
50	4	1.000000000	6.5	-0.97
100	4	0.000000000	2.5	-2.91
General	16		8.5	

H = 12.79 GL = 3 P = 0.005

H = 14.40 GL = 3 P = 0.002 (ajustados para los vínculos)

**ANEXO 12**  
**MATRIZ DE CONSISTENCIA**

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVO	MARCO TEORICO	HIPOTESIS	VARIABLES	METODOLOGIA
Efecto genotóxico <i>in vitro</i> de látex y extracto hidroalcohólico de semilla de <i>Carica papaya</i> L. "papaya" frente a ADN genómico humano. Ayacucho, 2016.	¿Cuál será el efecto genotóxico <i>in vitro</i> de látex y extracto hidroalcohólico de semilla de <i>Carica papaya</i> L. "papaya" frente a ADN genómico humano?	<p><b>GENERAL</b> Determinar el efecto genotóxico <i>in vitro</i> de látex y extracto hidroalcohólico de semilla de <i>Carica papaya</i> L. "papaya" frente a ADN genómico humano".</p> <p><b>ESPECIFICOS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Identificar los metabolitos secundarios presentes en el látex y el extracto hidroalcohólico de semilla de <i>Carica papaya</i> L. "papaya".</li> <li>▪ Caracterizar el efecto de la genotoxicidad del látex y extracto hidroalcohólico de semilla de <i>Carica papaya</i> L. "papaya" frente a ADN genómico humano.</li> </ul>	<p><b>Aspectos Botánicos</b> <i>Carica papaya</i> L. "papaya". Clasificación taxonómica, Descripción Botánica, Composición Química, Actividades Biológicas. Genotoxicidad.</p>	El látex y extracto hidroalcohólico de semilla de <i>Carica papaya</i> L. "papaya" presentan efecto genotóxico <i>in vitro</i> frente al ADN genómico humano.	<p><b>Variable independiente:</b> El látex y extracto hidroalcohólico de semilla de <i>Carica papaya</i> L. "papaya".</p> <p><b>Indicador:</b> - Concentración porcentual v/v del látex, en µL (microlitros). - Concentración m/v del extracto hidroalcohólico de semilla, en mg/mL.</p> <p><b>Variable dependiente:</b> Efecto genotóxico <i>in vitro</i> frente al ADN genómico humano.</p> <p><b>Indicador:</b> - Fragmentación del Ácido desoxirribonucleico (ADN).</p>	<p><b>Tipo de investigación :</b> Experimental.</p> <p><b>Nivel de investigación:</b> Básico</p> <p><b>Definición de la población y muestra:</b> Procedimiento para la recolección de muestra de látex y semillas de <i>Carica papaya</i> L. "papaya".</p> <p><b>Diseño Experimental:</b> Los ensayos se realizarán con un modelo <i>in vitro</i> para estudiar la actividad genotóxica del látex sobre el ADN genómico de linfocitos humanos, demostrándose por su fragmentación. Se aplicará prueba de Kruskal-Wallis para más de dos muestras independientes. El valor de <math>p \leq 0,05</math>.</p>