



**CINÉTICA UREÁSICA DE SUELOS Y SU INTERRELACIÓN CON LA ACTIVIDAD  
DE CATALASA, PEROXIDASA Y PECTINMETILESTERASA EN FRUTOS DE  
*RUBUS GLAUCUS*, TRATADOS CON CLORURO DE CALCIO ( $\text{CaCl}_2$ ) Y ÁCIDO  
ASCÓRBICO ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ).**

**NATALIA ANDREA MORENO COLINA**

**PABLO GILDARDO PARDO PARDO**

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA – UNAD  
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS TECNOLOGÍA E INGENIERÍA  
PROGRAMA DE QUÍMICA**

**BOGOTÁ, 2019**



**CINÉTICA UREÁSICA DE SUELOS Y SU INTERRELACIÓN CON LA ACTIVIDAD DE CATALASA, PEROXIDASA Y PECTINMETILESTERASA EN FRUTOS DE *RUBUS GLAUCUS*, TRATADOS CON CLORURO DE CALCIO ( $\text{CaCl}_2$ ) Y ÁCIDO ASCÓRBICO ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ).**

**NATALIA ANDREA MORENO COLINA**

**PABLO GILDARDO PARDO PARDO**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar el título de**

**QUÍMICO**

**Directores**

**Prof. Dolffi Rodríguez Campos. MSc**

**Magister Docencia de la Química**

**Prof. Jairo Enrique Granados Moreno. MSc**

**Magister Docencia de la Química**

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA – UNAD**

**ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS TECNOLOGÍA E INGENIERÍA**

**PROGRAMA DE QUÍMICA**

**BOGOTÁ, 2019**

Nota de aceptación

---

---

---

---

Presidente del Jurado  
Paula Andrea Méndez Morales

---

Jurado  
Paula Andrea Méndez Morales

Santafé de Bogotá, 2019

### **Dedicatorias**

*El presente trabajo lo dedico principalmente a Dios por ser mi inspirador y dame fuerza para continuar y culminar con éxito este proceso.*

*A mi madre por ser una luz en mi camino por su amor y sacrificio.*

*A mi familia y todos aquellos que estuvieron brindándome su apoyo constante y sin quienes no hubiese sido posible terminar el presente trabajo.*

*Natalia.*

*A Dios, por cumplir su promesa*

*A mi padre in memoriam*

*A mi madre, por su paciencia y confianza en mí*

*Y a todos aquellos que confiaron en este resultado*

*Pablo.*

## **Agradecimientos**

Los autores agradecen a la Universidad Nacional Abierta y a Distancia, a la Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería por su formación en la carrera de Química, la disposición que tuvieron al permitir desarrollar este trabajo de grado en las instalaciones de los Laboratorios de Nutrición y Bioquímica de la sede José Celestino Mutis.

A los profesores Dolffi Rodríguez y Jairo Granados por su apoyo incondicional e impulsar el semillero de investigación que desarrollo el presente trabajo, y por dirigir la presente tesis.

A los laboratoristas Hasbleidy y Michael por su desinteresada colaboración y paciencia hasta que terminábamos las prácticas.

A don Marco Pardo dueño de la finca El Tesoro, vereda Bethel, Municipio de Fusagasugá y don Jorge Rodríguez dueño de la finca Altagracia, vereda El Zaque, municipio de Pasca, por permitir el estudio de los suelos y frutos de sus cultivos de mora.

## Contenido

LISTA DE TABLAS .....	9
LISTA DE GRAFICAS .....	12
LISTA DE FIGURAS .....	15
Abreviaturas.....	16
Introducción .....	17
1. Marco Teórico .....	20
1.1. Generalidades de la mora de Castilla ( <i>Rubus glaucus</i> ) .....	20
1.1.1. Morfología de los frutos <i>Rubus glaucus</i> .....	20
1.1.2. Taxonomía de la mora variedad Castilla ( <i>Rubus glaucus</i> ) .....	21
1.1.3. Cosecha de los frutos.....	21
1.1.4. Almacenamiento de frutos.....	21
1.1.5. Características físicas de la mora .....	22
1.1.6. Madurez .....	22
1.1.7. Indicadores de maduración según NTC 4106 .....	22
1.1.8. Pigmentos presentes en los frutos de mora. ....	23
1.2. Enzimas .....	24
1.2.1. Clasificación de las enzimas .....	24
1.2.2. Reacciones Bioquímicas Enzimáticas (RBE) .....	25
1.2.3. Actividad Enzimática .....	25
1.2.4. Cinética enzimática .....	26
1.2.5. Orden de las reacciones. ....	27
1.2.6. Ureasa (EC 3.5.1.5) .....	27
1.2.7. Pectinmetilesterasa (PME) (EC 3.1.1.11).....	28
1.2.8. Pectina .....	29
1.2.9. Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6) .....	29
1.2.10. Peroxidasa (POD) (EC 1.11.1.7).....	30
1.2.11. Pardeamiento Enzimático .....	31
1.3. Inhibidores Químicos.....	32
1.3.1. Cloruro de calcio: CaCl <sub>2</sub> .....	33
1.3.2. Ácido ascórbico:.....	36
1.4. Estado del arte .....	37
2. Planteamiento del problema y justificación. ....	42

3.	Objetivos .....	43
	General .....	43
	Específicos.....	43
4.	Materiales y Métodos .....	44
	4.1. Localización del experimento .....	44
	4.2. Geografía de Fusagasugá.....	44
	4.3. Geografía de Pasca. ....	45
	4.4. Muestreo Suelos y Frutos .....	45
	4.4.1. Suelos.....	45
	4.4.2. Muestreo Frutos <i>Rubus Glaucus</i> .....	48
	4.5. Diseño experimental para los tratamientos post cosecha .....	48
	4.6. Tratamientos .....	50
	4.7. Variables Evaluadas.....	50
	4.7.1. Análisis fisicoquímico de suelos .....	50
	4.7.2. Actividad enzimática en los suelos:.....	51
	4.7.3. Variables fisicoquímicas en frutos <i>Rubus glaucus</i> .....	51
	4.7.4. Variables enzimáticas en frutos <i>Rubus glaucus</i> : .....	51
	4.8. Análisis Estadístico .....	52
	4.9. Procedimiento en laboratorio.....	52
	4.9.1. Indicadores fisicoquímicos de suelos .....	52
	4.9.2. Actividad y cinética enzimática de ureasa .....	52
	4.9.3. Actividades CAT, POD y PME.....	53
5.	Resultados y Discusión .....	55
	5.1. Indicadores fisicoquímicos del suelo .....	55
	5.2. Análisis fisicoquímico pretratamiento de frutos <i>Rubus glaucus</i> .....	56
	5.3. Indicadores fisicoquímicos en frutos Post-tratamiento .....	57
	5.4. Actividad ureásica en suelo.....	65
	5.5. Cinética ureásica.....	67
	5.5.1. Temperatura óptima.....	67
	5.5.2. pH óptimo .....	68
	5.5.3. Cinética de Michaelis a pH 7 para ureasa .....	69
	5.6. Actividades enzimáticas de frutos <i>Rubus glaucus</i> pretratamiento.....	71
	5.6.1. Actividad y cinética de catalasa.....	71

5.6.2.	Cinética de Catalasa (CAT) en Extractos de frutos <i>Rubus Glaucus</i> .....	74
5.6.3.	Cinética enzimática de catalasa proveniente de suelos: .....	79
5.6.4.	Actividad de Peroxidasa (POD) en los Frutos (ua /g.min).....	81
5.6.5.	Estudio cinético de la inhibición de POD .....	84
5.6.6.	Actividad de pectinmetilesterasa (PME) en los frutos (ua /g.h).....	90
5.6.7.	Estudio cinético de la inhibición de PME .....	92
5.6.8.	Cinética de pectinmetilesterasa en extractos de frutos <i>Rubus glaucus</i> ...	97
5.6.9.	Temperatura óptima de PME .....	97
5.7.	Análisis múltiple correlacional entre las actividades enzimáticas de los frutos <i>Rubus glaucus</i> , pertenecientes a los tratamientos experimentales .....	101
6.	Conclusiones.....	105
7.	Recomendaciones.....	108
	Bibliografía.....	109

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Calibres de la mora de Castilla.....	22
Tabla 2. Valores límites para frutos de mora de castilla.....	23
Tabla 3. Nomenclatura enzimática .....	25
Tabla 4. Ubicación fincas de estudio .....	44
Tabla 5. Distribución de Factores y tratamientos según el diseño Experimental.....	49
Tabla 6. Descripción de Tratamientos .....	50
Tabla 7. Variables y técnicas analíticas para calidad fisicoquímica de frutos.....	51
Tabla 8. Determinación de actividades enzimáticas en <i>Rubus glaucus</i> .....	51
Tabla 9. Indicadores después de los tratamientos .....	52
Tabla 10. Indicadores fisicoquímicos del suelo finca 1.....	55
Tabla 11. Indicadores fisicoquímicos del suelo finca 2.....	55
Tabla 12. Indicadores fisicoquímicos del fruto .....	56
Tabla 13. Indicadores Fisicoquímicos de frutos <i>Rubus glaucus</i> en estado de maduración 3, provenientes de la finca 1, para cada tratamiento aplicado.....	57
Tabla 14. Indicadores Fisicoquímicos de frutos <i>Rubus glaucus</i> en estado de maduración 5, provenientes de la finca 1, para cada tratamiento aplicado.....	58
Tabla 15. Indicadores Fisicoquímicos de frutos <i>Rubus glaucus</i> en estado de maduración 3, provenientes de la finca 2, para cada tratamiento aplicado.....	59
Tabla 16. Indicadores Fisicoquímicos de frutos <i>Rubus glaucus</i> en estado de maduración 5, provenientes de la finca 2, para cada tratamiento aplicado.....	60
Tabla 17. Resultados ANOVA doble vía sobre los indicadores fisicoquímico del fruto.....	65

Tabla 18. Valores promedios de Actividad Ureásica de los suelos provenientes de las dos fincas.....	66
Tabla 19. Velocidad máxima y constante Michaelis (Km) de la cinética ureasa.....	70
Tabla 20. Actividades de CAT, POD y PME, en frutos <i>Rubus glaucus</i> , al iniciar el experimento.....	71
Tabla 21. Valores de Actividad de CAT en frutos <i>Rubus glaucus</i> , tratados con CaCl <sub>2</sub> y Ácido Ascórbico.....	71
Tabla 22. Resultados ANOVA doble vía, para actividad de CAT en frutos <i>Rubus glaucus</i> , tratados con CaCl <sub>2</sub> y Ácido Ascórbico .....	73
Tabla 23. Valores de Km dados en (μmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /g.h) con las variables Vc, VAA, VCaCl <sub>2</sub> .....	78
Tabla 24. Ecuaciones cinéticas de CAT.....	79
Tabla 25. Parámetros cinéticos para CAT.....	81
Tabla 26. Ecuaciones cinéticas para CAT en suelos de Finca 1 y 2.....	81
Tabla 27. Actividades de POD en frutos <i>Rubus glaucus</i> tratados con AA y CaCl <sub>2</sub> , en los estados de maduración 3 y 5, provenientes de las fincas 1 y 2.....	82
Tabla 28. Resultados ANOVA doble vía.....	83
Tabla 29. Actividad enzimática residual de POD para frutos <i>Rubus glaucus</i> tratados con inhibidores químicos en estados de maduración 3 y 5, obtenidos de las fincas 1 y 2.....	84
Tabla 30. Análisis estadístico de valores de constantes de inhibición de POD y tiempo residual medio frutos <i>Rubus glaucus</i> provenientes de las fincas 1 y 2, estados de maduración 3 y 5.....	87
Tabla 31. Actividades de PME (uA/g.h) en frutos <i>Rubus glaucus</i> tratados con AA y CaCl <sub>2</sub> , en los estados de maduración 3 y 5, provenientes de las fincas 1 y 2.....	90
Tabla 32. Resultados ANOVA doble vía.....	92

Tabla 33. Parámetros cinéticos de inhibición de PME en frutos <i>Rubus glaucus</i> por finca y estado de maduración.....	95
Tabla 34. Km obtenidos en PME en frutos tratados.....	100
Tabla 35. Ecuaciones cinéticas para PME con frutos tratados.....	101
Tabla 36. Correlación múltiple entre las actividades enzimáticas de los frutos ( <i>Rubus Glaucus</i> ) .....	102
Tabla 37. Correlación múltiple entre parámetros cinéticos .....	103

## LISTA DE GRAFICAS

Gráfica 1. Diagrama de flujo para muestreo de suelo.....	46
Gráfica 2. Procedimiento general para la cuantificación enzimática.....	53
Gráfica 3. Comportamiento de la firmeza de los frutos de las fincas 1 y 2, en cada tratamiento aplicado al estado de maduración 3.....	61
Gráfica 4. Análisis de la firmeza en los frutos de la finca 1 y 2 estado de maduración 5, examinándose el comportamiento de los inhibidores en frutos maduros de mora.....	62
Gráfica 5. Comportamiento del pH en frutos tratados provenientes de las fincas 1 y 2, estados de maduración 3 y 5.....	63
Gráfica 6. Comportamiento de grados Brix, en frutos tratados, provenientes de las fincas 1 y 2, estados de maduración 3 y 5.....	64
Gráfica 7. Actividad Ureásica de los suelos provenientes de las fincas evaluadas .....	66
Gráfica 8. Velocidad de reacción de la ureasa contra temperatura.....	67
Gráfica 9. V máx. contra pH y ureasa.....	68
Gráfica 10. $\mu\text{mol Amonio/h.}$ contra $\text{mmol urea}$ .....	69
Gráfica 11. Representación Lineweaver-Burk.....	70
Gráfica 12. Actividad de Catalasa para frutos <i>Rubus glaucus</i> provenientes de fincas 1 y 2, tratados con inhibidores químicos. ....	72
Gráfica 13. Actividad de Catalasa para frutos <i>Rubus glaucus</i> provenientes de fincas 1 y 2, tratados con inhibidores químicos.....	74
Gráfica 14. Comportamiento de velocidad CAT frente a temperatura .....	75
Gráfica 15. Comportamiento cinético de CAT para fruto <i>Rubus glaucus</i> control y tratados con AA y $\text{CaCl}_2$ .....	76
Gráfica 16. Doble recíproca para CAT en frutos <i>Rubus glaucus</i> sin tratamiento y con inhibidores Químicos.....	77
Gráfica 17. Velocidades máximas del grupo control y con inhibidores en frutos	78

Gráfica 18. Cinética de CAT en suelos para finca 1 y 2.....	80
Gráfica 19. Doble recíproca para CAT en suelos fincas 1 y 2.....	80
Gráfica 20. Actividad de POD en frutos <i>Rubus glaucus</i> provenientes de dos fincas y tratados con AA y Cloruro de calcio.....	83
Gráfica 21. Cinética de inactivación de POD en frutos <i>Rubus glaucus</i> tratados con AA y $\text{CaCl}_2$ , provenientes de la finca 1.....	85
Gráfica 22. Comportamiento cinético de primer orden para inhibición de POD en frutos tratados con AA, Estados de maduración 3 y 5, finca 1.....	86
Gráfica 23. Comportamiento cinético de primer orden para inhibición de POD en frutos <i>Rubus glaucus</i> , tratados con $\text{CaCl}_2$ estados de maduración 3 y 5, Finca 1.....	87
Gráfica 24. Valores de constantes de velocidad de inhibición de POD en frutos <i>Rubus glaucus</i> , tratados con AA y $\text{CaCl}_2$ , estados de maduración 3 y 5, Fincas 1 y 2.....	88
Gráfica 25. Descenso logarítmico de AER.....	89
Gráfica 26. Comportamiento cinético primer orden en la inhibición de POD en frutos postratamiento estados de maduración 3 y 5 en finca 2.....	90
Gráfica 27. Actividades enzimáticas residuales de PME en frutos <i>Rubus glaucus</i> tratados con AA y $\text{CaCl}_2$ provenientes de las fincas 1 y 2.....	91
Gráfica 28. Comportamiento cinético de la AER de PEM en frutos <i>Rubus glaucus</i> , estados de maduración 3 y 5, fincas 1 y 2.....	93
Gráfica 29. Cinética de inhibición de primer orden para PME en frutos <i>Rubus glaucus</i> tratados con AA y $\text{CaCl}_2$ , EM 3 y 5, Finca 1.....	93
Gráfica 30. Cinética de inhibición de primer orden para PME en frutos <i>Rubus glaucus</i> , tratados con $\text{CaCl}_2$ 4% en estados de maduración 3 y 5, finca 2.....	94
Gráfica 31. Constantes cinéticas de inhibición de PME en frutos tratados con AA 4% y $\text{CaCl}_2$ 2%, estados de maduración 3 y 5, Fincas 1 y 2. ....	95
Gráfica 32. Tiempos de reducción decimal de PME en frutos tratados con	

AA 4% y CaCl <sub>2</sub> 2%, estado de maduración 3 y 5; fincas 1 y 2.....	96
Gráfica 33. Comportamiento PME con 7 temperaturas.....	97
Gráfica 34. Cinética de Michaelis para PME en frutos control y tratados con inhibidores químicos AA y CaCl <sub>2</sub> .....	98
Gráfica 35. Doble recíproca para PME en frutos <i>Rubus glaucus</i> control y tratados con Inhibidores químicos AA y CaCl <sub>2</sub> .....	99
Gráfica 36. Velocidad máxima de PEM en frutos tratados con AA y CaCl <sub>2</sub> .....	100
Gráfica 37. Valores de correlación múltiple.....	103

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frutos <i>Rubus Glaucus</i> .....	20
Figura 2. Tabla de color de la mora de castilla.....	22
Figura 3. Representación enzima sustrato.....	25
Figura 4. Curva Michaeliana.....	26
Figura 5. Demetilación de ácido Poligalacturónico por PME hasta la formación de ácido péptico.....	28
Figura 6. Conformación de silla de la pectina.....	29
Figura 7. Acción de POD sobre el guayacol para producir tetraguayacolato y agua.....	30
Figura 8. Reacciones enzimáticas de pardeamiento.....	31
Figura 9. Tipos de Inhibidores enzimáticos.....	32
Figura 10. Cloruro de calcio: $\text{CaCl}_2$ .....	33
Figura 11. Interacción de homogalacturanos con iones calcio para aumento de la rigidez de la pared celular.....	34
Figura 12. Formula estructural del ácido ascorbico.....	35
Figura 13. Reacción de oxidación de la quinina a fenol por medio del ácido ascórbico.....	36
Figura 14. Ubicación del municipio de Fusagasugá en Cundinamarca. ....	43
Figura 15. Ubicación del municipio de Pasca en Cundinamarca.....	44
Figura 16. Modelo en zig-zag de muestreo.....	45
Figura 17. Trabajo de campo .....	46
Figura 18. Trabajo de campo.....	46
Figura 19. Empaque de mora y rotulado.....	47
Figura 20. Estados de maduración 3 y 5. ....	48

## Abreviaturas

**AER:** Actividad enzimática residual

**CAT:** Abreviación de Catalasa: Enzima Peróxido-reductasa que actúa sobre el peróxido de hidrógeno produciendo agua y oxígeno molecular

**E.M.:** Estado de maduración: Fase del catabolismo celular dado por el desarrollo de Reacciones Bioquímicas Enzimáticas REDOX, que aceleran el proceso de respiración de los frutos, generando cambios Biofísicoquímicos en cáscara y pulpa.

**PME:** Abreviación de Pectinmetilesterasa: (PME, E.C. 3.1.1.11) cataliza la hidrólisis de los ésteres metílicos de pectina, reduciendo su grado de esterificación.

**POD:** Abreviación de la Peroxidasa: cataliza la oxidación de fenoles a quinonas

**RBE:** Reacción Bioquímica Enzimática

**SALTING-OUT:** Método utilizado para la separación de macromoléculas, basado en las interacciones electrolito-no electrolito, en concentraciones salinas altas.

## Introducción

Colombia es uno de los mayores productores de mora de Castilla (*Rubus glaucus*) en el mundo, con una producción de 73856 ton/año y un área de 7007 ha; su proyección de cultivo al año 2026 (DANE, SIPSA, 2013) es de 20631 ha, sin embargo se producen pérdidas que llegan al 70%, debido al mal manejo en la cosecha y postcosecha, su corta vida en estantes (3-5 días), daños mecánicos y el pardeamiento enzimático (Ayala, Valenzuela, & Bohorquez, 2013).

La creciente industria alimentaria busca métodos de conservación para este tipo de alimentos que son altamente perecederos, por lo tanto, esta investigación buscó conocer algunos inhibidores, utilizados en otras investigaciones, como son el cloruro de calcio y el ácido ascórbico, los cuales presentaron buena eficiencia en la inhibición de las enzimas catalasa, peroxidasa y pectinmetilesterasa; los resultados de la presente investigación reflejan un descenso de la actividad de estas enzimas hasta en un 96%, por lo que el proceso de senescencia del fruto se ve ralentizado. Se realizó análisis de las propiedades fisicoquímicas de suelos para determinar la relación que tienen estos parámetros con la actividad ureásica y a su vez estudiar el posible impacto de estos factores en la calidad del fruto, su importancia se vio reflejada en los resultados obtenidos, con una incidencia directa en los frutos en cuanto a su composición fisicoquímica; se consideró los compuestos utilizados para fertilizar cada suelo y la relevancia de las buenas prácticas agrícolas en el comportamiento de la micro biota del suelo.

Reina, (1998) informa que los frutos de *Rubus glaucus* están incluidos en el grupo de *frutos blandos*, ya que sufren un rápido deterioro de la pared celular y pardeamiento de la pulpa, debido a una alta actividad enzimática relacionada con Peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7), la cual a concentraciones altas de peróxido de hidrógeno:  $H_2O_2$ , oxida fenoles a quinonas, moléculas orgánicas aromáticas que luego se polimerizan generando polifenoles, responsables del color pardo y oscurecimiento del fruto, del mismo modo, la polifenoloxidasas (PFO, EC 1.10.3.2), en presencia de oxígeno cataliza la oxidación de numerosos compuestos fenólicos hasta biomoléculas poliméricas asociadas al pardeamiento de frutos y vegetales durante el crecimiento y maduración. Así mismo, teniendo en cuenta que POD y PFO biocatalizan la oxidación de compuestos fenólicos celulares a quinonas, ya que son biomoléculas altamente reactivas que interactúan con proteínas, ácidos nucleicos, flavonoides y otras quinonas, mediante (RBE), produciendo colores pardos, afectando sus propiedades sensoriales como: textura, color y sabor, disminuyendo la calidad nutricional del fruto (Baquero, Castro & Narváez. 2005). Este problema es de primera magnitud en la industria alimentaria y se reconoce como una de las principales causas de pérdida de calidad y valor comercial de frutos y vegetales.

Otra enzima que se incluye en este estudio por la importancia que tiene y el papel que desempeña en la senescencia es la CAT, es así como (Baquero, Castro &

Narváez. 2005) por medio de la prueba permanganométrica, (Ulrich, 1974) indica que una enzima peróxido reductasa es la catalasa (CAT, EC 1.11.1.6), que convierte el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ . El Peróxido de Hidrógeno también puede ser degradado por el guayacol peroxidasa (POD, EC 1.11.1.7) en tetrahydroguaiacol y por la ascorbato peroxidasa (APX, EC 1.11.1.11) en agua más alcohol, empleando como donador de protones el guayacol y ascorbato, respectivamente; esto sirve para controlar especies reactivas de Oxígeno-EROS. Por esto es importante estimular la acción de la catalasa puesto que juega un papel fundamental al degradar el peróxido de hidrógeno de la célula. Las plantas tienen mecanismos de protección, como lo es la acción de las enzimas antioxidantes; dentro de las más eficientes se encuentra la catalasa, así mismo esta enzima se activa en las etapas de senescencias cumpliendo el rol de eliminación de algunos agentes oxidantes como lo es el  $O_2$ .

Menéndez, *et al.* (2006) refieren que otra enzima que se relaciona con la calidad del fruto es la Pectinmetilesterasa, (PME, EC 3.1.1.11) la cual corresponde a una enzima hidrolasa, que se encuentra unida a la pared celular de los frutos y es liberada en el momento del ablandamiento de los mismos, cataliza la extracción de los grupos metilo de la cadena de ácido poligalacturónico, lo que provoca la liberación de metanol, pectinas de bajo metoxilo y formación de ácidos pépticos en este caso es interesante analizar la reacción que tiene la PME frente al inhibidor  $CaCl_2$  el cual aportaría calcio al fruto puesto que este es casi inexistente en los frutos postcosecha y su relevancia radica en la firmeza y estabilidad de la membrana celular por la formación de pectatos que incrementan la rigidez en la pared celular.

Ochoa, Hinojosa, Gomez-Muñoz, & García-Ruiz (2007) indican que la calidad fisicoquímica y actividad biológica de los suelos es otro factor importante en la producción de este tipo de cultivos, debido a que deben cumplir con las condiciones y nutrientes adecuados para el desarrollo de los frutos; es así como la actividad enzimática por ejemplo de la ureasa generada por el crecimiento de la microbiota, permite optimizar los ciclos geoquímicos que involucran sistemas edáficos, lo cual se traduce en un mayor incremento del flujo de nitrógeno, agua, carbono, fósforo y azufre en estos ambientes. Así, Ureasa (EC 3.5.1.5) es una enzima fundamental para el correcto crecimiento de la planta, además es una enzima extracelular con origen microbiano o vegetal, también es un tipo de amidohidrolasa, que cataliza en presencia de agua, el desdoblamiento de la urea (molécula rica en nitrógeno no proteico-NNP) hasta hidróxido de amonio y gas carbónico, lo cual es esencial para el proceso de asimilación del NNP a través del sistema radicular de la planta, este nitrógeno es luego transformado mediante reacciones bioquímicas enzimáticas (RBE) en aminoácidos y proteína por la célula vegetal. En consecuencia, la ureasa es importante para el crecimiento y desarrollo del fruto, por lo que está asociada en los ciclos del nitrógeno y del carbono que aportan nutrientes para el crecimiento y desarrollo efectivo de las plantas, todo esto redundando en la calidad final de los frutos (Henriquez, Uribe, Valenciano, & Nogales, 2014). Por lo tanto, *Rubus glaucus* no es ajeno a este comportamiento, de tal forma que la calidad de sus productos está

relacionada con la bioquímica del suelo. El porcentaje de hidrólisis de la urea varía dependiendo de factores como el pH, contenido de agua y temperatura.

Rivera, Restrepo & Narváez (2004) indican que las enzimas POD, PFO y PME, provenientes de algunos frutos pueden ser inactivadas por tratamientos térmicos y por la adición de compuestos químicos utilizados en la industria alimentaria, tales como cloruro de sodio (NaCl), sulfito de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), ácido ascórbico, (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido benzoico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>).

En la búsqueda de sustancias que puedan prolongar los componentes nutricionales en frutos y verduras se tienen estudios como los de Denoya, Ardanaz, Sancho, Benítez, González & Guidi (2012) que concluyen que hace algunos años se utilizaban los sulfitos como inhibidores, pero ha disminuido su uso por su relación directa con varios tipos de reacciones alérgicas incluyendo el asma. Los inhibidores de enzimas utilizados en este estudio han sido probados en otras frutas con buenos resultados en su efectividad, en consecuencia, se busca determinar el inhibidor de mayor efectividad sobre el comportamiento fisicoquímico y enzimático de mora de Castilla (*Rubus glaucus*), además de estudiar la posible relación con la actividad ureásica presentada en los suelos de estos cultivos.

Teniendo en cuenta los parámetros descritos, el propósito de este trabajo se centró en evaluar la cinética Ureásica de suelos y su interrelación con actividad de catalasa, peroxidasa y pectinmetilesterasa en frutos de *Rubus glaucus*, antes y después de ser tratados con inhibidores químicos, a fin de comprender mejor el papel que desempeñan CAT, POD y PME, durante los procesos de maduración y senescencia, así mismo, el comportamiento fisicoquímico y enzimático de los frutos tratados con cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) y ácido ascórbico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>), esto con el objeto de suministrar métodos efectivos que disminuyan el pardeamiento y ablandamiento de *Rubus glaucus*, durante su comercialización, y por lo tanto lograr prolongar su vida útil en anaquel.

## 1. Marco Teórico

### 1.1. Generalidades de la mora de Castilla (*Rubus glaucus*)

Según Salinas (2014) la mora es una planta de hábito perenne, de tallos rastreros o semierguidos que poseen espinas, hojas trifoliadas lanceoladas, verdes por el haz y vellosos por el envés. Las flores que posee son blancas de numerosos estambres y se auto fecundan. Se produce en alturas que varían de los 1700 a los 2400 metros sobre el nivel del mar, siendo su temperatura óptima entre los 11 y 22 grados centígrados; en cuanto a la precipitación requiere de 1500 a 2300 milímetros de lluvia por año y la humedad relativa puede oscilar entre 70 a 80 %; el requerimiento de brillo solar va de 1200 a 1600 horas/año y vientos de menos de 3 km /h.

En cuanto a suelos (Gobernación del Huila: Secretaria de Agricultura y Minería, s.f.) reporta que los mejores son aquellos de textura franca, que sean permeables y con buena cantidad de materia orgánica, dado que los suelos arcillosos ocasionan encharcamientos y los arenosos no conservan la humedad necesaria, tal característica no favorece su cultivo. También se recomienda que sean ligeramente ácidos, con pH entre 5,5 a 6,5.

#### 1.1.1. Morfología de los frutos *Rubus glaucus*

Bohórquez & Úsuga (2017) indican que los frutos de *Rubus glaucus* están compuestos por drupas, pequeñas esferas redondeadas que poseen una semilla dentro, la forma es de redonda a alargada con tamaños que oscilan de 1 a 4 cm. Su color depende del estado de maduración en que se encuentre y varía desde el verde en su etapa primera hasta el purpura oscuro o incluso negro en su estado de mayor madurez. En cuanto al sabor es una fruta agridulce, refrescante con toques ácidos muy agradable.

**Figura 1. Frutos *Rubus Glaucus***



**Fuente:** Autores (2018)

### **1.1.2. Taxonomía de la mora variedad Castilla (*Rubus glaucus*)**

Reino: *Plantae*

Subreino: *Tracheophyta*

Filo: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Rosales*

Familia: *Rosaceae*

Género: *Rubus*

Especie: *glaucus*

(Cruz & Garcia, 2013)

### **1.1.3. Cosecha de los frutos**

El DANE, SIPSA (2013) informa que la primera cosecha de los frutos se obtiene entre los siete y nueve meses después de establecido el cultivo, llegando a su plena producción a los 15 meses de edad, con rendimientos de 18 a 20 toneladas de fruta por hectárea/año. Por su parte, el fruto está listo para ser cosechado cuando presente un color rojo vino tinto brillante a ligeramente pálido.

### **1.1.4. Almacenamiento de frutos**

Núcleo Ambiental S.A.S. (2015) notifica que después de la recolección de frutos de mora lo más recomendable es que sean trasladados al sitio de almacenamiento temporal para evitar el contacto con contaminantes que puedan oxidar los frutos así

mismo se debe evitar la exposición a factores ambientales como sol o lluvia, y al momento de reenvasar los frutos ser muy cuidadosos en su manipulación para evitar daños mecánicos. La mora debe ser almacenada entre 0 y 1°C; no debe permanecer almacenada por más de 1 día si son frutas para exportación.

#### 1.1.5. Características físicas de la mora

Determinación del diámetro máximo de cada fruto como se indica en la tabla.

**Tabla 1. Calibres de la mora de Castilla**

<b>Diámetro (mm)</b>	<b>Peso promedio (g)</b>
≥27	9.2
26-23	9.8
22-19	6.2
18-14	4.2
≤13	3.2

**Fuente.** ICONTEC: (NTC 4106). Diámetro y peso estándar para frutos de mora.

#### 1.1.6. Madurez

Según ICONTEC: NTC 4106 se define que la madurez de la mora de Castilla se puede verificar por su color externo. Su estado de maduración se puede confirmar por medio de pruebas de laboratorio como la determinación de los sólidos solubles totales, acidez titulable y el índice de madurez.

#### 1.1.7. Indicadores de maduración según NTC 4106

COLOR 0: fruto de color amarillo verdoso con sus drupillas bien formadas.

COLOR 1: fruto de color amarillo verdoso con algunas drupillas de color rosado.

COLOR 2: se incrementa el área de color rosado.

COLOR 3: el fruto es de color rojo claro.

COLOR 4: el color rojo del fruto es más intenso.

COLOR 5: el fruto es de color rojo intenso, con algunas drupillas de color morado.

COLOR 6: el fruto es de color morado oscuro

**Figura 2.** Tabla de color de la mora de castilla.

Fuente: NTC 4106.

**1.1.8. Pigmentos presentes en los frutos de mora.**

La coloración presentada por los frutos de mora es debido a la presencia de antocianinas, que generalmente se expresan como cianidin-3-glucosida (Cyd-3-glu) por cada 100 g de muestra, y los carotenoides (luteína, zeaxantina y  $\beta$ -caroteno), los cuales van disminuyendo a medida que va aumentando el estado de madurez (Souza, Lopes, Perin, & da Silva, 2018) y (Rutz, Voss, & Zambiasi, 2012).

**1.1.9. °Brix**

El grado brix equivale al porcentaje de peso de la sacarosa en una solución, es decir, representa los gramos de  $C_{12}H_{22}O_{11}$  que están presentes en 100 gramos de muestra, este solamente debe ser definido a una temperatura de 20° C, basado en un método de concentración por medio de la refracción de la luz en una solución. La unidad de medida °Bx es (*grados Brix*) (Suarez, 2003).

**Tabla 2.** Valores límites para frutos de mora de castilla

Color	0	1	2	3	4	5	6
°Brix (mínimo)	5,4	5,7	5,9	6,3	6,7	7,2	7,7
°Brix (máximo)	5,7	6,1	6,4	6,9	7,3	7,9	8,5

**Fuente** (NTC 4106). Contenido de sólidos solubles totales expresado en °Brix según el estado de maduración del fruto

**1.1.10. Acidez Titulable**

Expresa el porcentaje de ácido málico (Hidroxiácido dicarboxílico  $C_4$ ) en los frutos, esto representa entonces los gramos de este ácido  $C_4H_6O_5$ , que están presentes en 100g del fruto.

**Tabla 3.** Porcentaje de ácido málico

Color	0	1	2	3	4	5	6
% Acido málico (máximo)	3,0	3,4	3,5	3,4	3,1	2,8	2,5

**Fuente** (NTC 4106). Acidez titulable máxima expresada como porcentaje de ácido málico dependiendo del estado de maduración.

## 1.2. Enzimas

Son biocatalizadores de origen proteico, conformados por Apoenzima (componente proteico) y Coenzima (Componente no proteico), que forman parte de las células. Su importancia radica en que son capaces de acelerar la velocidad de las reacciones químicas, por esto se definen como catalizadores biológicos, sin estas, muchas reacciones fundamentales para la vida serían muy lentas y los ciclos vitales no se generarían. (Open Stax, 2015).

Para la clasificación de las enzimas Peña (2004) sugiere que están organizadas de acuerdo con las reacciones que catalizan en: oxidorreductasas (aceleran reacciones de óxido-reducción), transferasas (transfieren grupos químicos entre moléculas), hidrolasas (rompen o sintetizan enlaces covalentes de las moléculas), liasas (rompen enlaces formando a su vez dobles ligaduras), isomerasas (catalizan un arreglo espacial de grupos químicos en la molécula sin modificar su composición química) y ligasas (promueven unión covalente de dos moléculas acopladas con la ruptura de un enlace pirofosfato como fuente de energía).

### 1.2.1. Clasificación de las enzimas

A continuación, se describe el diseño básico para la clasificación de las enzimas involucradas en el presente trabajo.

Boyce & Tipton (2001) refieren que el número **CE**: es el número de clasificación por lo general con 4 números que se clasifican de la siguiente forma:

**1er dígito Clase.** Tipo general de enzima

**2 do dígito subclase.** Tipo de enzima específica

**3er dígito sub-subclase.** Grupo funcional del sustrato

**4to dígito serie.** Tipo de sustrato

**Tabla 3.** Nomenclatura enzimática

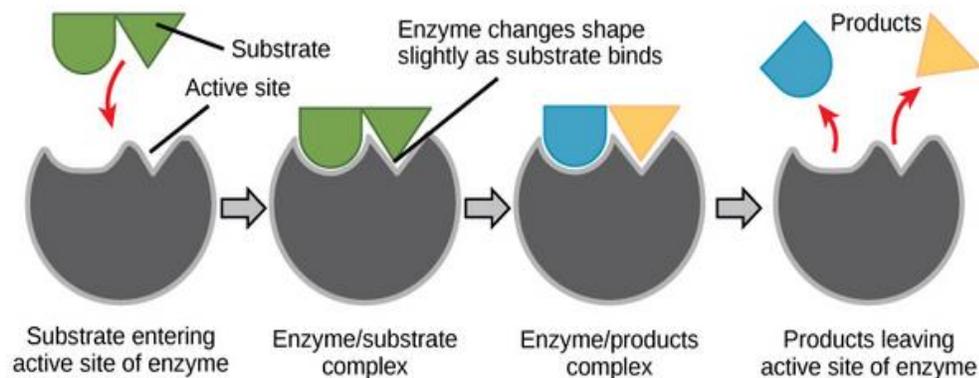
1er dígito	2do dígito	3er dígito	4to dígito
3 Hidrolasa (UREASA)	5 amidohidrolasas	1 amida	5 urea
3 Hidrolasa (PME)	1 pectin demetoxilasa	1 carboxilo	11 pectina 6 peróxido de hidrogeno
1 Oxidoreductasa (CAT)	1 peróxido-reductasa	1 peroxo	
1 Oxidoreductasa (POD)	11 guayacol peroxidasa	1 fenol	7 guayacol

Fuente (Autores). Tipo de enzimas analizadas.

### 1.2.2. Reacciones Bioquímicas Enzimáticas (RBE)

En la figura 3 se ilustra la acción enzimática; la reacción comienza cuando el sustrato localiza el sitio activo (SA) de la enzima, el cual está conformado por aminoácidos específicos, los cuales se enlazan o ligan al grupo funcional del sustrato), al unirse a esta por la alta afinidad entre el complejo sustrato-enzima se produce la reacción con una baja energía de activación. Así, la tasa de reacción se acelera sustancialmente para generar los productos sin alterar la estructura de la enzima, la cual queda disponible para iniciar un nuevo ciclo.

**Figura 3.** Representación mecanismo de una RB con el complejo Enzima-sustrato



Fuente: adaptado de Open Stax, (2015).

### 1.2.3. Actividad Enzimática

Actividad enzimática (AE) se define como la cantidad de enzima que transforma 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato en producto por minuto, generalmente se expresa en  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ . Y puede ser afectada por otras moléculas como son los inhibidores o condiciones como la temperatura y el pH, los cuales tienen rangos definidos para cada tipo de

enzima. Campbell (2007) refiere que los factores ambientales como pH y temperatura son fundamentales para el correcto desarrollo de la catálisis enzimática. Es así como la temperatura hasta cierto límite es fundamental para acelerar la velocidad de las reacciones, bajo estas condiciones los sustratos colisionan con los sitios activos, pero al superar la temperatura óptima, la agitación térmica produce rompimiento de enlaces y puentes, inestabilizando la estructura proteica, así se produce la desnaturalización. Los valores óptimos de pH para la mayoría de enzimas esta entre 6 y 8, pero al superar el valor óptimo de pH también se puede producir una desnaturalización de la proteína.

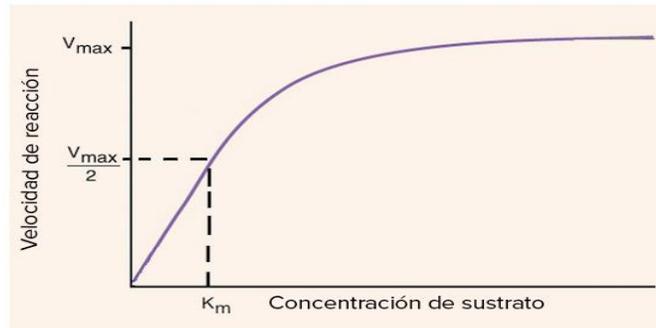
Otro factor importante para analizar de una forma más completa la actividad enzimática es por medio de la actividad residual enzimática (AER), según Maca, Osorio & Mejía (2013) esta es la relación entre la actividad enzimática postratamiento ( $A_p$ ) y la actividad inicial ( $A_i$ ), su cálculo se realiza en términos de porcentaje.

$$\%AER = \frac{A_p}{A_i} \times 100$$

#### 1.2.4. Cinética enzimática

Cinética química es la ciencia que estudia la velocidad de las reacciones, así en los ensayos enzimáticos se analiza la actuación de la enzima sobre determinado sustrato a través de un proceso de catálisis para formar un producto específico de interés en un tiempo que se puede calcular con la cinética.

Los parámetros cinéticos de una RBE son: Velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ), Constante de Michaelis ( $K_m$ ) y Energía de Activación ( $E_{ac}$ ); Así La velocidad de reacción es la cantidad de sustrato consumido por unidad de tiempo, luego ( $V_{max}$ ) corresponde a la actividad máxima de la enzima en los Sitios activos; Por su parte, la Constante de Michaelis ( $K_m$ ) corresponde a la concentración de sustrato en donde la velocidad es la mitad de la Velocidad máxima, es decir la RBE está ocurriendo en un 50%; así mismo, es un valor que indica la tendencia del sustrato por unirse a la enzima, esto se relaciona con la afinidad de la enzima por el sustrato, de tal forma que cuando  $K_m$  tiende a cero, la afinidad E-S, es alta, mientras si se obtiene lo contrario, la afinidad química de la enzima por el sustrato, es baja; La figura 4 esquematiza la relación entre velocidad y concentración del sustrato siguiendo un comportamiento Michaeliano.

**Figura 4.** Curva de Michaelis-Menten.

Fuente: OpenStax (2015)

### 1.2.5. Orden de las reacciones.

Moreno (2010) refiere que el orden de las reacciones se da de la siguiente forma:

**Reacción de orden cero.** La velocidad de la reacción no depende de la concentración del reactante y la velocidad se mantiene constante.

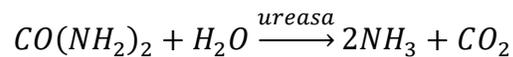
**Reacción de primer orden.** La velocidad de reacción depende de la concentración de una de las especies.

**Reacción de segundo orden.** La velocidad es proporcional al cuadrado de la concentración de una sola especie o es proporcional al producto de las concentraciones de dos especies.

Es importante reconocer el orden de las reacciones puesto ya que con estas se puede analizar de forma más efectiva el mecanismo de la reacción y de esta forma obtener información de cómo actúa la enzima con el sustrato.

### 1.2.6. Ureasa (EC 3.5.1.5)

La enzima ureasa pertenece a la clase 3 del grupo de las amidohidrolasas, catalizando reacciones de hidrólisis de la urea a amonio y dióxido de carbono.



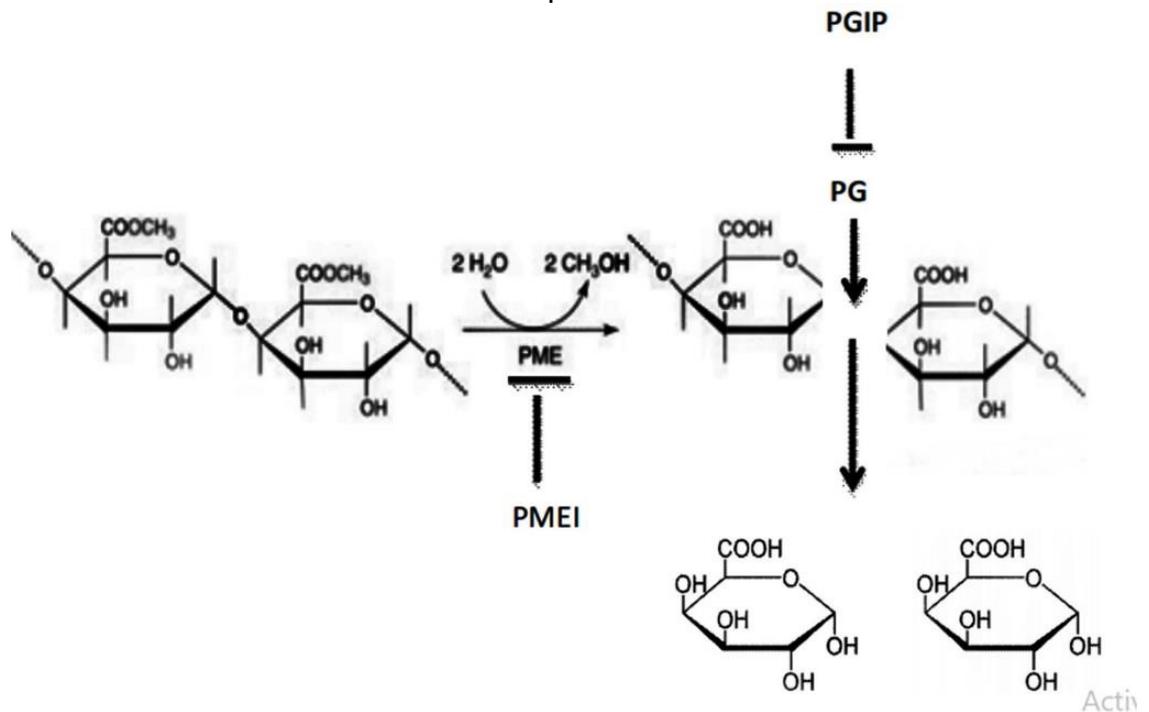
Según Carter, Flugga, Boer, Mulrooney & Husinger (2009) la ureasa cataliza el proceso de la hidrólisis de la urea en amoníaco y ácido carbámico, este compuesto se descompone de forma espontánea produciendo otra molécula de amoniaco y ácido carbónico. El pH asociado a esta reacción tiene implicaciones en la agricultura, por el aumento del pH, esta enzima también tiene un papel muy importante en la semilla de germinación al degradar la urea formada por la actividad de la arginasa.

Núñez, Jara, Sandoval, Demanet & Mora. (2012). Citan que una mayor actividad ureasa (AU) desarrollada en el suelo está asociada con un mayor contenido de biomasa microbiana, coincidiendo con Nannipieri, Muccini & Ciardi (1983), quienes sugirieron que la AU se incrementa con dicha microbiota, ya que ésta es un constituyente intracelular. Sin embargo, hay planteamientos que sugieren que una mayor AU está relacionada con mayor contenido de Materia Orgánica (MO) en el suelo, más que a un incremento en la biomasa microbiana.

### 1.2.7. Pectinmetilesterasa (PME) (EC 3.1.1.11)

Maca, Osorio & Mejía. (2013) describen la pectinmetilesterasa, como una hidrolasa que se encuentra unida a la pared celular y que se libera en la extracción del zumo, cataliza la eliminación de grupos metilo del ácido poligalacturónico, causando liberación de metanol, algunas pectinas y formación de ácidos pécticos, estos ácidos llegan a reaccionar con los iones de calcio del medio, para formar complejos que son insolubles o pectato cálcico, dejando un número de carboxilos libres que se pueden luego enlazar cationes y formar pectinas reticuladas, las cuales pueden agregarse y asentarse.

**Figura 5.** Demetilación de ácido poligalacturónico por PME hasta la formación de ácido péctico



Fuente: (Salazar, Gamboa 2013)

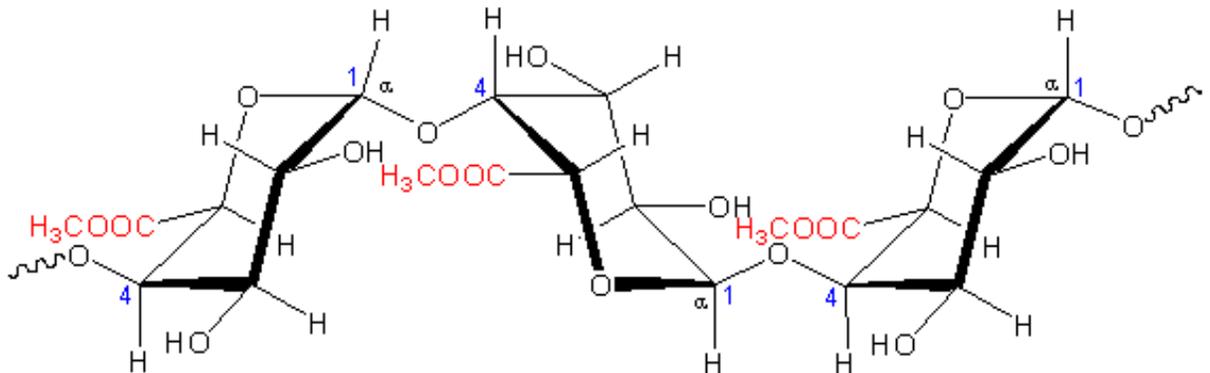
Carabalí, Narváez & Restrepo (2009) citan que “el éster metílico del ácido ( $\alpha$ -1,4) poligalacturónico corresponde a las pectinas con varios grados de esterificación. La PME cataliza la hidrólisis de los ésteres metílicos de pectina, por lo que disminuye su grado de esterificación, se reduce la adhesividad intracelular y la rigidez tisular.”

En la figura 5, se muestra el mecanismo de acción de la pectinmetilesterasa en los poligalacturanos, dicho polímero es un componente estructural de la pectina en el que su interacción con la PME puede disminuir los grados de metil-esterificación de la pectina, por lo cual es importante reconocer la estructura de la pectina presentada en la figura 6.

### 1.2.8. Pectina

En el artículo presentado por Guidi & Arandia (2010) informan que la pectina es un tipo de polisacárido con una estructura compleja, de alta proporción de ácido galacturónico que está presente en las paredes celulares de los vegetales, especialmente en las frutas, por lo general se utiliza como espesante en varias industrias.

**Figura 6.** Conformación de silla de la pectina

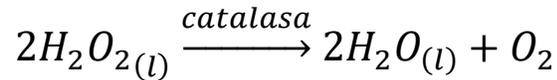


**Fuente.** Mederos & Hormeza (2008).

### 1.2.9. Catalasa (CAT) (EC 1.11.1.6)

Granados (2014) cita que la catalasa como catalizador de principio proteico, es una enzima clasificada como peróxido-reductasa la cual se involucra en la conversión del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), hasta oxígeno ( $O_2$ ) y agua ( $H_2O$ ). Dicha biomolécula, está presente en peroxisomas celulares y mitocondrias, tanto en animales como vegetales, protegiendo a la célula de la toxicidad ocasionada por los radicales peróxidos, impidiendo su depósito y favoreciendo el metabolismo.

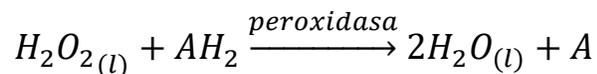
Además, participa activamente en la respiración vegetal, promoviendo la oxidación del glicolato que se produce a nivel del estroma ubicado en el cloroplasto, en una etapa adelantada del ciclo de Calvin en la fotosíntesis, hasta llegar al aminoácido llamado glicina (ácido-2-aminoetanoico), el cual se oxida a nivel mitocondrial por acción de reacciones de desaminación oxidativa que conllevan a la producción de: dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), trifosfato de adenosina (ATP) y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ).



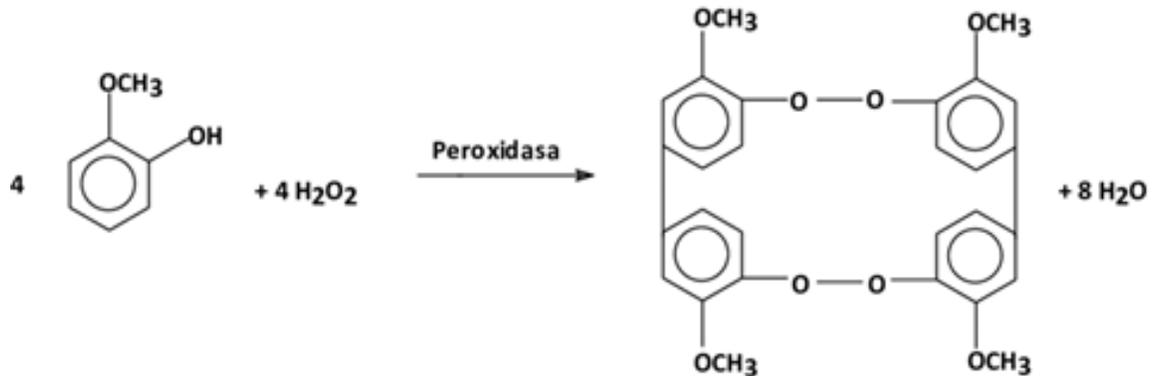
#### 1.2.10. Peroxidasa (POD) (EC 1.11.1.7)

Berg, Tymoczko & Stryer (2007) plantean que la peroxidasa es similar a la polifenoloxidasas (PPO), ya que pertenecen al grupo de las enzimas óxido-reductasas. Se encargan de descomponer el peróxido de hidrógeno con la presencia de un aportante de hidrógeno, es una enzima que se encuentra en animales, plantas y microorganismos. En plantas se encuentra en la célula en forma soluble en una parte y en el citoplasma es insoluble. La POD soluble, se puede extraer de los tejidos con un buffer fosfato, además, cataliza 4 tipos de reacción: (a) Peroxidativas (b) Oxidativas (c) Catalíticas y (d) de hidroxilación. Algunos de los aportes más relevantes en cuanto a la reacción y interacción de esta enzima con algunos inhibidores, se puede observar en los estudios de (Baquero, Castro & Narváez, (2005)) investigación en la que se muestra el efecto de enzimas como la POD y PFO en frutos de pitaya.

POD se activa por una respuesta inmunológica de la planta para evitar el ataque de patógenos, por lo cual, esta se encarga de oxidar la superficie celular provocando la salida de radicales libres y peróxido de hidrógeno, sustancias que resultan tóxicas para muchos organismos.



**Figura 7.** Acción de POD sobre el guayacol para producir tetraguayacolato y agua.

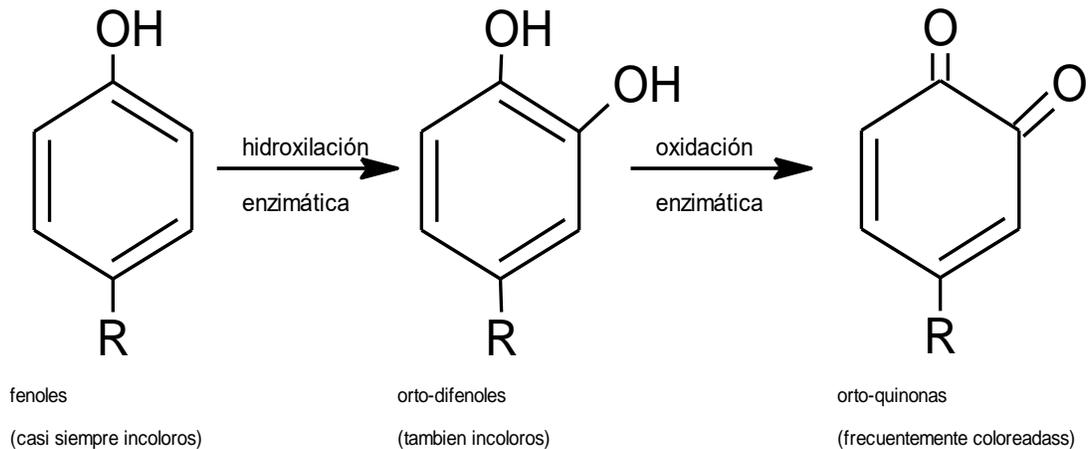


**Fuente:** (Beccacece, Galli, Giuntoli, Zanotti, & Pioli, 2013)

### 1.2.11. Pardeamiento Enzimático

Se conoce como pardeamiento enzimático a la transformación que soportan los compuestos fenólicos en polímeros coloreados debido a la acción de las enzimas. El mecanismo de reacción simplificado de la figura 8, muestra cómo se sustituye un hidrogeno por un grupo hidroxilo produciéndose una oxidación del compuesto y generando quinonas.

**Figura 8.** Reacciones enzimáticas de pardeamiento.



**Fuente:** (García, Giraldo, Hurtado, & Mendivil, 2006).

Según Pérez, (2003) el pardeamiento enzimático se presenta principalmente por Cambios Bioquímicos y fisiológicos durante la cosecha, o al someterse a procesos fisicoquímicos en la postcosecha. Radica principalmente por la oxidación de

compuestos fenólicos, formándose o-quinonas, los cuales se polimerizan por su alta reactividad originando melaninas cuya coloración es parda. La velocidad a la cual sucede esta reacción tiene muchas variables de las que depende como: concentración, temperatura, pH, cantidad y naturaleza de los compuestos fenólicos, actividad de agua y cantidad de oxígeno disponible.

La reacción es catalizada por enzimas como polifenoloxidasas (PFO) y peroxidasa (POD). Los compuestos fenólicos se ubican dentro del citoplasma de la célula, separados de las enzimas que causan el pardeamiento las cuales se encuentran unidas a la membrana tilacoide de los cloroplastos y en las mitocondrias. Otro factor influyente es la producción de etileno provocado por el estrés del procesamiento y que estimula el metabolismo de las sustancias fenólicas. (Silveira, Uso de aditivos y métodos físicos para mantener la calidad de los productos IV gama o minimamente procesados, 2017).

Otro análisis sobre la reacción de pardeamiento fue la expuesta por los autores Jeantet, Croguennec, Schuck & Brule (2016) quienes analizaron que el pardeamiento enzimático es la transformación de compuestos fenólicos en polímeros coloreados, que cambian de tonos intermedios de rosa, rojo o azul a principalmente marrón o negro. Al igual que el pardeamiento no enzimático, el pardeamiento enzimático es indeseable cuando afecta negativamente las propiedades sensoriales y nutricionales de los alimentos. Muchos sustratos naturales (mono, di o polifenoles) están involucrados en el pardeamiento enzimático. Los más importantes son los derivados del pirocatecol, el ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico, los flavonoides, los taninos y las ligninas. Existen varios métodos para prevenir el pardeamiento enzimático como acidulantes agentes quelantes, sales y en métodos físicos se están usando tratamientos térmicos, radiaciones ionizantes y no ionizantes (UV-C, microondas, ultrasonido) pero solo algunos se utilizan en la práctica. La intensidad del pardeamiento enzimático en productos vegetales depende de la naturaleza y contenido de los polifenoles, así como la disponibilidad de oxígeno y el entorno fisicoquímico también tiene gran relevancia en la aceleración del pardeamiento. Es difícil predecir la velocidad de inicio y la intensidad de pardeamiento enzimático ya que cada compuesto fenólico tiene sus propios parámetros ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) y produce pigmentos de un color particular.

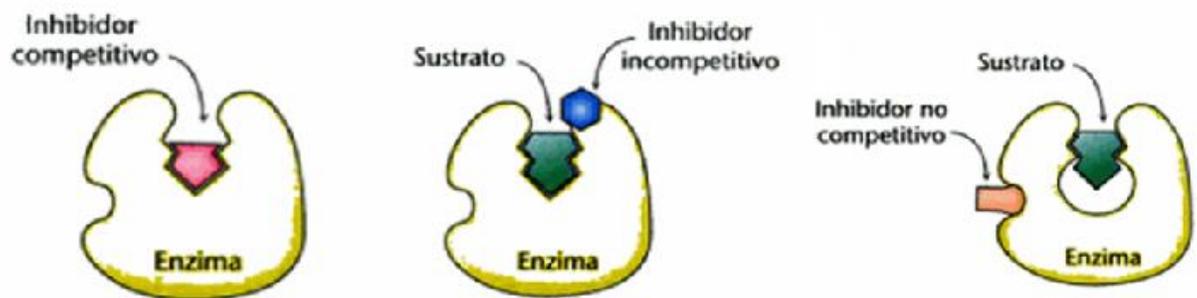
### **1.3. Inhibidores Químicos**

Los inhibidores químicos son sustancias que tienen la capacidad de reducir o detener la acción enzimática, los tipos de inhibiciones más comunes son:

Inhibición irreversible, por lo general el inhibidor se une de forma covalente a la enzima y modifica su estructura, alterando la actividad enzimática.

Según Berg, Tymoczko, Stryer (2007). La Inhibición reversible, comprende tres tipos de inhibición las cuales inestabilizan la reacción enzima-sustrato por un tiempo determinado. Estas son: inhibición competitiva, en este tipo de inhibición el inhibidor compite con el sustrato por el sitio activo de la enzima. Inhibición no competitiva, el inhibidor no compite con el sustrato, el inhibidor puede unirse a la enzima o a un sitio alostérico de la misma, modificando su actividad. Inhibidor incompetitivo, requiere que la enzima este unida al sustrato y disminuye  $K_m$ .

**Figura 9.** Tipos de inhibidores enzimáticos



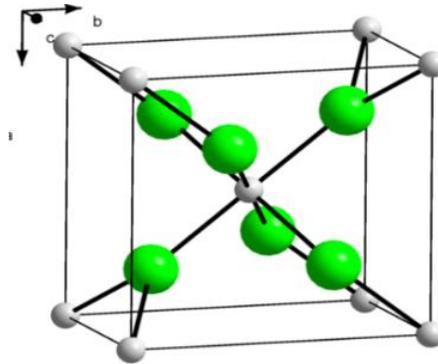
Fuente: Berg, Tymoczko, Stryer (2007).

Según lo expuesto, los inhibidores enzimáticos son moléculas que se adhieren a las enzimas, generalmente a los centros activos, disminuyendo su actividad. A nivel industrial los inhibidores revisten mucha importancia porque se utilizan para modificar la actividad en enzimas no deseadas presentes en diversos compuestos o alimentos.

### 1.3.1. Cloruro de calcio: $\text{CaCl}_2$

Con respecto a este inhibidor Montealegre & Díaz. (2014) citan que, debido a la conformación estructural en el fruto de mora y su absorción de nutrientes, el calcio es fundamental al orientar el fortalecimiento y mejora de desórdenes en las características morfológicas, químicas y físicas que en desequilibrio provocan alteraciones fisiológicas acortando la utilidad del producto por medio de la pérdida de agua, descomposición, etc.

**Figura 10.** Estructura del  $\text{CaCl}_2$  anhídrido. Las esferas verdes corresponden a los iones  $\text{Cl}^-$ , mientras que las blancas a los iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas esferas se arreglan en una celda unitaria ortorrómbica de los cristales



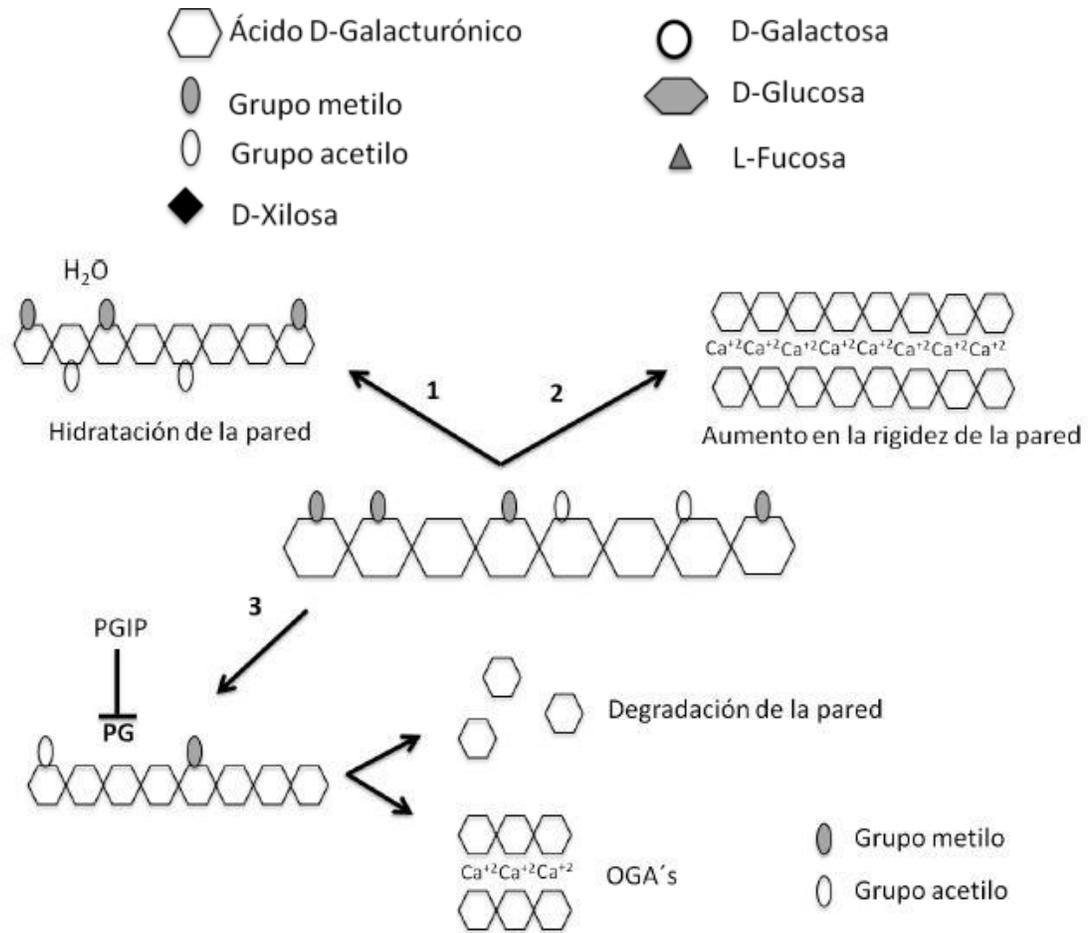
Fuente: (Bolívar, 2014)

Rincón & Martínez., (2015), encontraron que al hacerse aplicaciones de calcio en postcosecha se logra mantener la turgencia en las células, la consistencia de los tejidos y la lentitud del catabolismo de lípidos de la membrana, logrando así extender la vida en el almacenamiento de las frutas en buenas condiciones. El calcio es muy importante para la estabilización de la membrana de las células conservando la permeabilidad selectiva y la integridad del fruto (Azcón & Talón, 2008).

Por otra parte, Rincón & Martínez (2015) sugieren que, entre los principales métodos reportados con aplicación del calcio en productos hortofrutícolas en fresco, se hacen por inmersión, este método se usa principalmente para productos frescos perecederos, como hortalizas de hoja verde. El método consiste en la inmersión del producto, la aplicación o no de agitación mecánica, seguido por la eliminación del exceso de solución de lavado, este tratamiento es más suave con la técnica de impregnación que pueden causar daños en los tejidos y estrés metabólico.

Los fragmentos de oligalacturónidos, provenientes de la reacción de la pectina de la pared celular con la pectinmetilesterasa, al remover el grupo metilo del ácido galacturónico, y que poseen carga negativa, reacciona con el calcio promoviendo la formación de estructuras llamadas “eggbox” que provocan el aumento en la rigidez de la pared celular.

**Figura 11.** Interacción de homogalacturonanos con iones calcio para aumento de la rigidez de la pared celular.

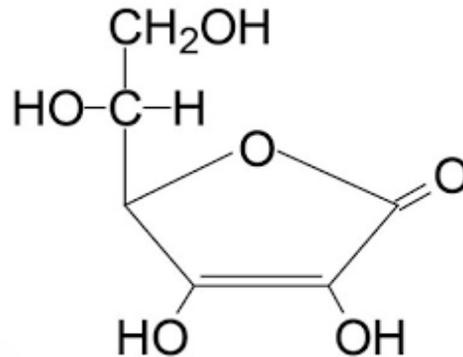


Fuente (Salazar & Gamboa, 2013)

Según Salazar & Gamboa (2013), la “estructura de los polisacáridos principales de la pared celular de plantas es la celulosa, la cual está constituida por una cadena de glucosas unidas a través de un enlace  $\beta$ -1-4. Las hemicelulosas constituyen un grupo de polisacáridos formados por una cadena principal de glucosas unidas con enlace  $\beta$ -1-4 con ramificaciones. La galactosa, fructosa y xilosa son los residuos que se presentan en el caso de los xiloglucanos. Las pectinas son un grupo heterogéneo de polisacáridos ricos en ácido galacturónico que constituyen estructuras muy complejas. Los más sencillos y abundantes son los homogalacturonanos, que son cadenas de ácido galacturónico y presentan modificaciones como metilaciones y acetilaciones”.

### 1.3.2. Ácido ascórbico:

**Figura 12.** Fórmula estructural del ácido ascórbico



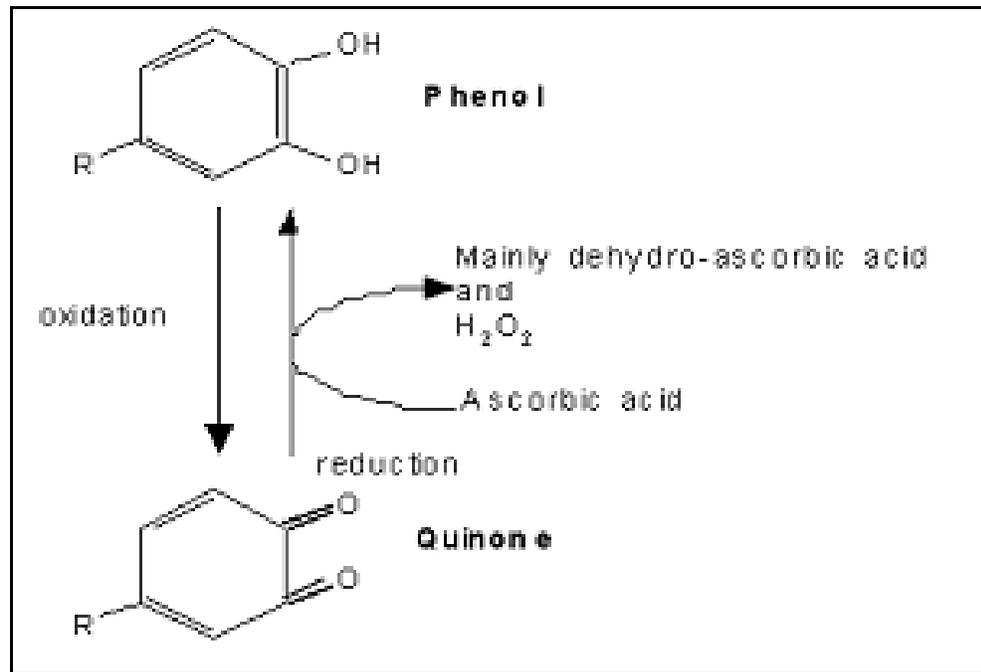
**Fuente:** (Guerrero.,2009)

Las propiedades fuertemente reductoras del ácido ascórbico se deben a la posible ionización del hidroxilo situado en el carbono 3, el hidroxilo del carbono 2 también se puede disociar formando un dianion (Serra & Cafaro, 2007).

El ácido ascórbico, se conoce como un inhibidor de reacción muy efectivo al transformar nuevamente las quinonas producidas en fenoles, pero la inhibición es temporal, al agotarse el ácido ascórbico durante la reacción, posteriormente puede ocasionar dificultades.

En el estudio presentado por Guerrero (2009) se analiza que el ácido ascórbico se puede catalogar más como un antioxidante, pero una de sus grandes desventajas es que a altas temperaturas es un compuesto inestable y la luz también puede degradarlo a ácido dehidroascórbico (DHAA). Los fenoles presentes en los frutos se oxidan a orto-difenoles y flavonoides resultando de este proceso las orto-quinonas las cuales reaccionan dando coloraciones oscuras o marrones, al estar presente el ácido ascórbico hay una reducción nuevamente a fenoles y se presenta la inhibición enzimática, en la metodología utilizada por el autor a base de métodos colorimétricos y manométricos se define el efecto de la fenolasa sobre el catecol el cual fue reversible si se adiciona la suficiente cantidad de ácido ascórbico reduciendo el mayor porcentaje de ortoquinonas.

**Figura 13.** Reacción de oxidación de la quinona a fenol por medio del ácido ascórbico.



Fuente: Toit (2006).

#### 1.4. Estado del arte

Algunos estudios que se han desarrollado con respecto a la influencia de la actividad de las enzimas en el pardeamiento enzimático presentado en diferentes tipos de frutos, se citan a continuación, estos estudios plasman diferentes metodologías de análisis de la actividad enzimática y reacciones generales.

Así mismo, se ha estudiado mucho la ureasa por ser una enzima de gran importancia en los suelos, son limitados los estudios que se encuentran de la misma, a pesar de su alta relevancia en la hidrólisis de la urea, la cual es controlada principalmente por esta enzima (E.C.3.5.1.5), única capaz de afectar en forma importante el rendimiento de un fertilizante. El  $NH_3$  o  $NH_4^+$  liberado es absorbido por los coloides del suelo y nitrificado posteriormente, en los resultados de este estudio se demuestra que hay una relación directamente proporcional entre la actividad ureásica y la materia orgánica (Borie & Fuentealba, 1982) citados por (Navarro, & Villalobos, 2018)

Se analizó la actividad enzimática en suelos de cactáceas en México por Olvera, Espino, & Pacheco (2012), donde la actividad enzimática es una señal de calidad del suelo en su estudio se explica que aunque la fertilidad de los suelos donde se producen las cactáceas es de bajo contenido de nitrógeno y materia orgánica hay un incremento de metabolismo en poblaciones microbianas por la rizosfera de las cactáceas las cuales reflejan un incremento en la actividad enzimática, concluyendo que los diferentes consorcio de microorganismos en la simbiosis con la planta resulta en un incremento de estas enzimas.

En la actividad enzimática que se desarrolla en los suelos se encuentran algunos estudios como el de los autores Henríquez, Uribe, Valenciano, & Nogales (2014), analizaron que la actividad de enzimas del suelo como: la deshidrogenasa,  $\beta$ -glucosidasa, fosfatasa acida y alcalina y ureasa en cultivos de papa parda pastusa tiene diversos comportamientos dependiendo la fertilización y el manejo de suelo, así los resultados indican que hay un posible efecto inhibitorio en las enzimas dependiendo la fertilización y el uso de plaguicidas lo que afecta el nitrógeno, fósforo y carbono.

Los estudios de Baquero, Castro & Narváez, (2005) encuentran que la CAT presenta una alta actividad en el desarrollo de los frutos de pitaya, y que enzimas como la PFO y POD muestran una alta actividad en frutos maduros, en donde el pardeamiento y el deterioro del fruto fueron evidentes, se propone que la efectividad en los tratamientos de las frutas en postcosecha se deben dirigir en incitar la actividad de CAT y parar la actividad de POD y PFO para garantizar la duración de la vida en pitaya amarilla.

Algunos inhibidores químicos utilizados para controlar propiedades fisicoquímicas y nutricionales de las frutas, son: sulfitos, agentes antioxidantes o reductores, acidulantes y compuestos quelantes. A pesar de su efectividad, estos compuestos están sujetos a restricciones, debido a que provocan efectos adversos para la salud. (Wesche-Ebeling and Montgomery., 1983, citado por Sellés., 2007).

En la inhibición de la peroxidasa se realizó el estudio en pulpa de uva, sus autores citan que el ácido ascórbico fue el inhibidor más potente seguido por el bisulfito de sodio, mientras el ácido cítrico y el cloruro de sodio tuvieron un menor impacto en la actividad de la PFO y la POD, en este artículo encuentran la relación que existe de estas enzimas con el pardeamiento de la pulpa y el cambio de color así como propiedades organolépticas en el fruto, su inactivación por medio de temperaturas e inhibidores, presentando la recomendación de estudiar a una mayor profundidad el uso de los inhibidores para la inactivación enzimática. (Rivera, Restrepo, & Narváez, 2004).

Luna y Barrett (2000), Abbott y Buta (2002), Soto e Yahia (2002), informan que ácidos orgánicos y sales de calcio, pueden ser utilizados en concentraciones adecuadas, con el propósito de inhibir reacciones bioquímicas enzimáticas en frutos de alta perecibilidad, promoviendo la formación de pectatos de calcio en la laminilla

media de la pared celular, fortaleciendo así la resistencia textural del tejido fresco (García, 2008), además, son inocuos para el consumo humano.

Adicionalmente: Harper; et al,(1969), citados por Sellés, (2007), indican que la aplicación de ácido ascórbico, evita o minimiza el pardeamiento enzimático, mediante un mecanismo de inhibición, fundamentado en el enlace de las formas iónicas a las formas protonadas de la enzima; para evitar la pérdida de textura de frutos, se utilizan sales cálcicas, como el cloruro de calcio, debido a la actividad del calcio iónico, sobre formación de puentes o enlaces entre las cadenas pécticas, aumentando la fuerza de resistencia de la pulpa (Poovaiah.1986, citado por Pérez, 2008).

En el caso de los métodos combinados en la manzana, se utilizaron tres tipos de combinaciones, el tratamiento I. 2% ácido ascórbico + 1% ácido cítrico + 0,5% EDTA, II. 1% ácido ascórbico + 0,5 % ácido cítrico + 0,25% EDTA y III. el control en el que se utilizó agua. Los resultados ratifican que el tratamiento I fue el más efectivo en la inhibición de la PPO, por lo que en este estudio se sugiere estudiar la efectividad de los inhibidores sobre extractos que se obtienen de la enzima de esta manera se pueden obtener datos más precisos sobre la efectividad de estas sustancias y su forma de acción directamente en la enzima (Denoya *et. al.*, 2012).

Un trabajo en frutas con énfasis en la inhibición de enzimas se llevó a cabo por Guerrero (2009) en banano, mediante el uso de isoespintanol y ácido ascórbico, en la que la extracción se realizó por medio de sistemas bifásicos acuosos, en los resultados se muestra al ácido ascórbico actuando como un reductor y la actividad de la PPO quedó indetectable, siendo este muy efectivo al utilizarse en concentraciones adecuadas en este caso con valores de 505 a 2000 ppm siendo esta la más efectiva.

El trabajo realizado por Ortiz & Rincón (2010) evalúan las enzimas POD, PFO y PME y los inhibidores NaCl, CaCl<sub>2</sub> y ácido ascórbico en los frutos de mora, siendo este trabajo un complemento, al profundizar en la caracterización fisicoquímica del suelo, además del estudio de la cinética enzimática de la ureasa en el mismo, como factor que influye en la calidad del suelo y la posible relación con la capacidad antioxidante que posee el fruto. En los resultados expuestos por los autores se encuentra a que la actividad de la POD en el estado de maduración 5 tiene una mayor actividad que en el estado de maduración 2 por lo que se comprueba que esta enzima participa activamente del proceso de degeneración celular. Así mismo el CaCl<sub>2</sub> fue el inhibidor más efectivo para detener la actividad enzimática de la POD, sobre todo en la mayor concentración (4%).

En el análisis de la evaluación de la capacidad antioxidante que presenta la guayaba documentada por Espinal (2010) se lleva a cabo una metodología de extracción enzimática (POD, PFO, PG y PE) por medio de precipitación de proteínas mediante el método de polvos de acetona (2, 3, 4, 5 y 6 lavados con 5 mL de acetona a 4 °C cada uno), en los resultados el modelo de Michaelis-Menten se correlacionó con la cinética de las enzimas POD, PFO, PG y PE la prueba arrojó que la POD tiene una

mayor afinidad por el  $H_2O_2$  que por el guayacol y la velocidad máxima de la POD es cerca de 10 veces mayor que la de PFO.

Un proceso patentado por Ramírez Aristizábal & Restrepo (2013) utilizó un recubrimiento comestible que se elaboró con gel mucilaginoso de penca sábila, el cual se aplicó por inmersión de la fruta con posterior secado, almacenado bajo refrigeración en un lapso de 10 días y observando el comportamiento físico y químico del fruto. Se inhibió la actividad realizada por las enzimas y las reacciones de pardeamiento que conllevan al daño del fruto, incluyendo la percepción de su sabor.

Uno de los estudios más concluyentes sobre la relación directa de la peroxidasa en el catabolismo de frutos fue el de Zhang & Shao (2015) en los frutos de níspero quienes reportan los roles de la PPD y POD en el deterioro de frutos y sus características variables según sea el cultivo, para el análisis se utilizaron métodos espectrofotométricos confiables así la POD es una enzima directamente involucrada en el ennegrecimiento de los tejidos al reducir los di fenoles y participar en la producción de lignina aun así la actividad de la peroxidasa está limitada por la ausencia de electrones.

También se pueden obtener buenos resultados en la inhibición de enzimas al aplicar calcio en frutas tal como lo demuestra el estudio de Rincón & Martínez (2015) en su revisión de funciones que cumple el calcio para la calidad postcosecha de las frutas y las hortalizas en el que se concluye que al aplicar calcio en los frutos directamente por inmersión se mantiene la rigidez celular evitando que actúen enzimas como la pectinmetilesterasa y retarda el catabolismo que presentan los lípidos de la membrana celular, teniendo como consecuencia la ampliación de la utilidad del fruto en almacenamiento, de los productos hortofrutícolas manteniendo las buenas condiciones de calidad, concluyeron que la aplicación de calcio a frutas y hortalizas, en postcosecha, son muy útiles para mantener la firmeza, reducir la incidencia en enfermedades por patógenos y prevenir el desarrollo de trastornos fisiológicos, esto conlleva a preservar la calidad de las frutas y hortalizas, factor de gran importancia en el proceso de la comercialización.

Otros estudios significativos presentan *el efecto del ácido ascórbico como inhibidor de pardeamiento enzimático en el fruto de anona y en la cinética de PPO*. Se evaluó el efecto del ácido ascórbico como inhibidor a concentraciones de 0.50%, 0.70% y 0.90% (p/v), para verificar la eficiencia del inhibidor se determinó las principales variables fisicoquímicas *pH*, *acidez titulable*, propiedades organolépticas, así se comprobó que el tiempo de vida de la *anona* es de 8 días, mientras, que con el ácido ascórbico se obtuvo un incremento de 3 días más, las diferentes concentraciones de ácido ascórbico no representa ningún tipo de problema con la parte organoléptica del fruto, es así como este inhibidor no funciona como acidulante, finalmente se observa que los tratamientos a diferentes concentraciones obtienen similares resultados por lo cual se puede utilizar la concentración más baja (Pardo & Méndez, 2017).

Las enzimas POD, PPO modifican las propiedades sensoriales, organolépticas y nutricionales del fruto por lo que comercialmente son indeseables, sin embargo, los estudios que hay sobre su inhibición con sustancias químicas son muy recientes (Carriel, *et. al.*, 2014). Algunos procesos, como lo son los daños mecánicos producidos al momento de transportarlas y otros procedimientos, deterioran la fruta por la acción del oxígeno al penetrar en las misma, desencadenando la acción enzimática y dando como resultado un fruto poco apetecible por la asociación visual del color con sus propiedades nutricionales. El ácido ascórbico está siendo muy estudiado por ser una fuente natural y disponible para controlar la oxidación y de esta forma disminuir las grandes pérdidas de diversos frutos y hortalizas.

## 2. Planteamiento del problema y justificación.

La creciente producción de la mora de Castilla (*Rubus glaucus*) en Colombia, pero también su alta perecibilidad, llevan a que se estudie posibles formas de alargar su vida útil en anaquel y su consiguiente fortalecimiento en las exportaciones, aunque ya han comenzado, son muy escasos los estudios a nivel mundial y menos a nivel nacional que buscan darle solución a este problema utilizando el método de la inhibición enzimática. Se plantea entonces como posibles inhibidores de la actividad enzimática en los frutos de (*Rubus glaucus*), las soluciones de cloruro de calcio y ácido ascórbico en concentraciones de 1%, 2% y 4% y se estudia la relación existente con la actividad ureásica que se produce en los suelos donde se cultiva.

Por el alto grado de perecibilidad de (*Rubus glaucus*) se hace necesario desarrollar investigaciones que involucren las actividades enzimáticas de oxidación del fruto, también explorar moléculas orgánicas o inorgánicas que adicionadas a los frutos, puedan inactivar enzimas como PME y POD, para disminuir el pardeamiento enzimático y ablandamiento de los frutos, lo que aumentará significativamente la vida en anaquel, disminuyendo con esto el efecto económico negativo a productores de regiones Colombianas como la del Sumapaz.

### 3. Objetivos

#### General

Estudiar la interrelación fisicoquímica y bioquímica, entre los parámetros cinéticos de ureasa extraída en suelos cultivados con *Rubus glaucus*, variedad Castilla y la actividad de CAT, POD y PME en frutos *de mora*, tratados con dos inhibidores químicos, cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) y ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ), en regiones de Pasca y Fusagasugá, Cundinamarca.

#### Específicos

- Determinar las condiciones de pH y temperatura de máxima actividad cinética para ureasa en suelos cultivados con mora (*Rubus glaucus*) de Castilla, provenientes de los municipios de Pasca y Fusagasugá.
- Establecer la posible interrelación existente entre la actividad ureásica de los suelos con la actividad de POD, CAT, PME en frutos de mora (*Rubus glaucus*), sometidos a tratamientos con  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ .
- Analizar las características fisicoquímicas de frutos *Rubus glaucus*, antes y después de la aplicación de tratamientos con inhibidores químicos  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ .
- Identificar la actividad y parámetros cinéticos de CAT, POD y PME en frutos de *Rubus glaucus* en los estados de maduración 3 y 5, pre y post tratamiento con inhibidores químicos  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ .
- Determinar los efectos de dos inhibidores  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ , sobre la calidad y prolongación de la vida útil de frutos *Rubus glaucus* en dos estados de maduración.

## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Localización del experimento

**Tabla 4.** Ubicación fincas de estudio

Finca	Vereda	Nombre	Finca	Latitud (N)	Longitud (O)	Altitud(m.s.n.m.)
Pasca	El Zaque	Altagracia	1	4°18'53,9"	74°18'46.0"	2129
Fusagasugá	Bethel	El Tesoro	2	4°19'02,8"	74°21'00.7"	1908

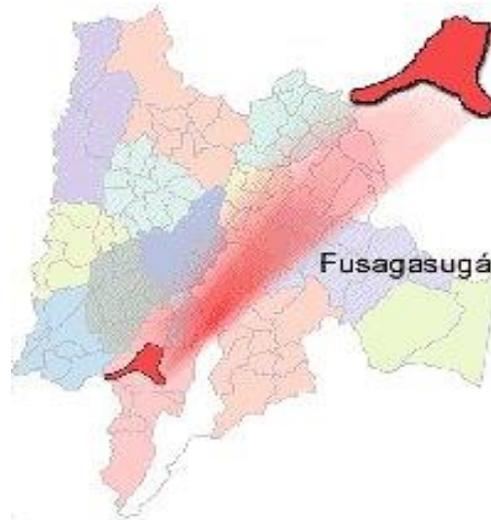
Fuente: Autores, (2019)

### 4.2. Geografía de Fusagasugá

Municipio ubicado al suroccidente del departamento de Cundinamarca, limita con los municipios de Sibaté, Silvania, Tibacuy, Arbeláez y Pasca. Posee una temperatura media de 14 °C, su altitud varía entre 550 y 35050 m.s.n.m. Su extensión es de 204 km<sup>2</sup>.

Los productos agrícolas más importantes del municipio según el área sembrada son: hortalizas, 40% (arveja 13%, habichuela 16% y tomate 11%) y frutales con un 60% (mora 32%, cítricos 17%, guanábana 9% y curuba 2%) (Cámara de Comercio de Bogotá, 2015).

**Figura 14.** Ubicación del municipio de Fusagasugá en Cundinamarca.



Fuente: (Gturismo, 2008)

### 4.3. Geografía de Pasca.

Municipio perteneciente a la región del Sumapaz, limita con los municipios de Fusagasugá, Sibaté y el Distrito Especial de Bogotá. Su temperatura media es de 15,4 °C, la altitud de su cabecera es de 2180 m.s.n.m. y posee una extensión de 264 km<sup>2</sup> (Alcaldía de Pasca, 2017).

**Figura 15.** Ubicación del municipio de Pasca en Cundinamarca.



Fuente: Pasca Cundinamarca. (2017)

### 4.4. Muestreo Suelos y Frutos

#### 4.4.1. Suelos

Para la investigación, se muestrearon suelos y frutos *Rubus glaucus* completamente al azar en 2 fincas, ubicadas en Pasca y Fusagasugá Cundinamarca; ambos municipios ubicados dentro de la provincia del Sumapaz se tomaron muestras de suelo de cada cultivo siguiendo el método zigzag (Osorio., 2012). Se recolectó más o menos un kilogramo de muestra por cada finca y se empacaron en bolsa negra seca, las cuales se rotularon con datos de origen. Posteriormente se trasladaron refrigeradas en nevera de icopor hasta el laboratorio de química de la UNAD ubicado en la sede nacional José Celestino Mutis 307, con el propósito de analizar su calidad fisicoquímica, materia orgánica y actividad ureásica.

**Figura 16.** Modelo en zig-zag de muestreo

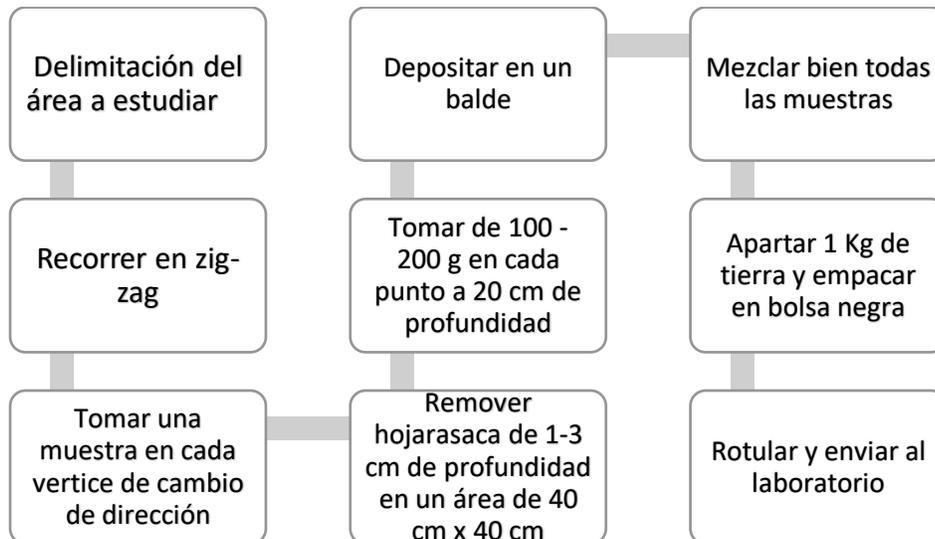


Fuente: (Osorio, 2012)

### **Metodología para la recolección de suelo en las fincas de estudio.**

Se ubicaron dos fincas de la provincia del Sumapaz, departamento de Cundinamarca, una en el municipio de Pasca y otra en el municipio de Fusagasugá, regiones de con altas producciones de mora, se contactaron a los propietarios para solicitar el respectivo permiso para la recolección tanto de frutos como de las muestras de suelos para su respectivo análisis, llevandose a cabo el siguiente procedimiento representado en la gráfica 1.

**Gráfica 1.** Diagrama de flujo para muestreo de suelo



Fuente: (Autores, 2019)

**Figura 17.** Recolección muestras de frutos



**Fuente:** Autores (2018)

**Figura 18.** Recolección de frutos para el respectivo análisis



**Fuente:** Autores (2018)

#### 4.4.2. Muestreo Frutos *Rubus Glaucus*

Frutos *Rubus glaucus* se recolectaron en estados de maduración 3 y 5 en dos fincas seleccionadas, dicho material se empacó en bolsas plásticas estériles para almacenamiento y empaque de alimentos, que luego se sellaron y rotularon con datos de origen, figura 19, y se refrigeraron en neveras de icopor, para finalmente transportarlas al laboratorio de química ubicado en la sede nacional José Celestino Mutis 307, donde se desarrollaron los análisis fisicoquímicos y enzimáticos antes y después de aplicar los respectivos tratamientos.

**Figura 19.** Empaque de mora y rotulado.



Fuente: Autores (2018)

#### 4.5. Diseño experimental para los tratamientos post cosecha

Se aplicó un diseño en bloques completos al azar (DBCA), con arreglo factorial  $2 \times 2 \times 3$ , el bloque se realizó con las 2 fincas muestreadas y los factores a considerar fueron:  $f_1$ : estado de maduración (3 y 5) NTC 4106,  $f_2$ : Inhibidor (cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ),  $f_3$ : concentración (1%, 2%, 4%). El diseño condujo a 12 tratamientos por finca, con 3 réplicas por tratamiento, 2 unidades experimentales por réplica para un total de 72 muestras destinados al análisis de laboratorio.

La figura 18 muestra los colores que se tuvieron en cuenta para la recolección de los frutos de mora en los estados de maduración 3 y 5, siguiendo los parámetros de la norma NTC 4106. (1997)

**Figura 20.** Estados de maduración 3 y 5.

Fuente: (Autores, 2019)

El siguiente cuadro, muestra la distribución de factores y tratamientos según el diseño experimental.

**Tabla 5.** Distribución de factores y tratamientos según el diseño experimental

Finca	Estado	Inhibidor	Concentración (%)	Réplicas		
				R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
1	3	AA	1	T <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> R <sub>3</sub>
			2	T <sub>2</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>2</sub> R <sub>3</sub>
			4	T <sub>3</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>3</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>3</sub> R <sub>3</sub>
		CaCl <sub>2</sub>	1	T <sub>4</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>4</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>4</sub> R <sub>3</sub>
			2	T <sub>5</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>5</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>5</sub> R <sub>3</sub>
			4	T <sub>6</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>6</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>6</sub> R <sub>3</sub>
	5	AA	1	T <sub>7</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>7</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>7</sub> R <sub>3</sub>
			2	T <sub>8</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>8</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>8</sub> R <sub>3</sub>
			4	T <sub>9</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>9</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>9</sub> R <sub>3</sub>
		CaCl <sub>2</sub>	1	T <sub>10</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>10</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>10</sub> R <sub>3</sub>
			2	T <sub>11</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>11</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>11</sub> R <sub>3</sub>
			4	T <sub>12</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>12</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>12</sub> R <sub>3</sub>
2	3	AA	1	T <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>1</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>1</sub> R <sub>3</sub>
			2	T <sub>2</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>2</sub> R <sub>3</sub>
			4	T <sub>3</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>3</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>3</sub> R <sub>3</sub>
		CaCl <sub>2</sub>	1	T <sub>4</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>4</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>4</sub> R <sub>3</sub>
			2	T <sub>5</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>5</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>5</sub> R <sub>3</sub>
			4	T <sub>6</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>6</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>6</sub> R <sub>3</sub>
	5	AA	1	T <sub>7</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>7</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>7</sub> R <sub>3</sub>
			2	T <sub>8</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>8</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>8</sub> R <sub>3</sub>
			4	T <sub>9</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>9</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>9</sub> R <sub>3</sub>
		CaCl <sub>2</sub>	1	T <sub>10</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>10</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>10</sub> R <sub>3</sub>
			2	T <sub>11</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>11</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>11</sub> R <sub>3</sub>
			4	T <sub>12</sub> R <sub>1</sub>	T <sub>12</sub> R <sub>2</sub>	T <sub>12</sub> R <sub>3</sub>

**Fuente:** Elaboración propia (2018). AA (Ácido Ascórbico); EM (Estado de Maduración); ST (Sin Tratamiento). Fuente: Autores (2019)

### Modelo Matemático del diseño

El modelo matemático aplicado a dicho análisis es como sigue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta + \epsilon_{ij}$$

Donde:  $Y_{ij}$  son las variables respuesta (indicadores fisicoquímicos y actividades enzimáticas),  $\mu$  es la media poblacional,  $\tau_i$  corresponde a los tratamientos,  $\beta$  es el factor de bloqueo, tipo de finca,  $\epsilon_{ij}$  es el error experimental, relacionado con las réplicas.

#### 4.6. Tratamientos

Los Doce (12) tratamientos trabajados por finca en el experimento se describen a continuación:

**Tabla 6.** Descripción de Tratamientos.

Tratamiento	E.M.	Descripción
T <sub>1</sub>	3	AA 1%
T <sub>2</sub>	3	AA 2%
T <sub>3</sub>	3	AA 4%
T <sub>4</sub>	3	CaCl <sub>2</sub> 1%
T <sub>5</sub>	3	CaCl <sub>2</sub> 2%
T <sub>6</sub>	3	CaCl <sub>2</sub> 4%
T <sub>7</sub>	5	AA 1%
T <sub>8</sub>	5	AA 2%
T <sub>9</sub>	5	AA 4%
T <sub>10</sub>	5	CaCl <sub>2</sub> 1%
T <sub>11</sub>	5	CaCl <sub>2</sub> 2%
T <sub>12</sub>	5	CaCl <sub>2</sub> 4%

Fuente: autores (2019)

#### 4.7. Variables Evaluadas

##### 4.7.1. Análisis fisicoquímico de suelos

Para realizar el correcto análisis de los suelos se tuvo en cuenta las principales variables que afectan tanto la calidad del suelo como su microbiota, así se determinaron los siguientes indicadores fisicoquímicos:

Humedad, pH, % aluminio intercambiable, % carbono orgánico, % materia orgánica, nitrógeno, capacidad de intercambio catiónico, conductividad eléctrica.

#### 4.7.2. Actividad enzimática en los suelos:

Se determinó la Actividad Ureásica (AU), aplicando extracción “*salting-out*” y cuantificación por método de titulación volumétrica con HCl estandarizado, posteriormente, se efectuó la respectiva cinética, teniendo en cuenta valores de pH y temperatura óptimos, utilizando 5 concentraciones de urea: a partir del análisis gráfico y estadístico se calcularon los parámetros cinéticos de la ureasa (velocidad máxima y constante de Michaelis o de afinidad).

#### 4.7.3. Variables fisicoquímicas en frutos *Rubus glaucus*

Las variables respuesta de los frutos se describen en la siguiente tabla.

**Tabla 7.** Variables y técnicas analíticas para calidad fisicoquímica de frutos

Variable	Tipo	Unidad	Técnica analítica
Peso	Física	g	Gravimetría
Diámetro	Física	cm	Calibrador pie de rey
longitud	Física	cm	Calibrador pie de rey
Diámetro transversal	Física	cm	Calibrador pie de rey
Resistencia	Física	Kg/N	Penetrómetro
pH	Fisicoquímica	$-\log[H^+]$	Potenciómetro
Índice de acidez	Fisicoquímica	g ácido cítrico/100g fruta	Titulación volumétrica con NaOH 0,1N
Ácido ascórbico	Química	p.p.m.	Espectrofotometría U.V.
°Brix	Química	g sacarosa/100 g fruta	Refractometría

Fuente: Autores 2019

#### 4.7.4. Variables enzimáticas en frutos *Rubus glaucus*:

En el fruto de la mora de Castilla se realizaron a cabo las siguientes cuantificaciones enzimáticas:

**Tabla 8.** Determinación de actividades enzimáticas en *Rubus glaucus*

Enzima	AE (unidad)	Técnica analítica	Referencia
CAT	$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/(\text{g proteína} \cdot \text{h})$	Permanganometría	(García, Hernández, Trasar., 2003)
POD	$\Delta\text{Abs}/\text{min}$	Espectrofotometría con guayacol Cambio de absorbancia por unidad de tiempo	(Hemeda y Klein., 1990)
PME	$\Delta\text{Abs}/\text{h}$	La lectura de absorbancia a 520 nm en espectrofotómetro con una lectura inicial y otra final a los 5 min. A una temperatura de 20 °C	(Hagerman and Austin 1986)

Fuente: Autores (2018).  $\Delta\text{E}$ : actividad enzimática;  $\Delta\text{A}$ : Cambio de Absorbancia; h: hora.

## Respuesta fisicoquímica y enzimática a los tratamientos postcosecha de los frutos

Las siguientes características se evaluaron en los frutos, después de realizados los tratamientos con los inhibidores.

**Tabla 9.** Indicadores después de los tratamientos

CARACTERÍSTICAS	INDICADORES
Fisicoquímicas	pH, Acidez titulable, °Brix, Peso Diámetros
Enzimáticas	Peroxidasa (POD) Pectinmetilesterasa (PME) Catalasa (CAT)

Fuente: Autores 2018

### 4.8. Análisis Estadístico

Se utilizaron estadígrafos de tendencia central y de dispersión para cada variable evaluada; Así mismo, los datos se sometieron al análisis de varianza en doble vía (ANOVA) con el fin de determinar diferencias y efectos estadísticos de bloques y tratamientos; igualmente, se utilizó la comparación múltiple de Medias, mediante Test Duncan y una prueba de correlación múltiple que exploró la asociación entre las variables evaluadas; Los datos se evaluaron mediante Excel (Office 365) y STATGRAPHICS Centurion (2015).

### 4.9. Procedimiento en laboratorio

#### 4.9.1. Indicadores fisicoquímicos de suelos

Los análisis fisicoquímicos de los suelos se realizaron acorde a las técnicas analíticas descritas en el manual IGAC (2017).

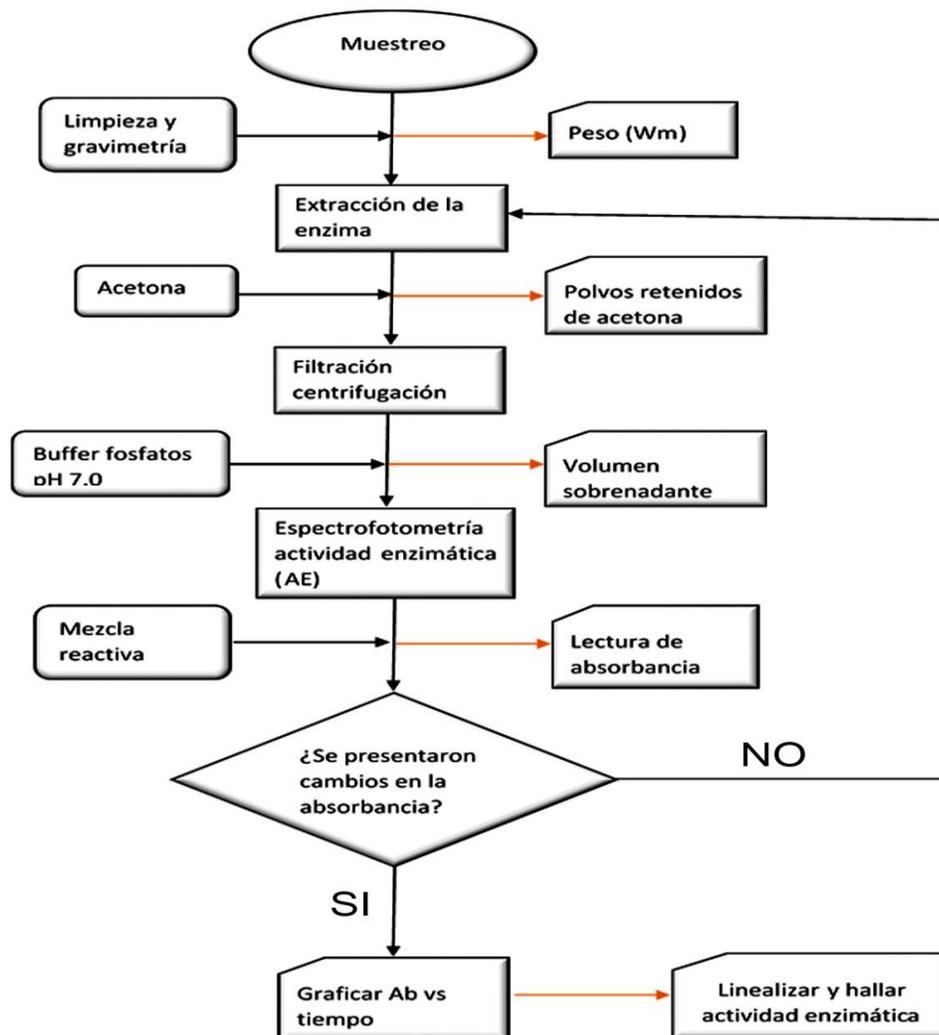
#### 4.9.2. Actividad y cinética enzimática de ureasa

La actividad ureásica se desarrolló acorde a la técnica descrita por García, C, *et al* (2003), utilizando 1g de muestra pasada por tamiz 2mm, búffer fosfato 0,1 M, pH 7,0 y como extractante salino: KCl 2M, se incubó por 90min, el amonio producido fue cuantificado por método de titulación volumétrica con HCl 0,1N, utilizando indicador de Tashiro.

La cinética Ureásica se desarrolló siguiendo la técnica propuesta por Granados, (2014) con extracto de suelo obtenido por disolución en KCl 2M, búffer fosfato 0,1 M, pH: 7,0. Para tal fin se prepararon 6 soluciones del sustrato Urea a diferentes concentraciones, se evaluó la producción de amonio a 7 temperaturas y 5 pH, con el fin de determinar valores de temperatura y pH óptimos; las mezclas se incubaron en destilación rápida Kjeldhal y el amonio producido se cuantificó por titulación volumétrica con HCl 0,1N.

#### 4.9.3. Actividades CAT, POD y PME

Gráfica 2. Procedimiento general para la cuantificación enzimática.



Fuente: Elaboración autores (2019)

La metodología para el análisis de las actividades y cinéticas de CAT, POD y PME, se realizaron acorde a lo sugerido por los autores indicados en la tabla 11, cuyos procedimientos propuestos se inician con la obtención del extracto enzimático a partir de los polvos de acetona, después de realizar la respectiva mezcla reactiva con búffer, sustrato y el reactivo de color, se procedió a incubar, enfriar y leer absorbancia en espectrofotómetro UV-VIS Génesis, cada 30 segundos por 5 minutos.

## 5. Resultados y Discusión

### 5.1. Indicadores fisicoquímicos del suelo

Se analizaron siguiendo los parámetros de interpretación del IGAC (1997).

**Tabla 10.** Indicadores fisicoquímicos del suelo. Finca 1

Indicadores	promedio	SD	%CV	Interpretación IGAC
pH	5,46	0,097	1,77	Fuertemente ácido
C.E. (dS/m)	0,12	0,004	3,33	Sin problemas en general, limitante para algunos cultivos susceptibles
Ai (meq/100g)	0,12	0,009	7,50	Baja Acidez intercambiable, suelo normal
Al <sup>3+</sup> (Cmol/Kg)	0,04	0,003	7,50	Baja concentración de Al <sup>3+</sup> , suelo normal
CO (%)	5,6	0,322	5,75	Medio
MO (%)	9,6	0,592	6,14	Medio
NT (%)	0,48	0,033	6,87	Medio

**Fuente:** IGAC\*: dS: Decisiemens. Instituto Geográfico Agustín Codazzi

**Tabla 11.** Indicadores fisicoquímicos del suelo. Finca 2

Indicadores	promedio	SD	%CV	Interpretación IGAC
pH	4,75	0,087	1,83	Muy fuertemente ácido
C.E. (dS/m)	0,13	0,003	2,31	Sin problemas en general, limitante para algunos cultivos susceptibles
Ai (meq/100g)	0,16	0,009	5,62	Baja Acidez intercambiable, suelo normal
Al <sup>3+</sup> (Cmol/Kg)	0,05	0,003	6,00	Baja concentración de Al <sup>3+</sup> , suelo normal
CO (%)	4,2	0,251	6,03	Medio
MO (%)	7,2	0,462	6,44	Medio
NT (%)	0,36	0,017	4,86	Medio

**Fuente:** IGAC\*: dS: Decisiemens. Instituto Geográfico Agustín Codazzi

La tabla anterior, indica que los valores promedios de los indicadores fisicoquímicos de los suelos analizados provenientes de las fincas 1 y 2, mostraron buen comportamiento estadístico dado que los coeficientes de variación, correspondientes a la relación cociente entre desviación estándar y el promedio, oscilaron en un rango de 1,77% hasta 7,50%, lo cual significa que los valores determinados para cada muestra presentaron poca variabilidad y en consecuencia son confiables.

Los valores de pH encontrados en las dos fincas, son similares a lo reportado por Cardona, W, (2017), quien realizó análisis fisicoquímico de 4 lotes en el municipio de Sylvania, destinados a cultivo de mora de castilla, obteniendo valores entre 4,47 hasta 5,53. No obstante, el pH encontrado en la finca 1 es más ácido que la finca 2 según lo constatado por la tabla 11; el rango más apropiado para establecer este

cultivo es: 5,20-6,70, con un valor óptimo de 5,70, por lo tanto, la finca 1 estuvo más cercano a este pH. En cuanto a la conductividad eléctrica CE, la acidez y el aluminio intercambiables están relacionados con el pH, puesto que al presentarse valores menores de pH los datos son congruentes con un aumento en estas variables, aunque ambos suelos se mostraron dentro de los rangos normales según el IGAC. Teniendo en cuenta que el cultivo *Rubus glaucus* variedad Castilla, requiere suelos con buena cantidad de materia orgánica, se aprecia que, en ambas fincas, los porcentajes de carbono Orgánico, materia orgánica y nitrógeno están en un valor medio, posiblemente este factor genere alguna incidencia en la calidad nutricional de los frutos. Respecto a la acidez intercambiable que está relacionada con la suma de la concentración de Aluminio intercambiable y los iones hidronio, se observó que ambas son bajas y en consecuencia no se convierten en limitantes para el cultivo de mora.

## 5.2. Análisis fisicoquímico pretratamiento de frutos *Rubus glaucus*

**Tabla 12.** Indicadores fisicoquímicos del fruto antes de aplicar tratamientos

Indicadores	Finca 1		Sign	Finca 2		Sign
	E.M. 3	E.M. 5		E.M. 3	E.M. 5	
Peso (g)	5,13±0,51	6,5±0,65	**	3,97±0,23	4,50±0,44	NS
Firmeza (N)	8,16±0,62	6,21±0,71	**	6,7±0,83	5,9±0,29	NS
Diámetro (mm)	16±0,70	25±0,30	*	15±0,70	22±0,0,60	*
Longitud (mm)	23±0,20	32±0,60	*	21±0,80	27±0,50	*
pH	2,4±0,19	2,7±0,58	*	1,8±0,21	2,5±0,33	*
Índ. de Acidez (ATT)	0,8±0,08	0,7±0,11	*	1,0±0,10	0,7±0,13	**
°Brix	5,0±0,38	5,9±0,81	*	4,1±0,58	5,0±0,42	NS
Índice de madurez	6,3±0,52	8,5±0,76	*	3,9±0,48	6,5±0,68	*

Fuente: Autores (2019). ATT: Acidez Total Titulable; N: Newton; Sign: Significancia estadística; \*P<0,05; \*\*p<0,01; NS: P>0,05

Con relación a lo mostrado en la tabla 12, se aprecia que en general, los indicadores fisicoquímicos de los frutos la finca 1, presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los estados de maduración. Evaluadas por medio de la prueba t-student, siendo más notorio en: peso, firmeza, tamaño e índice de madurez que resulta de dividir °Brix entre ATT, lo cual se puede explicar por cambios bioquímicos significativos de los frutos en sus procesos de maduración y senescencia. En contraste, los indicadores fisicoquímicos de los frutos en la finca 2, no exhibieron diferencias estadísticas en peso, firmeza y grados Brix entre estados de maduración, lo cual probablemente se puede atribuir a que los cambios fisicoquímicos y bioquímicos de los frutos no fueron tan notables como en la finca 1. Así mismo, también se podría relacionar este comportamiento con la calidad y manejo del suelo en esta finca. En el suelo de la finca 2, se destaca el cambio significativo en la acidez de los frutos, dados por la generación de ácidos orgánicos metabólicos en el proceso de maduración.

Los resultados anteriores también se pueden explicar en razón de las prácticas agrícolas que se desarrollan en las dos fincas, dado que en la finca 1 se llevaban procesos de fertilización más seguidos con abonos sintéticos (Triple 15) el cual tiene un 15% de nitrógeno total, 15% de nitrógeno amoniacal, mientras que en la finca 2 se abona con materia orgánica (gallinaza), la cual cuenta con un 2,02% de nitrógeno total por lo que el cultivo de mora no era el principal ingreso económico, y desenlaza en un fruto con algunas deficiencias como las que se aprecian en la tabla 14. Es de notar la diferencia en los frutos obtenidos donde peso, firmeza, longitud, diámetro, grados Brix e índice de madurez es mayor en la finca 1, mientras que ATT es mayor en la finca 2, mostrando un fruto con limitaciones. La razón más probable es debido a la proporción de nitrógeno presente en la finca 1 que es mayor que en la finca 2, siendo este elemento primordial para el crecimiento en el tamaño de los frutos, peso y número de frutos por planta según lo plantean Terán, Meléndez, García, Acuña y Urdaneta (1996), citados por (Montes *et al*; 2016) al estudiar su influencia en la guayaba.

Estos datos concuerdan también con lo reportado por Alzáte, Mayor & Montoya (2010), en donde los mayores valores de grados Brix, índice de madurez y niveles obtenidos en el pH, producen un menor porcentaje en la acidez, por causa del catabolismo de los carbohidratos solubles en las vacuolas de células vegetales, que originan cetoácidos e hidroxiácidos mono y dicarboxílicos, biomoléculas encargadas de producir cambios en pH y acidez titulable. Datos concordantes encontramos con Rodríguez, López y García (2010), en donde los grados °Brix, la acidez titulable y el índice de madurez, que presenta el estado de maduración 3, es menor comparado con los datos obtenidos para el estado de maduración 5; concluyendo que el mejor estado para la cosecha es el estado de maduración 5 ya que se trata de una fruta no climatérica.

### 5.3. Indicadores fisicoquímicos en frutos Post-tratamiento

**Tabla 13.** Indicadores fisicoquímicos de frutos *Rubus glaucus* en estado de maduración 3, provenientes de la finca 1, para cada tratamiento aplicado.

Indicadores	Finca 1, EM, 3						Sign.
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	
Peso (g)	5,13±0,56	5,22±0,58	5,35±0,55	5,34±0,67	5,31±0,59	5,35±0,52	NS
Firmeza (N)	13,59± 0,61	7,98 ± 0,74	10,44 ± 0,41	15,23 ± 1,82	16,58 ± 1,66	2,69 ± 0,17	*
Diámetro(mm)	15,97±0,62	16,12±0,75	16,17±0,74	16,11±0,81	16,14±0,52	16,33±0,48	NS
Longitud (mm)	21,05±1,12	23,91±0,97	24,02±0,76	23,07±1,14	23,78±1,11	24,02±0,75	NS
pH	2,45±0,12	2,61±0,15	2,64±0,11	2,49±0,21	2,56±0,24	2,57±0,15	NS
Índic de Acidez(ATT)	1,91±0,15	1,52±0,11	1,77±0,22	1,87±0,14	1,99±0,14	1,86±0,21	NS
°Brix	4,63 ± 0,15	5,53 ± 0,38	5,50 ± 0,17	5,83 ± 0,25	5,33 ± 0,23	6,80 ± 0,10	*
Índice de madurez	2,42±0,17	3,64±0,33	3,11±0,21	3,12±0,22	2,68±0,14	3,65±0,09	*

Fuente: Autores (2019). ATT: Acidez Total Titulable; N: Newton; Sign: Significancia estadística; \*P<0,05; \*\*p<0,01; NS: P>0,05

De acuerdo a la tabla 13, se puede apreciar que los indicadores fisicoquímicos de los frutos en estado de maduración 3, correspondientes a la finca 1, mostraron ciertas variaciones con respecto a aquellos sin tratamientos, destacándose la incidencia significativa de los inhibidores químicos en la firmeza ( $P < 0,05$ ) y en los grados Brix ( $P < 0,05$ ), especialmente en frutos *Rubus glaucus*, tratados con cloruro de calcio, lo cual se puede atribuir a una probable acción inhibitoria de esta molécula sobre los sistemas enzimáticos presentes en pared celular y citoplasma. Esto se explica en lo expuesto por Díaz, Cayón & Mira (2007) donde dan mención de que una de las principales funciones del calcio es estabilizar y dar firmeza a la pared celular por medio de la interacción de los iones de calcio con el ácido péptico presente entre la pared celular y la lámina media, el producto de esta interacción es el pectato cálcico o las pectinas generando firmeza, evitando así que la célula experimente lisis celular y se promueva la liberación de los fenoles y sustratos que entran a reaccionar con las enzimas. Los grados Brix en la finca 1 son superiores a los de la finca 2 por casi una unidad de diferencia en el estado de maduración 3 y 5. Esto influye en el hecho de que los cultivos de la finca 1 están más fertilizados teniendo mayores reservas de nitrógeno y porcentajes más altos en materia orgánica, aminoácidos, flavonoides además de minerales. Esto tiene una consecuencia directa de mejora en las características fisicoquímicas como el tamaño o la acidez en la finca 1. Así, las plantas de cultivo de la finca 2 tienen menos absorción de bioelementos por el tipo de fertilización desencadenando frutos más pequeños y menos agradables a la percepción sensorial. Cabe resaltar que a pesar de que variables fisicoquímicas como pH no fueron afectadas estadísticamente ( $P > 0,05$ ), también presentaron un comportamiento similar en cuanto al efecto del cloruro de calcio y el ácido ascórbico.

**Tabla 14.** Indicadores fisicoquímicos de frutos *Rubus glaucus* en estado de maduración 5, provenientes de la finca 1, para cada tratamiento aplicado.

Indicadores	Finca 1, EM, 5						Sign.
	T <sub>7</sub>	T <sub>8</sub>	T <sub>9</sub>	T <sub>10</sub>	T <sub>11</sub>	T <sub>12</sub>	
Peso (g)	2,53±0,11	2,67±0,18	2,65±0,13	3,14±0,07	3,03±0,09	3,27±0,14	*
Firmeza (N)	1,00±0,04	0,50±0,01	1,20±0,03	0,70±0,02	1,00±0,03	0,70±0,04	*
Diámetro(mm)	11,24±0,21	12,15±0,17	13,13±0,24	12,19±0,57	13,78±0,65	13,83±0,51	*
Longitud (mm)	14,89±1,21	14,96±0,99	15,01±0,68	14,87±1,06	15,23±0,98	15,45±0,18	*
pH	2,11±0,10	2,23±0,44	2,34±0,15	2,31±0,41	2,48±0,06	2,49±0,08	NS
Índice de Acidez(ATT)	1,95±0,21	2,08±0,36	2,03±0,91	1,79±0,29	1,96±0,12	1,39±0,31	*
°Brix	7,23 ± 0,06	7,90 ± 0,36	7,20 ± 0,35	7,27 ± 0,67	8,03 ± 0,21	6,17 ± 0,45	*
Índice de madurez	3,69±0,25	3,79±0,98	3,55±0,29	4,06±0,24	4,09±0,20	4,41±0,13	*

Fuente: Autores (2019). ATT: Acidez Total Titulable; N: Newton; Sign: Significancia estadística; \* $P < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; NS:  $P > 0,05$

Es de notar en la tabla 14, que los efectos de  $\text{CaCl}_2$  y AA, sobre las propiedades fisicoquímicas de los frutos, fueron más considerable y significativa ( $P < 0,05$ ),

especialmente para: peso, firmeza, diámetro, pH, índice de acidez y grados brix, mostrando un efecto positivo en el control del sistema ácido-base y un leve incremento de los grados Brix, correspondientes a la cantidad de sacarosa presente en el contenido citoplasmático de los frutos. Es decir, AA y CaCl<sub>2</sub>, incidieron sobre los mecanismos bioquímicos de maduración y senescencia de estos frutos, mejorando levemente algunos indicadores de maduración 5. Los resultados presentados muestran las diferencias significativas entre tratamientos sin embargo al comparar los valores con los frutos control es notorio el deterioro del fruto al estar en estado de maduración 5, esto se genera por la condición celular de la mora en este estado por lo que los inhibidores no muestran mayor efectividad, caso contrario cuando están en estado de maduración 3 donde es apreciable las mejoras en la calidad del fruto y el fortalecimiento de la pared celular debido a su lignificación por los iones calcio, así el sistema de inmersión es más efectivo en este estado de maduración. En la tabla 14 se muestra que los grados brix con el tratamiento cloruro de calcio son menores a los demás valores, mostrando un efecto positivo puesto que no se produciría una rápida liberación de acetileno lo que conllevaría a un rápido deterioro del fruto por el proceso de fermentación, es así como el “Ca<sup>2+</sup> divalente se opone a los aniones inorgánicos en la vacuola e ingresa al apoplasto y se une de forma intercambiable a la pared celular y a la membrana esto se debe a que la mayor parte de la actividad del calcio se relaciona con su capacidad de coordinación proporcionando enlaces intermoleculares estables” (Valdiviezo, 2018).

**Tabla 15.** Indicadores fisicoquímicos de frutos *Rubus glaucus* en estado de maduración 3, provenientes de la finca 2, para cada tratamiento aplicado.

Indicadores	Finca 2, EM, 3						Sign.
	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	
Peso (g)	3,98±0,31	4,02±0,58	3,99±0,55	4,08±0,67	4,09±0,59	4,16±0,52	NS
Firmeza (N)	14,43±1,96	6,99 ± 1,16	10,44±1,41	14,28±3,60	12,75±1,41	13,13±1,80	*
Diámetro(mm)	15,01±0,60	15,12±0,68	15,23±0,67	15,91±0,76	15,95±0,44	16,03±0,39	*
Longitud (mm)	23,71±1,12	23,91±0,97	24,02±0,76	23,07±1,14	23,78±1,11	24,02±0,75	NS
pH	1,90±0,21	1,97±0,13	2,09±0,16	1,97±0,23	2,23±0,28	2,39±0,19	NS
Índice de Acidez(ATT)	1,98±0,10	0,74±0,34	0,73±0,11	0,86±0,04	0,76±0,04	0,82±0,31	NS
°Brix	4,03 ± 0,55	4,37 ± 0,40	4,17 ± 0,55	4,87 ± 0,23	4,30 ± 0,87	4,87 ± 0,12	NS
Índice de madurez	2,04±0,17	5,91±0,33	5,71±0,21	5,66±0,22	5,65±0,14	5,94±0,09	*

Fuente: Autores (2019). ATT: Acidez Total Titulable; N: Newton; Sign: Significancia estadística; \*P<0,05; \*\*p<0,01; NS: P>0,05

La tabla 15, muestra la variabilidad de los indicadores fisicoquímicos de los frutos en estado de maduración 3 para la finca 2, advirtiéndose que los inhibidores causaron efectos estadísticos significativos (P<0,05) en firmeza, grados Brix e

índice de madurez de los frutos, lo cual es similar al comportamiento exhibido por las variables en la finca 1. La variable que se vio más afectada en la tabla 16 fue la firmeza de los frutos expresada en newton (N) se observa que esta característica se triplicó después de los tratamientos siendo un comportamiento más marcado en los inhibidores con  $\text{CaCl}_2$ , en otros reportes como los de Valdiviezo, (2018), muestra que tras los tratamientos de inmersión, el contenido de calcio en la cáscara y la pulpa de melocotón aumentaron sus índices significativamente siendo un método eficaz para aportar firmeza a la membrana celular. En la presente tabla se observa que el índice de maduración fluctuó casi en el doble, lo que indica que el proceso de formación de sólidos solubles y el ATT no fueron afectados por los inhibidores y siguieron su cauce natural, sin embargo, el proceso de pardeamiento si se vio afectado debido a la acción de los inhibidores.

**Tabla 16.** Indicadores fisicoquímicos de frutos *Rubus glaucus* en estado de maduración 5, provenientes de la finca 2, para cada tratamiento aplicado.

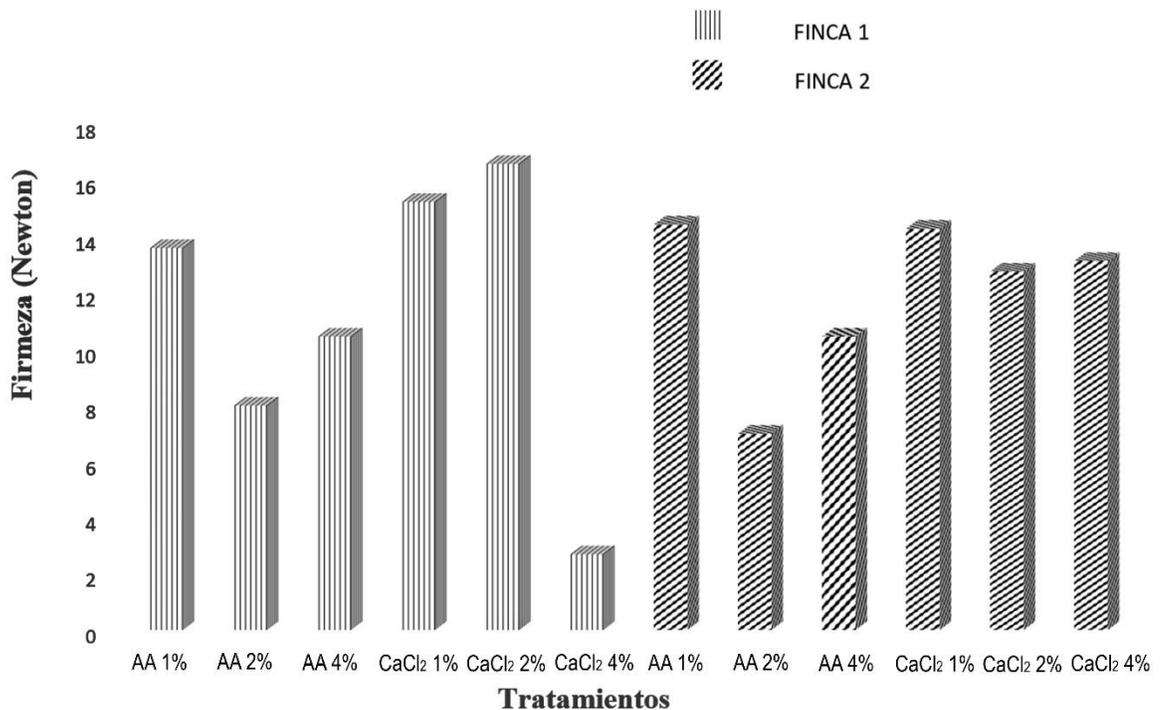
Indicadores	Finca 2, EM, 5						Sign.
	T <sub>7</sub>	T <sub>8</sub>	T <sub>9</sub>	T <sub>10</sub>	T <sub>11</sub>	T <sub>12</sub>	
Peso (g)	4,55±0,56	5,22±0,58	5,35±0,55	5,34±0,67	5,31±0,59	5,35±0,52	NS
Firmeza (N)	1,19 ± 0,15	1,28 ± 0,33	1,34 ± 0,13	1,52 ± 0,18	1,63 ± 0,16	1,69 ± 0,09	*
Diámetro(mm)	13,09±0,75	13,18±0,63	13,24±0,58	13,33±0,61	14,54±0,62	14,83±0,39	*
Longitud (mm)	15,17±0,98	15,54±1,02	15,73±0,65	15,78±1,03	15,83±0,97	16,04±0,75	NS
pH	2,14±0,12	2,25±0,15	2,34±0,11	2,19±0,21	2,33±0,24	2,38±0,15	NS
Índice de Acidez ATT)	1,78±0,15	1,23±0,11	1,69±0,22	1,77±0,14	1,79±0,14	1,81±0,21	NS
°Brix	7,30 ± 0,44	6,30 ± 0,62	5,87 ± 0,32	5,97 ± 0,81	5,07 ± 0,95	5,97 ± 0,31	NS
Índice de madurez	4,10±0,21	5,12±0,30	3,47±0,17	3,37±0,38	2,83±0,65	3,29±0,13	*

Fuente: Autores (2019). ATT: Acidez Total Titulable; N: Newton; Sign: Significancia estadística; \*P<0,05; \*\*p<0,01; NS: P>0,05

Con relación con la tabla 16, se advierte el efecto estadístico significativo ( $P<0,05$ ) de AA y  $\text{CaCl}_2$ , sobre las variables mencionadas anteriormente: firmeza y grados brix, encontrándose valores más bajos en la finca 2, estado de maduración 5, lo cual puede estar relacionado con la calidad fisicoquímica del suelo y en especial el porcentaje de materia orgánica presente en el mismo. La prueba Duncan mostró que la firmeza de T<sub>7</sub>, exhibió el valor estadístico ( $P<0,050$ ) más bajo con relación a los demás tratamientos; comportamiento opuesto mostraron los grados Brix, dado que el valor de T<sub>7</sub> fue superior a los demás tratamientos, lo cual confirma la eficiencia de los inhibidores utilizados, pero siendo más notable el efecto del cloruro de calcio en concentraciones de 2% y 4%, en el estado de maduración 5, tal como se aprecia en la gráfica 3.

Al Analizar el comportamiento de la firmeza en frutos bajos las mismas variables permite dilucidar la función del cloruro de calcio y su efecto en la membrana celular, reflejándose un mejor comportamiento. En la gráfica 3 donde los valores de la finca 1 fueron mayores a los de la finca 2 se produjo un aumento de la absorción y respuesta por parte del fruto.

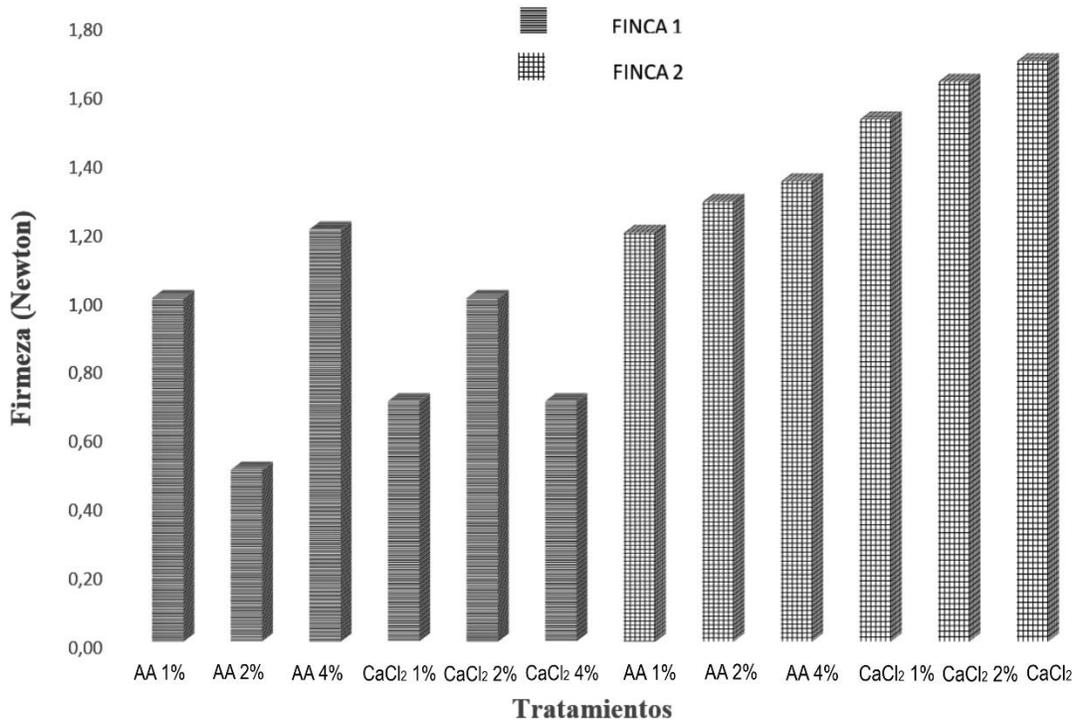
**Gráfica 3.** Comportamiento de la firmeza de los frutos de las fincas 1 y 2, en cada tratamiento aplicado al estado de maduración 3.



En la gráfica 3 se muestra la firmeza de los frutos en estado de maduración 3, de las dos fincas, advirtiéndose la notoria incidencia de los tratamientos con Cloruro de calcio sobre el comportamiento de esta variable, especialmente en la finca 1, dado que los valores de CaCl<sub>2</sub> 1%, y CaCl<sub>2</sub> 2%, superaron significativamente ( $P < 0,05$ ) a AA 1%, AA 2% y AA 4%,; comportamiento similar se observó en la finca 2, con valores más bajos; cuando se aplicó la prueba de rangos múltiples de Duncan, posterior al ANOVA, se detectaron diferencias estadísticas entre CaCl<sub>2</sub> 2% y los demás tratamientos de las dos fincas, demostrándose que el CaCl<sub>2</sub>, en concentración del 2% causó un efecto muy significativo en la conservación de esta propiedad, dado que enlaza componentes estructurales de la pared celular como las pectinas, generando un aumento en la dureza y resistencia de los frutos. La firmeza de los frutos fue uno de los parámetros que mostró mayor variación debido a la acción del cloruro de calcio que actúa sobre el ácido péctico, el cual es una de

las biomoléculas que se asocian con el ablandamiento en frutos, posteriormente los iones calcio forman pectato de calcio el cual le provee rigidez a la membrana.

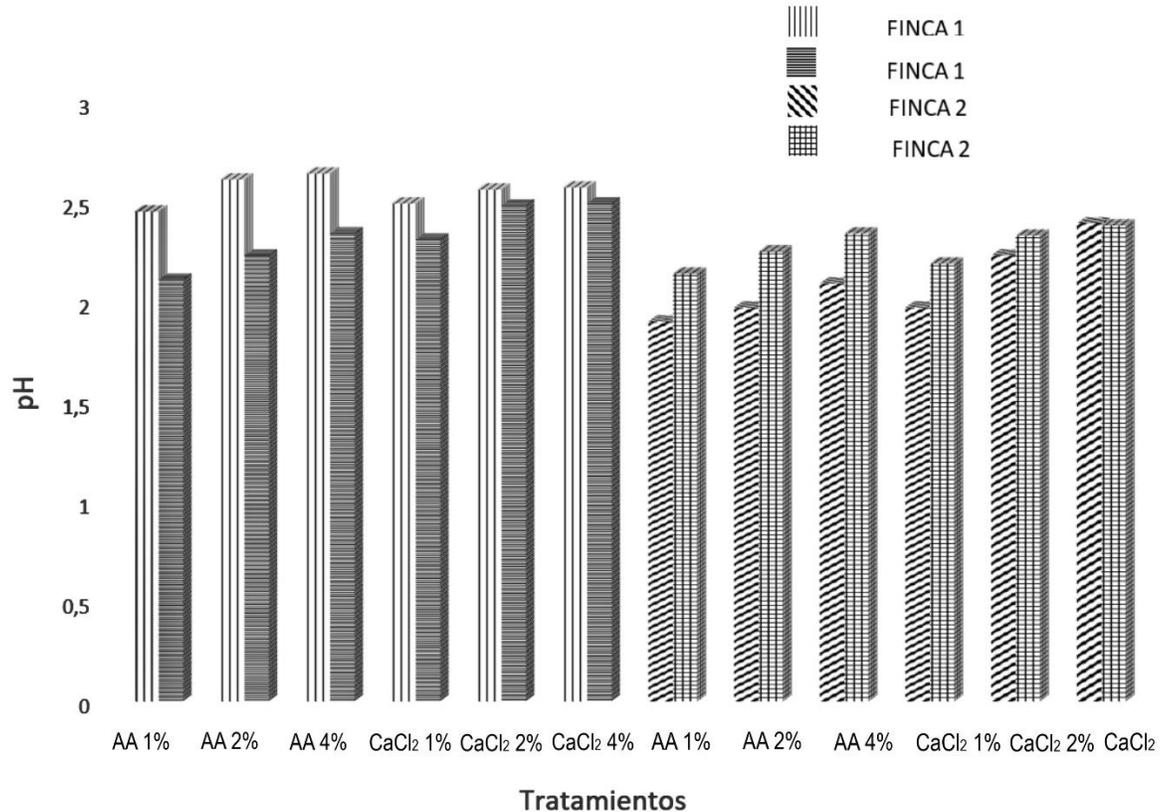
**Grafica 4.** Análisis de la firmeza en los frutos de la finca 1 y 2 estado de maduración 5, examinándose el comportamiento de los inhibidores en frutos maduros de mora.



Con relación al comportamiento de estas variables en el estado de maduración 5 y en las dos fincas estudiadas, en la gráfica 4 se observa la particular relación con los tratamientos, AA 1% al CaCl<sub>2</sub> 4% de la finca 2, puesto que se advierte una cierta tendencia lineal, indicando que los inhibidores químicos con concentraciones del 1 al 4% causaron un efecto positivo sobre la resistencia del fruto a la degradación. En contraste el comportamiento de la finca 1, mostró valores más bajos y sin tendencia. En esta finca, se destacaron los tratamientos AA 4% y CaCl<sub>2</sub> 2%, los cuales exhibieron los mejores valores; la prueba de Duncan mostró que los tratamientos CaCl<sub>2</sub> 2% y CaCl<sub>2</sub> 4%, fueron diferentes y superaron a los demás tratamientos de manera significativa, dejando entrever el efecto positivo del CaCl<sub>2</sub>, en la resistencia de los frutos en concentración del 2% y 4%. Este comportamiento es importante dado que al afectar notablemente la firmeza de los frutos en el estado de maduración 5, se está controlando la senescencia de los mismos.

En cuanto a la variable pH postratamiento se encontraron diferencias significativas en las fincas 1 y 2.

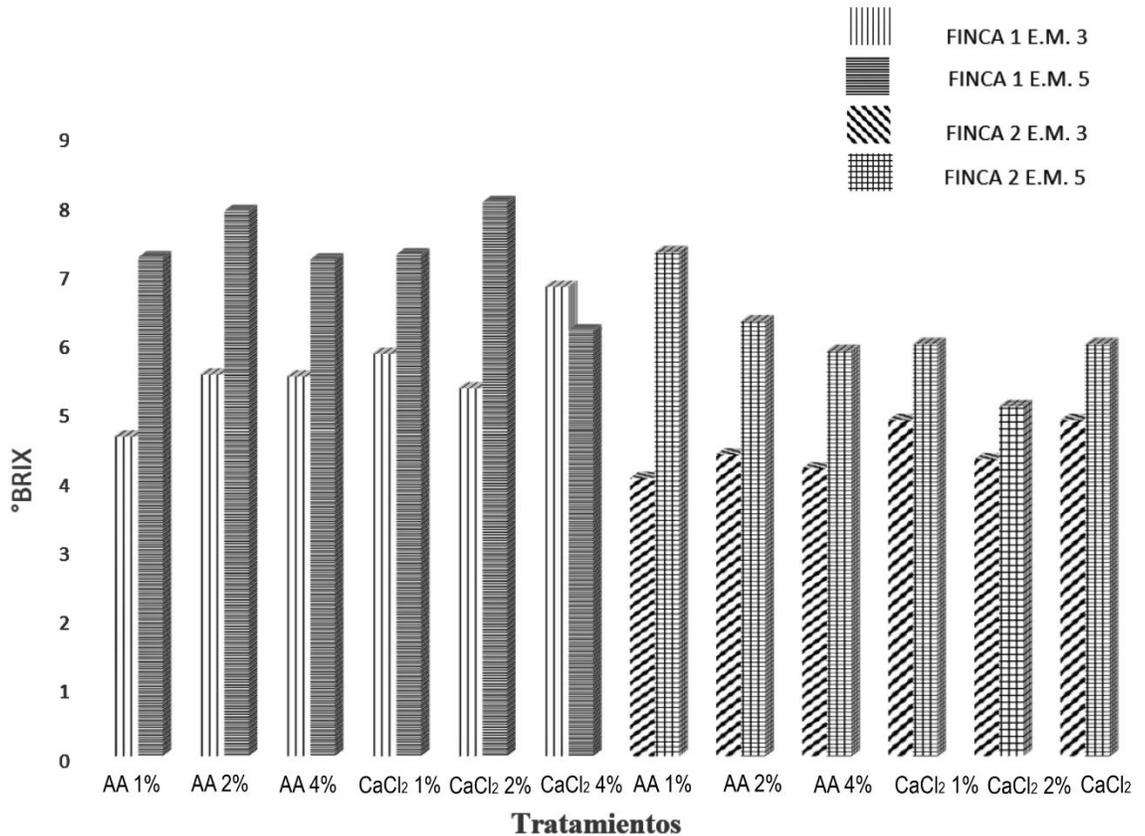
**Gráfico 5.** Comportamiento del pH en frutos tratados provenientes de las fincas 1 y 2, estados de maduración 3 y 5.



Al efectuar el análisis comparativo del pH de los frutos en las fincas 1 y 2 en estados de maduración 3 y 5, en la gráfica 5 se evidencia que los valores de pH, fueron más altos para la finca 1 en estado de maduración 3. Los valores de pH para la finca 1 estado de maduración 5 fueron más bajos que para el estado de maduración 3 en contraste, este indicador fisicoquímico incrementó su valor en el estado de maduración 5 en la finca 2, lo cual demuestra el efecto positivo de AA y CaCl<sub>2</sub>, en el control del proceso fermentativo de los monosacáridos tales como sacarosa y glucosa, como se detectó en el valor de los grados Brix.

Otro parámetro importante para analizar son los grados Brix, para confirmar el efecto de los inhibidores, los cuales deben tener una mayor proporción en el estado de maduración 5.

**Gráfica 6.** Comportamiento de grados Brix, en frutos tratados, provenientes de las fincas 1 y 2, estados de maduración 3 y 5.



En la gráfica 6, se observa que los valores de °Brix, fueron más altos en EM-5, en las dos fincas, confirmándose el control de la degradación sacarolítica en los Frutos *Rubus glaucus*, especialmente en los tratamientos 2, 5 y 7, que correspondieron a AA de 2%, CaCl<sub>2</sub>: 4% y AA: 1%. No obstante, cuando se realizó el ANOVA en doble vía, se detectó el efecto altamente estadístico ( $P < 0,010$ ) de cada finca y estado de maduración sobre el comportamiento de esta variable fisicoquímica, lo cual se puede atribuir a la posible inhibición enzimática del ácido ascórbico y del cloruro de calcio, sobre las peroxidasas y pectinmetilesterasas que condujo a un control de las Reacciones Bioquímicas de maduración y modificación de color, textura y resistencia del fruto.

La tabla 17, muestra la significancia estadística de los indicadores fisicoquímicos de los frutos, dados por el Análisis de Varianza (ANOVA) en doble vía y acorde al diseño experimental planteado para la investigación.

**Tabla 17.** Resultados ANOVA doble vía sobre los indicadores fisicoquímicos del fruto.

Variable Fisicoquímica	Finca (Sign)	Estado de Maduración (Sign)
Peso (g)	*	*
Firmeza (N)	NS	**
Diámetro (mm)	NS	*
Longitud (mm)	NS	*
pH	**	*
Índice de Acidez (ATT)	*	*
°Brix	**	**
Índice de madurez	*	*

**Fuente:** Autores (2019). Sign: Significancia estadística; \*P<0,05; \*\*p<0,01; NS: P>0,05

En la tabla 17, se advierte que los inhibidores aplicados a frutos *Rubus glaucus*, en las dos fincas, causaron efectos estadísticos sobre las variables peso, pH, índice de acidez, grados brix e índice de madurez; es decir el tipo de finca afectó el comportamiento de estas variables, dado que presentaban diferencias en la calidad de suelo, debido a los prácticas agrícolas como la fertilización, que es más completa en la finca 1 por la utilización del fertilizante comercialmente conocido como (15 15 15) mientras que la finca 2 utiliza un fertilizante orgánico, la gallinaza. En contraste, los estados de maduración de los frutos afectaron estadísticamente todos los indicadores fisicoquímicos de los frutos, lo cual es lógico por los cambios fisicoquímicos y bioquímicos desarrollados en cada estado que se evidencian en las variaciones contundentes de firmeza, pH y grados brix. Por lo tanto, es importante destacar el efecto de estos inhibidores AA y CaCl<sub>2</sub>, sobre las propiedades fisicoquímicas de los frutos.

#### 5.4. Actividad ureásica en suelo

Teniendo en cuenta que la ureasa es una amidohidrolasa, generada por la microbiota del suelo, encargada de desdoblar la urea como sustrato para producir: NH<sub>4</sub>OH y CO<sub>2</sub>. Esta es utilizada en investigación para analizar la actividad microbiológica y enzimática del suelo, en términos del ciclo del nitrógeno, ya que el amonio es fácilmente asimilable por las plantas.

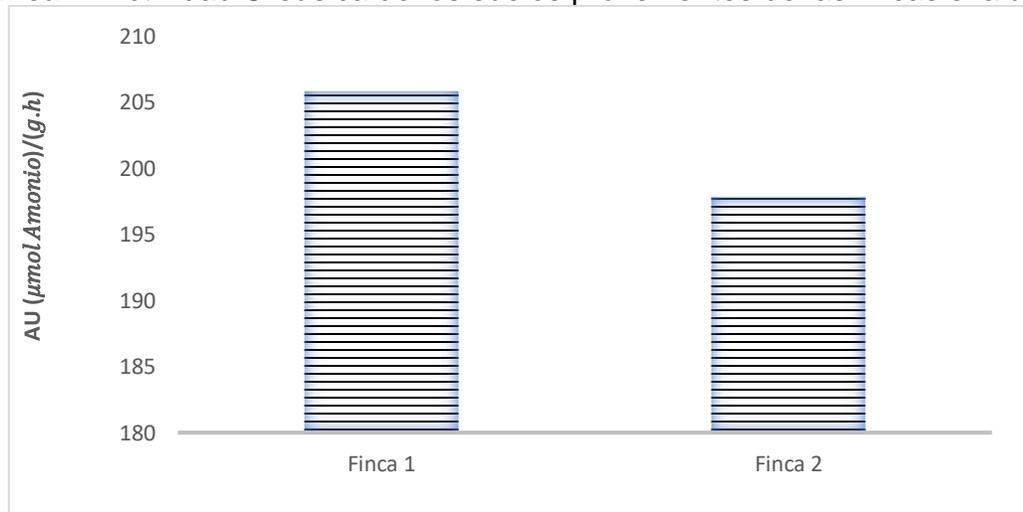
**Tabla 18.** Valores promedios de actividad ureásica de los suelos provenientes de las dos fincas.

Finca	AU $\frac{\mu\text{mol Amonio}}{\text{g.h}}$	%CV
1	205,83±8,35	4,06
2	197,84±15,80	7,99

**Fuente:** Autores (2019). %CV: Coeficiente de variación; AU: Actividad Ureásica

En La tabla 18 se observa que la actividad ureásica de la finca 1 es superior al valor encontrado en la finca 2, lo cual es concordante con el análisis fisicoquímico de suelos. Al graficar los valores de AU, se aprecia que la finca 1, superó en 7,99 $\mu\text{mol}$  de amonio /g.h al valor de la finca 2, lo cual representa un 4,04% de diferencia, a pesar de esto cuando se realizó el ANOVA, no se detectaron diferencias estadísticas ( $P>0,05$ ).

**Gráfica 7.** Actividad Ureásica de los suelos provenientes de las fincas evaluadas



La actividad ureásica concuerda con la concentración de materia orgánica presentada en cada finca, puesto que la finca 1 posee mayor actividad ureásica que la finca 2, al igual que los porcentajes de materia orgánica tal como se puede observar en las tablas 10 y 11. También la acidez forma parte de los valores obtenidos ya que afecta directamente la acción de los microorganismos que llevan a cabo dicha actividad presentando valores menores cuanto menor es el pH en los suelos ya que la microbiota del suelo es muy sensible a los cambios de pH y al alterarse el metabolismo de estas poblaciones, hay un efecto directo en la actividad ureásica, así es como factores fisicoquímicos presentes en el suelo afectan la actividad enzimática.

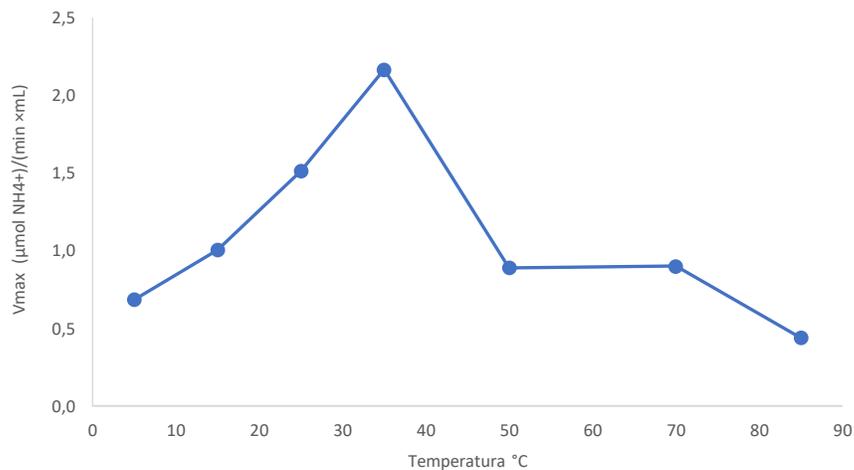
## 5.5. Cinética ureásica

Se tuvieron en cuenta solamente dos aspectos: el pH y la temperatura a la que se sometieron los extractos para encontrar los valores óptimos o de mayor velocidad de reacción. Estos dos valores son el estándar para analizar los límites enzimáticos a los que se puede desnaturizar una enzima o potencializar su efecto catalítico. Es así como en la gráfica 8 se observa el comportamiento de la ureasa sometida a temperaturas con un rango de (10 a 80°C).

### 5.5.1. Temperatura óptima

En la gráfica 8 se representa la velocidad de reacción de la ureasa en  $\mu\text{mol NH}_4^+$ /(min. mL) comparado con rangos de temperaturas desde 5 hasta 85 grados centígrados.

**Gráfica 8.** Velocidad de reacción de la ureasa contra temperatura.



En la gráfica 8 se observa un ascenso en la velocidad de reacción a medida que sube la temperatura a partir de los 5°C. La temperatura óptima se encontró alrededor de los 35 °C mostrando el mayor valor en la actividad enzimática de la ureasa en 2,166  $\mu\text{moles}$  de amonio/ (g.h). Por lo tanto, se tendrá en cuenta esta temperatura para el análisis de la actividad de ureasa en el suelo de las fincas. Hay un descenso de la velocidad de reacción al llegar a una temperatura de 50 °C y se mantiene hasta los 70 °C, donde empieza la inactivación de la enzima.

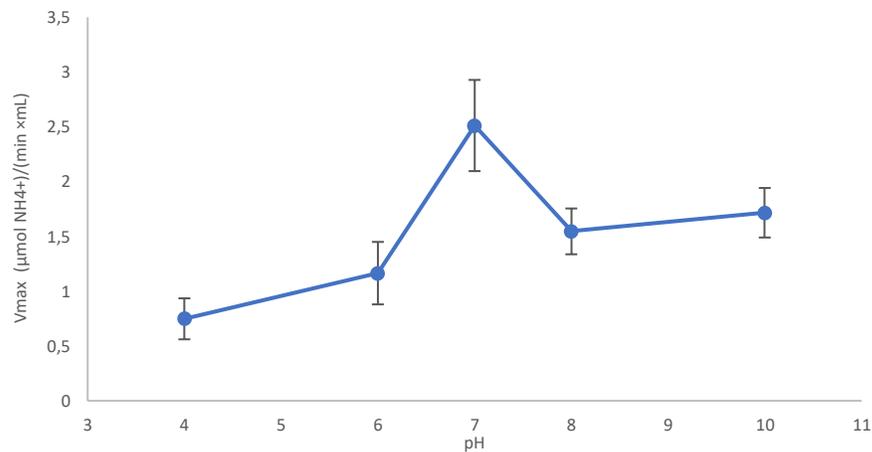
Hay una tendencia a la disminución de la actividad de la amidohidrolasa con valores de temperaturas superiores a los 37 grados centígrados.

Lai C.M. & Tabatabai M.A. (1992) reportan que la actividad de la enzima aumenta conforme lo hace la temperatura, desde un intervalo de los 10 hasta los 40 grados centígrados, siendo esta temperatura la óptima encontrada en su investigación, mientras que en el estudio realizado por Dash *et. al.* (1981) encontraron una temperatura óptima de 47 °C esta diferencia en las temperaturas óptimas se debe a la metodología que utilizaron donde la inactivación enzimática empieza desde los 70 grados centígrados en adelante, lo cual concuerda con la inactivación ureásica expuesta en el presente trabajo.

### 5.5.2. pH óptimo

En el gráfico 9 se presenta la actividad de la ureasa en  $\mu\text{mol NH}_4^+$ / (min x mL) de la ureasa con rangos de pH de 4 a 10.

**Gráfica 9.** V máx. contra pH en ureasa.



En la gráfica 9 el máximo valor de reacción, correspondiente a 2,512  $\mu\text{mol NH}_4^+$ / (min. mL) se obtuvo en un pH aproximado de 7, que está de acuerdo con lo encontrado en el estudio de Krajewska (2009), quien indica que los valores óptimos de actividad con relación al pH están en el rango 6.5 a 7.5 siendo el más óptimo el pH 7. Nannipiere *et al*; (1975), sugiere que los valores de pH son relativos, ya que estos dependen mucho de los tipos de suelo y la asociación ureasa-coloide del suelo.

La actividad a partir del pH 4 asciende, pero con una mayor pendiente desde el pH 6, hasta alcanzar un valor máximo en 7, a partir de este valor la reacción de la enzima desciende.

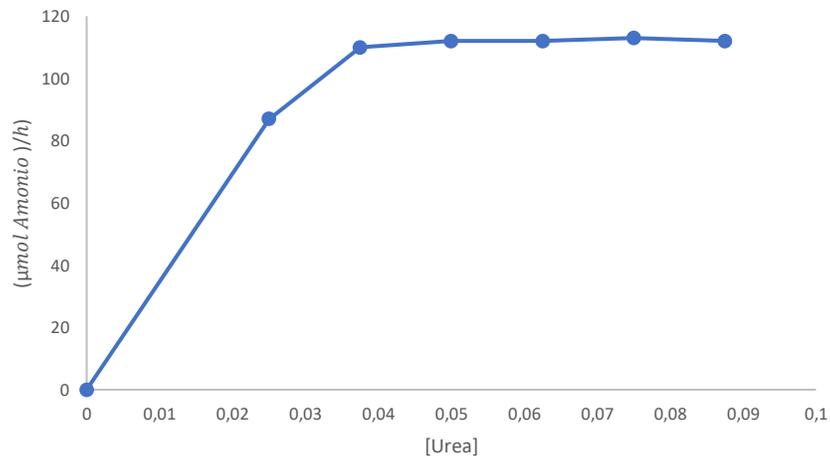
Al aumentar el pH del suelo se generan reacciones que cambian los estados de ionización de los sitios activos de la ureasa. "El sitio activo de todas las ureasas está

en las subunidades alfa, es un centro de níquel dimérico bis- $\mu$ -hidroxo” Carter, Flugga, Mulrooney, & Hausinger (2009).

### 5.5.3. Cinética de Michaelis a pH 7 para ureasa

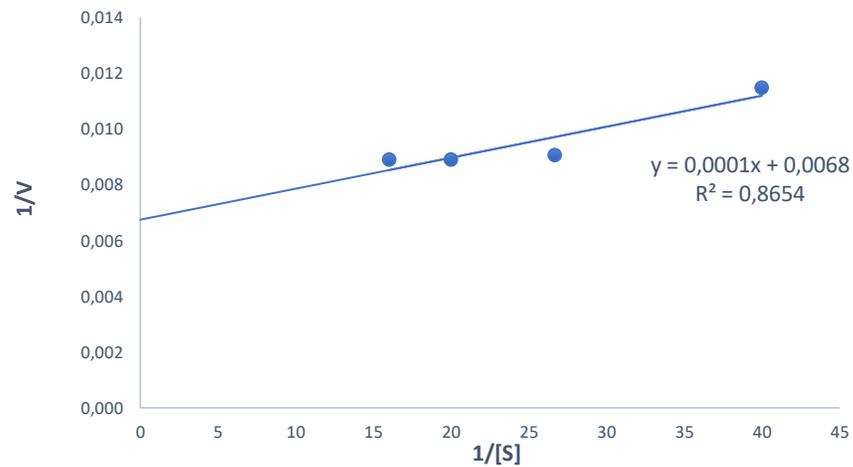
La grafica 10 corresponde a la representación de los datos obtenidos entre los  $\mu\text{mol NH}_4^+/\text{h}$  contra la concentración de amidohidrolasa en milimoles con un rango de  $113 \mu\text{mol NH}_4^+/\text{h}$  y una concentración máxima de  $0.0875 \text{ mmol}$  de urea.

**Gráfica 10.** Velocidad de la RBE en función de la Concentración de Urea



Con relación a la gráfica 10 se aprecia que su comportamiento es Michaeliano, es decir la ureasa (EC 3.5.1.5) como amidohidrolasa cumple los principios de la cinética de Michaelis, así se percibe que al inicio de la RBE su cinética es de primer orden ( $n=1$ ), dado que existe una reacción lineal entre el llenado de los sitios activos de la enzima por la urea, cuando esto ocurre la cinética cambia a orden 2 ( $n=2$ ), con pendiente negativa dado que los sitios activos de la ureasa se encuentran saturados por el sustrato, posteriormente, la cinética se transformó a orden cero ( $n=0$ ), indicando que los sitios activos están totalmente saturados y se ha logrado una actividad máxima, también es importante destacar que en la mitad de la velocidad máxima, se halla una concentración de urea que corresponde a la constante de Michaelis este valor determina la afinidad de la enzima por el sustrato, es decir el complejo activado: ureasa-urea.

Para determinar los parámetros cinéticos:  $V_{\text{max}}$  y  $K_m$ , se aplica la técnica de Lineweaver-Burk o método de la doble recíproca, dando como resultado la siguiente gráfica:

**Gráfica 11.** Representación Lineweaver-Burk

Con base en la ecuación de regresión:  $y=0,0001x+0,0068$  y a partir de la pendiente y el intercepto se determina la velocidad máxima de la RBE, y la constante de Michaelis o de afinidad, obteniendo los valores en la siguiente tabla.

**Tabla 19.**  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$  de la cinética ureasa

Parámetro cinético	
$V_{m\acute{a}x}$	147 $\mu\text{mol NH}_4^{+1} / \text{g.h}$
$K_m$	0,015 $\mu\text{mol NH}_4^{+1} / \text{g.h}$
$R^2$	0.8654

**Fuente:** Autores (2019).

En la tabla 19 se observa que la actividad máxima de ureasa extraída de los suelos de la región de Sumapaz fue de 147  $\mu\text{mol (NH}_4^+) / (\text{g.h})$ , es decir un gramo de urea se hidroliza por acción de la amidohidrolasa, produciendo 147 micro moles de amonio en una hora, tal valor se encuentra dentro de lo reportado por Tabatabai y Bremner (1972), quienes reportaron valores de entre 27, 5 hasta 356,5  $\mu\text{g}$  de amonio N liberado/g de suelo/2h. Con respecto al otro parámetro se obtuvo un valor de 0.015 mmoles urea/Mmol, lo que significa que en la mitad de la velocidad máxima es decir 73.5  $\mu\text{mol (NH}_4^+) / (\text{g.h})$ , la concentración de urea está en 0.015 mmol/mL lo que determina la actividad de la enzima por el sustrato.

## 5.6. Actividades enzimáticas de frutos *Rubus glaucus* pretratamiento

**Tabla 20.** Actividades de CAT, POD y PME, en frutos *Rubus glaucus*, al iniciar el experimento.

Indicador Enzimático	Unidad	Finca 1	Finca 2	Sign
CAT	$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{g.h}$	0,219	0,138	**
POD	uA / g.min	1,417	1,362	*
PME	uA /g.min	0,220	0,124	**

**Fuente:** Autores (2019). Sign: Significancia estadística; \*P<0,05; \*\*p<0,01; NS: P>0,05

Las actividades enzimáticas reflejadas en la tabla 20 presentaron mayores valores en las tres enzimas estudiadas en la finca 1, presentando alta significancia estadística en cuanto a la catalasa y la pectinmetilesterasa y solo significativo en la enzima peroxidasa, lo que confirma que las prácticas agrícolas utilizadas en las dos fincas están influyendo en la actividad enzimática en los frutos pretratamiento.

### 5.6.1. Actividad y cinética de catalasa

**Tabla 21.** Valores de Actividad de CAT en frutos *Rubus glaucus*, tratados con  $\text{CaCl}_2$  y ácido ascórbico.

Tratamiento	FINCA 1		FINCA 2	
	E.M. 3	E.M. 5	E.M. 3	E.M. 5
$\text{CaCl}_2$ 1%	0,176 $\pm$ 0,040	0,128 $\pm$ 0,040	0,117 $\pm$ 0,023	0,096 $\pm$ 0,016
$\text{CaCl}_2$ 2%	0,136 $\pm$ 0,016	0,107 $\pm$ 0,020	0,123 $\pm$ 0,020	0,107 $\pm$ 0,012
$\text{CaCl}_2$ 4%	0,123 $\pm$ 0,023	0,096 $\pm$ 0,029	0,080 $\pm$ 0,016	0,061 $\pm$ 0,017
AA 1%	0,203 $\pm$ 0,023	0,208 $\pm$ 0,040	0,077 $\pm$ 0,026	0,099 $\pm$ 0,020
AA 2%	0,123 $\pm$ 0,023	0,155 $\pm$ 0,023	0,096 $\pm$ 0,014	0,075 $\pm$ 0,024
AA 4%	0,197 $\pm$ 0,020	0,155 $\pm$ 0,023	0,091 $\pm$ 0,018	0,067 $\pm$ 0,023

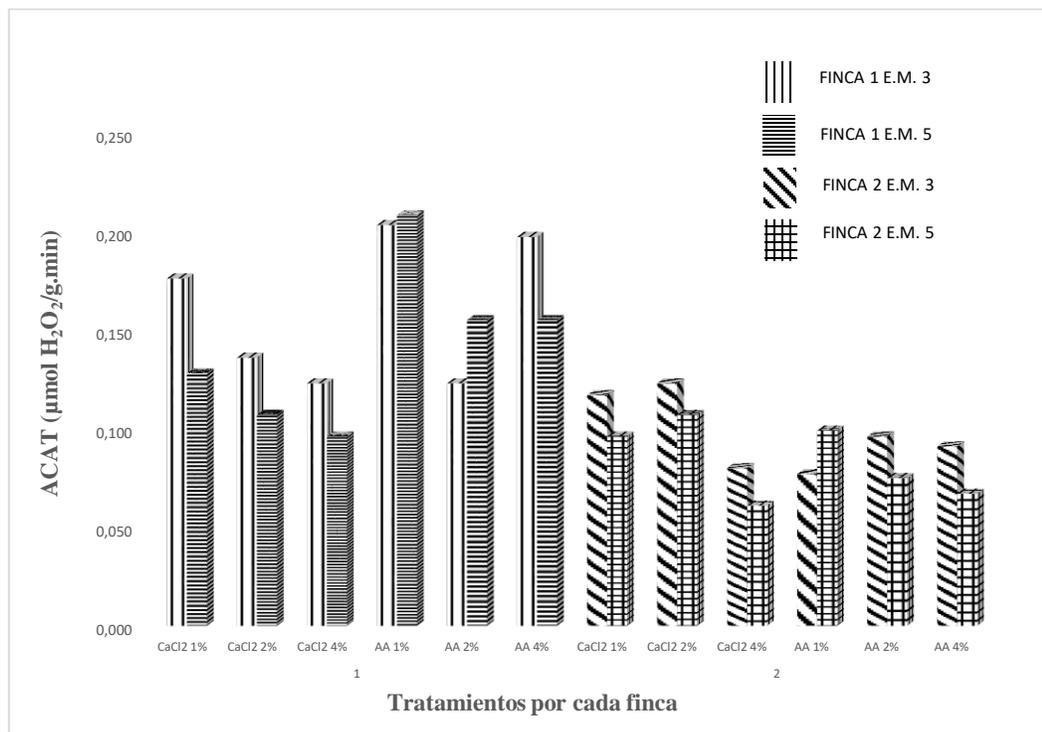
**Fuente:** Autores (2019).

Con relación a la tabla 21, se puede observar que los frutos tratados con cloruro de calcio exhibieron mayor actividad catalásica que aquellos tratados con ácido ascórbico, siendo más notable este comportamiento en la finca 2, cuando se comparan estos valores con las actividades iniciales, se aprecia una sensible disminución dada seguramente por procesos y mecanismos de inhibición de estas

moléculas sobre la holoenzima. Es decir, posiblemente afectaron sitios activos o lugares de la apoenzima que redujeron la acción catalítica de esta peróxido-reductasa. Es notable la reducción de la CAT en estados más avanzados de senescencia del fruto, por lo que se deduce que las cargas oxidantes son mayores produciendo una disminución de esta enzima, esto concuerda con lo encontrado por Baquero, Castro y Narváz (2005)

En la gráfica 12 se evidencia el comportamiento de la actividad catalítica para las fincas 1 y 2 y la inhibición presentada por los inhibidores, destacándose la finca 2 con una menor actividad de esta enzima.

**Gráfica 12.** Actividad de catalasa para frutos *Rubus glaucus* provenientes de fincas 1 y 2, tratados con inhibidores químicos.



Con el fin de mostrar el comportamiento de estas actividades enzimáticas, se realizó la gráfica 12, la cual destaca que CaCl<sub>2</sub> y AA, generaron mayor efecto de inhibición en el estado de maduración 5, en los frutos provenientes de las dos fincas evaluadas, siendo más notorio el de ácido Ascórbico en la finca 2, lo cual concuerda con lo reportado por literatura y dado por acción del grupo carboxilo de la molécula en los sitios activos de la peróxido-reductasa. A pesar de lo anterior, el cloruro de calcio, presentó un comportamiento inhibitorio similar en las dos fincas, causado por la formación de pectato cálcico en la pared celular de los frutos.

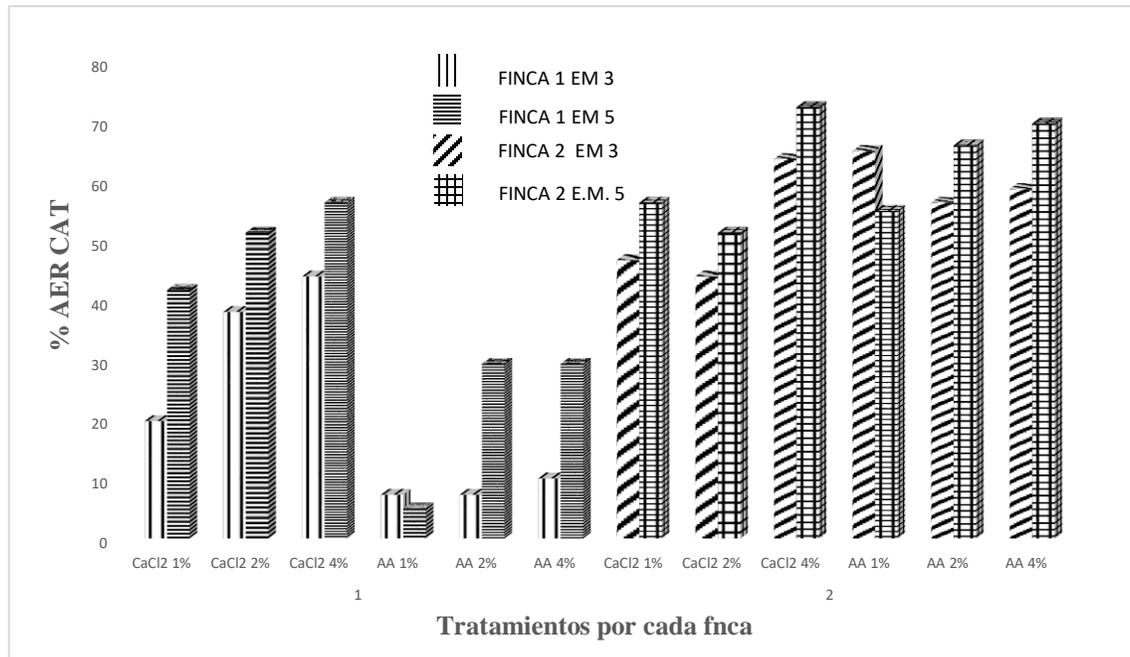
Cuando se realizó el Análisis de Varianza en doble vía para los valores de actividad de CAT, se encontró que los estados de maduración no causaron efecto estadístico significativo sobre la actividad de la enzima ( $P > 0,22290$ ), mientras que las fincas seleccionadas para el muestreo de los frutos si afectaron estadísticamente ( $P < 0,00011$ ) el comportamiento de CAT. Por otra parte, se notó que la interacción entre los dos factores, maduración y tipo de finca, no causaron efectos estadísticos ( $P > 0,84294$ ) sobre la actividad catalásica de los frutos; estos resultados demuestran el comportamiento fuertemente antioxidante de CAT, puesto que desdobla peróxido de hidrógeno, causante de la oxidación de mitocondrias y otros organelos celulares durante la maduración de los frutos. Según Kehrer (2010) la capacidad del  $H_2O_2$  para atravesar las capas lipídicas y su enorme capacidad de reacción con la membrana o el  $Fe^{2+}$  unido a las proteínas los cuales se unen con el peróxido hace que este sea extremadamente tóxico para la célula, es así como las capacidades antioxidantes de estas se miden por medio de la cantidad de CAT presentes en los peroxisomas, puesto que es una de las enzimas con más rotaciones y reactividad con el peróxido de hidrógeno, es una enzima considerada como en una de las primeras líneas de defensas siendo esta antioxidante.

**Tabla 22.** Resultados ANOVA doble vía, para actividad de CAT en frutos *Rubus glaucus*, tratados con  $CaCl_2$  y Ácido Ascórbico

Fuente de Variación	Significancia	P- valor
Estado de Maduración	NS	0,22290
Finca	**	0,00011
Interacción EMXF	NS	0,84294

**Fuente:** Autores (2019). Sign: Significancia estadística; \* $P < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; NS:  $P > 0,05$

**Gráfica 13.** Actividad enzimática residual de Catalasa para frutos *Rubus glaucus* provenientes de fincas 1 y 2, tratados con inhibidores químicos.

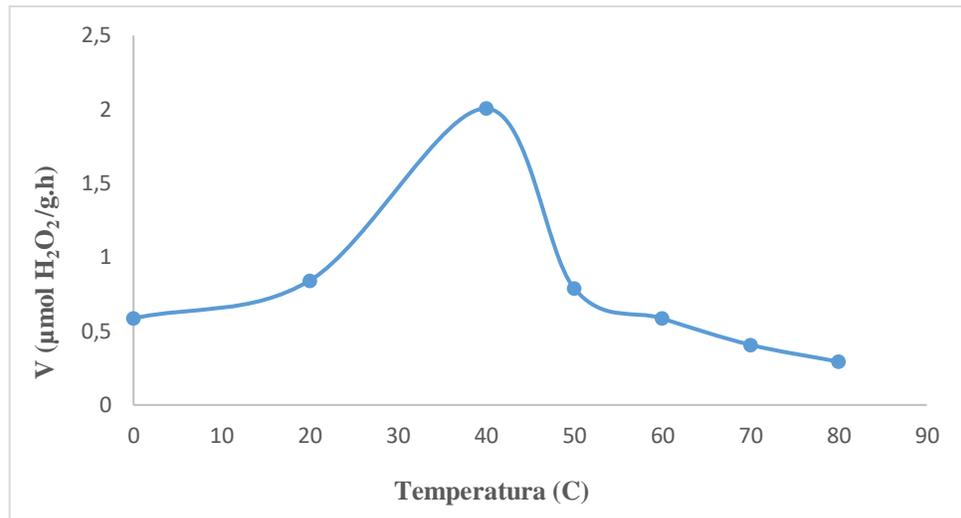


La gráfica 13, permite comprender que la actividad enzimática residual de catalasa en los frutos fue más baja en la finca 1, estado de maduración 3, comportamiento similar mostraron los frutos tratados con cloruro de calcio. No obstante, en la finca 2, se presentaron fluctuaciones de esta actividad residual, por lo que el efecto de estas moléculas sobre la actividad enzimática de CAT, no es tan significativa; estos resultados confirman que de alguna forma Ácido ascórbico y  $\text{CaCl}_2$ , inhiben la actividad de CAT en el estado inicial de maduración de los frutos, más no son tan efectivos en estados de maduración avanzados. El comportamiento del ácido ascórbico en la gráfica 13 demuestra su capacidad antioxidante sin embargo está presente el hecho de que no es un inhibidor que prevalezca en la reacción puesto que al agotarse los difenoles vuelven a reaccionar con las peroxidases y se transforman nuevamente a orto quinonas, así este inhibidor es efectivo cuando se encuentra en buenas cantidades en el medio de la reacción llegando a un rendimiento óptimo en los primeros lazos de reacción o hasta agotar el sustrato.

### 5.6.2. Cinética de Catalasa (CAT) en Extractos de frutos *Rubus Glaucus*

Se tomaron extractos enzimáticos al azar de una de las fincas, provenientes de frutos *Rubus glaucus* tratados con ácido ascórbico y cloruro de calcio, y se realizó estudio cinético que se muestra a continuación: temperatura óptima de CAT.

**Gráfica 14.** Comportamiento de velocidad CAT frente a temperatura

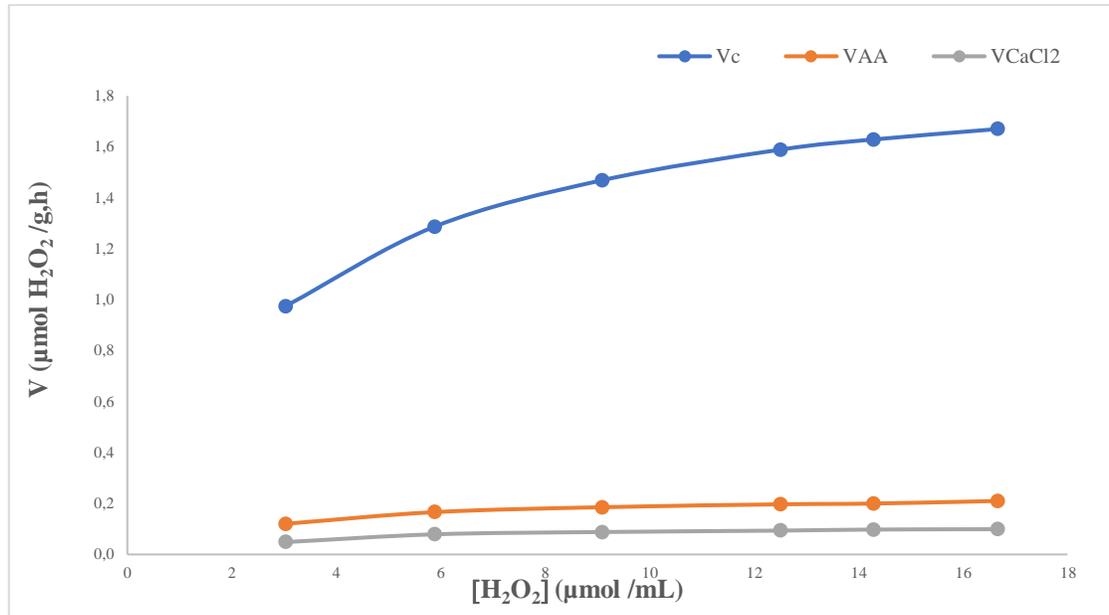


La gráfica 14 describe el comportamiento de CAT en función de 7 temperaturas trabajadas, en ella se aprecia que la actividad máxima de la enzima estuvo en 40 grados centígrados, por encima de este valor la velocidad se reduce, siendo más notable su descenso en temperaturas superiores a 50°C, lo cual se puede explicar dado que los cambios de temperatura causan ruptura de puentes de hidrógeno los cuales afectan la conformación tridimensional de la holoenzima.

Posteriormente, se buscó determinar el comportamiento Michaeliano de la enzima, mediante el estudio de la relación entre Velocidad y concentración de Peróxido de Hidrógeno a T<sub>máx</sub> de 40C y pH de 6,9 y los resultados se muestran a través de la gráfica 14.

A continuación, se evidencia la velocidad de la CAT con el testigo (V<sub>c</sub>) y los tratamientos ácido ascórbico (VAA) y (VCaCl<sub>2</sub>).

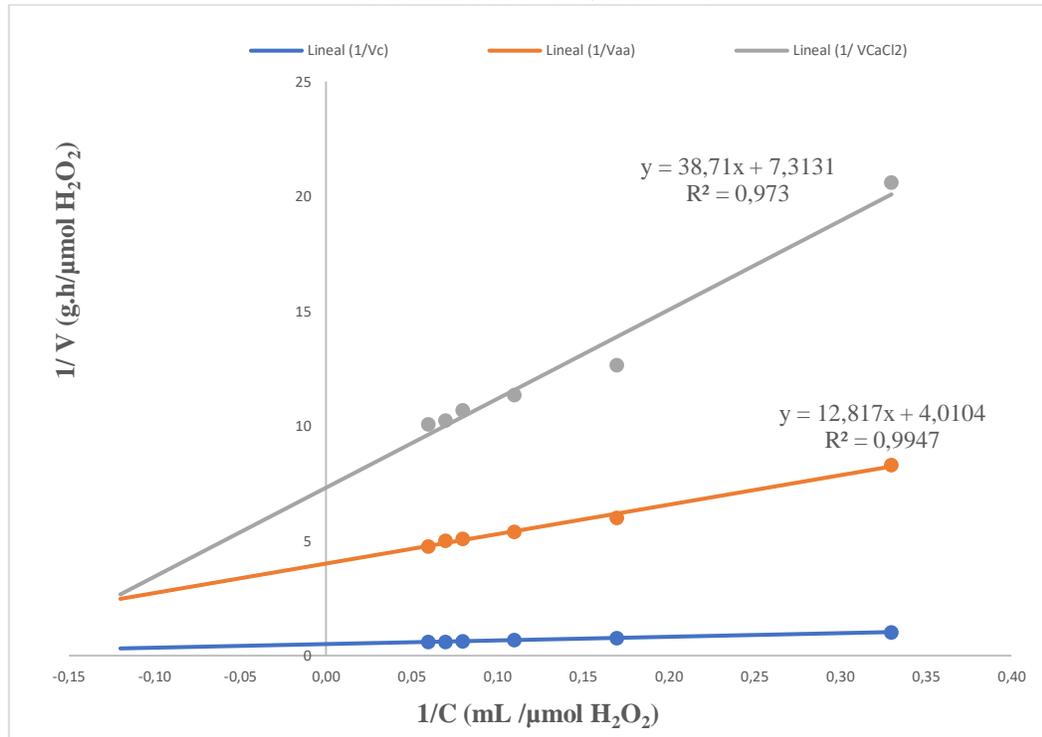
**Gráfica 15.** Comportamiento cinético de CAT para fruto *Rubus glaucus* control y tratados con AA y  $\text{CaCl}_2$



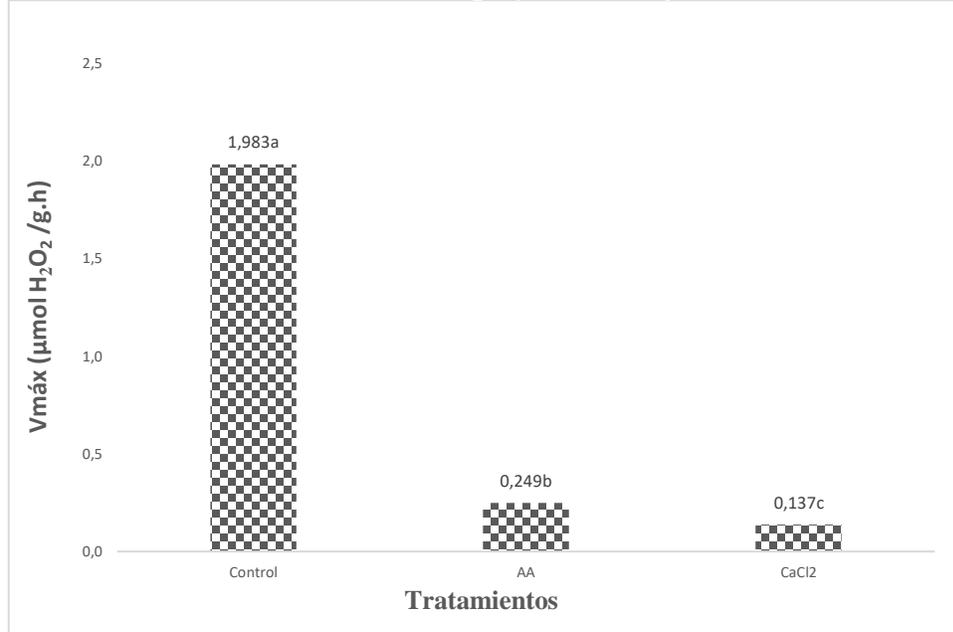
En la gráfica 15, se observa que CAT tuvo un comportamiento muy aproximado a la cinética de Michaelis-Menten en los dos extractos enzimáticos tratados con inhibidores químicos. Se destaca CAT tratada con ácido Ascórbico, tuvo mayor actividad catalítica que la enzima tratada con  $\text{CaCl}_2$ . Es decir, que el primer tratamiento presentó menos inhibición, mientras que la cinética de CAT fue afectada por la sal cálcica, dado el efecto de este inhibidor sobre los centros activos de la enzima.

Con el fin de hallar los parámetros cinéticos de CAT en estos extractos enzimáticos de Frutos *Rubus glaucus*, se procedió a tratar los datos cinéticos con el modelo de la doble recíproca de Linnewaver and Burk. La doble recíproca de CAT, en la gráfica 15, demuestra que las sustancias químicas aplicadas causaron una posible inhibición No competitiva sobre el sitio activo de la enzima, por lo tanto, afectaron la velocidad de CAT, más no redujeron significativamente la constante de Michaelis, es decir su afinidad por la peróxido-reductasa.

**Gráfica 16.** Doble recíproca para CAT en frutos *Rubus glaucus* sin tratamiento y con inhibidores Químicos.



Con base en las ecuaciones de regresión, se calcularon los parámetros cinéticos, obteniendo valores de velocidad máxima, según la gráfica 16.

**Gráfica 17.** Velocidades máximas del grupo control y con inhibidores en frutos.

Aquí se aprecia que la velocidad máxima de la CAT en los dos extractos enzimáticos presentó diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,05$ ) según las letras que acompañan los promedios, siendo mayor con ácido ascórbico, el cual superó en  $0,112 \mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{g.h}$ , a la velocidad máxima de CAT tratada con cloruro de calcio. Es decir, la actividad de la enzima con  $\text{CaCl}_2$ , se redujo un 45% por causa de la inhibición no competitiva de esta molécula; los valores de  $K_m$ , son mostrados en la tabla 23.

**Tabla 23.** Valores de  $K_m$  dados en ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{g.h}$ ) con las variables  $V_c$ ,  $V_{AA}$ ,  $V_{\text{CaCl}_2}$ 

Inhibidores	$K_m$ ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{g.h}$ )
Control	3,070a
$\text{CaCl}_2$ 4%	3,196a
AA 4%	5,293b

**Fuente:** Autores (2019).

Observando los valores de  $K_m$  para CAT en los extractos control y tratado con cloruro de calcio, se puede apreciar que no presentaron diferencias estadísticas ( $P > 0,050$ ), es decir son similares, lo cual confirma la inhibición No competitiva del

cloruro de calcio sobre la enzima, por lo tanto, se puede afirmar que esta molécula afecta el poder catalítico de catalasa, más no su afinidad de la enzima por el sustrato: peróxido de hidrógeno.

Con base en los parámetros cinéticos encontrados para CAT, se hallaron las ecuaciones cinéticas de esta enzima para los frutos *Rubus glaucus* en los respectivos tratamientos, tal como se evidencia en la tabla 24:

**Tabla 24.** Ecuaciones cinéticas de CAT

Tratamiento	Ecuación Michaelis-Menten	Ecuación doble recíproca Lineweaver-Burk	r	%CD	Sign
Control	$V = \frac{1,983[H_2O_2]}{3,070 + [H_2O_2]}$	$\frac{1}{V} = 38,710 \times \frac{1}{[H_2O_2]} + 0,504$	0,989	97,98	**
Ácido Ascórbico	$V = \frac{0,249[H_2O_2]}{3,196 + [H_2O_2]}$	$\frac{1}{V} = 12,817 \times \frac{1}{[H_2O_2]} + 4,014$	0,997	99,47	**
CaCl <sub>2</sub>	$V = \frac{0,137[H_2O_2]}{5,293 + [H_2O_2]}$	$\frac{1}{V} = 35,98 \times \frac{1}{[H_2O_2]} + 7,313$	0,986	97,30	*

Fuente: Autores (2019).

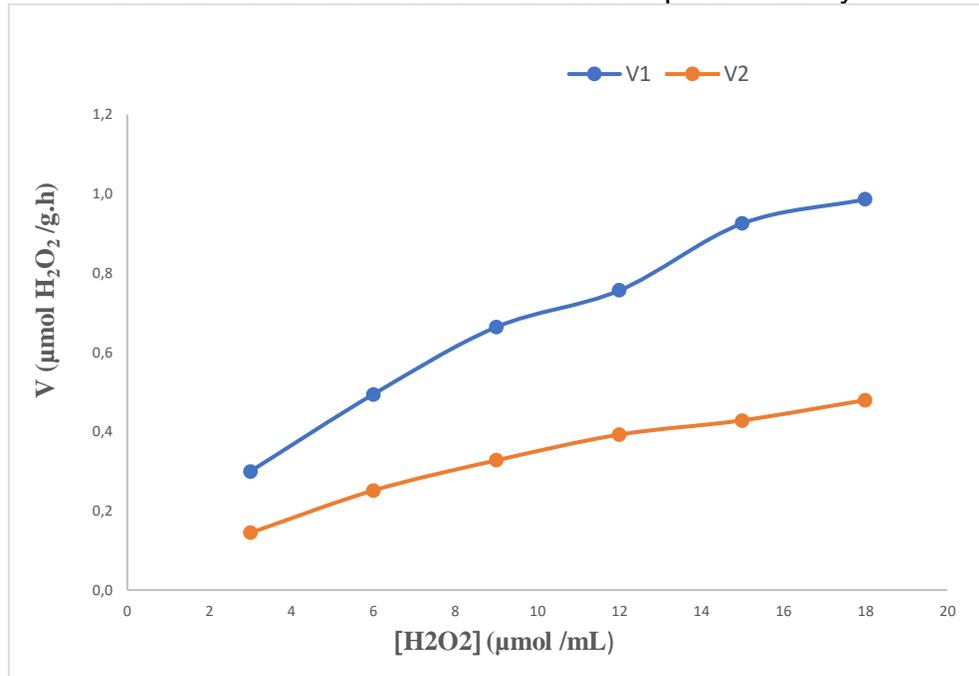
En dicha tabla se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson mostró alta significancia estadística ( $P < 0,01$ ) para la actividad de CAT en frutos controles y los tratados con ácido ascórbico, mientras que fue significativo ( $P > 0,05$ ) para CAT tratados con cloruro de calcio; lo confirma el efecto inhibitorio de las sustancias utilizadas sobre la actividad de CAT, resaltando que, además, las cinéticas estudiadas cumplieron con los principios científicos de la cinética Michaeliana.

### 5.6.3. Cinética enzimática de catalasa proveniente de suelos:

Con el fin de establecer una relación más clara de la actividad del suelo con la de los frutos, se realizó extracción de catalasa en suelo para realizar su respectivo estudio cinético, de esta forma, se obtuvo la gráfica 18.

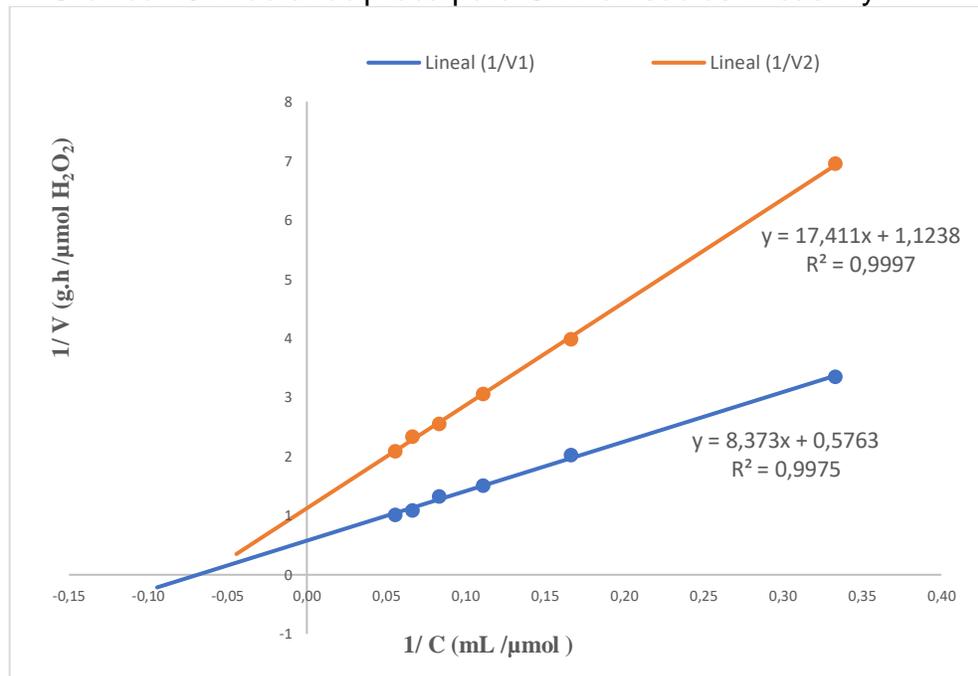
Analizando la gráfica, se aprecia que CAT en suelos tiene un comportamiento aproximadamente Michaeliano, con una velocidad inicial relativamente baja en la cinética de primer orden, la cual se sostiene hasta alcanzar la cinética de orden cero en un valor máximo cercano a  $1,0 \mu\text{moles } H_2O_2 / \text{g.h}$ , lo que correspondería a un valor cercano a su velocidad máxima.

**Gráfica 18.** Cinética de CAT en suelos para finca 1 y 2.



Cuando se aplicó el modelo de la doble recíproca, se obtuvo la siguiente gráfica:

**Gráfica 19.** Doble recíproca para CAT en suelos fincas 1 y 2.



En la gráfica 19 se confirmó el comportamiento de CAT, según el modelo cinético de Michaelis-Menten; el coeficiente de correlación de Pearson para esta gráfica, correspondió a un valor de 0,9987, indicando alta significancia estadística ( $P < 0,05$ ) entre los recíprocos de velocidad y concentración de sustrato. A partir de las ecuaciones de regresión de esta gráfica, se calcularon los parámetros cinéticos, obteniéndose los siguientes valores:

**Tabla 25.** Parámetros cinéticos para CAT.

Fincas	Vmax ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{g.h}$ )	Km ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mL}$ )	r	Sign
1	1,735	14,529	0,9987	**
2	0,889	15,492	0,9984	**

Fuente: Autores (2019).

Acorde a la tabla anterior, se observa que CAT del suelo proveniente de la Finca 1, mostró mayor velocidad Máxima y mejor afinidad por el sustrato según la constante de Michaelis en general, la actividad catalítica de CAT de  $F_1$ , superó en  $0,846 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{g.h}$ , a la velocidad Máxima enzimática del suelo extraído de la  $F_2$ . Así mismo, la afinidad de CAT por  $\text{H}_2\text{O}_2$  tuvo menor comportamiento en la Finca 2; lo anterior demuestra que el suelo  $F_1$ , mostró mejor comportamiento en su actividad biológica que el de  $F_2$ . Con base en los parámetros cinéticos obtenidos se plantearon las ecuaciones cinéticas de CAT en suelos provenientes de las Fincas 1 y 2.

**Tabla 26.** Ecuaciones cinéticas para CAT en suelos de Finca 1 y 2.

Finca	Ecuación Michaelis-Menten	Ecuación doble recíproca Linnewaver-Burk
1	$V = \frac{1,735[H_2O_2]}{14,529 + [H_2O_2]}$	$\frac{1}{V} = 8,373 \times \frac{1}{[H_2O_2]} + 0,576$
2	$V = \frac{0,889[H_2O_2]}{15,492 + [H_2O_2]}$	$\frac{1}{V} = 17,411 \times \frac{1}{[H_2O_2]} + 1,124$

#### 5.6.4. Actividad de Peroxidasa (POD) en los Frutos (ua /g.min)

La actividad de la peroxidasa es un parámetro importante para determinar el efecto de los inhibidores, puesto que la peroxidasa es una de las principales enzimas que causan el deterioro y coloraciones marrones en frutos.

**Tabla 27.** Actividades de POD en frutos *Rubus glaucus* tratados con AA y CaCl<sub>2</sub>, en los estados de maduración 3 y 5, provenientes de las fincas 1 y 2.

FINCA	*Estándar	0,414	
	INHIB	EM-3	EM-5
1	AA1%	0,059	0,018
	AA2%	0,038	0,015
	AA4%	0,058	0,026
	CaCl <sub>2</sub> 1%	0,061	0,062
	CaCl <sub>2</sub> 2%	0,059	0,048
	CaCl <sub>2</sub> 4%	0,029	0,014
2	AA1%	0,060	0,064
	AA2%	0,066	0,052
	AA4%	0,032	0,037
	CaCl <sub>2</sub> 1%	0,075	0,054
	CaCl <sub>2</sub> 2%	0,063	0,050
	CaCl <sub>2</sub> 4%	0,060	0,048

\*Actividad de solución estándar.

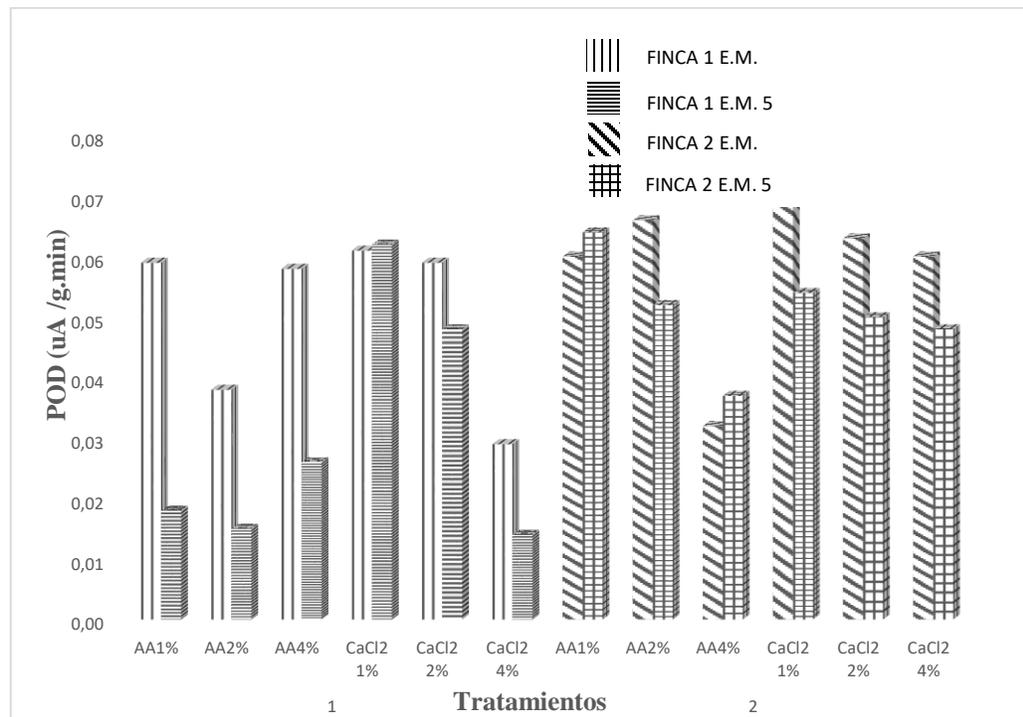
La tabla 27, muestra que las actividades de POD en los frutos fueron superiores en la etapa de maduración 3 y disminuyeron en la etapa 5, en las dos fincas estudiadas. Es decir, posiblemente la acción de los inhibidores fue más efectiva en EM-5, en razón de los cambios bioquímicos de los frutos y la sensibilidad de los sitios activos de POD a los cambios de pH.

La actividad enzimática del estándar de la peroxidasa en los frutos de mora fue similar a los datos reportados por: Santander, Mejía & Osorio, (2013) en el cual la actividad de esta enzima para el tomate de árbol es de  $0,21488 \pm 0,02256$ , actividad enzimática (DO/min) cambio de absorbancia por minuto.

En la gráfica 19 se muestra todos los valores de la actividad enzimática de la POD en los frutos postratamientos para las dos fincas.

Analizando la anterior gráfica, se aprecia que el ácido ascórbico 2% y el cloruro de calcio 4%, causaron mayor efecto de inhibición sobre la enzima en el estado de maduración 5 para los frutos de la finca 1. En la finca 2, se observa que el ácido ascórbico al 4% y cloruro de calcio 4% generaron un mayor efecto inhibitorio en el estado de maduración 5 para la capacidad catalítica de POD. Se advierte una mejor inhibición en los frutos con estado de maduración 5 para la finca 1.

**Gráfica 20.** Actividad de POD en frutos *Rubus glaucus* provenientes de dos fincas y tratados con AA y Cloruro de calcio



El análisis de varianza en doble vía mostró lo siguiente:

**Tabla 28.** Resultados ANOVA doble vía.

Fuente de Variación	P-valor	Sign
Inhibidores	0,0234561	*
Estados de maduración	0,0002103	**
Fincas	0,0000010	**
Interacción	0,0371200	*

Observando la tabla 30, se deduce que los estados de maduración de los frutos *Rubus glaucus* y los dos sistemas productivos causaron efectos estadísticos altamente significativos ( $P < 0,010$ ) sobre la inhibición de POD, lo cual está ligado también al efecto estadístico ( $P < 0,050$ ) de los inhibidores ácido ascórbico y Cloruro de calcio. Lo anterior también fue apoyado por la interacción significativa simultánea ( $P < 0,050$ ) de estos factores sobre la inhibición enzimática.

Con el fin de estudiar más a fondo el comportamiento de los tratamientos, se calculó el porcentaje de actividad enzimática residual (%AER), el cual se muestra en la siguiente tabla:

**Tabla 29.** Actividad enzimática residual de POD para frutos *Rubus glaucus* tratados con inhibidores químicos en estados de maduración 3 y 5, obtenidos de las fincas 1 y 2.

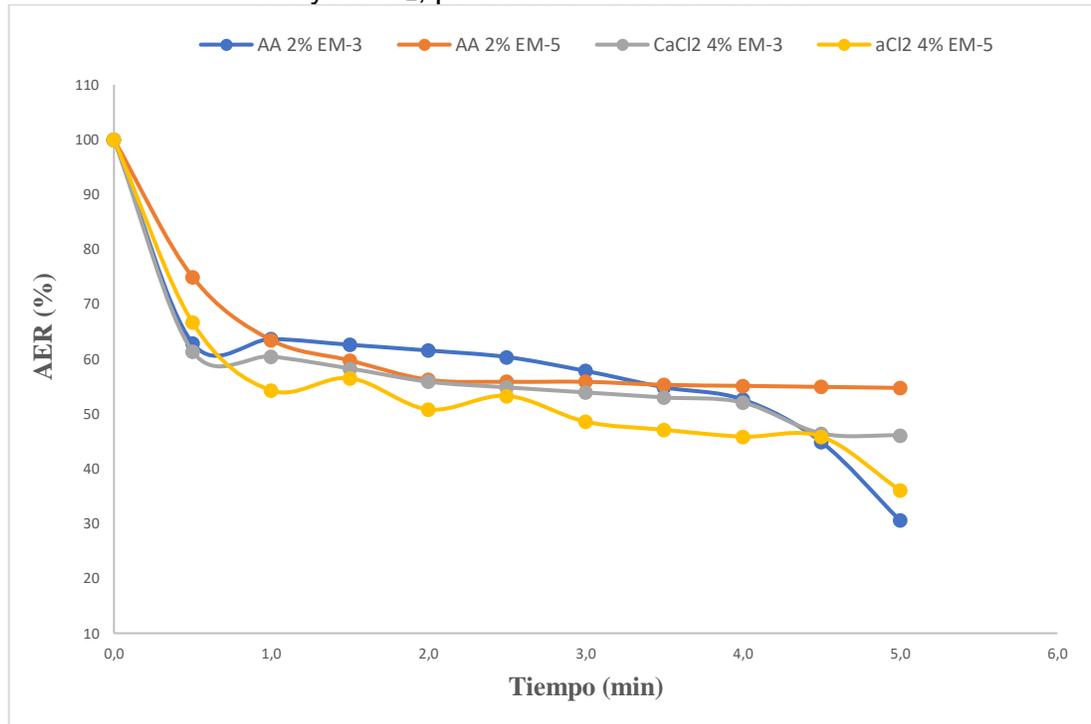
FINCA	INHIB	EM-3	EM-5
1	AA1%	14,251	4,348
	AA2%	9,179	3,623
	AA4%	14,010	6,280
	CaCl <sub>2</sub> 1%	14,734	14,976
	CaCl <sub>2</sub> 2%	14,251	11,594
	CaCl <sub>2</sub> 4%	7,005	3,382
2	AA1%	14,493	15,459
	AA2%	15,942	12,560
	AA4%	7,729	8,937
	CaCl <sub>2</sub> 1%	18,116	13,043
	CaCl <sub>2</sub> 2%	15,217	12,077
	CaCl <sub>2</sub> 4%	14,493	11,594

La tabla 29, muestra que en los frutos provenientes de la finca 1, el ácido ascórbico 2% causó una actividad POD de 3,63% en el estado de maduración 5, es decir, causó un descenso de 96,377% en la actividad catalítica de la enzima, mientras que CaCl<sub>2</sub> 4% produjo una AER del 3,382, generando un descenso de 96,618% en la RBE de POD, de la misma manera, en los frutos de la finca 2, AA 4% y Cloruro de Calcio 4% redujeron en 92,271% y 88,406%, respectivamente la actividad catalítica de POD.

#### 5.6.5. Estudio cinético de la inhibición de POD

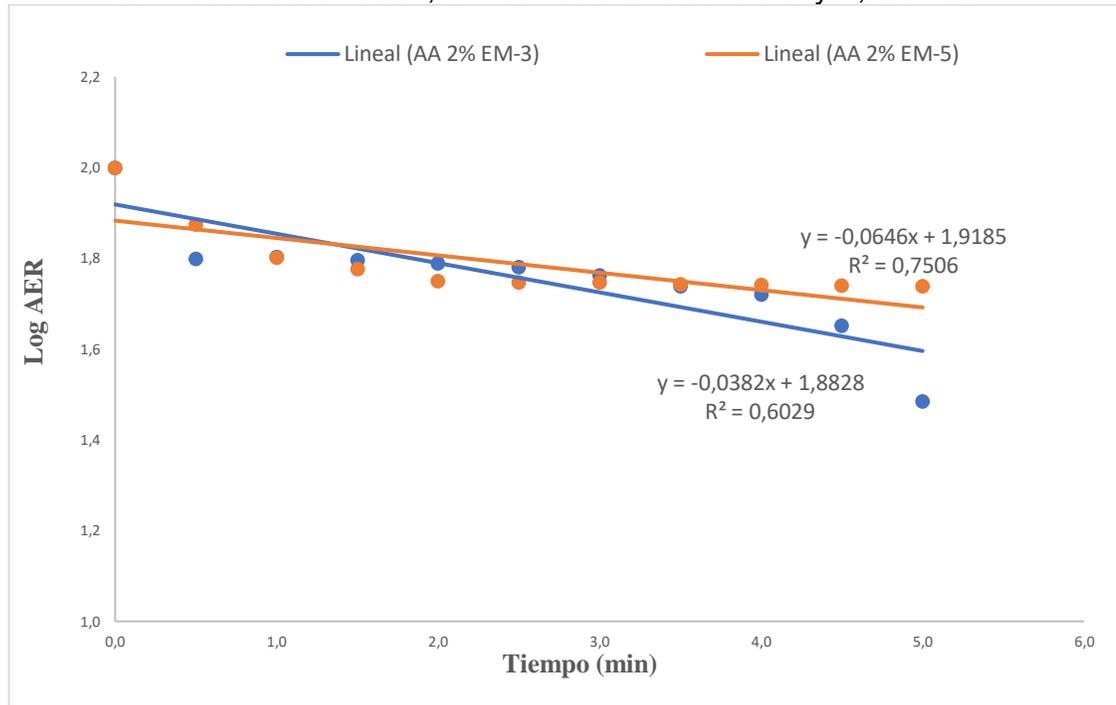
Con el propósito de analizar detalladamente el comportamiento cinético de POD, se decidió graficar AER versus el tiempo para los inhibidores que exhibieron mejor comportamiento, se obtuvo lo siguiente:

**Gráfica 21.** Cinética de inactivación de POD en frutos *Rubus glaucus* tratados con AA y CaCl<sub>2</sub>, provenientes de la finca 1.



En la gráfica 21 se observa una reducción logarítmica de la AER por acción de los dos inhibidores químicos en sus respectivas concentraciones y estados de maduración 3 y 5, es decir la reducción logarítmica de la actividad residual en el tiempo, supone una cinética de primer orden ( $n=1$ ), advirtiéndose un descenso notorio de POD tratada con AA al 2%, estado de maduración 3 y Cloruro de calcio del 4%, estado de maduración 5, hacia el final de la reacción bioquímica enzimática (RBE). Dado este comportamiento cinético, se procedió a obtener logaritmos decimales de las actividades residuales y elaborar la gráfica cinética de Log AER versus tiempos de lectura en el espectrofotómetro UV-VIS, con el propósito de linealizar la anterior gráfica y encontrar así: Constante de Inhibición ( $K_i$ ) de la reacción, lo mismo que el tiempo de vida media residual de la enzima ( $t_R$ ), Dichas gráficas obtenidas fueron las siguientes para los frutos provenientes de la finca 1:

**Gráfica 22.** Comportamiento cinético de primer orden para inhibición de POD en frutos tratados con AA, Estados de maduración 3 y 5, finca 1.



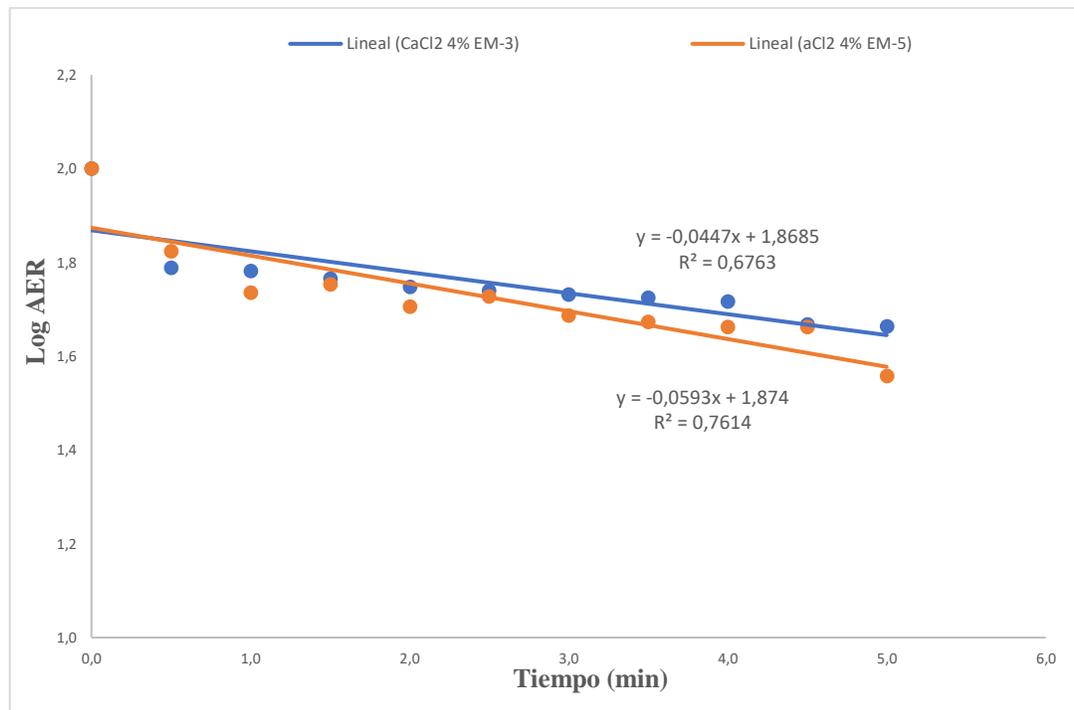
El comportamiento lineal de los datos, en las gráficas 21 y 22, confirma la cinética de primer orden de la inhibición de POD, por lo que se procedió a calcular  $K_i$  mediante la expresión:

$$K_i = -2,303 \times \text{Pendiente de la recta}$$

Y el tiempo residual de vida medio así:

$$t_R = \frac{0,693}{K_i}$$

**Gráfica 23.** Comportamiento cinético de primer orden para inhibición de POD en frutos *Rubus glaucus*, tratados con  $\text{CaCl}_2$  estados de maduración 3 y 5, Finca 1.



Los valores calculados para  $K_i$  y  $t_R$ , junto con el análisis estadístico se muestran en la tabla 30.

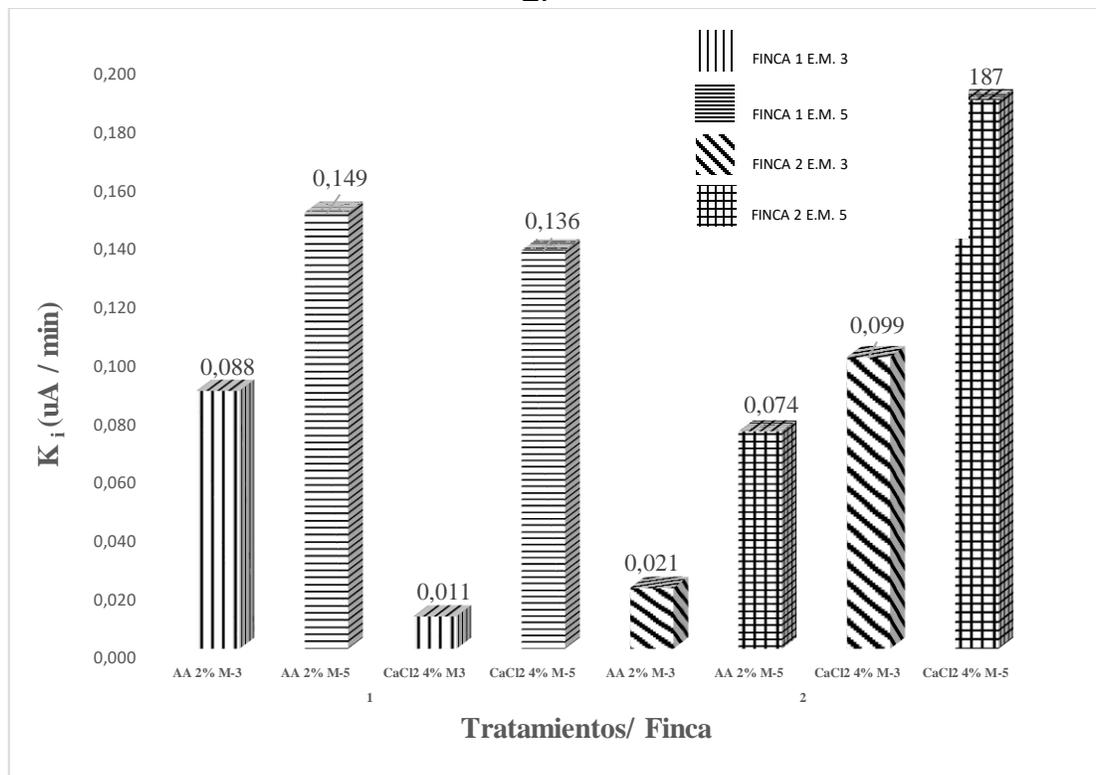
Los resultados de  $K_i$  y tiempo residual medio para tratamientos, fincas y estados de maduración están analizados en la tabla 30:

**Tabla 30.** Análisis estadístico de valores de constantes de inhibición de POD y tiempo residual medio frutos *Rubus glaucus* provenientes de las fincas 1 y 2, estados de maduración 3 y 5.

Finca	Inhibidores	EM	$K_i$ (uA/min)	$t_R$ (min)	r	sign
1	AA 2%	3	0,088	7,88	0,776	NS
	AA 2%	5	0,149	4,65	0,866	*
	$\text{CaCl}_2$ 4%	3	0,011	64,02	0,822	NS
	$\text{CaCl}_2$ 4%	5	0,136	5,07	0,873	*
2	AA 2%	3	0,021	33,43	0,846	NS
	AA 2%	5	0,074	9,35	0,948	**
	$\text{CaCl}_2$ 4%	3	0,099	6,97	0,861	NS
	$\text{CaCl}_2$ 4%	5	0,187	3,70	0,977	**

De acuerdo con la tabla 30, el comportamiento cinético de la inhibición de POD mostró alta significancia estadística ( $P < 0,010$ ) en los tratamientos con AA 2% y  $\text{CaCl}_2$  4% en frutos provenientes de la finca 2, mientras que el efecto fue significativo ( $P < 0,050$ ) en los mismos tratamientos de la finca 1, estado de maduración 5. Así mismo se destaca que el valor más alto en la constante de velocidad de inhibición lo presentó el  $\text{CaCl}_2$  4% en el estado de maduración 5 y en frutos de la finca 2, en contraste, el menor valor se obtuvo en  $\text{CaCl}_2$  4% estado de maduración 3, finca 1; tal como se observa en la gráfica 24:

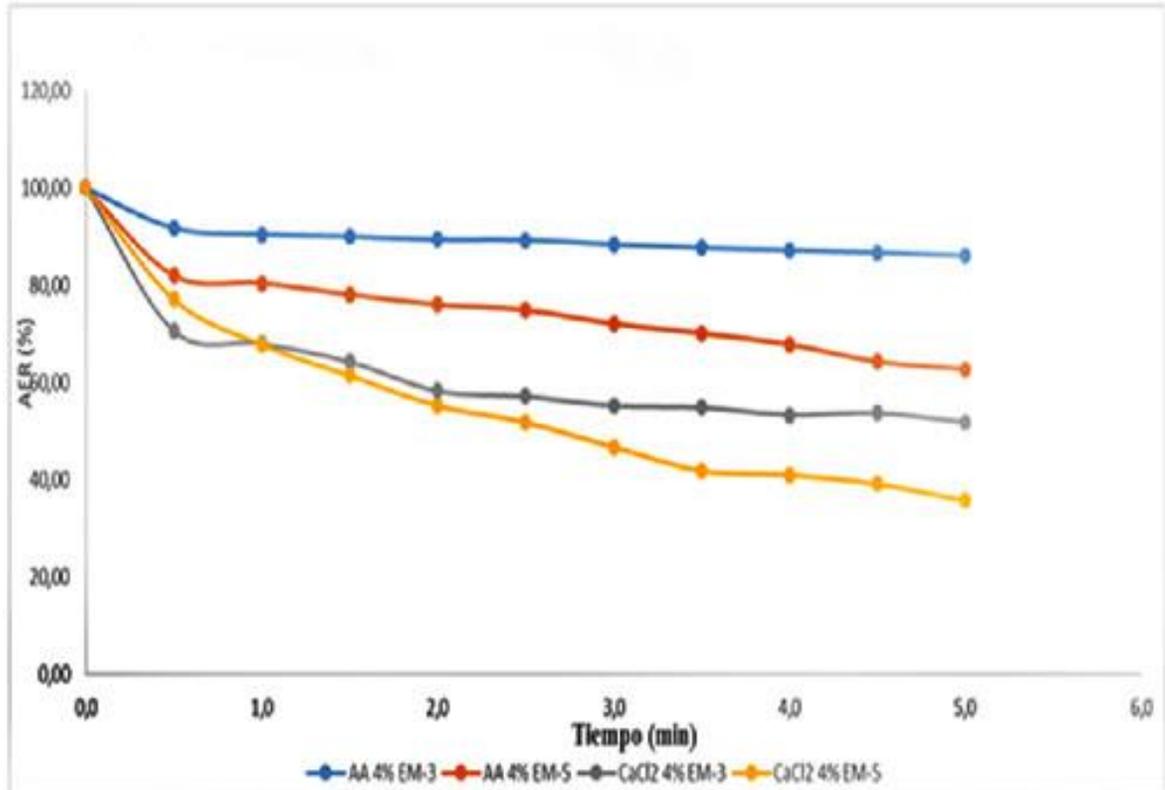
**Gráfica 24.** Valores de constantes de velocidad de inhibición de POD en frutos *Rubus glaucus*, tratados con AA y  $\text{CaCl}_2$ , estados de maduración 3 y 5, Fincas 1 y 2.



La gráfica 24 describe el comportamiento de la constante de inhibición de POD en los tratamientos estudiados, se destaca el menor valor estadístico de  $\text{CaCl}_2$  4% estado de maduración 5, finca 1 ( $P < 0,050$ ) y la tendencia ascendente de las constantes en la finca 2 para los dos inhibidores aplicados, resultando el  $\text{CaCl}_2$  4% estado de maduración 5 el de mejor comportamiento ( $P < 0,010$ ). Así mismo, se destacan los valores de  $K_i$  en AA 2% y  $\text{CaCl}_2$  4% estado de maduración 5 para las fincas 1 y 2 tuvieron valores más altos en la velocidad de la constante de inhibición.

El comportamiento de POD en los frutos provenientes de la finca 2, también confirmaron la cinética de inhibición de primer orden como se muestra a continuación:

**Gráfica 25.** Descenso logarítmico de AER

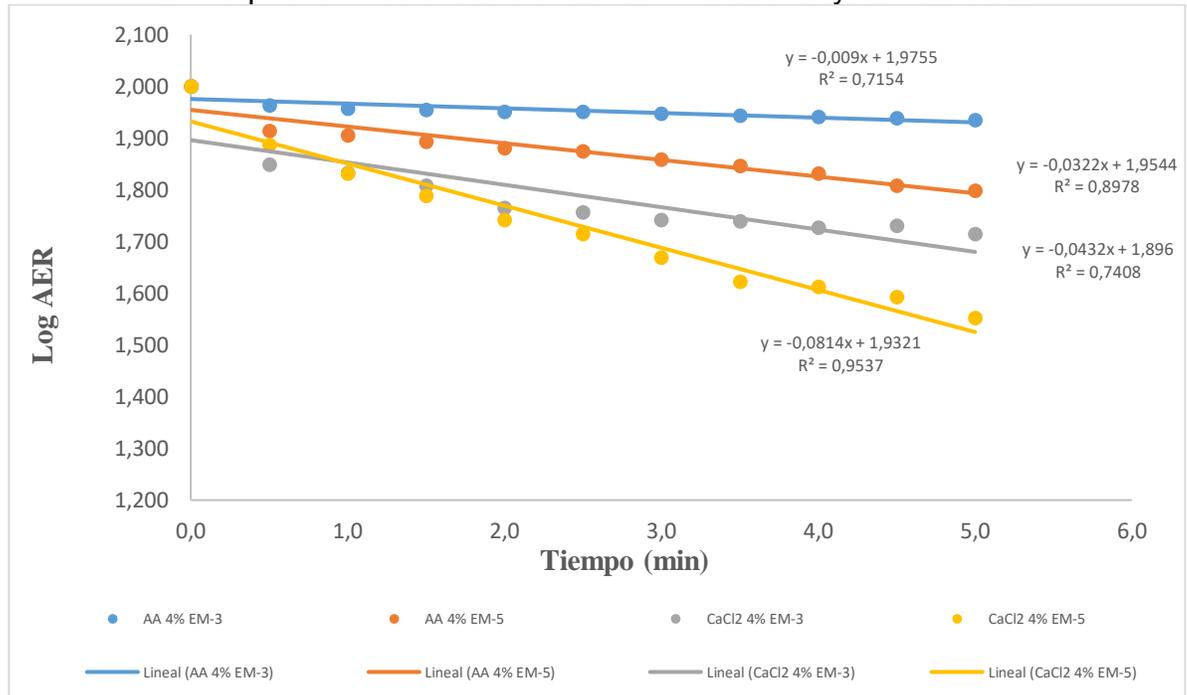


En la gráfica 25 se aprecia que el descenso logarítmico de AER fue más notable en POD tratada con  $\text{CaCl}_2$  4% y AA 4% en el estado de maduración 5, en contraste, el efecto de AA 4% en estado de maduración 3, es relativamente más bajo para la inhibición de POD, siguiendo una tendencia más lineal

En la gráfica 25 se observa un comportamiento cinético de primer orden para los frutos de la finca 2 destacándose el tratamiento  $\text{CaCl}_2$  4%.

De la misma manera que en la finca 1, el comportamiento de la gráfica de log AER versus Tiempo de reacción mostró una tendencia lineal, lo cual confirmó la cinética de primer orden de la inhibición enzimática

**Gráfica 26.** Comportamiento cinético primer orden en la inhibición de POD en frutos postratamiento estados de maduración 3 y 5 en finca 2.



### 5.6.6. Actividad de pectinmetilesterasa (PME) en los frutos (ua /g.h)

**Tabla 31.** Actividades de PME (ua/g.h) en frutos *Rubus glaucus* tratados con AA y CaCl<sub>2</sub>, en los estados de maduración 3 y 5, provenientes de las fincas 1 y 2.

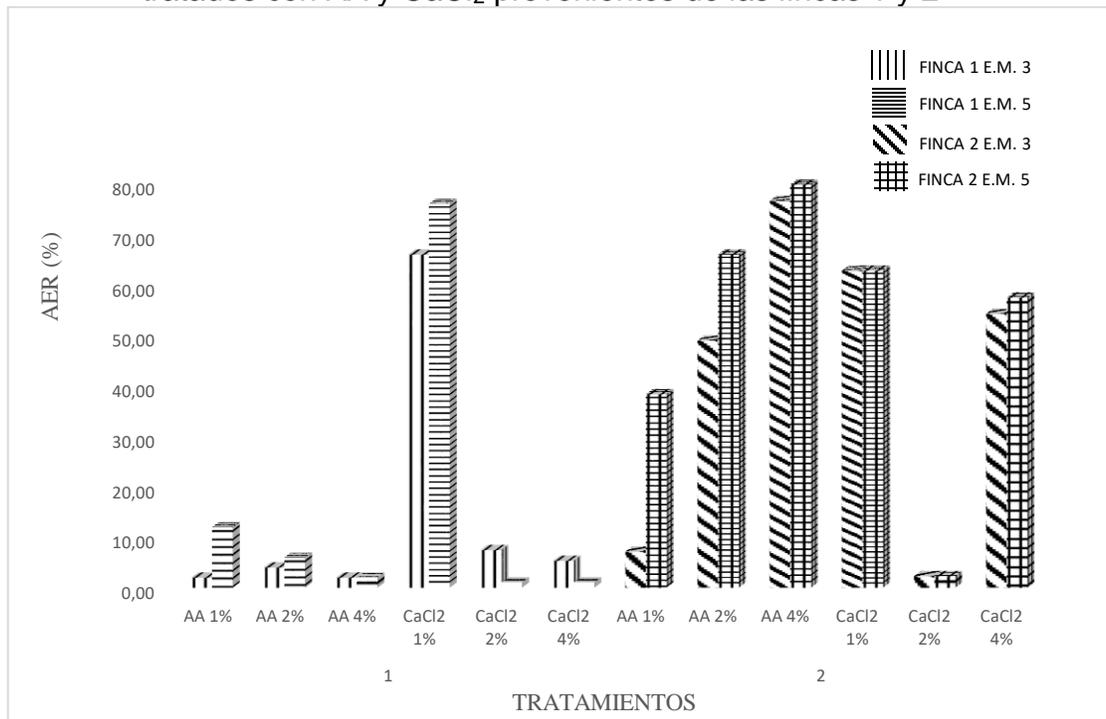
Finca	Tratamientos	EM 3	EM 5
1	AA 1%	0,001	0,006
	AA 2%	0,002	0,003
	AA 4%	0,001	0,001
	CaCl <sub>2</sub> 1%	0,062	0,038
	CaCl <sub>2</sub> 2%	0,007	0,001
	CaCl <sub>2</sub> 4%	0,005	0,001
2	AA 1%	0,001	0,036
	AA 2%	0,046	0,062
	AA 4%	0,072	0,075
	CaCl <sub>2</sub> 1%	0,059	0,059
	CaCl <sub>2</sub> 2%	0,001	0,001
	CaCl <sub>2</sub> 4%	0,051	0,054

La Tabla 31, muestra que las actividades de PME en los frutos fueron superiores en la etapa de maduración 5 comparados con los del estado de maduración 3, en las

dos fincas estudiadas. Es decir, posiblemente la acción de los inhibidores fue más efectiva en EM-2, en razón de los cambios bioquímicos de los frutos y la sensibilidad de los sitios activos de PME a cambios de pH y estructura de la membrana celular, por efecto de la precipitación del pectato cálcico.

Con el fin de estudiar más a fondo el comportamiento de los tratamientos, se calculó el porcentaje de actividad enzimática residual (%AER), el cual se muestra en la siguiente gráfica 27.

**Gráfica 27.** Actividades enzimáticas residuales de PME en frutos *Rubus glaucus* tratados con AA y  $\text{CaCl}_2$  provenientes de las fincas 1 y 2



La gráfica anterior, muestra que para los frutos provenientes de la finca 1, el ácido ascórbico 4% causó una actividad residual PME de 2 % en estados de maduración 3 y 5, es decir, causó un descenso de 98 % en la actividad catalítica de la enzima, mientras que  $\text{CaCl}_2$  4% produjo una AER del 5,32% en EM-3 y 1,06% en EM-5, generando un descenso de 94,68% y 98,94% en la RBE de PME; de la misma manera, en los frutos de la finca 2,  $\text{CaCl}_2$  del 2%, redujo en 97,73% la actividad catalítica de PME en los estados de maduración 3 y 5 respectivamente.

El análisis de varianza en doble vía mostró lo siguiente:

**Tabla 32.** Resultados ANOVA doble vía

Fuente de Variación	P-valor	Sign
Inhibidores	0,0092	**
Estados de maduración	0,6387	NS
Fincas	0,01375	*
Interacción	0,7583	NS

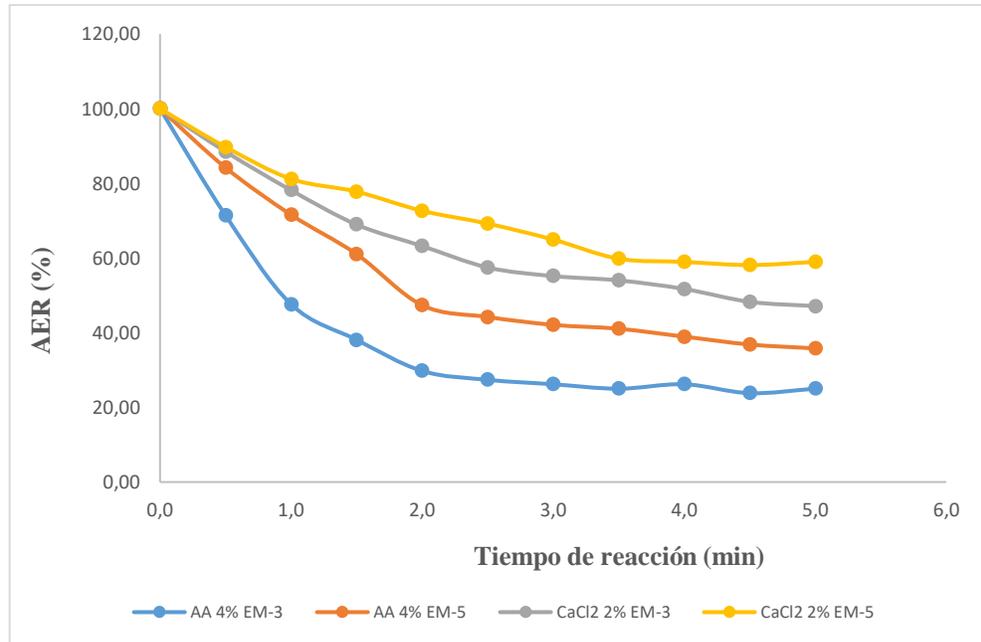
Observando la tabla 32, se deduce que los estados de maduración de los frutos *Rubus glaucus* no causaron efectos estadísticos ( $P > 0,050$ ) sobre la actividad de PME en frutos, mientras que los dos sistemas productivos causaron efectos estadísticos significativos ( $P < 0,050$ ) sobre la inhibición de PME, lo cual está ligado también al efecto estadístico altamente significativo ( $P < 0,010$ ) de los inhibidores ácido ascórbico y Cloruro de calcio; No obstante, no se presentó interacción significativa simultanea ( $P > 0,050$ ) de estos factores sobre la inhibición enzimática de PME.

#### 5.6.7. Estudio cinético de la inhibición de PME

Con el propósito de analizar detalladamente el comportamiento cinético de PME, se decidió graficar %AER versus el tiempo para los inhibidores que exhibieron mejor comportamiento, así se obtuvo lo siguiente:

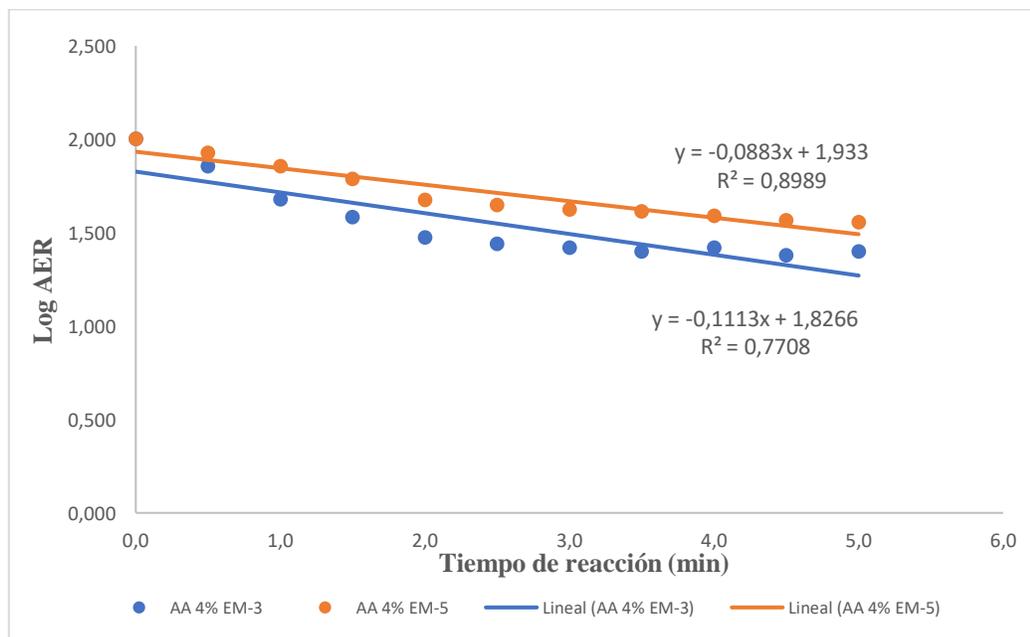
En la gráfica 28 se observa una reducción logarítmica de la AER por acción de los dos inhibidores químicos en sus respectivas concentraciones y estados de maduración 3 y 5, es decir la reducción logarítmica de la actividad residual en el tiempo, supone una cinética de primer orden ( $n=1$ ), advirtiéndose un descenso notorio de PME tratada con AA al 4%, estado de maduración 3 y ácido Ascórbico 4%, estado de maduración 5, hacia el final de la reacción bioquímica enzimática (RBE); dado este comportamiento cinético, se procedió a obtener logaritmos decimales de las actividades residuales y elaborar la gráfica cinética de Log AER versus tiempos de lectura en el espectrofotómetro UV-VIS, con el propósito de linealizar la anterior gráfica y encontrar así: Constante de Inhibición ( $K_i$ ) de la reacción, lo mismo que el tiempo residual decimal ( $D$ ) de la RBE inhibida

**Gráfica 28.** Comportamiento cinético de la AER de PME en frutos *Rubus glaucus*, estados de maduración 3 y 5, fincas 1 y 2.



Dichas gráficas obtenidas fueron las siguientes para los frutos provenientes de la finca 1:

**Gráfica 29.** Cinética de inhibición de primer orden para PME en frutos *Rubus glaucus* tratados con AA y CaCl<sub>2</sub>, EM 3 y 5, Finca 1.



El comportamiento lineal de los datos confirma la cinética de primer orden de la inhibición de PME, por lo que se procedió a calcular  $K_i$  mediante la expresión:

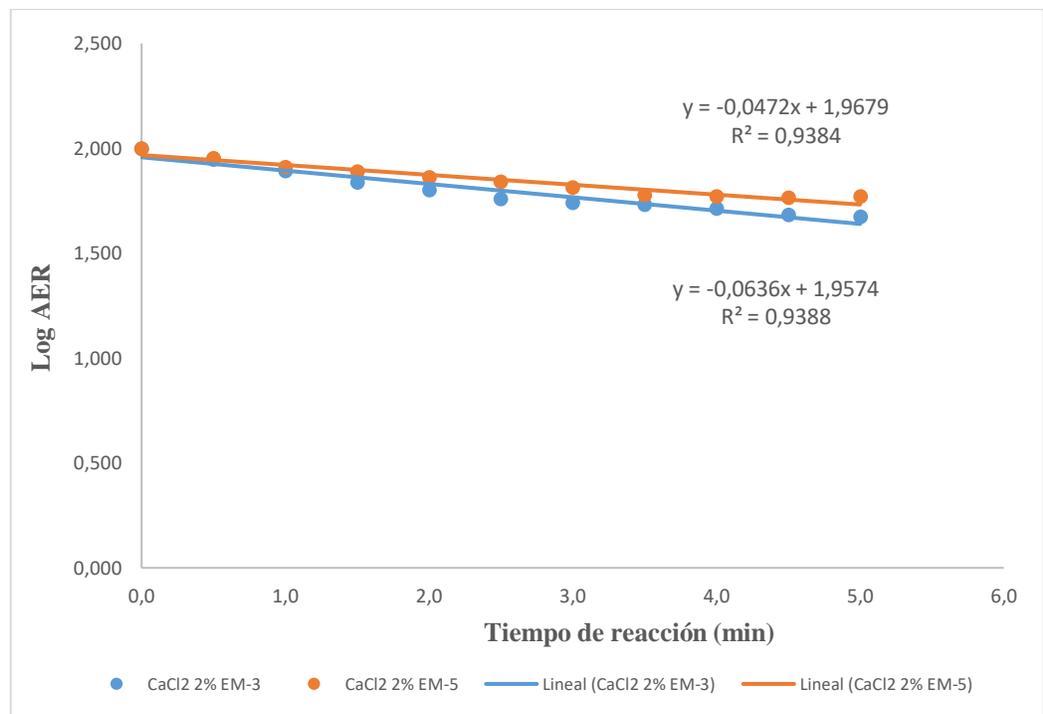
$$K_i = -2,303 \times \text{Pendiente de la recta}$$

Y el tiempo residual decimal así:

$$D = \frac{2,303}{K_i}$$

El comportamiento cinético de inhibición de primer orden para los frutos tratados en la finca 2, se muestra en la gráfica de abajo, la cual verifica la cinética del orden indicado, dados sus altos valores del coeficiente de correlación de Pearson encontrados en la regresión lineal de cada una:

**Gráfica 30.** Cinética de inhibición de primer orden para PME en frutos *Rubus glaucus*, tratados con  $\text{CaCl}_2$  4% en estados de maduración 3 y 5, finca 2



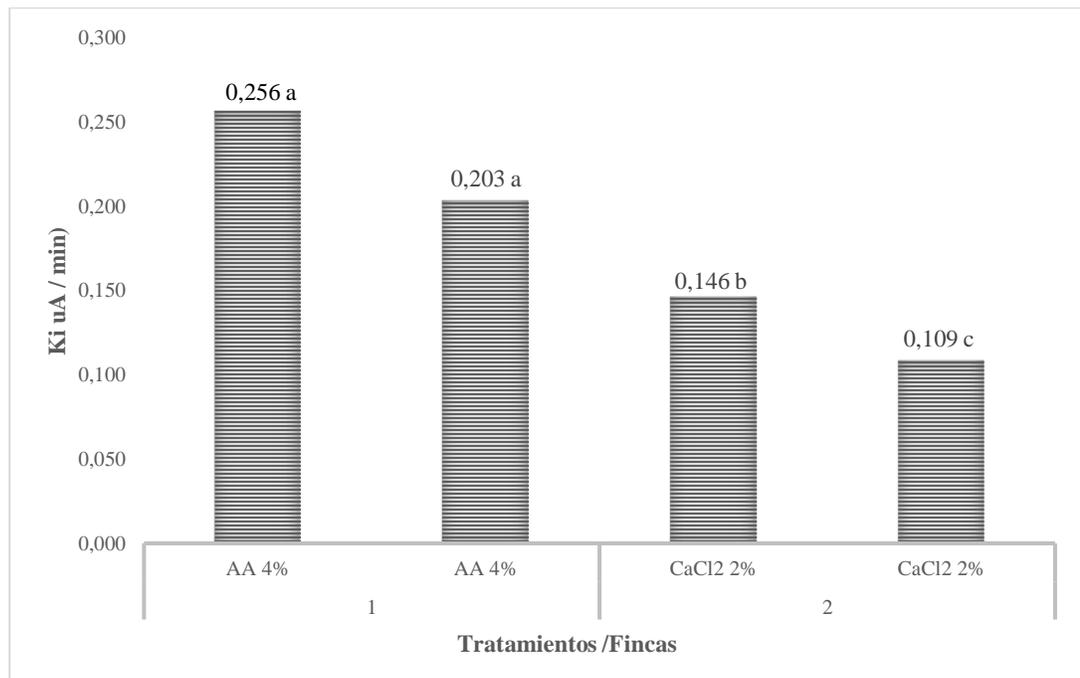
Los valores calculados para  $K_i$  y  $t_R$ , junto con el análisis estadístico se muestran en la tabla 33.

**Tabla 33.** Parámetros cinéticos de inhibición de PME en frutos *Rubus glaucus* por finca y estado de maduración

Finca	Inhibidores	EM	K <sub>i</sub> (uA/min)	D (min)	r	sign
1	AA 4%	3	0,256	8,985	0,878	*
	AA 4%	5	0,203	11,325	0,948	**
2	CaCl <sub>2</sub> 2%	3	0,146	15,723	0,969	**
	CaCl <sub>2</sub> 2%	5	0,109	21,186	0,969	**

De acuerdo a la tabla 33, el comportamiento cinético de la inhibición de PME mostró alta significancia estadística ( $P < 0,010$ ) en los tratamientos con AA del 4% estado de maduración 5 y CaCl<sub>2</sub> del 2% en frutos provenientes de la finca 2, estados de maduración 3 y 5, mientras que el efecto fue significativo ( $P < 0,050$ ) en el tratamiento de AA, de la finca 1, estado de maduración 3, así mismo se destaca que el valor más alto en la constante de velocidad de inhibición lo presentó el ácido ascórbico del 4% en el estado de maduración 3 y en frutos de la finca 1, en contraste, el menor valor se obtuvo en CaCl<sub>2</sub> del 2% estado de maduración 5, finca 2; lo anterior, se puede mostrar en la siguiente gráfica:

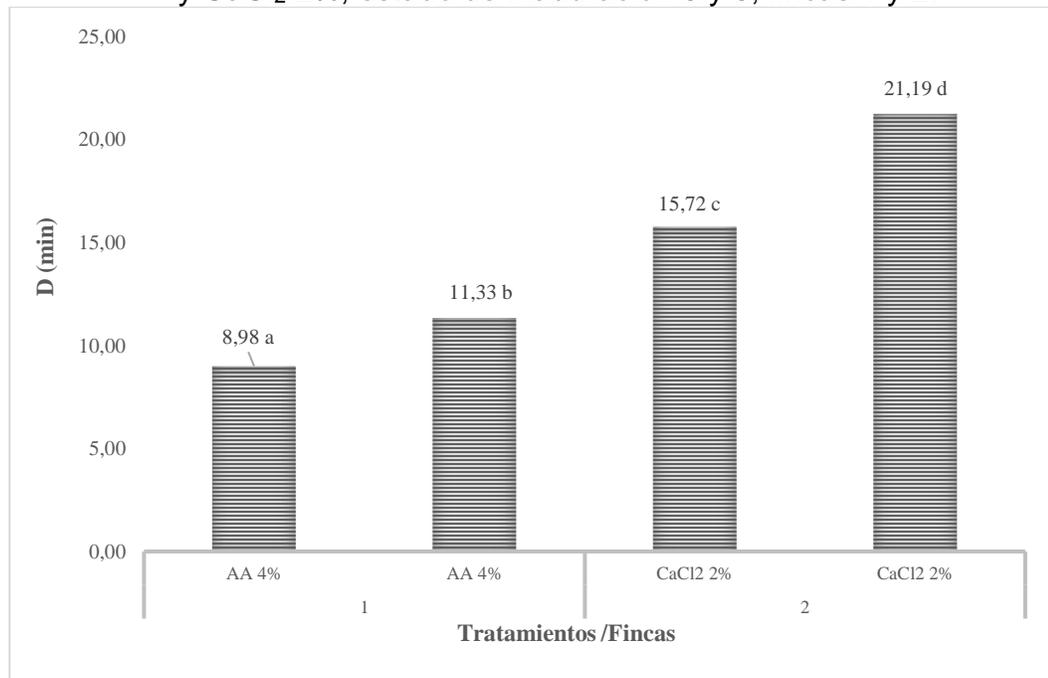
**Gráfica 31.** Constantes cinéticas de inhibición de PME en frutos tratados con AA 4% y CaCl<sub>2</sub> 2%, estados de maduración 3 y 5, Fincas 1 y 2.



La gráfica 31 muestra que los frutos tratados con ácido ascórbico del 4% en los dos estados de maduración y provenientes de la finca 1, exhibieron la mayor acción inhibitoria sobre la actividad de PME, mientras que el cloruro de calcio del 2% causó un menor efecto sobre la actividad catalítica de PME en los EM 3 y 5, en frutos tomados de la finca 2; así mismo como resultado de la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan, se destaca que los 4 valores de las constantes cinéticas de inhibición fueron diferentes estadísticamente ( $P > 0,050$ ).

Es importante analizar el tiempo residual decimal (D), el cual se define como el tiempo requerido para reducir la actividad de la enzima hasta un 10% de su valor original. Tales valores se muestran en la siguiente gráfica:

**Gráfica 32.** Tiempos de reducción decimal de PME en frutos tratados con AA 4% y  $\text{CaCl}_2$  2%, estado de maduración 3 y 5; fincas 1 y 2.



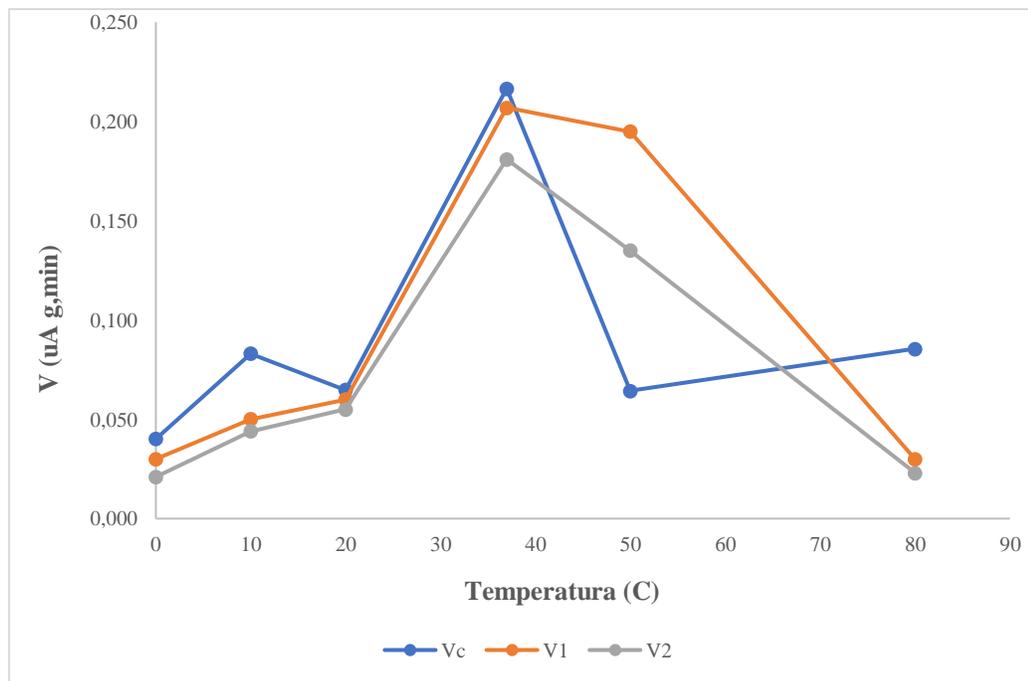
En esta gráfica se puede apreciar que en los frutos tratados con AA del 4% el tiempo residual decimal es menor, es decir, se requiere menos tiempo para reducir la actividad de PME hasta un 10% de su valor inicial, por lo tanto, su efecto es más significativo en la RBE de inhibición; opuesto a lo anterior, PME en los frutos tratados con cloruro de calcio requiere mayor tiempo para reducir su actividad, por lo que tardan más en hacer el efecto inhibitorio; los resultados del test de Duncan, señalan que los valores de D mostraron diferencias estadísticas ( $P < 0,050$ ) entre fincas y tratamientos.

### 5.6.8. Cinética de pectinmetilesterasa en extractos de frutos *Rubus glaucus*

Se tomaron extractos enzimáticos al azar de una de las fincas, provenientes de Frutos *Rubus glaucus* tratados con ácido ascórbico y Cloruro de calcio, y se realizó estudio cinético que se muestra a continuación:

### 5.6.9. Temperatura óptima de PME

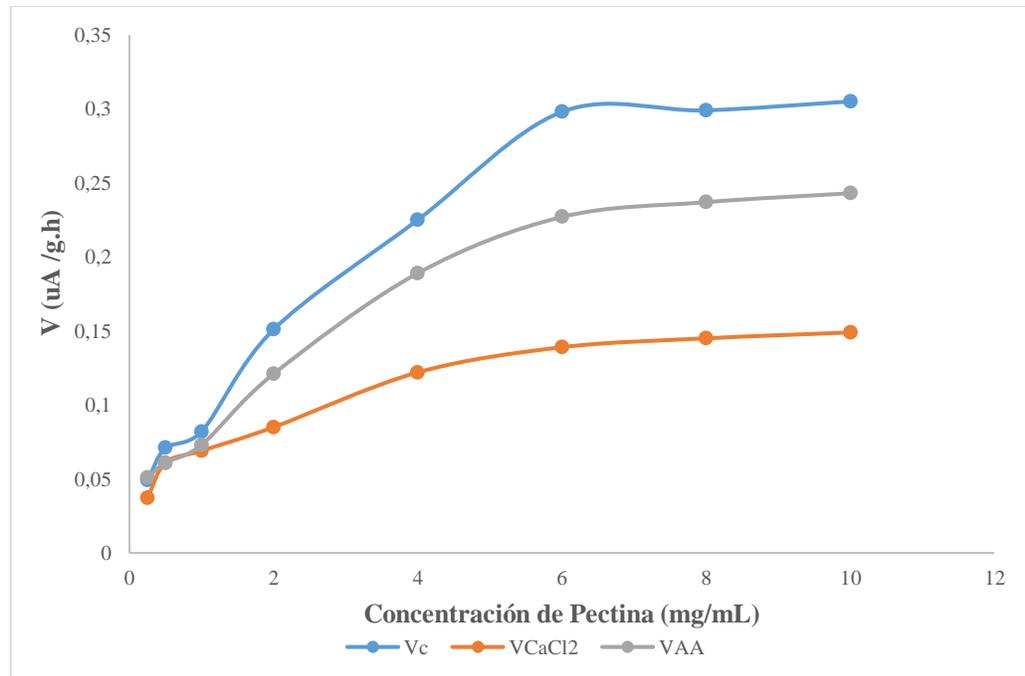
**Gráfica 33.** Comportamiento PME con 7 temperaturas.



La gráfica 33 describe el comportamiento de PME en función de 7 temperaturas trabajadas, en él se aprecia que la actividad máxima de la enzima estuvo cercana a 40 grados centígrados para las tres muestras estudiadas, así mismo los extractos tratados con los inhibidores químicos mostraron actividades de PME altas a temperaturas cercanas a 50° C, por lo tanto, es importante anotar que por debajo de estos valores la velocidad aumenta, siendo más notable el descenso en temperaturas superiores a 60°C, lo cual se puede explicar dado que cambios de temperatura causan ruptura de puentes de hidrógeno los cuales afectan la conformación tridimensional de la holoenzima; A partir de este valor de T<sub>máx</sub>, se decidió continuar con la cinética de CAT. Otros estudios como los de Sáenz, Téllez, Garza, Reyes, Contreras, & Cristóbal (2000), coinciden con los datos encontrados en este estudio, debido a que sus datos arrojan que la enzima PME es termoestable y su descenso en actividad enzimática comienza entre los 60 y 70° C.

Posteriormente, se buscó determinar el comportamiento Michaeliano de la enzima, mediante el estudio de la relación entre Velocidad y concentración de Pectina a  $T_{\text{máx}}$  de  $40^{\circ}\text{C}$  y pH de 7,0 los resultados se muestran a través de la gráfica 34.

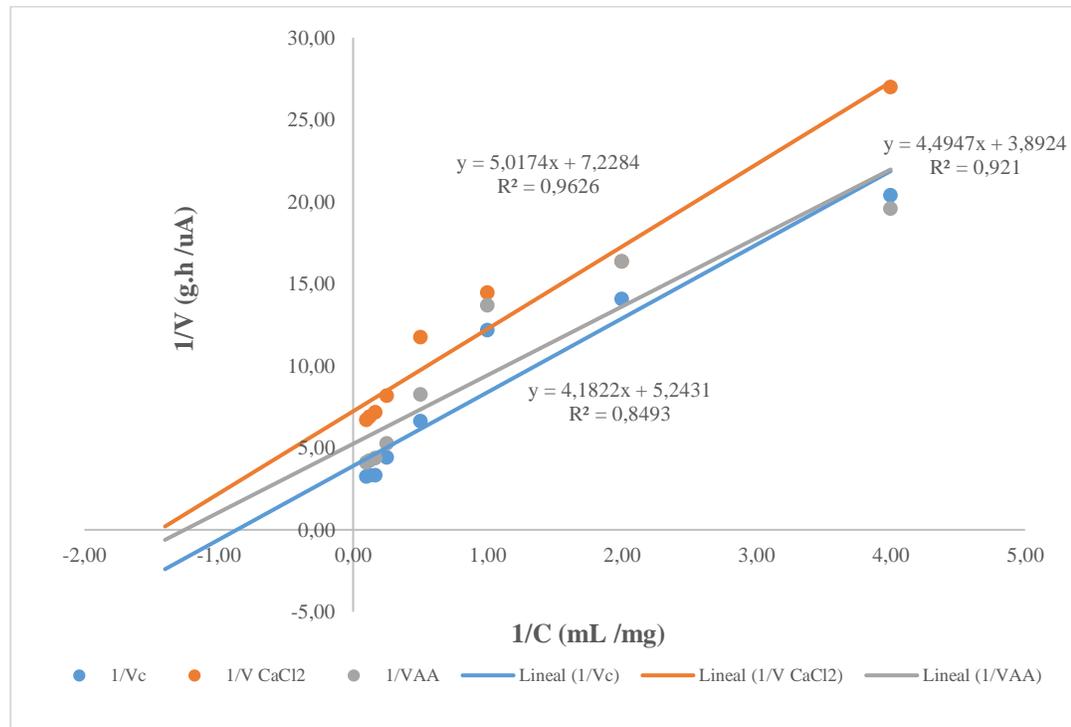
**Gráfica 34.** Cinética de Michaelis para PME en frutos control y tratados con inhibidores químicos AA y  $\text{CaCl}_2$



En la gráfica anterior, se observa que PME tuvo un comportamiento muy aproximado a la cinética de Michaelis-Menten en los dos extractos enzimáticos tratados con inhibidores químicos; se destaca que las dos curvas de tratamientos tuvieron un comportamiento cinético inferior al extracto control; ahora, PME tratada con ácido Ascórbico, tuvo mayor actividad catalítica que la enzima tratada con  $\text{CaCl}_2$ , es decir, presentó menos inhibición, mientras que la cinética de PME fue afectada por la sal cálcica, dado el efecto de este inhibidor sobre los centros activos de la enzima junto con la retención del calcio membranal formando pectato cálcico, el cual bloquea la acción enzimática de PEM; Con el fin de hallar los parámetros cinéticos de PEM en estos extractos enzimáticos de frutos *Rubus glaucus*, se procedió a tratar los datos cinéticos con el modelo de la doble recíproca de Linnewaver Burk, obteniéndose la siguiente gráfica:

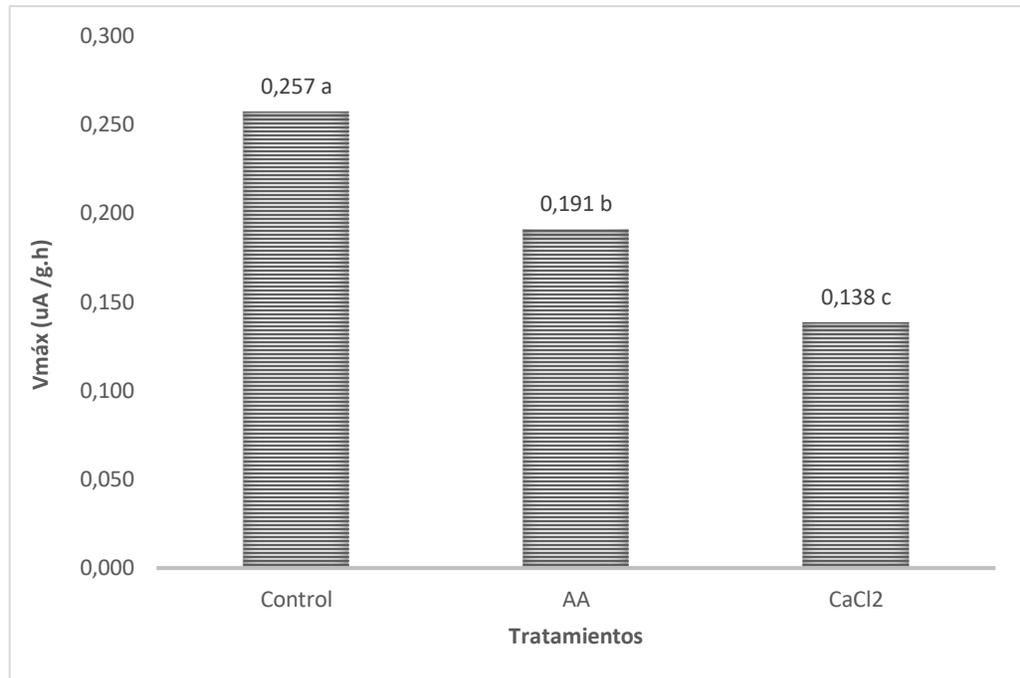
La doble recíproca de PME, demuestra que las sustancias químicas aplicados causaron una posible inhibición No competitiva sobre el sitio activo de la enzima, por lo tanto, afectaron la velocidad de PME, más no redujeron significativamente la constante de Michaelis, es decir su afinidad por el pectato.

**Gráfica 35.** Doble recíproca para PME en frutos *Rubus glaucus* control y tratados con Inhibidores químicos AA y CaCl<sub>2</sub>



Con base en las ecuaciones de regresión, se calcularon los parámetros cinéticos, obteniendo valores de velocidad máxima, según la gráfica 35

En esta gráfica se aprecia que la velocidad máxima de los PME en los dos extractos enzimáticos presentaron diferencias estadísticas significativas ( $P < 0,05$ ) según las letras que acompañan los promedios, siendo mayor con ácido ascórbico, el cual superó en 0,053 uA /g.h, a la velocidad máxima de PME tratada con cloruro de calcio; es decir, la actividad de la enzima con CaCl<sub>2</sub>, se redujo un 27,74 % por causa de la inhibición no competitiva de esta molécula; los valores de Km, son mostrados en la tabla 34.

**Gráfica 36.** Velocidad maxima de PEM en frutos tratados con AA y CaCl<sub>2</sub>**Tabla 34.** Km obtenidos en PME en frutos tratados

Inhibidores	Km (mg /mL)
Control	1,155 a
CaCl <sub>2</sub> 4%	0,798 b
AA 4%	0,694 b

Observando los valores de Km para PME en los extractos tratados con cloruro de calcio y ácido ascórbico, se puede apreciar que no presentaron diferencias estadísticas ( $P > 0,050$ ), es decir son similares, lo cual confirma la inhibición No competitiva del ácido ascórbico sobre la enzima, por lo tanto, se puede afirmar que esta molécula afectó el poder catalítico de pectinmetilesterasa, más no su afinidad de la PEM por el sustrato: pectina. Para los valores hallados de Km los reportes de la literatura son muy diversos debido a que las pectinas son de diferentes fuentes y los frutos son muy diversos, un ejemplo de esto es el valor reportado por: Ly, Van, Fachin, Verlent & Hendrickx (2002) en el que la Km de la PME del banano, reporta un valor de Km 0.151 mg/mL de pectina de manzana, este dato es muy bajo para los encontrados en este trabajo a pesar de haber usado inhibidores. Otros reportes arrojan valores de 17 mg/mL para pectina con DE y 0,7 mg/mL para pectina cítrica,

(Christensen, Nielson, Kreiberg, Rasmussen, Mikkelsen. 1998) datos que distan mucho de los encontrados en la presente investigación.

Con base en los parámetros cinéticos encontrados para PME, se hallaron las ecuaciones cinéticas de esta enzima para los frutos *Rubus glaucus* en los respectivos tratamientos, tal como se evidencia en la tabla siguiente:

**Tabla 35.** Ecuaciones cinéticas para PME con frutos tratados

Tratamiento	Ecuación Michaelis-Menten	Ecuación doble recíproca Linnewaver-Burk	r	%CD	Sign
Control	$V = \frac{0,257[PECT]}{1,155 + [PECT]}$	$\frac{1}{V} = 4,494 \times \frac{1}{[PECT]} + 3,892$	0,959	92,10	**
Ácido Ascórbico	$V = \frac{0,191[PECT]}{0,694 + [PECT]}$	$\frac{1}{V} = 4,182 \times \frac{1}{[PECT]} + 5,243$	0,921	84,93	*
CaCl <sub>2</sub>	$V = \frac{0,138[PECT]}{0,798 + [PECT]}$	$\frac{1}{V} = 5,017 \times \frac{1}{[PECT]} + 7,228$	0,962	96,26	**

En la tabla 35 se aprecia que el coeficiente de correlación de Pearson (r), mostró alta significancia estadística ( $P < 0,01$ ) para la actividad de PME en frutos controles y los tratados con Cloruro de calcio, mientras que fue significativo ( $P < 0,05$ ) para PME tratados con ácido ascórbico; lo que confirma el efecto inhibitorio de las sustancias utilizadas sobre la actividad de PEM, resaltando que, además, las cinéticas estudiadas cumplieron con los principios científicos de Michaelis-Menten;

Es importante señalar que las ecuaciones halladas en este experimento son confiables y predictivas para concentraciones de pectina desde 0,25 mg/mL hasta 10mg /mL, pero condicionadas a extractos de frutos *Rubus glaucus* tratados con ácido ascórbico y cloruro de calcio.

### 5.7. Análisis múltiple correlacional entre las actividades enzimáticas de los frutos *Rubus glaucus*, pertenecientes a los tratamientos experimentales

Con el fin de establecer la verdadera interrelación entre las actividades enzimáticas halladas en los frutos y la actividad ureásica de los suelos, se decidió aplicar un análisis de correlación múltiple basado en el coeficiente de correlación de Pearson(r); la tabla 38 muestra los resultados obtenidos con los valores de r.

**Tabla 36.** Correlación múltiple entre las actividades enzimáticas de los frutos (*Rubus Glaucus*)

Indicadores	AU	ACAT 3	ACAT 5	POD 3	POD 5	PME 3	PME 5
<b>AU</b>	1,0000						
<b>ACAT 3</b>	0,7131*	1,0000					
<b>ACAT 5</b>	0,3554	0,3501	1,0000				
<b>POD 3</b>	-0,3196	0,0052	0,0883	1,0000			
<b>POD 5</b>	-0,5859*	-0,1375	-0,3427	0,6574*	1,0000		
<b>PME 3</b>	-0,4525	-0,1938	-0,4602	0,1188	0,4466	1,0000	
<b>PME 5</b>	-0,7136*	-0,3726	-0,3445	0,1726	0,5247*	0,8880**	1

**correlación de Pearson**

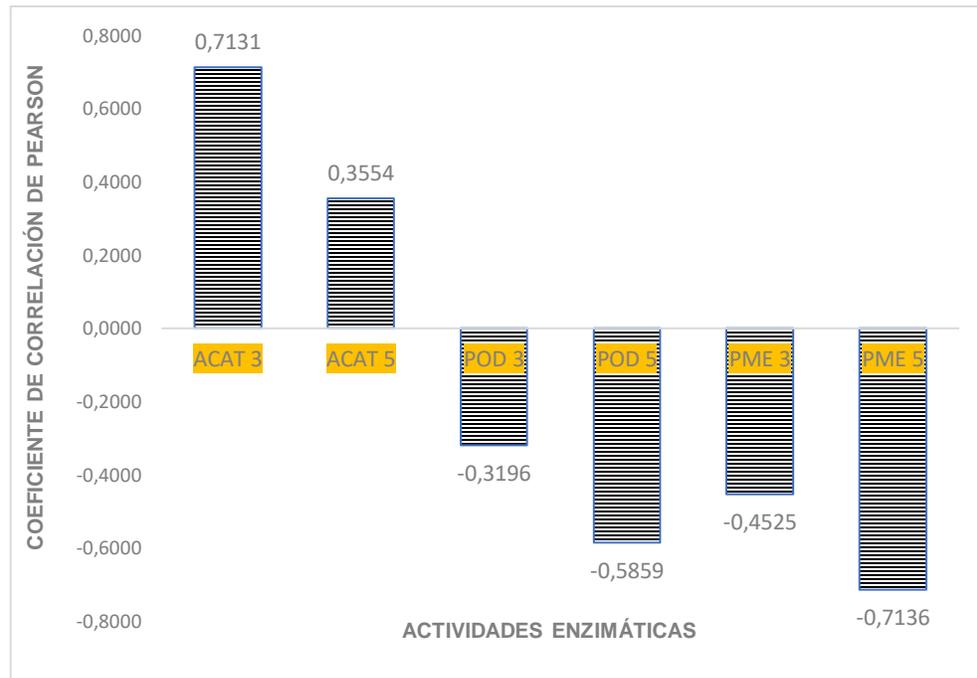
AU: Actividad Ureásica, ACAT: Actividad de catalasa frutos estados de maduración 3 y 5; POD: Actividad de Peroxidasa frutos estados de maduración 3 y 5; PME; Actividad de Pectinmetilesterasa para frutos con estados de maduración 3 y 5; \*( $P < 0,050$ ); \*\*( $P < 0,010$ ); NS( $P > 0,050$ )

Según lo observado en la tabla anterior, la actividad ureásica en suelos mostró una correlación lineal positiva y significativa ( $P < 0,050$ ) con la actividad de catalasa en frutos con estado de maduración 3, lo cual se puede explicar por la acción amidohidrolítica de la ureasa que genera un ciclamiento del nitrógeno no proteico presente en Amonio o Amoníaco; dicha biomolécula es movilizada por la savia del xilema hacia la parte superior de la planta, donde se incorpora a las reacciones bioquímicas del glutamato para producir aminoácidos, proteínas y la apoenzima con sus respectivos aminoácidos específicos que conforman la estructura de los sitios activos de la Catalasa; tal proceso induce mayor actividad de esta peróxido-reductasa, promoviendo mayor desdoblamiento del peróxido de hidrógeno en la célula vegetal.

Por otra parte, la actividad ureásica de suelos presentó una correlación lineal negativa y significativa ( $P < 0,050$ ), con las actividades de Peroxidasa y pectinmetilesterasa con frutos en estado de maduración 3 y 5; tal comportamiento se puede atribuir la acción inhibitoria de las sustancias químicas adicionadas a los frutos, es decir, a pesar de que la ureasa promueve la movilización de amonio por la planta, para producir aminoácidos constituyentes del centro activo de POD y PME, los inhibidores: cloruro de calcio y el ácido ascórbico afectan de cierta manera la dinámica del sitio activo de estas enzimas, lo que se traduce en un descenso de su actividad en los frutos.

En contraste con lo anterior, POD y PME exhibieron una correlación línea positiva y significativa ( $P < 0,050$ ) entre sus estados de maduración 3 y 5, lo cual está ligado a los procesos bioquímicos de maduración en la célula vegetal.

En general, el comportamiento del coeficiente de correlación de las actividades enzimáticas se resume en la siguiente gráfica:

**Gráfica 37.** Valores de correlación múltiple.

Se aprecia la alta correlación positiva ( $P < 0,050$ ), entre AU y ACAT 3, lo mismo que la alta correlación negativa ( $P < 0,050$ ), entre AU y PME 5

### Correlación entre los parámetros cinéticos de inhibición

A fin de estudiar en detalle, la correlación entre las constantes de velocidad de inhibición ( $K_i$ ) y los tiempos residuales de actividad enzimática, se aplicó la correlación lineal múltiple, encontrándose los resultados expuestos en la tabla 39.

**Tabla 37.** Correlación múltiple entre parámetros cinéticos

Indicadores	$K_i$ POD	Tr POD	$K_i$ PME	Tr PME
$K_i$ POD	1,0000			
Tr POD	-0,8061**	1,0000		
$K_i$ PME	-0,4744	0,0703	1,0000	
Tr PME	0,5337*	-0,1351	-0,9710**	1,0000

POD: Actividad de Polifenoloxidasas frutales en estados de maduración 3 y 5; PME; Actividad de Pectinmetilesterasa para frutales en estados de maduración 3 y 5; \*( $P < 0,050$ ); \*\*( $P < 0,010$ ); NS ( $P > 0,050$ ).

Recordando que  $K_i$  es la constante específica de velocidad de la RBE inhibida con cloruro de calcio o ácido ascórbico y  $t_r$  es el tiempo de vida residual de la enzima, es decir, el tiempo que tarda la enzima en llegar al 10% de su actividad, se observa en la tabla 39 que  $K_i$  de POD mostró una correlación lineal negativa altamente significativa ( $P < 0,010$ ) con su  $t_r$ , lo cual indica que a mayor velocidad específica de inhibición de la RBE, la enzima prolongará más el tiempo para alcanzar el 10% de su actividad residual; del mismo modo  $K_i$  PME y  $Tr$  PME, presentaron una fuerte correlación lineal negativa altamente significativa ( $P < 0,010$ ), lo cual deja entrever la acción eficaz de los inhibidores químicos sobre la actividad enzimática de los frutos.

## 6. Conclusiones

Según las propiedades fisicoquímicas de los suelos analizados se concluye que la finca 1 tiene condiciones más idóneas para el cultivo de la mora tanto en el pH como en MO, CO, y NT, propiedades que son limitantes para los cultivos de la *Rubus Glaucus* y que tienen valores que superan en más de una unidad a los valores presentados en la finca 2. En la finca ,1 se observa una acidez intercambiable de 0.120 mientras que en la finca 2 este valor es de 0,160 lo que produce una disminución en el pH y problemas de absorción de nutrientes por parte de la planta.

Las pruebas de valoración fisicoquímica indican que en ambas fincas todas las propiedades aumentaron sus valores conforme aumenta el estado de maduración, exceptuando el índice de acidez el cual desciende al avanzar la maduración en el fruto, esto se debe al empleo de ácidos orgánicos como sustrato en la respiración para sintetizar componentes nuevos en el proceso de maduración

Las propiedades fisicoquímicas en los frutos post tratamiento evidencian cambios en la firmeza siendo mayor después de tratar a los frutos con los inhibidores y disminuyendo al aumentar el estado de maduración. Los sólidos solubles totales aumentaron según el estado de maduración siendo mayor en estado 5. Para las variables peso, diámetro y pH no hay mayor diferencia entre pos y pretratamiento. Longitud, ATT y índice de maduración presentan altas variaciones. Según el tipo de finca se presentó diferencias por la calidad de suelo de cada una, el tipo de fertilizante utilizado influyo mucho en valores como el pH debido a las prácticas agrícolas y el tipo de fertilización que es más rico en la finca 1 que en la finca 2.

El coeficiente de variación en la actividad ureásica de suelos arroja mayor heterogeneidad en la finca 2 donde los valores son más dispersos y en la finca 1 la actividad ureásica es mayor por la calidad del suelo que es superior tanto en materia orgánica como un pH que se acerca más al ideal.

El estudio cinético permitió determinar la temperatura óptima para la ureasa que está en el rango de los 35 °C, su inactivación se produce a los 70°C y se completa a los 90 °C siendo una enzima termoestable. La máxima actividad de la ureasa se evidencia a pH 7, a valores más elevados de pH la velocidad desciende.

Los valores de Vmax se encuentra dentro de los rangos reportados por otros autores con un valor de 147 micro moles de amonio en una hora. Km presenta una alta afinidad por el sustrato el valor resultante es menor a lo reportado en la literatura.

El modelo cinético de Michaelis Menten representa adecuadamente el comportamiento de la ureasa teniendo una curva ideal para la representación de la curva Michaeliana

El ácido ascórbico y el CaCl<sub>2</sub> son efectivos en la inhibición de catalasa en el estado inicial de los frutos de mora (*Rubus glaucus*), en el caso estudiado estado de maduración 3.

El  $\text{CaCl}_2$  disminuye la catálisis de la enzima catalasa en mayor proporción que el ácido ascórbico, pero no reduce su afinidad por la peróxido-reductasa

La mayor afinidad de la catalasa por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  presentado en el suelo de la finca 1 concuerda con su menor acidez y mayor porcentaje de materia orgánica, que la presentada en la finca 2

Se observó mayor inhibición de la POD en los frutos de las dos fincas en estado de maduración 5 al ser sometidos a los tratamientos con el ácido ascórbico al 2% y el cloruro de calcio al 4%, mientras que en los frutos de la finca 2 se destacó la inhibición causada por el tratamiento del cloruro de calcio 4% al presentar una mayor constante de velocidad de inhibición.

Las cinéticas presentadas en la inhibición enzimática se confirmaron que fueron de primer orden para las dos fincas.

Se encontró que la actividad de la PME fue mayor en el estado de maduración 3 y menor en 5 lo que indica la efectiva acción de los inhibidores al detener progresivamente la actividad de la PME, la cual en condiciones normales tiende a aumentar conforme se produce la maduración del fruto.

La actividad enzimática residual muestra un descenso del 98% para la actividad catalítica de la enzima con la acción del ácido ascórbico, en los estados de maduración 3 y 5, este comportamiento se ve más marcado en la finca 1, mientras la finca 2 presenta una mayor inhibición con el cloruro de calcio al 2 %, quien redujo la actividad en un 97%, en ambos estados de maduración.

La velocidad de la PME fue mayor a la temperatura de 40°C para las muestras estudiadas incluyendo el testigo al incrementar la temperatura a 60°C se produce la reducción de la velocidad enzimática, exceptuando el testigo que mantuvo una velocidad más constante a estas temperaturas.

El comportamiento cinético de la inhibición de PME evidencia que el AA al 4% y  $\text{CaCl}_2$  al 2% en la finca 1 mostraron una alta inhibición, la velocidad de la constante de inhibición tuvo un valor más alto para el ácido ascórbico, en la finca 2 el ácido ascórbico 4% fue el inhibidor más efectivo con un alto grado de inhibición en los frutos con estado de maduración 3.

Se concluye que los inhibidores ácido ascórbico y cloruro de calcio son efectivos para reducir la actividad enzimática de la PME, POD Y CAT y por ende aumentar la resistencia en los frutos de mora disminuyendo los daños causados por la actividad enzimática a nivel de pared celular y reacción con fenoles. Según el análisis estadístico hay una relación entre la ureasa y las actividades de las enzimas, para PME y CAT se producen valores de 0.228 y 0.219 respectivamente en la finca 1, mientras que la finca 2 los valores de PME y CAT son 0.124 y 0.138. La actividad en POD también es más alta en la finca 1 que en la finca 2. Finalmente, estos resultados pueden estar relacionados con la calidad de suelo, teniendo la finca 1 mayor actividad ureásica que la finca 2 y más disponibilidad de MO y CO.

Se encontró una correlación directa entre la actividad ureásica en el suelo y la actividad de la catalasa en frutos de mora en estado de maduración 3, debido a la alta producción de peróxido de hidrógeno al presentarse un mayor metabolismo en este estado.

La correlación negativa encontrada entre la actividad ureásica del suelo con las actividades de PME y POD de los frutos demuestra una acción inhibitoria producida por el  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$  por lo que se expone la eficacia de estas sustancias para detener el desarrollo de estas enzimas y prolongar la vida útil del fruto.

## 7. Recomendaciones

Analizar el impacto que tengan otras formas de fertilizar los cultivos de mora frente a la actividad ureásica en el suelo, buscando el mejor resultado según la clase de suelo a utilizar para el cultivo de la mora

Es importante realizar estudios complementarios para determinar el efecto de los inhibidores sobre las propiedades organolépticas de los frutos de mora, a partir de las condiciones planteadas en este trabajo.

Determinar el efecto o incidencia que tiene sobre los frutos de mora la aplicación de riego que contengan diferentes concentraciones de  $\text{CaCl}_2$

Establecer los días de preservación de la mora en el anaquel al someterlos a los tratamientos con los inhibidores  $\text{CaCl}_2$  y Ácido ascórbico.

Estudiar el efecto de los inhibidores  $\text{CaCl}_2$  y AA en la polifenoloxidasas, enzimas de similar actividad que la POD precursoras ambas de reacciones de pardeamiento.

Realizar estudios donde se evalué la combinación de sistemas de preservación ya estudiadas con buenos resultados como: refrigeración, empacados al vacío, recubrimientos comestibles, deshidratación

Realizar estudios sobre la influencia de otros químicos aplicados al cultivo de mora como son: insecticidas, fungicidas, abonos foliares y herbicidas, sobre la actividad enzimática en los frutos.

## Bibliografía

- Abbott, J., & Buta, G. (s.f.). Effect of antibrowning treatment on color and firmness of freshcut pears. *Journal of Food Quality*(25), 333-341. Obtenido de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1745-4557.2002.tb01029.x>
- Alcaldía de Pasca. (2017). *Alcaldia de Pasca*. Obtenido de [http://www.pasca-cundinamarca.gov.co/informacion\\_general.shtml](http://www.pasca-cundinamarca.gov.co/informacion_general.shtml)
- Alzáte, A., Mayor, N., & Montoya, S. (2010). Influencia del manejo agronómico, condiciones edáficas y climáticas sobre las propiedades fisicoquímicas y fisiológicas de la mora (*Rubus glaucus* Benth) en dos zonas de la región centro sur del departamento de Caldas. *Agronomía*, 18(2), 37-46.
- Ayala, L., Valenzuela, C., & Bohorquez, Y. (2013). Caracterización fisicoquímica de mora de catilla (*Rubus glaucus* Benth) en seis estados de madurez. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 11(2), 10-18.
- Azcón, J., & Talón, M. (2008). *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid: Mc Graw-Hill. Obtenido de <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FundamentosdeFisiologiaVegetal2008Azcon..pdf>
- Baquero, L., Castro, J., & Narváez, C. (2005). Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*): Maduración y senescencia. *Acta Biológica Colombiana*, 10(2), 49-59.

- Beccacece, S., Galli, N., Giuntoli, G., Zanotti, E., & Pioli, R. (2013). *Actividad de peroxidasa inducida en hojas de triticum aestivum expuestas a stress de origen biótico*. Obtenido de [https://www.researchgate.net/publication/272943705\\_Actividad\\_de\\_peroxidasa\\_inducida\\_en\\_hojas\\_de\\_Triticum\\_aestivum\\_expuestas\\_a\\_stress\\_de\\_origen\\_biotico](https://www.researchgate.net/publication/272943705_Actividad_de_peroxidasa_inducida_en_hojas_de_Triticum_aestivum_expuestas_a_stress_de_origen_biotico)
- Berg, J., Tymoczko, J., & Stryer, L. (2007). *Bioquímica*. Barcelona, España: Reverté. Obtenido de <https://books.google.com.co/books?id=HRr4MNH2YssC&pg=PA225&dq=tipos+de+inhibici%C3%B3n+enzimatica&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjxh4zH28bhAhVCs1kKHTD4BF8Q6AEISDAG#v=onepage&q=tipos%20de%20inhibici%C3%B3n%20enzimatica&f=false>
- Bohórquez, S., & Úsuga, S. (2017). *Sistema de conservación para la mora Castilla en el departamento de Antioquia*. Universidad San Buenaventura, Bello.
- Bolívar, G. (2014). Cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>): estructura, usos y propiedades. Obtenido de <https://www.lifeder.com/cloruro-calcio/>
- Borie, F., & Fuentealba, R. (1982). Bioquímica de suelos derivados de cenizas volcánicas. II Actividad ureasica. *Agricultora tecnica*, 42(2), 135-142. Obtenido de [http://www.chileanjar.cl/files/V42I2A06\\_es.pdf](http://www.chileanjar.cl/files/V42I2A06_es.pdf)
- Boyce, S., & Tipton, K. (2001). *Enzyme Classification and Nomenclature*. doi:10.1038/npg.els.0000710

- Campbell, A., & Reece, J. (2007). *Biblioteca Salamandra*. Obtenido de <http://biblioteca.salamandra.edu.co/libros/Campbell%20reece%20biologia.pdf>
- Carabalí, I., Narváez, C., & Restrepo, L. (2009). Extracción y medida de actividad de pectinmetilesterasa en pitaya amarilla (*Acanthocereus pitajaya*), como enzima relacionada con el ablandamiento. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/rt/printFriendly/10569/36924>
- Cardona, W. (2017). Requerimientos nutricionales (nitrógeno, fósforo, potasio y calcio) en etapa vegetativa y reproductiva de un cultivo de mora (*Rubus glaucus* Benth), ubicado en el municipio de Sylvania (Cundinamarca). Obtenido de <http://bdigital.unal.edu.co/56649/1/1053794741.2017.pdf>
- Carter, E., Flugga, N., Boer, J., Mulrooney, S., & Hausinger, R. (2009). Interplay of metal ions and urease. *Metallomics*, 1(3). doi:10.1039/b903311d
- Cruz, M., & Garcia, A. (2013). *Obtencion de colorante natural a partir de dos variedades de mora (Rubus glaucus) mediante la utilización de dos métodos de extracción y dos tiempos de deshidratacion y su aplicación en productos lácteos*. Guaranda, Ecuador. Obtenido de <http://dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/845/1/015.pdf>
- DANE, SIPSA. (Noviembre de 2013). El cultivo de la mora de Castilla (*Rubus Glaucus* Benth) frutal de clima frío moderado, con propiedades curativas para la salud humana. *Boletín mensual*(17).

- Dash , M., Miskra, P., Mohanty, R., & Bhatt, N. (1981). Effects of specific conductance and temperature on urease activity in some Indian Soils. *Soil Biol. Biochem*, 13, 73-74.
- Denoya, G., Ardanaz, M., Sancho, A., Benitez, C., Gonzalez, C., & Guidi, S. (2012). Efecto de la aplicación de tratamientos combinados de aditivos sobre la inhibición del pardeamiento enzimático en manzanas cv. Granny Smith mínimamente procesadas. *Revista de investigaciones Agropecuarias*, 38(3), 263-267. Obtenido de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1669-23142012000300010](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-23142012000300010)
- Díaz, A., Cayón, G., & Mira, J. (2007). Metabolismo del calcio y su relación con la "Mancha de madurez" del fruto del banano. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 25(2), 280-287. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/14131>
- Espinal, M. (2010). *Capacidad antioxidante y ablandamiento de la guayaba Palmira ICA I (Psidium guajava)*. Bogotá D.C.: Universidad Nacional de Colombia. Obtenido de <http://bdigital.unal.edu.co/2783/1/194761.2010.pdf>
- Estrada, M. (2005). Manejo y procesamiento de la gallinaza. *Revista Lasallista de Investigación*, 2. Obtenido de <https://www.redalyc.org/html/695/69520108/>
- García, C., Gil, F., Hernández, T., & Trasar, C. (2003). *Técnicas de análisis de parámetros Bioquímicos en suelos, Medidas de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. Madrid, España: Ediciones Mundi prensa.

- García, C., Giraldo, G., Hurtado, H., & Mendivil, C. (2006). Cinética enzimática de la polifenoloxidasa del banano Gros Michel en diferentes estados de maduración. *Vitae, 13*(2).
- García, C., Hernández, M., & Trazar, C. (2003). Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- García, D. (2008). Aplicación de la tecnología IV gama en frutos de melón (*Cucumis melo*) y piña (*Ananas comosus*). *Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha, 9*.  
Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/813/81311226006.pdf>
- Gobernación del Huila: Secretaria de Agricultura y Minería. (s.f.). *Producción limpia cultivo de la mora (Rubus glaucus) en el departamento del Huila*. Neiva.
- Granados, J. (2014). *Bioquímica metabólica*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
- Gturismo. (2008). Turismo ecológico y ambiental. Obtenido de <http://gturismoecologicoydeaventura.blogspot.com/2008/02/parque-san-rafael.html>
- Guerrero, C. (2009). Inhibición de la actividad enzimática de la polifenoloxidasa extraída del banano (Cavendish valery) mediante sistemas bifásicos acuosos con isoespintanol y ácido ascórbico. Medellín. Obtenido de <http://bdigital.unal.edu.co/1820/1/98380674.2009.pdf>

- Guidi, A., & Arandia, M. (2010). Obtención de la pectina a partir de la cáscara de maracuyá mediante hidrólisis ácida. *Journal Boliviano de Ciencias*, 7(21). Obtenido de [http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2075-89362010000300014&lng=es&nrm=iso3](http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2075-89362010000300014&lng=es&nrm=iso3)
- Hagerman, A., & Austin, P. (1986). Continuous Spectrophotometric assay for plant Pectin methyl esterase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(6), 440-444.
- Hemeda, H., & Klein, B. (1990). effects of Naturally Occurring Antioxidants on Peroxidase Activity of Vegetable Extracts. *Journal of Food Science*. doi:10.1111/j.1365-2621.1990.tb06048.x
- Henriquez, C., Uribe, L., Valenciano, A., & Nogales, R. (2014). Actividad enzimática del suelo deshidrogenasa, B-glucosidasa, fosfatasa y ureasa bajo diferentes cultivos. *Agronomía Costarricense*, 38(1), 43-54.
- ICONTEC. (1997). NTC 4106.
- Jeanette, R., Croguennec, T., Schuck, P., & Brule, G. (2013). *Ciencia de los Alimentos*. Madrid, España: Acribia S.A.
- Kehrer, J., Robertson, J., & Smith, C. (2018). Free radicals and reactive oxygen species. *Comprehensive toxicology*, 1, 262-294. doi:10.1016/B978-0-08-046884-6.00114-7
- Krajewska, B. (July de 2009). Ureases I. functional catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 59(1-3), 9-21. doi:10.1016/j.molcatb.2009.01.003

- Lai, C., & Tabatabai, M. (1992). Kinetic parameters of immobilized urease. *Soil Biology & Biochemistry*, 24(3), 225-228.
- Luna, I., & Barrett, D. (2000). Comparison of calcium chloride and calcium lactate effectiveness in maintaining shelf stability and quality of fresh-cut cantaloupes. *Postharvest Biology and Technology*, 19(1), 61-72. doi:10.1016/S0925-5214(00)00079-X
- Maca, M., Osorio, O., & Mejia, d. (2013). Inactivación Térmica de Pectinmetilesterasa en Tomate de. *Información Tecnológica*, 24(3), 41-50. doi:10.4067/S0718-07642013000300006
- Mederos, Y., & Hormaza, J. (2008). Consideraciones generales en la obtención, caracterización e identificación de los oligogalacturónidos. *Cultivos tropicales*, 29(1), 83-90. Obtenido de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362008000100014&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362008000100014&lng=es&tlng=es).
- Menéndez, O., Lozano , S., Ocampo, M., Bermúdez, K., Martínez, A., & Jiménez, A. (2006). Cambios en la actividad de  $\alpha$ -amilasa, pectinmetilesterasa y poligalacturonasa durante la maduración del maracuyá amarillo (*Passiflora edulis* Var. *Flavicarpa degener*). *INCI*, 31(10).

- Ministerio de Agricultura. (2016). *Cadena de Mora. Indicadores e Instrumentos*. Obtenido de <https://sioc.minagricultura.gov.co/Mora/Documentos/002%20-%20Cifras%20Sectoriales/Cifras%20Sectoriales%20-%202016%20Octubre%20Mora.pptx>
- Montealegre, L., & Díaz, J. (2014). Efecto de la aspersión localizada de calcio sobre la textura y vida útil de frutos de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth). Obtenido de <http://repository.ut.edu.co/handle/001/1116>
- Montes, R., Parent, L., Amorim, D., Rozane, D., Natale, W., & Modesto, V. (2016). Nitrogen and Potassium Fertilization in a Guava Orchard Evaluated for Five Cycles: Effects on the Plant and on Production. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo*, 40(e0140532). doi: 10.1590/18069657rbc20140532
- Moreno, A. (s.f.). *Cinética Química*. Obtenido de [http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CINETICAQUIMICAActualizado\\_19881.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/CINETICAQUIMICAActualizado_19881.pdf)
- Nannipieri, P., Muccini, L., & Ciardi, C. (1983). Microbial biomass and enzyme activities; production and persistence. *Soil Biol. Biochem*, 15(6), 679-685.
- Navarro, L., & Villalobos, L. (2018). Evaluación de tres fórmulas de nitrógeno a dos altitudes. Impacto de las características agronómicas del forraje Ryegrass anual (*Lolium multiflorum*) variedad Jumbo. *Horizonte Lechero*, 10(7), 68-69.

Núcleo Ambiental S.A.S. . (2015). Manual Mora, Cámara de Comercio de Bogotá.

Obtenido de

<https://bibliotecadigital.ccb.org.co/bitstream/handle/11520/14319/Mora.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Núñez, P., Jara, A., Sandoval, Y., Demanet, R., & Mora, M. (2012). Biomasa microbiana y actividad ureasa del suelo en una pradera permanente pastoreada de Chile. *Ciencia del suelo*, 30(2). Obtenido de

[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1850-20672012000200002](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1850-20672012000200002)

Ochoa, V., Hinojosa, B., Gomez-Muñoz, B., & García-Ruiz, R. (2007). Actividades enzimáticas como indicadores de calidad del suelo en agroecosistemas ecológicos. *Iniciación a la investigación (revista electrónica)*, 2(1).

Olvera, A., Espino, M., & Pacheco, J. (2012). Caracterización de suelos en una localidad tipo que alberga cactáceas prioritarias para su conservación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*(4), 672-678. Obtenido de

[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-09342012000900009](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342012000900009)

Open Stax. (2015). *Enzymes*. Rice University. Obtenido de

[https://cnx.org/contents/GFy\\_h8cu@9.85:MnC6GuJi@7/Enzymes](https://cnx.org/contents/GFy_h8cu@9.85:MnC6GuJi@7/Enzymes)

- Ortiz, L., & Rincón, J. (2010). *Evaluación de la actividad enzimática de pectinmetlesterasa (PME), peroxidasa (POD) y polifenoloxidasa (PFO) durante la maduración y senescencia del fruto de mora (Rubus glaucus) en la región del Sumapaz.* Fusagasugá, Colombia.
- Osorio, N. (2012). Toma de muestras de suelos para evaluar la fertilidad del suelo. *Manejo Integral del Suelo y Nutrición Vegetal*, 1(1), 1-4. Obtenido de <http://www.unalmed.edu.co/~esgeocien/documentos/muestreo.pdf>
- Pardo, G., & Méndez, S. (2017). Evaluación del efecto del ácido ascórbico como inhibidor del pardeamiento enzimático en el fruto de anona pulpa rosada (*Annona diversifolia*) y en la cinética de la polifenoloxidasa. Obtenido de <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/14627/1/13101639.pdf>
- Peña, S. (2004). Mecanismo de acción de las enzimas. Obtenido de <http://www.biologia.edu.ar/metabolismo/enzimas.htm>
- Pérez, L. (2003). *Aplicación de métodos combinados para el control del desarrollo del pardeamiento enzimático en pera (variedad Blanquilla) mínimamente procesada.* Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/2663/tesisUPV1784.pdf>
- Pérez, M., Del Rio, M., & Rojas, C. (2008). recubrimientos comestibles en frutas y hortalizas. *Horticom*, 11(207), 54-57. Obtenido de <http://www.horticom.com/pd/imagenes/69/831/69831.pdf>

PROJAR. (s.f.). Abono mineral 15-15-15. Obtenido de

[https://www.projar.es/productos/productos-hortofructicultura-jardineria/fertilizantes/abonos\\_minerales/abonos-compuestos/abono-mineral-15-15-15/](https://www.projar.es/productos/productos-hortofructicultura-jardineria/fertilizantes/abonos_minerales/abonos-compuestos/abono-mineral-15-15-15/)

Ramirez, J., Aristizábal, I., & Restrepo, J. (2013). Conservación de mora de Castilla

mediante la aplicación de un recubrimiento comestible de gel de mucílago de penca de sábila. *Vitae*, 20(3), 172-183.

Reina, C. (1998). manejo poscosecha y evaluación de la calidad para la mora de Castilla

(*Rubus glaucus*) que se comercializa en la ciudad de Neiva. Obtenido de <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/4705/1/Manejo%20poscosecha%20y%20evaluacion%20de%20la%20calidad%20de%20la%20mora.pdf>

Rincón, A., & Martínez, E. (2015). Funciones del calcio en la calidad poscosecha de frutas y hortalizas: una revisión. *Alimentos Hoy*, 23(34). Obtenido de

<http://www.alimentoshoy.acta.org.co/index.php/hoy/article/view/301>

Rivera, Á., Restrepo, P., & Narváez, C. (2004). Polifenoloxidasa y peroxidasa de pulpa de

uva caimaroná (*Pourouma cecropiifolia*). *Revista Colombiana de química*, 33(1), 67-66. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/article/view/766>

Rodríguez, L., López, L., & García, M. (2010). Determinación de la composición química

y actividad antioxidante en distintos estados de madurez de frutas de consumo habitual en Colombia: mora (*Rubus glaucus* B.), maracuyá (*Passiflora edulis* S.), gauyaba (*Psidium guajava* L.) y papayuela (*Carica cundina*). *Alimentos Hoy*, 19(21).

Obtenido de

[https://www.researchgate.net/publication/267918189\\_DETERMINACION\\_DE\\_LA\\_COMPOSICION\\_QUIMICA\\_Y\\_ACTIVIDAD\\_ANTIOXIDANTE\\_EN\\_DISTINTOS\\_ESTADOS\\_DE\\_MADUREZ\\_DE\\_FRUTAS\\_DE\\_CONSUMO\\_HABITUAL\\_EN\\_COLOMBIA](https://www.researchgate.net/publication/267918189_DETERMINACION_DE_LA_COMPOSICION_QUIMICA_Y_ACTIVIDAD_ANTIOXIDANTE_EN_DISTINTOS_ESTADOS_DE_MADUREZ_DE_FRUTAS_DE_CONSUMO_HABITUAL_EN_COLOMBIA)

Rutz, J., Voss, G., & Zambiazzi, R. (2012). Influence of the Degree of Maturation on the Bioactive Compounds in Blackberry (*Rubus* spp.) cv. Tupy. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 1453-1460. doi:10.4236/fns.2012.310189

Salazar, A., & Gamboa, A. (2013). Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal. *REB, Revista de Educación Bioquímica*, 32(2), 67-75. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/reb/v32n2/v32n2a3.pdf>

Salinas, D. (2014). *Evaluación de dos fosfitos en la incidencia del mildiu vellosa (*Peronospora* sp) en el cultivo de mora de Castilla (*Rubus glaucus* B)*. Obtenido de <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/8472/1/Tesis-88%20%20%20Ingenier%C3%ADa%20Agron%C3%B3mica%20-CD%20303.pdf>

Sellés, S. (2007). *Pardeamiento enzimático del fruto de níspero (*Eriobotrya japonica* cv. *Algerie*) Enzimología y fisiología de la polifenil oxidasa*. Universidad de Alicante, España. Obtenido de [https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/4085/1/tesis\\_doctoral\\_susana\\_selles.pdf](https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/4085/1/tesis_doctoral_susana_selles.pdf)

- Silveira, A. (2017). Uso de aditivos y métodos físicos para mantener la calidad de los productos de IV gama o mínimamente procesados. *Agrociencia Uruguay*, 21(1), 1-6. Obtenido de <http://www.scielo.edu.uy/pdf/agro/v21n1/2301-1548-agro-21-01-00001.pdf>
- Silveira, A. (2017). Uso de aditivos y metodos fisicos para mantener la calidad de los productos IV gama o minimamente procesados. *Agrociencia Uruguay*, 21(1). Obtenido de <http://www.scielo.edu.uy/pdf/agro/v21n1/2301-1548-agro-21-01-00001.pdf>
- Soto, M., & Yahia, M. (2002). Compuestos antioxidantes y tratamientos postcosecha. *Revista Horticultura*(160), 48-54. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/813/81311226006.pdf>
- Souza, A., Lopes, R., Perin, E., & da Silva, M. (2018). Biochemical characterization of blackberry fruit (*Rubus* sp) and jellies. *Australian Journal of Crop Science*, 12(4), 624-630. doi:10.21475/ajcs.18.12.04.pne933
- Suarez, D. (2003). Guía de procesos para la elaboración de néctares, mermeladas, pasa y vinos. Obtenido de <https://books.google.com.co/books?id=3xyk5WXjW5sC&pg=PA19&dq=que+son+los+%C2%B0brix&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwinlaSI1qPhAhUFZd8KHYWYDQUQ6AEIKDAA#v=onepage&q=que%20son%20los%20%C2%B0brix&f=false>

Terán, M., Meléndez, I., García, L., Acuña, J., & Urdaneta, M. (1996). Efecto de la aplicación de nitrógeno y potasio en el rendimiento del cultivo de la guayaba (*Psidium guajava*). *Revista de la Facultad de Agronomía, Luz*. Obtenido de <https://eurekamag.com/research/002/815/002815273.php>

Toit, W. (2006). New findings regarding ascorbic acid in wine. Obtenido de <https://www.wineland.co.za/new-findings-regarding-ascorbic-acid-in-wine/>

Ulrich, B. (1974). *Meth. Enz. Anal.* New York: Academic Press, Inc.

Valdiviezo, I. (2018). Aplicación poscosecha de cloruro de calcio en frutos de manzana (*Malus x domestica* Borkh) cv. ANNA. Obtenido de <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/3477>

Zhang, X., & Shao, X. (2015). Characterization of Polyphenol Oxidase and Peroxidase. doi:10.17221/384/2014-CJFS