

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA



Extractos de Lignina y Síntesis de Lignosulfonatos a Partir de Cáscaras de Nuez y su Efecto Bioestimulante en Plántulas de Tomate

Por:

**JUANA NAYELI VANEGAS MARTÍNEZ**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO EN HORTICULTURA**

Saltillo, Coahuila, México.

Diciembre 2022

## DECLARACIÓN DE NO PLAGIO

El autor quien es el responsable directo, jura bajo protesta de decir verdad que no se incurrió en plagio o conducta académica incorrecta en los siguientes aspectos:

Reproducción de fragmentos o textos sin citar la fuente o autor original (corta y pega); reproducir un texto propio publicado anteriormente sin hacer referencia al documento original (auto plagio); comprar, robar o pedir prestados los datos o la tesis para presentarla como propia; omitir referencias bibliograficas o citar textualmente sin usar comillas; utilizar ideas o razonamientos de un autor sin citarlo; utilizar material digital como imágenes, videos, ilustraciones, graficas, mapas o datos sin citar al autor original y/o fuente, así mismo tengo conocimiento de que cualquier uso distinto de estos materiales como el lucro, reproducción, edición o modificación, sera perseguido y sancionado por las autoridades correspondientes.

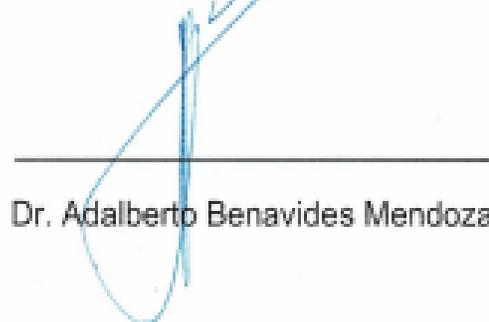
Por lo anterior nos responsabilizamos de las consecuencias de cualquier tipo de plagio en caso de existir y declaramos que este trabajo es original.

Pasante



Juana Nayeli Vanegas Martinez

Asesor principal



Dr. Adalberto Benavides Mendoza

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMIA  
DEPARTAMENTO DE HORTICULTURA

Extractos de lignina y síntesis de lignosulfonatos a partir de cáscaras de nuez y su efecto bioestimulante en plántulas de tomate

Por:

**JUANA NAYELI VANEGAS MARTÍNEZ**

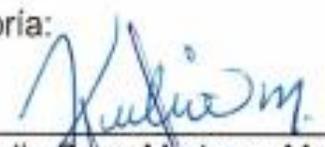
TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRONOMO EN HORTICULTURA**

Aprobada por el Comité de Asesoría:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Adalberto Benavides Mendoza  
Asesor Principal Interno

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Julia Rosa Medrano Macías  
Asesor Principal Externo

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alberto Sandoval Rangel  
Coasesor

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jerónimo Landeros Flores  
Coordinador Interino de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México  
Diciembre 2022

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Díos**

Por darme vida, paciencia y fuerza para poder cumplir uno de mis sueños y no dejarme sola en el proceso.

### **A mí Alma Terra Mater**

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Por convertirse en mi segunda casa en toda la etapa de mi carrera, por darme la oportunidad de conocer gente nueva y noble, gracias por llenarme de aprendizaje y por convertirme en una mejor persona.

### **A mis asesores**

**Dra. Julia R. Medrano Marcias.** Por tenerme paciencia y no dejarme sola en ningún momento, por siempre sacarme de mis dudas y por su gran compromiso que tuvo en el proyecto.

**Dr. Adalberto Benavides Mendoza** Quien colaboró para la realización del presente trabajo

**Dr. Alberto Sandoval Rangel** Por sus consejos, sus enseñanzas y su confianza.

**Dr. Marcelino Cabrera de la Fuente** Por aportarme muchos de sus conocimientos y aclarar cualquier tipo de duda, también le agradezco por su paciencia.

**A mis amistades dentro de la Universidad.**

Perla Rubi Sanchez Ángel

María Magdalena Briones Rodríguez

Carmen Rubi Aguilar Arrollo

Omar Galindo Corona

Alison Janini Velasco Alfaro

**A Miguel Angel González Colmenero.** Te agradezco porque gracias a ti conocí la escuela y tu me acompañaste y me apoyaste en todo este bonito proceso.

**DEDICATORIA**

**A mis padres**

Sr. Abel Vanegas Cruz

Sra. Sonia Martínez Alvarez

Este trabajo se lo dedico a mis padres ya que fueron los que me apoyaron en todo momento tanto económicamente como moralmente, gracias por creer en

mi y sacrificarse conmigo para poder realizar este sueño que no solo era mio si no tambien de ustedes, estare agradecida con ustedes infinitamente. Los amo.

### **A mis hermanos**

Cecilia Vanegas Martínez

Juan Carlos Vanegas Martínez

Angela Vanegas Martínez

Les dedico este trabajo porque nunca dudaron de mi, siempre me apoyaron y estuvieron para escucharme. Te dedico este trabajo ati hermano Juan Carlos, que aunque ya no estes conmigo yo se que desde el cielo estas orgulloso de mi y tambien festejas conmigo cada triunfo que tengo. Son los mejores hermanos que pude haber tenido. Te dedico este trabajo ati Ceci por siempre sentirte orgullosa de mi y nunca dudar de mi capacidad para sacar este proyecto. Te dedico este trabajo a ti Ange por no dejarme sola cuando mas te necesitaba y por querer seguir mis pasos aun cuando soy menor que tu.

### **A mis abuelos, tios, primos**

Gracias por preocuparse por mi siempre aunque haya estado lejos, por siempre preguntarme como me va o como estoy, gracias por todas las aportaciones y atenciones que han tenido conmigo.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS .....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
RESUMEN .....	XIII
ABSTRACT .....	XV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN .....	2
III. OBJETIVO GENERAL .....	3
3.1 Objetivos específicos.....	3
IV. HIPÓTESIS .....	3
V. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
4.1. Bioestimulantes vegetales.....	4
4.2 Producción de residuos de cáscara de nuez en México: .....	5
4.3 Características químicas de la cáscara de nuez.....	5
4.4 Lignosulfonatos como bioestimulante vegetal.....	6
4.5 El cultivo de tomate.....	7
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
6.1 OBTENCIÓN DE AGRORECIDUOS.....	9
6.2 PRODUCCIÓN DEL BIOESTIMULANTE .....	9
6.1.1 Extracción de lignina de cáscaras de nuez .....	9
6.1.2 Caracterización del extracto de lignina .....	9
6.1.3 Síntesis de Lignosulfonatos .....	12
6.2 PRUEBAS DEL EFECTO BIOESTIMULANTE SOBRE GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO EN PLÁNTULAS DE TOMATE .....	12
6.2.1 Evaluación del efecto bioestimulante sobre la germinación de semillas de tomate.....	12
6.2.2 Evaluación del efecto bioestimulante sobre el crecimiento de plántulas de tomate.....	14
VII. RESULTADOS .....	17
7.1 <i>Extracción de lignina de la cáscara de nuez.</i> .....	17

<b>7.3 Cuantificación fenoles totales</b> .....	18
<b>7.4 Variables de germinación</b> .....	18
<b>7.4.1 Coeficiente de Velocidad de Germinación</b> .....	18
<b>7.4.2 Germinación relativa</b> .....	19
<b>7.4.3 Crecimiento relativo de radícula</b> .....	19
<b>7.4.4 Índice de germinación</b> .....	20
<b>7.4.5 % de Germinación</b> .....	20
<b>7.4.6 Índice de Velocidad de Germinación</b> .....	21
<b>7.4.7. Índice de Vigor</b> .....	21
<b>7.5 Variables de crecimiento</b> .....	22
<b>7.5.1. Número de Foliolos.</b> .....	22
<b>7.5.2 Altura de planta</b> .....	22
<b>7.5.3 Diámetro del tallo</b> .....	23
<b>7.5.4 Peso fresco de hoja</b> .....	23
<b>7.5.5 Peso seco de hoja</b> .....	24
<b>7.5.6 Peso Fresco de Tallo</b> .....	24
<b>7.5.7 Peso Seco del Tallo</b> .....	25
<b>7.5.8 Peso Fresco de Raíz</b> .....	25
<b>7.5.9. Peso Fresco Total.</b> .....	26
<b>7.5.10 Peso Seco Total</b> .....	26
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	28
<b>IV. CONCLUSIONES</b> .....	30
<b>V. BIBLIOGRAFIA</b> .....	31

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Concentraciones para representación de curva de calibración.....	11
<b>Cuadro 2.</b> Resultados de absorbancia de cada tratamiento.....	11
<b>Cuadro 3.</b> Concentraciones de la solución nutritiva según (Steiner,1961).....	15

## Indice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Compendio de los resultados obtenidos de las variables de crecimiento de las plántulas de tomate.....	27
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Gráfico de barras de obtención de extracto de lignina en tres experimentos.....	17
<b>Figura 2.</b> Cuantificación de lignina total, expresada en % (p/p), en dos diferentes experimentos.....	17
<b>Figura 3.</b> Cuantificación de compuestos fenolicos totales, expresado en % (p/p), en dos diferentes experimentos de obtención.....	18
<b>Figura 4.</b> Medición de coeficiente de velocidad de germinación respecto a los 7 tratamientos por 7 días.....	18
<b>Figura 5.</b> Medición del % de semillas germinadas en los 7 tratamientos por los 7 días.....	19
<b>Figura 6.</b> Tratamiento con el cual optuvimos una raducula de mayor tamaño.....	19
<b>Figura 7.</b> % de indice de germinación de cada tratamiento en los 7 días.....	20
<b>Figura 8.</b> % de semillas germinadas por cada tratamiento por los 7 días.....	20
<b>Figura 9.</b> índice de velocidad de emergencia de los 7 tratamientos por los 7 días.....	21
<b>Figura 10.</b> Índice de vigor en los 7 tratamientos por los 7 días.....	21
<b>Figura 11.</b> Numero de foliolos de las plantas.....	22
<b>Figura 12.</b> Altura de las plantas.....	22
<b>Figura 13.</b> Diametro del tallo en mm.....	23
<b>Figura 14.</b> Peso fresco de hojas en gr.....	23
<b>Figura 15.</b> Peso seco de las hojas en gr.....	24
<b>Figura 16.</b> Peso fresco del tallo representado en gr.....	24
<b>Figura 17.</b> Peso seco del tallo en gr.....	25
<b>Figura 18.</b> Peso fresco de la raíz expresada en gr.....	25
<b>Figura 19.</b> Peso fresco total de toda la planta expresada en gr.....	26
<b>Figura 20.</b> Peso seco total de la planta en gr.....	26
<b>Figura 21.</b> Cáscara de nuez molida en mortero y posteriormente en licuadora.....	35

<b>Figura 22.</b> Hidroxido de sodio (NaOH al 18%).....	35
<b>Figura 23.</b> Conjunto de cáscara de nuez y (NaOH al 18%) en una proporción 1:10 (900 ml).....	36
<b>Figura 24.</b> Experimentos de separación por precipitado con ácido sulfúrico 6N en diferentes concentraciones.....	36
<b>Figura 25.</b> Obtención de extracto de lignina.....	37

## RESUMEN

Los bioestimulantes son sustancias o conjunto de sustancias que ayudan a mejorar procesos fisiológicos y químicos de las plantas.

Los agroresiduos hoy en día tienen un gran impacto negativo ya que no tienen un uso productivo y se acumulan contaminando el planeta.

Estos se pudieran disminuir dándole un mejor uso, ya que tienen muchos componentes que son favorables principalmente para las mismas plantas, basándose en esto para transformar un agroresiduo en un bioestimulante.

México es uno de los dos principales países productores de nuez pecanera, esto conlleva de igual forma a una gran producción de agroresiduos de cáscara de nuez. Para ser más exacto del 100% de la producción de cáscara de nuez un 50% representa los desechos generados.

La cáscara de nuez se conforma principalmente de materiales lignocelulósicos; como la holocelulosa que consiste de celulosa y hemicelulosa, también se conforma de lignina.

El cultivo de tomate se puede decir que es una de las hortalizas más importantes en el mercado, podemos englobar la problemática de los residuos agroindustriales, sus beneficios y que se tiene en nuestro país para poder transformarlo en bioestimulante y así mejorar el crecimiento de la planta de tomate.

El objetivo de este trabajo fue obtener mediante hidrólisis química un extracto rico en lignina y una posterior transformación de lignosulfonatos a partir de cáscara de nuez y probarlos en la germinación y crecimiento de plantas de tomate. Para cumplir el objetivo se prepararon soluciones de lignina a diferentes concentraciones: 10 ppm, 50 ppm y 100 ppm, ya teniendo la lignina cruda se transformó a lignosulfonatos por una sulfonación obteniéndolos a concentraciones de 10, 50 y 100 ppm, posteriormente se probó en germinación con 5 repeticiones que consistían de 15 semillas cada una. En el experimento de crecimiento de plántulas, se usó una charola de 128 cavidades utilizando 96 de estas, en este caso se tomaron los 4 mejores tratamientos y se tomaron dos testigos. Finalmente, se tomó una muestra de 5 plantas por tratamiento, dando un total de 30 plantas.

Las variables evaluadas de la germinación fueron: Coeficiente de velocidad de germinación, germinación relativa, crecimiento relativo de radícula, índice de germinación, % de germinación, índice de velocidad de germinación e índice de vigor.

Las variables de crecimiento evaluadas de las plántulas fueron: número de folíolos, altura, diámetro del tallo, peso fresco y seco de hoja y tallo, peso fresco de la raíz y peso fresco y seco total de la planta. Los resultados encontrados en las variables de germinación fueron: un incremento en el coeficiente de velocidad de germinación (0.203), en la germinación relativa (1.19), en el índice de germinación (0.0129), en el índice de velocidad de emergencia (56.7) con la aplicación del tratamiento de lignosulfonatos a 50 ppm, en comparación con las plantas testigo. Adicionalmente, se obtuvo un mayor índice de vigor tras la aplicación de la lignina a 10 ppm. El % de germinación se vio incrementado con la aplicación de lignosulfonatos al 10 y 100 ppm, así como con la lignina a 100 ppm. Respecto a las variables de crecimiento se encontró un incremento en el diámetro de tallo (3.70 mm), en el peso fresco de hoja (919.10 gr), en el peso seco de hoja (101.22 gr), en el peso fresco de tallo (749.08 gr), y en el peso seco total de la planta (145.42 gr), con la aplicación de lignosulfonatos 50ppm, en comparación con las plantas testigos y los demás tratamientos.

**Palabras clave: Tomate, lignosulfonatos, bioestimulante.**

## ABSTRACT

Biostimulants are substances or a set of substances that help to improve physiological and chemical processes in plants.

Agro-residues nowadays have a great negative impact since they have no productive use and accumulate polluting the planet.

These could be reduced by giving them a better use, since they have many components that are favorable mainly for the plants themselves, based on this to transform an agroresidue into a biostimulant.

Mexico is one of the two main pecan nut producing countries, which also leads to a large production of nut shell agroresidues. To be more exact, out of the 100% of the nut shell production, 50% represents the waste generated.

Walnut shells consist mainly of lignocellulosic materials, such as holocellulose, which consists of cellulose and hemicellulose, as well as lignin.

The tomato crop can be said to be one of the most important vegetables in the market, we can encompass the problem of agro-industrial waste, its benefits and what is available in our country to transform it into biostimulant and thus improve the growth of the tomato plant.

The objective of this work was to obtain by chemical hydrolysis a lignin-rich extract and a subsequent transformation of lignosulfonates from walnut shells and to test them in the germination and growth of tomato plants. To meet the objective, lignin solutions were prepared at different concentrations: 10 ppm, 50 ppm and 100 ppm, and having the raw lignin, it was transformed to lignosulfonates by sulfonation, obtaining them at concentrations of 10, 50 and 100 ppm, then tested in germination with 5 replicates consisting of 15 seeds each. In the seedling growth experiment, a 128-cavity tray was used with 96 cavities, in this case the 4 best treatments were taken and two controls were taken. Finally, a sample of 5 plants per treatment was taken, giving a total of 30 plants.

The germination variables evaluated were: germination speed coefficient, relative germination, relative radicle growth, germination index, germination %, germination speed index and vigor index.

The seedling growth variables evaluated were: number of leaflets, height, stem diameter, fresh and dry weight of leaf and stem, fresh weight of root and total fresh and dry weight of the plant. The results found in the germination variables were: an increase in the germination speed coefficient (0.203), in the relative germination (1.19), in the germination index (0.0129), in the emergence speed index (56.7) with the application of the lignosulfonate treatment at 50 ppm, in comparison with the control plants. Additionally, a higher vigor index was obtained after the application of lignin at 10 ppm. The germination % was increased with the application of lignosulfonates at 10 and 100 ppm, as well as with lignin at 100 ppm. With respect to growth variables, an increase in stem diameter (3.70 mm), leaf fresh weight (919.10 gr), leaf dry weight (101.22 gr), stem fresh weight (749.08 gr), and total plant dry weight (145.42 gr), with the application of lignosulfonates 50ppm, in comparison with the control plants and the other treatments.

Key words: Tomato, lignosulfonates, biostimulant.

## I. INTRODUCCIÓN

Los bioestimulantes han tomado una gran importancia en la actualidad y son considerados como una alternativa ecológica viable para sustituir el exceso de agroquímicos, ya que no solo mejora la producción agrícola si no también disminuye la contaminación ambiental (Lengai & Muthomi, 2018; Valverde *et al.*, 2020).

El término de bioestimulante hace referencia a la sustancia que, a pesar de no ser un nutriente, un plaguicida o un regulador de crecimiento, al ser aplicado en pequeñas cantidades, genera un impacto positivo en la germinación, el desarrollo, el crecimiento vegetativo, la floración, el cuajado y/o el desarrollo de los frutos, esta es una definición muy aceptada (du Jardin, 2015).

Los agroresiduos nos afectan hoy en día ya que es una parte de la planta que no se aprovecha y se acumula a través de los años, sumándose al incremento de la contaminación ambiental.

Para disminuir estos agroresiduos se pueden emplear en productos que así mismo ayuden a los productores con temas relacionados a la mejora de cultivo (Ertani *et al.*, 2019a).

Estos tienen compuestos bioactivos; tanto metabolitos primarios como proteínas, carbohidratos y lípidos; como secundarios que pueden ser antioxidantes, compuestos fenólicos entre otros, por este conjunto de compuestos que tienen los agroresiduos se pueden emplear como bioestimulantes (Colombia *et al.*, s/f).

México es uno de los dos principales países productores de nuez pecanera por su adaptación climática del norte del país. En el 2021 se llegó a una cosecha de 135,000 toneladas, según el anuncio estadístico de la producción agrícola del (SIAP).

A consecuencia de esta alta producción de nuez, también se producen agroresiduos, el cual representa un 40 y 50% del desecho generado (Loredo Medrano *et al.*, 2016).

La cascara de nuez contiene un 30-40% de lignina. La lignina es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas; esta, junto con la celulosa y la hemicelulosa conforman la pared celular. (Agustin-Salazar *et al.*, 2018a).

La lignina ha sido empleada como sustituto del fenol en las resinas resol en distintos porcentajes. Algunos autores emplearon la lignina Kraft y los lignosulfonatos como relleno para formular resinas resol destinadas a la fabricación de contrachapados y aglomerados (Lavoie, Baré, & Bilodeau, 2011).

EL tomate (*Solanum lycopersicum L*) pertenece a la familia Solanaceae, es una planta dicotiledónea y herbácea perenne que se cultiva en forma anual para el consumo de sus frutos (Romero-Arenas *et al.*, 2017).

Este cultivo es producido principalmente bajo sistemas intensivos con elevado uso de agroquímicos que pueden tener efectos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016), por lo que el propósito de esta investigación fue determinar el efecto bioestimulante de los extractos de lignina y de lignosulfonatos obtenidos a partir de cáscara de nuez, sobre la germinación de semillas dentro de una cámara bioclimática a 25°C y el crecimiento de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad floradade que se mantuvieron en invernadero de tecnología madia.

## II. JUSTIFICACIÓN

Existe la necesidad de dar un valor agregado a los residuos de la agroindustria local. En el Norte del país se producen residuos de nuez pecanera; los cuales contienen moléculas de interés como lignina, celulosa, hemicelulosa, pectinas y compuestos polifenólicos, estos pueden recuperarse y/o modificarse para sintetizar compuestos con una amplia gama de aplicaciones; en este proyecto se pretenderá la producción de compuestos lignocelulolíticos con efecto bioestimulante sobre el metabolismo vegetal, el cuál puede lograr una mejora en la germinación y crecimiento de especies hortícolas, creándose así un nicho de oportunidad para la investigación básica, transferencia de tecnología e inserción de recursos humanos de alto nivel en sectores productivos.

### **III. OBJETIVO GENERAL**

Obtener extractos de lignina y sintetizar lignosulfonatos a partir de cáscaras de nuez y probar su efecto bioestimulante sobre la germinación y crecimiento de plántulas de tomate.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- 1- Gestionar con productores regionales la obtención de residuos de cáscara de nuez.
- 2- Obtención y caracterización de extractos crudos de la cáscara de nuez.
- 3- Síntesis mediante reacción química de compuestos lignosulfónicos a partir del extracto crudo de la cáscara de nuez.
- 4- Evaluar el efecto bioestimulante del extracto crudo de la cáscara de nuez sobre la germinación de semillas de tomate.
- 5- Evaluar el efecto bioestimulante del extracto crudo de la cáscara de nuez sobre variables de crecimiento de plántulas de tomate.
- 6- Evaluar el efecto bioestimulante de los compuestos lignosulfónicos sintetizado sobre la germinación de semillas de tomate.
- 7- Evaluar el efecto bioestimulante de los compuestos lignosulfónicos sintetizados sobre variables de crecimiento de plántulas de tomate.

### **IV. HIPÓTESIS**

El extracto crudo, rico en moléculas lignocelulolíticas de la cáscara de nuez, podrá evidenciar efecto bioestimulante sobre la germinación y el crecimiento de plántulas de tomate. También a partir del extracto crudo de la cáscara de nuez, se sintetizará mediante reacción de sulfonación los lignosulfonatos; moléculas con efecto bioestimulante sobre la germinación y crecimiento de las plántulas de tomate.

## V. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Bioestimulantes vegetales

Los bioestimulantes son sustancias orgánicas que se utilizan para elevar el crecimiento y desarrollo de las plantas y que estas tengan mayor resistencia a las condiciones adversas como salinidad, toxicidad, déficit o exceso de humedad (Rouphael & Colla, 2018).

La composición de bioestimulantes puede incluir auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico, ácido jasmónico u otra fitohormona (Valverde *et al.*, 2020).

La bioestimulación se refieren a la inducción para promover o inhibir algún proceso fisiológico, integrados con prácticas de los suelos o del follaje para facilitar un adecuado crecimiento y desarrollo de las plantas (van Oosten, Pepe, de Pascale, Silletti, & Maggio, 2017).

Los bioestimulante se usan más en la agricultura ya que pueden resolver problemas e ineficiencias con las que contamos en el campo hoy en día (Yakhin, Lubyantsev, Yakhin, & Brown, 2017).

El valor de los bioestimulantes en el mercado se estima entre 200 y 400 millones de euros, con un crecimiento anual de más de 10% e inversiones anuales en investigación y desarrollo de entre el 13 y el 10% de la facturación (van Oosten *et al.*, 2017).

Los productos que se consideran bioestimulantes se agrupan en una categoría de productos muy sofisticados, tanto que su reglamentación a nivel mundial aún no está completamente cerrada. Sin embargo, existen permisos entre científicos, reguladores, productores y agricultores en la definición de las categorías de estos productos (Ertani *et al.*, 2019a).

## **4.2 Producción de residuos de cáscara de nuez en México:**

La producción en México en el año 2014 fue de 126 mil 799 toneladas de nuez, gracias a esto nos colocamos como el principal productor en el mundo. Los principales estados productores son Chihuahua que fue el mayor productor al alcanzar 80 mil 413 toneladas, Sonora, Coahuila, Durango y Nuevo León, con estos aportando más del 95% de la producción nacional (Sánchez, Ramos-Díaz, Puc, Aracely, & López, s/f).

El mercado de exportación abarcara el 63 por ciento de la producción nacional, la mayor parte tiene como destino Estados Unidos, con esto se obtiene alrededor de 370 millones de dólares en ventas anuales. Sin embargo, la cáscara de nuez se considera que es el 50% del peso de la nuez, siendo este un residuo agroindustrial, el cual, a la fecha, no ha sido correctamente aprovechado a pesar de contener un arsenal de moléculas de interés industrial (del Carmen, Vázquez, & Urrea López, s/f).

## **4.3 Características químicas de la cáscara de nuez**

La cáscara de la nuez está conformada por un mesocarpio interno y un endocarpio, esta es una capa que protege a la semilla de agentes externos, la cual contiene celulosa y hemicelulosa en rangos similares (25-30%). Adicionalmente, contiene lignina, en un porcentaje entre 30-40% (Loredo Medrano *et al.*, 2016). La lignina es el segundo mayor componente de la pared celular, y esta tiene la función de dar rigidez a la cáscara (Cu, 2015).

La definición estructural de la lignina no ha sido tan clara como la de otros polímeros naturales debido a la complejidad que afecta su aislamiento, análisis de la composición, y la caracterización estructural (Dence, 1992).

La lignina tiene las siguientes características: Son polímeros vegetales construidos a base de unidades de fenilpropanoide; principalmente alcohol cumárico, coniferílico y sinapilo, presentan la mayor parte de los grupos metoxilo contenidos en la madera, son la mayor fuente de compuestos aromáticos, son resistentes a la hidrólisis ácida, fácilmente oxidables, solubles en bisulfito o álcalis caliente (Agustin-Salazar *et al.*, 2018a).

La lignina está presente en todas las plantas vasculares y al igual que muchos otros componentes de la biomasa, esta se forma mediante la fotosíntesis. La lignina está considerada como un recurso renovable asequible y de potencial uso industrial, cuya producción anual se ha estimado en el intervalo de  $5-36 \times 10^8$  toneladas. El potencial de aplicación de la lignina ha sido empleado en muchos campos, por ejemplo, termoplásticos, hidrogeles, antioxidantes, coberturas, lubricantes, surfactantes, resinas resol destinadas a la fabricación de contrachapados y aglomerados (Campobenedetto *et al.*, 2020).

Sin embargo, aunque este biopolímero, obtenido de biomasa residual ha sido aprovechado en diversas áreas, la agronómica aún esta prácticamente sin explorar. Actualmente, la mayor comercialización de la lignina es en forma de lignosulfonatos, los cuales son obtenidos mediante reacción de sulfonación; ya que poseen una mayor hidrosolubilidad. (Aro & Fatehi, 2017).

#### **4.4 Lignosulfonatos como bioestimulante vegetal**

Los lignosulfonatos son fracciones de las largas cadenas poliméricas de la lignina, con grupos sulfonatos introducidos en estas, lo que le confiere propiedades anfífilas, polielectrolíticas, y un incremento en la solubilidad (Ruwoldt, 2020a).

La composición y las propiedades físicas de los lignosulfonatos dependen no sólo de su fuente y de las condiciones de modo de preparación, sino también de los procedimientos llevados a cabo para su aislamiento, purificación y modificación (Ruwoldt, 2020b).

El cambio de catión de los lignosulfonatos de sodio, de magnesio o de amonio se lleva a cabo a través de resinas de intercambio catiónico; en el caso de los lignosulfonatos de calcio se consigue mediante la adición del sulfato o carbonato soluble del catión preferido, seguido de la eliminación de la sal insoluble de calcio resultante (Ruwoldt, 2020b).

Parece establecido que las propiedades de las resinas fabricadas con lignosulfonatos amónicos son mejores que las de calcio y sodio (Alonso Rubio, 2005) .

Autores como Peng (1994) han comprobado que los lignosulfonatos amónicos poseen un mayor número de protones aromáticos frente a la sal sódica, lo que les confiere una mejor predisposición hacia la hidroximetilación.

Los lignosulfonatos amónicos son más solubles en disolventes orgánicos que sus homólogos de calcio, sodio y magnesio. Los cortes de lignosulfonatos de bajo peso molecular ofrecen mejores resultados que los de elevado peso molecular (Francisco Burgos, s/f).

#### **4.5 El cultivo de tomate**

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), es la hortaliza más cultivada y consumida a nivel nacional e internacional (Florido Bacallao & Fundora, 2014).

El cultivo de tomate es uno de los más importantes respecto al desarrollo económico y social de la agricultura a nivel mundial (Mannino *et al.*, 2020).

Los principales productores de tomate son: Baja California, Colima, Hidalgo, Sonora, Quintana Roo, dando un rendimiento de 183.683 toneladas por hectárea en el año 2003 (Romero-Arenas *et al.*, 2017).

La semilla tiene forma ovalada, con un tamaño promedio de 3.5mm de longitud y está constituida por el embrión, endospermo y la testa. El embrión está integrado por la yema apical, dos cotiledones, hipocótilo y radícula (Halka, Smoleń, Ledwozyw-Smoleń, & Sady, 2019).

La germinación de la semilla del tomate conlleva tres etapas. La primera dura aproximadamente 12 horas y se produce una rápida absorción de agua. La segunda etapa dura 40 horas, en esta etapa no se observan cambios de anatomía ni en el metabolismo de la semilla. En la última etapa, la semilla vuelve a absorber agua, iniciando con la emergencia de la radícula (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016).

El tipo de raíz es típica, presenta ramificaciones profundas que pueden alcanzar hasta 60 cm o más, las hojas son grandes, compuestas y divididas, con distintos tonos de color verde y distintas formas según sea su variedad. Las hojas compuestas se forman por siete, nueve y algunas veces por once hojas sencillas, estas tienen pelos glandulosos que segregan al tocarlas una sustancia de color marrón (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016; Romero-Arenas *et al.*, 2017).

El fruto de tomate es una baya que se constituye por varios lóculos, el color más común es el rojo, esto gracias al licopeno, pero también existen otros de color amarillo, naranja y verde. Su diámetro comercial es de 10 cm (Romero-Arenas *et al.*, 2017).

Aquí solamente falta el hacer hincapié en que el tomate se consume mucho y es susceptible a muchas enfermedad y estrés abiótico por lo que es importante probar un nuevo bioestimulante, el cual aparte es producido de un agroresiduo.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 OBTENCIÓN DE AGRORECIDUOS

Se obtuvieron los agroresiduos gracias a los productores locales del estado de Coahuila, los cuales fueron los que donaron la cáscara de nuez para realizar este proyecto.

### 6.2 PRODUCCIÓN DEL BIOESTIMULANTE

#### 6.1.1 Extracción de lignina de cáscaras de nuez

La cáscara de nuez se trituró en un mortero de porcelana y posteriormente se molió en la licuadora para obtener un polvo fino. De este polvo se pesaron 100 g para agregarle una solución convencional caustica (NaOH al 18%) en una proporción 1:10 (900 ml). Para llevar a cabo la extracción de la lignina, la mezcla anterior se calentó a 170 °C en una plancha por 85 minutos. Posteriormente, se procedió a la separación por precipitación, en donde se llevaron a cabo tres experimentos:

En el primero, a 500 ml de la lignina alcalina se le añadieron 500 ml de ácido sulfúrico 6N (proporción 1:1).

En el segundo a 100 ml de la lignina alcalina se le añadieron 900 ml de ácido sulfúrico al 6 N (proporción 1:10), y enseguida fue filtrado con un tamiz metálico y puesto a secar en estufa por 24 hrs a una temperatura de 70 °C.

En el tercer experimento a 50 ml de lignina alcalina se le agregó 950 ml del ácido sulfúrico 6N (proporción 1: 20), se filtró con tamiz metálico y fue puesto en estufa a 70 C por 24 hrs.

#### 6.1.2 Caracterización del extracto de lignina

##### *Cuantificación de lignina total*

Se tomó 1 g de la muestra y se diluyo en 200 ml de agua destilada. A esta solución se le agregaron 50 ml de Ácido Sulfúrico 4N + 50 ml de Permanganato de Potasio 0.1N. Colocando con una agitación a la muestra durante 5 min., posteriormente se adicionaron 10 ml de Yoduro de Potasio 1N. Titulando el yodo libre con solución de tiosulfato de Sodio

0.1N, y añadiendo 5 gotas de almidón (0.2%), cuando el yodo se consume totalmente, desaparece el color azul producto del complejo yodo-almidón. Punto final de la reacción.

Se reportó la cantidad de mililitros consumidos de una solución de Permanganato de Potasio 0.1N que consumió la muestra (a) se realizó el ensayo en blanco siguiendo el mismo procedimiento de la prueba, pero sin pulpa. (b)

#### CÁLCULO DE RESULTADOS:

$$K = \frac{V \cdot F \cdot P}{1}$$

Experimento 2:

$$K = 59.5 \cdot 95.3 \cdot 1 = 5,670 \text{ ml}$$

Experimento 3:

$$K = 8.5 \cdot 95.3 \cdot 1 = 810.05 \text{ ml}$$

Dónde:

K = número permanganato  
F = la titulación en blanco  
P = Peso de la pulpa libre de humedad en gramos

V = Volumen gastado tiosulfato realmente consumidos por la muestra.

#### *Cuantificación de fenoles totales*

Extracción: Se pesaron 100 mg del extracto de lignina seca en una balanza analítica y se colocó en tubos Eppendorf de 2 ml, posteriormente con una micropipeta se agregaron 2.0 ml de la mezcla agua: acetona 1:1, se colocó en vórtex por 10 s, posteriormente la muestra se sónico durante 5 minutos, se centrifugó a 12 500 rpm durante 10 minutos a 4 °C y finalmente se obtuvo el sobrenadante y se filtró.

Para la determinación del contenido de Fenoles Totales se sigue la siguiente metodología (Sultana et al., 2009, Nsor-Atindana *et al.*, 2012).

Añadimos 50 µL de la solución (blanco (agua: acetona 1:1), estándar o extracto, adicionamos 200 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y le agregamos 500 µL de Carbonato de Sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 20%, 5 ml de agua destilada y esto se sometió a vórtex 30 segundos,

colocamos las muestras en baño maría a 45°C por 30 min, leímos la absorbancia a 750 nm con una celdilla de plástico (se calibro con solución blanco).

Curva de calibración.

Preparar una solución patrón de ácido gálico (500 ppm), disolviendo 12.5 g de ácido gálico en 25 ml de agua: acetona (1:1). Construir la curva con las siguientes concentraciones:

**Cuadro 1.** Concentraciones para representación de curva de calibración.

<b>Concentración (ppm)</b>	<b>Solución madre (µL)</b>	<b>Agua:acetona 1:1 (µL)</b>
5	12.5	987.5
10	25	975
15	37.5	962.5
25	62.5	937.5
50	125	875
100	250	750
200	500	500
300	750	250
400	1000	0

**Cuadro 2.** Resultados de absorbancia de cada tratamiento.

Absorbancia (750 nm)	Concentración ácido gálico (ppm)
0.065	5
0.071	10
0.072	15

0.089	25
0.095	50
0.133	100
0.22	200
0.355	300
0.433	400

Se obtuvieron las absorbancias de cada tratamiento. Los resultados muestran que se obtuvo mayor concentración de fenoles (g /kg de biomasa seca).

### **6.1.3 Síntesis de Lignosulfonatos**

A 1 g (duplicado) del sólido alcalino obtenido se le agregaron 2 ml de formaldehído al 37% y fue sometido a calentamiento a 70 °C por 60 min, posteriormente se le agregaron 0.5 g de sulfito de sodio (pH 4) y esta mezcla se calentó a 150 °C por 1.5 hrs. Cuando la reacción terminó, la fracción soluble se secó a 70 °C por 24 hrs y de aquí se obtuvo los lignosulfonatos (Abdulkhani *et al* 2019).

## **6.2 PRUEBAS DEL EFECTO BIOESTIMULANTE SOBRE GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO EN PLÁNTULAS DE TOMATE**

### **6.2.1 Evaluación del efecto bioestimulante sobre la germinación de semillas de tomate.**

Para medir la germinación, se colocaron 15 semillas de tomate variedad floradade en cajas Petri con un disco de papel filtro, cada una de ellas representaba una repetición, y se le hicieron 5 repeticiones a cada uno de los 7 tratamientos, los cuales fueron 1: lignina a 10 ppm, 2: lignina a 50 ppm, 3: lignina a 100 ppm, 4: lignosulfonatos a 10 ppm, 5: lignosulfonatos a 50 ppm, 6: lignosulfonatos a 100 ppm y 7: Testigo agua destilada. A cada repetición se le agregaron 10 ml del tratamiento. Posterior a esto, se inició el monitoreo

diario de la germinación de la semilla hasta el final del experimento; siete días más tarde. Se consideró como semilla germinada las que presentaran radícula de al menos 2 mm.

La humedad fue mantenida agregando los respectivos tratamientos a diario y metiendo las cajas Petri en una cámara bioclimática en la oscuridad a 25°C.

Al día siete se midió el largo de radícula, el peso fresco, el peso seco y el total de semillas germinadas para realizar el cálculo de las siguientes variables de germinación:

1- *Coefficiente Velocidad de germinación (CVG)*

$$CVG = \sum Ni / \sum NiTi$$

Ni= semillas germinadas por día

Ti= número de días del inicio de la germinación

2- Germinación relativa (GR)

$$GR = Nsgt / Nsgc$$

Nsgt= número de semillas del tratamiento

Nsgc= número de semillas germinadas del control.

3- Crecimiento relativo de radícula (CRR)

$$CRR = (\text{media longitud de radícula del tratamiento}) / (\text{media longitud del control})$$

4- *Índice de germinación (IG)*

$$IG = (GR)(CRR)/100$$

5- % germinación (%g)

$$\%g = (\text{semillas germinadas}) / (\text{total de semillas colocadas}) * 100$$

6- Índice de velocidad de emergencia (IVE)

Se obtiene a través del conteo diario de las plántulas emergidas a partir de la siembra, tomando como plántulas emergidas a las que sobresalgan del sustrato. El índice de velocidad de emergencia IVE se calcula mediante la expresión propuesta por (Maguire, 1962):

$$IVE = \sum_{i=1}^n \frac{X_i}{N_i}$$

En donde:

IVE = índice de velocidad de emergencia;  $X_i$  = Número de plántulas emergidas por día;  $N_i$  = Número de días después de la siembra;  $n$  = Número de conteos 1, 2, ...,  $n$  conteos.

#### 7- Índice de vigor

Fue calculada multiplicando la longitud de la radícula por el porcentaje de germinación (Masondo, Kulkarni, Finnie, & Van Staden, 2018).

### **6.2.2 Evaluación del efecto biosetimulante sobre el crecimiento de plántulas de tomate.**

#### *Ubicación del experimento*

El experimento se llevó a cabo en un invernadero tipo capilla de mediana tecnología con medida de 14 m de largo x 7 m de ancho en el departamento de Horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, Coahuila, México, ubicado a 25° 21' 12.8" latitud norte y 101° 01' 51.9" longitud oeste.

#### *Tratamientos*

Se eligieron cuatro tratamientos: lignina a 100 ppm, lignosulfonatos al 10, 50 y 100 ppm, en donde 20 semillas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*) variedad Floradade fueron imbibidas en 10 ml de cada solución, más un control donde las semillas fueron imbibidas en agua y un testigo absoluto en donde las semillas no fueron imbibidas, en recipientes de plásticos de 29.5 ml de capacidad, por 48 hrs., llevando a cabo así un "priming". Posterior a este tiempo, las semillas fueron sembradas en charola de germinación de poliestireno de 128 cavidades, con sustrato 1:1 de perlita y peat moss con 15 repeticiones por cada tratamiento poniendo 3 semillas por cavidad, el 9 de junio del 2022, una vez germinadas fueron colocadas bajo condiciones de invernadero de mediana tecnología. A las tres semanas posteriores a la siembra fueron trasplantadas a macetas de 500 ml de poliestireno con sustrato más perlita a la misma proporción ya indicada, 10 repeticiones por tratamiento, dando un total de 60 plántulas. Estas fueron regadas y nutridas con (100 ml) aplicando solución Steiner al 25% diariamente de forma manual con un pH de 6.3 y una conductividad eléctrica de 2 dS/m, como se muestra en el Cuadro 1.

**Cuadro 3.** Concentraciones de la solución nutritiva según (Steiner,1961).

Macronutrientes	Mili equivalentes (Meq)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4
CA(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .a <sub>2</sub> O	9
KNO <sub>3</sub>	12
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7
Micronutrientes	Partes por millón (ppm)
HBO <sub>3</sub>	0.5
MnSO <sub>4</sub>	0.7
ZnSO <sub>4</sub>	0.09
CuSO <sub>4</sub>	0.02
Fe quelado	3

### Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos de treinta y cinco repeticiones cada uno.

### Muestreo

Se realizó un muestreo completamente al azar dos semanas posteriores al trasplante, donde se tomaron 5 repeticiones por tratamientos, una unidad experimental fue una plántula. De manera no destructiva se midió número de folíolos, la altura, el diámetro del tallo y el peso fresco. Finalmente, fue cuantificado el peso seco.

### VARIABLES DE CRECIMIENTO EVALUADAS

- Número de folíolos

El número de folíolos se cuantificó contando cada lámina foliar dentro de la hoja compuesta.

- Altura

Se midió con cinta métrica flexible desde la base del tallo hasta el ápice.

- Diámetro del tallo

Se tomó mediante el uso de un vernier manual a 10 cm sobre la base del tallo.

Peso fresco y seco de todas las variables con excepción de la raíz que solo se midió el peso fresco, ya que el peso seco era muy poco y no tenía caso pesarlo.

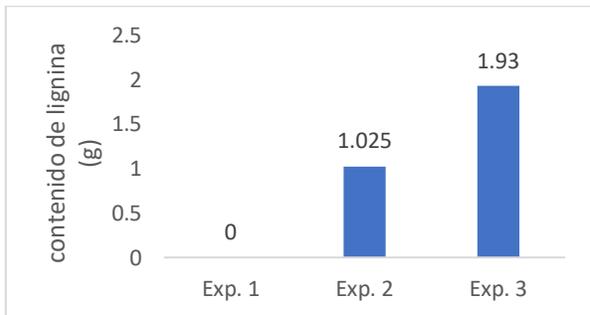
- Peso Fresco y Seco

Las plantas fueron divididas en tallo, raíz y hojas y se pesaron utilizando una balanza digital, registrando el peso fresco. Posteriormente se colocarán en un horno de secado por 76 horas a una temperatura de 760°C para luego pesarse y registrar nuevamente el peso seco expresado en gramos.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Extracción de lignina de la cáscara de nuez.

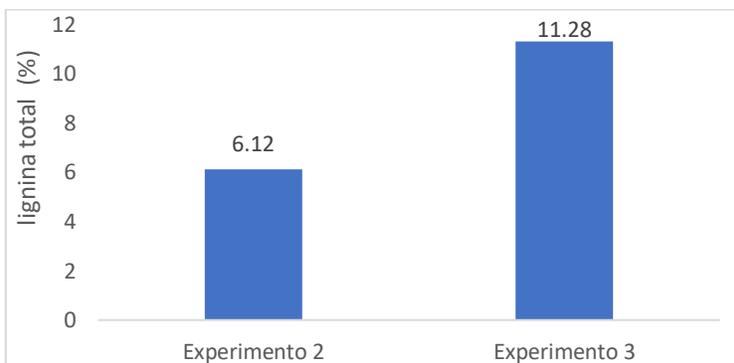
Como se puede observar en la Figura 1, en el experimento 1 no se formó el precipitado de lignina. En el experimento 2 se obtuvieron 1.025 g del precipitado de lignina y en el experimento 3 se obtuvo la mayor cantidad de lignina sólida, la cual fue de 1.93 g.



**Figura 1-** Gráfico de barras del contenido de lignina en tres experimentos de extracción de la cáscara de nuez.

### 7.2 Cuantificación lignina total

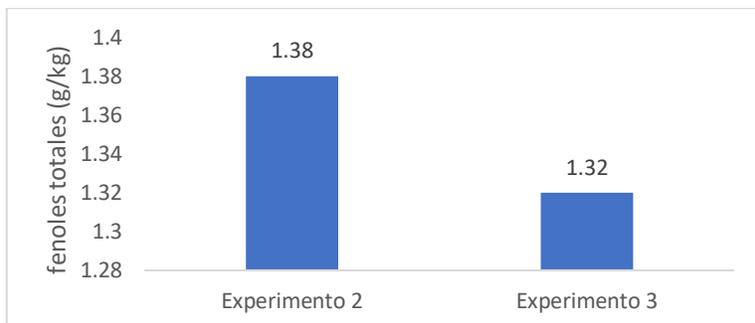
En la Figura 2 se puede observar los resultados expresados en % (g/100g) de la cuantificación de lignina total. En el experimento dos se obtuvo 6.12% y en el experimento 3 11.28 % de lignina total.



**Figura 2.** Cuantificación de lignina total, expresada en % (p/p), en dos diferentes experimentos de obtención.

### 7.3 Cuantificación fenoles totales

En el experimento 2 se obtuvieron 1.378 g/kg de fenoles totales y en el experimento 3 se obtuvo 1.322 g/kg, como se muestra en la Figura 3.

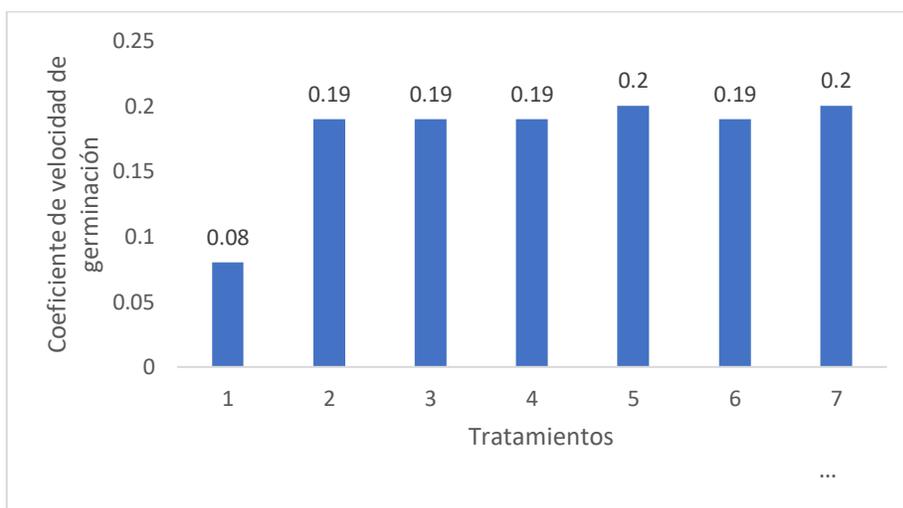


**Figura 3.** Cuantificación de compuestos fenólicos totales, expresada en gramos (g)/ kilo de tejido (p/p), en dos diferentes experimentos de obtención.

### 7.4 Variables de germinación

#### 7.4.1 Coeficiente de Velocidad de Germinación

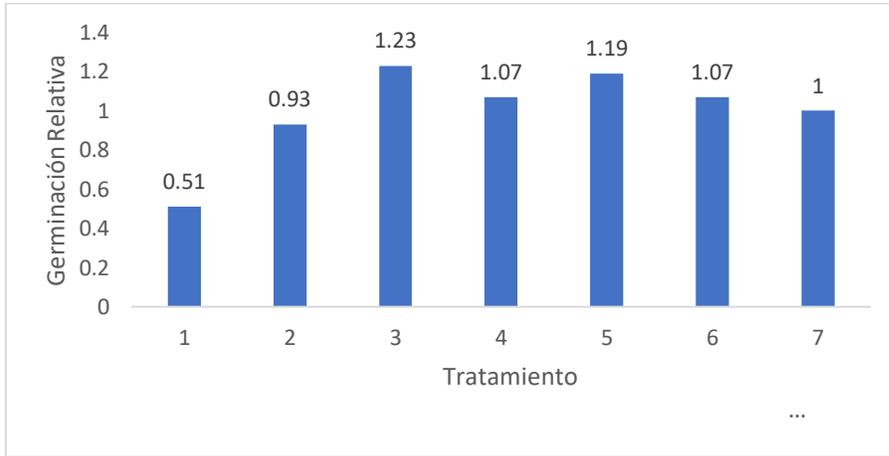
Como se puede observar en la Figura 4, el tratamiento que dio un mayor coeficiente de velocidad de germinación fue el de lignosulfonatos a 50 ppm (tratamiento 5) con un coeficiente de 0.203, mientras que el testigo evidenció un coeficiente de 0.19.



**Figura 4.** Medición de coeficiente de velocidad de germinación respecto a los 7 tratamientos por 7 días.

### 7.4.2 Germinación relativa

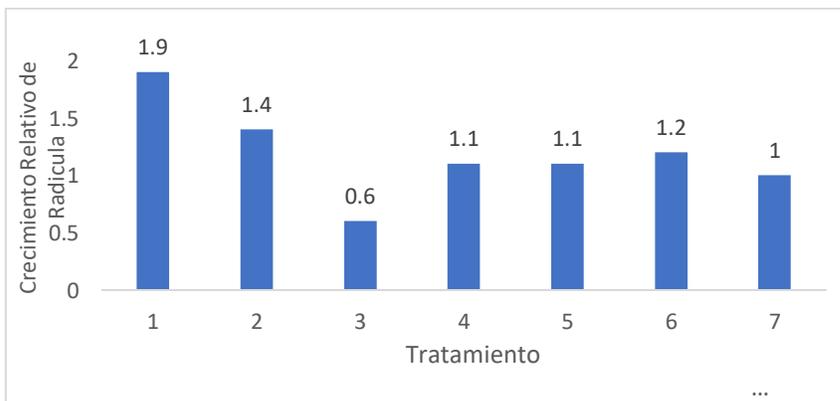
La germinación relativa es un coeficiente que se compara con el testigo, el cuál es 1. Y como se puede observar en la Figura 5, el mayor índice de germinación relativa de semillas fue obtenido con el tratamiento 3, lignina a 100 ppm, el cuál fue de 1.23.



**Figura 5.** Medición del % de semillas germinadas en los 7 tratamientos por los 7 días.

### 7.4.3 Crecimiento relativo de radícula

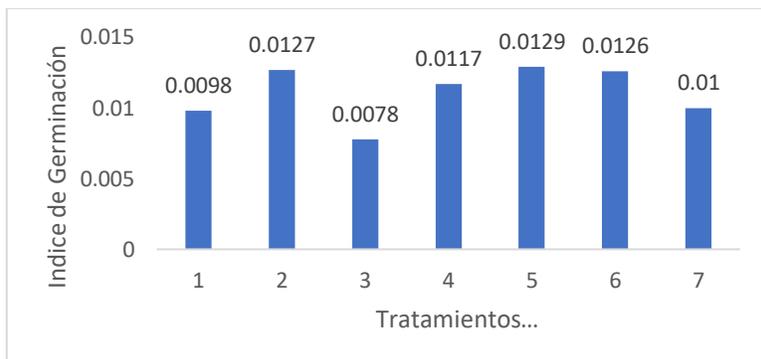
El tratamiento que obtuvo el mayor crecimiento relativo de la radícula fue el 1(lignina 10 ppm) con 1.90%., como se puede observar en la Figura 6.



**Figura 6.** Gráfico de barras del crecimiento relativo de radícula con la aplicación de los diferentes tratamientos de lignina y lignosulfonatos, comparados contra el testigo (tratamiento 7)

#### 7.4.4 Índice de germinación

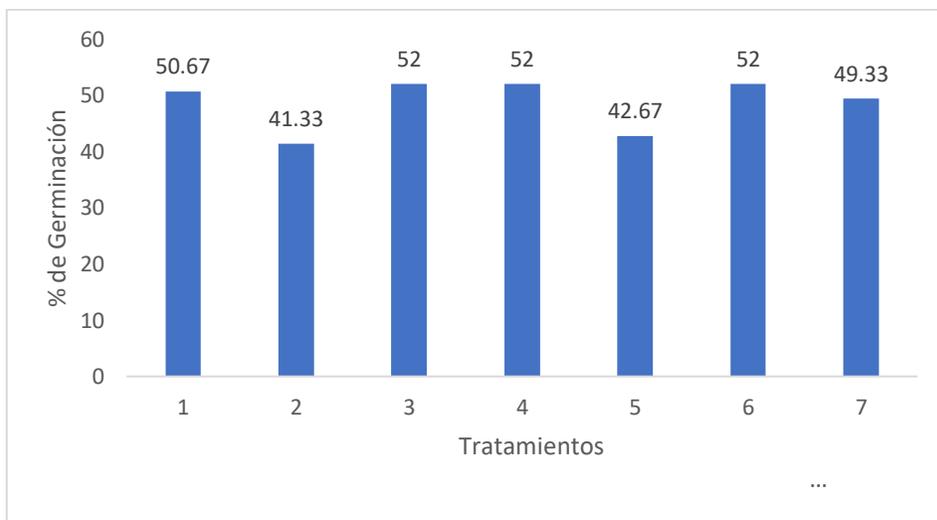
Como se puede observar en la gráfica 7, los tratamientos 5 (lignosulfonatos a 50 ppm) y 2 (lignina 50 ppm) son los que evidenciaron el mayor Índice de germinación.



**Figura 7.** Índice de germinación de las semillas de tomate, tras *el priming* de los diferentes tratamientos.

#### 7.4.5 % de Germinación

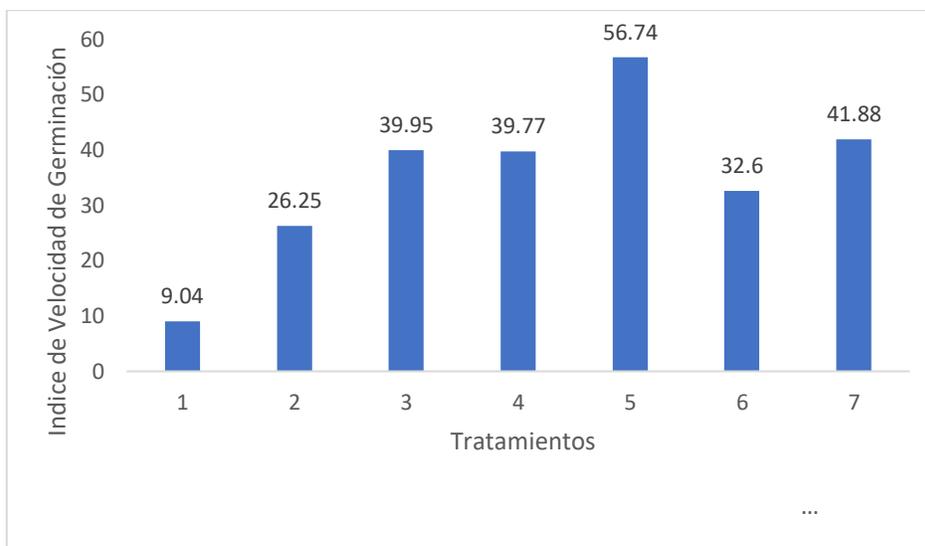
En el experimento de % de germinación, los tratamientos que nos dieron mayor resultado fue el 3 (lignina 100ppm), el 4 (lignosulfonatos 10ppm) y el tratamiento 6 (lignosulfonatos 100 ppm).



**Figura 8.** % de semillas germinadas por cada tratamiento por los 7 días.

#### 7.4.6 Índice de Velocidad de Germinación

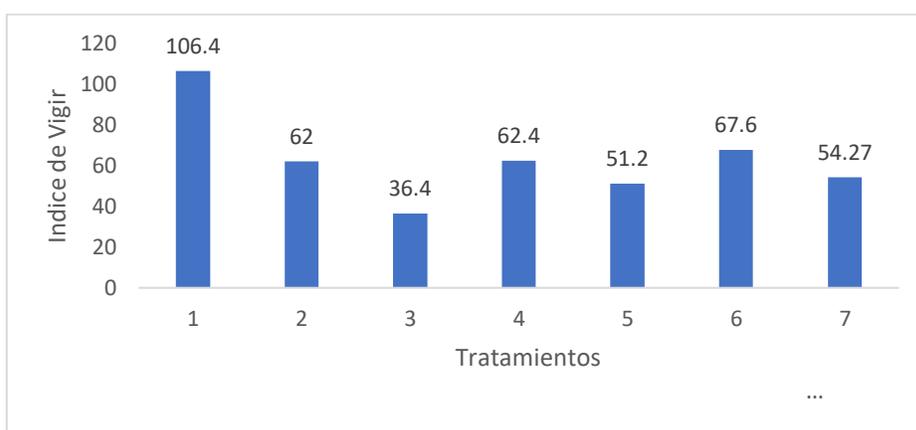
El tratamiento que tuvo una mayor velocidad de emergencia fue el tratamiento 5 (lignosulfonatos 50ppm) con un índice de 56.74, como se puede observar en la Figura 9.



**Figura 9.** Índice de velocidad de emergencia de los 7 tratamientos por los 7 días.

#### 7.4.7. Índice de Vigor

El tratamiento que evidenció un mayor índice de vigor fue el tratamiento 1 (lignina 10ppm) con 106.4 en comparación con el testigo de 54.27, como se puede observar en la Figura 10.



**Figura 10.** Índice de vigor en los 7 tratamientos por los 7 días.

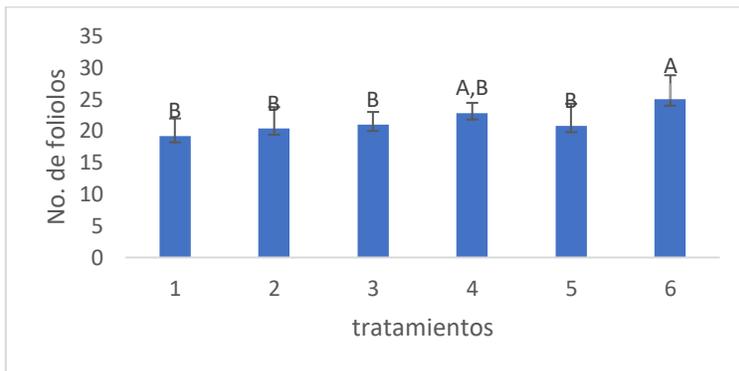
### 7.5 Variables de crecimiento

Los tratamientos que se tomaron para analizar las variables de crecimiento fueron:

1(lignina 100ppm), 2(lignosulfonatos 10ppm), 3(lignosulfonatos 50ppm), 4(lignosulfonatos 100ppm) 5(testigo) y 6(testigo absoluto).

#### 7.5.1. Número de Foliolos.

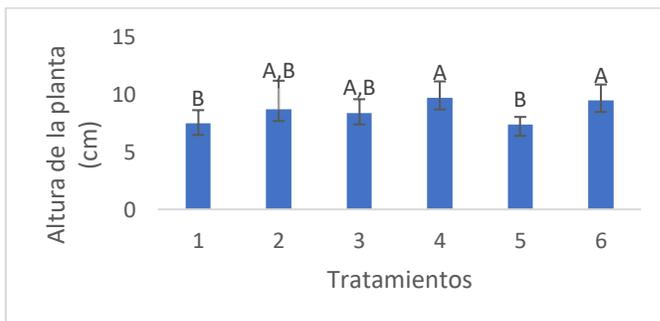
Ningún tratamiento afecto positivamente a la planta respecto a número de foliolos. Sin embargo el testigo imbibido en agua fue el que nos dio mayor número de foliolos.



**Figura 11.** Número de foliolos de las plántulas de tomate de cada uno de los tratamientos y testigos.

#### 7.5.2 Altura de planta

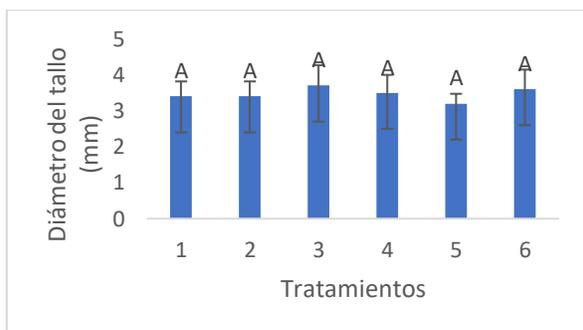
Como se muestra en la figura 12, los tratamientos que nos dieron mayor altura fueron 4 (lignosulfonatos a 100 ppm) y nuestro testigo imbibido en agua, ninguno de nuestros tratamientos fue diferente a nuestro testigo absoluto (5).



**Figura 12.** Altura de las plántulas de tomate tratadas con bioestimulantes y testigo.

### 7.5.3 Diámetro del tallo

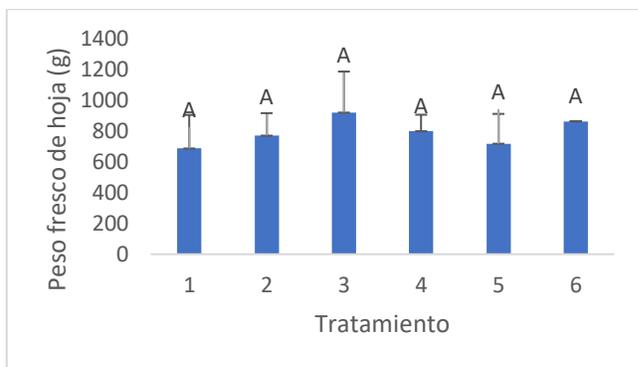
En el diámetro del tallo, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas, pero si se explica de manera simple observando la gráfica, se puede ver que el tratamiento que dio un tallo más grueso fue el tratamiento 3 (lignosulfonatos a 50 ppm) midiendo un promedio de 3.7mm de diámetro.



**Figura 13.** Diámetro del tallo de plántulas de tomate tratadas con bioestimulantes y testigos expresada en mm.

### 7.5.4 Peso fresco de hoja

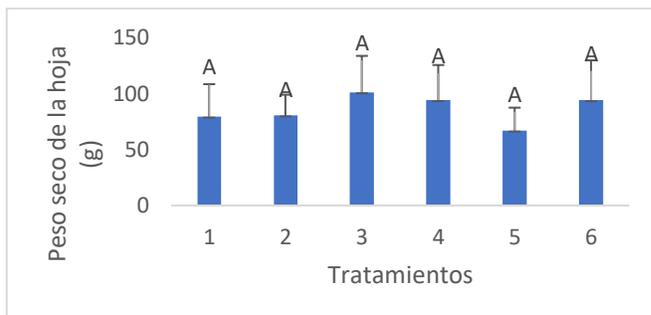
En el peso fresco de la hoja no se observaron diferencias estadísticas en los tratamientos. Pero si se exponen los resultados de su valor numérico el tratamiento con el que se obtuvo más peso fresco en las hojas, sería el tratamiento 3 (lignosulfonatos a 50 ppm) con 919.10 g.



**Figura 14.** Peso fresco de las hojas de las plántulas de tomate tratadas con bioestimulante y testigos.

### 7.5.5 Peso seco de hoja

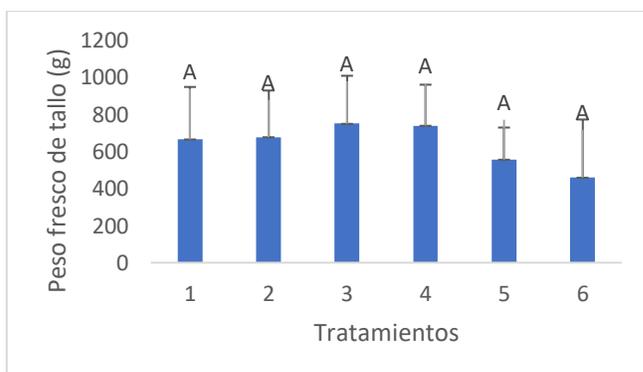
En el peso seco de hoja no se observó ninguna diferencia significativa estadísticamente, pero si se evalúa solo con los datos de la gráfica se observa que el tratamiento 3 (lignosulfonatos a 50 ppm) fue el que nos dio más peso seco con 101.22 g.



**Figura 15.** Peso seco de las hojas de plántulas de tomate tratadas con bioestimulantes y testigos expresadas en gramos.

### 7.5.6 Peso Fresco de Tallo

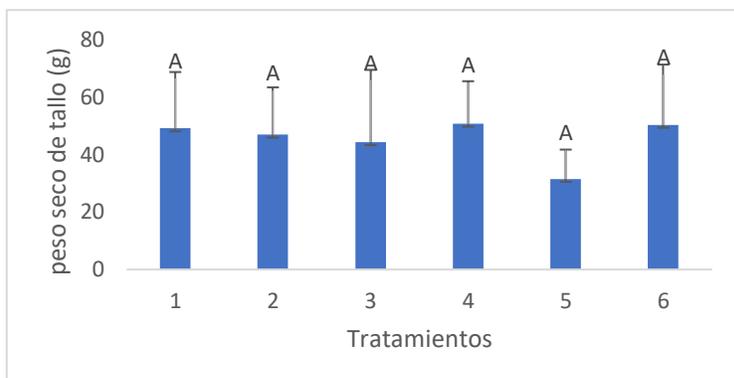
En el peso fresco de tallo no se ven diferencias significativas estadísticamente, pero basándose en el valor numérico se observa que el tratamiento que nos dio más peso fresco del tallo fue el 3 (lignosulfonatos a 50 ppm) con 749.08 g.



**Figura 16.** Peso fresco del tallo de las plántulas de tomate tratadas con bioestimulantes y testigos expresadas en g.

### 7.5.7 Peso Seco del Tallo

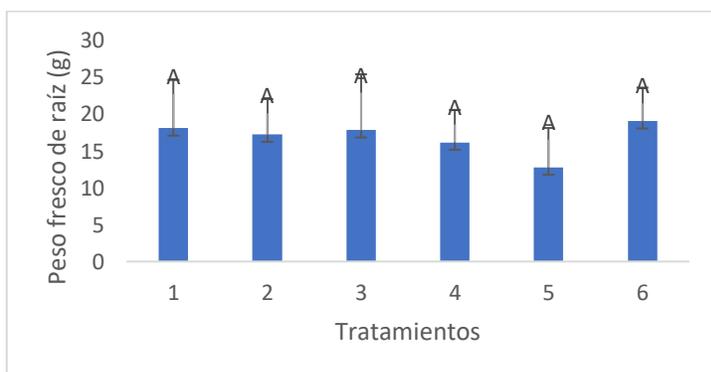
En el peso seco del tallo estadísticamente no se encontraron diferencias significativas, pero en el valor numérico el tratamiento que nos dio más peso fue el tratamiento 4 (lignosulfonatos a 100 ppm) con 50.60 g.



**Figura 17.** Peso seco del tallo de plántulas de tomate tratadas con bioestimulante y testigo expresadas en g.

### 7.5.8 Peso Fresco de Raíz

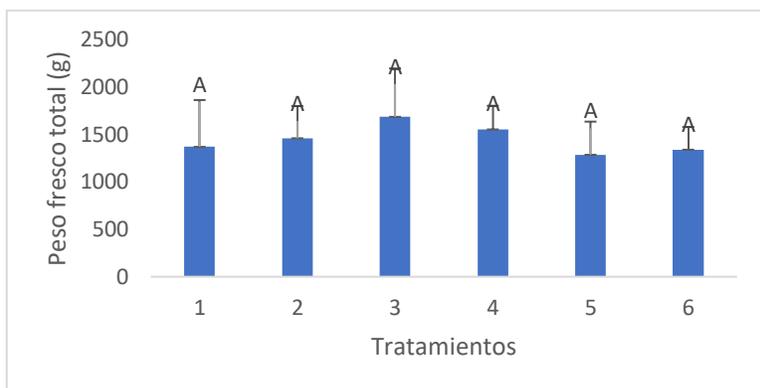
De igual manera en el peso fresco de raíz estadísticamente no se observan diferencias significativas, pero en los datos numéricos se observa que el que dio más peso fresco de raíz fue el 6 (testigo absoluto) con un peso de 19.04 g.



**Figura 18.** Peso fresco de la raíz de plántulas de tomate tratadas con bioestimulantes y testigo expresado en g.

### 7.5.9. Peso Fresco Total.

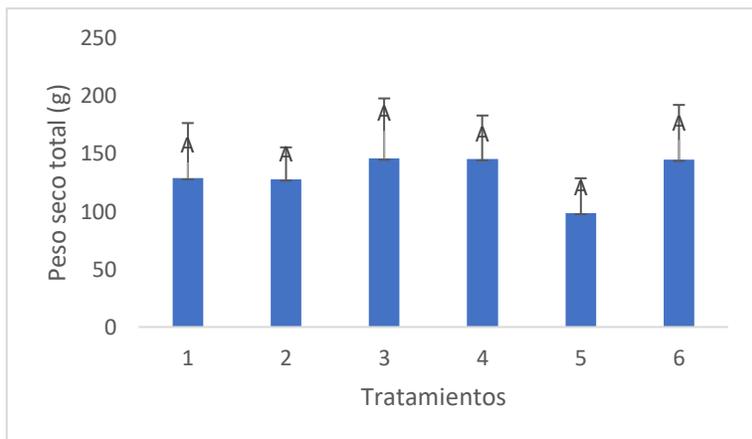
En la variable de peso fresco total de la planta no se encontraron diferencias significativas estadísticamente pero el valor numérico muestra que el tratamiento que dio más peso fresco de la plántula fue el 3 (lignosulfonatos a 50 ppm) con 1686 g.



**Figura 19.** Peso fresco total de toda la plántula de tomate tratadas con bioestimulantes y testigos expresado en g.

### 7.5.10 Peso Seco Total

En el peso seco total no se encontraron diferencias entre tratamientos. Pero en el valor numérico el tratamiento que dio un mayor peso fue el tratamiento 3 (lignosulfonatos a 50 ppm) con 145.42 g.



**Figura 20.** Peso seco total de la plántula de tomate tratada con bioestimulante y testigo expresada en g.

En la Tabla 1 se muestra el compendio de los resultados de las variables de crecimiento tras la aplicación por priming de los distintos tratamientos de lignina y de los lignosulfonatos, así como la del testigo absoluto y por imbibición, y en general se puede observar que, para el estadio de plántulas de 5 semanas posteriores a la siembra, no lograron evidenciarse cambios en biomasa o crecimiento desde la perspectiva estadística.

<b>Tabla 1-</b> Compendio de los resultados obtenidos de las variables de crecimiento de las plántulas de tomate						
<b>tratamiento</b>	<b>nombre</b>	<b># foliolos</b>	<b>altura</b>	<b>diam tallo</b>	<b>pfH</b>	<b>psH</b>
1	L 100	19.2 b	7.48 b	3.4 a	686.4 a	79.5 a
2	Ls 10	20.4 b	8.7 ab	3.4 a	769.78 a	80.58 a
3	Ls 50	21.0 b	8.4 ab	<b>3.7 a</b>	<b>919.10 a</b>	<b>101.22 a</b>
4	Ls 100	<b>22.8 ab</b>	<b>9.7 a</b>	3.5 a	798.48 a	94.3 a
5	testigo abs	20.8 b	7.4 b	3.2 a	717.3 a	67.02 a
6	testigo imbibido	<b>25 a</b>	9.46 a	3.6 a	862.16 a	67.02 a
<b>tratamiento</b>	<b>nombre</b>	<b>Pft</b>	<b>pst</b>	<b>pfr</b>	<b>ptf</b>	<b>pts</b>
1	L 100	664.98 a	49 a	18.08 a	1369.5 a	128.5 a
2	Ls 10	676.96 a	46.8 a	17.23 a	1460.52 a	127.38 a
3	Ls 50	<b>749.08 a</b>	44.2 a	17.82 a	<b>1686 a</b>	<b>145.42 a</b>
4	Ls 100	738.68 a	<b>50.6 a</b>	16.16 a	1553.32 a	144.9 a
5	testigo abs	555.90 a	31.44 a	12.78 a	1285.98 a	98.46 a
6	testigo imbibido	458.88 a	50.24 a	<b>19.04 a</b>	1340.08 a	144.42 a

## VIII. DISCUSIÓN

Para lograr la separación de la lignina del material lignocelulósico de la cáscara de nuez existen una amplia diversidad de métodos físicos, químicos y biológicos (Chávez-Sifontes & Domine, 2013). En el presente trabajo de investigación fue llevado a cabo la técnica de Kraft, la cuál ha sido reportada como la de más alta eficiencia en matrices como la empleada en esta investigación; consistió en someter a altas temperaturas y agregar una base fuerte, en este caso NaOH al 18% y una posterior precipitación con ácido sulfúrico al 6N (Figueiredo, Lintinen, Hirvonen, Kostianen, & Santos, 2018). En donde se obtuvo 6.12% de lignina con el experimento 2 a una proporción de 1:10. En el experimento 3, en el cuál consistió en un proporción 1:20, de precipitado, ácido sulfúrico se obtuvo 11.2% de lignina. Sin embargo, en la literatura se ha reportado entre 40 y 50% de lignina (Figueiredo *et al.*, 2018) en la cáscara de nuez, esta diferencia pudiera ser debida a la técnica exploratoria indirecta que fue utilizada, ya que en lo reportado se usaban técnicas más sofisticadas como los infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR), quimioluminiscencia y espectrofotometría (Agustin-Salazar *et al.*, 2018b).

Respecto al contenido de fenoles totales se obtuvieron en el experimento 2, 1.38 g/kg y en el experimento 3 se obtuvieron 1.32 g/kg que se traduce a 13.8% y 13.2%. En la literatura se reportan de 12 a 16% de fenoles totales en la cáscara de nuez, lo que nos indica que esto concuerda con lo reportado anteriores (de La Rosa, Alvarez-Parrilla, & Shahidi, 2011).

El polímero de la lignina está conformado por monómeros aromáticos, los cuales tienen un efecto antioxidante, gracias a esto tienen un efecto positivo en el metabolismo de las plantas, sin embargo, los lignosulfonatos., los cuales son lignina modificada mediante sulfonación; contienen más grupos aniónicos debido a más grupos sulfuro contenidos, los cuales los hacen más hidrosolubles y por lo tanto biodisponibles (Ertani *et al.*, 2019b).

Se trabajó con variables de germinación como el CVG (coeficiente de velocidad de germinación) este analiza la rapidez de la germinación, su valor aumenta a medida que aumenta el número de semillas germinadas y el tiempo requerido para la germinación disminuye. El índice de germinación es una prueba ampliamente utilizada para evaluar la fitotoxicidad potencial de ciertas sustancias presentes en medio de crecimiento, sustratos, o suelos y se estima considerando el porcentaje de germinación de semillas y elongación de raíces (Sobarzo-Bernal, Gómez-Merino, Alcántar-González, Saucedo-Veloz, & Trejo-Téllez, 2021). El % de germinación relativa representa el porcentaje de semillas germinadas en el agua de los diferentes sitios de estudio con respecto a aquellas germinadas en el testigo. El crecimiento relativo de radícula representa el porcentaje de crecimiento de la radícula de las semillas expuestas a las aguas de los diferentes sitios de estudio con respecto a aquellas del lote testigo (Joseph *et al.*, 2014). El índice de vigor de las semillas ha sido definido como la sumatoria total de aquellas propiedades de las semillas que determinan el nivel de actividad y el comportamiento de las semillas o de un lote de semillas durante la germinación y emergencia de las plántulas (Rita Salinas, Maria Yoldjian, Mario Craviotto, & Bisaro, 2001). El índice de velocidad de germinación es el tiempo transcurrido del momento en que la semilla toca el agua hasta que comienza la elongación de la radícula. (Rita Salinas *et al.*, 2001)

La germinación se vio afectada positivamente en algunas de las variables muy probablemente porque las ligninas que son la base de todo, son resistentes a la hidrólisis

ácida, fácilmente oxidables, solubles en bisulfito o álcalis caliente, y fácilmente condensables con fenoles o tioles (Chávez-Sifontes & Domine, 2013)

El crecimiento es una evidencia de la eficiencia fotosintética, este puede ser medido con diferentes parámetros con los que se destaca la biomasa (Cárdenas M Edgar Eduardo Yáñez A, 2010)

El presente trabajo, la mayoría de estos parámetros de crecimiento número de foliolos, altura, diámetro de tallo, peso fresco de hoja, peso seco de hoja, peso fresco de tallo, peso seco de tallo, peso fresco de raíz, peso fresco total y peso seco total no se vieron afectados por los tratamientos: lignina 100 ppm, lignosulfonatos 10 ppm, lignosulfonatos 50 ppm, lignosulfonatos 100 ppm, testigo absoluto y testigo imbibido en agua. En un futuro se tendrían que volver a probar estos mismos bioestimulantes, pero con un método de extracción diferente, con otras concentraciones y en otras condiciones ya que a pesar de que el uso de lignosulfonatos como bioestimulantes a sido poco explorado, la aplicación de estos ha mostrado eficientes resultados sobre el estrés por salinidad del cultivo de cebada (Elsawy *et al.*, 2022)

#### **IV. CONCLUSIONES**

Fue posible obtener residuos de cáscara de nuez donados por productores de la región.

De aquí se logró extraer lignina y una posterior modificación a lignosulfonatos.

Con la aplicación de ambos bioestimulantes se evidenció un incremento en las variables de germinación, pero no del crecimiento.

Con lignina a 10 ppm se elevó el crecimiento relativo de radícula e índice de vigor. Con lignina a 100 ppm se elevó la germinación relativa y el % de germinación y por último con lignosulfonatos a 50 ppm se elevó el coeficiente de velocidad de germinación, índice de germinación y el índice de velocidad de germinación.

En conclusión, general, se puede fabricar un bioestimulante a base de residuos agroindustriales para mejorar variables de germinación, pero para las variables de crecimiento se tendrían que hacer más pruebas con métodos diferentes y diferentes concentraciones.

## V. BIBLIOGRAFIA

- Agustin-Salazar, S., Cerruti, P., Medina-Juárez, L. Á., Scarinzi, G., Malinconico, M., Soto-Valdez, H., & Gamez-Meza, N. (2018a). Lignin and holocellulose from pecan nutshell as reinforcing fillers in poly (lactic acid) biocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 727–736. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.120>
- Agustin-Salazar, S., Cerruti, P., Medina-Juárez, L. Á., Scarinzi, G., Malinconico, M., Soto-Valdez, H., & Gamez-Meza, N. (2018b). Lignin and holocellulose from pecan nutshell as reinforcing fillers in poly (lactic acid) biocomposites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 727–736. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.120>
- Alonso Rubio, M. Virginia. (2005). *Formulación y curado de resinas fenol-formaldehído tipo “resol” con sustitución parcial del fenol por lignosulfonatos modificados : memoria para optar al grado de doctor.* [Universidad Complutense], Servicio de Publicaciones.
- Aro, T., & Fatehi, P. (2017). Production and Application of Lignosulfonates and Sulfonated Lignin. *ChemSusChem*, 10(9), 1861–1877. <https://doi.org/10.1002/cssc.201700082>
- Campobenedetto, C., Mannino, G., Agliassa, C., Acquadro, A., Contartese, V., Garabello, C., & Berteza, C. M. (2020). Transcriptome analyses and antioxidant activity profiling reveal the role of a lignin-derived biostimulant seed treatment in enhancing heat stress tolerance in soybean. *Plants*, 9(10), 1–19. <https://doi.org/10.3390/plants9101308>
- Cárdenas M Edgar Eduardo Yáñez A, M. M. (s/f). *Power Generation and Use of Biomass at Palm Oil Mills in Colombia.*
- Chávez-Sifontes, M., & Domine, M. E. (2013). LIGNINA, ESTRUCTURA Y APLICACIONES: MÉTODOS DE DESPOLIMERIZACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE DERIVADOS AROMÁTICOS DE INTERÉS INDUSTRIAL LIGNIN, STRUCTURE AND APPLICATIONS: DEPOLYMERIZATION METHODS FOR OBTAINING AROMATIC DERIVATIVES OF INDUSTRIAL INTEREST. En *Av. cien. ing (Vol. 4)*. Chávez-Sifontes & Domine. Recuperado a partir de Chávez-Sifontes & Domine website: [http://www.exeedu.com/publishing.cl/av\\_cien\\_ing/15](http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cien_ing/15)
- Colombia, E., Victoria, L., Gonzalez, P., Montenegro Gómez, S. P., Andrea, P., & Abad, G. (s/f). *Aprovechamiento de residuos agroindustriales Exploitation of agroindustrial waste in Colombia* *Exploração de resíduos agroindustriais na Colômbia.*
- Cu, O.-T. C. (2015). *Revista de Arquitectura e Ingeniería*. 9(1), 1–11. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193948443004>
- de La Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., & Shahidi, F. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of Mexican pecan (*Carya illinoensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 152–162. <https://doi.org/10.1021/jf1034306>
- del Carmen, N., Vázquez, R., & Urrea López, R. (s/f). *Retos y oportunidades para el aprovechamiento de la Nuez pecanera en México.* Recuperado a partir de [www.ciatej.mx](http://www.ciatej.mx)
- Dence, C. W. (1992). The Determination of Lignin. En *In. methods in lignin chemistry* (pp. 33–61). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-74065-7_3)

- du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>
- Duncan, E. G., O'Sullivan, C. A., Roper, M. M., Biggs, J. S., & Peoples, M. B. (2018, septiembre 1). Influence of co-application of nitrogen with phosphorus, potassium and sulphur on the apparent efficiency of nitrogen fertiliser use, grain yield and protein content of wheat: Review. *Field Crops Research*, Vol. 226, pp. 56–65. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2018.07.010>
- Elsawy, H. I. A., Alharbi, K., Mohamed, A. M. M., Ueda, A., AlKahtani, M., AlHusnain, L., ... Shahein, A. M. E. A. (2022). Calcium Lignosulfonate Can Mitigate the Impact of Salt Stress on Growth, Physiological, and Yield Characteristics of Two Barley Cultivars (*Hordeum vulgare* L.). *Agriculture*, 12(9), 1459. <https://doi.org/10.3390/agriculture12091459>
- Ertani, A., Nardi, S., Francioso, O., Pizzeghello, D., Tinti, A., & Schiavon, M. (2019a). Metabolite targeted analysis and physiological traits of *zea mays* L. In response to application of a leonardite-humate and lignosulfonate-based products for their evaluation as potential biostimulants. *Agronomy*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/agronomy9080445>
- Ertani, A., Nardi, S., Francioso, O., Pizzeghello, D., Tinti, A., & Schiavon, M. (2019b). Metabolite targeted analysis and physiological traits of *zea mays* L. In response to application of a leonardite-humate and lignosulfonate-based products for their evaluation as potential biostimulants. *Agronomy*, 9(8), 1–18. <https://doi.org/10.3390/agronomy9080445>
- Figueiredo, P., Lintinen, K., Hirvonen, J. T., Kostianen, M. A., & Santos, H. A. (2018, abril 1). Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. *Progress in Materials Science*, Vol. 93, pp. 233–269. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2017.12.001>
- Florido Bacallao, C., & Fundora, B. (2014). *Cultivos Tropicales*. *Cultivos Tropicales*, 35(3), 70–88. Recuperado a partir de <http://ediciones.inca.edu.cu>
- Francisco Burgos, S. O. (s/f). Caracterización y activación de lignosulfonato de amonio por hidroximetilación.
- Halka, M., Smoleń, S., Ledwozyw-Smoleń, I., & Sady, W. (2019). Comparison of Effects of Potassium Iodide and Iodosalicylates on the Antioxidant Potential and Iodine Accumulation in Young Tomato Plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s00344-019-09981-2>
- Joseph, A., Romero, R., Alberto, C., Salazar, R., Arturo, R., Picos, R., ... Dorantes, A. R. (2014). ÍNDICES DE GERMINACIÓN Y ELONGACIÓN RADICAL DE *Lactuca sativa* EN EL BIOMONITOREO DE LA CALIDAD DEL AGUA DEL RIO CHALMA. En *Rev. Int. Contam. Ambie* (Vol. 30).
- Lavoie, J. M., Baré, W., & Bilodeau, M. (2011). Depolymerization of steam-treated lignin for the production of green chemicals. *Bioresource Technology*, 102(7), 4917–4920. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.010>

- Lengai, G. M. W., & Muthomi, J. W. (2018). Biopesticides and Their Role in Sustainable Agricultural Production. *Journal of Biosciences and Medicines*, 06(06), 7–41. <https://doi.org/10.4236/jbm.2018.66002>
- Loredo Medrano, J. A., Bustos Martínez, D., Rivera De la Rosa, J., Carrillo Pedraza, E. S., Flores-Escamilla, G. A., & Ciuta, S. (2016). Particle pyrolysis modeling and thermal characterization of pecan nutshell. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 126(2), 969–979. <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5541-4>
- Maguire, J. (1962). SPEED OF GERMINATION-AID IN SELECTION AND EVALUATION FOR SEEDLING EMERGENCE AND VIGOR. *Crop Science*, 3–4.
- Mannino, G., Campobenedetto, C., Vigliante, I., Contartese, V., Gentile, C., & Berteà, C. M. (2020). The application of a plant biostimulant based on seaweed and yeast extract improved tomato fruit development and quality. *Biomolecules*, 10(12), 1–19. <https://doi.org/10.3390/biom10121662>
- Martínez-Ruiz, F. E., Cervantes-Díaz, L., Aíl-Catzím, C. E., Hernández-Montiel, L. G., Sánchez, C. L. D. T., & Rueda-Puente, E. O. (2016). Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico. *European Scientific Journal*, ESJ, 12(18), 232. <https://doi.org/10.19044/esj.2016.v12n18p232>
- Masondo, N. A., Kulkarni, M. G., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2018). Influence of biostimulants-seed-priming on *Ceratotheca triloba* germination and seedling growth under low temperatures, low osmotic potential and salinity stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 147(August 2017), 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.017>
- Rita Salinas, A., Maria Yoldjian, A., Mario Craviotto, R., & Bisaro, V. (s/f). Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja (1). En *Pesq. agropec. bras.*
- Romero-Arenas, O., Amaro, J. L., Damián, M. A., Valencia de Ita, M. A., Rivera, A., & Huerta, M. (2017). Biopreparados de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Phytophthora capsici* en el cultivo de tomate de Puebla, México. *ITEA Informacion Tecnica Economica Agraria*, 113(4), 313–324. <https://doi.org/10.12706/itea.2017.019>
- Rouphael, Y., & Colla, G. (2018). Synergistic biostimulatory action: Designing the next generation of plant biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 871(November), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01655>
- Ruwoldt, J. (2020a). A Critical Review of the Physicochemical Properties of Lignosulfonates: Chemical Structure and Behavior in Aqueous Solution, at Surfaces and Interfaces. *Surfaces*, 3(4), 622–648. <https://doi.org/10.3390/surfaces3040042>
- Ruwoldt, J. (2020b). A Critical Review of the Physicochemical Properties of Lignosulfonates: Chemical Structure and Behavior in Aqueous Solution, at Surfaces and Interfaces. *Surfaces*, 3(4), 622–648. <https://doi.org/10.3390/surfaces3040042>
- Sánchez, J., Ramos-Díaz, A., Puc, G. L., Aracely, N., & López, P. (s/f). Establishment of an in vitro germplasm bank of native orchids of the state of Campeche for its sustainable

use View project Development of the research laboratory and testing of Habanero chilli pepper and horticultural products. View project. Recuperado a partir de <https://www.researchgate.net/publication/327644371>

Sobarzo-Bernal, O., Gómez-Merino, F. C., Alcántar-González, G., Saucedo-Veloz, C., & Trejo-Téllez, L. I. (2021). Biostimulant effects of cerium on seed germination and initial growth of tomato seedlings. *Agronomy*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/agronomy11081525>

Valverde, Y., Moreno, J., Quijije, K., Castro, A., Merchán, W., & Gabriel, J. (2020). Los bioestimulantes: Una innovación en la agricultura para el cultivo del café ( *Coffea arábica* L). *Journal of the Selva Andina Research Society*, 11(1), 18–28.

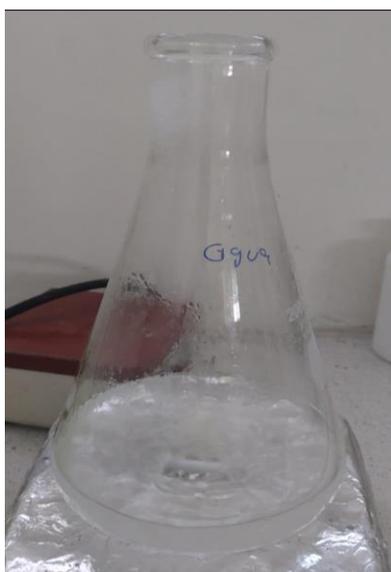
van Oosten, M. J., Pepe, O., de Pascale, S., Silletti, S., & Maggio, A. (2017). The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>

Yakhin, O. I., Lubyantsev, A. A., Yakhin, I. A., & Brown, P. H. (2017). Biostimulants in plant science: A global perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7(January). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.02049>

## ANEXOS



**Figura 21.** Cáscara de nuez molida en mortero y posteriormente en licuadora.



**Figura 22.** Hidroxido de sodio (NaOH al 18%)



**Figura 23.** Conjunto de cáscara de nuez y (NaOH al 18%) en una proporción 1:10 (900 ml).



**Figura 24.** Experimentos de separación por precipitado con ácido sulfúrico 6N en diferentes concentracion .



**Figura 25.** Obtención de extracto de lignina.



