

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



PRODUCCIÓN DE UN BIOESTIMULANTE VEGETAL A BASE DE RESIDUO DE
GRANADO

Tesis

Que presenta GILBERTO ABDÓN AGUILAR

Como requisito parcial para obtener el Grado de:
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Saltillo, Coahuila

Junio 2019

PRODUCCIÓN DE UN BIOESTIMULANTE VEGETAL A BASE DE RESIDUO DE
GRANADO

Tesis

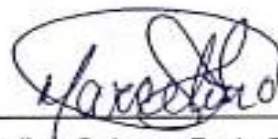
Elaborada por GILBERTO ABDÓN AGUILAR como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Horticultura con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



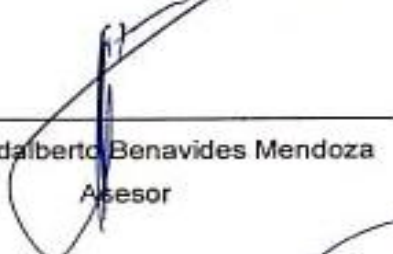
Dr. Armando Robledo Olivo
Asesor Principal



Dra. Susana González Morales
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente
Asesor



Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Asesor



Dr. Antonio Juárez Maldonado
Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente
Subdirector de Postgrado UAAAN

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro** por brindarme un lugar en esta institución, universidad de gran prestigio agronómico en México; por darme las herramientas necesarias para ejercer como todo un profesionalista en el mundo laboral y sobre todo por permitirme llevar en alto el nombre de la universidad.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** por la beca otorgada para la realización de la Maestría en Ciencias en Horticultura.

Al **Dr. Armando Robledo Olivo**, por permitirme formar parte de unos de sus proyectos de investigación, por todo el apoyo brindado y por la motivación de seguir aprendiendo siempre cosas nuevas, ya que sin su valioso apoyo no hubiese sido posible la culminación de este trabajo.

A la **Dra. Susana González Morales** que formó parte vital de este proyecto de investigación, además de la confianza que demostró tenerme.

Al **Dr. Marcelino Cabrera de la Fuente** por su asesoría y apoyo durante la realización del proyecto.

A la **Dr. Adalberto Benavides Mendoza** por los consejos y observaciones realizadas para la culminación en este trabajo de investigación.

Al **Dr. Antonio Juárez Maldonado** por el apoyo incondicional recibido y por la asesoría de los análisis estadísticos del proyecto de investigación realizados.

A mis compañeros de Posgrado: **Marco Villegas, Mónica Morales, Uldarico Bigurra, Tomasa Quiterio** y a **Leonel Espinoza** por convivir estos dos largos años y por brindarme su valiosa amistad.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

A la **Sra. Margarita Aguilar Mendoza** y **Sr. Ángel Abdón González**

Por darme la vida, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy, por estar a mi lado cuando más lo necesite, en los buenos y malos momentos, gracias por mostrarme que todo lo que me proponga lo puedo lograr que con un poco de esfuerzo nada es imposible y que a pesar de estar fuera de casa siempre tuvieron la confianza en mí y por todos esos consejos mis viejecitos; ahora puedo decirles lo logre, el objetivo está cumplido.

A MIS HERMANOS:

A **Wilbert Ángel Abdón Aguilar** mi hermano mayor, mi ejemplo a seguir de la vida, una persona que nunca se da por vencido, a ti te dedico el logro de este trabajo, también a mi hermano menor **Ángel Manuel Abdón Aguilar** por darle ese ejemplo a seguir para que día a día siga superándose académicamente.

A **Eva Carmona Rodríguez** gracias por estar siempre a mi lado en las buenos y malos momentos, porque siempre estuviste dándome ánimos para seguir a delante.

A TODA MI FAMILIA:

Gracias a cada uno de mis primos, primas, tíos, tías, que a pesar de estar tan lejos de casa, siempre estuvieron dándome palabras de aliento para seguir adelante.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
Resumen.....	x
Abstract.....	xii
INTRODUCCIÓN	1
Hipótesis.....	3
Objetivos	3
General.....	3
Específicos	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Cultivo de Tomate.....	4
Bioestimulantes para plantas.....	4
Aminoácidos.....	5
Polisacáridos	5
Polipéptidos.....	5
Hormonas.....	6
Extracto de algas marinas.....	6
Ácidos húmicos	7
Compuestos fenólicos	8
Clasificación de los compuestos fenólicos.....	8
Función de los compuestos fenólicos en las plantas	10
Cultivo de granado y su industrialización.....	11
Producción de compuestos fenólicos por microorganismos	11
Proceso de fermentación microbiana	11
Tipos de aplicación de bioestimulantes en plantas.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Materiales.....	14
Pretratamiento del residuo de granada.....	14

Caracterización de los residuos de la granada	14
Determinación de materia seca total	14
Determinación de ceniza	14
Determinación de grasa	15
Determinación de proteína	15
Determinación de fibra cruda	15
Determinación de fenoles hidrolizables totales	16
Determinación de azúcares totales	16
Determinación de azúcares reductores	16
Proceso de fermentación para obtención de compuestos fenólicos	17
Preparación de medio de cultivo para la fermentación en estado líquido. .	17
Obtención del extracto crudo de fermentación.	18
Análisis proximal de la cáscara de granada	18
Determinación de azúcares totales	18
Determinación de azúcares reductores.....	19
Determinación de fenoles hidrolizables totales	19
Determinación de taninos condensados.....	19
Determinación de la actividad antioxidante	20
Determinación mineral del extracto líquido de fermento de granada	20
Establecimiento del cultivo	21
Ubicación	21
Siembra	21
Transplante	21
Aplicación del extracto al cultivo	21
Evaluación de variables agronómicas y calidad del fruto	21
Licopeno.....	22
Determinación de la actividad antioxidante	22
Análisis mineral del fruto	23
Diseño experimental.....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
Primera etapa	25

Análisis proximal de la cáscara de granada	25
Segunda etapa	26
Cinética de degradación de la cáscara de granada (<i>Punica granatum</i>) ..	26
Tercera etapa	30
Variables agronómicas	30
Calidad de frutos.....	32
Contenido mineral en frutos de tomate	34
CONCLUSIONES	36
REFERENCIAS	37

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Sitios de síntesis de las diferentes fitohormonas en sistemas vegetales.....	6
Cuadro 2. Componentes del medio de cultivo.....	17
Cuadro 3. Contenido fisicoquímico de cáscara de granada en base seca.....	25
Cuadro 4. Análisis mineral, actividad antioxidante, taninos condensados y taninos hidrolizables del extracto fermentado de granada a las 0 y a las 96 horas.....	30
Cuadro 5. Efecto de la aplicación del extracto fermentado de granada en el crecimiento, desarrollo y productividad de plantas de tomate.....	31
Cuadro 6. Calidad de fruto de plantas de tomate tratadas con extracto fermentado de granada.....	33
Cuadro 7. Contenido mineral en frutos de tomate.....	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales componentes y características de las sustancias húmicas.....	7
Figura 2. Estructura y clasificación general de los compuestos fenólicos.....	9
Figura 3. Tipos de riego para la aplicación de bioestimulantes en cultivos hortícolas..	12
Figura 4. A) cinética de producción de azúcares reductores; B) cinética de producción de biomasa de <i>Aspergillus niger</i>	27
Figura 5. C) Cinética de actividad antioxidante; D) cinética de producción de fenoles hidrolizables; E) cinética de producción de taninos condensados; F) cinética de producción de azúcares totales.	29

Resumen

**PRODUCCIÓN DE UN BIOESTIMULANTE VEGETAL A BASE DE RESIDUO
DE GRANADO**

POR

GILBERTO ABDÓN AGUILAR

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO**

DR. ARMANDO ROBLEDO OLIVO - ASESOR-

Saltillo, Coahuila

Junio 2019

Los bioestimulantes son compuestos activos, que ayudan dar una mejor defensa ante factores bióticos y abióticos. En la actualidad, la demanda de productos naturales se ha incrementado debido al aumento a la intolerancia y las reacciones alérgicas hacia los pesticidas utilizados en la agricultura. Debido a esto surge la necesidad de emplear nuevas tecnologías para la producción de compuestos útiles con valor agregado. La alternativa de los bioestimulantes ha tenido un gran impacto en la actualidad, ya que son subproductos de origen vegetal. El objetivo de la presente investigación fue producir mediante tecnologías de la fermentación, un extracto que se aplique como bioestimulante en el cultivo de tomate, para evaluar el efecto en el crecimiento, desarrollo y calidad de los frutos de tomate. Se realizó el monitoreo de la fermentación en estado líquido de la cascara de granada, con la utilización del hongo *Aspergillus niger* para la obtención de un extracto que contenga compuestos fenólicos mayoritarios, y así aplicarlos al cultivo de tomate. Los resultados obtenidos indican que la cáscara de granada es un residuo con buenas características como sustrato para la fermentación en medio líquido y que a las 96 horas del proceso fermentativo se incrementan los taninos condensados (162%), medidos como unidades de catequina. Por otra parte, al aplicar el extracto fermentado de granada se obtiene un aumento del 34% de rendimiento y un 17% en el contenido de licopeno en el fruto de tomate.

Palabras clave: Bioestimulante, Compuestos fenólicos, Fermentación, Tomate

Abstract

PRODUCTION OF A VEGETABLE BIOSTIMULANT BASED ON GRANADA
RESIDUE

BY

GILBERTO ABDÓN AGUILAR

MASTER OF SCIENCES IN HORTICULTURE
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. ARMANDO ROBLEDO OLIVO- ADVISER

Saltillo, Coahuila

June 2019

Biostimulants are active compounds, which help to give a better defense against biotic and abiotic factors. Currently, the demand for natural products has increased due to increased intolerance and allergic reactions to pesticides used in agriculture. Due to this, there is a need to employ new technologies for the production of useful compounds with added value. The alternative of biostimulants has had a great impact at present, since they are by-products of vegetable origin. The objective of the present investigation was to produce by means of fermentation technologies, an extract that is applied as a biostimulant in the tomato crop, to evaluate the effect on the growth, development and quality of the tomato fruits. The monitoring of the liquid state fermentation of the pomegranate shell was carried out, with the use of the *Aspergillus niger* fungus to obtain an extract containing major phenolic compounds, and thus apply them to the tomato crop. The obtained results indicate that the pomegranate husk is a residue with good characteristics as a substrate for fermentation in liquid medium and that at 96 hours of the fermentation process the condensed tannins (162%) are increased, measured as catechin units. On the other hand, when applying the fermented pomegranate extract, an increase of 34% in yield and 17% in the content of lycopene in the tomato fruit is obtained.

Key Words: Biostimulant, Phenolic compounds, Fermentation, Tomato

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas de importancia económica mundial, que representa el 72% del valor de la producción de hortalizas frescas en todo el mundo (Juárez-Maldonado *et al.*, 2015). Es importante mencionar que en todos los sistemas de producción hay condiciones de estrés biótico y abiótico, que afectan la producción y calidad de este cultivo (Kun, 2016). La bacteria Gram positiva *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* causante de la “marchitez” y el “chancro bacteriano” (EPPO, 2016) ha ocasionado pérdidas que van desde el uno al 100% del cultivo (Rueda-Barrientos *et al.*, 2017). Por otra parte, la salinidad, el calor y la sequía, provocan daños importantes a nivel mundial y daños económicos, que impactan directamente en la producción y calidad del fruto de este cultivo (Cuartero *et al.*, 2008).

El 50% de estas hortalizas en los cultivos de Sinaloa y Sonora se ve perjudicada por distintas enfermedades afectando un 60% la venta del producto. En el Valle del Yaqui en el 2017, cuatro de cada diez hectáreas presentaron daños por algunas de las plagas y enfermedades, por ejemplo: moho blanco, pulgón amarillo, moho gris, falsa cenicilla y el tizón temprano que afectan al cultivo del tomate (Ochoa, 2018).

Según las condiciones ambientales adversas, las plantas pueden generar respuestas de adaptación mediante la acumulación de compuestos fenólicos en sus tejidos, mismos que tienen un papel importante en la regulación de diversos tipos de estrés ambiental, como luz alta, bajas temperaturas, infección por patógenos, herbívoros y deficiencia de nutrientes. La acumulación de compuestos fenólicos deriva en la formación de estructuras de lignina, las cuales también pueden actuar como reguladores de estrés biótico y abiótico (Cesarino, 2019)

Los bioestimulantes son compuestos que contienen principios activos, que actúan sobre la fisiología de las plantas incrementando su desarrollo y productividad en la calidad del fruto, contribuyendo a mejorar la resistencia de especies vegetales ante diversas enfermedades, y por lo tanto, aumentando el

rendimiento total del cultivo (González et al., 2015). En los últimos años en el mercado agrícola se han desarrollado este tipo de productos, los cuáles se utilizan para aumentar la calidad, tamaño, color y forma, además de que incrementan el rendimiento en los cultivos, activando el desarrollo de diferentes órganos y reducen los daños causados por el estrés biótico y abiótico, sin importar el contenido nutritivo (Granados, 2015; Du, 2015).

Desde hace varias décadas los residuos agroindustriales han sido un foco de atención para varios investigadores a nivel mundial. Valdez-Vázquez *et al.* (2010), mencionan que, en el año 2006, México produjo 75.73 millones de toneladas de materia seca, de los cuales el 79% corresponden a residuos obtenidos al momento de la cosecha de cultivos como: maíz, sorgo, caña de azúcar, trigo, cebada, frijol y algodón, el resto, corresponden a residuos obtenidos del procesamiento poscosecha, entre los que están: bagazo de caña de azúcar, mazorcas y olotes, bagazo de maguey o agave, así como pulpa de café.

Caballero y Soto (2019), mencionan que solo en la Unión Europea, se desperdician anualmente alrededor de 89 millones de toneladas de biomasa (de las etapas de producción agrícola, poscosecha y de procesamiento) y se espera que este valor aumente en 40% en 2020.

Hipótesis

La aplicación foliar del extracto vegetal generado promoverá mayor crecimiento, desarrollo y producción del cultivo de tomate.

Objetivos

General

- Producir mediante tecnologías de la fermentación, un extracto que se aplique como bioestimulante, en el cultivo de tomate.

Específicos

- Producir un extracto que contenga compuestos fenólicos, mediante la fermentación en líquido de cascara de granada, por el hongo *Aspergillus niger*.
- Evaluar las técnicas de recuperación y preparación del extracto de fermentación, que contengan los compuestos fenólicos mayoritarios.
- Aplicar el extracto generado, en un cultivo de tomate.

REVISIÓN DE LITERATURA

Cultivo de Tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) pertenece a la familia *Solanaceae*, es considerado uno de los principales cultivos a nivel mundial, debido a su elevado potencial alimenticio (Saleem *et al.*, 2015). Es una rica fuente de licopeno, carotenoides, ácido ascórbico, vitamina A, vitamina E, folato, flavonoides y potasio (Poiroux-Gonord *et al.*, 2010) y la demanda de esta hortaliza aumenta de forma permanente (Ortega-Martínez *et al.*, 2010).

En México la superficie destinada a la producción de tomate es de 21.5 millones de ha, lo que representa 587 mil millones de pesos como valor de producción (SIAP, 2017). Ante este panorama y debido a la importancia de este y otros cultivos en México, la tecnificación de los sistemas de producción ha ido en aumento, la superficie destinada a la agricultura protegida pasó de 3,200 ha en 2005 (Ocaña-Romo, 2008) a 40,862 ha en el 2016 y el 44.8% de esta superficie está destinada para la producción de tomates (SIAP, 2016).

Bioestimulantes para plantas

La mejor definición a la actualidad del término bioestimulante, ha sido la descrita por Du (2015), donde describe a un bioestimulante de plantas como cualquier sustancia o microorganismo aplicado a las plantas con el objetivo de mejorar la eficiencia nutricional, la tolerancia al estrés abiótico y/o los rasgos de calidad de los cultivos, independientemente de su contenido de nutrientes. En pocas palabras, se refiere a sustancias que, a pesar de no ser un nutrimento, un pesticida o un regulador de crecimiento, al ser aplicadas en cantidades pequeñas generan un impacto positivo (Sharma *et al.*, 2014). Tal impacto se debe a que están compuestos por sustancias naturales como carbohidratos, péptidos de bajo peso molecular, aminoácidos y diversos metabolitos o biomoléculas, activadores de las funciones fisiológicas de las plantas. La aplicación de bioestimulantes en los cultivos, permite un mejor aprovechamiento de los nutrientes y representa una opción para enfrentar problemas de estrés abiótico (Batista-Sánchez *et al.*, 2015).

Existe una gran cantidad de bioestimulantes disponibles para las prácticas agrícolas, unos químicamente bien definidos (aminoácidos, polisacáridos, polipéptidos, hormonas), y otros más complejos estructuralmente (extractos de algas marinas, ácidos húmicos, compuestos fenólicos).

Aminoácidos

Los aminoácidos son moléculas orgánicas constituidas por un grupo amino (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH). Generalmente, se dice que son los bloques de construcción de las proteínas y que son requeridos para la síntesis de sustratos esenciales de bajo peso molecular (glutación, creatina, serotonina, etc.). Según su método de síntesis pueden ser clasificados en esenciales y no esenciales (Wu, 2013). En los sistemas vegetales, este tipo de sustancias pueden actuar como reguladores de crecimiento al promover, inhibir, o modificar uno o varios procesos fisiológicos en las plantas (Coggins y Lovatt, 2014).

Polisacáridos

Los polisacáridos son moléculas formadas por la unión de varios monosacáridos, los cuales, son los componentes más abundantes en la dieta de la mayor parte de los mamíferos (Voet *et al.*, 2013). Se ha descubierto que estos compuestos participan en gran parte de los procesos biológicos que ocurren en plantas y animales (aparte de la respiración celular aerobia y anaerobia), como son la comunicación célula-célula, señalización por infecciones causadas por la presencia de bacterias y/o virus, e inmunidad celular (Liu *et al.*, 2015).

Polipéptidos

Los polipéptidos son moléculas conformadas con por lo menos 10 aminoácidos, que cuentan con propiedades bioquímicas específicas. Pueden modificar ciertas expresiones genéticas en las plantas para inferir mayor resistencia a ciertos estímulos negativos ambientales o proveer la capacidad de evitar las infecciones por virus y bacterias según sea el tipo estudiado (Rey *et al.*, 2015).

Hormonas

Las hormonas son un grupo de sustancias orgánicas que influyen en los procesos fisiológicos de las plantas (fitohormonas) a bajas concentraciones. Los procesos que se ven más influenciados por estas moléculas son el crecimiento, diferenciación y desarrollo, aunque bajo ciertas circunstancias, el movimiento estomático también puede verse afectado (Davies, 2013). Entre las hormonas más utilizadas hasta la fecha y de efectos más destacables, se encuentran las auxinas, giberelinas, citoquininas, etileno, ácido abscísico, brasinoesteroides, salicilatos, y jasmonatos, aunque gracias a la investigación científica continua se espera encontrar otras hormonas con propiedades distintas, pero que de igual forma, fomenten el aumento del rendimiento en los cultivos hortícolas (Khan *et al.*, 2014). En el Cuadro 1, se puede observar los sitios de síntesis de los reguladores de crecimiento en las plantas.

Cuadro 1. Sitios de síntesis de las diferentes fitohormonas en sistemas vegetales.

Regulador de Crecimiento	Sitios de Síntesis
¹ Auxinas	Polen, meristemas, primordios foliares Hojas jóvenes Semillas y frutos en expansión
² Giberelinas	Semillas en desarrollo
³	Raíces, frutos
⁴ Citoquininas	Tejidos seminales
⁵ Etileno	Todos los tejidos según etapa de desarrollo
⁶ Ácido Abscísico	Hojas (cloroplastos y plastidios)
⁷ Brasinoesteroides	Polen, hojas, flores, semillas, brotes
⁸ Jasmonatos	Meristema apical y radical Hojas jóvenes Frutos inmaduros

¹ (McSteen y Zhao, 2008; ^{2,3,6,7} Srivastava, 2002; ³ Santner y Estelle, 2009; ⁵ Kim *et al.*, 2009).

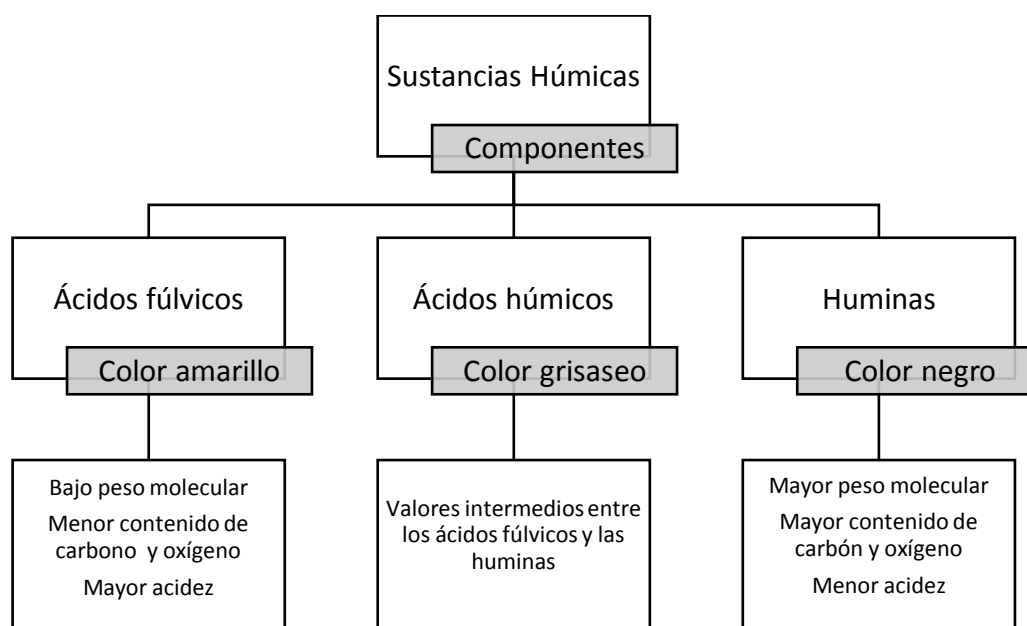
Extracto de algas marinas

El uso de extractos (o suspensiones) de algas marinas incrementa el crecimiento y rendimiento de varios cultivos hortícolas, al mejorar la movilización de nutrientes dentro de la planta, y favorecer el desarrollo de las raíces, mientras aumenta el contenido de clorofila por hoja (Briceño-Domínguez *et al.*, 2014). Similarmente,

influye en la respiración y fotosíntesis neta, síntesis de ácidos nucleicos y absorción de nutrientes del suelo. Estos efectos son atribuidos a la presencia de hormonas, enzimas y oligosacáridos naturalmente presentes en las algas y organismos marinos que actúan como inductores metabólicos que desencadenan las respuestas fisiológicas anteriormente mencionadas (Sharma *et al.*, 2014).

Ácidos húmicos

Las sustancias húmicas (entre ellas los ácidos húmicos) son una categoría de compuestos orgánicos creados a partir de la descomposición y transformación de plantas, animales y residuos microbianos. Son un componente natural de prácticamente cualquier tipo de suelo, aunque su concentración puede variar en función de las prácticas agrícolas que se desarrollen en el área (Brown *et al.*, 2014). Se ha comprobado que la adición de estas sustancias a los suelos agrícolas tiene un efecto de promotor de crecimiento en las plantas que sean cultivadas en la zona debido a los múltiples compuestos que las conforman (Martinez-Balmori *et al.*, 2014). A continuación, en la Figura 1, se presentan los principales componentes y características de las sustancias húmicas.



(Baldotton y Baldotto, 2015; Aimin *et al.*, 2008; Baglieri *et al.*, 2010)

Figura 1. Principales componentes y características de las sustancias húmicas.

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (CF) son metabolitos secundarios sintetizados por las rutas metabólicas Shikimato/fenilpropanoide o acetato-malonato/policétida (Quideau, 2011) al igual que la mayoría de los metabolitos secundarios, los CF son la primera línea de defensa de las plantas (Liu *et al.*, 2019). La principal tarea de los CF es proteger contra el estrés o ataque de patógenos, se caracterizan por tener al menos un anillo de benceno aromático (C6), con sistema conjugado aromático, unido a uno o más grupos hidroxilo libre o sustituido, con una gran diversidad de funciones y estructuras (Cheynier, 2012).

Los CF desempeñan un papel de señalización en la defensa. Por lo regular, se acumulan en las vacuolas centrales de las células protectoras y de las células epidérmicas. También las podemos encontrar en las células sub-epidérmicas de las hojas y los brotes (Dai and Mumper, 2010).

Estos se producen en las plantas mediante la acción secuencial de cinco vías biosintéticas. Las vías glucolíticas y de pentosa fosfato proporcionan precursores (fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato, respectivamente) a la vía del shikimato. La fenilalanina, producida por la vía del shikimato, es el precursor del metabolismo de los fenilpropanoides que, a su vez, alimenta las diversas vías específicas de los flavonoides (Cheynier *et al.*, 2013).

Clasificación de los compuestos fenólicos

Los grupos más importantes de compuestos fenólicos son los flavonoides, los ácidos fenólicos y los polifenoles.

cadena principal C1-C6 ó C3-C6 (Saxena y Saxena, 2012). Los compuestos fenólicos más abundantes en los cereales son los ácidos hidroxicinámicos, siendo el ácido ferúlico el principal, seguido por los ácidos diferúlicos y cumárico, también se ha reportado que el 90% del ácido ferúlico presente en los cereales se encuentra unido a arabinosilanos (AX) por medio de enlaces éster y el resto en forma libre (Scalbert y Williamson, 2000, Nackz y Shahidi, 2006).

En el caso específico de los ácidos fenólicos se producen en plantas a través del ácido shikímico a través de la ruta fenilpropanoidea, como subproductos de la vía del monolignol y como productos de descomposición de la lignina y polímeros de la pared celular en plantas vasculares (Carpita *et al.*, 2000; Croteau, *et al.*, 2000).

No flavonoides: Los no flavonoides, son moléculas que poseen anillos fenólicos con diferentes grupos funcionales (nitrosilo, hidroxilo, etc.), que comprenden estilbenos, alcoholes fenólicos, lignanos y chalconas (Vitaglione *et al.*, 2008).

Función de los compuestos fenólicos en las plantas

El estrés biótico y abiótico puede inducir estrés oxidativo en las plantas, a lo cual los CF son encargados de activar el sistema de defensa antioxidante, siendo el principal mecanismo para la eliminación de las especies reactivas de oxígeno. Este sistema conlleva la producción de compuestos enzimáticos como catalasa, peroxidasa, ascorbato peroxidasa, superóxido dismutasa y glutatión reductasa, así como compuestos no enzimáticos como ascorbato, glutatión, flavonoides, compuestos fenólicos, tocoferol y carotenoides (Schützendübel y Polle 2002; Mittler *et al.*, 2004; Gratao *et al.* 2005).

Los CF, pueden inhibir el crecimiento de *Xylella fastidiosa* (bacteria fitopatógena de muchas especies de cultivo) en condiciones in vitro (Maddox *et al.*, 2010). El ácido p-coumarico y kaempferol presentes en los extractos de la cáscara de una mezcla de tres cultivares chilenos de *Vitis vinífera*, han sido reportados con potencial contra *Botrytis cinerea* (Mendoza *et al.*, 2013). También el resveratrol, el ácido gálico y el ácido ferúlico se han reportado contra *Botrytis cinérea* con buenos resultados (Apolonio-Rodríguez, 2017).

Cultivo de granado y su industrialización

La granada (*Punica granatum* L.) es un pequeño árbol frutal caducifolio nativo de Irán (Al-Said *et al.*, 2009). La producción en México de granada roja en el 2010 alcanzó un volumen de 4,371.37 toneladas obtenidas en una superficie de 685 hectáreas. Fueron los estados de Oaxaca, Sonora, Hidalgo y Guanajuato los que aportaron el 77% de la producción, aunque también se cultiva en menor cantidad en los estados de Coahuila, Morelos, Puebla, Michoacán, Jalisco entre otros (OEIDRUS, 2010).

Gran parte de su importancia organoléptica y posible papel beneficioso para la salud, se debe a la presencia de compuestos fenólicos, ya que, a nivel organoléptico, los antocianos son los responsables de su atractivo color rojo y los taninos de su sabor astringente (siendo los ácidos orgánicos, cítrico y málico, los responsables del sabor acidulado), mientras que los elagitaninos y, en menor proporción, los antocianos le confieren propiedades antioxidantes. Se presentan compuestos antioxidantes en todo el árbol de granado: corteza, raíz, hojas, flores y frutos (Gil *et al.*, 2000).

Producción de compuestos fenólicos por microorganismos

Evidencias demuestran que la cascara de la granada es un excelente sustrato para la producción microbiana de metabolitos secundarios de alto interés comercial, como el ácido elágico, debido a la degradación del contenido de elagitaninos (Robledo *et al.*, 2018; Sepúlveda 2018; Verotta, 2018; Gullon 2016; Robledo *et al.*, 2008). Por otra parte, Balde (2014), al comparar los extractos y jugos de la granada, se observó que el extracto contiene mayor acumulación de compuestos fenólicos. Además, el grupo mayoritario que se presentó fueron los elagitaninos y el ácido elágico. Estos compuestos atribuyen grandes propiedades antioxidantes a los extractos vegetales.

Proceso de fermentación microbiana

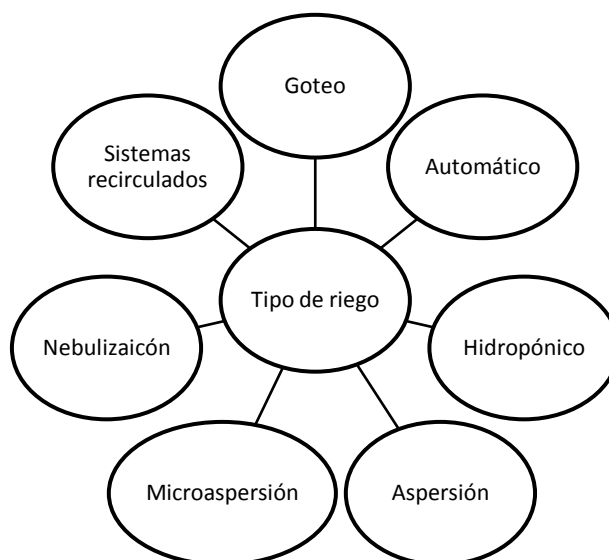
La fermentación es el proceso en el que los microorganismos producen biomasa y metabolitos a partir de la utilización de materia orgánica, en ausencia o

presencia de oxígeno (Hernández, 2003). La fermentación en estado líquido es el método más utilizado en la industria, debido a la facilidad de manejo, donde pueden controlarse muchas más variables que en otros procesos y el producto final es mucho más fácil de recuperar. Este tipo de fermentación presenta la ventaja de mantener mayor homogeneidad, mayor facilidad de controlar los factores del proceso (temperatura, aireación, agitación y pH), presenta mejor distribución del oxígeno y del calor suministrado al sistema y se puede llevar a cabo la medición directa de la biomasa (Cruger y Cruger, 1989).

Tipos de aplicación de bioestimulantes en plantas

A grandes rasgos, se dice que existen tres tipos de formas de aplicar bioestimulantes y agentes quelantes a los sistemas vegetales, en el suelo para fomentar su absorción radicular, directo al follaje de la planta afectada, y por medio del agua de riego para asegurar su transporte junto con los fertilizantes naturalmente añadidos. En la Figura 3, podemos observar los diferentes tipos de riego que se utilizan para la aplicación de bioestimulantes en cultivos hortícolas.

Figura 3. Tipos de riego para la aplicación de bioestimulantes en cultivos hortícolas.



a) Suelo (radicular)

Los bioestimulantes y agentes quelantes añadidos directamente al suelo pueden incrementar la habilidad de las plantas para asimilar los nutrientes aplicados, o beneficiar en general su desarrollo. Aparte de esto, y por su capacidad para atraer y movilizar nutrientes, pueden enriquecer el suelo y fomentar la movilización de sustancias que permitan una mejor respuesta en la planta. Por último, algunos estudios les atribuyen la capacidad de aumentar la diversidad microbiológica en la rizósfera del sistema vegetal (Calvo *et al.*, 2014).

b) Directa (follaje)

La aplicación directa de bioestimulantes en el follaje de la planta incrementa significativamente el rendimiento del cultivo al ser comparado con otros métodos de contacto, ya que se cree que las moléculas que componen a estas sustancias (vitaminas, citoquininas, auxinas y aminoácidos) son aprovechadas en mayor proporción por ingresar al sistema vegetal de forma inmediata sin tener que atravesar el sistema vascular como al ser aplicados en riego o suelo (Zodape *et al.*, 2011). Sin embargo, el modo de acción en la mayoría de estos casos es aún desconocido, por lo que el resultado de la afirmación anterior podría variar respecto al tipo de extracto utilizado (Saa *et al.*, 2015).

c) Riego

Comúnmente, se dice que el riego directo combina ambos tipos de aplicación de bioestimulantes, foliar y en suelo, obteniendo el beneficio de una mayor dispersión de la sustancia activa, aunque pudiendo perderse gran parte de estos compuestos al ser depositados en muestras de suelo en donde las raíces de la planta no alcanzan a contactar. Esto genera pérdidas económicas al desperdiciar parte de la sustancia activa pero debido a su facilidad de aplicación cada vez se adopta más esta técnica (Roberts *et al.*, 2015).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizaron: residuo de granada, obtenido de una empresa productora de jugo de granada de la ciudad de Cuatro Ciénegas, Coahuila; y el microorganismo *Aspergillus niger*, adquirido del Laboratorio de Fermentaciones del Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos, de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Pretratamiento del residuo de granada

El residuo obtenido fue sometido a un proceso de deshidratación a 70°C durante 48 horas. Se pulverizó y se tamizó con tamaño de mallas 10-30, para separar las partículas de acuerdo con su tamaño. Las muestras se conservaron en bolsas herméticas a temperatura ambiente.

Caracterización de los residuos de la granada

Determinación de materia seca total

Se colocó un gramo de polvo de granada en una Termobalanza PRECISA XM50 a 120°C durante 60 minutos hasta obtener un peso constante en la muestra. Con ello se obtuvo la materia seca total, y se obtuvo la humedad con la diferencia de peso de la muestra.

Determinación de ceniza

La determinación se realizó por la metodología descrita por la AOAC (1992). Se pesaron dos gramos de polvo de granada en un crisol de porcelana (previamente sometido a peso constante) en una estufa de secado a una temperatura de 105°C por 24 horas. Posteriormente, se carbonizó la muestra con una parrilla eléctrica a 250°C por una hora, para después introducirla en una mufla a 500°C por cinco horas.

Determinación de grasa

La determinación se realizó por la metodología descrita por la AOAC (1992). Se pesaron cinco gramos de polvo de granada y se envolvieron en un papel filtro. Posteriormente, se introdujo a un sifón que se unió a un matraz bola de fondo plano en el cual se adicionaron 150 mL de hexano. La parte superior del sifón se conectó a un refrigerante y la muestra se mantuvo en reflujo durante cuatro horas a 80°C. Consecutivamente, se evaporó el hexano del matraz y se sometió a secado a 70°C por dos horas. Después se transfirió la muestra a un desecador, para tomar el peso en una balanza.

Determinación de proteína

La determinación se realizó por la metodología descrita por la AOAC (1992). Se colocó 0.1 gramo de polvo de granada en papel filtro y se introdujo en un matraz de fondo redondo con cuello largo. Se añadieron 4 mL de solución digestora, sometiendo la muestra en el digestor Kjeldahl a 100°C, girando constantemente la muestra evitando evaporar la solución digestora.

Posteriormente se pasó la muestra en Micro-Kjeldahl (destilación), donde se agregó la mitad de la muestra NaOH al 50% y se esperó el destilado sumergiendo el frasco de recepción en 30 mL de ácido bórico al 2%, al que se le agregaron dos gotas de indicador de proteína. Una vez observado el cambio de color a verde cristalino y obteniendo 60 mL de muestra se pasó a titular con ácido sulfúrico al 0.026 N.

Determinación de fibra cruda

La determinación se realizó por la metodología descrita por la AOAC (1992). Se pesó la bolsa donde se colocó un gramo de polvo de granada, sellándose perfectamente y sumergiéndose en éter de petróleo por 10 minutos. Posteriormente, se analizó en el equipo ANKOM 200, FIBER ANALYZER, con agitación a una temperatura de 100°C por 40 minutos, añadiendo consecutivamente dos litros de H₂SO₄ al 0.255 N. Para retirar el residuo, se realizaron dos lavados con agua caliente por 5 minutos. Se realizó un tercer

lavado con NaOH al 0.313 N a 100°C por 40 minutos, para posteriormente realizar tres lavados con agua caliente por 5 minutos. Al terminar los lavados, la muestra se sumergió en acetona cubriéndola por completo durante 10 minutos, para retirar cualquier exceso de grasa. La muestra se colocó en una estufa YAMATO DKN602C a una temperatura de 105°C por 72 horas. Se trasladó la muestra en un crisol a un desecador para registrar el peso de la muestra. Finalmente, la muestra se calcinó a 500°C por 5 horas en la mufla FELISA y se tomó el peso de la ceniza.

Determinación de fenoles hidrolizables totales

Para la determinación se utilizó la metodología descrita por Yu y Dahlgren, (2000). Se pesaron 0.25 gramos de polvo de granada, diluyendo en 25 mL de agua destilada. Se adicionaron 800 µL de la muestra en un tubo de ensaye. Después se añadieron 800 µL del reactivo Folin Ciocalteu, dejándolo reaccionar por 5 minutos. Enseguida se agregaron 800 µL de carbonato de sodio anhidrido al 0.01 M, dejándolo reposar durante 5 minutos. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Thermo Fisher G10S Uv-Vis a 790 nm, teniendo como estándar el ácido gálico al 1%.

Determinación de azúcares totales

La determinación se realizó por la técnica de Dubois (1956). Se pesaron 0.25 gramos de polvo de granada y se diluyó en agua destilada, se tomaron 250 µL de la dilución y se colocaron en un tubo de cuarzo. Después se agregaron 250 µL de fenol al 5%, dejando a baño de agua fría durante 5 minutos. Posteriormente se añadió un mL de H₂SO₄ y se dejó a ebullición durante cinco minutos. Por último, la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos y se procedió a leer la muestra en un espectrofotómetro Thermo Fisher G10S Uv-Vis a una absorbancia de 480 nm.

Determinación de azúcares reductores

La determinación se realizó por la técnica de Miller (1989). Se pesaron 0.25 gramos de polvo de granada y se diluyó, homogenizando la muestra. Se tomó un mililitro de la dilución y se colocó en un tubo de cuarzo, añadiendo un mililitro de reactivo DNS, posteriormente se pasó a baño maría durante 5 minutos a 90°C. Por último, se colocó en baño de agua fría por 5 minutos para detener la reacción y se añadieron 5 mililitros de agua destilada, dejando reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Thermo Fisher G10S Uv-Vis a una absorbancia de 540 nm.

Proceso de fermentación para obtención de compuestos fenólicos

Preparación de medio de cultivo para la fermentación en estado líquido

Se prepararon dos litros de medio de cultivo, disolviéndose las sales en agua destilada en proporciones que se presentan en la Cuadro 2. Posteriormente se esterilizó en la autoclave Tetraium BKQ-B50II a 121°C durante 15 minutos.

Cuadro 2. Componentes del medio de cultivo

Sales	g/L
KH ₂ PO ₄	4.38
Urea	8.76
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.88
CaCl ₂	0.09
MnCl ₂ •4H ₂ O	0.02
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.01
FeSO ₄ •7H ₂ O	0.12

En matraces Erlenmeyer de 250 mL, se agregaron 1.25 g de polvo de cáscara de granada, 50 mL de medio de cultivo y se inoculó el microorganismo a una concentración de 1x10⁶ esporas/mL de medio de cultivo. Para el monitoreo de degradación del residuo de la granada, se evaluó cada 24 horas hasta las 240 horas totales, tomando un matraz en cada tiempo de muestreo (el muestreo se

realizó por triplicado). Las muestras se colocaron en incubación en un agitador orbital con control de temperatura (INNOVA 44) a 30°C y 175 rpm.

Obtención del extracto crudo de fermentación.

Para la obtención del extracto crudo de la fermentación, se realizó un filtrado a las muestras, para lo cual se utilizó un embudo de porcelana al que se le colocó papel filtro FAGA-LAB del número uno con un tamaño de poro de 11 µm y para la recepción del extracto filtrado se colocó un matraz Kitazato conectado a una bomba de vacío (millipore). Este proceso únicamente se realizó para la separación de la biomasa generada por el hongo *Aspergillus niger* en el proceso de fermentación.

La biomasa fresca obtenida se pesó con una balanza analítica Ohaus Pioneer PA214 y se registró el peso obtenido. Posteriormente, esta se llevó a peso constante, mediante una estufa de secado RIOSSA E-71 a 70°C y también se realizó el registro del peso obtenido. La biomasa generada por el microorganismo se obtuvo por diferencia de peso. Las muestras se evaluaron durante 240 horas totales, tomando una muestra cada 24 horas.

Para la obtención del extracto crudo final, se colocaron las muestras en tubos cónicos de 15 mL y se centrifugaron a 12000 rpm durante cinco minutos, recuperando el sobrenadante. Por último, se realizó una filtración, en el cual se utilizaron jeringas de 10 mL y filtros pirinola de 0.45 µL. El líquido obtenido se refrigeró a 4°C para su posterior análisis.

Análisis proximal de la cáscara de granada

Determinación de azúcares totales

La determinación se realizó por la técnica de Dubois (1956). Se colocó un mililitro de extracto líquido de fermento de granada en un tubo de cuarzo. Después se agregaron 250 µL de fenol al 5%, dejando a baño de agua fría durante 5 minutos. Posteriormente se añadió un mililitro de H₂SO₄ y se dejó a ebullición durante cinco minutos. Por último, la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente por 5 minutos y se procedió a leer la muestra en un espectrofotómetro Thermo Fisher

G10S Uv-Vis a una absorbancia de 480 nm. Las muestras se evaluaron durante 240 horas totales, tomando una muestra cada 24 horas.

Determinación de azúcares reductores

La determinación se realizó por la técnica de Miller (1989). Se colocó un mililitro de extracto líquido de fermento de granada en un tubo de cuarzo, añadiendo un mililitro de reactivo DNS, posteriormente se pasó a baño maría durante 5 minutos a 90°C. Por último, se colocó en baño de agua fría por 5 minutos para detener la reacción y se añadieron 5 mililitros de agua destilada, dejando reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Thermo Fisher G10S Uv-Vis a una absorbancia de 540 nm. Las muestras se evaluaron durante 240 horas totales, tomando una muestra cada 24 horas.

Determinación de fenoles hidrolizables totales

Para la determinación se utilizó la técnica descrita por Yu y Dahlgren (2000). Se colocó un mililitro de extracto líquido de fermento de granada en un tubo de ensaye. Posteriormente, se añadieron 800 µL del reactivo Folin Ciocalteu, dejándolo reaccionar por 5 minutos. Enseguida se agregaron 800 µL de carbonato de sodio anhídrido al 0.01 M, dejándolo reposar durante 5 minutos. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Thermo Fisher G10S Uv-Vis a 790 nm, teniendo como estándar el ácido gálico al 1%. Las muestras se evaluaron durante 240 horas totales, tomando una muestra cada 24 horas.

Determinación de taninos condensados

Para la determinación se utilizó la técnica de HCl-Butanol (Swain y Hillis, 1959; Ventura-Sobrevilla, 2006). Se prepararon los siguientes reactivos: Sulfato férrico de amonio, HCl-Butanol al 10% y catequina como estándar. En tubos de ensaye se colocó un mililitro de extracto líquido de fermento de granada, consecutivamente se le agregaron 3 mL de HCl-Butanol y 0.1 mL de reactivo férrico. Los tubos se taparon, para evitar la evaporación del metanol. Las muestras fueron calentadas por una hora en baño maría a 95°C. Una vez

transcurrido el tiempo, se dejó enfriar y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro Thermo Fisher G10S Uv-Vis a 460 nm.

Determinación de la actividad antioxidante

Para la determinación de la actividad antioxidante se utilizó la técnica de DPPH. Se preparó el radical DPPH a una concentración de 60 μM , en una solución metanólica. Para la curva estándar se utilizó una solución madre a una concentración a 1000 ppm de Trolox, de la cual se prepararon diferentes diluciones. Para la lectura de las muestras, se colocaron 7 μL del blanco, los puntos de la curva estándar y las muestras de los diferentes tiempos de la fermentación (0, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216 y 240 horas) en la microplaca. Posteriormente a cada muestra se le agregaron 193 μL de la solución DPPH-metanol. Se cubrió la microplaca con papel aluminio para evitar el contacto con la luz y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Para la lectura de las muestras se utilizó un lector de microplaca Biotek ELx808 a una absorbancia de 540 nm. Las muestras se evaluaron durante 240 horas totales, tomando una muestra cada 24 horas.

Determinación de minerales en el extracto líquido de fermento de granada

La determinación mineral del extracto fermentado de granada se realizó por la empresa Fertilab. Para esto se tomaron seis tiempos del extracto fermentado, los tiempos fueron: 0, 48, 96, 144, 192 y 240 horas. De cada uno de los tiempos se tomó un volumen de 31 mL y se aforó a 500 mL, teniendo un total de seis muestras por analizar.

Para el envío de las muestras se utilizaron frascos de plástico de 500 mL en los cuales se colocaron las muestras a analizar, estas fueron identificadas con el tiempo de fermentación que le correspondían a cada una.

Los minerales que se mandaron a analizar fueron: Fósforo (P), Potasio (K), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Sodio (Na), Hierro (Fe), Cobre (Cu), Manganeso (Mn), Zinc (Zn) y Boro (B). El método empleado para el análisis mineral por Fertilab fue el de digestión en microondas/ICP. El método empleado para la determinación de

fosforo de nitrógeno total fue el de Dumas y para la determinación de azufre (S) por el método de Digestión en microondas / Turbidiometria.

Establecimiento del cultivo

Ubicación

La presente investigación se realizó en un invernadero, ubicado en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo, Coahuila, México (25°21'5" de latitud norte y 101°1'47" de longitud oeste, Elevación 1,742 msnm), en el Departamento de Horticultura.

Siembra

Se utilizó semilla de tomate de la variedad Sun 7705 (Numhems) de crecimiento indeterminado. Se llenó una charola de poliestireno de 200 cavidades con una mezcla de perlita-peat moss (v:v 1:1), colocando una semilla por cavidad.

Trasplante

El trasplante se realizó un mes después de la siembra, para lo cual, se llenaron bolsas negras de polietileno de 10 litros de capacidad con una mezcla 1:1 de perlita-peat moss. El riego se aplicó mediante un sistema de riego dirigido, usando la solución nutritiva (Steiner, 1961) para nutrir el cultivo.

Aplicación del extracto al cultivo

La aplicación del extracto fermentado de granada se realizó vía foliar, mediante la utilización de atomizadores. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: T1= agua, T2= 0.750 L/Ha, T3= 1.5 L/Ha, T4= 3L/Ha. Se realizaron tres aplicaciones: la primera aplicación se realizó en la etapa de crecimiento y desarrollo a los cinco días después del trasplante (DDT), la segunda aplicación (etapa de floración) a los 20 DDT y la tercera aplicación a los 35 DDT (llenado de frutos).

Evaluación de variables agronómicas y calidad del fruto

Las variables agronómicas evaluadas fueron las siguientes: altura (cm), diámetro de tallo (mm), número de hojas, biomasa aérea fresca y seca (g), biomasa radicular fresca y seca (g) y rendimiento (g). La evaluación de las variables de altura, diámetro de tallo y número de hojas se realizó 24 horas después de la aplicación de los tratamientos (primera aplicación: crecimiento y desarrollo; segunda aplicación: floración; tercera aplicación: llenado y cuajado de fruto), las variables faltantes se evaluaron al final del cultivo. Por otra parte, el rendimiento se determinó de acuerdo al desarrollo de la planta, contabilizando el peso de frutos obtenidos al momento de la madurez fisiológica, realizando la contabilización final hasta el segundo racimo de producción (100 DDT).

Las variables evaluadas de calidad de fruto fueron: firmeza, sólidos solubles totales, acidez titulable, pH, licopeno, potencial antioxidante (DPPH) y también se realizó un análisis mineral. Se realizó la colecta de 24 frutos 60 DDT, estos frutos fueron de tamaño uniforme sin daños físicos colectándose en la etapa 6 (rojo claro) de la madurez de acuerdo a la escala visual USDA, 1997. Realizando las siguientes evaluaciones: la firmeza de fruto se determinó con un penetrómetro manual (WAGNER INSTRUMENTS, modelo FDK 20, Greenwich, CT, EE. USA). El pH se determinó usando un potenciómetro digital HI 98130 (Hanna Instruments). Los sólidos solubles totales (SST) se midieron colocando una gota de jugo del tomate en la lente de un refractómetro digital (ATAGO, MASTER – 100Hmodel, Bellevue, WA, EE. USA). La acidez titulable se determinó mediante la técnica de colorimétrica *Official Methods of Analysis of the AOAC*, (1990) y los datos se expresaron en porcentaje de ácido cítrico. Las variables de licopeno, potencial antioxidante y análisis mineral se determinaron con sus técnicas descritas a continuación.

Licopeno

La determinación se realizó por el método descrito por Nagata y Yamashita, (1992). Se pesaron 100 mg de fruto liofilizado y se colocaron en tubos eppendorf

de 2 mL y se le agregaron 20 mg de polivinil pirrolidona (PVP-estabilizador de enzimas). Posteriormente se agregaron 1.5 mL hexano: acetona (v/v 1:1), después las muestras se sometieron a centrifugación a 12 500 rpm por 10 minutos a 4 °C en una microcentrífuga (Model: FC5515R, OHAUS), el sobrenadante se recolecto y se filtró con una membrana de nylon. La lectura se realizó en un espectrofotómetro Thermo Fisher G10S Uv-Vis a 472 nm.

Determinación de la actividad antioxidante

Para la extracción, se pesaron 100 mg de fruto liofilizado y se le agregaron 1.5 mL metanol. Las muestras se agitaron en vórtex durante 20 segundos, después se sonicaron por 10 minutos y posteriormente se sometieron a centrifugación a 12500 rpm por 10 minutos a 4°C en una microcentrífuga (Model: FC5515R, OHAUS), el sobrenadante se recolecto y se filtró con una membrana de nylon. Se utilizó la técnica de DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) y esto se realizó de acuerdo con lo propuesto por Brand-Williams et al., (1995), con modificaciones. La solución madre se preparó mezclando 10 mg (2.53 mM) del radical DPPH, en un matraz de 10 mL aforado con metanol. La solución de Trolox (estándar) fue preparada a una concentración 2.5 mM, este se agregó a un matraz de 50 mL y fue aforado con metanol. Para la cuantificación se ha empleado el siguiente procedimiento; Una vez obtenido el filtrado tanto del hidrolizado como del extracto con membranas de PVDF de 0.45 µm de diámetro de poro. La lectura se realizó en lector de placa (BioTek, modelo ELx808, VT, EE. UU.), para lo cual se tomaron 50 µl de cada muestra sin dilución, se colocaron en la placa y se agregaron 50 µl de la solución DPPH a una concentración 0.5 Mm, se dejó reposar 15 min y se realizó su lectura a 530 nm.

Análisis mineral del fruto

Para analizar el fruto de tomate se sometió a cada una de las muestras a una digestión con ácido nítrico. Se pesaron 500 mg de muestra seca en un vaso de precipitados de 100 mL y se le agregaron 30 mL de HNO₃ concentrado. Se tapó el vaso con un vidrio de reloj y se dejó digerir hasta la desintegración de la materia

orgánica (4-8 horas). Evitando que llegara a sequedad y agregando ácido hasta los 30 mL, cuando la solución estaba completamente transparente, se dejó enfriar y se filtró con papel filtro Whatman No. 42. Posteriormente se aforó cada una de las muestras en un matraz volumétrico de 50 mL con agua desionizada. La solución resultante se analizó con el espectrómetro de emisión de plasma Inductively Coupled Plasma (ICP), Thermo Jarrel Ash Irish Advantage modelo 74400 del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Saltillo.

Diseño experimental

Para el establecimiento del cultivo se utilizó un diseño de bloques completos al azar con tres tratamientos y un testigo absoluto, con 10 repeticiones por tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza y comparación de medias según LSD Fisher ($P \leq 0.05$), mediante el uso del Software InfoStat, 2018.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera etapa

Análisis proximal de la cáscara de granada

En el Cuadro 3, se presentan los resultados de la caracterización de la cáscara de granada deshidratada. La importancia del análisis proximal del residuo radica en el conocimiento del material como fuente de energía y proteínas, para poder llevar a cabo el proceso de fermentación por un microorganismo.

Cuadro 3. Contenido fisicoquímico de cáscara de granada en base seca.

Variable	Medias (%)
Materia seca total	92.10 ± 0.014
Humedad	7.90 ± 0.014
Ceniza	2.45 ± 0.002
Grasa	0.62 ± 0.004
Proteína	15.24 ± 0.320
Fibra cruda	67.16 ± 0.014
Azúcares totales	0.90 ± 0.020
Azúcares reductores	5.19 ± 0.010
Fenoles hidrolizables totales	4.19 ± 1.050

Los resultados obtenidos del polvo de cáscara de granada muestra que es un residuo con buenas características para ser utilizado como sustrato en la fermentación en medio líquido, contribuyendo con todos los nutrientes necesarios para que el microorganismo realice un adecuado metabolismo.

El valor proximal obtenido de la ceniza nos muestra, que en el residuo de la granada están presentes los minerales, que son elementos inorgánicos y muchos de ellos son fundamentales para la actividad del microorganismo en la fermentación. Por otro lado, los porcentajes elevados de la proteína nos indican un valor aproximado en cuanto al contenido de nitrógeno, un elemento esencial para el funcionamiento del microorganismo, el cual va a ser aprovechado en el proceso de fermentación. Los valores obtenidos de la fibra cruda nos representan

la cantidad de celulosa, hemicelulosa y lignina, presentes en la cáscara de granada deshidratada, atribuyendo una posibilidad de obtener gran cantidad de compuestos fenólicos, y de esta forma siendo una excelente fuente para obtener sustancias fenólicas de alto valor agregado. Se ha reportado que los compuestos asociados a la fibra de cáscara de granada corresponden a taninos hidrolizables como punicalagina, punicalina, pedunculagina, y a sus derivados, como ácido elágico, ácido gálico y quercetina (Middha *et al.*, 2013). Los taninos hidrolizables han atraído gran interés debido a sus propiedades anticancerígenas, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorias (Sofi y Nabi, 2018).

Los valores obtenidos de azúcares totales presentes en la cáscara de granada, tiene un bajo porcentaje. Favadi *et al.*, (2005) mencionan que las primeras fuentes de sustrato disponible en un medio de cultivo para los microorganismos son los azúcares disueltos en ello, como lo son la glucosa y fructosa, azúcares de fácil asimilación. La cáscara de granada presentó una concentración de azúcares reductores de 5.19%. Existen resultados que reportan un contenido de azúcares reductores de 13.02 g/mL en jugo de granada para diferentes variedades (Carreño-Raga *et al.*, 2015). Comparando el contenido de azúcares reductores obtenido en esta investigación, se observa que el material evaluado tiene una diferencia. Así mismo (De la Cruz *et al.*, 2013) mencionan que la cáscara de la granada posee un 4.34% de azúcares reductores, quedando este valor más próximo a lo encontrado en este estudio. Por otra parte, se obtuvo una concentración de fenoles hidrolizables totales del 4.19%. Robledo *et al.*, (2008) mencionan, que la cáscara de granada es un buen soporte, y al mismo tiempo un sustrato excelente en la producción de metabolitos de alto interés comercial como el ácido elágico debido a la degradación de su contenido de elagitaninos.

Segunda etapa

Cinética de degradación de la cáscara de granada (*Punica granatum*).

En el inciso A de la Figura 4, podemos observar como el comportamiento de los azúcares reductores durante la cinética fermentativa, donde se observa un incremento notable a las 24 h al inicio de la fermentación, siendo a las 120 h el

punto máximo de cuantificación de azúcares reductores. Posteriormente se observa una tendencia de disminución, indicando que la cáscara de granada presenta azúcares reductores y que el hongo es capaz de metabolizarlos en pequeñas cantidades. En el inciso B se presenta la cinética de producción de biomasa de *Aspergillus niger*. En el grafico se aprecia que la curva de crecimiento del microorganismo no posee una fase latente evidente en el tiempo monitoreado, mientras que sí se observa claramente una fase exponencial. El comportamiento anterior puede ser derivado de la cantidad de azúcares monoméricos presentes donde se produce un incremento micelial del microorganismo a partir de las 48 h, posteriormente, se presenta una pequeña fase estacionaria, donde los nutrientes se agotan. En esta fase estacionaria, es donde se pudieron sintetizar diversas enzimas que permitan degradar el material lignocelulósico y los diferentes compuestos fenólicos presentes.

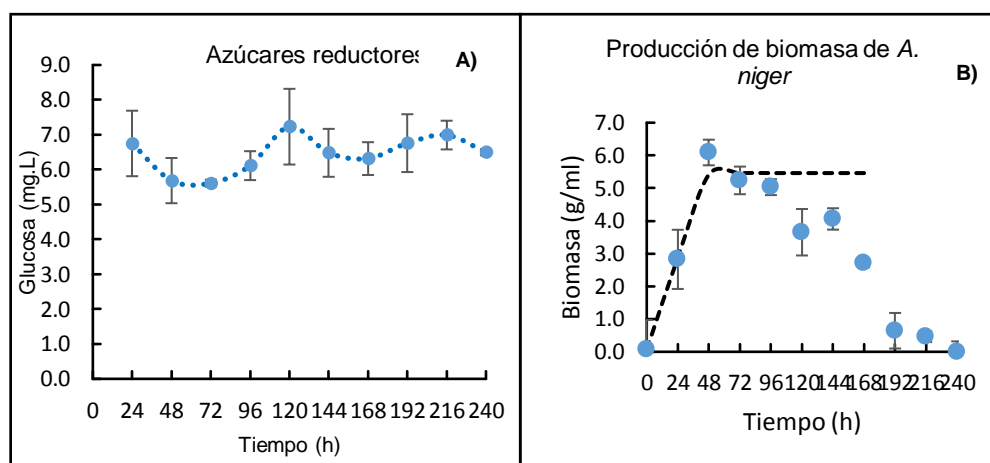


Figura 4. A) Cinética de producción de azúcares reductores; B) cinética de producción de biomasa de *Aspergillus niger*.

En el inciso A de la Figura 5, se observa la cinética de la actividad antioxidante de la fermentación en estado líquido, durante 240 h totales. En las primeras 48 h se observa un bajo porcentaje de actividad antioxidante, debido al proceso de adaptación del hongo *Aspergillus niger*, y a la baja cantidad de biomoléculas con capacidad anti-radicalaria. Posteriormente a las 72 h se logra obtener un incremento considerable hasta las 120 h, lo cual nos indica que la degradación

de la cáscara de granada, se están produciendo compuestos fenólicos con capacidad antioxidante, como ácido elágico o ácido gálico, por lo cual aumenta el porcentaje de la actividad antioxidante. Por otro lado, en el inciso B podemos observar la cinética de degradación de fenoles hidrolizables, teniendo un consumo inicial de polifenoles totales, durante las primeras 48 h se observa un incremento en el contenido de fenoles, después se presenta un decrecimiento significativo, lo que sugiere que la síntesis de tanasa y la degradación de fenoles hidrolizables está ligada al crecimiento del microorganismo, ya que la acumulación de ácido gálico se presenta en los puntos de mayor crecimiento microbiano. Payan (2018), menciona que al utilizar a la tanasa como hidrolizador, se puede degradar el 100% de los taninos de gran peso molecular, convirtiéndolos en compuestos de menor peso como los lo son la glucosa y el ácido gálico. Prigione *et al.* (2018), mencionan que la presencia de taninos hidrolizables (punicalin, punicalagin y pedunculagin) y flavonoides (catequina y epicatequina), mismos que pueden ser empleados como fuente de carbono debido a la producción de la enzima tanasa. Esto muestra que el microorganismo es capaz de degradar los polifenoles presentes en el extracto y generar compuestos antioxidantes derivados de fenoles hidrolizables. La producción de compuestos antioxidantes derivados de fenoles hidrolizables puede ayudarnos a entender el comportamiento del inciso A, ya que presenta dos puntos máximos, a las 96 y 240 horas. Por otro lado, la disminución en el contenido de ácido gálico sugiere la presencia de enzimas galato descarboxilasas, quienes se encargan de catalizar la descarboxilación del ácido gálico en pirogallol (Prigione *et al.*, 2018). En el inciso C) se observa la cinética con respecto a los taninos condensados, durante las primeras 96 h se observa un pequeño incremento cada 24 h, posteriormente se tiene un incremento significativo, índice del punto máximo de acumulación de catequina, lo que indica que, el contenido de taninos no es un limitante para el crecimiento del microorganismo, ya que presenta la habilidad de convertir los taninos condensados en catequina. En el inciso E) se presenta la cinética de producción de azúcares totales, donde se observa una tendencia general de incrementos cada 24 h hasta obtener 240 h totales de la fermentación,

no se demuestra una tendencia de disminución considerable, lo significa que el soporte utilizado al degradar los compuestos fenólicos presentes, se obtienen azúcares de diferentes características.

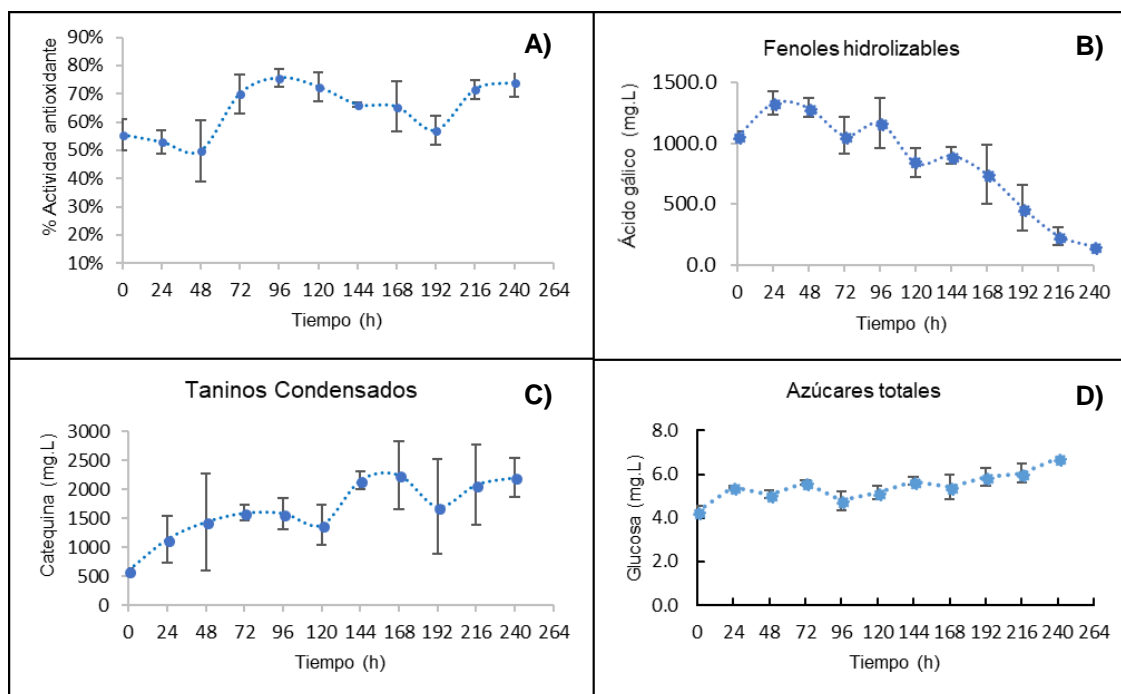


Figura 5. A) Cinética de actividad antioxidante; B) cinética de producción de fenoles hidrolizables; C) cinética de producción de taninos condensados; D) cinética de producción de azúcares totales.

El proceso de fermentación fúngica permitió biotransformar los residuos de granada en compuestos con actividad antioxidante, lo que permitirá actuar al extracto de fermentación, como inductor de resistencia en el cultivo de plantas. Otro análisis importante fue la composición mineral derivada del proceso de fermentación (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis mineral, actividad antioxidante, taninos condensados y taninos hidrolizables del extracto fermentado de granada a las 0 y a las 96 horas.

Determinación	Unidades	0 h	96 h
Cond. Eléctrica	dS m ⁻¹	0.87	1.3
Nitrógeno (N)	%	0.01	0.01
Potasio (K)	%	0.01	0.01
Fósforo (P)	%	0.0050	0.0061
Magnesio (Mg)	%	0.0004	0.0006
Azufre(S)	%	0.0008	0.0011
Hierro (Fe)	ppm	0.92	0.71
Manganeso (Mn)	ppm	0.24	0.25
Zinc (Zn)	ppm	0.03	0.05
Actividad Antioxidante	%	55	76
Taninos condensados	mg/L	605.5	1586.5
Taninos hidrolizables	mg/L	85.2	93.6

Comparando un extracto acuoso del residuo de cáscara de granada contra el extracto del proceso fermentativo, se logra incrementar con el fermentado, la conductividad eléctrica en un 49%, el fósforo, magnesio, azufre y zinc en 22%, 50%, 38% y 67% respectivamente. Finalmente, un incremento del 38% en la capacidad antioxidante. De los minerales considerados de importancia dentro del cultivo, cabe destacar el Hierro, el cual sufrió una disminución de -23%, debido posiblemente a una quelación con los derivados polifenólicos, ya que estos cuentan con una gran capacidad quelante del hierro (Phiwchai *et al.*, 2018).

Los mayores compuestos que se incrementaron en el extracto obtenido a las 96 horas del proceso fermentativo fueron los taninos condensados (162%), medidos como unidades de catequina. Estas unidades de catequina pueden actuar como antioxidantes en diversos organismos (Grzesik *et al.*, 2018).

Tercera etapa

Variables agronómicas

Para la variable peso seco de raíz, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que para el resto de las variables al menos un tratamiento fue diferente (Cuadro 5). En la variable altura de planta, se observa que al aplicar el tratamiento de 3 L/ha del extracto fermentado de granada (EFG), aumento en un 8% respecto al testigo absoluto (TA). En cuanto al número de

hojas, los tratamientos con extracto fermentado de granada obtuvieron un 6% más de hojas comparado con el TA. Por otra parte, la variable biomasa fresca aérea y biomasa seca aérea, presentaron diferencias significativas, al comparar la aplicación del EFG contra el testigo absoluto, el tratamiento de 0.75 L/ha, aumento ligeramente el uno por ciento de peso para ambas variables. Para la variable de peso fresco de raíz, el tratamiento de 0.75 L/ha del EFG aumento en un 13% de peso seco a comparación del TA. En variable de rendimiento se observó que a medida que se elevaba la aplicación del extracto fermentado de granada, se obtenía un aumento de hasta un 34% de rendimiento a comparación del TA.

Cuadro 5. Efecto de la aplicación del extracto fermentado de granada en el crecimiento, desarrollo y productividad de plantas de tomate.

Variables	TA	0.75 L/ha	1.5 L/ha	3 L/ha	CV (%)
DT (mm)	12.5±0.83b	13.6±0.69a	13.9±0.65a	13.6±0.76a	5.78
Altura (cm)	94.3±3.08b	100.1±4.99a	99.1±4.25a	101.7±3.03a	4.1
Hojas	15.3±0.59b	16.2±0.71a	16.2±0.71a	16.1±0.42a	3.9
BFA (kg)	1.31±0.13 a	1.32±0.14a	1.12±0.25b	1.22±0.17ab	14.7
BSA (g)	181.3±18.6a	182.6±19.3a	147.3±30.0b	168.12±1.4ab	13.8
PFR (g)	74.1±26.0ab	83.6±16.6a	62.1±22.2b	83.8±22.5a	24.7
PSR (g)	28.6±10.8a	28.7±6.0a	23.4±8.1a	29.4±8.5a	31.1
Rend (kg)	0.76±0.22b	0.89±0.20ab	1.01±0.51a	1.02±0.24a	34.7

TA: testigo absoluto; DT: diámetro de tallo (mm); Altura (cm); FA: biomasa fresca aérea (kg); BSA: biomasa seca aérea (g); PFR: peso fresco de raíz (g); PSR: peso seco de raíz (g); Rend: rendimiento (kg); CV: coeficiente de variación (%). Medias por con una letra común no son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios cuya principal tarea es proteger contra el estrés o ataque de patógenos (Cheynier, 2012). Estudios realizados por Zarate-Martínez *et al.*, (2018) mencionan que al tratar plantas de tomate con ácidos fenólicos no provocaron cambios significativos en las variables agronómicas evaluadas, sin embargo, si se obtuvo una disminución para estas variables en las plantas inoculadas con *Clavibacter michiganensis*, lo que puede ser debido a que la planta activa los mecanismos de defensa contra el estrés y sintetiza metabolitos secundarios, lo que se traduce en gasto energético (Lattanzio *et al.*, 2013). Por otra parte, Villanueva-Couoh *et al.*, (2009) observaron que al aplicar foliarmente compuestos fenólicos a plantas de crisantemo, se

obtienen mayor altura de planta, diámetro de tallo y mayor producción de biomasa, estos resultados son similares a los obtenidos en esta investigación.

Calidad de frutos

Para las variables de calidad de frutos se obtuvieron diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 6). Los frutos que presentaron mayor firmeza fueron a los que se les aplicaron el EFG, siendo el tratamiento de 3 L/ha que obtuvo un promedio de 5.35 kg cm⁻², a comparación del TA que obtuvo una media 4.30 kg cm⁻². Para la variable firmeza de sólidos soluble totales (SST), se puede observar que al aplicar una concentración mayor del EFG, podemos obtener un aumento de un siete por ciento a comparación del TA. Por otra parte, al aplicar el EFG se obtiene una ligera disminución del uno al dos por ciento, para las variables de pH y acidez titulable. En las variables de licopeno y DPPH, la aplicación del EFG, logró aumentar en un 17 y uno por ciento respectivamente, comparados contra el TA.

Cuadro 6. Calidad de fruto de plantas de tomate tratadas con extracto fermentado de granada.

Trat.	Firmeza (kg cm ⁻²)	SST (°Brix)	pH	AT (% ácido citríco)	Licopeno (mg L ⁻¹)	DPPH (% reducción)
TA	4.30±0.88c	5.00±0.28b	4.36±0.037a	0.30±0.036a	155.96±20.15b	90.89±0.91b
0.75 L/ha	5.97±1.15ab	5.28±0.22ab	4.32±0.040ab	0.27±0.030ab	147.02±18.85b	91.28±0.53ab
1.5 L/ha	6.05±2.14a	5.27±0.30ab	4.30±0.038b	0.28±0.038ab	151.41±18.25b	91.73±0.05a
3 L/ha	4.50±1.04bc	5.35±0.34a	4.30±0.036b	0.25±0.030b	182.99±34.54a	90.98±0.65ab
CV (%)	22.9	4.68	0.91	13.31	15.29	0.69

TA: testigo absoluto; Firmeza (kg cm⁻²); SST: sólidos solubles totales (°Brix); pH: potencial de hidrogeno; AT: acidez titulable (% ácido cítrico); licopeno (mg/mL); DPPH (% de reducción); CV: coeficiente de variación. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Al aplicarse diferentes concentraciones del EFG, podemos observar que algunas de las variables evaluadas se ven favorecidas, ya que contienen compuestos que pueden servir como antioxidantes debido a su capacidad para inhibir la formación de especies radicales, inhibir enzimas relacionadas con la producción de especies reactivas de oxígeno y aniones superóxido, por quelación de iones metálicos tales como hierro y cobre (Mojica *et al.*, 2015). Esto se traduce en que los compuestos fenólicos presentes en dicho extracto, desempeñan funciones importantes en la pared celular como proporcionar tanto las barreras físicas y químicas, la protección contra la invasión de patógenos y la astringencia que evita el ataque de insectos y animales (Acosta-Estrada *et al.*, 2014).

Contenido mineral en frutos de tomate.

Los resultados del contenido mineral en fruto, en cobre (Cu), fierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), fosforo (P), azufre (S) y zinc (Zn) no presentaron diferencias significativas (Cuadro 7). Para el tratamiento de 3 L/ha del EFG podemos observar que el calcio (Ca) aumentó en un 59% a comparación del testigo. Por otra parte, el potasio (K) disminuyó de un 6 a 11% con la aplicación del EFG. El sodio (Na) presentó un aumento de un 112% con el tratamiento de 3 L/ha del EFG. Para el mineral de selenio (Se) se obtuvo un aumento del 14% en comparación del testigo y para el silicio (Si) se obtuvo el efecto contrario, donde al aplicar el EFG disminuyó de un 100% a un 18% Del contenido de este mineral.

Cuadro 7. Contenido mineral en frutos de tomate.

Minerales mg/L	TA	0.75 L/ha	1.50 L/ha	3.00 L/ha	CV (%)
Ca	6.38±1.5b	6.68±2.8b	7.14±2.9b	10.16±2.7a	33
Cu	0.034±0.009a	0.020±0.009a	0.033±0.013a	0.033±0.006a	28
Fe	0.39±0.099a	0.35±0.126a	0.32±0.064a	0.34±0.111a	29
K	156.91±11.4a	140.84±7.00b	146.94±17.10ab	139.12±12.40b	9
Mg	7.21±0.67a	7.03±0.79a	7.25±0.02a	6.95±0.03a	11
Mn	0.08±0.019a	0.07±0.018a	0.07±0.021a	0.09±0.017a	24
Na	2.07±0.89b	1.86±0.28b	2.89±1.67b	4.39±1.16a	38
P	25.41±2.50a	23.51±2.91a	24.88±3.78a	24.37±1.34a	11
S	10.93±1.10a	11.06±1.73a	10.45±2.73a	9.82±0.83a	17
Se	0.034±0.019ab	0.026±0.010ab	0.023±0.007b	0.039±0.018a	21
Si	4.22±1.893a	1.44±0.441b	0.90±0.460b	0.74±0.352b	15
Zn	0.17±0.041a	0.17±0.034a	0.17±0.042a	0.16±0.022a	21

TA: testigo absoluto; CV: coeficiente de variación. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P \leq 0.05$).

Los incrementos en el contenido de calcio, sodio y selenio, son favorables en la nutrición humana, ya que están involucrados en importantes funciones metabólicas. El calcio ayuda en la función muscular, el estímulo nervioso, actividades enzimática y hormonal y el transporte del oxígeno. Una carencia de selenio, aunque es un alimento traza, puede generar enfermedades cardíacas y está asociado a algunos tipos de cáncer (Latham, 2002).

CONCLUSIONES

La fermentación líquida de los residuos de cáscara de granada por el hongo *Aspergillus niger* es una buena opción para obtener un extracto rico en compuestos fenólicos con actividad antioxidante, además de cambiar la composición mineral de los residuos empleados.

El extracto generado derivado de la fermentación de residuos de granada logró ser empleado como un bioestimulante en el cultivo de tomate, donde se promovió un mayor crecimiento, desarrollo y producción del fruto.

Los procesos fermentativos empleando residuos agroindustriales pueden ser una alternativa para la generación de insumos agrícolas por procesos sustentables dando valor agregado a estos desechos. Es por ello por lo que se requiere desarrollar investigaciones relacionadas a la degradación microbiana de compuestos vegetales, para obtener productos orgánicos, biodegradables, de valor agregado y de aplicación en el área agroalimentaria.

REFERENCIAS

- Acosta-Estrada, BA, Gutiérrez-Urbe, JA, y Serna-Saldívar, S. O. 2014. Fenólicos ligados en los alimentos, una revisión. *Química de los alimentos*, 152, 46–55. doi: 10.1016 / j.foodchem.2013.11.093
- Aimin, L. I., Minjuan, X. U., Wenhui, L.I., Xuejun, Wang y Jingyu, D. A. I. 2008. Caracterizaciones de adsorción de fracciones de ácido fúlvico en caolinita. *Revista de Ciencias Ambientales*. 20 (5), 528-535.
- Al-Said, F. A., Opara, L. A., and Al-Yahyai, R. A. 2009. Physico-chemical and textural quality attributes of pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in the Sultanate of Oman. *Journal of Food Engineering*. 90(1), 129-134.
- Andersen, O. M., and Markham, K. R. 2005. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Eds. CRC Press/Taylor y Francis Group: Boca Raton, FL, USA. pp. 472–551.
- Apolonio-Rodríguez, I., Franco-Mora, O., Salgado-Siclán, M. L., y Aquino-Martínez, J. G. 2017. Inhibición in vitro de *Botrytis cinerea* con extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis* spp.). *Revista mexicana de fitopatología*. 35(2), 170-185.
- Armesto, J., Gómez-Limia, L., Carballo, J., & Martínez, S. 2017. Impact of vacuum cooking and boiling, and refrigerated storage on the quality of galega kale (*Brassica oleracea* var. *acephala* cv. Galega). *LWT-Food Science and Technology*, 79, 267-277.
- Austin, M. B., and Noel, J. P. 2003. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Natural product reports*. 20(1), 79-110.
- Baglieri, A., Ioppolo, A., Nègre, M., Abbate, C. and Gennari, M. 2010. Characterization of glycerolextractable organic matter from Etna soils of different ages. *Pedosphere*. 20(1), 120-128.
- Baldotto, M. A., y Baldotto, L. E. B. 2015. Ácidos húmicos. *Ceres*, 61(7).
- Batista-Sánchez, D., Nieto-Garibay, A., Alcaraz-Melendez, L., Troyo-Diéguéz, E., Hernández-Montiel, L. G., Ojeda-Silvera, C. M., y Amador, B. M. 2015. Uso de un bionutriente como atenuante del estrés salino (NaCl) durante la emergencia y crecimiento inicial de *Ocimum basilicum* L. *Nova Scientia*. 7(15), 265-284.
- Briceño-Domínguez, D., Hernández-Carmona, G., Moyo, M., Stirk, W., and Van S. J. 2014. Plant growth promoting activity of seaweed liquid extracts

produced from *Macrocystis pyrifera* under different pH and temperature conditions. *Journal of applied phycology*. 26(5), 2203-2210.

- Brown, A. L., Jackson, W. R., and Cavagnaro, T. R. 2014. A meta-analysis and review of plant-growth response to humic substances: practical implications for agriculture. *Advances in agronomy*. 124(1), 37-46.
- Caballero, E., and Soto, C. 2019. Valorization of Agro-Industrial Waste into Bioactive Compounds: Techno-Economic Considerations. In *Biorefinery*. pp. 235-252.
- Calvo, P., Nelson, L., and Kloepper, J. W. 2014. Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant and Soil*. 383(1-2), 3-41.
- Carpita, N. and McCann, M. 2000. The cell wall. In: Buchanan, et al., editors. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville MD: American Society of Plant Physiologists. pp. 52–108.
- Carreño-Raga, J., Perez-Marmol, Z., Perez, E., Páez, G. y Araujo, K. 2016. Evaluación fisicoquímica y fitoquímica de granada (*Punica granatum* L.). *Revista Tecnocientífica URU*. (8), 47-56.
- Cesarino, I. 2019. Structural features and regulation of lignin deposited upon biotic and abiotic stresses. *Current opinion in biotechnology*. 56, 209-214.
- Cheyrier, V.; Comte, G.; Davies, K. M.; Lattanzio, V. and Martens, S. 2013. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol. Biochem*. 72: 1–20.
- Coggins Jr, C. W., and Lovatt, C. J. 2014. Plant Growth Regulators. *Citrus Production Manual*. 3539, 215.
- Croteau, R., Kutchan, T. M. and Lewis, N. G. 2000. Natural products (secondary metabolites) In: Buchanan, et al., editors. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville MD: American Society of Plant Physiologists. pp. 1250–1318.
- Cruger, W. y Cruger, A. 1989. *Biotechnología: manual de microbiología industrial*: Acríbia S.A. Zaragoza-España.
- Cuartero, J., Bolarín, M. C., Moreno, V. y Pineda, B. “Tolerancia a la salinidad”. En: la adaptación al ambiente y los estreses abióticos en la mejora vegetal, edit. Andalucía. Consejería De Agricultura Y Pesca, Sevilla, 1 de noviembre de 2008, pp. 233-261, ISBN 978-84-8474-248-7.
- Dai, J. and Mumper, R. J. 2010 Plant phenolics: extracción, análisis y sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas. *Molecules*. 15, 7313-7352

- Davies, P. J. 2013. Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology. *Springer Science & Business Media*.
- De la Cruz, Q. R., Rodriguez, H. R., Contreras, E. J. C. y Aguilar, C. N. 2013 La granada fuente de potentes agentes bioactivos. *CienciAcierta*. Pp.35-38.
- Du, J. P. 2015. Plant biostimulants: definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*. 196, 3-14.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- EPPO. 2016. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Bulletin OEPP 46(2): 202–225; doi: 10.1111/epp.12302
- Fadavi, A., Barzegar, M., Azizi, M. H., and Bayat, M. 2005. Note. Physicochemical composition of ten pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. *Food Science and Technology International*. 11(2), 113-119.
- Feng, K., Yu, J., Cheng, Y., Ruan, M., Wang, R., Ye, Q., and Zheng, Q. 2016. The SOD gene family in tomato: identification, phylogenetic relationships, and expression patterns. *Frontiers in plant science*. 7, 1279.
- Gartemann, K. H., Kirchner, O., Engemann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R., and Burger, A. 2003. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium. *Journal of biotechnology*. 106 (2-3), 179-191.
- Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N. 2015. Flavonoides y ácidos fenólicos: papel y actividad bioquímica en plantas y humanos. *J. Med. Plantas Res.*, 6697–6703
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., and Kader, A. A. 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 48(10), 4581-4589.
- Granados, E. F. E. 2015. Efecto de Bioestimulantes Foliares en el Rendimiento del Cultivo de la Berenjena. Universidad Rafael Landívar. San Marcos. Guatemala. *The science of flavonoids*. pp. 239-267.
- Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J., and Azevedo, R. A. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional plant biology*. 32(6), 481-494.
- Grotewold, E. 2006. *The science of flavonoids*. New York: Springer. pp. 239-267.

- Grzesik, M., Namiesnik, J., Bartosz, G. and Sadowska-Bartos, I. 2018. Antioxidant properties of ferrous catechin complexes. *Free Radical Biology and Medicine*. 120, S111.
- Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., and Küfrevioğlu, Ö. İ. 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food chemistry*. 83(3), 371-382.
- Hanssen, I. M., Lapidot, M., and Thomma, B. P. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *Molecular plant-microbe interactions*. 23 (5), 539-548.
- Hernández, A. 2003. *Microbiología Industrial*. Costa Rica: Ed. EUNED.
- Juárez-Maldonado, A., de Alba Romenus, K., Zermeño González, A., Ramírez, H., & Benavides Mendoza, A. (2015). Análisis de crecimiento del cultivo de tomate en invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(5), 943-954.
- Kang, S. M., Khan, A. L., Hamayun, M., Hussain, J., Joo, G. J., You, Y. H. and Lee, I. J. 2012. Gibberellin-producing *Promicromonospora* sp. SE188 improves *Solanum lycopersicum* plant growth and influences endogenous plant hormones. *The Journal of Microbiology*, 50(6), 902.
- Kim, O. T., Bang, K. H., Kim, Y. C., Hyun, D. Y., Kim, M. Y., and Cha, S. W. 2009. Upregulation of ginsenoside and gene expression related to triterpene biosynthesis in ginseng hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 98(1), 25-33.
- Latham, M. C. 2002. *Nutricion humana en el mundo en desarrollo*. FAO. Roma. Vol. 29
- Lattanzio, V. 2013. Phenolic compounds: Introduction. In: *Nat. Prod.* (Ramawa, K. G. and Mérillon, J. M. (Eds.). Springer Berlin Heidelberg. Pp. 1543-1580.
- Lekha, P. K., & Lonsane, B. K. 1997. Production and application of tannin acyl hydrolase: state of the art. *Advances in applied microbiology*, 44, 216-260.
- Liu, J., Willför, S., and Xu, C. 2015. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*. 5(1), 31-61.
- Liu, W., Zu, Y. G., Fu, Y. J., Kong, Y., Ma, W., Yang, M., & Wu, N. (2010). Variation in contents of phenolic compounds during growth and post-harvest storage of pigeon pea seedlings. *Food chemistry*, 121(3), 732-739.

- Maddox, C. E., Laur, L. M., and Tian, L. 2010. Antibacterial activity of phenolic compounds against the phytopathogen *Xylella fastidiosa*. *Current microbiology*. 60(1), 53.
- Martinez-Balmori, D., Spaccini, R., Aguiar, N. O., Novotny, E. H., Olivares, F. L., and Canellas, L. P. 2014. Molecular characteristics of humic acids isolated from vermicomposts and their relationship to bioactivity. *Journal of agricultural and food chemistry*. 62(47), 11412-11419.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M. y Tuñón, M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*. 17 (6): 271-278.
- McSteen, P., and Zhao, Y. 2008. Plant hormones and signaling: common themes and new developments. *Developmental cell*. 14(4), 467-473.
- Mendoza, L., Yañez, K., Vivanco, M., Melo, R., and Cotoras, M. 2013. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Industrial crops and products*. 43, 360-364.
- Middha, S. K., Usha, T., and Pande, V. 2013. HPLC evaluation of phenolic profile, nutritive content, and antioxidant capacity of extracts obtained from *Punica granatum* fruit peel. *Advances in pharmacological sciences*. 296236.
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., and Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 84(4), 407-412. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8482045>
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F. 2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*. 9(10), 490-498.
- Mojica, L., Meyer, A., Berhow, M. A., & de Mejía, E. G. 2015. Bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) have similar high antioxidant capacity, in vitro inhibition of α -amylase and α -glucosidase while diverse phenolic composition and concentration. *Food Research International*, 69, 38-48. doi:10.1016/j.foodres.2014.12.007
- Naczki, M., y Shahidi, F. 2006. Fenolicos en cereales, frutas y verduras: ocurrencia, extracción y análisis. *Revista de análisis farmacéutico y biomédico*. 41 (5), 1523-1542.
- Nagata, M., y Yamashita, I. 1992. Simple Method for Simultaneous Determination of Chlorophyll and Carotenoids in Tomato Fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 39(10), 925-928. <https://doi.org/10.3136/nskkk1962.39.925>

- Ocaña-Romo, C. R. 2008. En crecimiento. Desarrollo de invernaderos en México. www.hortalizas.com.
- Ochoa, Guillermo. 26 de octubre 2018. <http://www.tribuna.com.mx/Agricultores-se-preparan-para-combatir-las-plagas-l201810260001.html>. Tribuna. Consultado el 16 de marzo de 2019.
- Official Methods of Analysis of the AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemist: Arlington, VA, USA 1990.
- Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (OEIDRUS), (2010). Anuario estadístico de la producción agrícola. Recuperado en abril de 2011 de <http://www.oeidrus-jalisco.gob.mx:8040/oeidrus-jalisco/index.php>.
- Ortega-Martínez, L. D.; Sánchez-Olarte, J.; Díaz-Ruíz, R. y Ocampo-Mendoza, J. 2010. Efecto de diferentes sustratos en el crecimiento de plántulas de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill). *Ra Ximhai*. 6: 365-372.
- Payán, A., & Mario, A. (2018). Evaluación del tiempo de hidrólisis enzimática del zumaque (*Rhus coriaria*) durante fase oral, gástrica e intestinal.
- Phiwchai, I., Yuensook, W., Sawaengsiriphon, N., Krungchanuchat, S. and Pilapong, C. (2018). Tannic acid (TA): A molecular tool for chelating and imaging labile iron. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 114, 64-73.
- Poiroux-Gonord, F., Bidel, L. P., Fanciullino, A. L., Gautier, H., Lauri-Lopez, F., & Urban, L. (2010). Health benefits of vitamins and secondary metabolites of fruits and vegetables and prospects to increase their concentrations by agronomic approaches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12065-12082.
- Prigione, V., Spina, F., Tigini, V., Giovando, S., & Varese, G. C. 2018. Biotransformation of industrial tannins by filamentous fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(24), 10361-10375
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., y Pouysegu, L. 2011. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*. 50(3), 586-621.
- Quiñones, M., Miguel, M., y Aleixandre, A. 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición hospitalaria*. 27(1), 76-89.

- Rey, A. S., Avila, C. E., Acero, V. M., & QEPD, G. M. M. 2015. Efecto de los polipéptidos linforeticulares en caninos con parvovirus en Funza, Cundinamarca. *Journal of Agriculture and Animal Sciences*, 3(2).
- Robbins, J. R. 2003. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (10): 2866–2887.
- Roberts, J. A., Kerns, J. P., and Ritchie, D. F. 2015. Bacterial etiolation of creeping bentgrass as influenced by biostimulants and trinexapac-ethyl. *Crop Protection*. 72, 119-126.
- Robledo, A., Aguilera-Carbo, A. F., Prado-Barragan, A., Sepulveda-Torre, L., Rodríguez-Herrera, R., Contreras-Esquivel, J. C. and Aguilar, C. N. 2018. Kinetics of ellagic acid accumulation by solid-state fermentation. In *Theoretical Models and Experimental Approaches in Physical Chemistry*. Apple Academic Press. pp. 293-306.
- Robledo, A., Aguilera-Carbó, A., Rodríguez, R., Martínez, J. L., Garza, Y. and Aguilar, C. N. 2008. Ellagic acid production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of pomegranate residues. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 35(6), 507-513.
- Rueda-Barrientos, M. C., Martínez-Fernández, E., Villegas-Torres, O. G., Sainz-Aispuro, M. J., Peña-Chora, G., Hernández-Velazquez, V. M. y Hernández-Romano, J. 2017. Sensibilidad de la prueba de InmunoStrips® en la detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en tomate. *ActA Agrícola y pecuaria*. 3 (2): 50-57.
- Saa, S., Rio, O. D., Castro, S. and Brown, P. H. 2015. Foliar application of microbial and plant based biostimulants increases growth and potassium uptake in almond (*Prunus dulcis* [Mill.] DA Webb). *Frontiers in plant science*. 6, 87.
- Saborio, F. 2002. Bioestimulantes en fertilización foliar. En: Fertilización foliar: principios y aplicaciones. Eds. G. Meléndez y E. Molina. UCR-CIALSF. Costa Rica. Pp. 107-125
- Saleem, M. Y.; Akhtar, K. P.; Iqbal, Q.; Asghar, M. y Shoaib, M. 2015. Development of high yielding and blight resistant hybrids of tomato. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*. 52: 293-299.
- Santner, A., y Estelle, M. 2009. Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature*. 459(7250), 1071.

- Saxena, M .; Saxena, J .; Pradhan, A. Flavonoids y ácidos fenólicos como antioxidantes en plantas y salud humana. En t. J. Pharm. Sci. Rev. Res. 2012 , 16 , 130-134
- Scalbert, A., & Williamson, G. 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*. 130(8), 2073S-2085S.
- Schutzendubel, A. and Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of experimental botany*. 53(372), 1351-1365.
- Sepúlveda, L., Wong-Paz, J. E., Buenrostro-Figueroa, J., Ascacio-Valdés, J. A., Aguilera-Carbó, A. and Aguilar, C. N. 2018. Solid state fermentation of pomegranate husk: Recovery of ellagic acid by SEC and identification of ellagitannins by HPLC/ESI/MS. *Food bioscience*. 22, 99-104.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2016. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <http://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2017. Atlas Agroalimentario 2017. http://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2017/Atlas-Agroalimentario-2017.
- Shao, Y. and Bao, J. 2015. Polyphenols in whole rice grain: Genetic diversity and health benefits. *Food Chemistry*. 180, 86–97.
- Sharma, H. S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J. R., and Martin, T. 2014. Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of applied phycology*. 26(1), 465-490.
- Sofi, M. S., and Nabi, S. 2018. The role of phytochemicals in cancer treatment: A current review. *Journal of Medicinal Plants*. 6(4), 83-93.
- Srivastava, L. M. 2002. Plant growth and development. *Hormones and environment*. Academic Press, Amsterdam. 772 p.
- Stalikas, C. D. 2007. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science*. 30(18), 3268-3295.
- Steiner, A. A. 1961. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil*, 15(2), 134–154. <https://doi.org/10.1007/BF01347224>

- Swain, T., and Hillis, E. 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. The quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10:63-68.
- Valdez-Vazquez, I., Acevedo-Benítez, J. A., and Hernández-Santiago, C. 2010. Distribution and potential of bioenergy resources from agricultural activities in Mexico. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 14(7), 2147-2153.
- Ventura-Sobrevilla J. M. 2006. Tesis de licenciatura. Biodegradación de tatinos en extractos de gobernadora (*Flouencia cernua*) mediante fermentación en estado sólido usando *Aspergillus niger* PSH. Universidad Autónoma de Coahuila.
- Verotta, L., Panzella, L., Antenucci, S., Calvenzani, V., Tomay, F., Petroni, K., and Napolitano, A. 2018. Fermented pomegranate wastes as sustainable source of ellagic acid: Antioxidant properties, anti-inflammatory action, and controlled release under simulated digestion conditions. *Food chemistry.* 246, 129-136.
- Villanueva-Couoh, E., Alcántar-González, G., Sánchez-García, P., Soria-Fregoso, M., y Larque-Saavedra, A. 2009. Efecto del ácido salicílico y dimetilsulfóxido en la floración de (*Chrysanthemum morifolium* (Ramat) Kitamura) en Yucatán. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 15(SPE), 25-31.
- Vitaglione, P., Napolitano, A. and Fogliano, V. 2008. Cereal dietary fibre: a natural functional ingredient to deliver phenolic compounds into the gut. *Trends in Food Science and Technology.* 19: 451-463.
- Voet, D., Voet, J. G. P., Charlotte, W., Judith, G. V. and Charlotte, W. P. 2013. Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level (No. 577.1 VOE).
- Willcox, J. K.; Catignani, G. L. and Lazarus, S. 2003. Tomatoes and cardiovascular health. *Crit. Rev. Food Sci.* 43(1): 1-8.
- Wollgast, J., and Anklam, E. 2000. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: Changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Research International.* 33(6), 423– 447.
- Wu, G. 2013. Functional amino acids in nutrition and health. *Amino acids.* 45(3), 407-411.
- Zárate-Martínez, W., González-Morales, S., Ramírez-Godina, F., Robledo-Olivo, A., & Juárez-Maldonado, A. (2018). Efecto de los ácidos fenólicos en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) inoculadas con

Clavibacter michiganensis. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 9 (SPE20), 4367-4379.

Zodape, S. T., Gupta, A., Bhandari, S. C., Rawat, U. S., Chaudhary, D. R., Eswaran, K. and Chikara, J. (2011). Foliar application of seaweed sap as biostimulant for enhancement of yield and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Scientific & Industrial Research*. 70, 215-219.

Yu, Z., y Dahlgren, R. A. (2000). Evaluation of Methods for Measuring Polyphenols in Conifer Foliage. *Journal of Chemical Ecology*, 26(9), 2119–2140. <https://doi.org/10.1023/A:1005568416040>

USDA. 1997. United States Department of Agriculture. Agricultural Marketing Service. United States standards for grades of fresh tomatoes. Consultado el 13 de enero del 2019. Disponible en <http://www.ams.usda.gov/AMSV1.0/getfile?dDocName=STELP RDC5050331>