



**ANÁLISIS DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO MAGNÉTICO
SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES
EN SEMILLAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.)**

CAMILA ALEJANDRA ERAZO PÉREZ

**Universidad de Caldas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Biología
Manizales, Colombia
2022**

ANÁLISIS DEL EFECTO DEL TRATAMIENTO MAGNÉTICO SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN SEMILLAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.).

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Bióloga

Presentado por:
CAMILA ALEJANDRA ERAZO PÉREZ

Director
MSc. Juan David Rivera Giraldo

Codirector
MSc. Javier Ignacio Torres Osorio

Grupo de Investigación
Campos Electromagnéticos, Medio Ambiente y Salud Pública

**Universidad de Caldas
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Programa de Ciencias Biológicas
Manizales, Colombia
2022**

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por haberme acompañado a lo largo de mi carrera, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes, de experiencias y sobre todo de paz.

Agradezco a mis padres, por darme la oportunidad de formarme como profesional y por impulsar mis sueños y esperanzas, quienes estuvieron siempre a mi lado en los días y noches más difíciles durante mis horas de estudio. Siempre han sido mis mejores guías de vida, les dedico a ustedes este logro como una meta más conquistada, agradecida por creer en mí.

A mi director y codirector por su paciencia y constancia, ya que sin ello este trabajo no lo hubiese logrado tan fácil. Ustedes formaron parte importante de esta historia con sus aportes profesionales que lo caracterizan. Gracias por estar allí cuando mis horas de trabajo se hacían confusas, sus consejos fueron siempre útiles cuando no salían de mi pensamiento las ideas para escribir lo que hoy he logrado.

A Juan Pablo Penagos por haberme brindado sus aportes y conocimientos en este trabajo, usted permitió que este trabajo siguiera adelante y se pudiera concluir de manera exitosa, sus consejos fueron siempre útiles cuando no salían los resultados, usted ilumino el camino y muchas gracias por sus múltiples palabras de aliento, cuando más las necesite.

A mis profesores por sus sabias palabras, sus conocimientos rigurosos y precisos, a ustedes mis profesores queridos, les debo mis conocimientos. Gracias por permitirme formarme como persona y profesional, gracias por su paciencia, por compartir sus conocimientos de manera profesional e invaluable, por su dedicación perseverancia y tolerancia.

A todas las personas que me apoyaron durante este proceso, que me colaboraron para que este proyecto sea una realidad, a mis amigos y compañeros, por brindarme seguridad y confianza, no puedo dejar de recordar cuantas tardes y horas de trabajo nos juntamos a lo largo de nuestra formación como biólogos.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ASBTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
HIPÓTESIS.....	5
OBJETIVOS.....	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos	6
CAPÍTULO 1. ESTADO DEL ARTE	7
CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO	9
2.1 Campos electromagnéticos.....	9
2.1.1 Generalidades de los campos electromagnéticos	9
2.1.2 Generadores de campos magnéticos.....	10
2.2 Tomate	11
2.2.1 Requerimiento edafoclimático	12
2.2.2 Estructura de la semilla de tomate	12
2.2.3 Composición química	13
2.2.4 Aplicaciones	14
2.3 Proteínas	14
2.4 Métodos de extracción	15
2.4.1 Extracción sólido-líquido con agitación	15
2.4.2 Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido.....	16
2.5 Espectrofotometría	16
2.5.1 Método de Lowry.....	17
2.5.2 Método de Bradford	17
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	18
3.1 Matriz de estudio	18
3.2 Tratamientos magnéticos	18
3.3 Siembra	18
3.4 Pruebas de germinación	18
3.5 Métodos de extracción	19
3.5.1 Método A: Agitación orbital.....	19
3.5.2 Método B: Ultrasonido	19
3.6 Cuantificación de proteínas	19

3.6.1	Método de Bradford	20
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES		21
4.1	Cuantificación de proteínas totales	21
4.1.1	Curva de Calibración	21
4.1.2	Cifras de mérito del método	23
4.2	Extracción de proteínas totales	25
4.2.1	Mejores condiciones de la extracción por agitación	25
4.2.2	Mejores condiciones de la extracción por ultrasonido.....	27
4.2.3	Comparación entre los métodos de extracción.....	28
4.3	Tratamientos magnética con imanes toroidales.....	29
4.3.1	Resultado de la estimulación magnética sobre la concentración de proteínas totales	30
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....		32
RECOMENDACIONES.....		33
BIBLIOGRAFÍA.....		34

RESUMEN

La estimulación de semillas y de plántulas a través de campos magnéticos, electromagnéticos, infrarrojo, rayos gama, rayos láser y rayos U.V. disminuyen los riesgos ambientales y sanitarios, evitando el uso de agroquímicos. La exposición de semillas a campos magnéticos es valiosa, dado que en investigaciones anteriores se ha observado que el tiempo de germinación de las semillas se reduce, la longitud de la radícula, el área foliar y la actividad enzimática aumentan. También se han encontrado resultados positivos en respuesta a la activación de mecanismos de acción biológica, biofísica y bioquímica. Sin embargo, aún no se conoce claramente como la estimulación magnética genera alteraciones en los procesos bioquímicos de la semilla, por lo tanto, es necesario investigaciones de esta índole para comprender las respuestas fisiológicas, las modificaciones en la morfología y algunos procesos celulares.

En este estudio se efectuaron ocho tratamientos magnéticos en semillas de tomate con un conjunto de imanes toroidales con densidad de flujo magnético nominal de 100.00 mT. El análisis de los tratamientos se realizó empleando una optimización bayesiana, teniendo como variables el tiempo de exposición (T_{exp}), la temperatura de incubación y la cantidad de agua, siendo los intervalos 0.0 a 900 s, 20.0 a 35.0 °C y 3.0 a 15.0 mL respectivamente. El efecto magnético sobre la germinación como variable biológica se evaluó midiendo el Tiempo Medio de Germinación (TMG) y como variable química determinado la concentración de proteínas totales. Las semillas germinadas se someterán a dos procesos de extracción de proteínas: agitación orbital y ultrasonido empleando como solvente Tris-HCl o Tris-Base y posteriormente la cuantificación se realizará por medio del método espectrofotométrico UV-visible de Bradford.

La mejor metodología de extracción para la obtención de proteínas totales fue empleando ultrasonido como método físico, tris-base como solvente y un tiempo de extracción de 50 min. Las mejores dosis de estimulación magnética fueron obtenidas mediante el diseño de optimización bayesiana presentando TMG inferiores a las 65.00 horas. Al comparar la concentración de proteínas totales entre los tratamientos con los mejores TMG y el control, se determinó que seis tratamientos tuvieron concentraciones por encima del control, de los cuales cuatro presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Palabras clave: Proteínas, tratamientos magnéticos, extracción, semillas, cuantificación.

ASBTRACT

The stimulation of seeds and seedlings through magnetic, electromagnetic, infrared, gamma, laser and U.V. fields reduce environmental and sanitary risks, avoiding the use of agrochemicals. The exposure of seeds to magnetic fields is valuable, since in previous research it has been observed that seed germination time is reduced, radicle length, leaf area and enzymatic activity are increased. Positive results have also been found in response to the activation of biological, biophysical and biochemical mechanisms of action. However, it is still not clearly known how magnetic stimulation generates alterations in the biochemical processes of the seed, therefore, research of this nature is necessary to understand the physiological responses, modifications in morphology and some cellular processes.

In this study, eight magnetic treatments were performed on tomato seeds with a set of toroidal magnets with a nominal magnetic flux density of 100.00 mT. The analysis of the treatments was performed using a Bayesian optimization, having as variables the exposure time (T_{exp}), incubation temperature and amount of water, the intervals being 0.0 to 900 s, 20.0 to 35.0 °C and 3.0 to 15.0 mL, respectively. The magnetic effect on germination as a biological variable was evaluated by measuring the Mean Germination Time (MTG) and as a chemical variable, the concentration of total proteins was determined. The germinated seeds were subjected to two protein extraction processes: orbital shaking and ultrasound using Tris-HCl or Tris-Base as solvent, and then quantification was performed by means of the Bradford UV-visible spectrophotometric method.

The best extraction methodology to obtain total proteins was using ultrasound as physical medium, tris-base as solvent and an extraction time of 50 min. The best doses of magnetic stimulation were obtained by Bayesian optimization design presenting TMG lower than 65.00 hours. When comparing the total protein concentration between the treatments with the best TMG and the control, it was determined that six treatments had concentrations above the control, of which four showed statistically significant differences between them.

Key words: Proteins, magnetic treatments, extraction, seeds, quantification.

INTRODUCCIÓN

Basados en que todos los organismos vivos han evolucionado en presencia de un campo geomagnético natural (Wiltschko & Wiltschko, 2005), algunas teorías han propuesto que la interacción de la energía magnética con la materia representa un factor determinante para el desarrollo de la vida en la Tierra (Aladjadjiyan, 2010). Por esto, en la actualidad el uso de la estimulación magnética es una alternativa potencial como herramienta biotecnológica en la solución de problemas ambientales y sociales generados por las diversas prácticas agropecuarias que en la mayoría de los casos generan contaminación (Domínguez Pacheco et al., 2010). La aplicación de esta herramienta puede mejorar la producción agrícola debido a que estimula diversos procesos en los organismos, lo cual se ve reflejado en modificaciones morfológicas, mejoras en los procesos germinativos y de desarrollo de los mismos; razón por la cual se han adelantado estudios con muchas especies vegetales, en particular aquellas de interés agrícola como el tomate (Carbonell et al., 2000).

La determinación de los efectos de la estimulación magnética en los vegetales se ha enfocado en el análisis de algunas variables físicas, como la conductividad de lixiviados (Vashisth & Nagarajan, 2010), la absorción de agua y en propiedades del pericarpio (Iqbal et al., 2012); así como también, en propiedades bioquímicas, como la actividad enzimática, el análisis de azúcares, de clorofilas y de compuestos reductores; y un número mayor de variables biológicas como la tasa de germinación, el vigor, el establecimiento de las plántulas (Domínguez Pacheco et al., 2010), el crecimiento de las hojas, el tallo y la raíz, la fructificación y la producción de biomasa (Flórez et al., 2007a). Pero son pocos los reportes encontrados sobre el estudio de variables bioquímicas relacionadas con la actividad de proteínas, tema que puede servir de explicación para entender los mecanismos bioquímicos activados por la estimulación magnética.

Las proteínas son las encargadas de regular diversos procesos en las plantas, como detoxificación, adaptación de plantas superiores a la sequía y desecación desde una aproximación genética, regulación en procesos de la embriogénesis (LEA), regulación de la expresión de genes y traducción de señales en respuesta al estrés, otorgar tolerancia ante una limitación hídrica y adaptación celular tales como, proteínas canal, enzimas que participan en la síntesis de osmolitos (Cardozo & Quiriban, 2014). Las proteínas liposolubles son una mezcla compleja que incluye fracciones de albúminas, globulinas, zeínas o prolaminas y gluteninas (Wegary et al., 2011). Las proteínas de almacenamiento de las semillas de tomate, han sido investigadas ampliamente como una herramienta en la mejora de los cultivos (Doria, 2010). Las proteínas se han extraído de diferentes matrices empleando principalmente extracción líquido-líquido, y ha sido estudiada aplicando diferentes técnicas de análisis químico. Los métodos más utilizados son los que se valen de la absorción que presentan estas moléculas al ser coloreadas con reactivos específicos; cada uno de estos procedimientos tiene su

particularidad, y el mejor solo podrá ser determinado dependiendo de las concentraciones de las proteínas en las muestras (Vicente & Felipe, 2016)

Debido a las distintas funciones de las proteínas en el crecimiento vegetal sobre las semillas, se hace necesario realizar un estudio en el cual se pueda comparar la concentración de proteínas totales tanto en semillas estimuladas como en las no estimuladas magnéticamente, y poder con esto evidenciar si hay un efecto del campo magnético sobre las proteínas.

HIPÓTESIS

Dada la importancia de las proteínas en el ciclo biológico de las semillas y de las plantas, y del probado efecto positivo de los tratamientos magnéticos sobre la germinación, nos planteamos la posibilidad de que exista una relación entre los tratamientos magnéticos y la concentración de proteínas totales presentes en semillas. La efectividad de dichos procesos se manifiesta y ha sido investigada por el análisis de variables como la germinación, la longitud de la planta, la imbibición y el vigor de las plantas. Sin embargo, aunque algunas variables bioquímicas han sido investigadas, es fundamental intensificar esfuerzos en esta área para que junto con el análisis de variables biológicas, bioquímicas, biofísicas y fisiológicas, se pueda realizar una descripción con múltiples concepciones que permita identificar los mecanismos activados por la incidencia del campo magnético sobre sistemas complejos tal como los biológicos, y de esta manera aportar a estandarizar los procedimientos de estimulación magnética en los sistemas vegetales, estableciendo los campos magnéticos como una herramienta biotecnológica de impacto agropecuario. Por lo anterior se formula la siguiente hipótesis.

¿Los tratamientos magnéticos de las semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) generará un aumento en la concentración de proteínas totales, lo cual redundará en la aceleración de los procesos metabólicos, evidenciándose un menor tiempo de germinación, así como un incremento de la tasa de germinación?

OBJETIVOS

Objetivo general

- Analizar el efecto del tratamiento magnético sobre la concentración de proteínas totales en semillas de tomate (*Solanum lycopersicum L.*).

Objetivos específicos

- Validar un método por espectrofotometría de ultravioleta-visible para la cuantificación de proteínas totales en semillas de tomate.
- Determinar las mejores condiciones de la extracción para la obtención de proteínas totales en semillas de tomate.
- Determinar el efecto del tratamiento magnético sobre la concentración de proteínas en semillas de tomate.

CAPÍTULO 1. ESTADO DEL ARTE

Han sido importantes y variadas las investigaciones que se han desarrollado en cuanto a la determinación y extracción de proteínas totales presentes en una gran variedad de plantas, por ejemplo, el tomate (*Solanum lycopersicum* L.), que es una especie de fruta muy conocida en nuestro país y uno de los principales alimentos en distintas partes del mundo. *Solanum lycopersicum* es una dicotiledónea perteneciente a la familia de las Solanáceas; es una planta perenne cultivada anualmente y la forma de su desarrollo puede ser rastrera, semirrecta o erecta (de Desarrollo, 2014). Es la principal hortaliza de fruto en el mundo y de alto consumo como producto en fresco o procesado, ya sea en pasta, jugo, fruta deshidratada, entre otros (Stevens, 1913).

Por lo anterior es importante determinar la concentración de proteínas en una muestra biológica para abordar un esquema de purificación de una proteína concreta, conocer la actividad específica de una preparación enzimática o para el diagnóstico de enfermedades (Moreno et al., 2018).

Gracias a los aportes de la tecnología y la ciencia han sido varios los estudios que se han desarrollado, pues desde principios de la década de 1950, se han utilizado diversos equipos como los espectrofotómetros, que han sido un instrumento corriente en laboratorios químicos y médicos; en la actualidad, este equipo es muy utilizado en diversos ámbitos de la ciencia, pues el alcance de esta tecnología ha aportado en la búsqueda del conocimiento y es por ello, que, con los recientes desarrollos tecnológicos en el área de la informática, junto con el perfeccionamiento de los foto-detectores y las lámparas, han permitido producir espectrofotómetros cada vez más rápidos, con resultados muy precisos y la posibilidad de reproducir los experimentos (García, 2013).

Por otra parte, dada su efectividad en laboratorio se han demostrado que hay dos procesos físicos para la extracción de proteínas: agitación orbital y ultrasonidos. El primero de ellos consta de un control de tiempo, el cual puede ser ajustado según la necesidad, también tiene un control de velocidad que puede ser ajustada según se requiera (Vicente & Felipe, 2016), y el segundo método de extracción se fundamenta en la deformación elástica de materiales ferroeléctricos dentro de un campo eléctrico de alta frecuencia y es causada por la mutua atracción de moléculas polarizadas en el campo (Raichel, 2006), también hace uso de fenómenos físicos y químicos que son fundamentalmente diferentes a los que se aplican convencionalmente en las técnicas de extracción, procesamiento y conservación, además ofrece ventajas en términos de productividad, rendimiento y selectividad, ya que se obtienen mejores tiempos de proceso, mejora la calidad, reduce riesgos químicos y físicos y se considera ambientalmente amigable (Chemat et al., 2011).

Los principales métodos para la cuantificación de las proteínas extraídas a través de derivados colorimétricos son: Bradford, Biuret, Lowry y ácido bicinconínico (BCA), muchos de estos métodos se basan en la propiedad intrínseca de las proteínas para

absorber luz en el UV, para la formación de derivados químicos, o la capacidad que tienen las proteínas de unir ciertos colorantes (Fernández Reyes Aurora Galván Cejudo, n.d.-a). El uso del método adecuado depende de la cantidad total de proteína presente en la muestra, la concentración de la proteína, la especificidad del método, la presencia de otras sustancias que pudieran interferir y de la facilidad y reproducibilidad del método (García-Arellano & Vázquez-Duhalt, 1998).

Uno de los estudios más reciente es de 2015 en la universidad de Caldas, en el cual evaluaron la relación de algunas variables biológicas con los procesos bioquímicos involucrados en la germinación y el crecimiento de las plántulas de maíz, En este estudio encontraron que el uso del ultrasonido presenta mejor comportamiento frente al de agitación de vaivén en tanto logra extraer mayor cantidad de proteína en menor tiempo. En dicho estudio, el mejor protocolo de extracción para semillas de maíz se basa en extracción por ultrasonido con Tris-Base. Por otro lado, definen que la metodología más eficiente fue la de Bradford, dado que la ecuación tiene una mayor precisión en comparación con la de lowry. En cuanto al tiempo medio de germinación, se determinó que los mejores tratamientos son con dosis de 100 mT durante 60 minutos, 250 mT durante 30 minutos, 200 mT durante 60 minutos y 100 mT durante 30 minutos, mostrando que los tratamientos donde la germinación tardó más horas en las dosis de 200 mT, 250 mT y 100 mT durante 15 minutos, lo que permite afirmar que la estimulación magnética de semillas durante tiempos preferiblemente de 30 y 60 minutos, sí tiene un efecto positivo en la germinación, evidenciado en la velocidad de emergencia de la radícula. Con respecto al tiempo medio de crecimiento radical los tratamientos con resultados más rápido fueron con dosis de 200 mT y 100 mT durante 60 minutos, 100 mT y 200 mT durante 30 minutos (Correa et al., 2017).

Es importante señalar que uno de los retos que tiene la investigación es generar tecnologías respetuosas con el medio ambiente y basados en tratamientos físicos y biológicos, los cuales permitan aumentar el poder germinativo de la semilla, disminuir periodos de latencia, aumentar el porcentaje de germinación, el vigor de las plántulas, entre otros. Actualmente, sabemos gracias a las investigaciones que se han desarrollado previamente que los campos magnéticos han demostrado ser uno de los métodos más fables y amigables con el medio ambiente, pues ha sido utilizado como un método pre-germinativo, además de ello esta técnica se ha extendido cada vez más debido a su popularidad (Dobrąnszki, 2015; Feizi et al., 2012; Iqbal et al., 2012).

CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO

En este capítulo, se describen algunos conceptos de la aplicación de tratamientos magnéticos en los seres vivos especialmente en tomate. Así como también se tratan conceptos sobre las proteínas haciendo énfasis en la extracción y cuantificación de estas biomoléculas.

2.1 Campos electromagnéticos

Los efectos de los campos magnéticos se han conocido desde épocas muy antiguas al observar por primera vez los fenómenos que producía la magnetita (Fe_3O_4), la cual es un imán permanente que se encuentra en forma natural. El descubrimiento de la propiedad de este material de indicar el norte y el sur tuvo profunda influencia en la navegación y la exploración. Posteriormente, a principios del siglo XIX, Oesterd descubrió que una corriente eléctrica producía un campo magnético, hallazgo que fue reforzado por los trabajos de Gauss, Henry, Faraday, Maxwell y otros, quienes demostraron que los campos eléctricos y magnéticos están entrelazados (Carbonell et al., 2017).

De esta manera los estudios realizados a lo largo de la historia por matemáticos, físicos e investigadores, han ayudado en la conformación de la teoría electromagnética, la cual se basa en la observación de los fenómenos eléctricos y magnéticos causados por cargas eléctricas en reposo o en movimiento. Las cargas eléctricas pueden ser positivas o negativas, siendo ambas fuentes de un campo eléctrico, y si estas se encuentran en movimiento, producen una corriente, la cual origina un campo magnético (Barco Rios et al., 2012)

Sabiendo que las cargas eléctricas en movimiento son fuente de un campo magnético, se pueden considerar dos cargas eléctricas q y q' , a una distancia r , que se mueven con velocidad moderada v , siguiendo dos rectas paralelas; las cargas del mismo (o distinto) signo se atraen (o repelen) débilmente con la fuerza magnética (Ferrero Botero et al., n.d.)

La fuerza magnética se relaciona con el campo magnético cuando, además de la fuerza electrostática, se ejerce otra fuerza perpendicular a la trayectoria sobre una carga móvil que pase por dicho punto (García, 2013)(ecuación 1).

$$\mathbf{F} = q \cdot \mathbf{v} \times \mathbf{B} \quad (1)$$

Donde B corresponde a la densidad de flujo magnético, F a la magnitud del vector fuerza, q a la carga eléctrica y v a la velocidad de la carga. La unidad del flujo magnético es el tesla (T).

2.1.1 Generalidades de los campos electromagnéticos

Debido a que la fuerza magnética es menor que la fuerza eléctrica, la fuerza magnética podría despreciarse con respecto a la eléctrica, pero hay sistemas de

partículas en las que esto no sucede; en una corriente de conducción donde las cargas positivas y negativas están presentes con iguales densidades, el campo eléctrico macroscópico es cero, pero el campo magnético de las cargas móviles no, como sucede en el caso del electroimán, donde las fuerzas magnéticas tienen gran importancia práctica (Javier Jimenez Cardenas, 2018). Por otro lado, las bobinas de helmholtz producen un campo magnético casi uniforme sobre un volumen mucho más grande que el de un solenoide y se limitan a aplicaciones de campo magnético bajo. Una de las características más importantes al elegir un generador de campo magnético es encontrar una región de interés en donde la inducción magnética conserve la homogeneidad del campo magnético, esta define la variación de la densidad de flujo magnético en un volumen determinado (Javier et al., 2018). Las bobinas de helmholtz y el electroimán, permiten una generación de campo magnético activo.

2.1.2 Generadores de campos magnéticos

Bobinas de helmholtz: es un arreglo para crear un campo magnético de baja frecuencia extremadamente uniforme entre y en el centro de las bobinas. Se compone de dos bobinas circulares similares, con igual número de vueltas y una distancia entre ellas igual a su radio. La densidad de flujo magnético es directamente proporcional a la corriente y el número de vueltas en la bobina es inversamente proporcional a la distancia entre las bobinas (Enrique & Osorio, 2019)(Figura 1).



Figura 1. Bobinas de Helmholtz

Electroimán: Un electroimán consiste en un par de bobinas de Helmholtz con núcleos de hierro, los devanados se localizan en un eje común unidos a un yugo (Figura 2); en el electroimán se genera una densidad de flujo magnético mayor en las caras de los núcleos, debido a elementos adicionales que crean un circuito magnético, orientando las líneas de fuerza dispersas hacia el centro de las bobinas presentando la magnetización de los núcleos, que ayuda a aumentar la densidad de flujo magnético (Torres et al., 2007). El campo magnético producido por un electroimán dependerá de las características magnéticas y geométricas de los núcleos; este

genera niveles de campo magnético más altos, en comparación con las bobinas de helmholtz (Sicard, n.d.)



Figura 2. Electroimán

Otros generadores de campos magnéticos son los imanes permanentes, que a diferencia de las bobinas de Helmholtz y los electroimanes no producen campos magnéticos uniformes.

Imanes permanentes: son materiales que pueden ser imantados y generar un campo magnético persistente, a diferencia de los imanes temporales que generan un campo magnético sólo mientras está activa la fuerza o energía externa que lo genera [98]. En los imanes permanentes la mayor densidad de flujo se encuentra en sus extremos y disminuye al irse acercando al centro del imán (Pérez- Alcázar, 2016)(Figura 3).



Figura 3. Imán toroidal

2.2 Tomate

El tomate perteneciente a la familia *Solanaceae* es una planta dicotiledónea (Cestoni et al. 2006 como se cita en López Madrid, 2016) y herbácea perenne, que se cultiva en forma anual para el consumo de sus frutos (Semillaria 2015 como se cita en López

Madrid, 2016) .El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es la hortaliza mayormente consumida y económicamente más rentable en el mundo, dado que se cultiva en más de cien países para consumo en fresco o para su industrialización. Los diez principales países productores que concentran más de 80 % del total mundial son: China, Estados Unidos, India, Egipto, Turquía, Italia, Irán, España, Brasil y México (FAO, 2012).

La especie *Solanum lycopersicum* (tomate), se ubica en la región Andina, desde el sur de Colombia hasta el norte de Chile. Posiblemente desde allí fue trasladada a América Central y México, donde se domesticó (Monardes, H., 2009). La planta de tomate posee porte arbustivo y puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. Existen variedades de tomate de crecimiento limitado y otras, por el contrario, de crecimiento ilimitado (Arias, 2001 como se cita en (Hernández-Leal et al., 2013).

2.2.1 Requerimiento edafoclimático

En cuanto al pH de suelo, el óptimo debe oscilar entre 6 y 6,5 para que la planta tenga un buen desarrollo y disponga de nutrientes necesarios. Los suelos pueden ser ligeramente ácidos o ligera a medianamente alcalinos, ya que el tomate es la especie cultivada en invernadero que mejor tolera las condiciones de pH (Técnico et al., n.d.)

Solanum lycopersicum es una hortaliza de clima cálido y moderado, es susceptible a heladas y temperaturas bajas. El crecimiento se favorece entre 18 °C y 24 °C, temperaturas superiores a los 30 °C reducen la fructificación y la fecundación de los óvulos, afectan el desarrollo de los frutos y disminuyen el crecimiento y la biomasa de la planta (Díaz, C. 2007 citado en Técnico et al., n.d.). Escobar & Lee (2001) informan que la humedad relativa ideal para el desarrollo, crecimiento y fertilidad del cultivo de tomate oscila entre el 60% y el 85%. Una alta humedad relativa y una baja iluminación reducen la viabilidad del polen y pueden limitar la evapotranspiración, disminuir la absorción del agua y los nutrientes, generar déficit de elementos como el calcio e inducir desórdenes fisiológicos (Escobar & Lee, 2001; Infoagro Systems S.L. 2016).

2.2.2 Estructura de la semilla de tomate

La semilla es el principal órgano reproductivo de la gran mayoría de plantas superiores (terrestres y acuáticas), la semilla desempeña un rol fundamental de los ecosistemas, ya que, gracias a ella se da la regeneración de bosques y la sucesión ecológica mediante la renovación, persistencia y dispersión de poblaciones de plantas (Estrada, 2010).

La semilla de tomate es plana y de forma lenticular (Grinfeld & Mendiz, 2007), tiene de 3 a 5 mm de diámetro y es discoidal y de color grisáceo; la superficie está cubierta por vellosidades, pequeñas escamas y el resto de las células externas de tegumento parcialmente gelificadas al producirse la madurez del fruto (Figura 4) (Estrada, 2010).

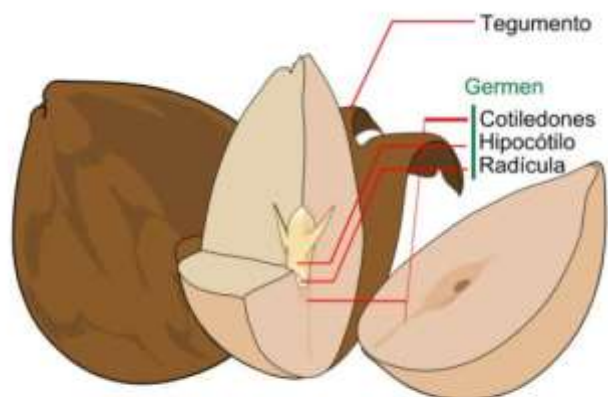


Figura 4. Semilla de tomate

2.2.3 Composición química

El fruto de *Solanum lycopersicum* es fuente de vitaminas A, B1, B2, B6, C y E, y de minerales como fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, sodio, hierro y calcio. Este fruto posee importante valor nutricional; pues incluye proteínas, hidratos de carbono, fibra, ácido fólico, ácido tartárico, ácido succínico y ácido salicílico. El aporte de cada 100 g de nutrientes del tomate en agua es del 94,52% (Arroyo et al., n.d; Grinfeld & Mendiz, 2007).

En la *Tabla 1* se muestra la composición porcentual, la cual tiene una aportación energética de 100 KJ (20 Kcal)

Tabla 1. Composición porcentual en 100 gramos de tomate.

Elemento	Porcentaje
Agua	94
Carbohidratos	3
Fibra	1.8
Proteínas	1
Grasas	0.2
Azúcares simples	Porcentaje
Fructosa	1.82
Glucosa	1,45
Azúcares complejos	Porcentaje
Pectinas y Arabinogalactanos	0.35
Xilanos y Arabinoxilanos	0.14

2.2.4 Aplicaciones

El tomate es muy utilizado en el ámbito culinario, como condimento, formando parte de numerosas y diversas salsas. Para aprovechar en toda su integridad es mejor comerlos crudos, en ensaladas o reducidos en forma de pulpa. También es utilizado en un enfoque medicinal ya que posee vitamina A, lo que ayuda a defender al organismo contra diversas infecciones de la boca, garganta y nariz, de la vista y de otras afecciones de órganos internos; contiene vitamina B que ayuda a estimular las funciones del aparato digestivo; contiene vitamina C que ayuda a mantener en buen estado las encías y para conservar los dientes bien firmes en ella (Quer, 2000).

2.3 Proteínas

Las proteínas son macromoléculas que están formadas principalmente por carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno. Sin embargo, algunas pueden contener azufre hierro, fósforo, magnesio y cobre entre otros elementos (Luque, M., 2011). La unidad mínima de estas son los aminoácidos (a.a), los cuales se encuentran unidos mediante enlaces peptídicos, cuando la molécula está formada por menos de 10 a.a se denomina oligopéptido, si es superior a 10 a.a se llama polipéptido y si el número es superior a 50 a.a se habla ya de proteína (Kondrikov et al., 1999).

Las proteínas pueden tener diferentes estructuras, dependiendo de su plegamiento. La estructura primaria se caracteriza por ser una secuencia de aminoácidos de la proteína; la estructura secundaria involucra aminoácidos cercanos en secuencia y los distintos tipos de estructura se definen como combinaciones periódicas de ángulos diedros phi y psi, hélices hebras; la estructura súper-secundaria en las proteínas están formados por la asociación y la interacción de elementos de estructura secundaria; la estructura terciaria arreglo espacial de elementos de estructura secundaria, empaquetamiento de cadenas laterales y el conjunto de interacciones no covalentes que determinan la estructura tridimensional de la proteína y finalmente la estructura cuaternaria es el nivel de estructura que resulta de la asociación de dos o más subunidades (Santos, 2009).

En cuanto al tomate las proteínas representan casi el 1% del peso total del tomate. El tomate contiene un poderoso antioxidante que podría ayudar a proteger las células del daño, el cual es el licopeno, este último es un tipo de pigmento orgánico llamado carotenoide y está relacionado con el betacaroteno (Bojórquez et al., 2013a)

El licopeno es un carotenoide de estructura acíclica, isómero del beta caroteno, que carece de actividad provitamina A (por no contar con el anillo de beta-ionona), (Figura 5), se caracteriza por poseer una estructura química de cadena abierta alifática formada por cuarenta átomos de carbono con trece enlaces dobles de los cuales once son conjugados, por lo que es muy reactivo frente al oxígeno y a los radicales libres (Bojórquez et al., 2013b).

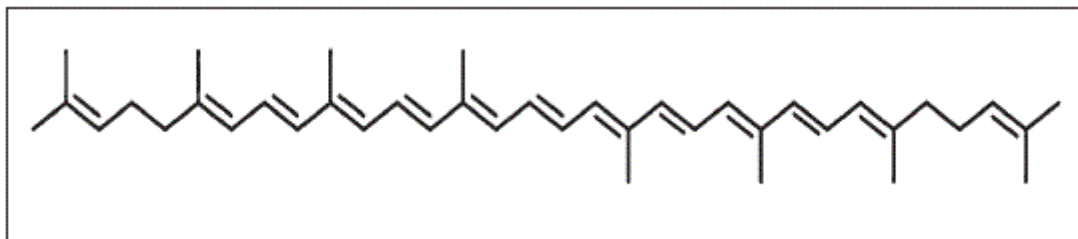


Figura 5. Estructura química de Licopeno

Una de sus fuentes principales del licopeno es el tomate (80-90%), que es un producto básico considerado saludable por su bajo contenido en kilocalorías y grasa y su contenido en fibra, proteínas, vitaminas E, A, C, y potasio (Vitale et al., 2010). Además de estar presente en los alimentos, el licopeno es uno de los carotenoides que se encuentra distribuido en mayores cantidades en el suero humano (21-43% de los carotenoides totales) y los diferentes tejidos (hígado, riñón, glándulas renales, testículos, ovarios y próstata). Al ser un antioxidante, es importante puesto que ayuda al cuerpo a protegerse contra los efectos nocivos de los radicales libres, que pueden ocasionar enfermedades relacionadas con el corazón o los vasos sanguíneos (enfermedades cardiovasculares) y cáncer (Bojórquez et al., 2013a)

2.4 Métodos de extracción

La extracción de las proteínas es muy importante en el área de la proteómica, dado que con ello se puede separar, identificar y caracterizar las proteínas, con el objetivo de comprender la interacción con otras proteínas dentro del organismo (sea una bacteria, un microorganismo una planta o un animal), por ende, es de vital importancia escoger un método de extracción con base al tipo y la cantidad de muestra que se obtenga. Lo primero en realizar es la ruptura celular o lisis, donde los métodos más empleados se basan en la homogenización del tejido y la destrucción de membranas por medio de procesos físicos y/o químicos, con el fin de maximizar la liberación de las proteínas y al mismo tiempo evitando la degradación por factores como la temperatura, o modificaciones por proteólisis, oxidación, entre otros; las técnicas de ruptura celular se pueden clasificar en métodos físicos mecánicos, métodos físicos no mecánicos y por métodos químicos, entre los que se presenta el tratamiento con álcalis, detergentes, solventes, ácidos o sustancias caotrópicas (Moreno et al., 2018).

2.4.1 Extracción sólido-líquido con agitación

La extracción Sólido-Líquido es una operación básica de recuperación o extracción mediante la cual uno o varios componentes de una fase sólida desestructurada, se transfiere a una fase líquida, disolvente, casi siempre el sentido de la transferencia es siempre desde el sólido hacia el líquido (Castelló M, Fito P, Seguí L, 2010). Es un procedimiento de extracción que tiene lugar exclusivamente sometiendo a la muestra a la acción del disolvente a través de un proceso de agitación.

De acuerdo a Ortega (2016) dicho proceso es solo aplicable a analitos unidos débilmente a la matriz y una vez extraído el analito, se tiene que separar el disolvente y la matriz. En general el volumen de disolvente utilizado es elevado y por tanto suele

ser necesaria la evaporación del mismo antes de la determinación final con el fin de pre concentrar los analitos.

A pesar de que el movimiento del líquido, con ayuda de bombas para la recirculación del solvente o agitadores mecánicos, desplaza el equilibrio en el sentido de la saturación del solvente, aumentando la eficiencia del proceso, hay que recalcar que la agitación podría causar suspensión de partículas finas en la solución, el cual requeriría subsecuentemente una filtración difícil o clarificación, además de ello este resulta ser complejo por la necesidad de filtración del extracto y la evaporación del disolvente, aumentando por tanto los riesgos de contaminación y/o pérdidas de analito así como la continua exposición del operador a vapores de disolventes tóxicos (PARA & ACERO, 2011; Manrique, Palacios & Sánchez Vilca, 2008; Ortega, 2016).

2.4.2 Extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido

La extracción sólido-líquido ha sido ampliamente utilizada para obtener aislar un compuesto objetivo de una muestra vegetal, en este tipo de proceso se extraen uno o varios solutos de un sólido mediante la utilización de un disolvente líquido. En la extracción S-L asistida por sonicación, la muestra es depositada en una celda por la cual hay paso continuo de solvente fresco y al mismo tiempo se aplican vibraciones acústicas con frecuencias por encima de 20 kHz, que promueven la transferencia de analitos desde la matriz en estudio hasta el disolvente (Rivera et al., 2017).

Cabe destacar que el ultrasonido es una técnica fiable usada principalmente en la industria alimentaria, porque aumenta y mejora el rendimiento de extracción y está basado en la propagación de ondas mecánicas conformada por un conjunto de ciclos, definidos como la combinación de altas y bajas presiones, denominadas compresiones y rarefacciones, respectivamente (Medina Torres, 2017; Robles Ozuna & Ochoa Martínez, 2012).

2.5 Espectrofotometría

El fundamento de la espectroscopía se debe a la capacidad de absorción de radianes dentro del espectro UV-visible que tienen las moléculas. Las longitudes de onda de las radiaciones que una molécula puede absorber y la eficiencia con la que se absorben dependen de la estructura atómica y de las condiciones del medio (pH, temperatura, fuerza iónica, constante dieléctrica) (Clingingsmith, 1984). Para el análisis de dicha absorción se utiliza un espectrofotómetro, el cual mide la transmitancia o absorbancia de una muestra, en función de la longitud de onda de la radiación electromagnética (Abril Díaz et al., n.d.).

Por otro parte se debe tener en cuenta el análisis volumétrico, que es el cambio de color que señala el final de una valoración y normalmente se detecta visualmente. Este proceso es inherentemente subjetivo y puede ser una fuente de error. El uso de un espectrofotómetro para detectar el final, introduce la objetividad y la automatización en el análisis (Owen, n.d.)

Cabe destacar que existe una relación entre la absorbancia y la concentración de una muestra, que está dada por la ley de Lambert- Beer (ecuación 2). Esta ley es una ley

límite, es decir que sólo se cumple en determinadas condiciones: luz monocromática y soluciones diluidas. Si esta ley se cumple, la diferencia entre la radiación incidente (I_0) y la transmitida (I), resulta ser proporcional a la concentración; por lo tanto, en estos análisis la cantidad de luz absorbida se expresa como transmitancia o absorbancia (Tonny, 1967; UNLP, 2016)

$$A = \epsilon \times b \times c \quad (2)$$

A: absorbancia, adimensional. ϵ : coeficiente de extinción molar o absortividad molar, se define como la unidad de absorbancia por unidad de concentración y por unidad de longitud de la trayectoria de luz; es una constante definida que depende de la solución y la longitud de onda, en general su unidad es la inversa de la molaridad por la inversa de cm, es decir $(M \times cm)^{-1}$ ó $L/mol \times cm$; b: es el camino óptico, en general se mide en cm. c: es la concentración del analito expresada en molaridad (M).

2.5.1 Método de Lowry

El método de Lowry (1951) tiene como fundamento que el Cu^+ forma complejos de coordinación con los enlaces peptídicos consecutivos de las proteínas, dando lugar a un compuesto coloreado azul; posteriormente dicho compuesto es capaz de reducir al reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico), dando un color más azulado y por último el reactivo de Folin-Ciocalteu reacciona con los residuos de tirosina de la cadena polipeptídica, produciendo un color azul por la reducción de fosfomolibdato en medio básico (Roca et al., 2003).

El método de Lowry tiene la ventaja de ser extremadamente sensible, capaz de detectar cantidades del orden de 10 microgramos de proteína y es monitoreado a 750 nm; su inconveniente principal es que, al evaluar los fenoles presentes en la proteína, la intensidad del color resultante varía entre las distintas proteínas; sin embargo, cuando tratamos con mezclas biológicas complejas, podemos perfectamente calibrar el método con alguna proteína comercial, como es la seroalbúmina bovina (Juárez, N., 2017).

2.5.2 Método de Bradford

Este método se fundamenta en la unión de las proteínas al colorante azul brillante de Coomassie G-250, provocando un cambio en el máximo de absorción de 465 a 595 nm, por lo tanto, la medida de absorbancia del complejo proteína-colorante se realiza a 595 nm (Roca et al., 2003). Este método es sensible (1-15 μg), simple, rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación, entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas (Fernández Reyes Aurora Galván Cejudo, n.d.-b)

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

En este capítulo se explicará la manera en la que se expusieron las semillas de tomate a un campo magnético, su modo de siembra y los protocolos empleados para la extracción y cuantificación de proteínas totales.

3.1 Matriz de estudio

Se usaron semillas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) proporcionadas por Sáenz Fety, variedad Santa Clara. Las semillas fueron preseleccionadas y se tomaron las que presentaban una morfología uniforme y sin daños visibles, se conformaron grupos de 200 semillas y se ajustó la masa promedio en 25.5 ± 0.4 mg. Este proceso se realizó con el fin de garantizar la uniformidad y calidad de cada grupo de semillas y del material en general, y así reducir la variabilidad química y biológica.

3.2 Tratamientos magnéticos

La generación del campo magnético se realizó con un conjunto de imanes toroidales con densidad de flujo magnético nominal de 100.00 mT, 5.00 cm de radio externo, 2.50 cm de radio interno y 2.00 cm de espesor. Los imanes fueron caracterizados previamente con un teslámetro digital FW Bell 5180 con resolución de 0.01 mT, sensores axial y transversal y un sistema de posicionamiento bidimensional con escala milimétrica.

Cada grupo de 200 semillas previamente seleccionadas fueron sometidas a tiempos de exposición de 1, 5, 23, 41, 751, 863, 865, 869 y 895 segundos, dando un total de nueve tratamientos magnéticos, además de un control.

3.3 Siembra

Cada grupo de 200 semillas tratadas magnéticamente (parcela) se dividió en cuatro grupos de 25 semillas (subparcela), siguiendo los lineamientos propuestos por la ISTA, para su siembra en cajas Petri (100 x 15 mm) con papel absorbente como soporte. Los parámetros temperatura y volumen de agua para la siembra, fueron de 28.0 °C y 11.0 mL respectivamente. Dichas magnitudes de los parámetros fueron definidas mediante una combinación aleatoria de valores, al emplear la optimización Bayesiana. Las semillas se mantuvieron en incubadoras Incucell, sin luz.

3.4 Pruebas de germinación

Después de 16 horas de la siembra se realizó revisión de la germinación cada cuatro horas, hasta la hora 106. Se asumió que las semillas de tomate habían germinado cuando la radícula alcanzo una longitud igual o mayor de 1.0 mm. Para determinar el efecto de los tratamientos sobre la germinación se evaluaron el parámetro t_{50} .

$$t_{50} = \frac{\sum n_i * t_i}{\sum N_i} \quad (3)$$

Donde, n_i es el número de semillas germinadas en el tiempo t_i , y N_i corresponde con el número total de semillas sembradas.

3.5 Métodos de extracción

Las proteínas totales fueron extraídas mediante el uso de dos solventes diferentes: Tris-HCl a pH de 8.0 (Tris-HCl 0.05 M, urea 5 M, SDS (Dodecil-sulfato sódico) 0.02% y glicerol 1%) y Tris-Base a pH de 8.0 (Tris-Base 0,05 M, ácido cítrico monohidratado 0.007 M, hidrocloreuro de cisteína 0.1%, ácido ascórbico 0.1% y glicerol 1%). Se trabajaron a diferentes tiempos de extracción (30, 50, 70, 90, 110, 130, 150 y 170 min) dos métodos extractivos diferentes, como se presenta a continuación.

3.5.1 Método A: Agitación orbital

50 mg del polvo de la semilla se depositaron en un tubo de ensayo con 3 mL del solvente de extracción (Tris-HCl o Tris-Base) y se colocaron en un agitador orbital durante 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150 y 170 min. Al cabo de este tiempo el material se decantó obteniéndose un sobrenadante y un pellet; el primero se retiró y se conservó, mientras que al segundo se le adicione una nueva porción del respectivo solvente fresco y se realizó el proceso descrito dos veces más. Los sobrenadantes obtenidos se unieron y se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 minutos, finalmente los extractos fueron pesados.

3.5.2 Método B: Ultrasonido

50 mg del polvo de la semilla se depositaron en un tubo de ensayo con 3 mL del solvente de extracción (Tris-HCl o Tris-Base) y se colocaron en un equipo de ultrasonido durante 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150 y 170 min a 28 °C. Al cabo de este tiempo el material se decantó obteniéndose un sobrenadante y un pellet; el primero se retiró y se conservó, mientras que al segundo se le adicione una nueva porción del respectivo solvente fresco y se extrajo dos veces más. Los sobrenadantes obtenidos se unieron y se centrifugaron a 7000 rpm durante 10 minutos, finalmente los extractos fueron pesados.

3.6 Cuantificación de proteínas

La cuantificación se llevó a cabo mediante espectrofotometría de ultravioleta-visible, se aplicaron las metodologías de Bradford (1976) y Lowry et al. (1951). En los dos casos se realizó una curva patrón con seroalbúmina bovina (BSA) a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L. Cada uno de los patrones fueron evaluado por triplicado.

3.6.1 Método de Bradford

Para la preparación del reactivo se empleó un balón volumétrico, en este se disolvió Azul Brillante de Coomassie G-250 en etanol al 95%; a esta solución se agregó ácido fosfórico al 85% (p/v), y la solución resultante fue diluida en agua destilada hasta el volumen deseado. Las concentraciones finales en el reactivo fueron: Azul Brillante de Coomassie G-250: 0.01% (p/v); etanol: 4.7% (p/v), y ácido fosfórico: 8.5% (p/v).

El reactivo se utilizó el mismo día de la preparación, dado que esta solución se degrada fácilmente. Se tomaron 200 μ L de muestra y 2 mL de reactivo de Bradford en un tubo de ensayo que se llevó a un agitador de contacto tipo vórtex marca Labnet S0200 modelo VX-200, durante 15 segundos, para garantizar la homogeneidad de la solución. Se contabilizaron dos minutos antes de llevar las soluciones a las celdas, y se realizarán tres lecturas de absorbancia por cada celda, a 635 nm.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Esta sección se divide en dos partes principales. En la primera se presentan, la validación del método espectroscópico y los análisis para determinar el mejor método de extracción para la obtención de proteínas totales. En la segunda se muestra y analiza la influencia de la estimulación magnética sobre la germinación y la concentración de proteínas totales en las semillas de tomate.

4.1 Cuantificación de proteínas totales

4.1.1 Curva de Calibración

Para cuantificar la cantidad de proteínas totales en las muestras de semillas de tomate, se realizó una curva de calibración con estándar externo, en esta se relacionó la concentración versus la absorbancia de cada uno de los estándares trabajados. Se dispuso de 6 niveles de concentración, iniciando en 0.00 mg L⁻¹ y aumentando secuencialmente con variaciones en aumento de 100 mg L⁻¹ hasta alcanzar una concentración final de 500.00 mg L⁻¹. De cada patrón se hicieron tres réplicas, para un total de 18 datos.

Para conocer la relación entre las dos variables de estudio (concentración y absorbancia) se realizó una regresión lineal simple por el método de mínimos cuadrados y se verificaron los supuestos que corroboran la fidelidad de la información aportada por el ANOVA paramétrica. Respecto al supuesto de normalidad de los residuos se obtuvo que estos no provenían de una distribución normal según la prueba de Shapiro-Wilk (p-valor=0,0015), esto con una significancia del 5%; sin embargo, la curva de calibrado planteada está dotada de robustez, hablando en términos estadísticos, esto pues todos los niveles de concentración de interés evaluados tenían el mismo número de réplicas, teniendo como tal un diseño experimental balanceado, donde la prueba F es robusta para el error tipo I en el caso de no normalidad (Melo et al., n.d.). Ahora bien, respecto al test de homocedasticidad se seleccionó la prueba de Brown-Forsythe, la cual proporciona buena robustez cuando la distribución subyacente de los residuos no es normal, y mediante la que se obtuvo aprobación con una significancia del 5%, es decir que las varianzas entre los diferentes niveles de concentración son estadísticamente iguales (p-valor=0,3566). Finalmente, el supuesto de independencia fue comprobado de manera gráfica, y se hizo evidente que los residuos se distribuían de manera aleatoria.

Después de haber verificado los supuestos del modelo, se realizó el análisis de varianza de la regresión. Este análisis se realizó teniendo en cuenta todas las réplicas por nivel de concentración y no mediante el promedio de cada nivel. Esto con el fin de que el modelo se ajustará más a la realidad mostrada por los datos (Figura 6).

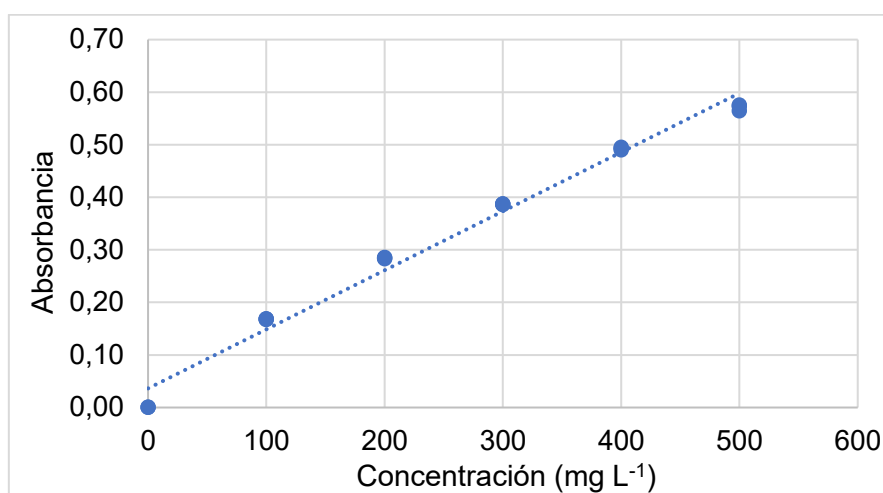


Figura 6. Curva de calibración de proteínas totales empleando el método de Bradford

El análisis de varianza permitió verificar que existía una relación estadísticamente significativa entre la concentración de proteínas totales y la absorbancia (p -valor < 0.0001), es decir, a medida que varía la concentración de proteínas también lo hace de manera significativa la absorbancia, esto con una significancia del 5%. Esto permitió plantear la ecuación del modelo (ecuación 4) y determinar los parámetros del análisis de la regresión (Tabla 2).

$$A = 1.1236 \times 10^{-3} * C + 0.0363 \quad \text{Ecuación 4}$$

donde A es la absorbancia y C la concentración en mg L⁻¹.

Tabla 2. Análisis de regresión

Intercepto ($\hat{\beta}_0$)	Desviación estándar Intercepto ($S_{\hat{\beta}_0}$)	Pendiente ($\hat{\beta}_1$)	Desviación estándar Pendiente ($S_{\hat{\beta}_1}$)	Coficiente Correlación (R)	Coficiente Determinación R^2
0.0363	0.0103	1.1236×10^{-3}	0.0399×10^{-3}	0.9600	0.9216

Por lo anteriormente expuesto y dado que los análisis estadísticos realizados a la curva de calibración fueron satisfactorios, se infiere que el modelo obtenido de la recta sirve para determinar la concentración de proteínas totales en muestras vegetales, siempre y cuando estas se encuentren en el rango de concentración propuesto.

4.1.2 Cifras de mérito del método

Para evaluar el método analítico fue necesario determinar los siguientes parámetros: sensibilidad de calibrado, sensibilidad analítica, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), rango lineal, precisión y exactitud, como lo describen la guía de validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición (The Fitness for Purpose of Analytical Methods : A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, n.d.).

Sensibilidad de calibrado

La sensibilidad de calibrado (S_C), corresponde a la pendiente ($\hat{\beta}_1$) de la curva de calibración utilizada para la cuantificación. La cual indica la variación que presenta la señal por una unidad de cambio en la concentración.

$$S_C = \hat{\beta}_1(\pm S_{\hat{\beta}_1}) = 1.1236 \times 10^{-3} (\pm 0.0399 \times 10^{-3}) \text{ U. A.}/(\text{mg L}^{-1})$$

Por otra parte, se determinan los límites inferior y superior del intervalo en el que varía dicha sensibilidad, y se evidencia que a medida que aumenta la concentración en 1.0 mg L^{-1} la absorbancia presenta un incremento desde 1.0515×10^{-3} hasta 1.1957×10^{-3} unidades de absorbancia (U. A.), intervalo obtenido con una confianza del 95% y para los grados de libertad correspondientes.

Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica (γ) es definida por la relación entre la sensibilidad (S_C) de calibrado y el ruido instrumental (S_y) ecuación 5.

$$\gamma = \frac{S_C}{S_y} = 0.42 \text{ L mg}^{-1} \quad \text{Ecuación 5}$$

El parámetro γ se interpreta mejor en términos de su inversa (γ^{-1}).

$$\gamma^{-1} = \frac{1}{\gamma} = 2.37 \text{ mg L}^{-1}$$

Entre el intervalo de concentraciones evaluado, se entiende el inverso de la sensibilidad analítica como la mínima diferencia de concentración que debe presentarse para que se detecte una variación en la señal que sea apreciable. En este caso particular la diferencia mínima que debe presentarse entre las concentraciones, para detectar una variación apreciable en la señal del equipo, es de 2.37 mg L^{-1} .

Límite de detección

El límite de detección (LOD) fue determinado de manera teórica siguiendo el procedimiento de la IUPAC (Boqué, n.d.) usando la expresión de la ecuación 6. El LOD corresponde a la mínima concentración detectable de manera confiable por la técnica.

$$LOD = \hat{\beta}_0 + 2 * t_{0.05;16} * S_{\hat{\beta}_0} = 0.0799 U.A. \quad \text{Ecuación 6}$$

Por lo tanto, la técnica es capaz de detectar proteínas cuando existen señales superiores $0.0799 U.A.$, es decir, cuando el analito presenta concentraciones superiores a $38.84 mg L^{-1}$.

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ) es la mínima concentración cuantificable en forma confiable. Este parámetro se calculó a partir de la ecuación 7.

$$LOQ = \hat{\beta}_0 + 10 * S_{\hat{\beta}_0} = 0.1392 U.A. \quad \text{Ecuación 7}$$

La proteína se vuelve cuantificable mediante la técnica cuando su señal es superior a $0.1392 U.A.$, es decir, cuando el analito está presente en concentraciones superiores a $91.61 mg L^{-1}$.

Rango lineal

Se considera que el rango lineal comprende desde la menor concentración que puede medirse (el LOQ) hasta la pérdida de la linealidad. Por lo tanto, se observa que mediante el coeficiente de determinación del modelo de regresión lineal se explica el 98,56% de la variabilidad de la señal en función de la concentración; mientras que, al hacer uso de un modelo cuyo argumento de función sea la raíz cuadrada de la concentración se explica el 96,63% con lo que se pierde representación de la variabilidad de la respuesta en función del factor. Se define entonces el rango lineal desde $91.61 mg L^{-1}$ hasta $500.00 mg L^{-1}$.

Exactitud

Este parámetro se evaluó determinando el error sistemático de la curva de calibración. Para esto se sometió el intercepto de la curva de calibración a prueba de hipótesis, donde si resulta que es igual a cero es porque no hay existencia de variabilidad significativa en términos de exactitud. A continuación, el conjunto de hipótesis puesto a prueba:

$$H_0: \beta_0 = 0$$

$$H_1: \beta_0 \neq 0$$

Se acepta H_0 , es decir, el intercepto de la recta de calibrado es igual a cero, por lo tanto, el método no presentó errores de tipo sistemático en la curva de calibración con una significancia del 5 %.

Precisión

Se calculó la precisión evaluando la variabilidad en los niveles cuantificables bajo, medio y alto de la curva de calibrado y tomando en todos los casos el error estándar

de estimación presentado en el análisis de regresión lineal simple, respecto a cada pronóstico para los $i = \text{bajo, medio y alto}$, como se muestra a continuación:

$$\% \text{ variación} = \frac{\hat{\sigma}}{\hat{y}_i} * 100\%$$

En términos de precisión se obtuvo que para niveles bajos existe falta de precisión pues el porcentaje de variación en el LOQ es de 17.69%; mientras que para los niveles medio y alto de concentración (250 mg L⁻¹ y 500 mg L⁻¹) las precisiones son buenas, con porcentajes de variación de 7.76% y 4.12% respectivamente. Esto es explicable desde el aspecto de que a menores concentraciones aumenta considerablemente la variabilidad en los resultados de cualquier tipo.

4.2 Extracción de proteínas totales

Para determinar las mejores condiciones del proceso de extracción sólido-líquido para la obtención de proteínas totales, se evaluaron tres factores diferentes: método, solvente y tiempo. Estos se relacionaron con sus respectivos niveles (Figura 7) obteniéndose 32 tratamientos, cada uno de los cuales se realizó por triplicado, para un total de 96 experimentos.

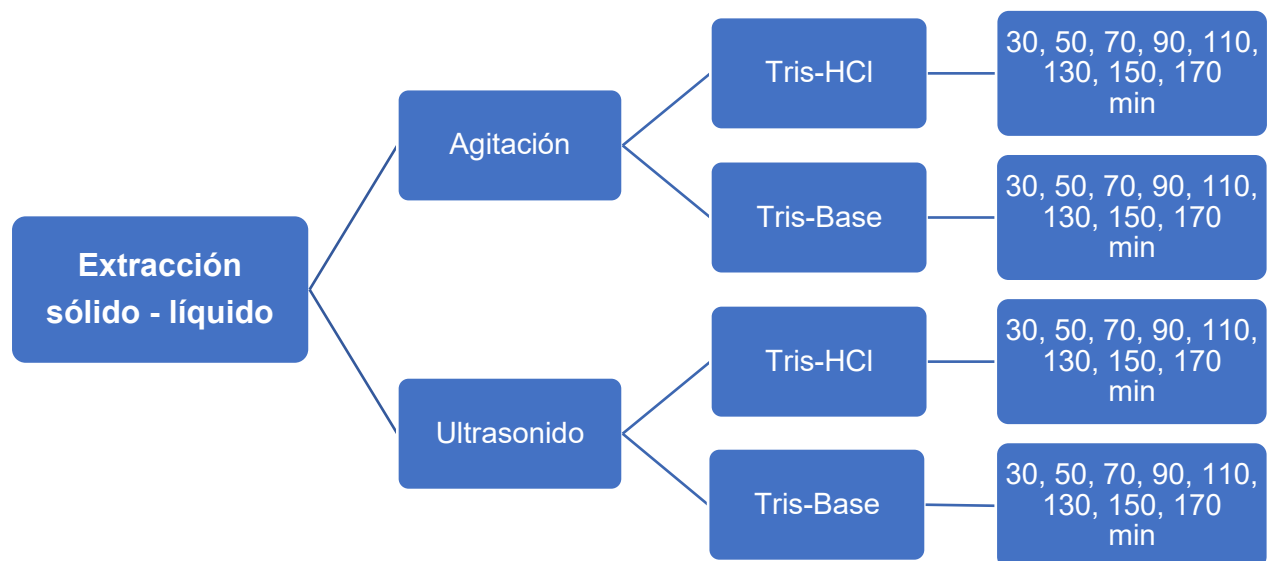


Figura 7. Factores y niveles de la extracción sólido-líquido

4.2.1 Mejores condiciones de la extracción por agitación

Se realizó el análisis de varianzas (ANOVA) paramétrico multifactorial para definir si existían diferencias entre los diferentes niveles del factor tiempo y solvente. El análisis se realizó teniendo en cuenta cada uno de los tratamientos y las respectivas

absorbancias obtenidas en la extracción. Antes de realizar el análisis se verificaron los supuestos de normalidad, independencia y homocedasticidad.

Para este procedimiento no analizaron interacciones entre los factores tiempo y solvente, por lo tanto, se procedió a evaluar si los factores individualmente presentan un efecto significativo sobre la respuesta.

Para los dos factores evaluados, la hipótesis nula se rechazó, es decir, alguna media difiere de las otras con una significancia del 5 % (p-valor inferior a 0.05). Debido a que los factores presentaron efectos significativos sobre la respuesta, se les realizó la prueba de rangos múltiples para determinar cuál era la mejor opción. Los resultados de estas pruebas se muestran en la Tabla 3 y en la Tabla 4.

Tabla 3. Resultados del factor solvente

Solvente	Absorbancia (U.A.)	Error estándar de la media (U.A.)	Grupos homogéneos
Tris-HCl	1.7944	0.0052	X
Tris-Base	1.8365	0.0052	X

En la tabla anterior se presentan los resultados de la prueba de rangos múltiples para el factor solvente. Las X de la columna de grupos homogéneos indica que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos solventes, siendo el mejor tris-base, el cual presentó la mayor absorbancia (1.8365 U.A.). Esto concuerda con los resultados obtenidos por Ranjan et al. (2012), quienes realizaron extracción de proteínas totales en guisantes verdes (*Pisum sativum*), soja verde (*Vigna radiata*) y en el garbanzo (*Cicer arietinum*) empleando diferentes solventes y obtuvieron como mejor resultado la solución preparada con tris-base.

Tabla 4. Resultados del factor tiempo

Tiempo (min)	Absorbancia (U.A.)	Error estándar de la media (U.A.)	Grupos homogéneos
30	1.7314	0.0103	X
50	1.7873	0.0103	X
150	1.8046	0.0103	XX
110	1.8217	0.0103	XXX
70	1.8239	0.0103	XXX
170	1.8406	0.0103	XX
130	1.8489	0.0103	XX
90	1.8651	0.0103	X

En la Tabla 4, se observa que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tiempos de extracción, siendo el tiempo de 90 min el que presenta la mayor absorbancia (1.8651 U.A.), sin embargo, este tiempo de extracción no presenta diferencias estadísticamente significativas con los tiempos de 130 min, 170 min, 70 min y 110 min. Por lo tanto, se decidió trabajar con el tiempo de 70 min, ya que este nos permite llegar más rápidamente a un equilibrio químico y mejorar la eficiencia de la extracción.

En resumen, las mejores condiciones para extraer proteínas totales por medio del método de agitación fueron: tris-base como solvente y 70 min como tiempo de extracción.

4.2.2 Mejores condiciones de la extracción por ultrasonido

Para la extracción por el método de ultrasonido se analizaron dos factores a saber: tipo de solvente y tiempo de extracción. Las mejores condiciones del método de extracción se determinaron mediante un ANOVA paramétrico multifactorial teniendo en cuenta cada uno de los tratamientos con sus respectivas réplicas y la absorbancia de las proteínas extraídas. Antes de realizar el análisis se verificaron los supuestos de normalidad, independencia y homocedasticidad para validar el ANOVA.

Debido a que no se analizaron interacciones entre factores, se procedió a evaluar cada uno de los factores de manera independiente, para determinar si presentan un efecto significativo sobre la respuesta.

Los p-valor arrojados por el ANOVA son inferiores a 0,05, por lo tanto, los dos factores evaluados presentaron efectos significativos sobre la respuesta. Para determinar el mejor nivel de cada factor se realizó la prueba de rangos múltiples. Los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 5 y en la Tabla 6.

Tabla 5. Resultados del factor solvente

Solvente	Absorbancia (U.A.)	Error estándar de la media (U.A.)	Grupos homogéneos
Tris-HCl	1.6782	0.0120	X
Tris-Base	2.0210	0.0120	X

Los resultados de la tabla 5 indican que hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos solventes, siendo tris-base el solvente que presenta la mayor absorbancia (2.0210 U.A.).

Tabla 6. Resultados del factor tiempo

Tiempo (min)	Absorbancia (U.A.)	Error estándar de la media (U.A.)	Grupos homogéneos
170	1.7427	0.0241	X
150	1.7668	0.0241	X
90	1.8368	0.0241	X
130	1.8415	0.0241	X
30	1.8597	0.0241	XX
70	1.8923	0.0241	XXX
50	1.9192	0.0241	XX
110	1.9376	0.0241	X

La tabla anterior presenta las diferencias entre los diferentes tiempos de extracción, siendo el tiempo de 110 min el de mayor absorbancia (1.9376 U.A.), sin embargo, este tiempo de extracción no presenta diferencias estadísticamente significativas con los tiempos de 50 min y 70 min. Por lo tanto, se decidió trabajar con el tiempo de 50 min (1.9192 U.A.), ya que este nos permite obtener la absorbancia más alta de proteínas en menor tiempo y, por ende, la extracción es más eficiencia.

Lo anterior permitió concluir que las mejores condiciones para la extracción de proteínas totales por el método de ultrasonido fueron: tris-base como solvente de extracción y un tiempo de extracción de 50 min.

4.2.3 Comparación entre los métodos de extracción

Los mejores niveles para cada factor evaluado en los métodos de extracción por agitación y ultrasonido fueron determinados anteriormente. En la primera metodología de extracción las mejores condiciones fueron: solvente tris-base y tiempo 70 min; para el segundo procedimiento, las condiciones óptimas fueron: solvente tris-base y tiempo de 50 min.

Para comparar los métodos de extracción previamente optimizados se realizó una prueba t, pero antes se comprobó si los datos provenían de una distribución normal y se efectuó una prueba F. Los análisis se realizaron teniendo en cuenta la absorbancia de proteínas totales en las semillas.

La normalidad de los datos para cada método de extracción se evaluó mediante el estadístico de Shapiro-Wilk, con este se comprobó que los residuos provienen de una distribución normal, tanto para agitación como para ultrasonido (p-valor de 0,1362 y 0,0774 respectivamente).

Así mismo se pudo afirmar que las varianzas entre los métodos son iguales, dado que en la prueba F el p-valor fue de 0.132. La prueba t para diferencia de medias independientes con varianzas iguales indicó que las medias de los métodos de extracción son diferentes con una significancia del 5.0%. El promedio de la concentración de cada uno de los métodos, así como sus desviaciones estándar se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados métodos de extracción empleados

Método	Absorbancia (U.A.)	Desviación estándar (U.A.)
Agitación	1.840	0.044
Ultrasonido	2.147	0.029

Como se mencionó anteriormente hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos métodos físicos empleados, siendo ultrasonido el que presenta mejores resultados con una absorbancia de 2.147 U.A. Este método físico presenta mejores resultados debido a que presenta ventajas en comparación con el método de agitación, pues como lo expresa Rostagno y Prado (2013) acorta el tiempo del proceso, disminuye el volumen del solvente empleado, e incrementa el rendimiento extractivo. Adicionalmente el ultrasonido tiene un efecto de limpieza, promovido por la cavitación, ya que de esta manera promueve la explosión/implosión de microburbujas de gas, que destruyen las partículas sólidas en la matriz analizada, mejorando el proceso de interacción entre la muestra y el solvente (Bodzon-Kulakowska, et al. 2007 como se cita en Correa Navarro et al., 2017).

Por todas estas razones la metodología empleada para la extracción de proteínas totales en semillas de tomate estimuladas fue: ultrasonido como método físico, tris-base como solvente y 50 min como tiempo de extracción.

4.3 Tratamientos magnética con imanes toroidales

Para valorar el efecto del tratamiento magnético de semillas sobre la germinación usando imanes toroidales, se realizaron ocho tratamientos aplicando el método de optimización bayesiana, teniendo como variables de entrada la temperatura (T), el volumen de agua (V_{H_2O}) y el tiempo de exposición ($t_{Exp.}$).

Tabla 8. Tiempo medio de germinación (TMG) para los diferentes tratamientos magnéticos

Tratamiento	$t_{Exp.}$ (s)	V_{H_2O} (mL)	T (°C)	TMG (h)
Control	0	11.0	28.0	80.3
D1	751	3.0	25.0	65.1
D2	23	11.8	25.2	57.7

D3	1	3.2	25.0	63.4
D4	869	11.8	25.2	56.8
D5	5	3.0	25.0	58.4
D6	5	12.0	25.0	61.1
D7	869	11.8	25.2	58.7
D8	895	4.0	26.0	61.7

En la tabla 8, se evidencia que los mejores tratamientos, correspondientes a las dosis de D4, D2, D5 y D7 en dicho orden, lo que permite afirmar que la estimulación magnética de semillas durante tiempos preferiblemente de 23 y 869 segundos, sí tiene un efecto positivo en la germinación, evidenciado en un menor tiempo de germinación. Estos resultados van acorde a las observaciones de Correa Navarro et al. (2017), sobre el incremento en la velocidad de germinación y en el crecimiento de plántulas de tomate al ser estimuladas magnéticamente. También están relacionados con los estudios de Flórez et al. (2007b), quienes encontraron reducciones en el TMG por encima del 75% al exponer semillas de maíz a campos magnéticos durante tiempos iguales o superiores a 24 horas.

Hipotéticamente, los efectos positivos de la estimulación magnética de las semillas se pueden deber a la activación de electrorreceptores, como los canales iónicos, los cuales aceleran la actividad metabólica al incrementar su flujo iónico, involucrando alteraciones en la actividad enzimática o de algún factor de crecimiento, y haciendo que las semillas absorban mayor humedad y nutrientes (MANUEL PITA VILLAMIL Doctor en Ciencias Biológicas FELIX PEREZ GARCIA Doctor Ingeniero Agrónomo Dpto Biología Vegetal, n.d.).

4.3.1 Resultado de la estimulación magnética sobre la concentración de proteínas totales

Para determinar la concentración de proteínas totales en las semillas de tomate tratadas magnéticamente, se realizaron las extracciones con las metodologías optimizadas. Las semillas control fueron comparadas con los ocho mejores tratamientos obtenidos mediante el método de optimización bayesiana, ya que estos presentaron los menores tiempos medios de germinación.

Las comparaciones entre cada uno de los tratamientos y el control se realizaron empleando un Anova factorial, previa verificación de los supuestos del análisis. El análisis se realizó empleando las concentraciones de cada uno de los tratamientos y del control. El análisis determinó que los ocho tratamientos evaluados presentan p-valores inferiores a 0.05 por lo tanto, las concentraciones de cada tratamiento presentan diferencias estadísticamente significativas con el control con una significancia del 5% (Figura 8).

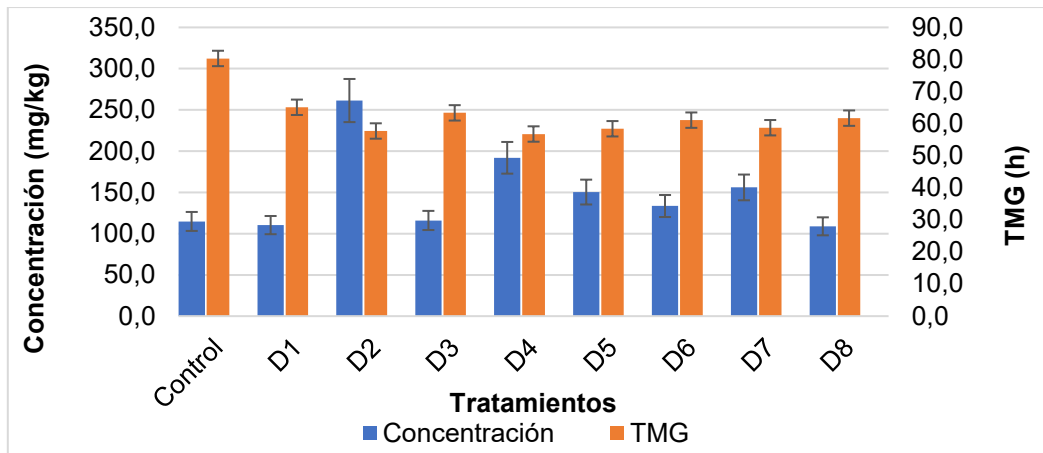


Figura 8. Comparación entre tratamientos y control

Al analizar la Figura 8 se observa que el tratamiento magnético tuvo una respuesta favorable en la disminución del TMG y que la concentración de proteínas totales también fue afectada. Estas variaciones pueden ser debidas al efecto del tratamiento magnético sobre iones metálicos como Fe^{2+} y Cu^{2+} , los cuales generan cambios en la actividad enzimática y por ende en el metabolismo y crecimiento celular. El aumento en la concentración de proteínas totales también puede ser debida a una afectación del transporte iónico a través de la membrana que a su vez modifica al mecanismo osmótico celular que gobierna el flujo de agua transmembrana.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES

Se logro la cuantificación de proteínas totales presentes en muestras de semilla de tomate mediante la técnica de espectrofotometría, garantizando de esta manera un método de análisis sensible, de amplio rango lineal, preciso y exacto.

En la presente investigación se determinó que el mejor método para la obtención de proteínas totales en semillas de tomate germinados (*Solanum lycopersicum L.*) fue la extracción asistida con ultrasonido empleando Tris-Base como solvente. Con este procedimiento se obtuvieron, de manera rápida y sencilla, cantidades cuantificables de las moléculas en estudio.

Los mejores tratamientos magnéticos fueron las dosis D4, D2 y D7 en dicho orden, ya que estas dosis permitieron que el tiempo de germinación disminuyera y la velocidad de germinación de la semilla aumentara, por lo cual permite afirmar que el tiempo de germinación de más del 50% de la población de las semillas de tomate fue en alrededor de 56 horas.

Las células vegetales responden de forma impredecible a los campos, esto depende de diversos factores como lo es la especie, la intensidad del campo y el tiempo de esta manera, los efectos que se evidencian pueden ser favorables o desfavorables sobre los procesos fisiológicos de plantas, en este caso las semillas de tomate expuestas antes de su siembra (pretratamiento o tratamiento en seco) a un campo magnético estacionario durante 23, 865 y 869 segundos, se observa efectos positivos debido a un aumento en la concentración de proteínas y una disminución en el TMG.

Se presenta una relación entre la concentración de proteínas y los tratamientos magnéticos con tiempo medio de germinación bajo. Debido posiblemente a que los tratamientos magnéticos promueven un aumento en la absorción de agua, lo que desencadena la liberación de proteínas, que a su vez promueven generación de diversas proteínas y enzimas

RECOMENDACIONES

Una recomendación muy interesante e importante es que, antes de realizar la metodología, se realice una curva de calibración con una proteína externa, debido que a partir de ahí se define entre que concentraciones las proteínas totales de la muestra biológica debería encontrarse.

En el procedimiento para evaluar la concentración de proteínas a través del espectrofotómetro se requiere del reactivo Bradford, se basa en una reacción colorimétrica de proteínas con un tinte, que es coomassie azul brillante G-250, por lo cual se debe ser muy precavido al momento de su preparación porque la respuesta puede variar dependiendo de las concentraciones y el medio de trabajo.

En los casos en los que se requiere hacer extracciones, es necesario hacer una apropiada elección del solvente y del método físico de trabajo, dado que cada protocolo se comporta de manera diferente según la especie y el tejido trabajado, por ende, se debe comparar métodos y de esta manera seleccionar el mejor método que puede utilizar para la extracción de proteínas de una muestra.

BIBLIOGRAFÍA

- Abril Díaz, N., Antonio Bárcena Ruiz, J., Fernández Reyes, E., Galván Cejudo, A., Jorrín Novo, J., Peinado Peinado, J., Toribio Meléndez-Valdés, F., & Túnez Fiñana, I. (n.d.). 8. *Espectrofotetría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*.
- Aladjadjyan, A. (2010). *Influence of stationary magnetic field on lentil seeds_Aladjadjyan.pdf*. 321–324.
- Arroyo, P., Leire, U., Bergera, M., Rodríguez, P., Teresa, A., Gaspar, V., Moreno, E. R., Manuel, J., Torres, Á., & Moreiras, G. V. (n.d.). *Autores*.
- Barco Rios, Hector., Rojas Caldern, Edilberto., & Restrepo Parra, E. (2012). *Fsica : principios de electricidad y magnetismo*. Universidad Nacional de Colombia.
- Bojórquez, R. M. C., Gallego, J. G., & Collado, P. S. (2013a). Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. In *Nutricion Hospitalaria* (Vol. 28, Issue 1, pp. 6–15). <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6302>
- Bojórquez, R. M. C., Gallego, J. G., & Collado, P. S. (2013b). Propiedades funcionales y beneficios para la salud del licopeno. *Nutricion Hospitalaria*, 28(1), 6–15. <https://doi.org/10.3305/nh.2013.28.1.6302>
- Boqué, R. (n.d.). *EL LÍMITE DE DETECCIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO*.
- Carbonell, M. V., Flórez, M., Martínez, E., & Álvarez, J. (2017). Aportaciones sobre el campo magnético: historia e influencia en sistemas biológicos. *Intropica*, 12(2), 0–2. <https://doi.org/10.21676/23897864.2282>
- Carbonell, M. V., Martinez, E., & Amaya, J. M. (2000). Stimulation of germination in rice (*Oryza Sativa* L.) by a static magnetic field. *Electro- and Magnetobiology*, 19(1), 121–128. <https://doi.org/10.1081/JBC-100100303>
- Cardozo, P. M., & Quiriban, A. (2014). Las Proteínas En La Tolerancia Al Estrés Hídrico En Plantas. *Revista de La Facultad de Agronomía UNLPam*, 24(1), 55–67.
- Castelló M, Fito P, Segui L, B. N. (2010). Fundamentos de la Corrosión. *Fundamentos de Ciencia de Los Materiales*, 1, 06–08. [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/147097/Castelló?sequence=1#:~:text=La operaci3n de extracci3n s3lido, l3quida%2C disolvente \(E0\)](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/147097/Castelló?sequence=1#:~:text=La operaci3n de extracci3n s3lido, l3quida%2C disolvente (E0)).
- Chemat, F., Zill-E-Huma, & Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813–835. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.023>
- Clingingsmith, T. W. (1984). Series flow tandem fan: A high-speed V/STOL propulsion concept. *SAE Technical Papers*, 1–8. <https://doi.org/10.4271/841496>
- Correa Navarro, Y. M., Buriticá Salazar, L. M., Rivera Giraldo, J. D., Penagos González, J. P., & Torres Osorio, J. I. (2017). Optimizaci3n del protocolo para la

- extracción y la cuantificación de proteínas totales en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 13(1), 65–68. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2756>
- Correa, Y. M., Buriticá, L. M., Rivera, J. D., Penagos, J. P., & Torres, J. I. (2017). Optimización del protocolo para la extracción y la cuantificación de proteínas totales en semillas germinadas de maíz (*Zea mays* L.). *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 13(1), 60–64.
- de Desarrollo, V. (2014). *Ministerio del Ambiente*.
- Dobránszki, J. A. T. da S. A.-J. A. T. da S. A.-J. (2015). How do magnetic fields affect plants in vitro? *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, v. 51(3), 233-240–2015 v.51 no.3. <https://doi.org/10.1007/s11627-015-9675-z>
- Domínguez Pacheco, A., Hernández Aguilar, C., Cruz Orea, A., Carballo Carballo, A., Zepeda Bautista, R., & Martínez Ortíz, E. M. (2010). Semilla de maíz bajo la influencia de irradiación de campos electromagnéticos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(2), 183–188. <https://doi.org/10.35196/rfm.2010.2.183>
- Doria, J. (2010). Generalidades Sobre Las Semillas: Su Producción, Conservación Y Almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1), 00–00.
- Enrique, J., & Osorio, A. (2019). *Análisis del efecto del tratamiento magnético sobre la actividad enzimática en semillas de maíz (Zea mays L.)*.
- Estrada, V. (2010). *Germinación de semillas de tomate (Lycopersicon esculentum Lycopersicon esculentum Mill.) Var. Rio grande con dos niveles de niveles de lombricomposta bajo lombricomposta bajo condiciones de laboratorio. condiciones de laboratorio*. 60.
- Feizi, H., Sahabi, H., Moghaddam, P. R., Gallehgir, O., & Amirmoradi, S. (2012). *Impact of Intensity and Exposure Duration of Magnetic Field on Seed Germination of Tomato_Feizi.pdf*. 4(1), 116–120.
- Fernández Reyes Aurora Galván Cejudo, E. (n.d.-a). 27. *Métodos para la cuantificación de proteínas*.
- Fernández Reyes Aurora Galván Cejudo, E. (n.d.-b). 27. *Métodos para la cuantificación de proteínas*.
- Ferrero Botero, A., Ferrero, A., Electricidad, B., Andrés, J., Rueda, A., Damián, Á., & Granja, G. (n.d.). *C B B Á S I C A S C I E N C I A S C B Electricidad y magnetismo: una guía introductoria magnetismo: una guía introductoria*.
- Flórez, M., Carbonell, M. V., & Martínez, E. (2007a). Exposure of maize seeds to stationary magnetic fields: Effects on germination and early growth. *Environmental and Experimental Botany*, 59(1), 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.10.006>
- Flórez, M., Carbonell, M. V., & Martínez, E. (2007b). Exposure of maize seeds to stationary magnetic fields: Effects on germination and early growth.

- Environmental and Experimental Botany*, 59(1), 68–75.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.10.006>
- García, R. (2013). Instrumentos que revolucionaron la química: la historia del espectrofotómetro. *Salud y Ambiente*, 6(8), 11–19.
www.saber.ula.ve/avancesenquimicaAvancesenQuímica,13
- García-Arellano, H., & Vázquez-Duhalt, R. (1998). Cuantificación De Proteínas: Una Revisión. In *BioTecnología* (Vol. 3, pp. 78–88).
- Grinfeld, L., & Mendiz, O. (2007). Agradecimiento. *Salud(i)Ciencia*, 15(6), 1038.
<https://doi.org/10.5354/0719-529x.2020.60133>
- Hernández-Leal, E., Lobato-Ortiz, R., Jesús García-Zavala, J., Reyes-López, D., Méndez-López, A., Bonilla-Barrientos, O., & Hernández-Bautista, A. (2013). Comportamiento agronómico de poblaciones f2 de híbridos de tomate (*Solanum Lycopersicum* L.). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36(3), 209–215.
<https://doi.org/10.35196/rfm.2013.3.209>
- Iqbal, M., Haq, Z. U., Jamil, Y., & Ahmad, M. R. (2012). Effect of presowing magnetic treatment on properties of pea. *International Agrophysics*, 26(1), 25–31.
<https://doi.org/10.2478/v10247-012-0004-z>
- Javier Jimenez Cardenas, D. (2018). *UN ACERCAMIENTO AL ELECTROMAGNETISMO: PROPUESTA DIDÁCTICA PARA LA COMPRENSIÓN Y APROPIACIÓN DEL CONCEPTO CAMPO UNIVERSIDAD PEDAGOGICA NACIONAL FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGIA LICENCIATURA EN FISICA.*
- Javier, L., Romero, A., & Ante La, P. (2018). *Desarrollo de instrumentación de Resonancia Magnética Nuclear con Ciclado Rápido de Campo magnético para imágenes y relaxometría localizada.*
- Kondrikov, B. N., Annikov, V. E., Egorshchikov, V. Y., DeLuca, L., & Bronzi, C. (1999). Combustion of ammonium nitrate-based compositions, metal-containing and water-impregnated compounds. *Journal of Propulsion and Power*, 15(6), 763–771. <https://doi.org/10.2514/2.5526>
- López Madrid, L. M. (2016). Manual técnico del cultivo de tomate. In *Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (inta)*.
<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10921.pdf%0Ahttp://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-10921.pdf%0Ahttp://repositorio.iica.int/bitstream/11324/3143/1/BVE17079148e.pdf%0Awww.inta.go.cr%0Ahttp://repositorio.iica.int/bitstream/11324/3143/1/BVE1707>
- Manrique, Palacios, J. C., & Sanchez Vilca, R. (2008). Diseño, construcción y evaluación de parámetros de operación de un equipo de extracción sólido-líquido para el laboratorio de procesos unitarios de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del centro del Perú. *Universidad Nacional Del Centro Del Centro De Posgrado*, 10–11.

http://repositorio.uncp.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/217/T-08_13.pdf?sequence=1&isAllowed=y

MANUEL PITA VILLAMIL Doctor en Ciencias Biológicas FELIX PEREZ GARCIA Doctor Ingeniero Agrónomo Dpto Biología Vegetal, J. (n.d.). *GERMINACION DE SEMILLAS MINISTERIO DEAGRICULTURA PESCA Y ALIMENTACIÓN SECRETARIA GENERAL TECNICA.*

Medina Torres, N. C. (2017). Efecto del Ultrasonido en la Extracción y Nanoencapsulación de Polifenoles de Limón Persa (*Citrus Latifolia*). *Centro de Investigación y Asistencia En Tecnología y Diseño Del Estado de Jalisco, A. C.*, 1–131.

Melo, O. O., Luis, M., López, A., Sandra, P., & Melo, E. (n.d.). *Diseño de Experimentos Métodos y Aplicaciones.*

Moreno, K., Gaytán, R., Tenorio, B., Galván, J., Martínez, A., Sánchez, Á., & Fernandez, R. (2018). Comparación de métodos de extracción de proteínas de cerebro y linfocitos de rata. *Tecnociencia Chihuahua*, 11, 127–137. http://tecnociencia.uach.mx/numeros/v11n3/data/Comparacion_de_metodos_de_extraccion_de_proteinas_de_cerebro_y_linfocitos_de_rata.pdf

Ortega, P. O. (2016). *Estudio comparativo de métodos de tratamiento de muestra para la determinación de bisfenol A en alimentos / bebidas alimentos / bebidas.* 1–42.

Owen, T. (n.d.). *Fundamentos de la espectroscopía UV-visible moderna.*

PARA, U., & ACERO, G. de. (2011). Universidad De San Carlos De Guatemala Facultad De Ingeniería. *Emecanica.Ingenieria.Usac.Edu.Gt*, 53, 1–75. <http://emecanica.ingenieria.usac.edu.gt/sitio/wp-content/subidas/6ARTÍCULO-III-INDESA-SIE.pdf>

Pérez- Alcázar, G. A. (2016). Imanes permanentes: características, aplicaciones y futuro. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 40(155), 221. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.361>

pub_29_-_manual_produccion_de_tomate. (n.d.).

Raichel, D. R. (2006). *The science and applications of acoustics.* Springer Science+Business Media.

Ranjan, S., Matcha, R., & Babu V R, N. P. (2012). COMPARATIVE EVALUATION OF PROTEIN EXTRACTION METHODS FROM FEW LEGUMINOUS SEEDS. In *International Journal of Advanced Biotechnology and Research* (Vol. 3, Issue 2). <http://www.bipublication.com>

Rivera, J. D., Correa, Y. M., & Penagos, J. P. (2017). Comparison of different extraction methods for giberelic acid obtention from corn (*Zea mays* L.) germinated seeds. (*Prueba*) *Revista Colombiana de Química (Prueba)*, 46(2), 45–50. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v46n2.63015>

- Roca, D. P., Oliver, J., & M^a Rodríguez, D. A. (n.d.). *BIOQUÍMICA TÉCNICAS Y MÉTODOS Serie Base*.
- Santos, J. (2009). *PROTEÍNAS Estructuras fascinantes J a v i e r S a n t o s*. <http://www.bnm.me.gov.ar/giga1/documentos/EL001849.pdf>
- Sicard, G. A. (n.d.). *Electricidad y magnetismo*.
- Stevens, M. (1913). The Tomato. *Journal of Education*, 78(1), 21–21. <https://doi.org/10.1177/002205741307800117>
- Técnico, M., Cultivo, D., & Tomate, D. E. (n.d.). *Innovación para la seguridad alimentaria y nutricional en Centroamérica y Panamá*.
- The fitness for purpose of analytical methods : a laboratory guide to method validation and related topics*. (n.d.).
- Tonny, Owen. (1967). Fundamentos de la espectrofotometría UV-visible moderna Conceptos Básicos. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952. <https://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?tp=&arnumber=6786370>
- Torres, O., Ignacio, J., Muñoz, C., & Ramirez, M. (2007). *Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84934091*.
- Ultrasonido, Y. S., Aplicaciones, E. N., El, P., De, A., Robles--Ozuna, L. E., & Ochoa--Martínez, * Y. (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el.... In *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha* (Vol. 13, Issue 2).
- UNLP. (2016). Métodos espectrofotométricos Teoría y Práctica. *Aulavirtual, Figura 1*, 1–25. https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/43546/mod_resource/content/3/Espectrofotometría 2019 versión final.pdf
- Vashisth, A., & Nagarajan, S. (2010). Characterization of water distribution and activities of enzymes during germination in magnetically-exposed maize (*Zea mays* L) seeds. In *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics* (Vol. 47).
- Vicente, J., & Felipe, A. (2016). Prácticas con técnicas instrumentales de análisis físico-químico en laboratorios industriales. *Universidad Politécnica de Madrid*, 24–25.
- Vitale, A. A., Bernatene, E. A., & Pomilio, A. B. (2010). Carotenoides en quimiopreención: Licopeno. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 44(2), 195–238.
- Wegary, D., Labuschagne, M. T., & Vivek, B. S. (2011). Protein quality and endosperm modification of quality protein maize (*Zea mays* L.) under two contrasting soil nitrogen environments. *Field Crops Research*, 121(3), 408–415. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2011.01.010>
- Wiltschko, W., & Wiltschko, R. (2005). Magnetic orientation and magnetoreception in birds and other animals. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology*,

Sensory, Neural, and Behavioral Physiology, 191(8), 675–693.
<https://doi.org/10.1007/s00359-005-0627-7>