



Terra Latinoamericana

ISSN: 0187-5779

ISSN: 2395-8030

Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A.C.

Mazón-Suástegui, José Manuel; Ojeda-Silvera, Carlos Michel;
Agüero#Fernández, Yuneisy Milagro; Batista-Sánchez, Daulemys; Batista-
Sánchez, Dailenys; García#Bernal, Milagro; Abasolo-Pacheco, Fernando

Efecto de medicamentos homeopáticos en la germinación
y crecimiento inicial de *Salicornia bigelovii* (Torr.)

Terra Latinoamericana, vol. 38, núm. 1, 2020, Enero-Marzo, pp. 113-124

Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A.C.

DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v38i1.580>

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57363014012>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org



Sistema de Información Científica Redalyc
Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso
abierto

Efecto de medicamentos homeopáticos en la germinación y crecimiento inicial de *Salicornia bigelovii* (Torr.)

Effect of homeopathic medicines on the germination and initial growth of *Salicornia bigelovii* (Torr.)

José Manuel Mazón-Suástegui¹ , Carlos Michel Ojeda-Silvera^{1,†} ,
Yuneisy Milagro Agüero-Fernández¹ , Daulemys Batista-Sánchez¹ ,
Dailenys Batista-Sánchez¹ , Milagro García-Bernal^{1,2}  y Fernando Abasolo-Pacheco³ 

¹ Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. Av. I. P. N. No. 195, Colonia Playa Palo de Santa Rita Sur. 23096 La Paz, Baja California Sur, México.

[†] Autor para correspondencia / Corresponding author (cojedas1979@gmail.com)

² Universidad Central de las Villas (CBQ). Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Provincia de Villa Clara, Cuba.

³ Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Facultad de Ciencias Agrarias, Campus “Ingeniero Manuel Agustín Haz Álvarez”. Av. Quito km 1 1/2 vía a Santo Domingo de los Tsáchilas. Quevedo, Los Ríos, Ecuador.

RESUMEN

El efecto de medicamentos homeopáticos en la germinación y crecimiento inicial de *Salicornia bigelovii* (Torr.) fue evaluado bajo condiciones controladas. Se aplicó un diseño experimental completamente al azar con tres tratamientos homeopáticos, *Natrum muriaticum* 7CH (NaM-7CH); *Phosphoricum acidum* 13CH (PhA-13CH); *Natrum muriaticum* 31CH (NaM-31CH); agua destilada como control (AD) y seis réplicas por tratamiento. Las variables de respuesta estudiadas fueron el porcentaje y la tasa de germinación, longitud de tallo y de radícula, y la biomasa fresca y seca de parte aérea y radícula. Se realizó un análisis de varianza y pruebas a posteriori para comparación múltiple de medias (Tukey HSD, $P \leq 0.05$), cuando se encontró diferencia significativa entre tratamientos. Se registró un incremento significativo en todas las variables de respuesta evaluadas de todos los tratamientos homeopáticos con respecto al control (AD). Las variables de mayor respuesta fueron el porcentaje de germinación con valores de hasta 44% y la longitud de tallo y radícula con 35% por encima del tratamiento control, en las plantas tratadas con NaM-7CH. Estos resultados confirman el efecto positivo de la medicación homeopática en la germinación y crecimiento inicial de *S. bigelovii*, revelando que la homeopatía agrícola y particularmente los tratamientos NaM-7CH,

SUMMARY

The effect of homeopathic medicines on germination and initial growth of *Salicornia bigelovii* (Torr.) was evaluated under controlled conditions. A completely randomized experimental design was applied with three homeopathic treatments, *Natrum muriaticum* 7CH (NaM-7CH); *Phosphoricum acidum* 13CH (PhA-13CH); *Natrum muriaticum* 31CH (NaM-31CH); distilled water as control (AD) and six replicates per treatment. The response variables were the percentage and germination rate, stem and radicle length, and fresh and dry biomass of aerial and radicle parts. An analysis of variance and subsequent tests were performed to compare means (Tukey HSD, $P \leq 0.05$) when a significant difference between treatments was found. A significant increase was observed in all the response variables evaluated in all the homeopathic treatments with respect to control (AD). The variables with the highest response were germination percentage, with values up to 44% and stem and radicle length with 35% above the control treatment in plants treated with NaM-7CH. These results confirmed the positive effect of homeopathic medicines on germination and initial growth of *S. bigelovii*, revealing that agricultural homeopathy, particularly NaM-7CH, PhA-13CH and NaM-31CH

Cita recomendada / Recommended citation:

Mazón-Suástegui, J. M., C. M. Ojeda-Silvera, Y. M. Agüero-Fernández, D. Batista-Sánchez, D. Batista-Sánchez, M. García-Bernal y F. Abasolo-Pacheco. 2020. Effect of homeopathic medicines on germination and initial growth of *Salicornia bigelovii* (Torr.). Terra Latinoamericana Número Especial 38-1: 1-12.

DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v38i1.580>

Recibido / Received: junio / June 02, 2019.

Aceptado / Accepted: noviembre / November 08, 2019.

Publicado en / Published in Terra Latinoamericana 38: 1-12.

PhA-13CH y NaM-31CH, muestran potencialidades para optimizar el desarrollo de la especie, ya que incrementó el porcentaje de germinación y estimuló el crecimiento inicial.

Palabras clave: homeopatía agrícola, plantas halófitas.

INTRODUCCIÓN

El género *Salicornia* pertenece a la familia *Chenopodiaceae* y está constituido por las especies *S. subterminalis*; *S. virginica*; *S. maritima*; *S. borealis*; *S. rubra*; *S. pacifica* y *S. bigelovii* (Lutts y Lefèvre, 2015). Esta última especie comúnmente se desarrolla en las costas y hábitats salinos de Europa, África y Norteamérica (Munns y Tester, 2008). Los estudios realizados demuestran que la especie es altamente tolerante a la salinidad; es considerada una halófita facultativa con un ciclo de vida anual (10 a 12 meses) y puede desarrollarse a diversas concentraciones de sal (Bagwell *et al.*, 2001; Beltrán-Burboa *et al.*, 2017).

El cultivo de plantas halófitas tiene ventajas porque no depende totalmente del agua dulce y porque algunas especies son aptas para el consumo humano en forma de ensaladas o harinas. Pueden utilizarse como forraje de alto contenido proteico para el consumo animal y la ganadería, particularmente en zonas áridas y semiáridas donde el cultivo de pastos y forrajes tradicionales no es posible por la falta de agua y condiciones ambientales adversas (Rueda-Puente *et al.*, 2017). Las plantas halófitas tienen además un potencial interesante como insumo industrial para la extracción del aceite vegetal contenido en sus semillas, que puede ser empleado en cosmetología (Slama *et al.*, 2015). Un estudio reciente demostró que el aceite de plantas halófitas como *S. bigelovii*, puede utilizarse para producir biocombustible (Al-Rashed *et al.*, 2016). Esto sugiere que su cultivo sería ventajoso al permitir el aprovechamiento de suelos costeros y de otros suelos altamente salinizados, sin utilizar terrenos agrícolas donde es posible el cultivo de especies no-halófitas y adecuadas para el consumo humano o animal. Bajo estos considerandos, este mismo autor argumenta que el cultivo de *S. bigelovii* permitiría la producción de alimentos, forrajes y productos alternativos, sin afectar la seguridad alimentaria.

En México, *S. bigelovii* se puede encontrar con frecuencia en las costas del Golfo de México, en Sonora y en la península de Baja California, particularmente

treatments, is a viable alternative to optimize the cultivation of species since it increases germination percentage and stimulates initial growth.

Index words: agricultural homeopathy, halophyte plants.

INTRODUCTION

The genus *Salicornia* belongs to the family *Chenopodiaceae*, constituted by the species *S. subterminalis*; *S. virginica*; *S. maritima*; *S. borealis*; *S. rubra*; *S. pacifica* and *S. bigelovii* (Lutts and Lefèvre, 2015). This last species usually grows in saline coasts and habitats in Europe, Africa, and North America (Munns and Tester, 2008). The studies performed demonstrated that the species is highly tolerant to salinity, considering it a facultative halophyte that can grow at different salt concentrations with an annual life cycle (10-12 months) (Bagwell *et al.*, 2001; Beltrán-Burboa *et al.*, 2017).

Cultivation of halophyte plants has some advantages because their growth does not depend totally on fresh water, and some species are suitable for human consumption in salads or flour. They can be used as high protein content forage for animal consumption and livestock, particularly in arid and semiarid regions where traditional forage is not possible due to lack of water and adverse environmental conditions (Rueda-Puente *et al.*, 2017). Moreover, halophyte plants have an interesting potential as industrial components because of the extraction of vegetal oil content in their seeds, which can be used in cosmetology (Slama *et al.*, 2015). A recent study demonstrated that halophyte plant oil, such as that of *S. bigelovii*, can be used to produce biofuel (Al-Rashed *et al.*, 2016), which suggests that its cultivation could have the advantage of allowing using coastal land and others with high salinity. In this manner, agricultural land would not be used where non-halophyte species suitable for human or animal consumption could be cultivated. Under this circumstances, these authors argued that cultivation of *S. bigelovii* would allow producing forage and alternative products without affecting food security.

In Mexico, *S. bigelovii* can be found frequently in the coasts of the Gulf of México, also in Sonora and the Baja California peninsula, particularly in habitats

en hábitats sujetos a inundación-desección periódica por efecto de la marea, (Rueda-Puente *et al.*, 2011). El estado de Baja California Sur es posiblemente la región del país con mayores posibilidades para desarrollar el cultivo de halófitas, debido a sus condiciones semiáridas y a sus grandes extensiones de suelos con tendencia a la salinidad que no son aptos para cultivos tradicionales, a lo que se le suma la baja disponibilidad de agua con calidad para el riego. El cultivo de *S. bigelovii* podría ser una alternativa viable para devolver vitalidad a estas áreas, generando empleos y produciendo biomasa nutritiva para consumo humano o animal o como materia prima para obtener aceites para la industria. Para lograr esto, es necesario optimizar la germinación de las semillas, pues de manera natural cuentan con una fuerte latencia que dificulta el desarrollo inicial del tejido germinal y, en consecuencia, la producción masiva, uniforme y sistemática de plántulas como materia prima para cultivos tecnificados. Diversas investigaciones revelan resultados importantes en este sentido, desde tratamientos térmicos a la semilla, hasta estudios comparativos para definir la temperatura óptima para mejorar el proceso de germinación (Rivers y Weber, 1971) y la aplicación de nitrato de sodio para su optimización (Wong-Corral *et al.*, 2010). La utilización de bacterias probióticas promotoras del crecimiento o fijadoras de nitrógeno es otra alternativa más natural para optimizar el proceso de germinación en *Salicornia* (Rueda-Puente *et al.*, 2009; Hernández-Perales *et al.*, 2016). El empleo de medicamentos homeopáticos ha sido probado con éxito en varios cultivos, demostrando su modo de acción como promotores del crecimiento vegetal (Pinto *et al.*, 2014; Meneses-Moreno, 2017). Por otro lado, algunos medicamentos homeopáticos para uso en humanos, con registro en la Secretaría de Salud de México (SSA, 2015), se han aplicado exitosamente como promotores del crecimiento vegetal (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019), para el control de organismos patógenos (Narváez-Martínez *et al.*, 2014), y como atenuadores de los efectos negativos del estrés abiótico (Giardini-Bonfim *et al.*, 2012). Dado que los medicamentos homeopáticos *Natrum muriaticum* y *Phosphoricum acidum* contienen nanopartículas del ingrediente activo, éstas pueden activar diversos procesos fisiológicos en las plantas que permiten un mejor funcionamiento celular y un desarrollo más eficiente de sus tejidos y órganos (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018a; 2019). Con estos antecedentes, y considerando que no existen referencias para plantas

subjected to periodical flooding-drying processes by tidal effect (Rueda-Puente *et al.*, 2011). The state of Baja California Sur is possibly the region with the most possibilities in the country of developing halophyte cultivation because of its semiarid conditions and large extension of salinity soil not suitable for traditional cultivations besides the low availability of quality irrigation water. The cultivation of *S. bigelovii* could be a viable alternative to restore vitality to these areas, generating jobs and producing nutritional biomass for human or animal consumption or as raw matter to obtain oil for the industry. To achieve these goals, optimizing seed germination is a priority since seeds have a naturally strong dormancy that makes initial germinal tissue development difficult, and consequently, massive, uniform and systematic production of seedlings as raw matter for technified cultivation systems. Different research studies have revealed important results in this sense, from thermal seed treatments to comparative studies, to define the optimum temperature to improve the germination process (Rivers and Weber, 1971) and the application of sodium nitrate for optimization (Wong-Corral *et al.*, 2010). The use of growth promoting or nitrogen-fixing probiotic bacteria is a more natural alternative to optimize the germination process in *Salicornia* (Rueda-Puente *et al.*, 2009 and Hernández-Perales *et al.*, 2016). The use of homeopathic medicines has been tested successfully in several cultivations, demonstrating its mode of action as plant growth promoters (Pinto *et al.*, 2014; Meneses-Moreno, 2017). On the other hand, some homeopathic medicines for use in humans, registered in the Health Ministry of México (SSA, 2015), have been applied successfully as plant growth promoters (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019) for the control of pathogen organisms (Narváez-Martínez *et al.*, 2014) and as attenuators of negative effects of abiotic stress (Giardini-Bonfim *et al.*, 2012). Given that the homeopathic medicines *Natrum muriaticum* and *Phosphoricum acidum* contain nanoparticles of the active ingredient, they can activate diverse physiological processes in plants that allow a better cellular function and a more efficient development of their tissues and organs (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018; 2019). With this background and considering to our knowledge that no references were available for halophyte plants, the objective of this study was to evaluate the effect

halófitas, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de medicamentos homeopáticos en la germinación y crecimiento inicial de *S. bigelovii*, bajo condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el laboratorio de Fisiotecnica Vegetal del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. (CIBNOR). Se utilizaron semillas de *S. bigelovii* previamente seleccionadas mediante la metodología propuesta por ISTA (2010).

Diseño Experimental

Se usó un diseño experimental completamente al azar, con tres tratamientos homeopáticos: *Natrum muriaticum* 7CH (NaM-7CH), *Phosphoricum acidum* 13CH (PhA-13CH), *Natrum muriaticum* 31CH (NaM-31CH) y agua destilada como tratamiento control (AD), con seis repeticiones por tratamiento y 30 semillas por repetición. Los medicamentos homeopáticos de uso en humanos del proveedor Similia® en dinamización alcohólica (NaM 6CH, PhA 12CH y NaM 30CH) fueron adquiridos en Farmacia Homeopática Nacional® (CDMX, México). Las siguientes dinamizaciones centesimales (NaM 7CH, PhA 13CH y NaM 31CH) fueron preparadas mediante su dilución 1:99 en agua destilada y su agitación en vórtex (BenchMixer®, Edison, NJ, USA), aplicando procedimientos básicos de homeopatía acuicola y agrícola (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017; 2018a,b; 2019; Ortiz-Cornejo *et al.*, 2017), usando como referencia la Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos Mexicanos (SSA, 2015).

Las semillas se desinfectaron previamente mediante inmersión por 5 min en una solución de hipoclorito de calcio con 5% de cloro activo y se lavaron abundantemente con agua destilada y esterilizada. Las semillas se mantuvieron en inmersión por un periodo de 1 hora en las diluciones homeopáticas y enseguida se colocaron en cajas Petri (150 × 15 mm) esterilizadas previamente en autoclave, cubriendo el fondo con una lámina de papel de filtro esterilizado, que se utilizó como sustrato. Las cajas se humedecieron con 20 mL de agua destilada. Posteriormente se incubaron en una cámara de germinación (Lumistell®, modelo IES-OS, serie 1408-88-01) a una temperatura de 25 ± 1 °C, 80% de humedad y 12 h diarias de luz continua durante 14 días. A los 14 días se seleccionaron al azar 10 plántulas

of homeopathic medicines in initial germination and growth of *S. bigelovii*, under controlled conditions.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was performed at Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) in the Laboratorio de Fisiotecnica Vegetal (Physical-technical Plant Laboratory). *Salicornia bigelovii* seeds were used, previously selected by the methodology proposed by the International Rules for Seed Testing (ISTA 2010).

Experimental Design

A completely randomized design was used with three homeopathic treatments: (1) *Natrum muriaticum* 7CH (NaM-7CH); (2) *Phosphoricum acidum* 13CH (PhA-13CH); (3) *Natrum muriaticum* 31CH (NaM-31CH) and distilled water as control treatment (DW), with six replicates per treatment and 30 seeds per repetition. The homeopathic medicines from the provider Similia® (Ciudad de Mexico, MX) in alcohol and distilled water dynamization (NaM 6CH, PhA 12CH and NaM 30CH) were acquired in Farmacia Homeopática Nacional® (Ciudad de Mexico, MX). The following centesimal dynamizations (NaM 7CH, PhA 13CH and NaM 31CH) were prepared by their dilution 1:99 in distilled water and agitated by vortex (BenchMixer®, Edison, NJ, USA), applying the basic procedures of aquacultural and agricultural homeopathy (Mazón-Suástegui *et al.*, 2017; 2018a,b; 2019; Ortiz-Cornejo *et al.*, 2017), using as reference Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos Mexicanos (SSA, 2015).

Seeds were disinfected previously by a 5 min immersion in a calcium hypochlorite solution with 5% of active chloride and washed sufficiently with distilled and sterilized water. Seeds were maintained in immersion for one hour in the homeopathic dilutions and subsequently placed in Petri boxes (150 × 15 mm) previously sterilized in autoclave, covering the bottom with sheets of sterile filtered paper used as substrate. The boxes were humidified with 20 mL of distilled water. Subsequently, they were incubated in a germination chamber (Lumistell®, model IES-OS, series 1408-88-01 USA) at a temperature of 25 ± 1 °C, 80% humidity and 12 h daily of continuous light for 14 days. After that, 10 seedlings per repetition (60 per

por repetición (60 por tratamientos) a las cuales se les determinó las variables morfométricas.

Porcentaje y Tasa de Germinación

La germinación se registró diariamente durante 14 días, considerando como semilla germinada cuando la radícula presentó alrededor de 1 mm de longitud y el porcentaje de germinación se determinó al concluir ese periodo. La tasa de germinación se calculó usando la ecuación propuesta por Maguire (1962):

$$M = n1/t1 + n2/t2 + \dots n30/t14$$

donde: $n1, n2, \dots n30$ son el número de semillas germinadas en los tiempos $t1, t2, \dots t14$ (hasta los 14 días).

Variables Morfométricas

Para determinar la longitud de la radícula (LR) y longitud del tallo (LT) se seleccionaron 10 plántulas al azar por cada repetición (60 por tratamiento) y ambas variables se determinaron empleando un analizador de imágenes (WinRhizo® Regent Instruments Inc.) cuyo principio de funcionamiento es mediante mediciones directas a las imágenes digitales obtenidas por el escáner, a los diferentes órganos de las plántulas. La masa fresca y seca de radícula y de parte aérea, se determinó mediante una balanza analítica (Mettler Toledo®, modelo AG204). Los tejidos vegetales divididos en parte aérea y radícula se colocaron en bolsas de papel, se pesaron y se introdujeron en una estufa de secado (Shel-Lab®, modelo FX-5, serie-1000203) a temperatura de 70 °C durante 48 h hasta su deshidratación completa y se pesaron nuevamente para determinar la masa seca.

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y cuando se encontró diferencia significativa entre tratamientos, se utilizó la prueba de comparación múltiple de medias (Tukey HSD, $P \leq 0.05$), usando el programa estadístico Statistica v. 10.0 para Windows (StatSoft Inc, 2011).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron diferencia significativa ($P = 0.0000$) en el porcentaje de germinación (PG),

treatment) were selected at random to determine their morphometric variables.

Germination Rate and Percentage

Germination was recorded daily for 14 days considering as germinated seed when the radicle showed around 1 mm in length, and the germination percentage was determined when that period ended. Germination rate was calculated using the equation proposed by Maguire (1962):

$$M = n1/t1 + n2/t2 + \dots n30/t14$$

where $n1, n2, \dots n30$ are the number of germinated seeds in time $t1, t2, \dots t14$ (up to 14 days).

Morphometric Variables

To determine radicle length (LR) and stem length (LT), 10 seedlings were selected at random for each replicate (60 per treatment) and both variables were determined using an image analyzer (WinRhizo® Regent Instruments Inc. USA) whose function principle is by direct measurements of the digital images obtained by scanner to the different seedling organs. Dry and fresh weight of the radicle and aerial parts were determined with an analytical balance (Mettler Toledo®, model AG204 USA). The plant tissues divided in aerial and radicle parts were placed in paper bags, weighed and introduced in a drying stove (Shel-Lab®, model FX-5, series-1000203) at a temperature of 70 °C for 48 h until they dehydrated completely to be weighed again and determine their dry weight.

Statistical Analysis

An analysis of variance (ANOVA) was performed, and if significant differences were found between treatments, the multiple comparison of means (Tukey's HSD, $P \leq 0.05$) was used with Statistica v. 10.0 program for Windows (StatSoft Inc, 2011).

RESULTS AND DISCUSSION

The results showed a significant difference ($P = 0.0000$) in germination percentage (PG), of

siendo el tratamiento NaM-7CH el de mayor respuesta con un 86% de semillas germinadas, 44% por encima de las semillas germinadas en el tratamiento control (AD). No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos PhA-13CH y NaM-31CH, pero ambos fueron estadísticamente diferentes al control (Figura 1). Se conoce que la germinación es un proceso complejo donde interviene un grupo de factores fisiológicos y bioquímicos que dan lugar a una nueva planta. Este proceso depende en gran medida de agentes externos para alcanzar su máxima expresión, y en el caso de *S. bigelovii*, la presencia de sal marina incentiva la germinación, dado que es una planta halófila facultativa y necesita de la sal para optimizar sus procesos fisiológicos (Beltrán-Burboa *et al.*, 2017). Esto explica los resultados obtenidos con el tratamiento NaM-7CH, ya que este medicamento se elabora a partir de sal marina, lo que coincide con uno de los postulados básicos de la homeopatía: el denominado “Principio de los Similares” (*Similia Similibus Curentur*: Let Likes Be Treated By Likes) y su principal fundamento filosófico y conceptual desde el punto de vista biofísico (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018b). Sin embargo, desde un punto de vista puramente químico y tomando como referencia la teoría de Avogadro, el contenido en NaM de sal de mar como ingrediente activo en forma de nanopartículas, sería mayor en la séptima dinamización

which treatment NaM-7CH had the greatest response with 86% of germinated seeds, 44% more than those in the control treatment (AD). No significant differences were found between PhA-13CH and NaM-31CH treatments, but both were statistically different from the control group (Figure 1). Germination is a complex process where a group of physiological and biochemical factors take part and give rise to a new plant. This process depends greatly on external agents to reach their maximum expression, in this case in *S. bigelovii*, the presence of marine salt stimulates germination because it is a facultative halophyte plant and needs salt to optimize its physiological processes (Beltrán-Burboa *et al.*, 2017). It explains the results obtained with NaM-7CH since this medicine is made from sea salt, which agrees with one of the basic assumptions of homeopathy: the denominated “Law of Similars” (*Similia Similibus Curentur*: ‘Like Cures Like’ or ‘Treat likes by likes’), its main philosophical and conceptual foundation from the biophysical point of view (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018b). However, from a chemical point of view and taking as reference only Avogadro’s theory, the sea salt content in NaM as an active ingredient in nanoparticles, would be greater in the seventh centesimal dynamization (7CH) than in the 31st centesimal dynamization (31CH),

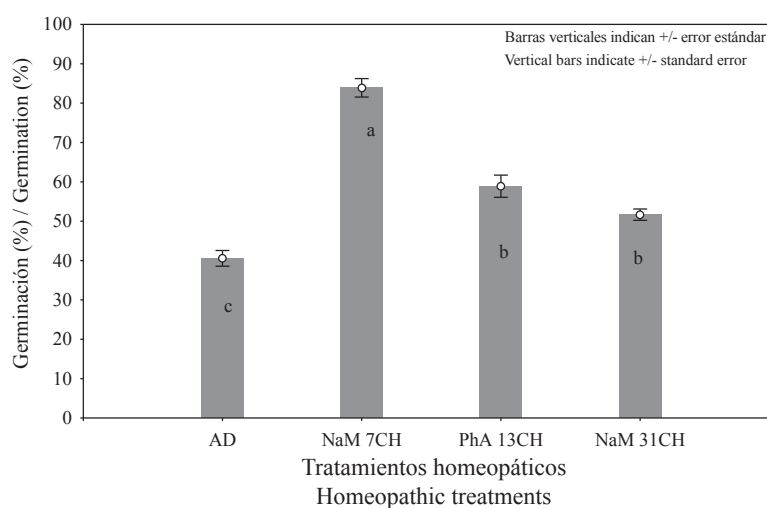


Figura 1. Efecto de los medicamentos homeopáticos en el porcentaje de germinación de *Salicornia bigelovii*. Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($P = 0.05$).

Figure 1. Effect of homeopathic medicines on the germination percentage of *Salicornia bigelovii*. Different letters show significant statistical differences ($P = 0.05$).

centesimal (7CH) que en la trigésima primera dinamización centesimal (31CH), algo que también puede justificar tales resultados (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019). Otros autores obtuvieron resultados similares aplicando nitrato de sodio para estimular la germinación (Wong-Corral *et al.*, 2010).

Con relación al efecto de los medicamentos homeopáticos en la tasa de germinación, se encontró diferencia significativa ($P = 0.0000$) entre los tratamientos homeopáticos aplicados, resaltando NaM-7CH como el de mayor TG (Figura 2). Esto evidencia un efecto positivo en la velocidad de germinación de las semillas de *S. bigelovii* tratadas con NaM-7CH. Este hallazgo se puede también asociar a la presencia de nanopartículas del ingrediente activo que tienen la capacidad de estimular la germinación de forma eficiente, incrementando la velocidad de este proceso fisiológico de manera significativa (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019). Los tratamientos con PhA-13CH y NaM-31CH, también favorecieron la tasa de germinación, aunque en menor proporción, pero es conveniente destacar que los tres tratamientos homeopáticos aplicados estimularon la tasa de germinación de *S. bigelovii* en comparación con el tratamiento control (Figura 2).

Al analizar la longitud del tallo (LT), se pudo observar diferencia significativa de esta variable con

something that could also justify such results (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019). Other authors have obtained similar results applying sodium nitrate to stimulate germination (Wong-Corral *et al.*, 2010).

In relation to the effect of homeopathic medicines in germination rate, a significant difference was found ($P = 0.0000$) among the homeopathic treatments applied, of which NaM-7CH stood out as the one with greater TG (Figure 2), which made a positive effect evident in germination speed of *S. bigelovii* seeds treated with NaM-7CH. This finding can also be associated to the presence of nanoparticles of the active ingredient that have the capacity of stimulating germination efficiently, increasing speed significantly with this physiological process (Mazón-Suástegui *et al.*, 2019). The treatments with PhA-13CH and NaM-31CH, also favored the germination rate although in lesser proportion; however, it is convenient to highlight that the three homeopathic treatments applied stimulated the germination rate of *S. bigelovii* when compared with the control treatment (Figure 2).

When stem length (LT) was analyzed, a significant difference of this variable could be observed with respect to the homeopathic treatments applied ($P = 0.000$), noticing again a greater response in

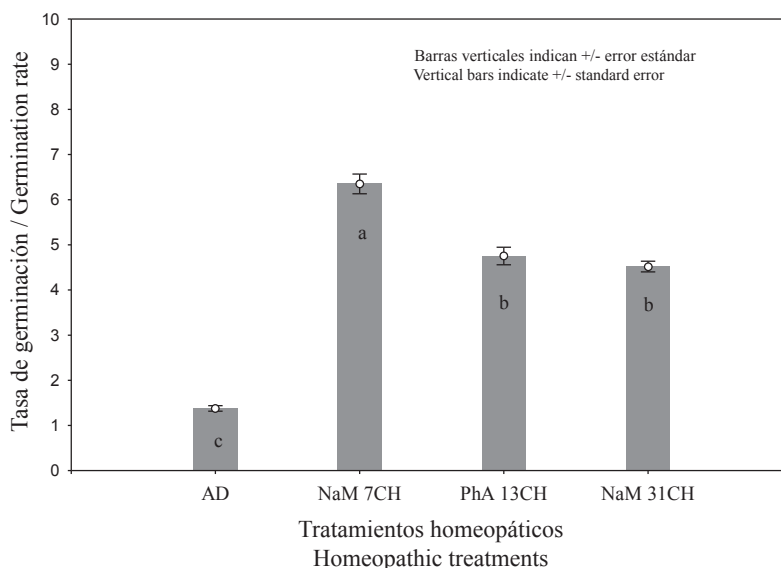


Figura 2. Efecto de los medicamentos homeopáticos en la tasa de germinación de *Salicornia bigelovii*. Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($P = 0.05$).

Figure 2. Effect of homeopathic medicines on the germination rate of *Salicornia bigelovii*. Different letters show significant statistical differences ($P = 0.05$).

respecto a los tratamientos homeopáticos aplicados ($P = 0.000$), notándose de nuevo, una respuesta mayor en las plantas tratadas con NaM-7CH (Figura 3). Con este medicamento homeopático fue posible incrementar la LT en un 63.6% con respecto al tratamiento control (AD). Tal como sucedió con otras variables respuesta, todos los tratamientos estimularon el crecimiento de LT comparado con el control, pero en un porcentaje menor a NaM-7CH (PhA-13CH, 45% y NaM-31CH, 27.2%).

Los resultados observados en LT para el tratamiento NaM-7CH, pueden explicarse por la presencia de oligoelementos constituyentes del ingrediente activo (sal de mar) del medicamento. Este podría ser el caso del oligoelemento magnesio (Mg) químicamente presente en NaM-7CH, esencial para la formación de moléculas de clorofila, y por lo tanto, de vital importancia en la fotosíntesis, que es el principal proceso de producción de biomasa vegetal a partir de nutrientes y energía luminosa. Además, el magnesio tiene un rol predominante en la actividad enzimática asociada al metabolismo de los carbohidratos (Xiao *et al.*, 2014). Resultados similares obtuvieron Lippert *et al.* (2007) cuando estudiaron el efecto de dinamizaciones homeopáticas de azufre en el crecimiento del cultivo de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench), evidenciaron un efecto estimulante sobre la variable LT, asociado

plants treated with NaM-7CH (Figure 3). With this homeopathic medicine, it was possible to increase LT in 63.6% with respect to the control treatment (DW), such as with the other response variables, all treatments stimulated growth in LT compared with the control but in a lesser percentage to NaM-7CH (PhA-13CH, 45% and NaM-31CH, 27.2%).

The results observed in LT for the treatment NaM-7CH could be explained by the presence of oligoelements that constitute the active ingredient (sea salt) of the medicine. It could be the case of the magnesium (Mg) oligoelement chemically present in NaM-7CH, which is essential for the development of chlorophyll molecules, thus, its vital importance in photosynthesis, the main plant production process starting from nutrients and luminous energy. Moreover, magnesium has a predominant role in the enzymatic activity associated with carbohydrate metabolism (Xiao *et al.*, 2014). Similar results were obtained by Lippert *et al.* (2007) when they studied the effect of homeopathic sulfur dynamizations in sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) cultivation growth; a stimulating effect was evident on the LT variable, associated to the beneficial effect of the treatments used, concluding that they contained plant growth stimulating oligoelements.

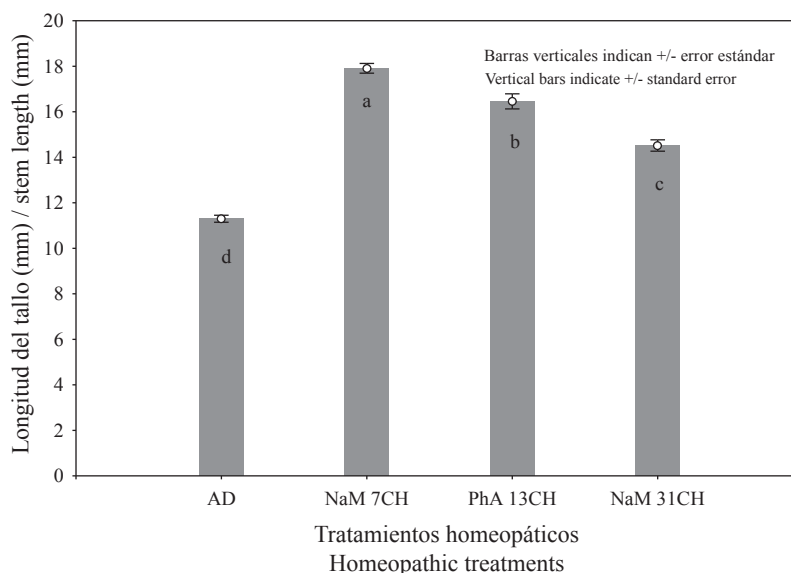


Figura 3. Efecto de los medicamentos homeopáticos en la longitud del tallo de *Salicornia bigelovii*. Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($P = 0.05$).

Figure 3. Effect of homeopathic medicines on the length of the stem of *Salicornia bigelovii*. Different letters show significant statistical differences ($P = 0.05$).

al efecto benéfico de los tratamientos empleados y concluyeron que éstos contenían oligoelementos estimuladores del crecimiento vegetal.

Con respecto a la variable longitud de radícula (LR) se registró diferencia significativa entre tratamientos ($P = 0.000$), con una respuesta favorable a todas las diluciones homeopáticas aplicadas, pero mayor LR en las plantas tratadas con NaM-7CH (Figura 4). No obstante, conviene aclarar que los demás tratamientos (PhA-13CH y NaM-31CH) también presentaron respuestas positivas en esta variable. Estos resultados pueden atribuirse a la presencia de nanopartículas del ingrediente activo de NaM (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018b); que en este caso podrían ser oligoelementos como el calcio, cuya función en la planta es vital en la pared celular para mantener la integridad de la membrana, además de ser muy importante en el fortalecimiento de las raíces y en la regulación de procesos fisiológicos relacionados con la absorción de nutrientes (Hojjat-Nooghi y Mozafari, 2012).

Con respecto a la producción de biomasa vegetal, se observaron diferencias significativas para BFPA ($P = 0.000$), BSPA ($P = 0.023$), BFR ($P = 0.0000$) y para la BSR ($P = 0.00$), destacando de nuevo el tratamiento NaM-7CH como el de mayor respuesta para estas variables (Cuadro 1). Los resultados obtenidos

With respect to the radicle length (LR) variable a significant difference was recorded among treatments ($P = 0.000$), with a favorable response to all the homeopathic dilutions applied but greater LR in those treated with NaM-7CH (Figure 4). Nonetheless, it is worth to point out that the rest of the treatments (PhA-13CH and NaM-31CH) also showed positive responses in this variable. These results could be attributed to the presence of nanoparticles of the active NaM ingredient (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018), which in this case they could be oligoelements, for example, calcium whose function in plants is vital to maintain the integrity of the cell wall membrane besides its importance in strengthening roots in regulating the physiological processes related to nutrient absorption (Hojjat-Nooghi and Mozafari, 2012).

With respect to plant biomass production, significant differences were observed for BFPA ($P = 0.000$), BSPA ($P = 0.023$), BFR ($P = 0.0000$) and for BSR ($P = 0.00$), highlighting once again treatment NaM-7CH as the one with the greatest response for these variables (Table 1). The results obtained demonstrated, without any doubt, a positive effect of all the homeopathic treatments used in this study. Additionally, these results suggested that low

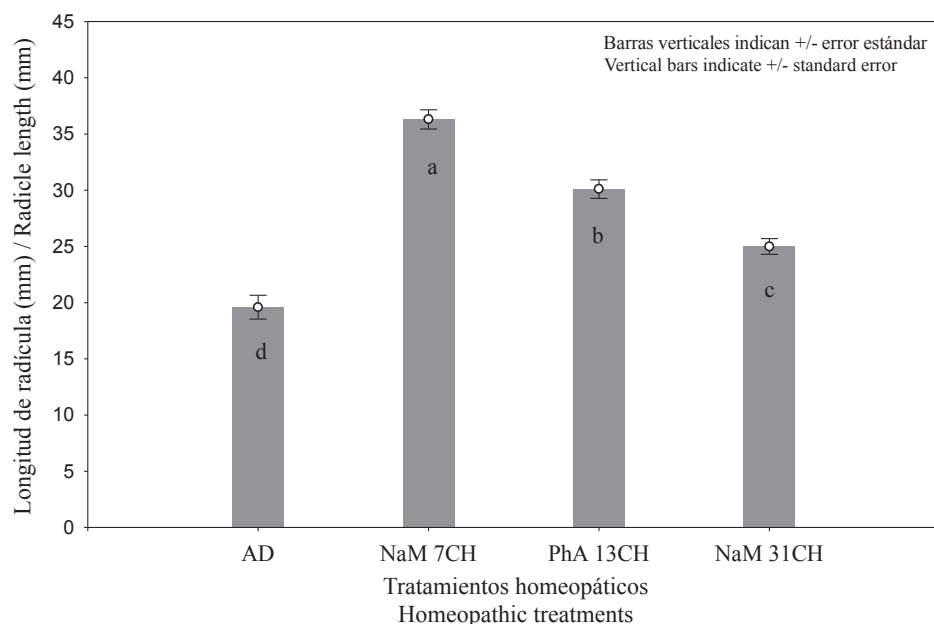


Figura 4. Efecto de los medicamentos homeopáticos en la longitud de la radícula de *Salicornia bigelovii*. Letras distintas muestran diferencias estadísticas significativas ($P = 0.05$).

Figure 4. Effect of homeopathic medicines on the length of the radicle of *Salicornia bigelovii*. Different letters show significant statistical differences ($P = 0.05$).

Cuadro 1. Efecto de los medicamentos homeopáticos en la producción de biomasa de *Salicornia bigelovii*.
Table 1. Effect of homeopathic medicines on the biomass production of *Salicornia bigelovii*.

Tratamientos / Treatments	BFPA	BSPA	BFR	BSR
	----- mg planta ⁻¹ -----			
AD	0.132c	0.014b	0.0046c	0.0010c
NaM 7CH	0.232a	0.024a	0.087a	0.0155a
PhA 13CH	0.229a	0.020ab	0.074ab	0.0049b
NaM 31CH	0.188b	0.018ab	0.054b	0.0011c

BFPA = biomasa fresca de parte aérea; BSPA = biomasa seca parte aérea; BFR = biomasa fresca de radícula; BSR = biomasa seca de radícula. Valores promedios con literales diferentes en una misma columna difieren estadísticamente (Tukey HSD, $P = 0.05$).

BFPA = fresh biomass of aerial part; BSPA = dry biomass aerial part; BFR = fresh radicle biomass; BSR = dry radicle biomass. Average values with different literals in the same column differ statistically (Tukey HSD, $P = 0.05$).

demuestran sin lugar a dudas un efecto positivo de todos los tratamientos homeopáticos empleados en el presente estudio. Adicionalmente, estos resultados sugieren que las bajas diluciones, es decir aquellas que se encuentran por debajo del límite de Avogadro (1×10^{-23}) que aproximadamente equivale a una dinamización 12 Centesimal Hahnemaniana (12CH), asegura una mejor respuesta de *S. bigelovii*.

Aplicando un criterio basado únicamente en la presencia química de los elementos contenidos en el concentrado inicial o Tintura Madre (TM) a partir de la cual se preparó el medicamento homeopático mediante un proceso serial de dilución/agitación, podría decirse que se garantiza la presencia del “principio activo” en NaM-7CH, pero no en NaM-31CH. Sin embargo, el principio básico de la homeopatía no reside solamente en la presencia de moléculas y de nanopartículas del denominado “principio activo” de la TM, sino en procesos complejos de naturaleza física y electromagnética que mantienen su actividad incluso en ultradiluciones más allá del límite que establece la teoría de Avogadro. Todo esto deberá ser investigado a mayor profundidad, ya que las dinamizaciones por arriba de la dilución 12CH mantienen la capacidad de inducir efectos biológicamente medibles, desencadenando respuestas positivas a nivel celular, fisiológico, genómico, transcriptómico y metagenómico, entre otros (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018b, 2019).

CONCLUSIONES

Todos los medicamentos homeopáticos aplicados incrementaron significativamente la tasa y porcentaje de germinación de *S. bigelovii*, así como la longitud

dilutions, in other words, those that were found below Avogadro's (1×10^{-23}) limit, which is approximately equivalent to a 12-Centesimal Hahnemanian (12CH) dynamization, ensured a better response of *S. bigelovii*.

Applying the criteria based only in the chemical presence of the elements contained in the initial concentrate or Mother Tincture (MT), from which the homeopathic medicine was prepared by a serial dilution/agitation process, may guarantee the presence of the “active principle” in NaM-7CH but not in NaM-31CH. However, the basic principle of homeopathy does not reside only in the presence of molecules and/or nanoparticles of the so called MT “active principle but in complex processes of physical and electromagnetic nature that maintain its activity, including in ultradilution beyond the limit established by Avogadro's theory. Therefore, all the previously mentioned should be investigated in depth because dynamizations beyond the 12CH dilution maintain the capacity of inducing biologically measurable effects, unchaining positive responses at cellular, physiological, genomic, transcriptomic and metagenomic levels, among others (Mazón-Suástegui *et al.*, 2018b, 2019).

CONCLUSIONS

All the homeopathic medicines applied in this study increased germination rate and percentage of *S. bigelovii* significantly, as well as stem length, radicle length and biomass production. However, the best results and with the greatest productive applicability were obtained with the treatment NaM-7CH, with which the variables PG, TG, RL and BFPA were

del tallo, longitud de radícula y producción de biomasa. Sin embargo, los resultados mejores y con mayor aplicabilidad productiva se obtuvieron con el tratamiento NaM-7CH, siendo PG, TG, LR y BFPA las variables mayormente estimuladas con la aplicación profiláctica de la medicación homeopática. Estos resultados confirman que de la homeopatía agrícola es una alternativa viable y de bajo costo para optimizar el cultivo de *S. bigelovii* y que *Natrum muriaticum* favorece de manera eco-amigable, la germinación de semillas y la producción de biomasa de esta especie halófila que tiene un excelente potencial agrícola, productivo y de mercado.

AGRADECIMIENTOS

El estudio fue financiado por el Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (México), proyecto Ciencia Básica SEP-CONACYT No. 258282 “Evaluación experimental de homeopatía y nuevos probióticos en el cultivo de moluscos, crustáceos y peces de interés comercial”. Dailenys Batista-Sánchez es becaria de maestría en CIBNOR, bajo la co-Dirección de JMMS (Beca CONACYT 756669).

-Fin de la versión en español-

REFERENCIAS / REFERENCES

- Al-Rashed, S. A., M. M. Ibrahim, M. M. A. Hatata, and G. A. El-Gaaly. 2016. Biodiesel production and antioxidant capability from seeds of *Salicornia bigelovii* collected from Al Jubail, Eastern province, Saudi Arabia. Pak. J. Bot. 48: 2527-2533.
- Bagwell, C. E., M. Dantzler, P. Bergholz, and Ch. R. Lovell. 2001. Host-specific ecotype diversity of rhizoplane diazotrophs of the perennial glasswort *Salicornia virginica* and selected salt marsh grasses. Aquat. Microb. Ecol. 23: 293-300. doi: 10.3354/ame023293.
- Beltrán-Burboa, C. E., M. E. Arce, O. Bianciotto, G. A. López Ahumada, J. M. Vargas, L. G. Hernández-Montiel, J. J. Reyes-Pérez, A. Nieto-Garibay, F. H. Ruiz-Espinoza, F. Ayala Alvarez, R. R. Cisneros Almazán, F. J. Wong Corral, J. Borboa Flores y E. O. Rueda-Puente. 2017. *Salicornia bigelovii* (Torr.): Un sistema modelo para incorporarse como cultivo agrícola en zonas árido-desérticos. Biotecnia 19: 46-50.
- Giardini-Bonfim, F. P., V. W. Dias-Casali, and E. Ronie-Martins. 2012. Germinação e vigor de sementes de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) peletizadas com preparados homeopáticos de *Natrum muriaticum*, submetidas a estresse salino. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer-Goiânia 8: 625-633.

highly stimulated with the prophylactic application of the homeopathic medicine. These results confirmed that agricultural homeopathy is a viable and low cost alternative to optimize *S. bigelovii* cultivation, and that *Natrum muriaticum* favored seed germination and biomass production in an eco-friendly manner of this halophyte species that has an excellent agricultural, productive and marketing potential.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed by Sectoral Fund for Research and Education (Mexico), Project Ciencia Básica SEP-CONACYT No. 258282 “Evaluación experimental de homeopatía y nuevos probióticos en el cultivo de moluscos, crustáceos y peces de interés comercial”. Dailenys Batista-Sánchez is a Master’s Fellow at CIBNOR, under the co-Direction of JMMS (CONACYT Scholarship 756669).

-End of english version-

- Hernández Perales, M., R. Cisneros Almazán, J. Ortega-García, C. Márquez Hernández, J. J. Reyes-Pérez, B. Murillo-Amador, L. G. Hernández Montiel, A. Nieto-Garibay y E. O. Rueda-Puente. 2016. Mitigación del efecto de sales clorhídricas y sulfáticas en la germinación de *Salicornia bigelovii* (Torr.) por bacterias benéficas in vitro. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 7: 923-34.
- Hojjat-Nooghi, F. and V. Mozafari. 2012. Effects of calcium on eliminating the negative effects of salinity in pistachio (*Pistacia vera* L.) seedlings. Aust. J. Crop Sci. 6: 711-716.
- ISTA (International Seed Testing Association). 2010. Rules proposals for the International Rules for Seed Testing 2010 Edition. OM Rules Proposals for the International Rules for Seed Testing 2010 Edition.doc. Approved by ECOM Decision. No.498. Bassersdorf, Switzerland.
- Lippert, M. A. M., C. M. Bonato, and A. T. Mizote. 2007. Efeito do medicamento homeopático Sulphur e de suas dinamizações na germinação e no crescimento de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench). Arq. Mudi. 1: 81-91.
- Lutts, S. and I. Lefèvre. 2015. How can we take advantage of halophyte properties to cope with heavy metal toxicity in salt-affected areas? Ann. Bot. 115: 509-528. doi: 10.1093/aob/mcu264.
- Maguire, J. D. 1962. Speed of germination - aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. Crop Sci. 2: 176-177. doi: http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x.
- Mazón-Suástegui, J. M., M. García-Bernal, P. E. Saucedo, A. Campa-Córdova, and F. Abasolo-Pacheco. 2017. Homeopathy outperforms antibiotics treatment in juvenile scallop

- Argopecten ventricosus*: Effects on growth, survival, and immune response. Homeopathy 106: 18-26. doi: 10.1016/j.homp.2016.12.002.
- Mazón-Suástegui, J. M., B. Murillo-Amador, D. Batista-Sánchez, Y. Agüero-Fernández, M. R. García-Bernal, and C. M. Ojeda-Silvera. 2018a. *Natrum muriaticum* as an attenuant of NaCl-salinity in basil (*Ocimum basilicum* L.). Nova Sci. 10: 120-136. doi: 10.21640/ns.v10i21.1423.
- Mazón Suástegui, J. M., D. Tovar Ramírez, J. S. Salas Leiva, G. F. Arcos Ortega, M. García Bernal, M. A. Avilés Quevedo, J. A. López Carvallo, J. L. García Corona, L. E. Ibarra García, N. L. Ortiz Cornejo, A. Teles, A. Rosero García, F. Abasolo Pacheco, A. I. Campa Cordova, P. E. Saucedo Lastra, J. D. Barajas Frias, P. Ormart Castro, M. C. Rodriguez Jaramillo, R. González Gonzáles, U. Barajas Ponce, J. L. Tordecillas Guillén, F. A. Álvarez Gil, G. Pineda Mahr, J. Peiro López, and M. Robles Mungaray. 2018b. Aquacultural homeopathy: A focus on marine species. Chapter 4. pp. 67-91. In: G. Diarte-Plata and R. Escamilla (eds.). Aquaculture: Plants and invertebrates. InTechOpen Books. doi: 10.5772/intechopen.78030.
- Mazón-Suástegui, J. M., C. M. Ojeda-Silvera, M. García-Bernal, M. A. Avilés-Quevedo, F. Abasolo-Pacheco, D. Batista-Sánchez, D. Tovar-Ramírez, F. Arcos-Ortega, B. Murillo-Amador, A. Nieto-Garibay, Y. Ferrer-Sánchez, R. M. Morelos-Castro, A. Alvarado-Mendoza, M. Díaz-Díaz, and B. Bonilla-Montalvan. 2019. Agricultural homeopathy: A new insights into organic's. IntechOpen Books. doi: 10.5772/intechopen.84482.
- Meneses-Moreno, N. 2017. Agrohomeopatía como alternativa a los agroquímicos. Rev. Méd. Homeop. 10: 9-13. doi: https://doi.org/10.1016/j.homeo.2017.04.004.
- Munns, R. and M. Tester. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Ann. Rev. Plant Biol. 59: 651-681. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911.
- Narváez-Martínez, E. C., H. A. Toro P., J. A. León-Guevara y T. Bacca. 2014. Evaluación de soluciones homeopáticas para controlar *Neoleucinodes elegantalis guenée* (Lepidoptera: Crambidae) en cultivo de Lulo. Biotecnol. Sector Agropec. Agroindus. 12: 115-123.
- Ortiz-Cornejo, N. L., D. Tovar-Ramírez, F. Abasolo-Pacheco y J. M. Mazón-Suástegui. 2017. Homeopatía, una alternativa para la acuicultura. Rev. Méd. Homeopat. 10: 18-24. doi: https://doi.org/10.1016/j.homeo.2017.04.006.
- Pinto, R. J., N. C. Mapeli, C. Cremon, e E. Frazão da Silva 2014. Germinação e crescimento inicial de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) em função de preparados homeopáticos Carbo vegetabilis e dias após o despolpamento para sementeira. Rev. Agrarian 7: 244-250.
- Rivers, W. G. and D. J. Weber. 1971. The influence of salinity and temperature on seed germination in *Salicornia bigelovii*. Physiol. Plant. 24: 73-75. doi: 10.1111/j.1399-3054.1971.tb06719.x.
- Rueda-Puente, E. O., J. A. Villegas-Espinoza, L. E. Gerlach-Barrera, M. A. Tarazón-Herrera, B. Murillo-Amador, J. L. García-Hernández, E. Troyo-Diéguez y P. Preciado-Rangel. 2009. Efecto de la inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre la germinación de *Salicornia bigelovii*. Terra Latinoamericana 27: 345-54.
- Rueda-Puente, E. O., F. A. Beltrán Morales, F. H. Ruíz Espinoza, R. D. Valdez Cepeda, J. L. García Hernández, N. Y. Ávila Serrano, L. Partida Ruvalcaba y B. Murillo Amador. 2011. Opciones de manejo sostenible del suelo en zonas áridas: aprovechamiento de la halófito *Salicornia bigelovii* (Torr.) y uso de biofertilizantes en la agricultura moderna. Trop. Subtrop. Agroecosyst. 13: 157-167.
- Rueda-Puente, E. O., B. Murillo-Amador, J. Ortega García, P. Rangel Preciado, A. Nieto Garibay, R. J. Holguín Peña, G. A. López Ahumada, F. Rodríguez Félix, J. M. Vargas-López y F. J. Wong Corral. 2017. Desarrollo natural de la halófito *Salicornia bigelovii* (tor.) En zona costera del estado de Sonora. Trop. Subtrop. Agroecosyst. 20: 1-9.
- SSA (Secretaría de Salud). 2015. Farmacopea homeopática de los Estados Unidos Mexicanos. FEUM-SSA. Biblioteca Nacional de México 615.532-scdd21. ISBN: 978-607-460-509-9.
- Slama, I., C. Abdelly, A. Bouchereau, T. Flowers, and A. Savouré. 2015. Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. Ann. Bot. 115: 433-447. doi: https://doi.org/10.1093/aob/mcu239.
- StatSoft Inc. 2011. Statistica. System reference. StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA.
- Wong-Corral, F. J., J. Borboa-Flores, M. Ortega-Nieblas, J. León-Lara, F. J. Cinco-Moroyoqui y E. O. Rueda-Puente. 2010. Mejoramiento de la germinación de seis ecotipos de salicornia (*Salicornia bigelovii*) con nitrato de potasio. VII Simposio Internacional sobre la Flora Silvestre en Zonas Áridas. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México.
- Xiao, J., Ch. Hu, Y. Chen, B. Yang, and J. Hua. 2014. Effects of low magnesium and an arbuscular mycorrhizal fungus on the growth, magnesium distribution and photosynthesis of two citrus cultivars. Sci. Hortic. 177: 14-20. doi: 10.1016/j.scienta.2014.07.016.