

EFFECTO ECOTOXICOLÓGICO DEL PLOMO SOBRE LA GERMINACIÓN Y CRECIMIENTO RADICULAR DE *Raphanus sativus* Y *Beta vulgaris* EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Ecotoxicological effects of lead on the root growth of *Raphanus sativus* and *Beta vulgaris* under laboratory conditions

Brenda Nureña-Velásquez¹; Santos E. Padilla-Sagástegui²

Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo. Av Juan Pablo II s/n.
Trujillo – Perú
bnuve89@gmail.com¹, padsag@yahoo.com²

RESUMEN

El intercambio de material nutritivo de los organismos vegetales con su medio externo, se ve afectado por residuos de actividades antrópicas, que ponen a disposición concentraciones de plomo que afectan a la salud humana y a la integridad de los ecosistemas. Su absorción por las raíces de los vegetales repercute en la cadena alimenticia, como tal sucede con algunas plantas comestibles como *Raphanus sativus* y *Beta vulgaris*, las mismas que satisfacen el consumo popular. Por tal motivo, en esta investigación se planteó como objetivo determinar el efecto ecotoxicológico del plomo en el crecimiento radicular de estas especies y estimar la concentración del elemento químico acumulado en su parte radicular. Para ello se dispuso a germinar semillas en recipientes distribuidos en un diseño en bloques con estímulo creciente. De este modo se determinó el crecimiento en longitud y la acumulación del plomo en la raíz, mediante técnicas de espectrofotometría de absorción atómica. Los datos obtenidos sirvieron para procesar los análisis de varianza. Asimismo, se pudo evidenciar que existe una diferencia significativa en las medidas de longitud y concentración de plomo en la radícula e hipocotilo de ambas especies, lo que nos permite concluir que el plomo causa efecto a medida que aumenta su concentración.

Palabras clave: Plomo, *Raphanus sativus* y *Beta vulgaris*

ABSTRACT

The exchange of nutritive materials from vegetable organisms to their external environment has been regularly affected by human activities wastes, providing certain amounts of lead in proportional concentrations affecting human health and ecosystem integrity, as a consequence of this, lead is absorbed by vegetable roots producing an alteration on the food chain; this is the case of some comestible plants like *Raphanus sativus* and *Beta vulgaris*. This investigation has a main objective that is determining ecotoxicological effect of lead in the root growth of each one of these species; also determine lead concentration in the root area; in order to accomplish this it was necessary to do the following experience, consisting on few steps, the first one was to germinate seeds distributed in containers in a block design with increasing stimulus; with this it was able to determine the growth and lead accumulation in the root by using spectrophotometric techniques of atomic absorption, whose data were used to process the analysis of variance obtaining, in this way, as a result of the procedure that there is actually a significant difference in length measures between treatments and root length for both species; similar to the concentration of lead in the root and hypocotyl between treatments and species, this allows us to conclude that lead causes an increase on its effect as its concentration raises.

Key Words: lead, *Raphanus sativus* and *Beta vulgaris*

Recibido: 03 de Marzo de 2014

Aceptado: 11 de Julio de 2014

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, las actividades antropogénicas han generado una gran variedad de contaminantes, los mismos que han ocasionado el deterioro de los distintos compartimentos ambientales entre los cuales destacan el agua, aire, suelo y la biota; por ende, el de los ecosistemas. Estos dependen de la concentración en la que se encuentren las sustancias tóxicas, de su persistencia y su biodisponibilidad; pudiendo ocasionar desde efectos no letales, como el desplazamiento temporal de algunas especies, hasta la muerte de poblaciones enteras¹.

Para los organismos vegetales, es necesario un constante intercambio de material nutritivo con el medio externo, pero muchas veces es dificultado por los residuos de las actividades antrópicas, entre los que destacan los elementos químicos que aparecen como consecuencia de la fundición, minería, fabricación de pinturas y combustión de gasolinas. Todos ellos ponen a disposición metales pesados dentro de los cuales sobresalen concentraciones abundantes de plomo (Pb) en el ambiente. Éstas afectan a la salud humana y a la integridad de los ecosistemas, ocasionando daños irreversibles que repercuten en la pérdida de biodiversidad^{2,3}.

En los vegetales, las concentraciones altas de metales pesados inhiben la germinación de semillas, el crecimiento y desarrollo de plantas. Del mismo modo, alteran gran cantidad de procesos bioquímicos, útiles en el empleo de bioensayos estáticos. Estos además, pueden catalogar toxicológicamente muestras contaminadas con elementos químicos y obtener, simultáneamente, pruebas experimentales exitosas capaces de minimizar la presencia de muchos de ellos en los suelos y aguas contaminados. Por lo tanto, la sensibilidad mostrada por las especies vegetales en sus procesos fisiológicos destinados a contrarrestar a los metales pesados, varía considerablemente a través de reinos y familia. De acuerdo a esta característica, las plantas vasculares son ligeramente más tolerantes, pudiendo atribuirse esta sensibilidad a factores

genéticos y fisiológicos^{4,5}.

En estas condiciones, el plomo como otros metales pesados, cuando es absorbido por las raíces de la planta, toma parte en la cadena alimenticia y su acumulación depende de la movilidad de la solución desde la raíz a otras partes de la planta. De este modo, produce efectos como la inhibición de la elongación de la radícula y el hipocotilo, lo cual permite suponer que nos encontramos ante un efecto tóxico, el mismo que constituye un indicador para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta^{6,7}.

Desde el punto de vista regulatorio, las pruebas biológicas pueden utilizarse para establecer criterios de calidad ambiental, para controlar descargas de aguas residuales municipales e industriales, regular el uso y producción de sustancias químicas. También para enjuiciar y defender actividades relacionadas con los contaminantes en casos de litigio ambiental o en todo caso incorporar las pruebas biológicas en procesos de toma de decisiones con respecto al desarrollo, manufactura y comercialización de productos afectados⁸.

En este sentido, los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para identificar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos⁷.

Los estudios reportados por Calow⁵, destacan la potencialidad del uso de *Allium cepa* L., “cebolla”, *Beta vulgaris* L., “betarraga”, *Oriza sativa* L., “arroz” y *Raphanus sativus* L., “rabanito” para evaluar la toxicidad y el riesgo de sustancias químicas peligrosas en el ambiente. Así lo confirman los estudios de Iannacone y Alvarino⁹, quienes sostienen que la germinación de semillas de *Sichorium intybus* var. fina “achicoria”, *Lactuca sativa*

var. mantecosa “lechuga”, *Sichorium endivia* var. lisa “escarola”, frente a sustancias tóxicas como cianuro de potasio, cloruro de cobalto, dicromato de potasio y cloruro de cobre, demostraron mayor sensibilidad en las raíces que el hipocotilo¹⁰.

En este contexto y dada la importancia de los antecedentes, la presente investigación tiene como objetivos determinar el efecto ecotoxicológico de plomo en el crecimiento radicular de *Raphanus sativus* y *Beta vulgaris*, así como determinar la concentración acumulada en la parte radicular de cada especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material biológico, estuvo constituido por semillas de *Raphanus sativus* y *Beta vulgaris*, que fueron obtenidas en los centros de venta de productos agrícolas de Trujillo, con la finalidad de asegurar su certificación. Éstas fueron cultivadas en macetas hasta cumplir su ciclo biológico, de donde se obtuvieron semillas de la misma planta las cuales sirvieron de unidades experimentales para desarrollar el proceso experimental, con la finalidad de asegurar la homogeneidad del material y el estado de sanidad. Dichas semillas fueron almacenadas en bolsas de papel identificadas con un código y sometidas a pruebas preliminares de germinación, para asegurar la viabilidad de potencial germinativo. Este procedimiento nos sirvió de referencia para estimar las condiciones de la población de 101 semillas de cada especie, de donde se tomaron las unidades experimentales a fin de someterlas al diseño experimental con el tamaño de la muestra de 80 semillas, usando la fórmula:

$n = \{384 / [1 + (384/N)]\}$; donde “n”, representa el tamaño de la muestra y N, el tamaño de la población¹¹.

La preparación del material químico, se inició con la preparación de la solución “madre”. Para esto se disolvió un gramo de plomo contenido en Nitrato de Plomo en un litro de agua destilada con la finalidad de hacer

diluciones de 12,5; 25 y 50 ppm. A continuación se formaron los tratamientos en un diseño de estímulo creciente distribuidos en 20 unidades experimentales de cada especie en presencia de un control. Éstas fueron instaladas en envases de polietileno de medio litro de capacidad, cada uno de los cuales llevó cinco semillas para la germinación; las mismas que permanecieron durante 15 días humedecidas con soluciones de plomo en las condiciones indicadas^{11,12}.

La toma de datos estuvo referida a longitud de hipocotilo y radícula de la plántula a los 15 días de germinación. Se utilizó en este procedimiento una regla Vernier Uyustools $\pm 0,05$ mm, y para determinar la concentración de plomo en las plantas germinadas, se empleó la metodología de Epha con la técnica de la Espectrofotometría de Absorción Atómica. En este paso fue necesaria la utilización de un Espectrofotómetro marca Emperor (Chemical 160) con sensibilidad $\pm 0,1$ ppm y para la morfología de la planta se observaron los cambios de color, la forma de la hoja y radículas afectadas.

Los datos obtenidos fueron procesados con el programa Microsoft Excel 2007, para los procesos estadísticos concernientes al análisis de Varianza siguiendo el esquemas de Little y Hills¹³ con un modelo estadístico de: $Y_{ijklm} = \mu + A_{jklm} + B_{i.klm} + C_{ij.lm} + D_{ijk.m} + E_{ijkl} + F_{ijklm}$; donde Y=varianza experimental con cuatro fuentes de variación; A= tratamientos, variando de “i” de 1 a 4; B= repeticiones, variando “j” de 1 a 4; C = partes de la planta, variando “k” de 1 a 2; D = especies, variando “l” de 1 a 2; E = repeticiones, variando “m” de 1 a 4 y F = error experimental en cada una de las fuentes de variación habiendo de mostrado la diferencia significativa.

Así mismo, se hizo la comparación de Medias por el método de la Mínima Diferencia Significativa Honesta, con la siguiente fórmula matemática $D = \sqrt{\{(2CMe/N)(Gl)\}}$; donde D, representa Mínima Diferencia Significativa Honesta; CMe, el Cuadrado Medio del error experimental; N, el Numero de muestra y Gl, el Grados de Libertad con un

nivel de significación de 0,05¹⁴.

Quevedo¹⁵ sugiere que con la finalidad de asegurar la confiabilidad de los resultados se procesen los análisis de regresión lineal con la posibilidad de asegurar la relación causa – efecto entre plomo y el crecimiento de las partes de la planta, siguiendo la técnica de mínimos cuadrados.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos corresponden a la longitud de la radícula e hipocotilo, y las concentraciones de plomo en *R. sativus* y *B.vulgaris*; cuyos valores se presentan en la

Tabla 1, que corresponden a los análisis de varianza de la longitud de radícula e hipocotilo con las fuentes de variación son tratamientos, partes de la planta, especies y repeticiones.

Así mismo, la Tabla 2, nos muestra los promedios comparados de las longitudes de las partes de la planta y concentraciones de plomo en ambas especies, representados en Fig. 1 y 2; complementados por los análisis de regresión lineal entre la concentración de plomo aplicado y la longitud de radícula, para cada especie que se muestra en la Tabla 3, seguida de su representación en la Fig. 3 y 4 de regresión lineal.

Tabla 1: Análisis de varianza de los valores de la longitud y concentraciones de plomo en la radícula e hipocotilo de *R. sativus* y *B. vulgaris*, con 95% de confiabilidad.

	Fuente de Variación	SC	gl	CM	Fc	Ft
Longitud de radícula e hipocotilo	Tratamientos	109,229	3	36,410	18,731	2,099*
	Partes de la planta	84,000	1	84,000	43,214	2,711*
	Especies	14,861	1	14,861	7,645	2,711*
	Repeticiones	0,558	3	0,186	0,096	2,099
	Error	106,910	55	1,944		
	Total	315,558	63			
Concentraciones de plomo en la radícula e hipocotilo	Tratamientos	5567,895	3	1855,965	177,943	2,099*
	Partes de la planta	1,048	1	1,048	0,100	2,711
	Especies	40,074	1	40,074	3,842	2,711*
	Repeticiones	0,210	1	0,210	0,020	2,711
	Error	260,753	25	10,430		
	Total	5869,979	31			

Leyenda: *Significancia. SC=suma de cuadrados; Gl= grados de libertad; CM= Cuadrado medio; Fc= “F” calculado y Ft= “F” tabulado

Tabla 2: Comparación de los promedios entre las medidas de longitud (D=0,3184) y concentraciones de plomo en la radícula e hipocotilo (D=1,0513) usando el Método Mínima Diferencia Significativa Honesta en *R. sativus* y *B. vulgaris*.

	Fuentes de Variación		Promedio	Significancia		
Longitud de radícula e hipocotilo	Tratamientos	T4(50,0mg)	0,775	a		
		T3(25,0mg)	0,888	a		
		T2(12,5mg)	2,130		b	
		T1(0mg)	4,020		b	
	Partes de la planta	Hipocotilo	1,137	a		
		Radícula	2,769		b	
	Especie	<i>B. vulgaris</i>	1,471	a		
		<i>R. sativus</i>	2,435		b	
Concentraciones de plomo en la radícula e hipocotilo	Tratamientos	T1(0mg)	0,000	a		
		T2(12,5mg)	0,701	a		
		T3(25,0mg)	10,550		b	
		T4(50,0mg)	32,650			c
	Especie	<i>R. sativus</i>	9,856	a		
		<i>B vulgaris</i>	12,094		b	

Tabla 3: Análisis de regresión lineal entre la longitud de radícula y concentración de plomo para *R. sativus* y *B. vulgaris*.

Fuente de variación		SC	gl	CM	Fc	Ft
<i>R. sativus</i>	Regresión	2,251	1	2,251	7,767	3,77*
	Error	1,739	6	0,290		
	Total	3,99	7			
<i>B. vulgaris</i>	Regresión	3,121	1	3,120	20,800	3,77*
	Error	0,879	6	0,150		
	Total	4,000	7			

Leyenda: * Significancia. SC=suma de cuadrados; Gl= grados de libertad; CM= Cuadrado medio; Fc = “F” calculado y Ft= “F” tabulado.

	Tratamiento				Partes de la planta		Especies	
	T4	T3	T2	T1	Hipocotilo	Radícula	<i>B. vulgaris</i>	<i>R. sativus</i>
Valor promedio	0,775	0,888	2,130	4,020	1,137	2,769	1,471	2,435
Representación								
gráfica								

Fig. 1: Promedios de la longitud en radícula y epicotilo de *B. vulgaris* y *R. sativus*, la posición de niveles indica la diferencia significativa.

Fig. 2: Promedios comparados de las concentraciones de plomo en radícula y epicotilo de *B. vulgaris* y *R. sativus*, la posición de niveles indica la diferencia significativa.

	Tratamiento				Especies	
	T1	T2	T3	T4	<i>B. vulgaris</i>	<i>R. sativus</i> .
Valor promedio	0,000	0,701	10,550	32,650	9,856	12,094
Representación gráfica	[Barra azul]				[Barra azul]	[Barra roja]
			[Barra roja]	[Barra amarilla]		[Barra roja]

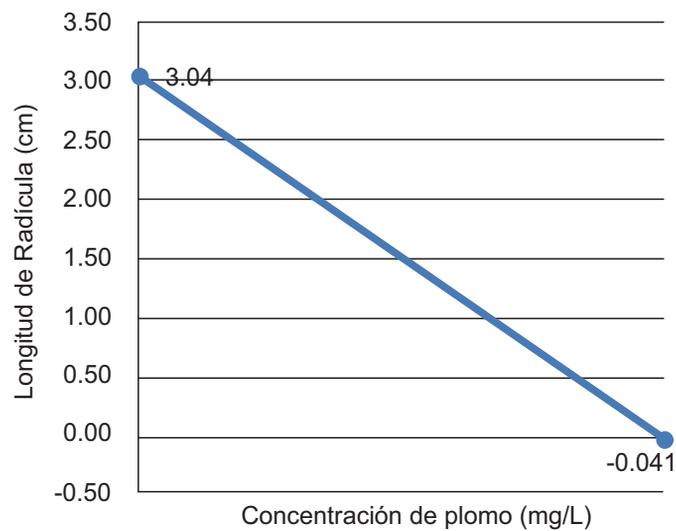


Fig. 3: Análisis de regresión lineal entre concentración de plomo y la longitud de radícula para *R. sativus*, donde la orientación de la curva evidencia efecto en la disminución del crecimiento.

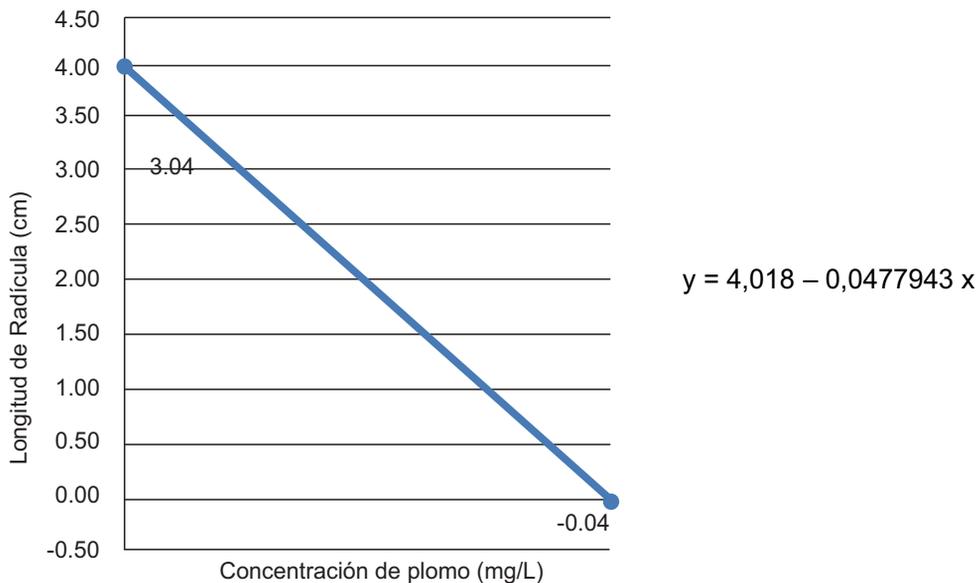


Fig. 4: Análisis de regresión lineal entre concentración de plomo y la longitud de radícula para *B. vulgaris*, donde la orientación de la curva evidencia efecto en la disminución del crecimiento.

DISCUSIÓN

Durante el período de disposición de las semillas a la germinación, junto con el plomo y los días de desarrollo de la plántula, se observaron cambios en la morfología y estructura de cada ejemplar experimental. Esto se debe a la ocurrencia de numerosos procesos fisiológicos ante la presencia y acción de la sustancia tóxica; la misma, que en algunos casos puede interferir y alterar la supervivencia y el desarrollo del embrión. Por lo tanto, nos encontramos ante una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos.

Por otra parte, se afirma que muchas de las reacciones y procesos involucrados durante la germinación son generalizados para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta expresada en los datos obtenidos a partir de la aplicación de las prueba de bioensayos son en gran medida de confiabilidad. Sus efectos en las unidades experimentales y/o plántulas en general, se demuestran en la evaluación continua del desarrollo de la radícula e hipocotilo. Por este motivo, constituyen indicadores de alta precisión para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta, similares a los ensayos de toxicidad aguda con semillas de lechuga⁷.

La comparación de los grupos de datos analizados siguiendo los procesos estadísticos, como es el caso de los análisis de varianza para longitud de hipocotilo y radícula (Tabla 1), nos indica que el cuadrado medio o varianza experimental (1,944), es menor que en los tratamientos, partes de la planta y especies experimentadas; pero mayor que en repeticiones. Esto evidencia que las unidades experimentales han sido dispuestas adecuadamente en el diseño experimental en las mismas condiciones; por lo tanto, tienen confiabilidad, es decir el desvío de observación durante la toma de datos es mínima, lo cual indica que las longitudes son homogéneas y se comprueba con la prueba de hipótesis al comparar el valor calculado (F_c) y valor tabulado (F_t), para cada fuente de

variación. Tal procedimiento nos lleva a deducir que existe diferencia en la respuesta de las especies al plomo en cada parte de la planta y en cada tratamiento, concordante con los resultados obtenidos en “lechuga”, tratada con diferentes compuestos a través de ensayos de fitotoxicidad^{2,7}.

Las observaciones de las concentraciones de plomo en la radícula e hipocotilo en el cuadrado medio o varianza experimental (10,430) es menor que en los cuadrados medios de los tratamientos y especies experimentadas. Este resultado nos permite deducir con suficiente confianza que existe diferencia significativa en la acumulación de plomo en las partes de la planta en las dos especies; es decir que cada concentración de plomo tiene acción diferente; apreciación que concuerda con los reportes de Iannacone y Alvarino⁹. Según estos investigadores, las concentraciones de plomo ejercen su propio efecto sobre el crecimiento de las plántulas y demuestran diferentes respuestas para cada concentración, lo cual puede afectar la velocidad de división celular y en muchos casos la muerte.

La comparación de promedios, siguiendo la metodología de Mínima Diferencia Significativa Honesta (Tabla 2), ha sido procesada luego de demostrar la diferencia significativa entre grupos de datos con los análisis de varianza; es decir, que sabiendo que los tratamientos (diferentes concentraciones) tienen comportamiento diferente en la radícula e hipocotilo. Se trata así de indicar la diferencia de uno o todos los tratamientos a través de la comparación de promedios, demostrando que las concentraciones de 0 a 12.5 ppm tienen el mismo efecto. Sin embargo, las concentraciones de 25 y 50 ppm, tiene efecto similar, lo que lleva a deducir que el plomo causa efecto en la germinación y crecimiento de la radícula e hipocotilo a concentraciones superiores a 12.5 ppm. Estos resultados concuerdan con los reportes de Cala y Kunimine³ en sus estudios del efecto de plomo en el entorno de una planta de reciclaje de

bacterias ácidas y los reportes para "lechuga"^{2,7}.

Así mismo, al comparar la longitud de la radícula e hipocotilo se demuestra diferencia significativa y según los datos encontrados se asume que a medida que aumentan las concentraciones de plomo, disminuye la longitud de ambos caracteres biológicos en ambas especies. Sin embargo, al realizar la comparación entre especies demuestra diferencias significativas, lo que nos lleva a deducir que la respuesta es independiente entre ellas y que puede estar relacionado con los patrones genéticos de la especie, como los sostienen los estudios de *Handbook of ecotoxicology*, reportados por Calow⁵.

Los análisis de regresión lineal simple, de acuerdo al método de los mínimos cuadrados, nos permite asegurar la existencia de causa y efecto; es decir, dar respuesta a la interrogante de que si el plomo es causante en la disminución de la germinación y crecimiento de la semilla de *R. sativus* y *B. vulgaris*. Esto indica que a mayor concentración de plomo, existe mayor efecto de inhibición de germinación y disminuye el crecimiento de las partes de la planta, lo cual se puede deducir en el efecto de toxicidad, como lo refieren los estudios Iannacone y Alvariano⁹.

CONCLUSIONES

Existe efecto toxicológico del plomo en el crecimiento radicular e hipocotilo de *R. sativus* y *B. vulgaris*.

A mayor concentración de plomo, existe mayor efecto en la longitud de radícula e hipocotilo en *R. sativus* y *B. vulgaris*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ramírez, P. y Mendoza, A. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. Secretaría del medio ambiente y Recursos naturales. México. Instituto Nacional de Ecología. Delegación Tlalpan, 2008:18-36.
2. Navarro, A., Arruetay, R., Maldonado, M. Determinación del efecto de diferentes compuestos a través de ensayos de fitotoxicidad usando semillas de lechuga, escarola y achicoria. Rev. Toxicol. 23:125 – 129. Instituto de Biotecnología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina. 2006.
3. Cala, V. y Kunimine, Y. Distribución de plomo en suelos contaminados en el entorno de una planta de reciclaje de baterías ácidas. Rev. Int. Contam. Ambient. 19 (3) 109-115. Departamento de Química Agrícola, Geología y Geoquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid. España. 2003.
4. Rosa, C., Sierra, M., y Radetski, C. Use of plant tests in the evaluation of textile flourentoxicity. Ecotoxicol. Environ. Res. 2:56-61. 1999.
5. Calow, P. Handbook of ecotoxicology. Vol. I. 478p. Blackwell Science Ltd., London, England. 1993.
6. Prieto, J., González, C., Román, A., Prieto F. Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 10: 29 – 44. Centro de Investigaciones Química de la Universidad Autónoma del estado de Hidalgo. México. 2009.
7. Castillo, G., Sobreno, M., Ronco, A. Ensayo de Toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México 2004: 71-79.
8. Rand, G. y Petrocelli, S. Fundamentals of Aquatic Toxicology. Methods and applications. Taylor and Francis, Nueva York. 1985: 666.

9. Iannacone J. y Alvariño L. Efecto Ecotoxicológico de tres Metales Pesados Sobre el Crecimiento Radicular de Cuatro Plantas Vasculares. *Agricultura Técnica (Chile)* 65(2):198-203. Universidad Nacional Federico Villareal, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática. Lima, Perú. 2005.
10. Navarro, A., Arruetay, R., Maldonado, M. Determinación del efecto de diferentes compuestos atreves de ensayos de fitotoxicidad usando semillas de lechuga, escarola y achicoria. *Rev. Toxicol.* 3:12-129. Instituto de Biotecnología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Tucumán, Argentina. 2006.
11. Quevedo, H. Métodos estadísticos para la ingeniería ambiental y la ciencia. Instituto de ingeniería y tecnología. Universidad Autónoma de CD. Juárez. México. 2006.
12. Días V. Metodología de la Investigación Científica y Bioestadística, para Médicos, Odontólogos y Estudiantes de Ciencias de la Salud. Universidad FinisTerra. 2006: 132.
13. Little, T y Hills, J. Métodos estadísticos para la legislación en la Agricultura. Editorial Trillas. México. 1976.
14. Milton J. Estadística para biología y ciencias de la salud. Tercera edición. España. 2004.
15. Calzada, J. Métodos Estadísticos para la Investigación. Segunda edición. Perú. 1964: 1

CORRESPONDENCIA:

Brenda Nureña-Velásquez

Dirección: Calle Filadelfia #345 Interior. 18

Urb. Santa Isabel

Teléfono celular: 949020932

E-mail: bnuve89@gmail.com