Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Caracterización fisicoquímica y toxicidad *in vitro* de la oleorresina de *Copaifera reticulata* "copaiba"

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTORES

Jorge André HARO CALVO

Karla Vanessa MORENO MORALES

ASESORES

Mg. Mónica Guadalupe RETUERTO FIGUEROA

Eva RAMOS LLICA (Coasesora)

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Haro J, Moreno K. Caracterización fisicoquímica y toxicidad *in vitro* de la oleorresina de Copaifera reticulata "copaiba" [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2021.

Metadatos complementarios

Datos de autor 1	
Nombres y apellidos	Jorge André Haro Calvo
DNI	72929095
URL de ORCID	-
Datos de autor 2	
Nombres y apellidos	Karla Vanessa Moreno Morales
DNI	70586247
URL de ORCID	-
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Mónica Guadalupe Retuerto Figueroa
DNI	09481617
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8706-2789
Datos de coasesor	
Nombres y apellidos	Eva Ramos Llica
DNI	29735069
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8594-5537
Datos de investigación	
Línea de investigación	Recursos y productos naturales con potencial farmacéutico, alimentario, cosmético y terapéutico.
Grupo de investigación	Farmacognosia y Medicina Tradicional
Agencia de financiamiento	Perú. INNOVATE PERÚ. Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad del Ministerio de la Producción. 092-IDIBIO-2018
Ubicación geográfica de la investigación	Edificio: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Laboratorio de Farmacognosia y Medicina Tradicional País: Perú

	Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Cercado de Lima Calle: Jr. Puno Nº1002 Latitud: -12.05572 Longitud: -77.02324
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Enero 2020 - marzo 2021
URL de disciplinas OCDE	Toxicología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.07

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Caracterización fisicoquímica y toxicidad *in vitro* de la oleorresina de *Copaifera reticulata* "copaiba"

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

KARLA VANESSA MORENO MORALES Y
JORGE ANDRÉ HARO CALVO

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado Evaluador, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

17 (DIECISIETE) SOBRESALIENTE

---

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

JURADO EVALUADOR (R.D. N.° 000539-2021-D-FFB/UNMSM)

- Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz
- Dr. César Augusto Canales Martínez
- Dr. Edgar Robert Tapia Manrique
- Mg. Oscar Herrera Calderón

Lima, 30 de setiembre de 2021.

UNMSM
Firmado digitalmente por FELIX VELIZ Luis Miguel Visitacion FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 30.09.2021 17:04:56 -05:00

Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz
Presidente

INFORMACIÓN GENERAL	
Título del Proyecto	Caracterización fisicoquímica y toxicidad *in vitro* de la oleorresina de *Copaifera reticulata* "copaiba"
Área de investigación	Recursos naturales
Líneas de Investigación	Recursos y productos naturales con potencial farmacéutico, alimentario, cosmético y terapéutico.
Ubicación geográfica donde se desarrolla la investigación (incluir localidades y/o coordenadas geográficas)	Iquitos y Lima (UNMSM - Facultad de Farmacia y Bioquímica)
Institución que financia si corresponde	Apoyo INNOVATE PERU-VRIP
Año o rango de años que abarcó	Enero 2020 – marzo 2021
DATOS DEL TESISTA	
Apellidos y Nombres	Haro Calvo, Jorge André
Número de matrícula	14040079
Iindicar si es egresado o si aún está cursando estudios, de ser así especificar el año de estudios	Egresado
Código ORCID (opcional)	
DATOS DEL TESISTA	
Apellidos y Nombres	Moreno Morales, Karla Vanessa
Número de matrícula	14040101
Indicar si es egresado o si aún está cursando estudios, de ser así especificar el año de estudios	Egresado
Código ORCID (opcional)	
DATOS DEL ASESOR I	
Apellidos y nombres	RETUERTO FIGUEROA, MONICA GUADALUPE
Código docente: 0A2036	Categoría: Auxiliar Clase: TC
Máximo grado alcanzado	Magister
Código ORCID (obligatorio)	0000-0001-8706-2789
Título profesional	QUIMICO FARMACEUTICO
Departamento Académico al que pertenece	Departamento Académico de Farmacología, Bromatología y Toxicología
Instituto de Investigación al que pertenece	CLEIBA
Grupo de investigación al que pertenece	Farmacognosia y Medicina Tradicional

Indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	Miembro titular
DATOS DEL ASESOR II	
Apellidos y nombres	RAMOS LLICA, EVA
Código docente: 0A1904	Categoría: Auxiliar Clase: TC
Máximo grado obtenido	Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Bachiller en Maestría en Recursos Vegetales y Terapéuticos
Título profesional	Química Farmacéutica
Código ORCID (obligatorio)	0000-0001-8594-5537
Centro laboral (si es que fuera externo a la UNMSM)	
Departamento Académico al que pertenece	Departamento Académico de Farmacología, Bromatología y Toxicología
Instituto de Investigación al que pertenece	Instituto de Investigación en Recursos Naturales y Terapéuticos “Juan de Dios Guevara”
Grupo de investigación al que pertenece	Farmacognosia y Medicina Tradicional
Indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	Miembro titular

DEDICATORIA

A Dios, primero que nada, por permitirme culminar esta tesis con salud.
A mis padres Jessy y Urbano por ser mis maestros de vida.
A mi hermano Gerald por inspirarme y guiarme en el camino de la ciencia.
A mi abuelita Olga que desde el cielo sigue siendo mi fuente de fortaleza y resiliencia.

Moreno Morales, Karla Vanessa

DEDICATORIA

A mis padres Jorge y Yuli por su gran ayuda en cada una de las etapas de mi crecimiento personal y académico.

A mis tíos Rómulo, Armando, Nely, Rafael por su gran apoyo en mi etapa universitaria.

A cada una de las personas que logran cumplir sus metas en la vida.

Haro Calvo, Jorge André

AGRADECIMIENTOS

A los profesores por compartir sus conocimientos y consejos con nosotros en los años de formación académica.

A nuestras asesoras Mg. Q.F. Guadalupe Retuerto Figueroa y Q.F. Eva Ramos Llica por su confianza, disposición y apoyo en la elaboración de la presente tesis.

Al Bachiller Jossimar Huamani Tarazona por su apoyo en la realización de la parte experimental.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1
1.1 HIPÓTESIS 2
1.2 OBJETIVOS 2
2. MARCO TEÓRICO 3
2.1. Aspectos generales 3
2.1.1 Clasificación taxonómica 3
2.1.2 Distribución geográfica 3
2.1.3 Desarrollo del árbol de *Copaifera reticulata* 4
2.1.4 Oleorresina de "copaiba" 4
2.1.4.1 Composición química 6
2.1.4.2 Propiedades farmacológicas 9
2.1.4.3 Usos tradicionales 11
2.2 Toxicidad 12
2.2.1 Toxicidad aguda 12
2.2.2 Toxicidad crónica 12
2.2.3 Efecto tóxico 12
2.3 Curva de relación dosis – respuesta 12
2.4 Marcadores de toxicidad 13
2.5 Toxicidad *in vitro* 14
2.5.1 Bioensayos 14
2.5.2 Citotoxicidad 15
2.5.3 Tóxico de referencia 15
2.6 Bioensayos para evaluar la toxicidad 16
2.6.1 Toxicidad en *Artemia salina* 16
2.6.1.1 *Artemia salina* 16
2.6.1.2 Ciclo de vida 17

2.6.1.3 Bioensayo de toxicidad en *Artemia salina*..... 19
2.6.2 Toxicidad en *Lactuca sativa* 20
2.6.2.1 *Lactuca sativa*..... 20
2.6.2.2 Etapas en la germinación..... 20
2.6.2.3 Bioensayo de toxicidad en *Lactuca sativa*..... 22
3. METODOLOGÍA 23
3.1 Materiales y métodos..... 23
3.2 Tipo y diseño de Investigación..... 24
3.3 Extracción e identificación taxonómica..... 24
3.4 Características organolépticas..... 24
3.5 Caracterización fisicoquímica de la oleorresina de "copaiba"..... 24
3.5.1 pH 24
3.5.2 Miscibilidad 24
3.5.3 Índice de acidez 25
3.5.4 Índice de peróxido 25
3.5.5 Índice de saponificación 26
3.5.6 Índice de yodo 26
3.5.7 Índice de refracción 27
3.5.8 Densidad 27
3.5.9 Viscosidad 28
3.5.10 Humedad y materia volátil 28
3.5.11 Tamizaje fitoquímico 28
3.6 Toxicidad en *Artemia salina*..... 29
3.6.1 Preparación del agua de mar artificial (agua salina) 29
3.6.2 Cultivo de los huevos de *Artemia salina* 29
3.6.3 Preparación de la muestra 29
3.6.4 Preparación de los controles (positivo y negativo) 30

3.6.5 Desarrollo del bioensayo 30
3.6.6 Cálculo del % de Mortalidad y CL_{50} 31
3.7 Toxicidad en *Lactuca sativa*..... 32
3.7.1 Preparación de la muestra 32
3.7.2 Preparación de los controles (positivo y negativo) 32
3.7.3 Desarrollo del bioensayo 32
3.7.4 Cálculo de los indicadores de toxicidad y procesamiento estadístico 33
4. RESULTADOS 35
4.1 Características organolépticas..... 35
4.2 Caracterización fisicoquímica..... 35
4.2.1 pH 35
4.2.2 Miscibilidad 35
4.2.3 Índice de acidez 35
4.2.4 Índice de peróxido 36
4.2.5 Índice de saponificación 36
4.2.6 Índice de yodo 37
4.2.7 Índice de refracción 37
4.2.8 Densidad 37
4.2.9 Viscosidad 38
4.2.10 Humedad y materia volátil (HMV) 38
4.2.11 Tamizaje fitoquímico 38
4.3 Toxicidad en *Artemia salina*..... 39
4.3.1 Control positivo 39
4.3.2 Oleorresina de “copaiba” 40
4.4 Toxicidad en *Lactuca sativa*..... 42
4.4.1 Control positivo 42
4.4.2 Oleorresina de “copaiba” 46

4.4.3 Fitotoxicidad 54
5. DISCUSIÓN 56
6. CONCLUSIONES 59
7. RECOMENDACIONES 60
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 61
9. ANEXOS 68

ABREVIATURAS

CI_{50}: Concentración letal media

NOEC: *No observed effect concentration*

LOEC: *Lowest observed effect concentration*

AOAC: *Association of official analytical chemists*

USP: *United states pharmacopeia*

EPA: *Environmental protection agency*

DMSO: Dimetilsulfóxido

CV: Coeficiente de variación

ppt: partes por trillón

ppm: partes por millón

µg: microgramos

µL: microlitros

mg/L: miligramos por litro

meq: miliequivalentes

IC: Intervalo de confianza

SR: Solución reactivo

SV: Solución volumétrica

FIGURAS

Figura 1. Regiones donde se encuentra el género *Copaifera*…….. 4

Figura 2. Estructuras de algunos sesquiterpenos encontrados en la oleorresina de copaiba……7

Figura 3. Estructuras de algunos diterpenos encontrados en la oleorresina de copaiba……8

Figura 4. Gráficas de toxicidad dosis-respuesta……...13

Figura 5. Organismos usados en bioensayos……15

Figura 6. *Artemia salina*……16

Figura 7. Distribución de *Artemia salina* a nivel mundial……17

Figura 8. Ciclo de vida de *Artemia salina*……...18

Figura 9. *Artemia salina* en estadio naúplio……...18

Figura 10. Formas adultas de *Artemia salina*…… 19

Figura 11. Curva del proceso de germinación de semillas……..21

Figura 12. Plántula de *Lactuca sativa*……21

Figura 13. Proceso de germinación de *Lactuca sativa*…… 21

Figura 14. Flujograma del trabajo experimental……24

Figura 15. Curva de % de mortalidad frente a concentración de $K_2Cr_2O_7$……40

Figura 16. Curva de % de mortalidad frente a concentración de oleorresina…….. 42

Figura 17. Curva % Germinación frente a concentración de $ZnSO_4$……44

Figura 18. Efecto de las concentraciones de $ZnSO_4$ en semillas de *Lactuca sativa*…….. 45

Figura 19. Curva % Germinación semillas de *Lactuca sativa* frente a concentración de oleorresina…….. 48

Figura 20. Curva % Inhibición semillas de *Lactuca sativa* frente a concentración de oleorresina……49

Figura 21. Efecto de las concentraciones de oleorresina de copaiba en semillas de *Lactuca sativa*……..50

Figura 22. Promedio de elongación de la radícula (IC 95%) con respecto a cada concentración de oleorresina de copaiba……51

Figura 23. Promedio de elongación del hipocótilo (IC 95%) con respecto a cada concentración de oleorresina de copaiba……52

Figura 24. Porcentaje de Inhibición/Estimulación en la elongación de la radícula con respecto a cada concentración de oleorresina de copaiba…….. 53

Figura 25. Porcentaje de Inhibición/Estimulación en la elongación del hipocótilo con respecto a cada concentración de oleorresina de copaiba……. 53

Figura 26. Efectos fitotóxicos producidos por la oleorresina de copaiba a diferentes concentraciones…….. 55

TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Copaifera reticulata*…… 3

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Artemia salina*……16

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Lactuca sativa*..... 20

Tabla 4. Niveles de miscibilidad……...25

Tabla 5. Ensayos de tamizaje fitoquímico de la oleorresina de copaiba……...29

Tabla 6. Parámetros en la prueba de toxicidad con *Artemia salina*……...31

Tabla 7. Clasificación de toxicidad según el CL_{50}…… 32

Tabla 8. Factores en la prueba de toxicidad con *Lactuca* sativa……33

Tabla 9. Características organolépticas de la oleorresina de copaiba…….. 35

Tabla 10. Miscibilidad de la oleorresina de copaiba en diferentes solventes……...35

Tabla 11. Índice de acidez de la oleorresina de copaiba…… 36

Tabla 12. Índice de peróxido de la oleorresina de copaiba…….. 36

Tabla 13. Índice de saponificación de la oleorresina de copaiba……36

Tabla 14. Índice de yodo de la oleorresina de copaiba…… 37

Tabla 15. Índice de refracción de la oleorresina de copaiba……...37

Tabla 16. Densidad de la oleorresina de copaiba…… 37

Tabla 17. Viscosidad de la oleorresina de copaiba…….. 38

Tabla 18. Viscosidad de la oleorresina de copaiba…….. 38

Tabla 19. Tamizaje fitoquímico de la oleorresina de copaiba…… 38

Tabla 20. Porcentaje de mortalidad producido por dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)…….. 39

Tabla 21. Concentración letal media del dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)…… 40

Tabla 22. Porcentaje de mortalidad producido por oleorresina de copaiba……. 41

Tabla 23. Concentración letal media de oleorresina de copaiba…… 42

Tabla 24. Valores de porcentaje de germinación (%G) y porcentaje de inhibición (%I) en semillas de *Lactuca sativa* por concentración de $ZnSO_4$……43

Tabla 25. Concentración letal media del sulfato de zinc ($ZnSO_4$)…….. 44

Tabla 26. Valores de elongación de radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa* por concentración de $ZnSO_4$…… 46

Tabla 27. Porcentaje de germinación e inhibición producido por oleorresina de copaiba en semillas de *Lactuca sativa*…… 47

Tabla 28. Valores de NOEC Y LOEC según análisis de Dunnett ($p<0,05$)…….. 48

Tabla 29. Valores de elongación de radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa* por concentración de oleorresina de “copaiba”……50

Tabla 30. Porcentaje de Inhibición/Estimulación para radícula e hipocótilo con respecto al control……...52

RESUMEN

La oleorresina de “copaiba” es un exudado que se obtiene del tronco de árboles pertenecientes a la especie *Copaifera sp.* El objetivo principal del presente trabajo de investigación fue caracterizar fisicoquímicamente y evaluar la toxicidad *in vitro* de la oleorresina de *Copaifera reticulata* “copaiba”. La caracterización fisicoquímica se realizó según la metodología descrita en la USP 42 – NF 37 para grasas y aceites, los constituyentes químicos se determinaron mediante tamizaje fitoquímico y la evaluación de la toxicidad *in vitro* se realizó en *Artemia salina* y *Lactuca sativa*. La caracterización fisicoquímica de la oleorresina de *Copaifera reticulata* “copaiba” fue: Índice de acidez 40 ± 1,13 mg NaOH/g, Índice de peróxido 2,51 ± 0,07 meq O_2/kg, índice de saponificación 115,16 ± 2,8 mg KOH/g, índice de yodo 98,87 ± 2,3 cg I_2/g, índice de refracción 2,504, pH 4,5, viscosidad 283,1 ± 8,5 cp, humedad y materia volátil 45,52 ± 1,68 %, densidad 0,9478 ± 0,0017 g/mL, miscible en cloroformo y dimetilsulfóxido, el tamizaje fitoquímico reveló la presencia predominante de azúcares reductores, terpenos y flavonoides. En la evaluación de toxicidad la oleorresina de “copaiba” tuvo un efecto altamente tóxico para *Artemia salina* (CI_{50}= 44,42 ppm), en el caso de *Lactuca sativa* la oleorresina tuvo un efecto tóxico (letal) a partir de la concentración de 1600 ppm y presentó efectos fitotóxicos (subletal) como: necrosis en hipocótilo y cotiledón, crecimiento de doble raíz, ensortijamiento de la radícula, germinación anormal (cotiledón sin radícula) y disminución de los pelos absorbentes. En conclusión, la oleorresina de “copaiba” (*Copaifera reticulata*) presentó toxicidad en ambos modelos de bioensayos.

Palabras clave: *Copaifera reticulata*, “copaiba”, oleorresina, caracterización fisicoquímica, toxicidad, *Artemia salina*, *Lactuca sativa*.

SUMMARY

“Copaiba” oleoresin is an exudate obtained from the trunk of trees belonging to the species *Copaifera sp*. The main objective of this research work was to physicochemically characterize and evaluate the in vitro toxicity of *Copaifera reticulata* "copaiba" oleoresin. The physicochemical characterization was performed according to the methodology described in USP 42 - NF 37 for fats and oils, the chemical constituents were determined by phytochemical screening and the in vitro toxicity evaluation was performed in *Artemia salina* and *Lactuca sativa*. The physicochemical characterization of *Copaifera reticulata* "copaiba" oleoresin was: Acid value 40 ± 1,13 mg NaOH/g, peroxide value 2,51 ± 0,07 meq O_2/kg, saponification value 115,16 ± 2,8 mg KOH/g, iodine value 98,87 ± 2,3 cg I_2/g, refractive index 2,504, pH 4,5, viscosity 283,1 ± 8,5 cp, moisture and volatile matter 45,52 ± 1,68 %, density 0,9478 ± 0,0017 g/mL, miscible in chloroform and dimethylsulfoxide, phytochemical screening revealed the predominant presence of reducing sugars, terpenes and flavonoids. In the toxicity evaluation, “copaiba” oleoresin had a highly toxic effect on *Artemia salina* (Cl_{50}= 44,42 ppm); in the case of *Lactuca sativa*, oleoresin had a toxic (lethal) effect at a concentration of 1600 ppm and presented phytotoxic effects (sublethal) such as necrosis in hypocotyl and cotyledon, double root growth, radicle curling, abnormal germination (cotyledon without radicle) and reduction of absorbing hairs. In conclusion, "copaiba” oleoresin (*Copaifera reticulata*) showed toxicity in both bioassay models.

Keywords: *Copaifera reticulata*, "copaiba", oleoresin, physicochemical characterization, toxicity, *Artemia salina*, *Lactuca sativa*.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los productos principales de los árboles del género *Copaifera* es la oleorresina de “copaiba” llamado comúnmente "aceite de copaiba", el cual se extrae de árboles adultos. Estudios de mercado en Perú indican que existen dos empresas que exportan productos a partir de aceite de “copaiba” una de ellas abarca un 47 % del total seguida en casi la mitad por la otra con un 24,2 %. A nivel internacional Brasil es el mayor y único exportador, junto con Perú, de aceite de “copaiba” para el mundo[1].

La oleorresina de “copaiba” presenta diversas propiedades medicinales como antiinflamatorio, antiséptico urinario, cicatrizante, gastroprotector, antitumoral, antimicrobiano, etc[2]. Sin embargo, en muchos de los casos el uso de la oleorresina se da de manera tópica, vía oral en forma de gotas y en los últimos de años es un producto de preferencia para la industria cosmética lo cual hace necesarios estudios de toxicidad de este derivado para prevenir riesgos en la salud de las personas[2,3].

En las pruebas toxicológicas iniciales del tipo preclínico se utilizan comúnmente ratones lo cual genera un costo elevado y produce un sufrimiento para este tipo de animales, por lo que se ha reducido la cantidad de animales utilizados y se buscó perfeccionar las metodologías existentes para atenuar el dolor y estrés que se les produce. En la actualidad se utilizan técnicas de toxicidad in vitro las cuales proveen una serie de ventajas al ser menos costosas, altamente reproducibles y se ha demostrado que guardan correlación con los estudios in vivo[4].

Debido a la poca información de estudios de toxicidad realizados a la oleorresina de “copaiba”, el presente trabajo describe la evaluación de toxicidad *in vitro* de la oleorresina en dos especies de laboratorio: *Artemia salina* y *Lactuca sativa*, también se describen las características fisicoquímicas (Índice de acidez, Índice de yodo, Índice de saponificación, Índice de peróxido, Índice de refracción densidad, contenido de humedad, viscosidad, pH) de la oleorresina según la metodología de la USP 42 – NF 37.

1.1 HIPÓTESIS

- La oleorresina de *Copaifera reticulata* “copaiba” de Iquitos presenta toxicidad frente a *Artemia salina* y *Lactuca sativa*.

1.2 OBJETIVOS

Objetivo general

- Caracterizar fisicoquímicamente y evaluar la toxicidad *in vitro* de la oleorresina de *Copaifera reticulata* “copaiba”.

Objetivos específicos

- Determinar las características fisicoquímicas de la oleorresina de *Copaifera reticulata* “copaiba”.
- Evaluar la toxicidad en *Artemia salina* de la oleorresina de *Copaifera reticulata* “copaiba”.
- Evaluar la toxicidad de la oleorresina de *Copaifera reticulata “copaiba”* en semillas de *Lactuca sativa.*

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Aspectos generales

2.1.1 Clasificación taxonómica

De acuerdo con el certificado de taxonomía (Anexo 1) según la nomenclatura de Cronquist, la clasificación es la siguiente:

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Copaifera reticulata*

Reino	*Plantae*
Clase	*Magnoliophyta*
Sub Clase	*Rosidae*
Orden	*Fabales*
Familia	*Fabaceae*
Sub Familia	*Caesalpinioidea*
Género	***Copaifera***
Especie	***Reticulata*** **Ducke**
Nombre científico	***Copaifera reticulata*** **Ducke**
Nombre común	"*copaiba*"

2.1.2 Distribución geográfica

La especie en estudio pertenece a familia *Fabaceae*, cuyo género *Copaifera* se distribuye por América central, América meridional, África occidental y también Asia. En América Latina, las especies se encuentran en la región que se extiende desde México hasta el norte de Argentina. Son encontradas en gran cantidad en las regiones del Amazonas y el Medio Oeste de Brasil. De un total de 28 especies, 16 se encuentran en la cuenca del amazonas[5]. Siendo las especies que más destacan: *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne (Amazonía*), C. officinalis* L. (norte de Amazonas, Roraima, Colombia, Venezuela y San Salvador), *C. langsdorffii* Desf. (Brasil, Argentina y Paraguay), *C. coriacea* Mart. (Bahía), *C. guianensis* Desf. (Guyana), *C. confertiflora* Bth (Piauí), *C. cearensis* Huber ex Ducke (Ceará)[6]. Dicho árbol se ha adaptado a diversos tipos de ambientes y se encuentra en bosques, orillas de lagos y ríos de la cuenca amazónica[7] (Figura 1).



Figura 1. Regiones donde se encuentra el género *Copaifera*. Fuente: Veiga [6]

2.1.3 Desarrollo del árbol de *Copaifera reticulata*

Son árboles de crecimiento lento, llegando de los 25 a 40 metros de altura, la cual es alcanzada en la cuenca amazónica. Puede llegar a una edad de hasta 400 años[5,7].

Respecto a su descripción morfológica, posee un tronco rugoso y oscuro con un diámetro promedio de 0,4 metros. Sus hojas son pecioladas y alternas, los frutos poseen una semilla ovoide rodeada por un arilo colorido, las flores con pétalos son pequeñas, hermafroditas y se disponen en panículas axilares. La fructificación y floración ocurre a partir de los 5 años, en el Amazonas la floración se da entre enero y abril, la fructificación se da entre marzo y agosto, pudiendo haber variaciones en ambos rangos, según la región, el clima y la especie. Llegando a existir regiones en las que la floración y fructificación no se da en todos años[5,6,7].

La “copaiba” tiene una densidad poblacional muy baja, menor a 0,4 individuos por hectárea, y esto debido a que las plántulas recién germinadas necesitan luz solar para crecer y desarrollarse, lo cual es impedido por los grandes árboles característicos de la selva amazónica, solo unas pocas plántulas sobreviven, y ello gracias a la caída natural de ramas o árboles, lo cual permite el paso de la luz del sol[6].

2.1.4 Oleorresina de “copaiba”

La designación correcta para el aceite de “copaiba” es oleorresina, debido a que se comporta como un exudado que presenta ácidos resinosos y compuestos volátiles.

Esta oleorresina se encuentra en canales secretores ubicados en todas las partes del árbol, dichos canales se forman por espacios intercelulares expandidos (meato) intercomunicados en el meristemo. En el tronco es donde encontramos el núcleo principal de este dispositivo secretor, en ese punto los canales secretores, se distribuyen en bandas concéntricas en las capas de crecimiento delimitadas por el parénquima terminal, convergen con un trazado irregular, en capas leñosas, generalmente sin comunicarse. Es considerada como producto de desecho del árbol y funciona como protección natural frente a animales, bacterias y hongos[6].

Dicha oleorresina es exportada desde hace mucho a países desarrollados como Estados Unidos, Francia, Alemania y Reino Unido, siendo usada en líneas de cosméticos orientadas hacia el consumidor verde, como *The Body Shop* y Natura[5].

Entre las características fisicoquímicas, la baja viscosidad y acidez de la oleorresina de "copaiba" son importantes para el procesamiento farmacéutico; en cambio, la alta viscosidad y acidez son importantes para el uso cosmético, como la producción de jabones, champús y acondicionadores[6].

Se describen métodos para la obtención tradicional que dejan al árbol inutilizable y causan su muerte. Uno de ellos es la obtención mediante cortes profundos de hacha en el tronco, haciendo una incisión en V, colocando los vasos apropiados debajo para recibir la oleorresina y recolectar hasta su agotamiento. Otro método es mediante el corte del de una grieta en el árbol, y en algunos casos de todo el tronco con una motosierra, siendo este sistema muy destructivo. La única práctica de recolección no agresiva es la que se realiza a través de una incisión con una broca a una profundidad que depende del diámetro del árbol. El lugar de la perforación puede variar desde unos pocos centímetros sobre el suelo hasta aproximadamente 1 metro de altura del tronco. Después de la recolección, el orificio se sella con arcilla para evitar la infestación del árbol por hongos o termitas. La arcilla puede ser removida fácilmente para permitir realizar otras recolecciones en el mismo tronco, en la cual se obtiene una cantidad igual o incluso mayor que la de la primera remoción[5,6].

El volumen producido puede variar desde cantidades ínfimas hasta los 30 litros al año según describen los productores locales[5]. Actualmente, se considera que la productividad media oscila entre 0,3 y 3 L por árbol en cada colecta[7]. Esto varía según las condiciones ambientales de crecimiento del árbol, la época del año, sus características genéticas, y además la presencia de termitas y agujeros[8]. Las

estimaciones de producción también pueden variar en relación con el tipo de gestión de la retirada de la oleorresina y el período entre extracciones consecutivas[5,6].

2.1.4.1 Composición química

Se reconoce que las características químicas de la oleorresina son variables en las diferentes especies de "copaiba", sin embargo, no se ven relacionadas con variables morfométricas, ambientales, ni con la frecuencia de recolección[9].

En una revisión se enumeró 72 sesquiterpenos (Figura 2) y 28 diterpenos (Figura 3) reportados en la literatura sobre las oleorresinas de "copaiba" de diferentes especies hasta el año 2002, los diterpenos descritos tienen tres tipos de esqueletos: caurano, labdano y clerodano[6]. Desde entonces se han publicado nuevos diterpenos y otros terpenoides no descritos. Se identificaron alrededor de 38 sesquiterpenos; de los cuales 35 se encontraron en oleorresinas de *C. duckei*, *C. paupera*, *C. piresii*, *C. pubiflora* y *C. reticulata*: ciclosativeno, 7-episesquitujeno, cipereno, cis-α-bergamoteno, trans-α-bergamoteno, (Z)-β-farneseno, guaya-6,9-dieno, epi-β-santaleno, (E)-β-farneseno, sesquisabineno, 4,5-di-epi-aristolochene, germacreno A, trans-cadin-1 (6), 4-dieno, β-chamigreno, cis-β-guaieno, viridifloreno, γ-gurjunene, γ-curcumeno, epi-cubebol, valenciano, trans-β-guaieno, (E,E)-α-farneseno, (Z)-α-bisaboleno, α-bulneseno, β-curcumeno , (Z) -γ-bisaboleno, 7-epi-α-selineno, trans-cadina-1 (2), 4-dieno, (E)-γ-bisaboleno, globulol, epóxido de humuleno II, epicubenol, cubenol, epi-α-murolol y epi-β-bisabolol. En cuanto a los diterpenos, se identificaron al menos otros 15 diterpenos no descritos en el estudio del 2002, incluidos cuatro con esqueletos de tipo kaurano: ent-kaur-16-eno, ent-kaur-16-en-19-al, 19-nor-kaur-16-en-4α-ol y ent-kaur-16-en-19-ol; tres de esqueleto de tipo clerodano y ocho con esqueletos de tipo labdano. Incluso con la gran variación que suele presentar la composición química de estas oleorresinas, el β-cariofileno, considerado un marcador químico de estas oleorresinas suele ser el constituyente mayoritario[10,11].

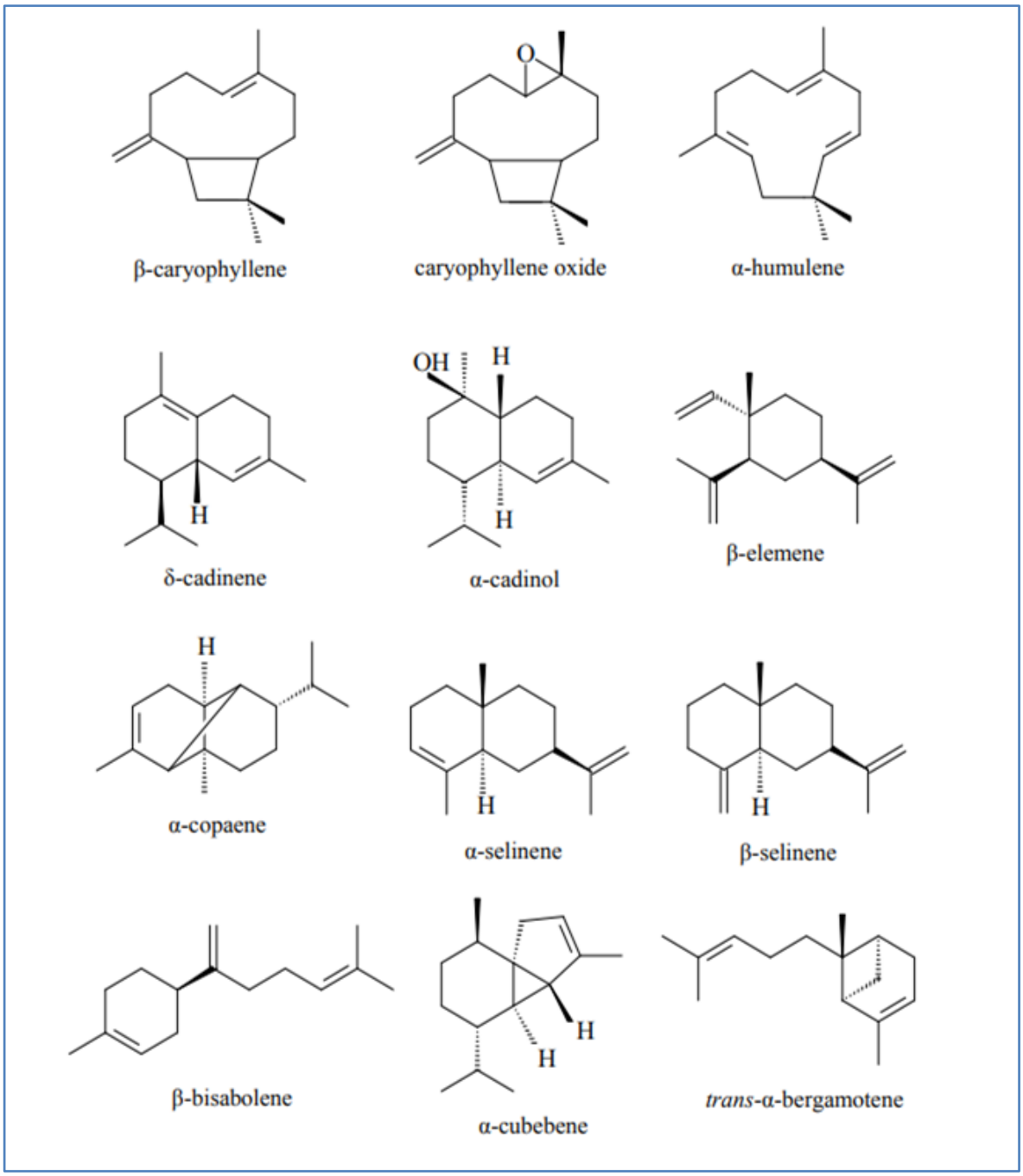


Figura 2. Estructuras de algunos sesquiterpenos encontrados en la oleorresina de copaiba. Fuente: Oliveira *et al*[10]

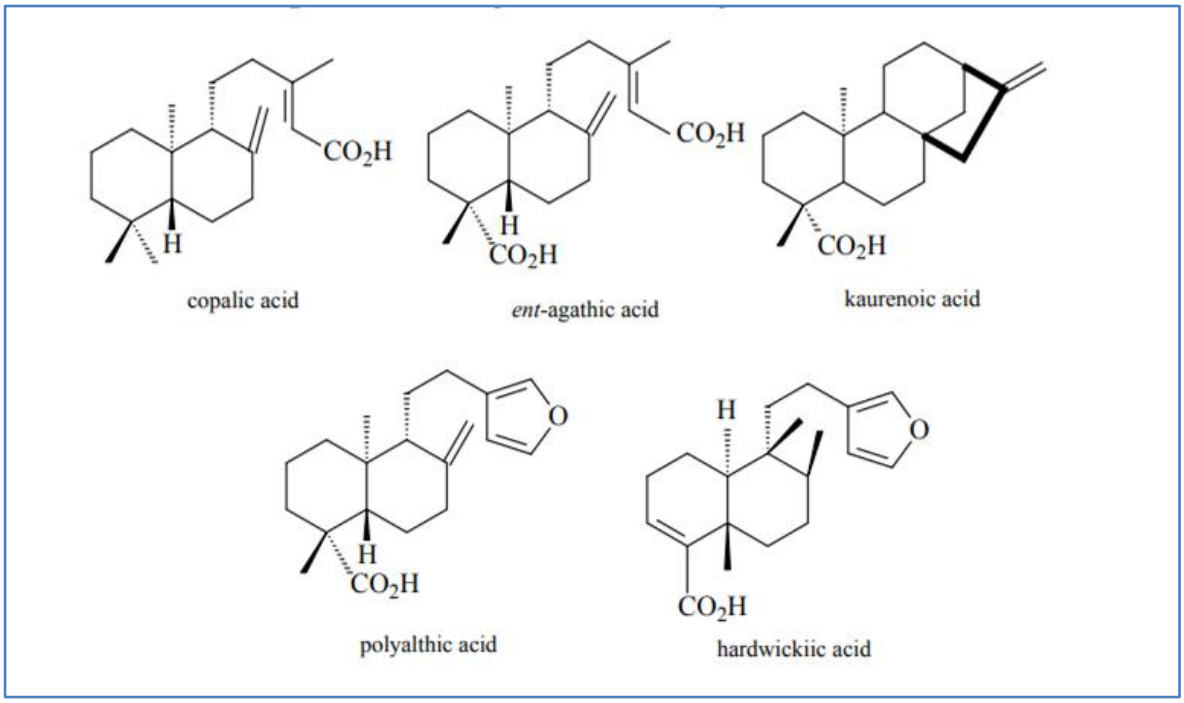


Figura 3. Estructuras de algunos diterpenos encontrados en la oleorresina de copaiba. Fuente: Oliveira *et al*[10]

Se han descrito los componentes de la oleorresina de *Copaifera reticulata* hallados mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear, entre los sesquiterpenos identificados se encuentran al α-elemeno, α-cubebeno, α-copaeno, α-cedreno, calareno, longifoleno, β-cariofileno, α-bergamoteno, β-sesquifelandreno, α-humuleno, α-curcumeno, γ-amorfeno, germacreno D, germacreno B, β-bisaboleno, γ-cadineno, δ-cadineno, α-cadineno, α-selineno, β-vetiveno, multigenol, oxido cariofileno, cedrol, cadaleno, α- cadinol, α-bisabolol; mientras entre los diterpenos identificados se encuentran: 16-kaureno, metil-kaurenoato, metil-copalato, metil- colavenato, metil-clorequinato, dimetil- agatato, metil-3-acetoxi-copalato[11].

Mientras que los análisis cromatográficos de oleorresina de *Copaifera reticulata* revelaron que la fracción sesquiterpénica compuesta en su mayoría por β-bisaboleno, trans-α-bergamoteno, β-selineno, α-selineno, estos son responsables del aroma y también de la actividad antiinflamatoria de la oleorresina[6,12]. Además otro de sus principales componentes identificados son los denominados ácidos terpénicos entre los que destacan el ent-agatico-15-metil éster, el ent-copalico y el ent-polialitico[12].

La industria cosmética y de perfumería tienen un gran interés por la fracción sesquiterpénica de la oleorresina de “copaiba”, y esto debido a que es la responsable del aroma, por ello el valor comercial de los concentrados sesquiterpénicos de *Copaifera* es hasta seiscientas veces mayor que la de toda la oleorresina de “copaiba”[6].

2.1.4.2 Propiedades farmacológicas

Una serie de estudios realizados a la oleorresina de diferentes especies del género *Copaifera*, concluyeron que estas tienen una amplia gama de propiedades farmacológicas, entre las que más destacan su actividad antiinflamatoria, antibacteriana, insecticida, antinociceptiva, leishmanicida, ansiolítica. La actividad antimicrobiana de la oleorresina de “copaiba” es una de las propiedades más estudiadas, y en numerosos trabajos han evaluado su actividad antimicrobiana frente a bacterias como: *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, S. aureus resistente a meticilina, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus mutans, Streptococcus salivarius, Streptococcus pyogenes, Enterococcus faecalis, Pseudomonas aeruginosa, Listeria monocytogenes, Bacillus subtilis, Proteus mirabilis, Klebsiella pneumoniae, Shigella flexinerii, Enterobacter cloacae, Citrobacter freundi, Actinobacillus pleuropneumoniae, Haemophilus parasuis, Paenibacillus alginolyticus, P. pabuli, P. azotofixans, P. borealis, P. gluconolyticus, P. validus, P. thiaminolyticus y P. larvae*; y levaduras como: *Candida albicans, C. parapsilosis, C. tropicalis y C. guilliermondii*; y hongos: *Aspergillus flavus , A. niger, A. tamari, A. terreus, Trichophyton rubrum, T. mentagrophytes, Microsporum canis* y *M. gypseum*[10].

- Moromi M, et al. en su investigación del año 2018 titulado: “Estudio *in vitro* del Efecto Antibacteriano de la Oleorresina de *Copaifera reticulata* y el Aceite Esencial de *Origanum majoricum* frente a *Streptococcus mutans* y *Enterococcus Faecalis* bacterias de importancia en patologías orales” demostraron la actividad antimicrobiana de la oleorresina de *Copaifera reticulata* con respecto a *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* en diferentes concentraciones (100 %, 50 %, 25 %, y 12,5 %) concluyendo que la oleorresina *Copaifera reticulata* presenta un efecto antibacteriano para las dos bacterias mencionadas, reflejando en *S. mutans* el más alto efecto antibacteriano, además las diferentes concentraciones de la oleorresina de “copaiba” no lograron un efecto diferenciado contra el *E. faecalis*, en cambio contra el *S.mutans* a mayor concentración se evidencio un mejor efecto[12].

- En el trabajo de investigación de Rodríguez D, *et al*. realizado en 2016 titulado: "*Copaifera reticulata oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens*", la oleorresina de *Copaifera reticulata* exhibió un efecto bactericida a diferentes horas contra algunos microorganismos que causan caries dental y periodontitis como *Fusobacterium nucleatum* y *Streptococcus mitis* a las 4 horas, *Prevotella nigrescens* a las 6 h, *Porphyromonas gingivalis* y *Lactobacillus casei* a las 12 horas y *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus mutans* después de 18 horas[13].

- Ramos D y Castro A, en su investigación realizada en 2014 titulado: "Actividad antibacteriana de *Copaifera reticulata* "copaiba" sobre *Porphyromonas gingivalis* aisladas de pacientes con periodontitis", concluyó que la oleorresina de *Copaifera reticulata* presentó actividad antibacteriana sobre *Porphyromonas gingivalis* la cual fue aislada de muestras de biopelícula subgingival de pacientes con periodontitis, así como una mayor actividad antibacteriana que la clorhexidina al 0,12 %. Por lo que los autores proponen un posible uso como antiséptico que complementaría el tratamiento odontológico de la periodontitis[14].

- Pieri F, et al. en su trabajo de investigación del año 2011 titulado: "*Inhibition of Escherichia coli from mastitic milk by copaiba oil*", comprobó la actividad antibacteriana *in vitro* de las oleorresinas de dos especies de *Copaifera* contenidas en una solución diferente cada una, frente a 27 cepas de *Escherichia coli* aisladas a partir de leche mastítica de origen animal; los autores evidenciaron que la solución que contenía la oleorresina de *Copaifera langsdorffii* inhibió el crecimiento de ocho cepas y la solución que contenía la oleorresina de *Copaifera officinalis* inhibió el crecimiento de siete cepas, los resultados determinaron que los aceites de "copaiba" serían potenciales fuentes para combatir la mastitis[15].

- Santos A, et al. en su trabajo de investigación del año 2008 titulado: "*Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the Copaifera genus*", analizaron la actividad antimicrobiana de los aceites de distintas especies de "copaiba" contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras y dermatofitos concluyendo que los aceites obtenidos de *Copaifera martii*, *Copaifera officinalis* y *Copaifera reticulata* fueron activos contra especies Gram positivas (*Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis Staphylococcus aureus*, *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), *Staphylococcus epidermidis*), además los aceites evidenciaron actividad

bactericida produciendo en estas bacterias una disminución en su viabilidad (3 h menos), por otra parte, los aceites presentaron actividad moderada contra hongos dermatofitos (*Trichophyton rubrum* y *Microsporum canis*), aunque no mostraron actividad contra bacterias Gram negativas y levaduras. La microscopía electrónica de transmisión reveló alteraciones y daños en la pared celular bacteriana, lo que indica que el aceite de "copaiba" podría afectar la pared celular de las bacterias[16].

- La investigación realizada por Veiga V, et al. del año 2007 titulado: "*Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from Copaifera cearensis Huber ex Ducke, Copaifera reticulata Ducke and Copaifera multijuga Hayne-A comparative study*", demostró que la actividad antiinflamatoria de la oleorresina de "copaiba" estaba relacionada con el efecto antiedematogénico observado en el edema de pata de rata inducido por carragenina, demostrando también que dicha actividad es variable en las oleorresinas del género *Copaifera*, además también indicaron que los sesquiterpenos naturales presentes en las oleorresinas de "copaiba" podrían ser los responsables de la actividad antiinflamatoria reportada[11].

- Veiga V, et al. en su trabajo de investigación del año 2001 titulado: "*Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil*" evaluó la actividad antiinflamatoria *in vitro* midiendo la producción de óxido nítrico por macrófagos murinos y actividad antiinflamatoria *in vivo* utilizando el modelo de pleuresía inducida por zimosán en ratones, con tres oleorresinas de "copaiba" diferentes (*C. multijuga* Hayne*, C. cearensis* Huber ex Ducke y *C. reticulata* Ducke), demostrando que la actividad de las tres oleorresinas de "copaiba" es variable a pesar de tener una similar composición, siendo la oleorresina de C. *multijuga* Hayne la más potente, tanto *in vivo* como *in vitro*[17].

2.1.4.3 Usos tradicionales

La oleorresina de "copaiba" se utiliza ampliamente como medicina popular, mediante administración tópica y oral. Lo más frecuente es la aplicación de la oleorresina, tal cual se obtiene del árbol, sobre la parte afectada masajeando, también lo suelen ingerir diluido con agua. En la actualidad la oleorresina es muy usado por la industria química (perfumes, cosméticos, barnices) además de la farmacéutica. Sus indicaciones etnofarmacológicas son diversas se usan para el tracto respiratorio como expectorante, antiasmático, en el tratamiento de bronquitis, neumonía, hemoptisis, catarro y sinusitis[1]; para tratamiento de infecciones de la dermis y membranas

mucosas, tales como dermatitis, eczema, psoriasis y ulceras; para quistes de ovario, mioma uterino, útero débil, secreción vaginal, problema ovárico, antiséptico, antiinflamatorio, antigonorreico, y en el tratamiento de cistitis, incontinencia urinaria y sífilis[18]; para otros fines, como dolores articulares, antirreumático, antitetánico, antiherpético (antiviral), afrodisíaco, anticanceroso, antitumoral (tumores de próstata), antiofídico, en el tratamiento de leucorrea, y contra la leishmaniasis[19,20].

2.2 Toxicidad

Capacidad que tiene una sustancia química de producir efectos nocivos en los organismos vivos, tales efectos corresponden al deterioro funcional, lesiones que afectan el funcionamiento del organismo y reducción de su capacidad de respuesta a factores de estrés[21] y dependen de la cantidad administrada, vía de ingreso, distribución a través del tiempo, naturaleza de la sustancia y severidad del daño ocasionado[22].

2.2.1 Toxicidad aguda

Capacidad que tiene una sustancia para generar daño sistémico producto de la exposición a cantidades elevadas de sustancia[23], generalmente la muerte del organismo de estudio es el punto final y se expresa por la dosis o concentración que provoca la muerte del 50% de organismos[24].

2.2.2 Toxicidad crónica

Es el resultado de las exposiciones consecutivas durante un periodo prolongado del toxico que genera daño sistémico[23], se da en días, meses o años[25] y se evidencian respuestas variadas como: desarrollo, capacidad reproductiva, crecimiento de organismos, etc[26].

2.2.3 Efecto tóxico

Es aquel que se produce por la acción uno o más agentes tóxicos sobre un organismo el cual se manifiesta por los cambios biológicos producidos, su intensidad o severidad está determinada por el grado de toxicidad y la magnitud guarda relación con la dosis o concentración empleada del agente tóxico[27].

2.3 Curva de relación dosis – respuesta

Es aquella que refleja la relación entre la concentración de compuesto tóxico al cual el organismo está expuesto y el desarrollo de un efecto negativo producido por tal concentración o dosis (Figura 4), estos últimos son inducidos por mecanismos fisiológicos y metabólicos diferentes. En base a la forma de la curva dosis-respuesta,

los compuestos tóxicos son clasificados en aquellos que presentan un punto donde se observa el efecto (sin umbral) y aquellos donde no presentan un punto definido donde se logre notar el efecto (con umbral)[28].

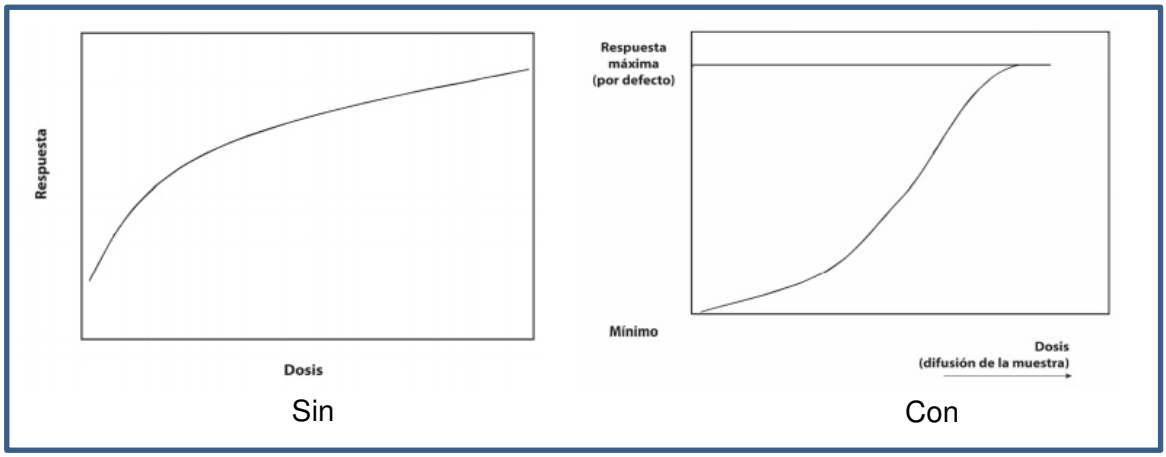


Figura 4. Graficas de dosis-respuesta. Fuente: Repetto[29]

2.4 Marcadores de toxicidad

a) CL_{50}: concentración de una sustancia que produce la muerte del 50% de organismos expuestos durante un período de exposición específico, se obtiene por métodos estadísticos y se expresa en mg/L[30].

b) NOEC: concentración más alta de tóxico que no produce ningún efecto negativo sobre los organismos de prueba[31].

c) LOEC: concentración menor de tóxico en la cual los efectos empiezan a observarse sobre los organismos de prueba[31].

d) TOEC: concentración umbral en la cual los efectos sobre el organismo de prueba se vuelven observables[31,32].

e) Efecto letal: es aquel que por acción directa produce la muerte de los organismos producto de la exposición con una determinada concentración de tóxico[31].

f) Efecto subletal: producido por un nivel inferior al que causa la muerte de los organismos consecuencia de la exposición a una concentración determinada del tóxico[31].

2.5 Toxicidad *in vitro*

2.5.1 Bioensayos

Los ensayos de laboratorio en los cuales se usan a organismos vivos o sus derivados (órganos, tejidos y células) son denominados bioensayos, estos ensayos se realizan en condiciones monitorizadas de laboratorio e incluyen el uso desde cultivos celulares hasta bacterias, insectos, hongos, plantas. El uso de bioensayos permite conocer la eficacia de varias sustancias y tener estandarizado su uso antes que se realicen estudios *in vivo*. Los bioensayos de toxicidad son un tipo específico de ensayo donde se busca determinar si la sustancia a estudiar presenta toxicidad, donde se prueban una serie fija de concentraciones de la sustancia a evaluar y a su vez también se controlan factores como temperatura, volumen, medio de dilución, sexo, edad y tamaño de los individuos, teniendo como factor principal a controlar la producción de la especie en estudio[33].

Antes de la realización de un bioensayo generalmente se deben tener en cuenta cuatro puntos importantes:

a) La sustancia sometida a evaluación

b) El sustrato donde se evaluará

c) El organismo donde se probará

d) El tipo de respuesta detectada (Efecto antihelmíntico, tóxico, antimicrobiano, etc.)

Una forma de clasificar los bioensayos es:

- Por su duración (corto, mediano o largo plazo),
- Por el método de incorporación de la muestra al ensayo (estático, flujo continuo, de renovación)
- Por la razón de su uso (evaluación de compuestos, toxicidad relativa, sensibilidad, etc).

Los organismos que se usan en bioensayos son diversos desde células hasta organismos complejos como plantas (Figura 5) los cuales son escogidos de acuerdo con el estudio a realizar[34].

Los ensayos *in vitro* son métodos de prueba alternativos prometedores a la prueba con animales[31] se caracterizan por ser sensibles y altamente reproducibles[36].

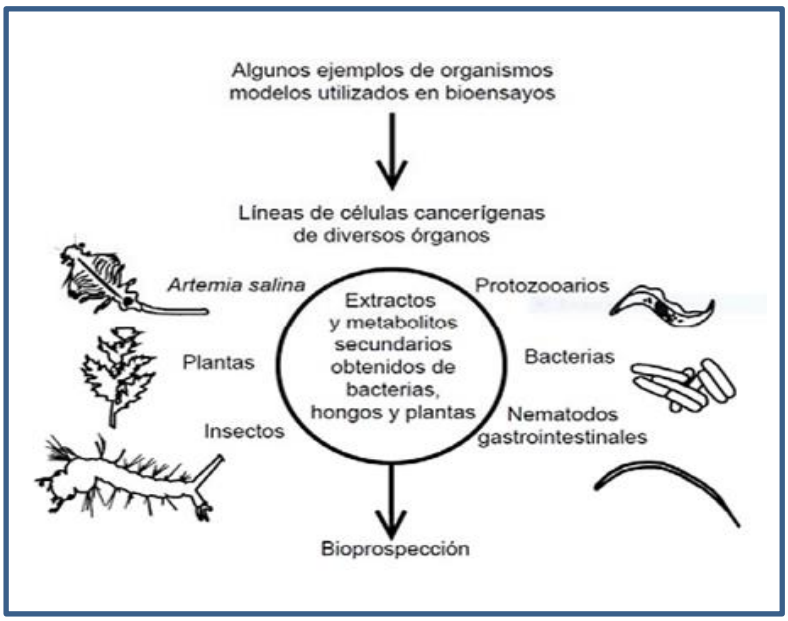


Figura 5. Organismos usados en bioensayos. Fuente: Avila[34]

2.5.2 Citotoxicidad

Definida como desequilibrio de las funciones celulares básicas la cual genera un efecto no deseado capaz de ser detectado en un organismo, por su facilidad de medición y empleo es de uso corriente en el laboratorio[37]. Diversos ensayos *in vitro* determinan la capacidad citotóxica del compuesto en estudio para que puedan ser usados como fármacos, tóxicos o cosméticos además dentro de los ensayos de toxicidad *in vitro* se valoran dos parámetros fundamentales: el sustrato biológico donde se aplica el compuesto químico y los indicadores de toxicidad que permiten detallar cuantitativamente los cambios producidos sobre el sustrato empleado[38].

2.5.3 Tóxico de referencia

Son compuestos puros (orgánicos o inorgánicos) cuya toxicidad es conocida y sirven para contrastar resultados de los análisis realizados.

La EPA (Agencia de protección ambiental de Estados Unidos) para ensayos *in vitro* recomienda los siguientes compuestos: cloruro de cadmio ($CdCl_2$), sulfato de Cobre ($CuSO_4$), dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), cloruro de potasio (KCl), sulfato de zinc ($ZnSO_4$)[39].

2.6 Bioensayos para evaluar la toxicidad

2.6.1 Toxicidad en *Artemia salina*

2.6.1.1 *Artemia salina*

Es un artrópodo acuático primitivo (Figura 6) perteneciente a la familia *Artemiidae* (Tabla 2) presenta una edad aproximadamente de 100 millones de años, fue descubierto por Carlos Linneo en 1758 y lo llamo *Cancer sallinus*, tiempo después en 1819 Leach lo renombra como *Artemia salina*[40].

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Artemia salina*.

Reino	*Animalia*
Phylum	*Arthropoda*
Subphylum	*Crustacea*
Clase	*Branchiopoda*
Orden	*Anostraca*
Familia	*Artemiidae*
Género	*Artemia*
Especie	*Artemia salina*
Nombre común	"Artemia"

Fuente: Rogers[41]

El hábitat es propio de lagos y estanques con alta salinidad entre los 60 a 300 ppt (partes por trillón) es endémica de cuenca mediterránea, pero se encuentra en todos los continentes (Figura 7). *Artemia salina* puede sobrevivir en agua con una alta deficiencia de oxígeno, la concentración mínima de oxígeno que requiere un adulto es de 0,5 mg/L y para el estadio joven de 0,3 mg/L[42].



Figura 6. *Artemia salina*. Fuente: Dumitrascu[42]

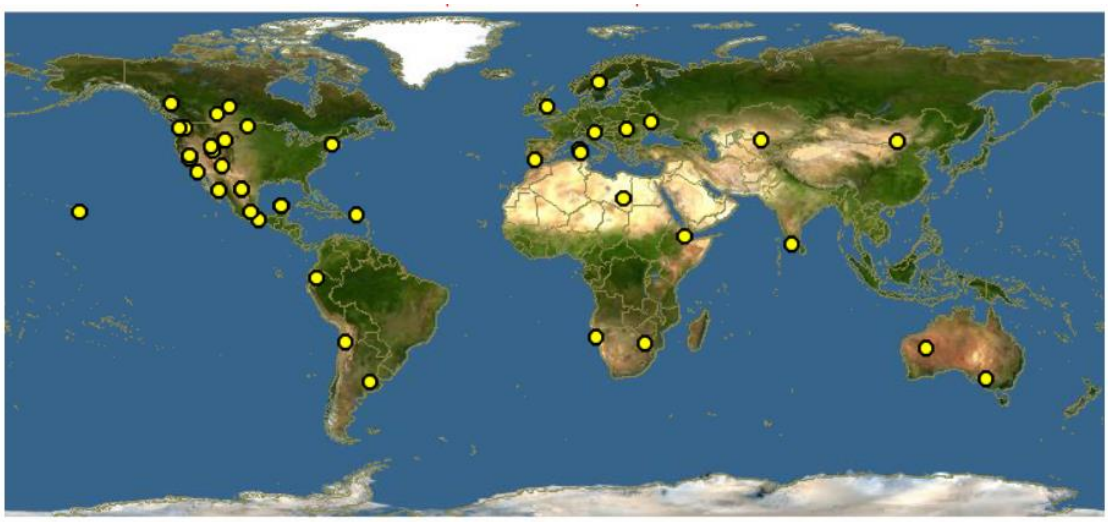


Figura 7. Distribución de *Artemia salina* a nivel mundial.

Fuente: https://www.discoverlife.org/ [43]

2.6.1.2 Ciclo de vida

El ciclo de vida (Figura 8) está controlado por factores ambientales como concentración de oxígeno en agua y su fluctuación, tipo de alimento, salinidad de agua. Presenta dos formas de reproducción ovovivípara la cual depende de la salinidad (< 150 ppt) y la ovípara con una salinidad entre 150-200 ppt esta última es la forma predominante de reproducción. En la reproducción ovípara luego de la cópula los óvulos fertilizados son rodeados por una cáscara dura color marrón compuesta por quitina y lipoproteínas, los huevos(quistes) formados son liberados al agua y deben pasar por un proceso de deshidratación para que luego las larvas puedan nacer solo si hay condiciones favorables. En la reproducción ovovivípara el óvulo fertilizado se desarrolla en la etapa de gástrula, pero se sigue diferenciando en el organismo femenino en larvas denominadas nauplios. Los quistes (0,2 mm-0,3 mm de longitud) de los que eclosionaran los nauplios presentan un color blanquecino los cuales en presencia de agua y condiciones favorables se convertirán en nauplios (0,45 mm) en un tiempo de 24 a 36 horas los cuales presentan movimiento por la presencia de aletas, luego dependiendo de las condiciones favorables como el alimento pasarán a la fase adulta (12 mm máximo) en un tiempo de 3 semanas. Los quistes hidratados mueren a temperaturas bajo 0ºC y por encima de 40ºC, en condiciones de 70 ppt los nauplios no podrán emerger debido al gradiente osmótico alto y a menos de 5 ppt de

salinidad los quistes eclosionarán, pero morirán; los quistes miden entre 200 y 270 µm y pesan 3,5 µg aproximadamente[42,44].

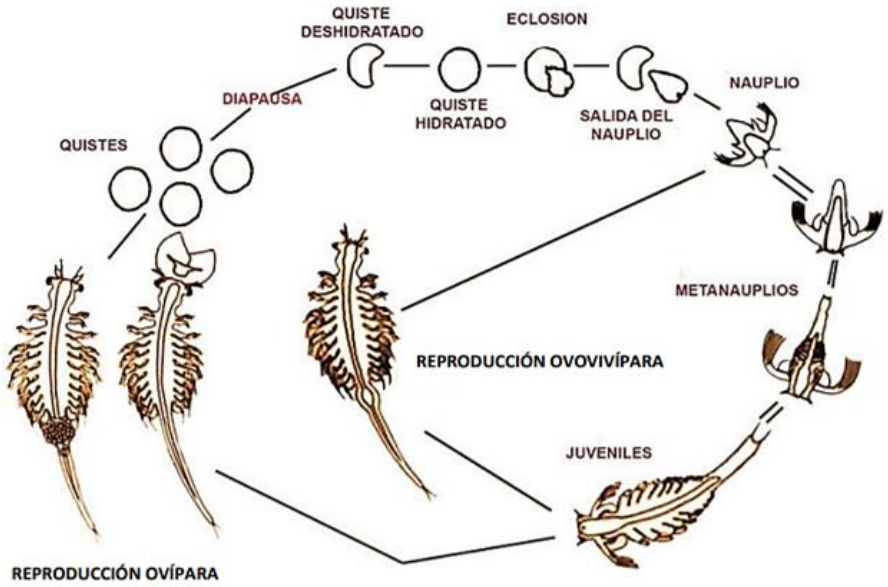


Figura 8. Ciclo de vida de *Artemia salina*. Fuente: Sanchez[45]

Los nauplios (Figura 9) presentan condiciones óptimas a 28ºC y 35 ppt de salinidad, son fototácticos (presentan movimiento en respuesta a un estímulo luminoso)[42,43]

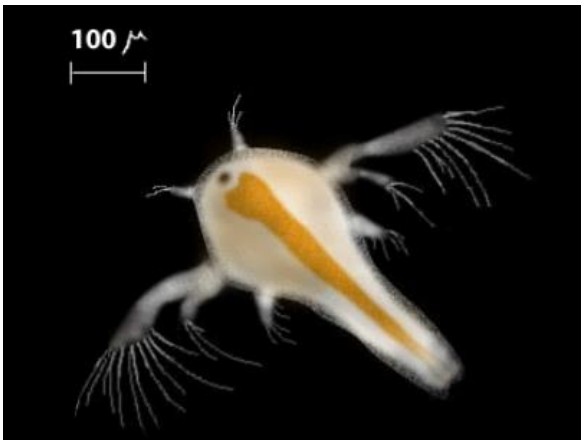


Figura 9. *Artemia salina* en estadio nauplio visto al microscopio. Fuente: Asem[46]

El estadio adulto (Figura 10) presenta un intestino el cual le permite una alimentación completa y presenta 2 ojos compuestos laterales oculares y un cerebro simple en forma de anillo cerca de la cavidad oral, las hembras desarrollan óvulos en un saco ventral en condiciones favorables[44].



Figura 10. Formas adultas de *Artemia salina*, macho (izquierda), hembra(derecha). Fuente: Dimitrascu[42]

2.6.1.3 Bioensayo de toxicidad en *Artemia salina*

El ciclo de vida corto, la adaptación rápida a condiciones de prueba, el cultivo simple, la gran producción de descendencia y el bajo costo de la prueba permite a esta especie ser un modelo adecuado para pruebas de toxicidad *in vitro*[47]. La validez del ensayo con *Artemia salina* ha sido confirmada por varios estudios de toxicidad realizados con diferentes compuestos como extractos de plantas, metales pesados, fármacos, microplásticos, pesticidas, agentes citotóxicos, nanopartículas, materiales dentales, radiaciones ionizantes[48,49]. La prueba generalmente se realiza en un periodo de 24h y en un máximo de 48h dado que a este tiempo la mortalidad de los nauplios presentan una alta variabilidad tanto en los tratamientos como en los controles debido a la falta de alimento[50]. La prueba se basa en la capacidad que presenta un compuesto de producir la muerte de *Artemia salina* en su estadio nauplio y permite determinar el valor que mata al 50% de la población expuesta (CL_{50})[51]. Este bioensayo proporciona una primera línea de estudio que puede ser respaldado por bioensayos más específicos y sofisticados[52].

2.6.2 Toxicidad en *Lactuca sativa*

2.6.2.1 *Lactuca sativa*

Es una especie vegetal dicotiledónea que pertenece a la familia *Asteraceae* (Tabla 3), sirve como modelo para evaluaciones de toxicidad y riesgos de contaminación ambiental[53], su uso es debido a su alta sensibilidad a factores externos, ser un organismo eucariota, presentar rápida proliferación celular además permite ensayos microscópicos, macroscópicos. Los ensayos de fitotoxicidad con semillas de *Lactuca sativa* presentan una serie de ventajas como: los costos de mantenimiento son mínimos, no requiere equipos sofisticados, las semillas son autosuficientes, se requiere poca muestra, las semillas permanecen viables durante mucho tiempo y es aplicable tanto *in situ* como *in vitro*[54,55].

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Lactuca sativa.*

Reino	*Plantae*
Phylum	*Magnoliophyta*
Clase	*Magnoliopsida*
Orden	*Asterales*
Familia	*Asteraceae*
Género	*Lactuca*
Especie	*Lactuca sativa*
Nombre común	“lechuga”

Fuente: Missouri Botanical Garden[56]

2.6.2.2 Etapas en la germinación

La germinación de las semillas de *Lactuca sativa* empieza cuando presentan contacto con el agua. La semilla pasa por 3 etapas o fases (Figura 11) para el desarrollo de la plántula (Figura 12), la primera etapa de hidratación donde los tejidos que conforman la semilla absorben el agua rápidamente hacia las membranas celulares, sin esta etapa la germinación no sería posible; la segunda etapa es la de germinación donde se producen variaciones metabólicas y disminuye la absorción de agua; en la última etapa de crecimiento se produce el rompimiento de la testa (envoltura seminal) y se produce el proceso de elongación de la radícula e hipocótilo (crece de forma ascendente) para que luego emerjan los cotiledones (Figura 13)[57].

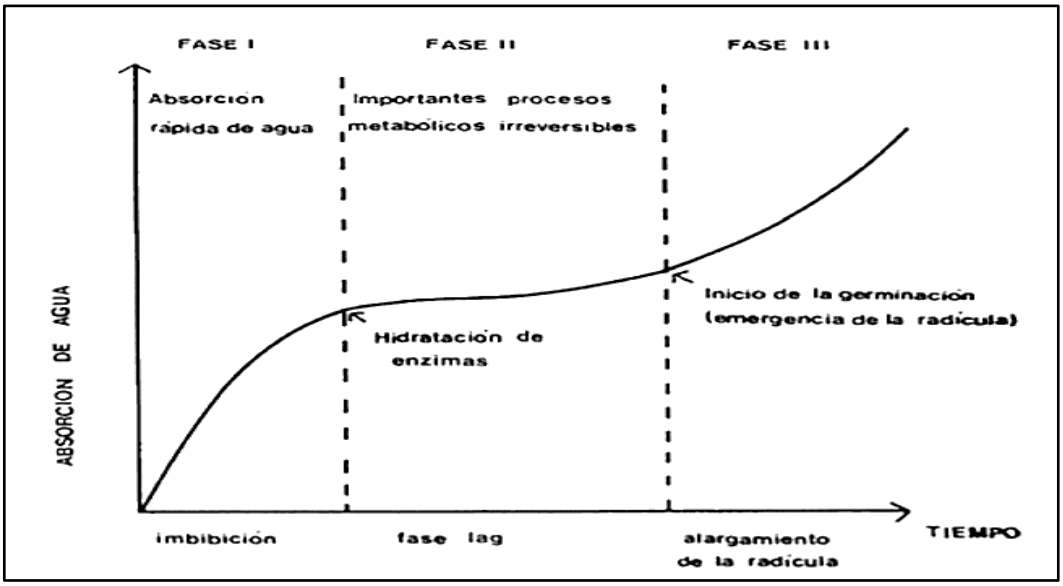


Figura 11. Curva del proceso de germinación de semillas.

Fuente: Vázquez et al[58]

En todo el proceso de germinación el control de la humedad, temperatura del medio y la concentración de oxígeno del agua condiciona a que cada una de las etapas se desarrolle favorablemente[57,59].

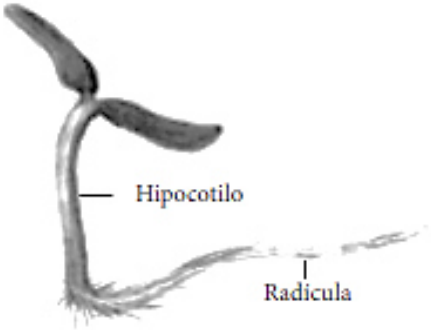


Figura 12. Plántula de *Lactuca sativa.* Fuente: Castillo[60]



Figura 13. Proceso de germinación de *Lactuca sativa*. Fuente: Saavedra[57]

2.6.2.3 Bioensayo de toxicidad en *Lactuca sativa*

El ensayo *in vitro* utiliza semillas de *Lactuca sativa*, es un análisis de carácter fijo sobre toxicidad, con un tiempo de exposición de 120 horas (5 días) que permite evaluar los efectos fitotóxicos producidos por mezclas complejas o compuestos puros en las etapas de germinación y desarrollo de la plántula en los días iniciales de crecimiento[61]. En el proceso de germinación y los primeros días de aparición de la plántula suceden diversas sucesiones fisiológicas los cuales son afectados por la presencia de compuestos tóxicos que consecuentemente interfieren en el desarrollo habitual y su supervivencia; por lo que, la fase de germinación en presencia de factores externos adversos presenta una alta sensibilidad, de esta manera la evaluación del desarrollo de la radícula e hipocótilo constituyen indicadores representativos (subletales) para determinar la capacidad de desarrollo de *Lactuca sativa*[55,60]. El bioensayo de toxicidad en *Lactuca sativa* es sugerido y utilizado por Instituciones internacionales que protegen el medio ambiente para evaluaciones ecotoxicológicas de compuestos puros y diferentes matrices ambientales (USEPA 1989, OECD 1984)[62].

3. METODOLOGÍA

3.1 Materiales y métodos

a) Materiales

- ✔ Fiolas de vidrio con tapa de 25, 50 y 100 mL marca Boeco
- ✔ Placas Petri de 10 cm de diámetro marca Pyrex
- ✔ Balones de 250 mL marca Kimax
- ✔ Matraces de 250 mL con tapón esmerilado marca Pyrex
- ✔ Bureta de 25 y 50 mL marca Boeco
- ✔ Papel filtro Whatman N° 41
- ✔ Probeta de 50 mL Boeco
- ✔ Tubo Eppendorf de 30 mL
- ✔ Condensador de reflujo marca Pyrex
- ✔ Tiras reactivas para pH marca Panpeha
- ✔ Picnómetro LMS marca Germany
- ✔ Micropipeta de 1000 µL marca Boeco modelo Axygen
- ✔ Pinzas de metal
- ✔ Reglas de metal de 20cm

b) Instrumentos

- ✔ Baño termostático “marca Memmert”, modelo WNB 14
- ✔ Balanza analítica marca Sartorius
- ✔ Refractómetro Abbe-Ref 1
- ✔ Viscosímetro digital marca Cromtek
- ✔ Cocinilla eléctrica
- ✔ Termohigrómetro marca Boeco
- ✔ Estereoscopio binocular marca Eurotech
- ✔ Equipo multiparámetro marca HACH HQ40D
- ✔ Estufa marca Memmert GMBH
- ✔ Lámpara de luz blanca
- ✔ Bomba de oxígeno

3.2 Tipo y diseño de Investigación

Esta investigación es de tipo experimental, prospectivo y transversal.

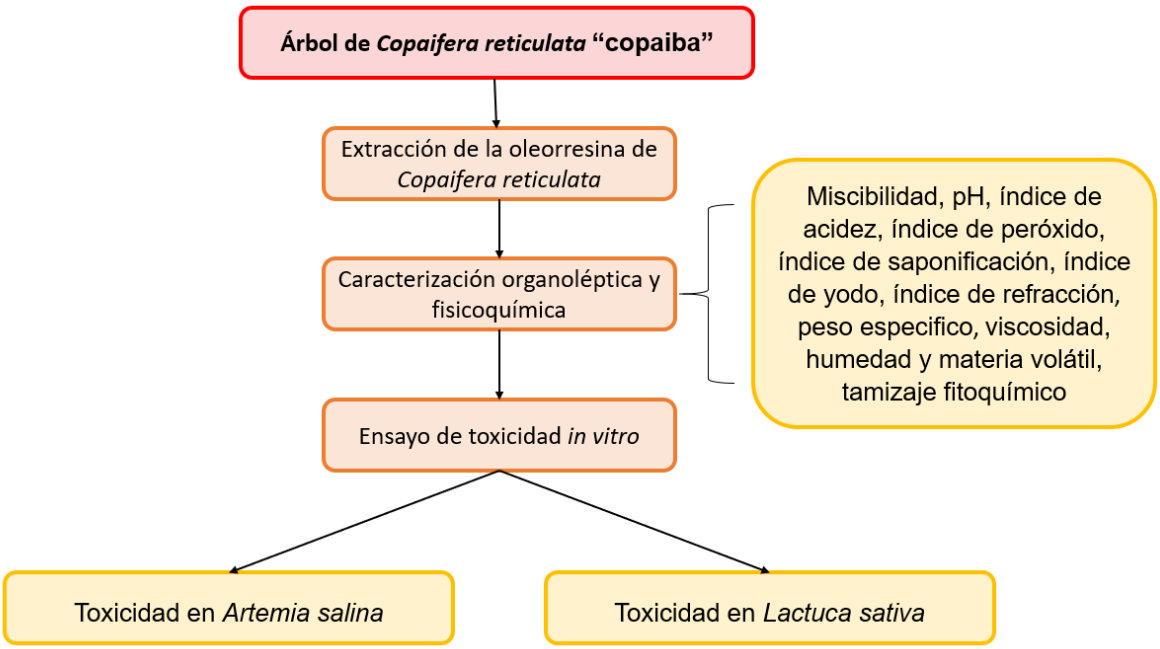


Figura 14. Flujograma del trabajo experimental. Fuente: Propia de los autores

3.3 Extracción e identificación taxonómica

La oleorresina fue extraída ecológicamente del árbol de "copaiba" (Anexo 2) del "Fundo Zungarococha" de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana ubicado en el departamento de Iquitos y fue identificada por un biólogo del mismo centro de estudios (Anexo 1).

3.4 Características organolépticas

Se determinó el aspecto, color y olor de la oleorresina de "copaiba".

3.5 Caracterización fisicoquímica de la oleorresina de "copaiba"

Se determinaron las siguientes características fisicoquímicas para aceites y grasas según la metodología descrita en la USP 42 - NF 37 (Anexo 3):

3.5.1 pH

Se determinó el pH a 25 C° mediante el uso de tiras reactivas para determinación de pH.

3.5.2 Miscibilidad

El ensayo se realizó según la USP 42 - NF 37. Se probó el grado de miscibilidad de 1 mL de oleorresina con los siguientes solventes: agua, metanol, etanol, cloroformo,

éter, DMSO, hexano[63]. Los niveles de miscibilidad se indican mediante los datos descriptivos de la Tabla 4.

Tabla 4. Niveles de miscibilidad.

Dato descriptivo	Partes de disolvente requeridas por 1 parte de soluto
Muy miscible	<1
Fácilmente miscible	1 - 10
Miscible	10 - 30
Moderadamente miscible	30 - 100
Poco miscible	100 - 1000
Muy poco miscible	1000 - 10 000
Prácticamente inmiscible	10 000

Fuente: USP 42 – NF 37[63]

3.5.3 Índice de acidez

Se determinó según la metodología de la USP 42 - NF 37 Método I. En un matraz se disolvió 2 g de oleorresina con 50 mL de una mezcla de alcohol y éter (1:1) previamente neutralizados, luego se agregó 1 mL de fenolftaleína SR y se valoró con hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N SV lentamente hasta que se torne de color ligeramente rosado después de agitar por medio minuto. Esta determinación se realizó por triplicado, y se determinó un blanco en las mismas condiciones que se analizó la muestra. Se calculó con la siguiente ecuación[63]:

$$I.A. = \frac{Vx\ N\ x\ Mr}{w}$$

Donde:

I.A.= índice de acidez

V = volumen de NaOH 0,5 N SV gastado en la valoración de la muestra (mL)

N = normalidad real de la solución de hidróxido de sodio

M_r = peso molecular del hidróxido de sodio 40 g/mol

w = peso de la muestra tomada (g)

3.5.4 Índice de peróxido

Se realizó según la metodología de la USP 42 - NF 37. Se pesó 2 g de oleorresina en un matraz de Erlenmeyer de 250 mL, se añadieron 30 mL de la solución de ácido acético-cloroformo (3:2) y se agitó hasta disolver la muestra completamente. Luego se agregó medio mililitro de yoduro potásico solución saturada (KI). Se agitó durante

60” exactamente y se añadió 30 mL de agua destilada. Se valoró con tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$) 0,01 N SV, añadiendo y agitando continuamente el matraz, vire ligeramente a amarillo. Se agregó almidón SR y se continuo la valoración hasta la desaparición de la coloración. Se realizó el ensayo por triplicado, y además se analizó un blanco. El índice de peróxido se calculó con la siguiente ecuación[63]:

$$I.P. = \frac{[1000\ x\ (V - V_B)\ x\ N]}{w}$$

Donde:

I.P.= índice de peróxido

V = volumen de $Na_2S_2O_3$ 0,01 N SV gastado en la valoración de la muestra (mL)

V_B= volumen de $Na_2S_2O_3$ 0,01 N SV gastado en la valoración del blanco (mL)

N = normalidad real de la solución de $Na_2S_2O_3$.

w = peso de la muestra tomada (g)

3.5.5 Índice de saponificación

Se realizó según la USP 42 - NF 37. Se pesó 2 g de oleorresina, en un matraz de Erlenmeyer de 250 mL y se agregó 25 mL de potasa alcohólica (KOH) 0,5 N. Se colocó el matraz en baño maría acoplado un condensador de reflujo por una hora, agitando cada diez minutos. Luego se añadió gotas de fenolftaleína SR y se valoró el hidróxido de potasio en exceso con el titulante HCl 0,5 N SV. Se realizó el ensayo por triplicado, con la determinación de un blanco en las mismas condiciones. Se calculó el índice de saponificación con la siguiente ecuación[63]:

$$I.S. = \frac{[Mr\ x\ (V_B - V_T)\ x\ N]}{w}$$

Donde:

I.S.= índice de saponificación

M_r = peso molecular de la potasa alcohólica 56,11 g/mol

V_B = volumen de HCl 0,5 N SV gastado en la valoración de la muestra (mL)

V_T = volumen de HCl 0,5 N SV gastado en la valoración del blanco (mL)

N = normalidad real del HCl

w = peso de la muestra tomada (g)

3.5.6 Índice de yodo

Se realizo según el método de Hanus descrito en la USP 42 - NF 37. Se peso 0,2 g de oleorresina en un matraz con tapa esmerilada de 250 mL y se agregó 10 mL de

cloroformo y 25 mL de reactivo de Hanus, luego se dejó en reposo tapado y en oscuridad durante 30 minutos. Seguidamente se agregó en este orden 10 mL de yoduro de potásico 30% y 100 mL agua destilada después se valoró el yodo liberado con el titulante, hasta que viró a un color amarillo pálido en ese momento se añadió 3 mL de almidón SR y se continuo la titulación hasta la desaparición del color azul. El ensayo se realizó por triplicado con la determinación de un blanco en las mismas condiciones. Se calculó el índice de yodo con la siguiente ecuación[63]:

$$I.Y. = \left[\frac{(A_T\ x(\ V_B - V_S)\ x\ N}{10\ x\ w}\right]$$

Donde:

I.Y.= índice de yodo

A_T = peso atómico del yodo 126,9 g/mol

V_B = volumen de $Na_2S_2O_3$ 0,1 N SV gastado en la valoración de la muestra (mL)

V_S = volumen de $Na_2S_2O_3$ 0,1 N SV gastado en la valoración del blanco (mL)

N = normalidad real del $Na_2S_2O_3$ SV

w = peso de la muestra tomada (g)

3.5.7 Índice de refracción

Se realizó según indica la USP 42 - NF 37 para ellos se utilizó un refractómetro tipo ABBE. Para lograr una mejor exactitud en la medición se comprobó el control de temperatura y la limpieza del instrumento mediante la determinación del índice de refracción de agua destilada cuyos valores son 1,333 a 20°C y luego se colocó una gota de la muestra en el prisma de medición y se registró la lectura[63].

3.5.8 Densidad

La densidad se determinó según la USP 42 - NF 37 método I usando un picnómetro calibrado con agua a 25°C. Para calibrarlo se pesó el picnómetro vacío luego el picnómetro con agua una vez calibrado se llenó el picnómetro con la oleorresina de "copaiba" a 20°C y luego se pesó al llegar a 25°C. Se calculó usando la siguiente fórmula[63]:

$$\rho.\,25\ C° = \frac{(Wpic_{+muestra} - Wpic_{vacio})}{(Wpic_{+agua} - Wpic_{vacio})}\left(\rho_{agua\ 25°C}\right)$$

Donde:

ρ = Densidad

$Wpic_{+\ muestra}$ = peso de picnómetro con oleorresina (g)

$W_{pic\ vacío}$ = peso de picnómetro vacío (g)

$W_{pic\ +\ agua}$ = peso de picnómetro con agua (g)

$\rho_{agua\ 25°C}$ = Densidad del agua a 25^0C (0,9971 g/mL)

3.5.9 Viscosidad

La viscosidad se determinó según la USP 42 - NF 37 empleando un viscosímetro de rotor. El rotor usado fue el N°1, la velocidad de rotación fue de 12 RPM (revoluciones por minuto) la medición se realizó a 25°C para ello se realizaron 5 mediciones en un intervalo de 30 segundos cada uno.

3.5.10 Humedad y materia volátil

Se realizó según el "procedimiento para artículos de origen botánico" descrito en la USP 42 - NF 37. Se colocó en una placa tarada aproximadamente 8 g de la oleorresina, pesados con exactitud. Consecuentemente se secó a 105 ºC durante 5 horas y se pesó luego de enfriarse en un desecador, después se continuó el secado y la pesada a intervalos de 1 hora hasta que la diferencia entre dos pesadas sucesivas no sea mayor de 0,25% para determinar la perdida de agua y otros compuestos volátiles. Se determinó usando la siguiente formula[63]:

$$H.M. = \frac{\left(W_{mta\ inicial} - (W_{placa\ +\ mta\ seca} - W_{placa})\right)}{(W_{mta\ inicial})} x100$$

Donde:

H.M.= Humedad y materia volátil

W_{placa} = peso inicial de la placa vacía (g)

$W_{mta\ inicial}$ = peso de la muestra (g)

$W_{placa\ +\ mta\ seca}$ = peso de placa con muestra luego de secar (g)

3.5.11 Tamizaje fitoquímico

Se realizó la determinación de la presencia cualitativa de los siguientes constituyentes químicos de la oleorresina de "copaiba" mediante reacciones químicas descritas en la tabla 5.

Tabla 5. Ensayos de tamizaje fitoquímico de la oleorresina de copaiba

Constituyentes químicos	Reacciones químicas
Azúcares reductores	Fehling
Saponinas	Prueba de la espuma
Alcaloides	Dragendorff
Flavonoides	Shinoda
Glucósidos cardiotónicos	Keller-Killiani
Esteroides	Liebermann-Burchard
Terpenos	
Compuestos fenólicos	$FeCl_3$
Antraquinona	Bornträger

3.6 Toxicidad en *Artemia salina*

El ensayo se aplicó según el manual de técnicas de investigación del CYTED y se fundamenta en la concentración de compuesto tóxico que mata al 50% de nauplios de *Artemia salina* lo cual es descrito como la concentración letal media (CL_{50})[64].

3.6.1 Preparación del agua de mar artificial (agua salina)

Se pesaron sal marina (38 g) y se disolvieron en agua destilada (1L), una vez preparada el agua salina se procedió a medir los parámetros de control con el equipo multiparámetro HACH: pH, salinidad y concentración de oxígeno.

3.6.2 Cultivo de los huevos de *Artemia salina*

Los huevos de *Artemia salina* fueron conseguidos de una donación del IMARPE (Instituto del Mar del Perú), seguidamente con la ayuda de una probeta se midió 350 mL del agua salina preparada y se trasvaso a un beaker, para luego agregar 50 mg de huevos de *Artemia salina*; este último recipiente se expuso a una lámpara de luz y dentro del beaker se agregó una fuente que produzca burbujeo. De esta forma el recipiente (beaker) se dejó a oscuridad por 72 horas (3 días) hasta la eclosión de los nauplios de *Artemia salina* (Anexo 4).

3.6.3 Preparación de la muestra

Se utilizó como muestra oleorresina de “copaiba” para lo cual se usó como disolvente DMSO (dimetilsulfóxido) a una concentración de 0,4% v/v, para ello se pesaron 15,3 mg de oleorresina de “copaiba” y se disolvieron en 0,12 mL de DMSO esta cantidad se agregó en un tubo eppendorf de 30 mL de capacidad y se completó con agua salina. A partir del contenido del tubo eppendorf la cual se denominó solución madre

(C_{Final}=0,51 mg/mL o 510 ppm) se prepararon las siguientes diluciones: 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm para una cantidad de 10 mL por vial. De esta manera se tuvieron 5 concentraciones para la evaluación de la toxicidad (Anexo 4).

3.6.4 Preparación de los controles (positivo y negativo)

Para los controles se utilizaron: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y se preparó a las siguientes concentraciones: 15 ppm, 10 ppm, 5 ppm, 2,5 ppm, 1 ppm. En el caso de del control negativo se realizó un control con agua salina y otro con DMSO al 0,4% v/v.

3.6.5 Desarrollo del bioensayo

Para el bioensayo se usaron viales, a cada vial se agregó 2 mL de agua salina, se inocularon 10 nauplios (por vial) de *Artemia salina* y a partir de la solución madre de oleorresina se calculó la cantidad que debía ser agregada para tener cada una de las siguientes concentraciones: 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 12,5 ppm, 6,25 ppm para un volumen final de 10 mL, resultando el volumen para concentración 1960 µL,980 µL, 490 µL, 245 µL, 122,5 µL respectivamente. Para culminar se completó con agua salina el vial hasta 10 mL; cada una de las concentraciones de prueba se hicieron por triplicado. Luego de agregar la muestra a los viales y enrasar hasta 10 mL se procedió a tapar los viales con papel aluminio y se realizaron pequeñas perforaciones al papel para permitir la oxigenación luego se esperó un tiempo de 24 horas para poder realizar el conteo de nauplios muertos (sin movimiento). Para esta prueba se cumplen con las siguientes condiciones para su completo desarrollo (Tabla 6):

Tabla 6. Parámetros en la prueba de toxicidad con *Artemia salina*.

Factores	Condición
Estadio del organismo	Nauplio
Carácter de la prueba	Estático
Temperatura	25 ± 1ºC
Salinidad (g/L)	37 ± 1
Agua de dilución	Agua salina
Volumen de ensayo	10 mL
Nauplios expuestos	10
Repeticiones por concentración	3
Número de controles	3
Tiempo de la prueba	24h
Criterio de aceptación	Mortalidad ≤ 10% en los controles negativos

Fuente: Saetama[65]

3.6.6 Cálculo del % de Mortalidad y CL_{50}

Luego de 24 horas se procede a destapar los viales y se contabiliza la cantidad de nauplios que no presentan movilidad (muertos) y se calcula el % de Mortalidad por cada concentración mediante la siguiente formula[66]:

$$\%\text{Mortalidad} = \frac{(Individuos\ vivos\ pruebas - Individuos\ vivos\ control)}{Individuos\ vivos\ control} x100$$

Para el cálculo de la Concentración letal media (CL_{50}) se utilizó el programa estadístico SPSS 25.0 con su análisis de regresión Probit y se clasificó el nivel de toxicidad según el CL_{50} a partir del cuadro establecido por el CYTED (Tabla 7):

Tabla 7. Clasificación de toxicidad según el CL_{50}.

Nivel de toxicidad		CL_{50}	Unidad
I	Extremadamente tóxico	0-10	mg/L
II	Altamente tóxico	10-100	mg/L
III	Moderadamente tóxico	100-500	mg/L
IV	Ligeramente tóxico	500-1000	mg/L
V	Prácticamente no tóxico	1000-1500	mg/L
VI	Relativamente inocuo	<1500	mg/L

Fuente: CYTED[64]

3.7 Toxicidad en *Lactuca sativa*

El ensayo de toxicidad en semillas de *Lactuca sativa* se trabajó en base a los métodos propuestos por Schmidt y Redshaw[67], el cual consiste en analizar la actividad que tiene la muestra sobre la germinación y crecimiento tanto de la radícula como del hipocótilo en un periodo de 120 horas (5 días)[65].

3.7.1 Preparación de la muestra

Se elaboró una solución madre de oleorresina de "copaiba" (2000 ppm), para ello se pesaron 200 mg de oleorresina y se disolvieron en 0,4 mL de DMSO luego se aforo hasta 100 mL en una fiola con agua mineral. De la solución madre se prepararon 4 diluciones: 1000 ppm, 1200 ppm, 1400 ppm, 1600 ppm de esta manera se tuvo 5 concentraciones de prueba (incluida la concentración de 2000 ppm).

3.7.2 Preparación de los controles (positivo y negativo)

Se utilizó sulfato de zinc "tóxico de referencia" como control positivo ($ZnSO_4$), y se preparó a las concentraciones de 200 ppm, 400 ppm, 600 ppm, 800 ppm y 1000 ppm. Para el control negativo se usó agua mineral y otro control negativo con DMSO al 0,4%. Para los dos controles (positivo y negativo) se realizó la prueba por triplicado.

3.7.3 Desarrollo del bioensayo

Se usaron semillas de *Lactuca sativa* tipo Great Lakes de la marca ANASAC**,** para el bioensayo con *Lactuca sativa* se usaron placas petri de 90 mm en las cuales se

colocaron papeles filtro tipo Whatman Nº 41 en forma de discos, seguidamente con una micropipeta se humedecieron con 4 mL de solución de prueba y finalmente se colocaron 20 semillas de *Lactuca sativa* a cada placa. En la prueba se usaron 5 concentraciones de prueba por lo que tuvimos 15 placas ya que cada concentración se realizó por triplicado más las 6 placas de los controles positivo (3) y negativo (3) se tuvieron 21 placas que fueron puestas en un reservorio que fue cubierto por bolsas de plástico color negro para evitar la exposición a la luz y se esperó un tiempo de 5 días (120 horas) hasta el conteo de los resultados (Anexo 5). Para esta prueba se cumplen las siguientes condiciones para su completo desarrollo (Tabla 8):

Tabla 8. Factores en la prueba de toxicidad con *Lactuca sativa*.

Factor	Condición
Tipo de prueba	Estático
Temperatura	22 ± 2ºC
Intensidad de luz	Oscuridad
Agua de dilución	Agua mineral
Volumen de solución de prueba	4 mL
Numero de semillas por replica	20
Replicas por concentración	3
Número de controles	3
Duración de la prueba	120 horas
Criterio de aceptabilidad de la prueba	● Germinación ≥ 90% ● (CV) < 30% en elongación de la radícula del control negativo

Fuente: Saetama[65]

3.7.4 Cálculo de los indicadores de toxicidad y procesamiento estadístico

Finalizado el ensayo (5 días) se realizó lo siguientes:

a) Conteo de la cantidad de semillas germinadas (se consideró que una semilla no germinada es aquella donde la radícula mide menos de 3 mm)
b) Medición de la longitud de la radícula
c) Medición de la longitud hipocótilo.

Todas las mediciones se hicieron con una regla. Posteriormente se calculó:

- Promedio de la longitud de la radícula e hipocótilo
- Desviación estándar

Fuente: Saetama[65]

- Coeficiente de variación del control y de cada concentración.

Finalmente se determinaron el porcentaje de germinación (%G) y porcentaje de inhibición o estimulación (%IE) en la elongación de la radícula e hipocótilo de la siguiente manera:

$$\%G=\frac{Nro.\ Semillas\ germinadas\ en\ cada\ concentracion}{Nro.\ Semillas\ germinadas\ en\ el\ control}\ x100$$

$$\%IE=\frac{(Promedio\ de\ elongacion\ de\ la\ muestra-Promedio\ de\ elongacion\ del\ control)}{Promedio\ de\ elongacion\ del\ control}\ x100$$

Para los valores de germinación mayores a 90% se consideró a la muestra no tóxica, para valores comprendidos entre 75% y 90% como tóxico y para valores menores a 75% como muy tóxicas[68], además con los datos donde el porcentaje de inhibición fue mayor a 50%, determinándose la concentración letal media (CL_{50}) con el programa estadístico SPSS 25.0 mediante el análisis de regresión Probit y para aquellos donde el porcentaje de inhibición sea menor a 50% se determinó el valor del NOEC Y LOEC mediante el análisis de Dunnett[69], seguidamente se procederá a realizar la prueba de ANOVA para determinar la significancia estadística de los datos y la prueba de Tukey para realizar las comparaciones múltiples entre las medias[60].

4. RESULTADOS

4.1 Características organolépticas

En la tabla 9 se describen las características organolépticas de la oleorresina de *Copaifera reticulata* Ducke "copaiba".

Tabla 9. Características organolépticas de la oleorresina de copaiba

Característica	Resultado
Aspecto	Líquido, oleoso, viscoso, traslucido
Color	Ámbar
Olor	*Sui generis*

4.2 Caracterización fisicoquímica

Se expresan los resultados por triplicado más su desviación estándar.

4.2.1 pH

El pH de la oleorresina de "copaiba" fue de 4,5.

4.2.2 Miscibilidad

En la tabla 10 se expresa el grado de miscibilidad de la oleorresina de "copaiba" en diferentes solventes.

Tabla 10. Miscibilidad de la oleorresina de copaiba en diferentes solventes.

SOLVENTE	RESULTADO
Agua	Inmiscible
Metanol	Poco miscible
Etanol	Muy poco miscible
Cloroformo	Fácilmente Miscible
Éter	Muy poco miscible
Dimetilsulfóxido	Moderadamente miscible
Hexano	Prácticamente inmiscible

4.2.3 Índice de acidez

El índice de acidez de la oleorresina de "copaiba" fue de 40 ± 1,13 mg NaOH/g de muestra (Tabla 11), siendo 0,9540 el factor de corrección del hidróxido de sodio 0,1 N

usado en la titulación. Este índice también se expresa en porcentaje de ácido oleico el cual realizando la conversión fue de 27,65%.

Tabla 11. Índice de acidez de la oleorresina de copaiba

INDICE DE ACIDEZ				
Muestra	Peso (g)	Gasto muestra (mL)	I.A. (mg NaOH/g de muestra)	Desviación estándar
1	2,0	21,2	40,4496	1,13
2	2,1	21,3	38,7051	
3	2,0	21,4	40,8312	
Promedio			40	

4.2.4 Índice de peróxido

El índice de peróxido de la oleorresina de "copaiba" fue de 2,51 ± 0,07 meq O_2/Kg muestra (Tabla 12), siendo 1,0190 el factor del tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$) 0,01 N utilizado en la titulación.

Tabla 12. Índice de peróxido de la oleorresina de copaiba.

INDICE DE PEROXIDO					
Muestra	Peso (g)	Gasto muestra (mL)	Gasto blanco (mL)	I.P. (meq O_2/Kg muestra)	Desviación estándar
1	2,0	0,6	0,1	2,5500	0,07
2	2,0	0,6		2,5500	
3	2,1	0,6		2,4286	
Promedio				2,51	

4.2.5 Índice de saponificación

El índice de saponificación de saponificación de la oleorresina de "copaiba" fue de 115,16 ± 2,8 mg KOH/g muestra (Tabla 13), siendo 1,0011 el factor de corrección del ácido clorhídrico 0,5 N usado en la titulación.

Tabla 13. Índice de saponificación de la oleorresina de copaiba.

INDICE DE SAPONIFICACION					
Muestra	Peso (g)	Gasto muestra (mL)	Gasto blanco (mL)	I.S (mg KOH/g muestra)	Desviación estándar
1	2,0	19,1	27,3	115,1635	2,8
2	2,0	18,9		117,9724	
3	2,0	19,3		112,3547	
Promedio				115,16	

4.2.6 Índice de yodo

El índice de yodo de la oleorresina de "copaiba" fue de 98,87 ± 2,3 cg I_2/g muestra (Tabla 14), siendo el factor de corrección 1,0190 del tiosulfato de sodio 0,1 N usado en la titulación.

Tabla 14. Índice de yodo de la oleorresina de copaiba.

INDICE DE YODO					
Muestra	Peso (g)	Gasto muestra (mL)	Gasto blanco (mL)	I.Y. (cg I_2/g muestra)	Desviación estándar
1	0,2013	16,30	32,1	101,4960	2,3
2	0,2075	16,40		97,8402	
3	0,2094	16,35		97,2612	
Promedio				98,87	

4.2.7 Índice de refracción

El índice de refracción de la oleorresina de "copaiba" fue de 1,504 (Tabla 15).

Tabla 15. Índice de refracción de la oleorresina de copaiba.

Muestra	I.R.	Desviación estándar
1	1,504	0,00
2	1,504	
3	1,504	
Promedio	1,504	

4.2.8 Densidad

La densidad de la oleorresina de "copaiba" fue de 0,9478 ± 0,0017 g/mL (Tabla 16).

Tabla 16. Densidad de la oleorresina de copaiba.

DENSIDAD					
Muestra	Peso pic. vacío	Peso pic+ agua	Peso pic+ Muestra	ρ (g/mL)	Desviación estándar
1	24,9908	35,2747	34,7846	0,9495	0,0017
2			34,7663	0,9478	
3			34,7489	0,9461	
Promedio				0,9478	

4.2.9 Viscosidad

La viscosidad de la oleorresina de “copaiba” fue de 283,1 ± 8,5 centipoise (cps).

Tabla 17. Viscosidad de la oleorresina de copaiba.

Muestra	Torque	Viscosidad (cps)	Desviación estándar
1	54,2%	271,0	8,5
2	55,6%	278,3	
3	56,9%	284,9	
4	57,8%	289,0	
5	58,4%	292,1	
Promedio	56,60%	283,1	

4.2.10 Humedad y materia volátil (HMV)

El porcentaje de humedad y materia volátil obtenido en la oleorresina de “copaiba” fue de 45,52 ± 1,68 %.

Tabla 18. Viscosidad de la oleorresina de copaiba.

Muestra	Peso placa	Peso muestra	Peso placa + muestra seca	HMV (%)	Desviación estándar
1	69,5118	8,0309	73,6953	47,9075	1,68
2	80,0326	8,0401	84,2937	47,0019	
3	95,0356	8,0383	99,4850	44,6475	
Promedio				45,52	

4.2.11 Tamizaje fitoquímico

En la tabla 19 se presentan los constituyentes químicos encontrados (Anexo 3) en la oleorresina de “copaiba”.

Tabla 19. Tamizaje fitoquímico de la oleorresina de copaiba

Constituyentes químicos	**Resultado**
Azucares reductores	**+++**
Saponinas	**-**
Alcaloides	**-**
Flavonoides	**+**
Glucósidos cardiotónicos	**-**
Esteroides	**-**
Terpenos	**++**
Compuestos fenólicos	**-**
Antraquinona	**-**

(-): ausencia, (+): leve, (++): moderado, (+++): abundante

4.3 Toxicidad en *Artemia salina*

4.3.1 Control positivo

Los parámetros del agua salina fueron: Salinidad (37,5 g/L), pH (7,27), oxígeno disuelto (5,78 mg/L). Después de 24 horas se contabilizaron los nauplios que presentaban movimiento (vivos) y los que no presentaban movimiento (muertos), para el caso del control positivo se usó dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) el cual a bajas concentraciones (10 ppm, 15 ppm) produjo una inhibición total de 100% (Tabla 20).

Tabla 20. Porcentaje de mortalidad producido por dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Concentración (ppm)	Inicio	Vivos	Muertos	%Mortalidad	Promedio de Mortalidad
15	10	0	10	100%	100%
	10	0	10	100%	
	10	0	10	100%	
10	10	0	10	100%	100%
	10	0	10	100%	
	10	0	10	100%	
5	10	2	8	77,7%	81%
	10	2	8	77,7%	
	10	1	9	88,8%	
2,5	10	3	7	66,6%	70%
	10	3	7	66,6%	
	10	2	8	77,7%	
1	10	5	5	44,4%	41%
	10	5	5	44,4%	
	10	6	4	33,3%	
Blanco (Agua salina)	10	9	1	10%	10%
	10	9	1	10%	
	10	9	1	10%	

Con la cantidad de muertos por concentración de la Tabla 20 se determinó la concentración letal media (CL_{50}) del $K_2Cr_2O_7$ con el análisis de regresión Probit (Anexo 6), la cual fue de 1,21 ppm (Tabla 21).

Tabla 21. Concentración letal media del dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

Concentración Letal Media (CL_{50})		1,21 ppm
Concentraciones límites (ppm) con un IC 95%	**Límite inferior**	0,701 ppm
	Límite superior	1,682 ppm

ppm=mg/L

En la figura 15 se observa el comportamiento del porcentaje de mortalidad frente a la concentración de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), se observa que la mortalidad presenta una relación directamente proporcional a la concentración empleada.

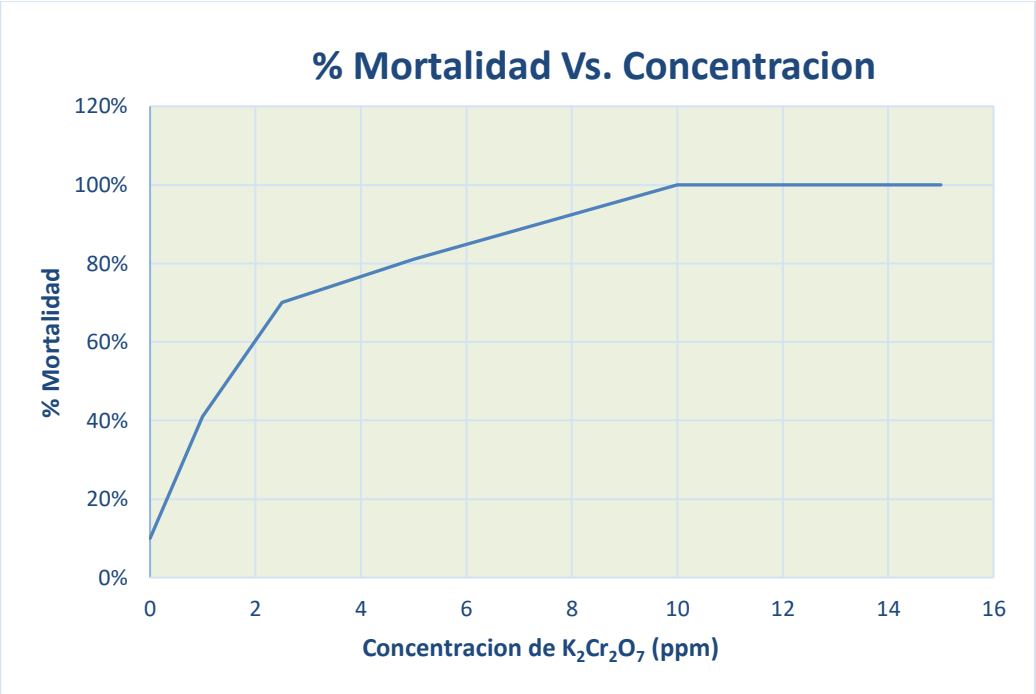


Figura 15. Curva de % de mortalidad frente a concentración de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)

4.3.2 Oleorresina de "copaiba"

Para la muestra de oleorresina de "copaiba", se observó que a una concentración de 100 ppm se produjo un porcentaje de mortalidad del 77,7% y en el control negativo de agua salina y dimetilsulfóxido se obtuvo 1 nauplio muerto lo cual representa el 10% de mortalidad (Tabla 22) lo cual indica que la prueba cumple con los requisitos.

Tabla 22. Porcentaje de mortalidad producido por oleorresina de copaiba

Concentración (ppm)	Inicio	Final	Muertos	% Mortalidad	Promedio de Mortalidad
100	10	2	8	77,7%	77,7%
	10	2	8	77,7%	
	10	2	8	77,7%	
50	10	4	6	55,5%	55,5%
	10	4	6	55,5%	
	10	4	6	55,5%	
25	10	6	4	33,3%	33,3%
	10	6	4	33,3%	
	10	6	4	33,3%	
12,5	10	7	3	22,2%	25,9%
	10	7	3	22,2%	
	10	6	4	33,3%	
6,25	10	7	3	22,2%	22,2%
	10	7	3	22,2%	
	10	7	3	22,2%	
Blanco	10	9	1	10%	10%
	10	9	1	10%	
	10	9	1	10%	
DMSO 0,4%	10	9	1	10%	10%
	10	9	1	10%	
	10	9	1	10%	

La concentración letal media (Cl_{50}) se determinó:

- A partir del número de nauplios muertos (sin movimiento)
- Con el análisis de regresión de Probit (Anexo 6), la cual fue de 44,42 ppm (Tabla 23) y este valor según la clasificación del CYTED es altamente tóxico (Tabla 7).

Tabla 23. Concentración letal media de oleorresina de copaiba

Concentración Letal Media (CL_{50})		44,42 ppm
Concentraciones límites (ppm) con un IC 95%	**Límite inferior**	24,897 ppm
	Límite superior	78,178 ppm

ppm= mg/L

La figura 16 describe aumento del porcentaje de mortalidad frente a las diversas concentraciones encontrándose que tiene una relación directamente proporcional

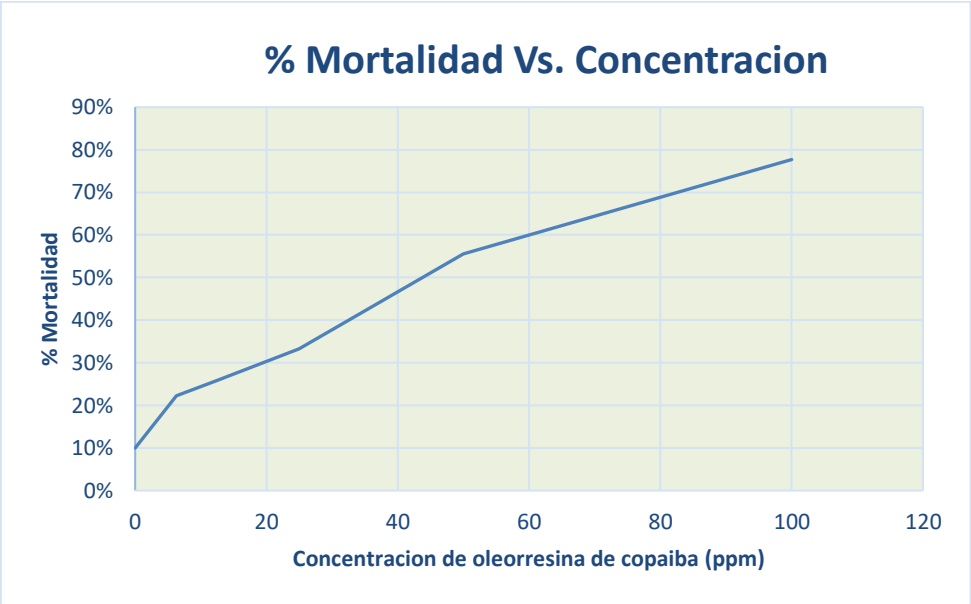


Figura 16. Curva de % de mortalidad frente a concentración de oleorresina

4.4 Toxicidad en *Lactuca sativa*

4.4.1 Control positivo

Los parámetros del agua mineral fueron: Salinidad (0,39 g/L), pH (7,83), oxígeno disuelto (5,31 mg/L). Terminados los 5 días de exposición se procedió a realizar el conteo placa por placa, se consideró que una semilla germinada es aquella donde el tamaño de la radícula es mayor o igual a 3mm. Los resultados se expresaron como la media más la desviación estándar (SD), para el caso del blanco se usó agua mineral (Tabla 24).

Tabla 24. Valores de porcentaje de germinación (%G) y porcentaje de inhibición (%I) en semillas de *Lactuca sativa* por concentración de $ZnSO_4$

Concentración (ppm)	Inicio	Replicas	Semillas Germinadas	% G ± SD	% I
1000	20	P1	0	0%[a]	100%
	20	P2	0		
	20	P3	0		
800	20	P1	2	8,8% ± 6,56[a]	91,2%
	20	P2	3		
	20	P3	0		
600	20	P1	12	68,4% ± 4,29[b]	31,6%
	20	P2	14		
	20	P3	13		
400	20	P1	19	96,5% ± 4,96[c]	3,5%
	20	P2	17		
	20	P3	19		
200	20	P1	20	86% ± 13,81[b,c]	14%
	20	P2	14		
	20	P3	15		
Blanco (Agua mineral)	20	P1	19	95% [c]	-
	20	P1	19		
	20	P1	19		

n=3, CV (Blanco)= 27,25, *Los superíndices (a, b, c) con letra diferente en una misma columna indica diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0,05

Con los datos de la tabla 24 y según el análisis de Tukey para germinación (Anexo 7), se refleja que respecto al control las concentraciones de 600 ppm, 800 ppm, 1000 ppm presentan diferencia significativa mientras que las concentraciones de 200 ppm y 400 ppm no presentan diferencia significativa con respecto al control.

Debido a que se tuvo un porcentaje de inhibición mayor a 50% se procedió a calcular el valor de la concentración letal media CL_{50} mediante el análisis Probit (Anexo 6) lo cual nos dio un valor 591,194 ppm (Tabla 25).

Tabla 25. Concentración letal media del sulfato de zinc ($ZnSO_4$)

Concentración Letal Media (CL_{50})		591,194 ppm
Concentraciones límites (ppm) al 95% de confianza	**Límite inferior**	522,247 ppm
	Límite superior	664,439 ppm

ppm=mg/L

La Figura 17 describe el comportamiento del porcentaje de germinación frente a las diversas concentraciones de sulfato de zinc observándose que conforme aumenta la concentración el porcentaje de germinación va disminuyendo hasta alcanzar el 0 % de germinación a una concentración de 1000 ppm.

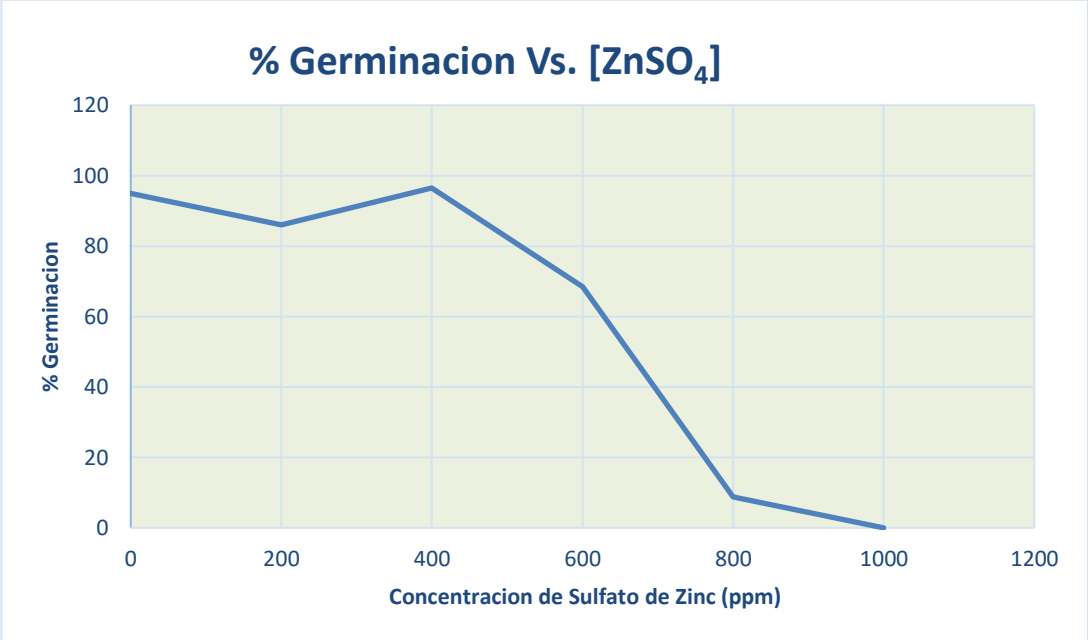


Figura 17. Curva % Germinación frente a concentración de $ZnSO_4$

La figura 18 describe los efectos de cada concentración de $ZnSO_4$ en las semillas de *Lactuca sativa* y se observa que conforme va aumentando la concentración se llega a un porcentaje de inhibición del 100% para la concentración de 1000 ppm lo cual se aprecia al no verse ninguna semilla germinada y en la Tabla 26 se describen los valores promedio de elongación de radícula e hipocótilo por efecto del $ZnSO_4$ (Anexo 8).

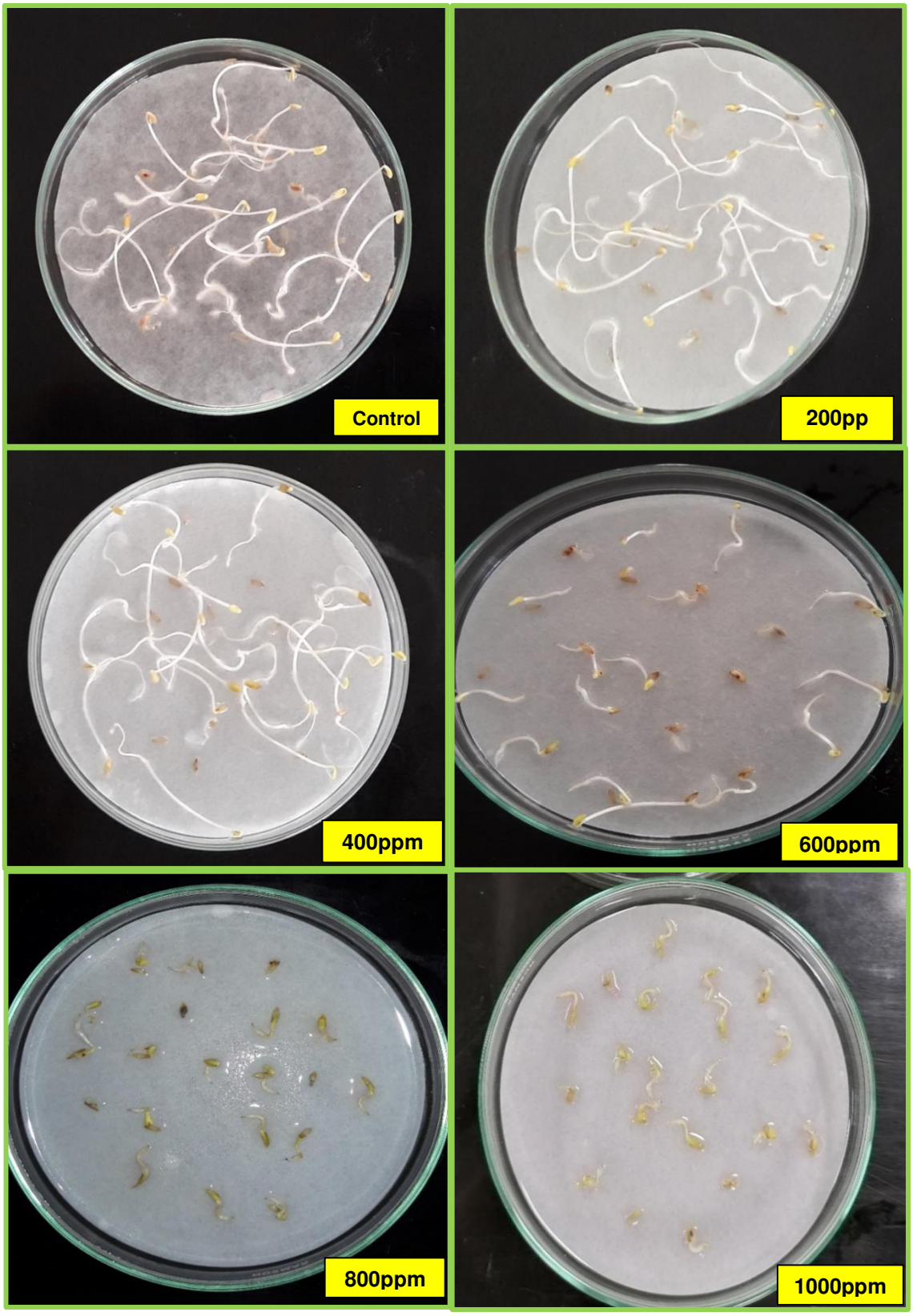


Figura 18. Efecto de las concentraciones de $ZnSO_4$ en semillas de *Lactuca sativa*

Tabla 26. Valores de elongación de radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa* por concentración de $ZnSO_4$

Concentración (ppm)	Promedio radícula (mm) ± SD	Promedio hipocótilo (mm) ± SD
1000	0,2 ± 0,5^a mm	5,2 ± 2,1^a mm
800	1,3 ± 1,1^a mm	4,7 ± 3,2^a mm
600	3,4 ± 2,2^a mm	9,5 ± 5,5^a mm
400	19,5 ± 8,7^b mm	24,2 ± 10,3^b mm
200	18,7 ± 12,2^b mm	21,1 ± 13,3^b mm
Blanco (Agua mineral)	18,12 ± 4,94^b mm	28 ± 5,54^b mm

n=20, *Los superíndices (a, b) con letra diferente en una misma columna indica diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0,05

En la tabla 26 se observa que con respecto al control (agua mineral) tanto en radícula e hipocótilo las concentraciones más altas (600 ppm, 800 ppm, 1000 ppm) presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (Anexo 9), además a partir de la concentración de 600 ppm se observa una marcada disminución del tamaño de elongación tanto de radícula como hipocótilo, sin embargo, a 200 ppm y 400 ppm no presentan significancia estadística con respecto al control.

4.4.2 Oleorresina de "copaiba"

La Tabla 27 representa los valores del porcentaje de germinación e inhibición luego de 120 horas de exposición (5 días), los valores son expresados como la media más la desviación estándar (SD). Se observa que a una concentración de 2000 ppm se logra un porcentaje de germinación (%G) de 71,9% siendo esta concentración muy tóxica y un porcentaje de inhibición (%I) de 28,1% mientras que los controles negativos no presentaron diferencia significativa para el porcentaje de germinación e inhibición, además los valores de 2000 ppm y 1600 ppm presentaron significancia estadística para todos los demás tratamientos incluido el control según el análisis de Tukey (p<0,05) (Anexo 10).

Tabla 27. Porcentaje de germinación e inhibición producido por oleorresina de copaiba en semillas de *Lactuca sativa*

Concentración (ppm)	Inicio	Replicas	Semillas Germinadas	%G ± SD	%I
2000	20	P1	14	71,9% ± 2,48[a]	28,1%
	20	P2	13		
	20	P3	14		
1600	20	P1	15	78,9%[b]	21,1%
	20	P2	15		
	20	P3	15		
1400	20	P1	17	91,2% ± 2,48[c]	8,8%
	20	P2	18		
	20	P3	17		
1200	20	P1	18	93% ± 2,48[c]	7%
	20	P2	17		
	20	P3	18		
1000	20	P1	18	93% ± 2,48[c]	7%
	20	P2	18		
	20	P3	17		
Blanco (Agua mineral)	20	P1	19	95% [c]	-
	20	P2	19		
	20	P3	19		
Blanco (DMSO 0,4%)	20	P1	19	95% [c]	-
	20	P2	19		
	20	P3	19		

n= 3, $CV_{(agua\ mineral)}$= 27,25, $CV_{(DMSO)}$= 28,17.*Los superíndices (a, b, c) con letra diferente en una misma columna indica diferencias significativas según la prueba de Tukey p<0,05

Debido a que los porcentajes de inhibición de cada uno de los tratamientos fue menor al 50% se calcularon los valores de NOEC (concentración mayor donde el efecto no es apreciable) Y LOEC (concentración menor en la cual el efecto es observado) para ello se usó el análisis estadístico por el método de Dunnett para comparar las diferencias significativas de cada tratamiento con respecto al grupo control (Anexo 11). Según el análisis de Dunnett el valor del NOEC fue de 1400 ppm y el valor del LOEC 1600 ppm (Tabla 28) lo cual nos indica que a una concentración de 1600 ppm recién se comienza a observar efectos significativos p<0,05 en nuestro caso los efectos fueron sobre la germinación de semillas.

Tabla 28. Valores de NOEC Y LOEC según análisis de Dunnett (p<0,05)

Tratamiento	Significancia (p)
2000 ppm	0,0 *
1600 ppm (LOEC)	0,0 *
1400 ppm (NOEC)	0,297
1200 ppm	0,853
1000 ppm	0,853
Control negativo (Agua)	1

*: Indica diferencias significativas p<0,05

Las Figuras 19 y 20 describen el comportamiento que posee el % de germinación y % de inhibición respectivamente frente a las concentraciones de oleorresina de "copaiba".

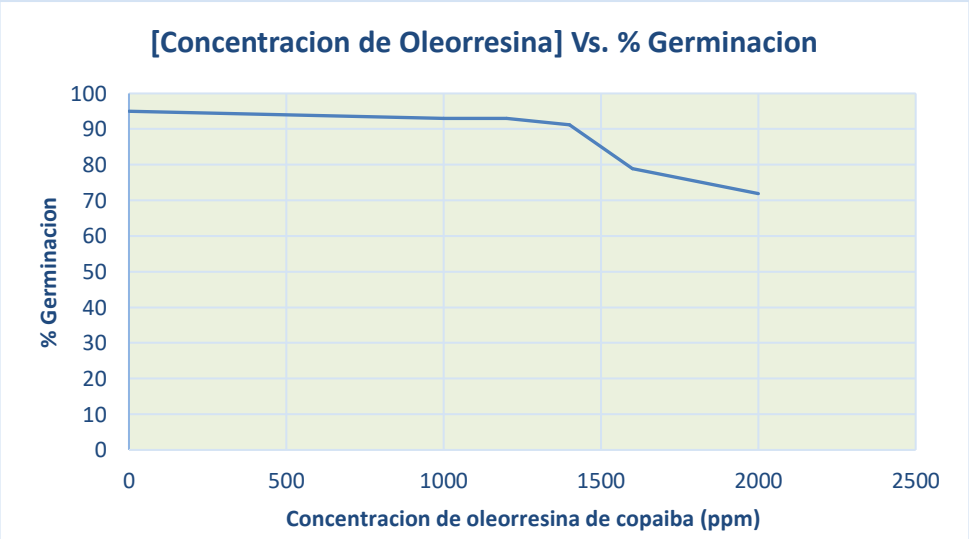


Figura 19. Curva de % germinación semillas de *Lactuca sativa* frente a concentración de oleorresina

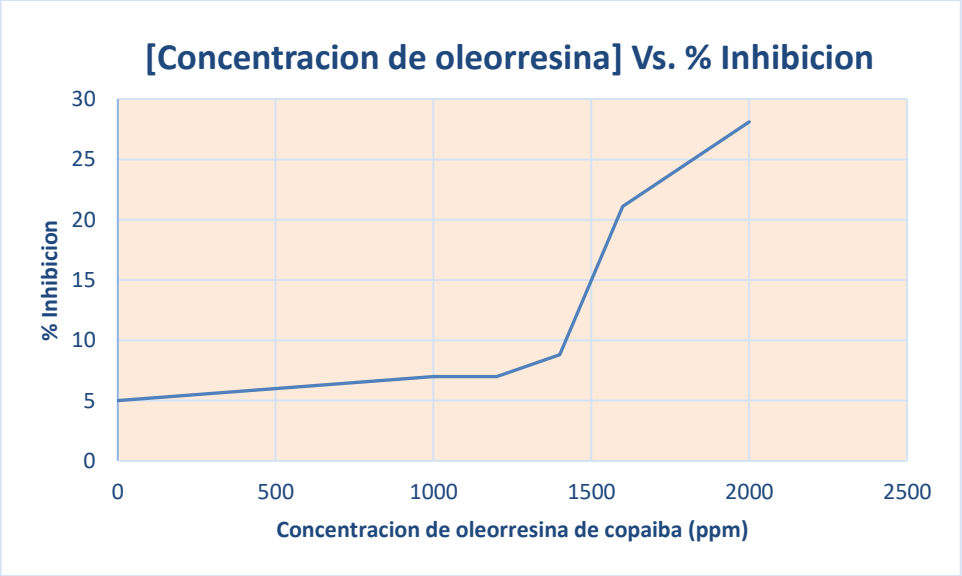
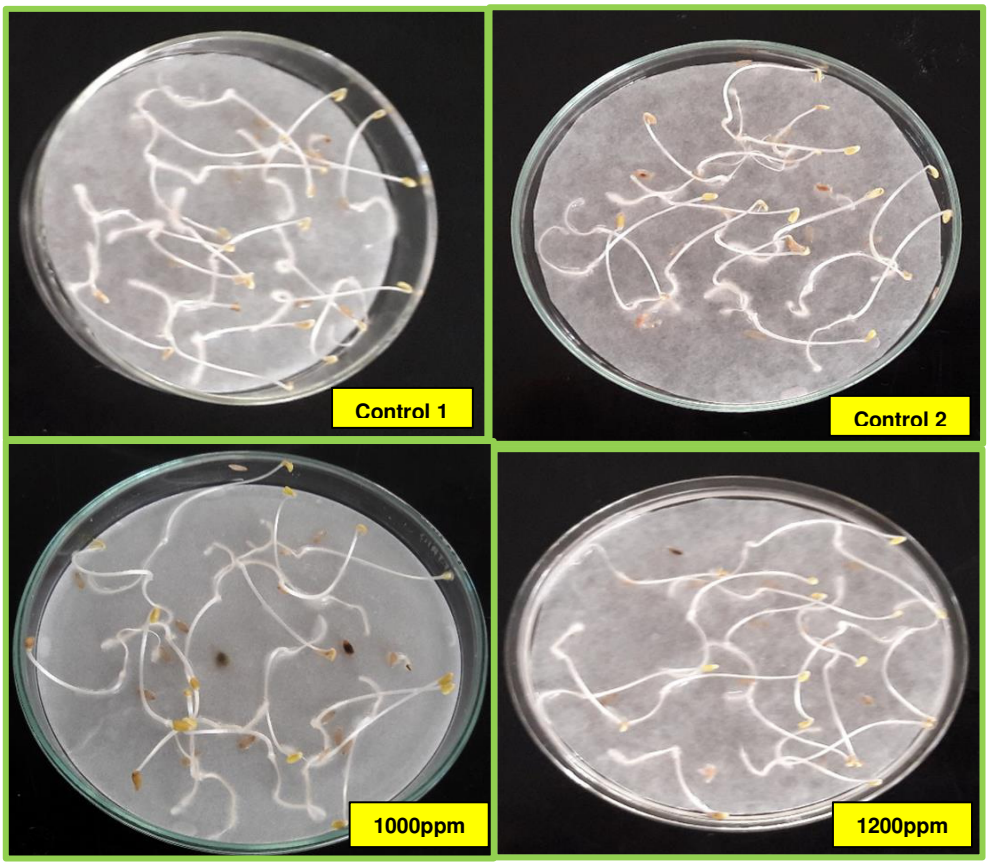


Figura 20. Curva de % Inhibición semillas de *Lactuca sativa* frente a concentración de oleorresina

La figura 21 describe los efectos de cada concentración de oleorresina de "copaiba" en las semillas de *Lactuca sativa* en este caso se observa que las concentraciones límites de 1600 ppm y 2000 ppm poseen diferencias macroscópicas tanto en la germinación y aspecto de las plántulas con respecto a los controles, en la Tabla 29 se describen los valores promedio de elongación tanto para radícula e hipocótilo (Anexo 12).



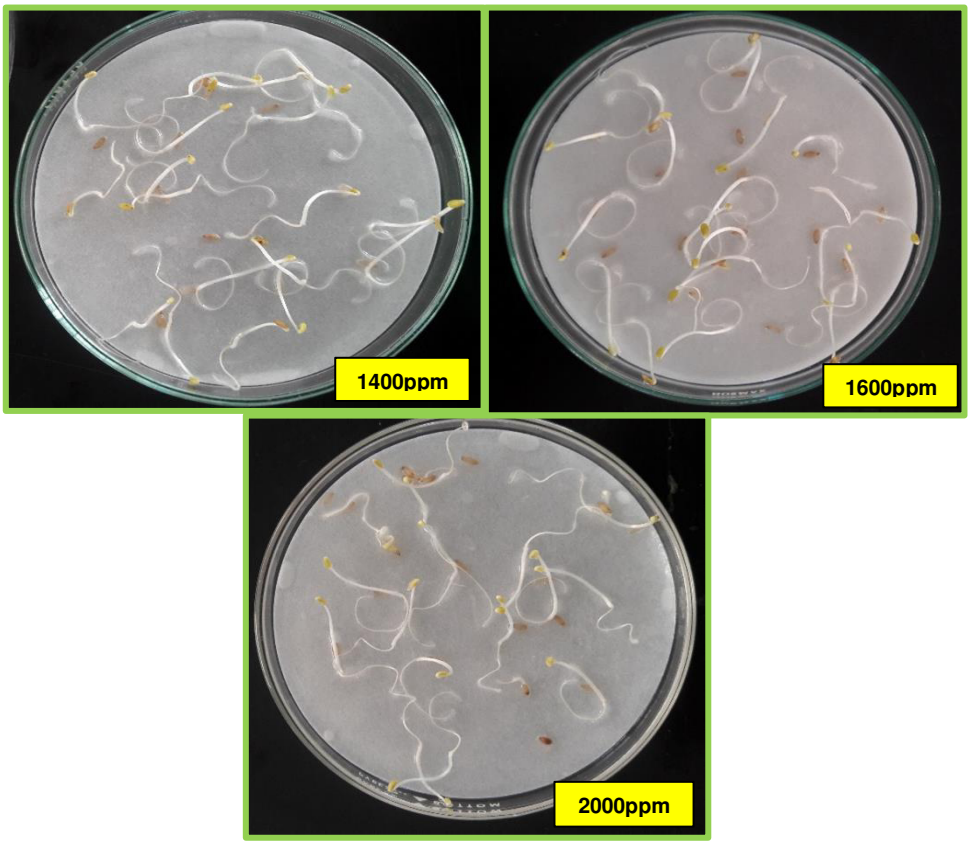


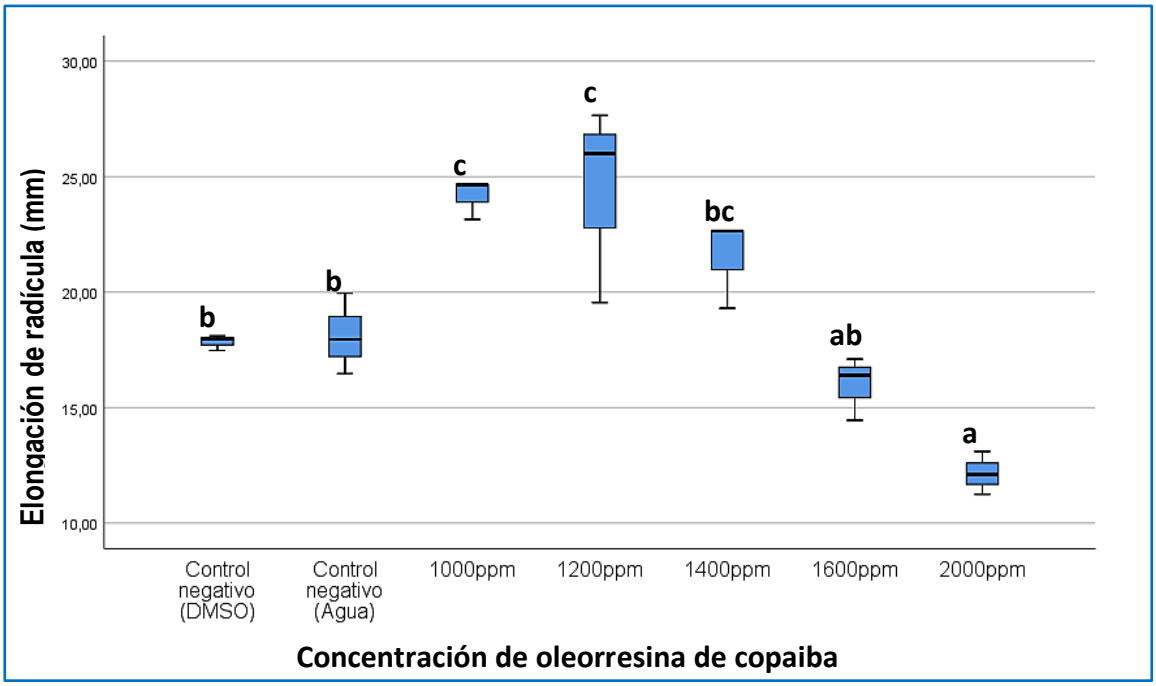
Figura 21. Efecto de las concentraciones de oleorresina de "copaiba" en semillas de *Lactuca sativa* (Control 1: DMSO 0,4%, Control 2: Agua mineral)

Tabla 29. Valores de elongación de radícula e hipocótilo de *Lactuca sativa* por concentración de oleorresina de "copaiba"

Concentración (ppm)	Promedio radícula (mm) ± SD	Promedio hipocótilo (mm) ± SD
2000 ppm	12,15 ± 8,37^{a}	13,47 ± 8,87^{a}
1600 ppm	15,98 ± 11,26^{ab}	13,07 ± 8,95^{a}
1400 ppm	21,53 ± 9,76^{bc}	18,12 ± 7,73^{b}
1200 ppm	24,4 ± 11,22^{c}	18,3 ± 8,1^{b}
1000 ppm	24,15 ± 10,7^{c}	20,17 ± 8,53^{b}
Blanco (Agua mineral)	18,12 ± 4,94^{b}	28 ± 5,54^{c}
Blanco (DMSO 0,4%)	17,84 ± 5,03^{b}	27,32 ± 8^{c}

*Los superíndices (a, b, c) con letra diferente en una misma columna indica diferencias significativas según la prueba de Tukey $p<0,05$

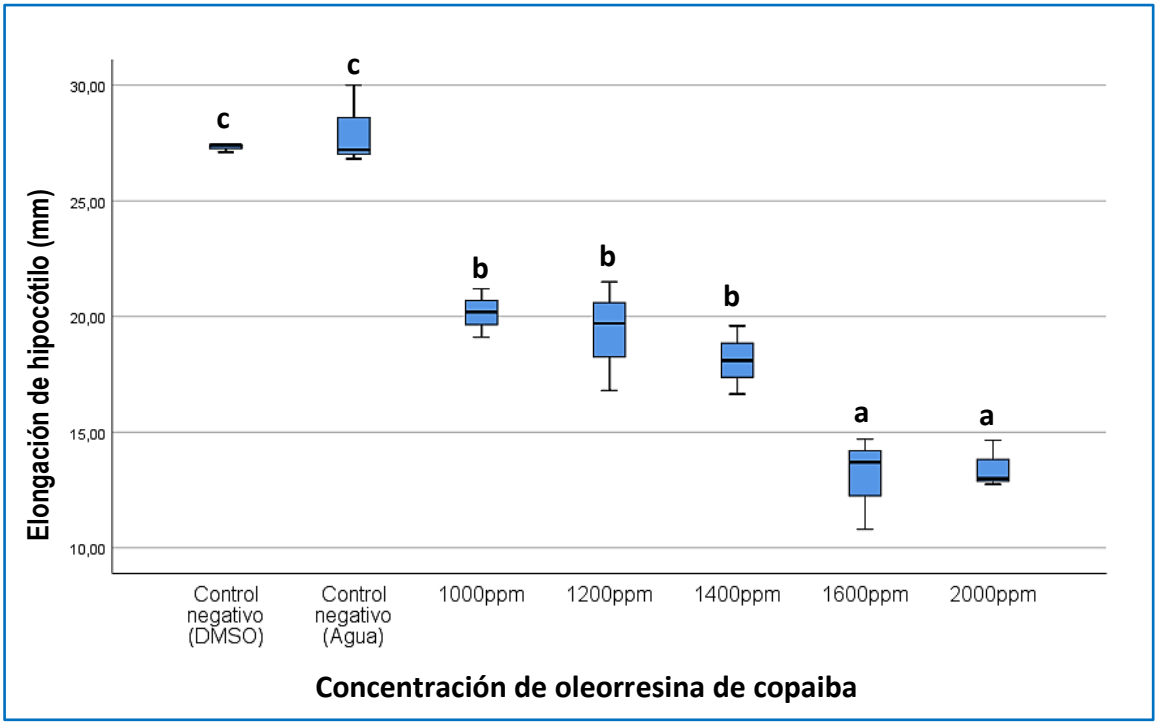
Con los valores de la Tabla 29 se observa que en el caso de elongación de la radícula a una concentración de 1200 ppm se tiene el valor más alto de elongación (24,4 ± 11,22 mm) siendo incluso mayor que los dos controles negativos (agua mineral y DMSO) lo cual indica que a esta concentración y también en las concentraciones de 1000 ppm y 1400 ppm la elongación de la radícula presenta una estimulación ,además a partir de la concentración de 1600 ppm los valores promedio de radícula disminuyen obteniéndose el valor más bajo a una concentración de 2000 ppm (12,15 ± 8,37[a] mm) el cual presenta diferencias significativas (Figura 22) para todos los demás tratamiento excepto con la concentración de 1600 ppm según el análisis de Tukey p<0,05 (Anexo 13).



* Letras diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p<0,05)

Figura 22. Promedio de elongación de la radícula (IC 95%) con respecto a cada concentración de oleorresina de "copaiba" (IC: intervalo de confianza)

Para el caso de elongación del hipocótilo en la Figura 23 se observa que conforme aumenta la concentraciones de 1000 ppm hasta 2000 ppm los valores de elongación van disminuyendo siendo el valor de la concentración de 1600 ppm el menor de todos (13,47 ± 8,87 mm), además los valores de los controles negativos para elongación de hipocótilo no presentan diferencias significativas, también se observa que el grupo de concentraciones de 1000 ppm , 1200 ppm , 1400 ppm son estadísticamente significativos a las concentraciones de 1600 ppm y 2000 ppm según el análisis de Tukey p<0,05 (Anexo 13).



* Letras diferentes (a, b, c) indican diferencias significativas según la prueba de Tukey (p<0,05)

Figura 23. Promedio de elongación del hipocótilo (IC 95%) con respecto a cada concentración de oleorresina de "copaiba" (IC: intervalo de confianza)

La tabla 30 representa los valores de porcentaje de Inhibición/Estimulación para cada concentración con respecto al valor del control. Para el caso de la radícula se tiene que las tres primeras concentraciones de 1000 ppm, 1200 ppm, 1400 ppm, presentan estimulación con respecto el control y a partir de la concentración de 1600 ppm se observa inhibición por el signo negativo (Figura 24).

Tabla 30. Porcentaje de Inhibición/Estimulación para radícula e hipocótilo con respecto al control

Concentración (ppm)	%Inhibición/Estimulación (Radícula)	%Inhibición/Estimulación (Hipocótilo)
2000 ppm	-21,63%	-51,07%
1600 ppm	-11,81%	-53,32%
1400 ppm	18,81%	-35,28%
1200 ppm	34,65%	-34,64%
1000 ppm	33,28%	-27,96%
Blanco (Agua mineral)	0%	0%
Blanco (DMSO 0,4%)	0%	0%

(-): Inhibición

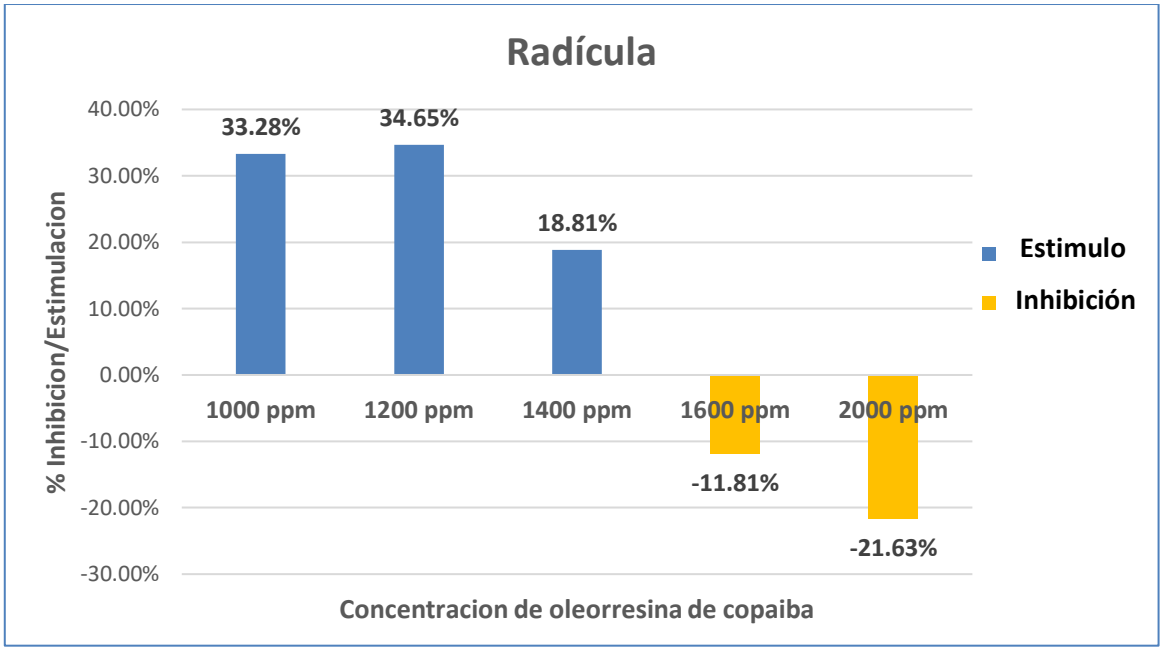


Figura 24. Porcentaje de Inhibición/Estimulación en la elongación de la radícula con respecto a cada concentración de oleorresina de “copaiba”

En el caso del hipocótilo se observa que en todos los tratamientos (1000 ppm a 2000 ppm) se obtuvo valores de inhibitorios con respecto a los controles negativos (Figura 25) teniéndose el 53,32% y 51,07% de inhibición para las concentraciones más altas probadas (1600 ppm y 2000 ppm) lo cual indica que la concentración de oleorresina a estas concentraciones posee un efecto inhibitorio en la elongación del hipocótilo.

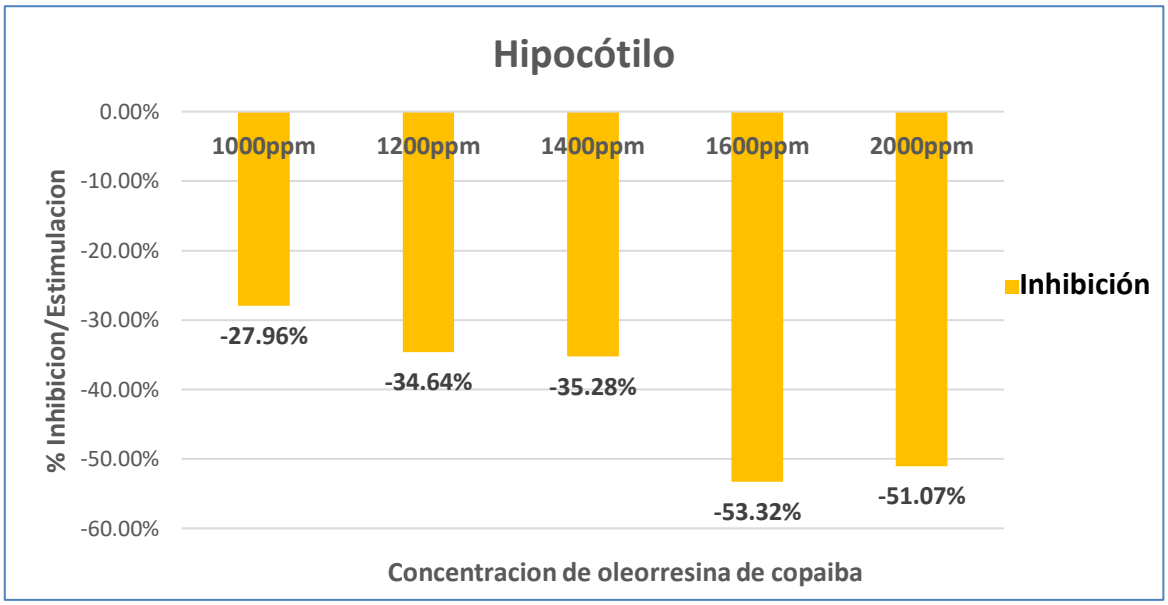
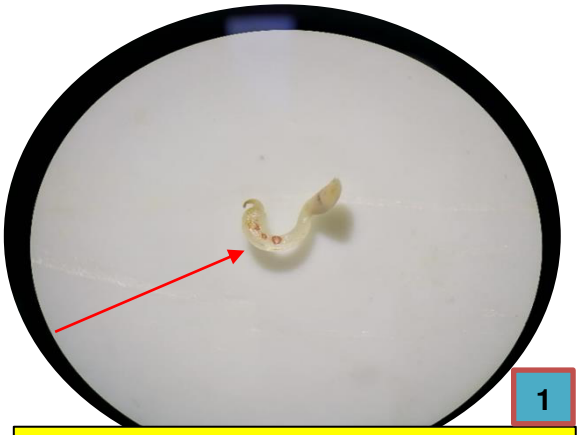


Figura 25. Porcentaje de Inhibición/Estimulación en la elongación del hipocótilo con respecto a cada concentración de oleorresina de copaiba

4.4.3 Fitotoxicidad

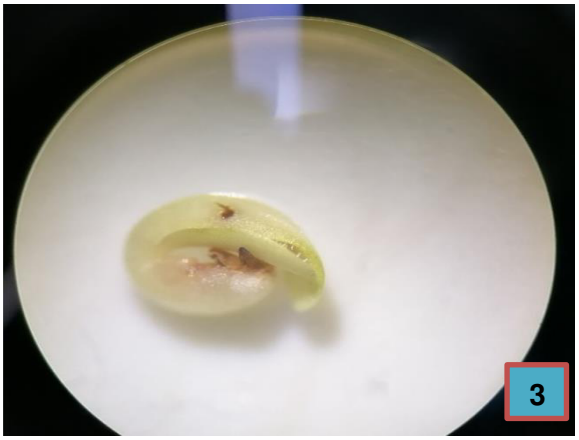
Al momento de registrar los valores de radícula e hipocótilo para cada una de las concentraciones de oleorresina se presentaron efectos característicos los cuales representan los efectos fitotóxicos (efectos subletales) en las plántulas de *Lactuca sativa* dichos efectos se observaron con un estereoscopio (Figura 26). En las concentraciones extremas de 1600 ppm y 2000 ppm se observaron manchas de necrosis tanto en los cotiledones como en el hipocótilo (1 y 4), conforme la concentración aumentaba se observa que algunas plántulas germinaban de manera anormal solo tenían cotiledón pero no radícula (3) y en la placa de 1400 ppm se observó que el papel filtro se impregno de una mancha rojiza (2), en las concentraciones de 1000 ppm, 1200 ppm, 1400 ppm se observaron crecimientos ensortijados en la radícula, el crecimiento de una segunda radícula que siempre fue de menor tamaño que la radícula principal (5 y 6); los pelos absorbentes se hicieron menos visibles en las concentraciones de 1600 ppm y 2000 ppm (7).



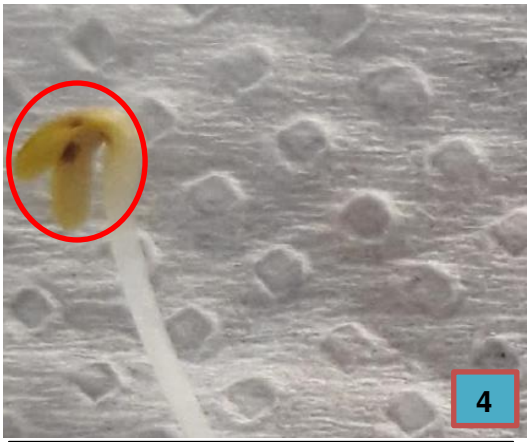
Manchas pardas en hipocótilo (Necrosis)



Manchas en papel filtro



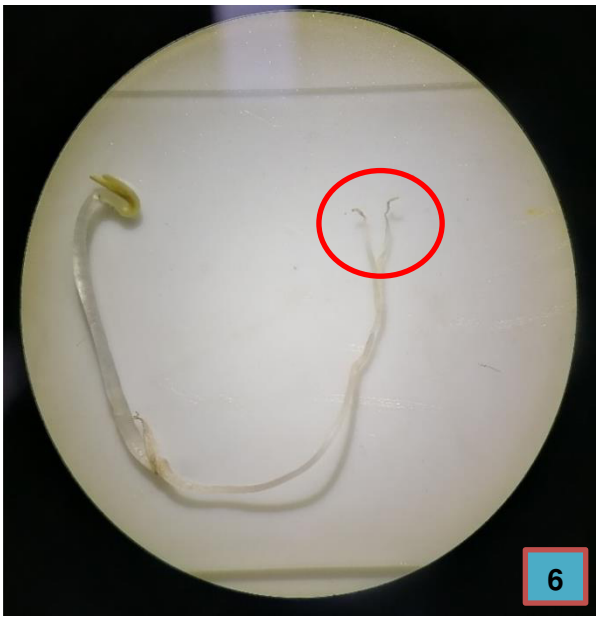
Germinación anormal (Cotiledón sin radícula)



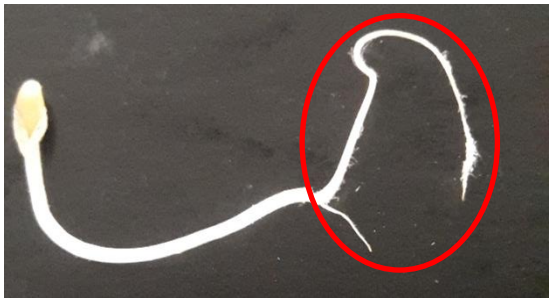
Manchas en cotiledones (Necrosis)

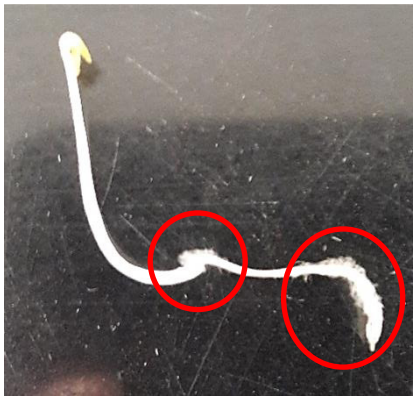


Crecimiento de doble raíz y radícula ensortijada



Crecimiento de doble raíz





7

Disminución en el desarrollo de pelos absorbentes

Figura 26. Efectos fitotóxicos producidos por la oleorresina de copaiba a diferentes concentraciones

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, los resultados de la caracterización fisicoquímica de la oleorresina de *Copaifera reticulata* "copaiba" se detallan en las tablas 9 a 18, dentro de los cuales destacan: el Índice de acidez (40 ± 1,13 mg NaOH/g o 27,65% p/p de ácido oleico), índice de peróxido (2,51 ± 0,07 meq O_2/kg), índice de saponificación (115,16 ± 2,8 mg KOH/g), índice de yodo (98,87 ± 2,3 cg I_2/g) los cuales son característicos de aceites y grasas, dichos resultados si bien no tienen un valor o rango establecido, muchos de ellos se acercan a los obtenidos en diferentes estudios como el de Yaringaño donde la caracterización fue la siguiente: Índice de acidez (31,19% p/p de ácido oleico), índice de peróxido (0,2 meq O_2/Kg), índice de saponificación (188,84 mg KOH/g), índice de yodo (98,45 cg I_2/g)[70]; en otro estudio realizado en la amazonia brasileña las propiedades fisicoquímicas de la oleorresina de *Copaifera reticulata* fueron: Índice de acidez (17,99% p/p de ácido oleico), índice de yodo (189,1 cg I_2/100g), índice de saponificación (48,6 mg KOH/g)[71]; en otra investigación en la floresta nacional de Tapajós (Brasil), los índices hallados en la oleorresina de árboles maduros de *Copaifera reticulata* fueron: Índice de acidez (9,62 - 10,17 mg KOH/g o 6,5 - 7,0 % p/p de ácido oleico), índice de saponificación (100,63 - 109,84 mg KOH/g)[72]. De lo descrito anteriormente se observa que para cada caso la caracterización fisicoquímica es propia, pero se presenta una cierta variación en los resultados lo cual se debe a las diferencias genéticas que presentan las especies del género *Copaifera sp.* que es influenciada por factores externos como clima, suelo y condiciones de cultivo de cada especie[73].

En la tabla 19 , el tamizaje fitoquímico evidencio la presencia cualitativa en mayor proporción de azúcares reductores (+++), seguidos por los terpenos (++) y en menor proporción los flavonoides (+), estos dos últimos componentes se relacionan a efectos de toxicidad en plantas como el estudio de Cámara donde demuestra que los monoterpenos y sesquiterpenos presentan toxicidad frente a organismos cultivados en laboratorio[74] y en el caso de los flavonoides la investigación de Dos Santos demuestra que la presencia de estos constituyentes genera efectos fitotóxicos y genotóxicos en semillas de *Lactuca sativa*[75].

Con respecto al **bioensayo en *Artemia salina*** la oleorresina de “copaiba” produjo un porcentaje de mortalidad que aumenta con cada concentración empleada (Tabla 22), obteniéndose un 77,7% de mortalidad a la concentración de 100 ppm, además la

concentración letal media producida por la oleorresina fue de 44,42 ppm la cual se clasifico como altamente tóxica según la clasificación de toxicidad del CYTED[64]; por otra parte, en otra investigación la oleorresina de *Copaifera langsdorffii* propia del Brasil no presento toxicidad para *Artemia salina* al presentar un porcentaje de mortalidad de 0% a una concentración de 2000 ppm[76]; otro estudio demostró que la oleorresina de *Copaifera officinalis* presenta un nivel de toxicidad ligeramente tóxico al presentar una Cl_{50} de 537,1 ppm para *Artemia salina*[77]. Cabe destacar que los resultados mostrados demuestran que la oleorresina de las especies del género *Copaifera* presentan diferentes niveles de toxicidad lo cual podría deberse a las diferentes zonas geográficas de recolección de la oleorresina (Perú-Brasil) y a los diferentes modos de cultivo de la especie[78].

Respecto al **bioensayo en *Lactuca sativa*** no existen estudios *in vitro* reportados sobre toxicidad realizados a oleorresinas, en nuestro estudio se demostró que la oleorresina de "copaiba" (*Copaifera reticulata*) presento efectos de toxicidad a partir de las concentraciones de 1600 ppm y 2000 ppm los cuales fueron estadísticamente significativos ($p<0,05$) con respecto al control con un porcentaje de germinación de 78,9% y 71,9% respectivamente (Tabla 27), lo cual según el estudio de Poi son clasificadas como concentraciones tóxicas para la germinación[68].

En la tabla 28 se verifica que las concentraciones de 1400 ppm y 1600 ppm según el análisis de Dunnett fueron los valores del NOEC y LOEC respectivamente, es decir que a la concentración de 1600 ppm recién se empezará a observarse los efectos de toxicidad.

En la figura 20 se observa que el porcentaje de inhibición fue menor a 50% por lo que no se calculó la concentración letal media; además los coeficientes de variación (CV) de la radícula fueron menores a 30 para los controles negativos, en el caso del agua mineral (27,25) y en el DMSO (28,17) lo cual según el trabajo realizado por Bohórquez los coeficientes de variación menores a 30 indican buena reproducibilidad de la prueba[79].

En la tabla 29, se aprecia que los valores de elongación de radícula en las concentraciones de 1000 ppm a 1400 ppm presentan valores mayores respecto a los valores de elongación de los controles negativos (Agua mineral y DMSO), este resultado es contrastado por distintos estudios de toxicidad *in vitro* de aceites esencial

y extractos acuosos en los cuales las concentraciones menores tuvieron un efecto estimulante en la radícula respecto a los valores de los controles negativos[80].

En la tabla 30, la elongación del hipocótilo en todas las concentraciones probadas obtuvo una inhibición significativa ($p<0,05$) con respecto a los controles negativos alcanzando en las concentraciones de 1600 ppm y 2000 ppm una inhibición mayor al 50% (53,32% y 51,07% respectivamente) y en el caso de la radícula solo se alcanzó el 21,63% de inhibición en la concentración de 2000 ppm esto demuestra que el hipocótilo presenta mayor sensibilidad frente a la radícula a los efectos fitotóxicos producidos por la oleorresina de “copaiba”.

En la Figura 26, se observa los cambios fitotóxicos visibles como: manchas pardas en el hipocótilo y en los cotiledones lo cual indica necrosis, germinación anormal (cotiledón sin radícula), manchas en el papel filtro, presencia de doble raíz ,radícula con ápices ensortijados y disminución de pelos absorbentes tales cambios también se corroboraron en la investigación de Huanca el cual presencio ausencia de pelos absorbentes, ápices ensortijados en la radícula, necrosis en hipocótilo, cotiledón y radícula[81] cabe destacar que estos efectos fitotóxicos son dependientes de la concentración de oleorresina ya que dependiendo de la concentración el efecto fitotóxico será diferente.

6. CONCLUSIONES

- La oleorresina de “copaiba” (*Copaifera reticulata* Ducke) presentó las siguientes características fisicoquímicas: Índice de acidez 40 ± 1,13 mg NaOH/g, Índice de peróxido 2,51 ± 0,07 meq O_2/kg, índice de saponificación 115,16 ± 2,8 mg KOH/g, índice de yodo 98,87 ± 2,3 cg I_2/g, índice de refracción 2,504, pH 4,5 viscosidad 283,1 ± 8,5 cp, humedad y materia volátil 45,52 ± 1,68 %, densidad 0,9478 ± 0,0017 g/mL, miscible en cloroformo y dimetilsulfóxido.
- La oleorresina de “copaiba” (*Copaifera reticulata* Ducke) presentó un efecto altamente tóxico para *Artemia salina* teniendo como valor de concentración letal media (CI_{50}) 44,42 ppm.
- La oleorresina de “copaiba” presentó en semillas de *Lactuca sativa* efectos tóxicos significativos para las concentraciones de 1600 ppm y 2000 ppm (%G<90%), además presentó efectos fitotóxicos como: necrosis en hipocótilo y cotiledón, crecimiento de doble raíz, ensortijamiento de la radícula, germinación anormal (cotiledón sin radícula) y disminución de los pelos absorbentes.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios posteriores para evaluar la toxicidad *in vitro* de la oleorresina de “copaiba” (*Copaifera reticulata* Ducke) en cultivos celulares.
- Realizar la caracterización fisicoquímica de la oleorresina de “copaiba” de las diferentes especies del género *Copaifera sp*. para establecer para establecer protocolos de control de calidad.
- Evaluar la toxicidad *in vitro* de la oleorresina de “copaiba” (*Copaifera reticulata* Ducke) en otros bioensayos.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Paredes J. Estudio de Pre-Factibilidad para la comercialización de aceite de copaiba en lima metropolitana y los principales mercados en el extranjero (Estados Unidos, Francia y Alemania). [Tesis para optar el Título Profesional de Ingeniero Industrial]. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú; 2012.

2. Toro L, Robles N, Trigos D, Trujillo J, Torres M. Uso de los recursos de la Biodiversidad estudio de caso de la Oleorresina de Copaiba (*Copaifera spp*) en la medicina tradicional en el departamento del Meta-Colombia. RIAA. 2020; 11(1): 53-64. DOI: https://doi.org/10.22490/21456453.3091

3. David B, Wolfender J, Dias A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. Phytochem Rev. 2015; 14(2): 299-315.

4. Hubrecht R, Carter E. The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change. Animals. 2019; 9(10): 1-10.

5. Herrero C, García C, Casado M. Copaiba: árbol milagroso de la selva amazónica. Quercus. 2010; 290: 36-41.

6. Veiga V, Pinto A. El género *Copaifera* L. Química Nova. 2002; 25 (2), 273-286.

7. Rigamonte O, Salvador P, Oliveira L. Copaíba: ecología y producción de oleorresina. 1era ed. Rio Branco: Embrapa Acre; 2004.

8. Silva R, Vieira G. Sustainability of extraction and production of copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oleoresin in Manaus, AM, Brazil. For. Ecol. Manag. 2008; 256: 282–288.

9. Herrero C, Casado M, Bichara M, Célia Martins R. Chemical variability of *Copaifera reticulata* Ducke oleoresin. Chem Biodivers. 2011; 8(4): 674-85. DOI: 10.1002/cbdv.201000258.

10. Oliveira J, Silva J, Souza P, et al. Chemistry and Biological Activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) Oleoresins. Molecules. 2012; 17: 3866-3889.

11. Veiga V, Rosas E, Carvalho M, Henriques M, Pinto A. Chemical composition and anti-inflammatory activity of copaiba oils from *Copaifera* cearensis Huber ex Ducke, *Copaifera reticulata* Ducke and *Copaifera multijuga* Hayne-A comparative study. J. Ethnopharmacoly. 2007; 112, 248–254.

12. Moromi N, Ramos P, Villavicencio G, et al. Estudio *in vitro* del Efecto Antibacteriano de la Oleorresina de *Copaifera reticulata* y el Aceite Esencial de *Origanum majoricum*

frente a *Streptococcus mutans* y *Enterococcus Faecalis* bacterias de importancia en patologías orales. Int. J. Odontostomat. 2018; 12 (4): 355-361.

13. Rodríguez D, Mangabeira J, Bianchi T, et al. *Copaifera reticulata* oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. Anaerobe. 2016; 40: 18-27.

14. Ramos D, Castro A. Actividad antibacteriana de *Copaifera reticulata* "copaiba" sobre *Porphyromonas gingivalis* aisladas de pacientes con periodontitis. Odontol. Sanmarquina. 2014; 17(1): 7-11.

15. Pieri F, Souza C, Costa J, Barrero M, et al. Inhibition of *Escherichia coli* from mastitic milk by copaiba oil. Semin Ciencias Agrárias. 2011; 32: 1929–1934.

16. Santos A, Ueda T, Dias B, et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera genus*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2008; 103: 277–281.

17. Veiga V, Zunino L, Calixto J, Patitucci M, Pinto A. Phytochemical and antioedematogenic studies of commercial copaiba oils available in Brazil. Phytother Res. 2001; 15: 476–480.

18. Matos N, Moraes C, Paredes S, et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. J. Ethnopharmacol. 2007; 109(3): 486-492.

19. Santos A, Ueda T, Dias B, et al. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. J Ethnopharmacol. 2008; 120: 204–208.

20. Santos A, Ueda T, Dias B, et al. Copaiba Oil: An Alternative to Development of New Drugs against Leishmaniasis. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 2012; 898419: 1-7.

21. Mencías E, Mayero L. Manual de toxicología básica. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 2000.

22. Klaassen C, Watkins J. Toxicology. 8a ed. Kansas: McGrawHill; 2013.

23. Malachowski M, Goldberg A. Health effects of toxic substances. 2ª ed. Maryland: Government Institute Inc; 1995

24. Peña C, Cartes D, Ayala F. Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental (Toxicología Ambiental). Arizona: The University of Arizona; 2001.

25. Peña C. Tipos de Toxicidad y escalas de valoración. Oncol. 2005; 28 (2) :62-65.

26. Castillo G. Ensayos Toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas, Estandarización, Intercalibración, resultados y aplicaciones. México: IMT; 2004.

27. Langman L, Kapur B. Toxicology: Then and now. Clin. Biochem. 2006; 39(5): 498–510.

28. Roldan E. Introducción a la toxicología. México: FES zaragoza; 2016

29. Repetto M, Repetto G. Toxicología fundamental. 4ta ed. Madrid: Díaz de Santos; 2009.

30. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente. Manual de Evaluación y Manejo de Sustancias toxicas en Agua superficiales. 2a ed. Argentina: OMS; 2001.

31. Gutiérrez J, Salsamendi C. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Madrid: Diaz de Santos; 2001

32. Leos C, Rivas C, García D. Actividad antioxidante y toxicidad. OmniaScience, 2016; 1(2): 41-76.

33. Saona G, Carnikian A, Sposito M, Baklayan P, Espinola J. Sensibilidad de los bioensayos de *Cnesterodon decemmaculatus* y *Pimephales promelas* en una serie de muestras de efluentes y tóxicos de referencia. Latu. 2015; 10: 49-55.

34. Ávila R, Mancilla G, González P, Sandoval C, Torres F. Bioensayos *in vitro* de relevancia en las ciencias biológicas y agropecuarias. Bioagrociencias. 2019; 12(1): 34-41.

35. Henneberger L, Muhlenbrink M, Konig M, Schlichting R, Fischer F, Escher B. Quantifcation of freely dissolved efect concentrations in *in vitro* cell-based bioassays. Arch. Toxicol. 2019; 19: 1-11.

36. Fawaz E, Salam D, Kamareddine L. Evaluation of copper toxicity using site specific algae and water chemistry: Field validation of laboratory bioassays. Ecotox environ safe. 2018; 155: 59-65.

37. Ordoñez A, Jaramillo L, Ibata M, Suárez-Obando F. Técnica de tinta China en células adherentes en cultivo. Nova. 2016; 13 (25): 07-16.

38. Arencibia D, Rosario L, Curveco D. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. Retel. 2003; 40-52.

39. EPA. Environmental Protection Agency. Ecological Effects Test Guideline. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. Washington DC: OPPTS; 1996.

40. Abatzopolulos T, Beardmore J, Clegg J, Sorgeloss P. *Artemia* Basic and applied biology. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2010.

41. Rogers D. Anostraca Catalogus (*Crustacea*: *Branchiopoda*). Raffles Bull. Zool. 2013; 61(2): 525-546.

42. Dumitrascu M. *Artemia salina*. Balneo research journal. 2011; 2(4): 11-14.

43. Discoverlife.org [Internet]. Houston: American Museum of Natural History; 2011 [Citado 22 de marzo 2021]. Disponible en: https://www.discoverlife.org/mp/20q

44. Muñoz J, Gomez A, Green A, Figuerola J, Amat F, Rico C. Phylogeography and local endemism of the native Mediterranean brine shrimp *Artemia salina* (*Branchiopoda*: *Anostraca*). Mol Ecol Resour. 2008; 17(13): 3160-3177.

45. Sanchez Romero A. Efecto de la temperatura sobre el tiempo y la eficiencia de descapsulacion y eclosion en el crustáceo euritermo *Artemia* sp. [Tesis para optar el Grado en Biología]. Bilbao: Universidad del País Vasco; 2017.

46. Asem A. Rastegar N.; De los Rios P. The genus *Artemia* Leach, 1819 (*Crustacea*: *Branchiopoda* Lat. Am J Aquat Res. 2010; 38(3): 501-506. DOI: 10.3856/vol38-issue3-fulltext-14

47. Manfra L, Tornambè A, Savorelli F, Rotini A, Canepa S., Mannozzi M, Cicero M. Ecotoxicity of diethylene glycol and risk assessment for marine environment. J. Hazard. Mater. 2015; 284: 130–135. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2014.11.008

48. Morgana S, Estévez, N, Gambardella C, Faimali M, Garaventa F. A short-term swimming speed alteration test with nauplii of *Artemia franciscana*. Ecotoxicol Environ Saf. 2018; 147: 558–564. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.09.026.

49. Mentor H, Blagica J. Tatjana P. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. Biol Pharm Bull. 2014: 60(1): 9-18.

50. Sundh I, Wilcks A, Goettel M. Beneficial Microorganisms in Agriculture, Food and the Environment:Safety Assessment and Regulation. Wallingford: CABI International; 2012.

51. Parra L, Yhebra R, Sardiñas I, Buela L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (CL50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. Phytomed. 2001; 8: 395-400.

52. Apu A, Bhuyan S, Khatun F, Liza M, Matin M, Hossain F. Assessment of cytotoxic activity of two medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) as an experimental tool.Int. J. Pharm Sci Res. 2013; 4(3): 1125-1130.

53. Freitas A, Fontes I., Andrade L, Techio V. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in

Lactuca sativa L. Ecotox Environ Safe. 2016; 124: 426–434. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.11.017

54. Silveira G, Franco M, Barreto G, Palmieri M, Andrade L. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* and *Lactuca sativa*. chemosphere. 2017;178: 359-367.DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.03.048

55. Priac A, Badot, P, Crini G. Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. C R Biol. 2017; 340(3): 188–194. DOI: 10.1016/j.crvi.2017.01.002

56. Missouri Botanical Garden. Tropicos.org. [Internet]. Saint Louis: Missouri Botanical Garden. 2021 [citado 03 de abril de 2021]. Disponible en: http://www. tropicos.org/Name/2710604.

57. Saavedra G. Manual de producción de lechuga. Santiago: INIA; 2017

58. Vázquez C, Orozco A, Roja M, Sánchez M, Cervantes V. La reproducción de las plantas semillas y meristemos. México: Fondo de Cultura Económica; 1998

59. Sánchez Melo L, Sánchez Ortiz K. Determinación de la concentración de Inhibición media ($CE_{50\text{-}120}$) del Bario, Hierro y Manganeso mediante bioensayos de toxicidad acuática sobre semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). [Tesis para optar el Título de Ingeniero Ambiental y Sanitario]. Bogotá: Universidad de la Salle; 2009.

60. Castillo G. Ensayos toxicológicos y método de evaluación de Calidad de Aguas. México: IMTA; 2004

61. Bagur M, Estepa C, Martín F, Morales S. Toxicity assessment using *Lactuca sativa* L. bioassay of the metal(loid) As, Cu, Mn, Pb and Zn insoluble in water saturated soil extracts from an abandoned mining site. J Soil Sediment. 2011; 11: 281-289.

62. Rodríguez A, Robles C, Ruiz R, López E, Sedeño Jacinto, Rodríguez A. Índices de Germinación y Elongación radical de Lactuca sativa en el Biomonitoreo de la calidad del agua del rio Chalma. Rev. Int Contam Ambie. 2014; 30(3): 307-316.

63. The Unites States Convention. Farmacopea de los Estados Unidos de América: Formulario Nacional, Compendios de normas oficiales. USP 42 – NF 37. Rockville. USA. 2019.

64. CYTED. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Manual de Técnicas de Investigación. Proyecto X-L Búsqueda de principios activos en plantas medicinales. Rev cubana Plant Med. Ciudad de la Habana. 1995; 16(1): 81-83.

65. Saetama V, Vera L, Vanegas M, Cruzat C, Brazales D. Evaluación toxicológica de soluciones acuosas de ibuprofeno mediante bioensayos con *Artemia salina*, *Allium schoenoprasum* L, *Lactuca sativa*. Rev Toxicol. 2018; 35(2): 112–118.

66. Rajabi S, Ramazani A, Hamidi M, Naji T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. DARU J Pharm Sci. 2015; 23(20): 1-6. DOI:10.1186/s40199-015-0105-x.

67. Schmidt W, Redshaw C. Evaluation of biological endpoints in crop plants after exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Implications for phytotoxicological assessment of novel contaminants. Ecotoxicol Environ Saf. 2015; 112: 212–222. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.11.008.

68. Poi de Neiff A, Ramos A. Utilización de *Lactuca sativa* y *Panagrellus redivivus* para el estudio ecotoxicológico de los ríos salado y negro. Facena. 2002; 18: 3-9.

69. El Alam et al. Antifungal and Phytotoxic Activities of Essential Oils: In Vitro Assays and Their Potential Use in Crop Protection. Agron. 2020; 10(825): 1-19. DOI: 10.3390/agronomy10060825.

70. Yaringaño Moreano J. Formulación de una crema dermocosmetica a base de *Mauritia flexuosa* L. f. y *Copaifera reticulata* var. peruviana con efecto regenerador de la piel lesionada en ratones *Mus musculus* Balb c. [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2015.

71. Espitia C, Delgado T, Aperador C. Oleorresina de Copaiba como materia prima para la producción de Biodiesel. Rev Int Contam Ambie. 2018; 34 (2): 317-329.

72. Santos S, De Souza M, Campelo F, Florencio D, Picanco R, Roland C. Análisis fisicoquímico de oleorresina y variabilidad genética de Copaiba de la Floresta Nacional de Tapajos. Pesq agropec bras. 2012; 47 (11): 1621-1628.

73. Acacio T. Evaluation of physicochemical parameters of oil-resin of Copaifera species. [Internet]. Rio de Janeiro. Em: 7th Brazilian Conference on Natural Product/ XXXIII RESEM Proceeding; 2019 [Citado 08 de junio 2021]. Disponible en:https://proceedings.science/bcnp-2019/papers/evaluation-of-physicochemical-parameters-of-oil-resin-of-copaifera-species?lang=pt-br#

74. Camara C, et al. Chemical composition and acaricidal activity of essential oils and selected terpenes from two species of *Psidium* in the Cerrado biome of Brazil against

Tetranychus urticae. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat. 2020 ;19(1): 15-28. DOI: 10.37360/blacpma.20.19.1.2.

75. Dos Santos F, et al. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of hydroalcoholic extracts from *Solanum muricatum Ait* and *Solanum betaceum Cav*. (*Solanaceae*) in the plant model *Lactuca sativa*. Environ Sci Pollut Res. 2018; 26(27): 1-11. DOI:10.1007/s11356-017-1015-x.

76. Governa P, Biagi M. Copaifera langsdorffii Desf: in vitro investigation on anti-Helicobacter pylori and anti-inflamatory activies of oleoresin and fruit methanolic extract. Pl Biosystems. 2019; 22: 1-8. DOI:10.1080/11263504.2019.1578284.

77. Rocha Lima L. Caracterización y validación de la actividad biológica de microparticulas de Quitosano conteniendo aceites esenciales. [Tesis para optar el grado de Magister en Procesos Químicos y Bioquímicos]. Brasil: Universidad Federal de Ceara; 2019.

78. Karchesy Y, Kelsey R, Constantine G, Karchesy J. Biological screening of selected Pacific Northwest Forest plants using the brine shrimp (Artemia salina) toxicity bioassay. SpringerPlus. 2016; 5(1): 1-9. DOI:10.1186/s40064-016-2145-1.

79. Bohórquez P, Campos C. Evaluación de *Lactuca sativa* Y *Selenastrum capricornutum* como indicadores de toxicidad en aguas. Univ Sci. 2007; 12(2): 83-98.

80. Verdeguer Sancho M. Fitotoxicidad de aceites esenciales y extractos acuosos de plantas mediterráneas para el control de arvenses. [Tesis para optar el grado de Doctor en Recursos y Tecnologías Agrícolas]. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2011.

81. Huanca Arocutipa S. Determinación de la concentración de la inhibición media (CE_{50-96}) y el efecto fitotóxico del arseniato de sodio ($NaH_2AsO_4.H_2O$) en *Lactuca sativa* (lechuga) mediante bioensayos, en la provincia de Tacna. [Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo]. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2016.

9. ANEXOS

Anexo 1. Certificado de clasificación taxonómica

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
HERBARIUM AMAZONENSE (AMAZ)
Esquina Pevas/Nanay -

E-mail:cgrandezii@hotmail.com.
Iquitos-Perú

CERTIFICACION BOTANICA

El Blgo. CESAR A. GRANDEZ RIOS CON NUMERO DE COLEGIATURA N° 3052, CONSULTOR BOTANICO DEL MINISTERIO DE AGRICULTURA CERTIFICA QUE.

LA MG. QF. MONICA GUADALUPE REUERTO FIGUEROA HA SOLICITADO LA CERTIFICACION BOTANICA DE LA PLANTA COPAIBA, SEGÚN LA NOMENCLATURA DE CRONQUIST OCUPA LAS SIGUIENTES CATEGORIAS TAXONOMICAS.

REYNO. PLANTAE

CLASE . MAGNOLIOPSIDA

SUB-CLASE. ROSIDAE

ORDEN FABALES

FAMILIA . FABACEAE

SYB-FAMILIA. CAESALPINIOIDEA

GENERO. ***Copaifera***

Especies. ***Reticulata Ducke***

NOMBRE COMUN. COPAIBA

SE EXPIDE LA PRESENTE CERTIFICACIÓN PARA LOS FINES QUE SE ESTIME CONVENIOENTE

IQUITOS , JULIO DEL 2018

BLGO. CESAR A. GRANDEZ RIOS

CBP. 3052

Anexo 2. Arboles de copaiba y muestra de oleorresina de copaiba extraída





Oleorresina de copaiba

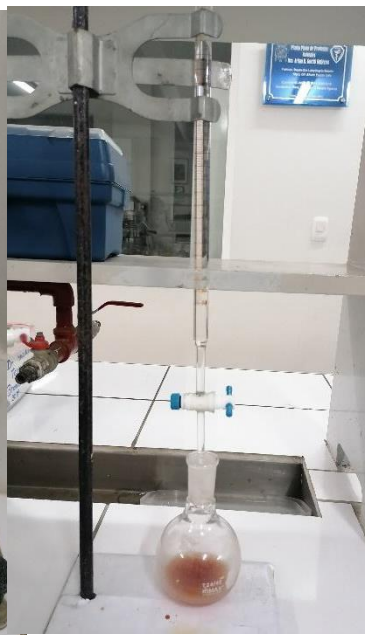
Anexo 3. Caracterización fisicoquímica y tamizaje fitoquímico





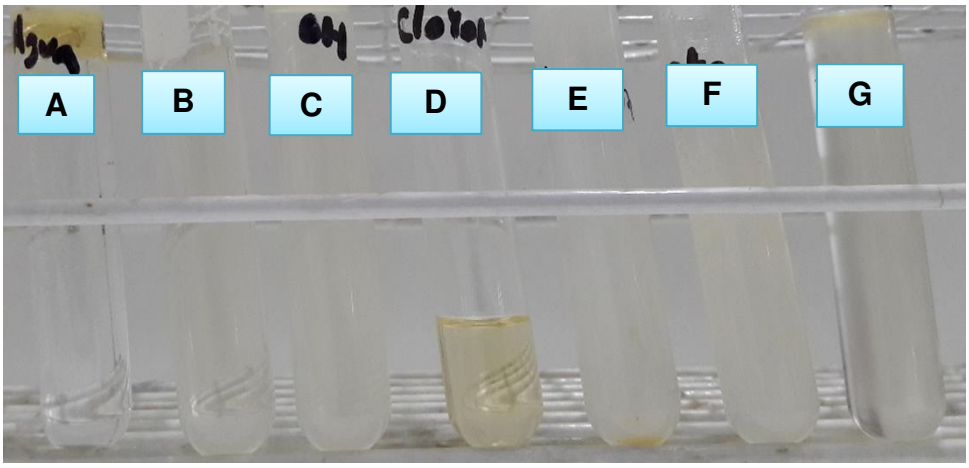






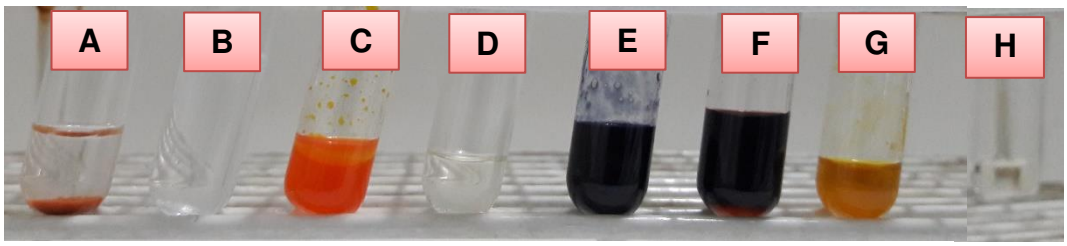
Ensayos Fisicoquímicos

*** Ensayo de miscibilidad**



Miscibilidad de la oleorresina de copaiba con A: agua, B: metanol, C: etanol, D: cloroformo, E: hexano, F: éter, G: DMSO.

*** Tamizaje fitoquímico**



Tamizaje fitoquímico de la oleorresina de copaiba, donde las reacciones son A: Fheling, B: prueba de la espuma, C: Dragendorff, D: Shinoda, E: Keller-Killiani, F: Liebermann-Burchard, G: Tricloruro férrico, H: Bornträger.

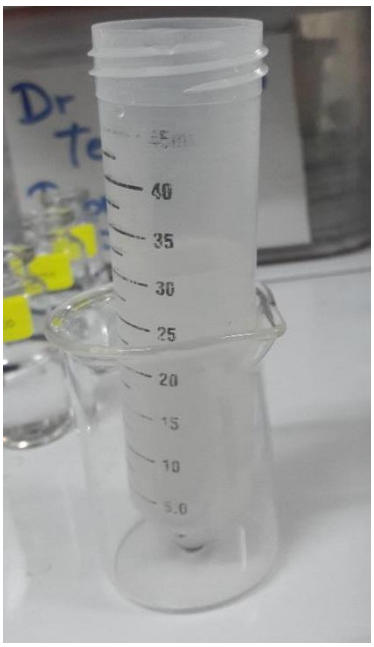
Anexo 4. Cultivo de *Artemia salina*, preparación de la muestra y bioensayo

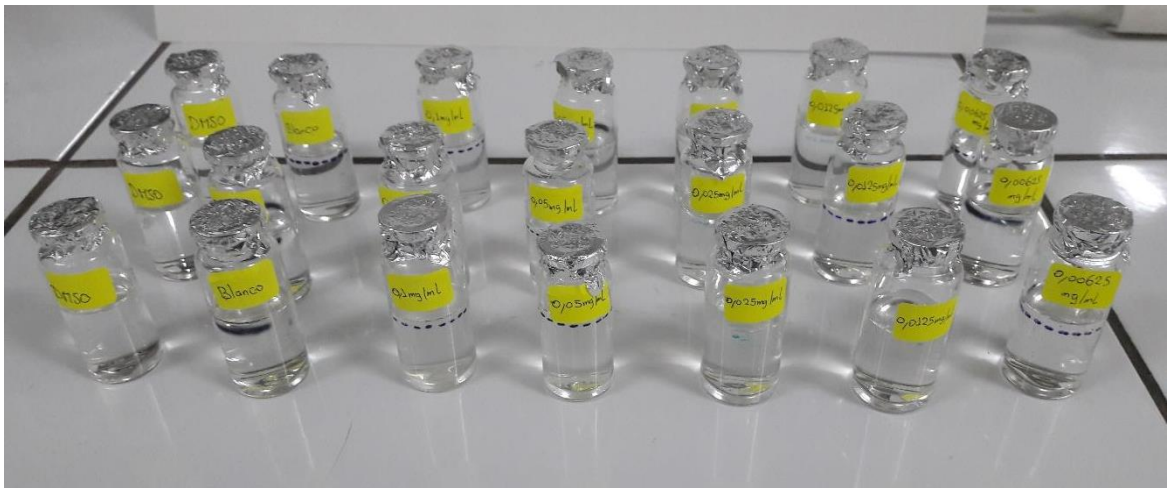








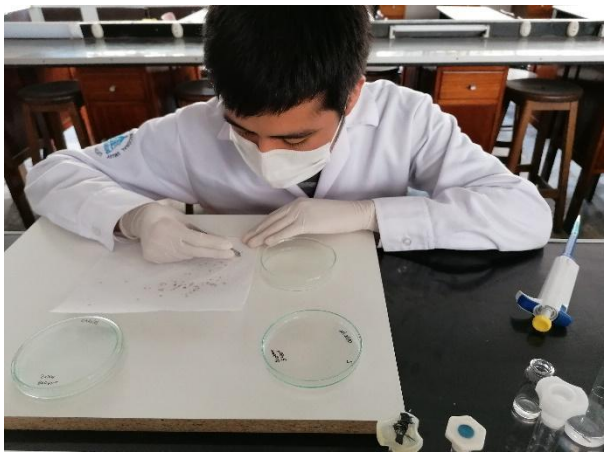




Anexo 5. Bioensayo de toxicidad con *Lactuca sativa*













Anexo 6. Cálculo de Cl_{50} según regresión por el método probit (SPSS 25)

Límites de confianza

		95% de límites de confianza para concentracion		
	Probabilidad	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	,010	,093	,014	,232
	,020	,126	,022	,290
	,030	,152	,030	,334
	,040	,176	,037	,372
	,050	,198	,045	,406
	,060	,218	,052	,438
	,070	,238	,060	,467
	,080	,257	,067	,496
	,090	,276	,075	,523
	,100	,295	,083	,549
	,150	,386	,126	,675
	,200	,479	,175	,796
	,250	,576	,232	,918
	,300	,679	,298	1,046
	,350	,792	,375	1,182
	,400	,916	,466	1,330
	,450	1,054	,573	1,495
	,500	1,210	,701	1,682
	,550	1,390	,853	1,901
	,600	1,600	1,036	2,163
	,650	1,850	1,258	2,492
	,700	2,157	1,526	2,922
	,750	2,545	1,856	3,517
	,800	3,059	2,267	4,399
	,850	3,791	2,806	5,828

Cl_{50} de $K_2Cr_2O_7$ (Bioensayo *Artemia salina*)

Límites de confianza

		95% de límites de confianza para concentracion		
	Probabilidad	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	,010	-85,886	-260,380	-39,567
	,020	-70,617	-223,108	-29,613
	,030	-60,929	-199,521	-23,236
	,040	-53,641	-181,821	-18,396
	,050	-47,713	-167,457	-14,426
	,060	-42,668	-155,260	-11,017
	,070	-38,244	-144,593	-8,001
	,080	-34,283	-135,066	-5,276
	,090	-30,680	-126,426	-2,774
	,100	-27,364	-118,496	-,448
	,150	-13,634	-85,985	9,507
	,200	-2,722	-60,733	18,004
	,250	6,640	-39,814	26,039
	,300	15,046	-22,032	34,259
	,350	22,837	-6,903	43,225
	,400	30,229	5,771	53,414
	,450	37,381	16,227	65,078
	,500	44,420	24,897	78,178
	,550	51,458	32,314	92,531
	,600	58,610	38,953	108,012
	,650	66,003	45,184	124,645
	,700	73,793	51,295	142,628
	,750	82,200	57,545	162,380
	,800	91,561	64,227	184,652
	,850	102,473	71,775	210,854
	,900	116,203	81,033	244,060

Cl_{50} de oleorresina de Copaifera reticulata Ducke (Bioensayo *Artemia salina*)

Límites de confianza

		95% de límites de confianza para Concentracion		
	Probabilidad	Estimación	Límite inferior	Límite superior
PROBIT	,010	100,629	-114,626	223,951
	,020	158,113	-34,568	270,137
	,030	194,585	15,973	299,693
	,040	222,021	53,830	322,091
	,050	244,338	84,501	340,432
	,060	263,334	110,506	356,144
	,070	279,989	133,222	370,006
	,080	294,902	153,485	382,494
	,090	308,464	171,844	393,921
	,100	320,949	188,680	404,503
	,150	372,638	257,602	449,098
	,200	413,718	311,228	485,692
	,250	448,962	356,153	518,167
	,300	480,612	395,431	548,398
	,350	509,940	430,756	577,483
	,400	537,770	463,195	606,162
	,450	564,695	493,498	634,992
	,500	591,194	522,247	664,439
	,550	617,692	549,947	694,934
	,600	644,618	577,079	726,935
	,650	672,447	604,149	760,983
	,700	701,776	631,743	797,799
	,750	733,425	660,616	838,434
	,800	768,669	691,868	884,582
	,850	809,750	727,360	939,311
	,900	861,438	770,947	1009,241
	,910	873,923	781,335	1026,271

Cl_{50} de $ZnSO_4$ (Bioensayo *Lactuca sativa*)

Anexo 7. Análisis de Tukey para Germinación de semillas de *Lactuca sativa*

ANOVA

Germinacion

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	28568,258	5	5713,652	82,395	,000
Dentro de grupos	832,140	12	69,345		
Total	29400,398	17			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Germinacion

HSD Tukey

(I) Concentracion	(J) Concentracion	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1000ppm	800ppm	-8,76667	6,79926	,785	-31,6049	14,0715
	600ppm	-68,43333*	6,79926	,000	-91,2715	-45,5951
	400ppm	-96,50000*	6,79926	,000	-119,3382	-73,6618
	200ppm	-85,96667*	6,79926	,000	-108,8049	-63,1285
	0ppm (Control)	-95,00000*	6,79926	,000	-117,8382	-72,1618
800ppm	1000ppm	8,76667	6,79926	,785	-14,0715	31,6049
	600ppm	-59,66667*	6,79926	,000	-82,5049	-36,8285
	400ppm	-87,73333*	6,79926	,000	-110,5715	-64,8951
	200ppm	-77,20000*	6,79926	,000	-100,0382	-54,3618
	0ppm (Control)	-86,23333*	6,79926	,000	-109,0715	-63,3951
600ppm	1000ppm	68,43333*	6,79926	,000	45,5951	91,2715
	800ppm	59,66667*	6,79926	,000	36,8285	82,5049
	400ppm	-28,06667*	6,79926	,014	-50,9049	-5,2285
	200ppm	-17,53333	6,79926	,176	-40,3715	5,3049
	0ppm (Control)	-26,56667*	6,79926	,020	-49,4049	-3,7285
400ppm	1000ppm	96,50000*	6,79926	,000	73,6618	119,3382
	800ppm	87,73333*	6,79926	,000	64,8951	110,5715
	600ppm	28,06667*	6,79926	,014	5,2285	50,9049
	200ppm	10,53333	6,79926	,643	-12,3049	33,3715
	0ppm (Control)	1,50000	6,79926	1,000	-21,3382	24,3382
200ppm	1000ppm	85,96667*	6,79926	,000	63,1285	108,8049
	800ppm	77,20000*	6,79926	,000	54,3618	100,0382
	600ppm	17,53333	6,79926	,176	-5,3049	40,3715
	400ppm	-10,53333	6,79926	,643	-33,3715	12,3049
	0ppm (Control)	-9,03333	6,79926	,765	-31,8715	13,8049
0ppm (Control)	1000ppm	95,00000*	6,79926	,000	72,1618	117,8382
	800ppm	86,23333*	6,79926	,000	63,3951	109,0715
	600ppm	26,56667*	6,79926	,020	3,7285	49,4049
	400ppm	-1,50000	6,79926	1,000	-24,3382	21,3382
	200ppm	9,03333	6,79926	,765	-13,8049	31,8715

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

Germinacion

HSD Tukey[a]

Concentracion	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
1000ppm	3	,0000		
800ppm	3	8,7667		
600ppm	3		68,4333	
200ppm	3		85,9667	85,9667
0ppm (Control)	3			95,0000
400ppm	3			96,5000
Sig.		,785	,176	,643

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 8. Valores de elongación de radícula e hipocótilo ($ZnSO_4$)

Control negativo (Agua mineral)

Control (-)	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
1	20	41	23	38	18	33
2	21	38.5	13	31	16	31
3	20	23	18	30	16	36
4	24	35	16	30	19	32
5	20	34	18	29	13	20
6	25	34	20	38.5	18	32
7	22	26	16	25	19	32
8	18	36	16	27	13	27
9	20	42	19	32	13	32
10	23	31	34	35	16	35
11	22	27,5	17	30	16	30
12	20	28	20	31	18	31
13	20	29	20	29	18	29
14	20	30	22	18	18	18
15	21	19	20	27,5	20	31
16	20	34	21	27	19	31
17	20	32	18	23,5	19	17
18	19	24	5	5	20	16
19	4	6	5	3	4	4
20	0	0	0	0	0	0
Promedio	19,95	30,00	17,95	26,82	16,47	27,21

	PLACA 1	PLACA 2	PLACA 3
N° Germinados	19	19	19
	DESV ESTANDAR	**MEDIA**	**COEFICIENTE DE VARIACION**
Radícula	4,94	18,12	27,25
Hipocótilo	5,54	28,01	19,78

Dimeltilsulfóxido 0,4%

DMSO 0,4%	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
1	19	33	29	35	22	31
2	24	30	19	30	22	40
3	19	30	19	29	17	25
4	23	34	22	32	20	30
5	15	23	18	25	20	28
6	21	32	20	29	19	30
7	20	36	21	27	16	27
8	19	31	18	32	20	27
9	16	28	20	36	25	35
10	19	33	17	31	16	24
11	16	28	18	25	15	25
12	18	31	20	35	21	30
13	21	32	18	29	21	25
14	18	28	22	18	14	19
15	16	32	22	31	13	33
16	20	34	15	23	13	31
17	20	21	17	28	23	29
18	4	2	4	14	18	29
19	4	3	5	6	6	3
20	0	0	0	0	0	0
Promedio	17,47	27,42	18,11	27,11	17,95	27,42

	PLACA 1	PLACA 2	PLACA 3
N° germinados	19	19	19
	DESV ESTÁNDAR	**MEDIA**	**COEFICIENTE DE VARIACIÓN**
Radícula	5,03	17,84	28,17
Hipocótilo	8,00	27,32	29,30

ZnSO4 a 200 ppm

200 ppm Zn (SO_4)	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
1	28	39	31	25	34	37
2	31	35	23	34	34	32
3	28	31	30	27	37	38
4	28	36	26	26	27	21
5	19	30	34	32	34	36
6	17	35	30	25	22	28
7	19	30	21	31	28	30
8	20	26	16	23	22	29
9	20	32	33	35	28	26
10	19	30	22	18	32	26
11	23	21	30	26	31	24
12	24	33	9	11	11	18
13	27	32	27	23	4	10
14	22	31	4	3	9	3
15	28	34	1	2	1	1
16	25	33	0	1	4	3
17	29	29	0	0	1	2
18	10	9	0	0	0	2
19	4	6	0	0	0	0
20	3	4	0	0	0	0
Promedio	21,20	27,80	16,85	17,10	17,95	31,38

	PLACA 1	PLACA 2	PLACA 3
N° Germinados	20	14	15

	Promedio	Desviación estándar
Radícula	18,7	12,2
Hipocótilo	21,1	13,3

$ZnSO_4$ a 400 ppm

400 ppm $Zn(SO_4)$	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
1	19	24	25	32	24	26
2	30	35	22	30	23	23
3	29	25	16	29	31	33
4	36	39	22	30	21	19
5	27	32	20	25	23	32
6	23	28	22	24	16	27
7	24	29	28	29	16	21
8	27	24	18	20	27	30
9	15	25	17	32	22	32
10	32	37	22	30	20	24
11	12	18	22	27	26	27
12	17	27	33	31	25	20
13	18	26	22	37	26	28
14	23	29	11	21	23	28
15	24	28	15	29	25	31
16	21	30	20	32	28	37
17	6	9	18	32	23	20
18	7	4	2	1	18	25
19	3	2	1	1	5	7
20	0	0	0	0	0	0
Promedio	24,50	29,50	17,80	24,60	21,10	26,38
	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
N° germinados	19		17		19	

	Promedio	Desviación estándar
Radícula	19,5	8,7
Hipocótilo	24,2	10,3

$ZnSO_4$ a 600 ppm

600 ppm $Zn(SO_4)$	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
1	7	15	4	14	11	25
2	4	12	5	14	6,6	8
3	4	14	3,5	9	6	10
4	4	15	4,5	12	9	15
5	4	15	4	10	4	11
6	5	14	3,5	14	6	13
7	4	12	4	14	6	15
8	7	5	4	11	4	12
9	4	11	4	15	6	17
10	4	16	4	6	3	13
11	3	15	4	7	3	13
12	3	5	4	7	3	11
13	2	11	4	11	3	6
14	2	13	3	9	1,5	10
15	1	5	2	9	2	12
16	2	3	2	13	2,5	2
17	2	2	2,5	12	2	2
18	0	1	2	1	0	1
19	0	0	1	3	0	0
20	0	0	0	1	0	0
Promedio	3,10	9,20	3,25	9,60	3,93	9,80

	PLACA 1	PLACA 2	PLACA 3
N° germinados	12	14	13

	Promedio	Desviación estándar
Radícula	3,4	2,2
Hipocótilo	9,5	5,5

$ZnSO_4$ a 800 ppm

800 ppm $Zn(SO_4)$	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
1	2,5	7	2	7	1	7
2	2	8	3	1	1	2
3	1	8	3	11	1	1
4	2	4	1	6	1	2
5	2	8	5	4	1	4
6	2,5	7	2	5	2	4
7	1	7	1	3	1	3
8	3	9	2	8	1	1
9	2,5	7	2	10	1	6
10	2	9	2	12	1	1
11	3,5	6	2	10	1	7
12	2	7	2	8	2	3
13	1	7	2,5	9	1	4
14	1	4	1	6	0	5
15	1,5	4	2	7	0	2
16	1	1,5	1	6	0	1
17	0	2,5	0	1	0	4
18	0	1	0	1	0	3
19	0	0	0	0	0	1
20	0	0	0	0	0	1
Promedio	1,53	5,35	1,68	5,75	0,75	3,10
	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
N° germinados	2		3		0	

	Promedio	Desviación estándar
Radícula	1,3	1,1
Hipocótilo	4,7	3,2

$ZnSO_4$ a 1000ppm

1000 ppm $Zn(SO_4)$	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
1	1	7	0	7	0	6
2	1	6	0	7	0	6
3	1	6	0	7	0	6
4	1	2	0	7	0	6
5	1	7	0	7	0	6
6	2	6	0	7	0	6
7	1	5	0	7	0	6
8	2	6	0	7	0	6
9	1	6	0	7	0	6
10	1	7	0	7	0	6
11	1	6	0	6	0	6
12	1	6	0	7	0	5
13	0	6	0	6	0	5
14	0	5	0	7	0	4
15	0	4	0	6	0	7
16	0	6	0	5	0	5
17	0	5	0	3	0	5
18	0	0	0	4	0	0
19	0	0	0	4	0	0
20	0	0	0	1	0	0
Promedio	0,70	4,80	0,00	5,95	0,00	4,85

	PLACA 1	PLACA 2	PLACA 3
N° germinados	0	0	0

	Promedio	Desviación estándar
Radícula	0,2	0,5
Hipocótilo	5,2	2,1

Anexo 9. Prueba de Tukey para valores de radícula e hipocótilo por efecto del $ZnSO_4$

***Radícula**

ANOVA

Radicula

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1449,103	5	289,821	93,275	,000
Dentro de grupos	37,286	12	3,107		
Total	1486,390	17			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Radicula

HSD Tukey

(I) Concentracion	(J) Concentracion	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	Límite superior
1000ppm	800ppm	-1,08667	1,43925	,970	-5,9210	3,7477
	600ppm	-3,19333	1,43925	,297	-8,0277	1,6410
	400ppm	-20,90000*	1,43925	,000	-25,7343	-16,0657
	200ppm	-18,43333*	1,43925	,000	-23,2677	-13,5990
	0ppm (Control)	-18,24000*	1,43925	,000	-23,0743	-13,4057
800ppm	1000ppm	1,08667	1,43925	,970	-3,7477	5,9210
	600ppm	-2,10667	1,43925	,691	-6,9410	2,7277
	400ppm	-19,81333*	1,43925	,000	-24,6477	-14,9790
	200ppm	-17,34667*	1,43925	,000	-22,1810	-12,5123
	0ppm (Control)	-17,15333*	1,43925	,000	-21,9877	-12,3190
600ppm	1000ppm	3,19333	1,43925	,297	-1,6410	8,0277
	800ppm	2,10667	1,43925	,691	-2,7277	6,9410
	400ppm	-17,70667*	1,43925	,000	-22,5410	-12,8723
	200ppm	-15,24000*	1,43925	,000	-20,0743	-10,4057
	0ppm (Control)	-15,04667*	1,43925	,000	-19,8810	-10,2123
400ppm	1000ppm	20,90000*	1,43925	,000	16,0657	25,7343
	800ppm	19,81333*	1,43925	,000	14,9790	24,6477
	600ppm	17,70667*	1,43925	,000	12,8723	22,5410
	200ppm	2,46667	1,43925	,548	-2,3677	7,3010
	0ppm (Control)	2,66000	1,43925	,474	-2,1743	7,4943
200ppm	1000ppm	18,43333*	1,43925	,000	13,5990	23,2677
	800ppm	17,34667*	1,43925	,000	12,5123	22,1810
	600ppm	15,24000*	1,43925	,000	10,4057	20,0743
	400ppm	-2,46667	1,43925	,548	-7,3010	2,3677
	0ppm (Control)	,19333	1,43925	1,000	-4,6410	5,0277
0ppm (Control)	1000ppm	18,24000*	1,43925	,000	13,4057	23,0743
	800ppm	17,15333*	1,43925	,000	12,3190	21,9877
	600ppm	15,04667*	1,43925	,000	10,2123	19,8810
	400ppm	-2,66000	1,43925	,474	-7,4943	2,1743
	200ppm	-,19333	1,43925	1,000	-5,0277	4,6410

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

Radicula

HSD Tukey[a]

Concentracion	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
1000ppm	3	,2333	
800ppm	3	1,3200	
600ppm	3	3,4267	
0ppm (Control)	3		18,4733
200ppm	3		18,6667
400ppm	3		21,1333
Sig.		,297	,474

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

***Hipocótilo**

ANOVA

Hipocotilo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1900,187	5	380,037	34,073	,000
Dentro de grupos	133,842	12	11,154		
Total	2034,029	17			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Hipocotilo

HSD Tukey

(I) Concentracion	(J) Concentracion	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1000ppm	800ppm	,46667	2,72684	1,000	-8,6926	9,6259
	600ppm	-4,33333	2,72684	,620	-13,4926	4,8259
	400ppm	-21,62667*	2,72684	,000	-30,7859	-12,4674
	200ppm	-20,22667*	2,72684	,000	-29,3859	-11,0674
	0ppm (Control)	-22,81000*	2,72684	,000	-31,9692	-13,6508
800ppm	1000ppm	-,46667	2,72684	1,000	-9,6259	8,6926
	600ppm	-4,80000	2,72684	,522	-13,9592	4,3592
	400ppm	-22,09333*	2,72684	,000	-31,2526	-12,9341
	200ppm	-20,69333*	2,72684	,000	-29,8526	-11,5341
	0ppm (Control)	-23,27667*	2,72684	,000	-32,4359	-14,1174
600ppm	1000ppm	4,33333	2,72684	,620	-4,8259	13,4926
	800ppm	4,80000	2,72684	,522	-4,3592	13,9592
	400ppm	-17,29333*	2,72684	,000	-26,4526	-8,1341
	200ppm	-15,89333*	2,72684	,001	-25,0526	-6,7341
	0ppm (Control)	-18,47667*	2,72684	,000	-27,6359	-9,3174
400ppm	1000ppm	21,62667*	2,72684	,000	12,4674	30,7859
	800ppm	22,09333*	2,72684	,000	12,9341	31,2526
	600ppm	17,29333*	2,72684	,000	8,1341	26,4526
	200ppm	1,40000	2,72684	,995	-7,7592	10,5592
	0ppm (Control)	-1,18333	2,72684	,998	-10,3426	7,9759
200ppm	1000ppm	20,22667*	2,72684	,000	11,0674	29,3859
	800ppm	20,69333*	2,72684	,000	11,5341	29,8526
	600ppm	15,89333*	2,72684	,001	6,7341	25,0526
	400ppm	-1,40000	2,72684	,995	-10,5592	7,7592
	0ppm (Control)	-2,58333	2,72684	,926	-11,7426	6,5759
0ppm (Control)	1000ppm	22,81000*	2,72684	,000	13,6508	31,9692
	800ppm	23,27667*	2,72684	,000	14,1174	32,4359
	600ppm	18,47667*	2,72684	,000	9,3174	27,6359
	400ppm	1,18333	2,72684	,998	-7,9759	10,3426
	200ppm	2,58333	2,72684	,926	-6,5759	11,7426

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

Hipocotilo

HSD Tukey[a]

Concentracion	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
800ppm	3	4,7333	
1000ppm	3	5,2000	
600ppm	3	9,5333	
200ppm	3		25,4267
400ppm	3		26,8267
0ppm (Control)	3		28,0100
Sig.		,522	,926

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 10. Análisis Tukey para germinación de semillas (oleorresina de copaiba)

ANOVA

Germinacion

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1494,499	6	249,083	47,896	,000
Dentro de grupos	72,807	14	5,200		
Total	1567,306	20			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Germinacion
HSD Tukey

(I) concentracion	(J) concentracion	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	Límite superior
2000pppm	1600ppm	-6,96667*	1,86198	,028	-13,3246	-,6088
	1400ppm	-19,30000*	1,86198	,000	-25,6579	-12,9421
	1200ppm	-21,03333*	1,86198	,000	-27,3912	-14,6754
	1000ppm	-21,03333*	1,86198	,000	-27,3912	-14,6754
	Control negativo (Agua)	-23,06667*	1,86198	,000	-29,4246	-16,7088
	Control negativo (DMSO)	-23,06667*	1,86198	,000	-29,4246	-16,7088
1600ppm	2000pppm	6,96667*	1,86198	,028	,6088	13,3246
	1400ppm	-12,33333*	1,86198	,000	-18,6912	-5,9754
	1200ppm	-14,06667*	1,86198	,000	-20,4246	-7,7088
	1000ppm	-14,06667*	1,86198	,000	-20,4246	-7,7088
	Control negativo (Agua)	-16,10000*	1,86198	,000	-22,4579	-9,7421
	Control negativo (DMSO)	-16,10000*	1,86198	,000	-22,4579	-9,7421
1400ppm	2000pppm	19,30000*	1,86198	,000	12,9421	25,6579
	1600ppm	12,33333*	1,86198	,000	5,9754	18,6912
	1200ppm	-1,73333	1,86198	,961	-8,0912	4,6246
	1000ppm	-1,73333	1,86198	,961	-8,0912	4,6246
	Control negativo (Agua)	-3,76667	1,86198	,443	-10,1246	2,5912
	Control negativo (DMSO)	-3,76667	1,86198	,443	-10,1246	2,5912
1200ppm	2000pppm	21,03333*	1,86198	,000	14,6754	27,3912
	1600ppm	14,06667*	1,86198	,000	7,7088	20,4246
	1400ppm	1,73333	1,86198	,961	-4,6246	8,0912
	1000ppm	,00000	1,86198	1,000	-6,3579	6,3579
	Control negativo (Agua)	-2,03333	1,86198	,920	-8,3912	4,3246
	Control negativo (DMSO)	-2,03333	1,86198	,920	-8,3912	4,3246
1000ppm	2000pppm	21,03333*	1,86198	,000	14,6754	27,3912
	1600ppm	14,06667*	1,86198	,000	7,7088	20,4246
	1400ppm	1,73333	1,86198	,961	-4,6246	8,0912
	1200ppm	,00000	1,86198	1,000	-6,3579	6,3579
	Control negativo (Agua)	-2,03333	1,86198	,920	-8,3912	4,3246
	Control negativo (DMSO)	-2,03333	1,86198	,920	-8,3912	4,3246
Control negativo (Agua)	2000pppm	23,06667*	1,86198	,000	16,7088	29,4246
	1600ppm	16,10000*	1,86198	,000	9,7421	22,4579
	1400ppm	3,76667	1,86198	,443	-2,5912	10,1246
	1200ppm	2,03333	1,86198	,920	-4,3246	8,3912
	1000ppm	2,03333	1,86198	,920	-4,3246	8,3912
	Control negativo (DMSO)	,00000	1,86198	1,000	-6,3579	6,3579
Control negativo (DMSO)	2000pppm	23,06667*	1,86198	,000	16,7088	29,4246
	1600ppm	16,10000*	1,86198	,000	9,7421	22,4579
	1400ppm	3,76667	1,86198	,443	-2,5912	10,1246
	1200ppm	2,03333	1,86198	,920	-4,3246	8,3912
	1000ppm	2,03333	1,86198	,920	-4,3246	8,3912
	Control negativo (Agua)	,00000	1,86198	1,000	-6,3579	6,3579

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

Germinacion

HSD Tukey[a]

concentracion	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
2000pppm	3	71,9333		
1600ppm	3		78,9000	
1400ppm	3			91,2333
1200ppm	3			92,9667
1000ppm	3			92,9667
Control negativo (Agua)	3			95,0000
Control negativo (DMSO)	3			95,0000
Sig.		1,000	1,000	,443

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Anexo 11. Análisis Dunnett

ANOVA

agerminados

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	53,143	6	8,857	46,500	,000
Dentro de grupos	2,667	14	,190		
Total	55,810	20			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: agerminados

T de Dunnett (bilateral)[a]

(I) concentracion	(J) concentracion	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
2000pppm	Control negativo (DMSO)	4,33333*	,35635	,000	3,2955	5,3712
1600ppm	Control negativo (DMSO)	3,00000*	,35635	,000	1,9622	4,0378
1400ppm	Control negativo (DMSO)	,66667	,35635	,297	-,3712	1,7045
1200ppm	Control negativo (DMSO)	,33333	,35635	,853	-,7045	1,3712
1000ppm	Control negativo (DMSO)	,33333	,35635	,853	-,7045	1,3712
Control negativo (Agua)	Control negativo (DMSO)	,00000	,35635	1,000	-1,0378	1,0378

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Anexo 12. Valores de elongación de radícula e hipocótilo (oleorresina de copaiba)

Oleorresina de Copaiba 1000 ppm

1000 ppm	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
1	26	27	31	26	36	27
2	30	30	38	25	25	23
3	29	25	33	30	12	15
4	40	28	26	27	30	23
5	37	26	34	29	31	27
6	30	26	33	22	34	25
7	32	26	37	24	32	24
8	36	22	27	18	28	27
9	20	19	30	22	24	24
10	16	23	31	22	30	25
11	18	24	28	27	22	18
12	37	26	25	20	22	20
13	28	25	24	21	26	21
14	28	21	19	18	29	26
15	22	22	20	20	32	28
16	28	21	15	11	24	28
17	13	20	24	14	26	23
18	23	10	18	6	0	0
19	0	3	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
Promedio	24,65	21,20	24,65	19,10	23,15	20,20
	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
N° germinados	18		18		17	

	Promedio	Desviación estándar
Radícula	24,15	10,7
Hipocótilo	20,17	8,53

Oleorresina de Copaiba 1200 ppm

1200 ppm	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
1	33	26	32	28	18	20
2	23	17	31	28	24	23
3	31	25	34	28	21	18
4	28	20	36	26	24	14
5	40	26	39	26	17	13
6	36	23	28	17	28	20
7	43	25	33	23	17	18
8	36	20	32	25	22	11
9	30	20	35	23	10	12
10	37	17	20	13	21	23
11	40	25	30	23	24	20
12	27	18	24	22	25	20
13	35	21	36	25	23	22
14	29	24	32	22	28	23
15	28	23	24	21	27	14
16	28	18	28	24	24	21
17	20	19	26	20	18	23
18	9	1	0	0	20	21
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
Promedio	27,65	21,50	26,00	19,70	19,55	16,80
	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
N° germinados	18		17		18	

	Promedio	Desviación estándar
Radícula	24,4	11,22
Hipocótilo	18,3	8,1

Oleorresina de Copaiba 1400 ppm

1400 ppm	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
1	33	27	24	22	29	18
2	28	17	30	23	36	19
3	23	21	27	25	35	25
4	24	18	16	19	24	22
5	24	24	23	22	20	25
6	25	23	31	21	27	22
7	22	23	25	22	27	20
8	22	15	17	20	15	15
9	30	22	20	28	25	20
10	21	17	30	25	31	24
11	23	18	33	22	35	23
12	21	21	24	18	26	23
13	17	15	23	18	26	24
14	13	11	29	20	27	19
15	18	20	31	22	24	20
16	16	18	24	25	26	22
17	26	23	24	23	20	21
18	0	0	22	17	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
Promedio	19,30	16,65	22,65	19,60	22,65	18,10
	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
N° germinados	17		18		17	

	Promedio	Desviación estándar
Radícula	21,53	9,76
Hipocótilo	18,12	7,73

Oleorresina de Copaiba 1600 ppm

1600 ppm	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
1	15	8	20	20	31	22
2	26	14	28	21	30	22
3	22	15	16	21	29	23
4	18	16	27	24	37	25
5	23	14	26	21	22	24
6	20	19	30	21	35	21
7	20	17	27	25	20	17
8	18	15	29	27	22	23
9	20	17	20	26	32	21
10	21	13	32	23	21	21
11	20	16	26	17	16	17
12	15	15	17	17	11	19
13	16	10	16	15	25	11
14	15	11	7	5	5	2
15	20	16	5	5	5	2
16	0	0	2	6	1	4
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
Promedio	14,45	10,80	16,40	14,70	17,10	13,70
	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
N° germinados	15		15		15	

	Promedio	Desviación estándar
Radícula	15,98	11,26
Hipocótilo	13,07	8,95

Oleorresina de Copaiba 2000 ppm

2000 ppm	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)	Radícula (mm)	Hipocótilo (mm)
1	17	20	21	15	12	21
2	16	21	17	18	14	18
3	17	20	17	20	17	16
4	23	18	21	24	16	16
5	22	19	22	22	15	18
6	19	21	17	21	20	17
7	21	22	21	22	20	20
8	16	19	19	22	15	20
9	17	26	19	20	15	19
10	20	19	15	15	14	19
11	17	21	15	18	17	21
12	21	21	19	19	18	18
13	18	19	17	19	15	15
14	17	15	0	0	15	18
15	2	4	0	0	1	4
16	2	6	0	0	0	0
17	0	2	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
Promedio	13,25	14,65	12,00	12,75	11,20	13,00
	PLACA 1		PLACA 2		PLACA 3	
N° germinados	14		13		14	

	Promedio	Desviación estándar
Radícula	12,15	8,37
Hipocótilo	13,47	8,87

Anexo 13. Análisis Tukey para valores de radícula e hipocótilo (oleorresina de copaiba)

* Radícula

ANOVA

Radicula

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	360,088	6	60,015	14,629	,000
Dentro de grupos	57,435	14	4,103		
Total	417,524	20			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Radicula
HSD Tukey

(I) Concentracion	(J) Concentracion	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95% Límite inferior	Límite superior
2000ppm	1600ppm	-3,83333	1,65379	,301	-9,4803	1,8137
	1400ppm	-9,38333*	1,65379	,001	-15,0303	-3,7363
	1200ppm	-12,25000*	1,65379	,000	-17,8970	-6,6030
	1000ppm	-12,00000*	1,65379	,000	-17,6470	-6,3530
	Control negativo (Agua)	-5,97333*	1,65379	,035	-11,6203	-,3263
	Control negativo (DMSO)	-5,69333*	1,65379	,048	-11,3403	-,0463
1600ppm	2000ppm	3,83333	1,65379	,301	-1,8137	9,4803
	1400ppm	-5,55000	1,65379	,055	-11,1970	,0970
	1200ppm	-8,41667*	1,65379	,002	-14,0637	-2,7697
	1000ppm	-8,16667*	1,65379	,003	-13,8137	-2,5197
	Control negativo (Agua)	-2,14000	1,65379	,844	-7,7870	3,5070
	Control negativo (DMSO)	-1,86000	1,65379	,910	-7,5070	3,7870
1400ppm	2000ppm	9,38333*	1,65379	,001	3,7363	15,0303
	1600ppm	5,55000	1,65379	,055	-,0970	11,1970
	1200ppm	-2,86667	1,65379	,607	-8,5137	2,7803
	1000ppm	-2,61667	1,65379	,695	-8,2637	3,0303
	Control negativo (Agua)	3,41000	1,65379	,422	-2,2370	9,0570
	Control negativo (DMSO)	3,69000	1,65379	,339	-1,9570	9,3370
1200ppm	2000ppm	12,25000*	1,65379	,000	6,6030	17,8970
	1600ppm	8,41667*	1,65379	,002	2,7697	14,0637
	1400ppm	2,86667	1,65379	,607	-2,7803	8,5137
	1000ppm	,25000	1,65379	1,000	-5,3970	5,8970
	Control negativo (Agua)	6,27667*	1,65379	,025	,6297	11,9237
	Control negativo (DMSO)	6,55667*	1,65379	,019	,9097	12,2037
1000ppm	2000ppm	12,00000*	1,65379	,000	6,3530	17,6470
	1600ppm	8,16667*	1,65379	,003	2,5197	13,8137
	1400ppm	2,61667	1,65379	,695	-3,0303	8,2637
	1200ppm	-,25000	1,65379	1,000	-5,8970	5,3970
	Control negativo (Agua)	6,02667*	1,65379	,033	,3797	11,6737
	Control negativo (DMSO)	6,30667*	1,65379	,024	,6597	11,9537
Control negativo (Agua)	2000ppm	5,97333*	1,65379	,035	,3263	11,6203
	1600ppm	2,14000	1,65379	,844	-3,5070	7,7870
	1400ppm	-3,41000	1,65379	,422	-9,0570	2,2370
	1200ppm	-6,27667*	1,65379	,025	-11,9237	-,6297
	1000ppm	-6,02667*	1,65379	,033	-11,6737	-,3797
	Control negativo (DMSO)	,28000	1,65379	1,000	-5,3670	5,9270
Control negativo (DMSO)	2000ppm	5,69333*	1,65379	,048	,0463	11,3403
	1600ppm	1,86000	1,65379	,910	-3,7870	7,5070
	1400ppm	-3,69000	1,65379	,339	-9,3370	1,9570
	1200ppm	-6,55667*	1,65379	,019	-12,2037	-,9097
	1000ppm	-6,30667*	1,65379	,024	-11,9537	-,6597
	Control negativo (Agua)	-,28000	1,65379	1,000	-5,9270	5,3670

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

Radicula

HSD Tukey[a]

Concentracion	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
2000ppm	3	12,1500		
1600ppm	3	15,9833	15,9833	
Control negativo (DMSO)	3		17,8433	
Control negativo (Agua)	3		18,1233	
1400ppm	3		21,5333	21,5333
1000ppm	3			24,1500
1200ppm	3			24,4000
Sig.		,301	,055	,607

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

*** Hipocótilo**

ANOVA

Hipocotilo

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	637,288	6	106,215	43,450	,000
Dentro de grupos	34,224	14	2,445		
Total	671,512	20			

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Hipocotilo

HSD Tukey

(I) concentracion	(J) concentracion	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
2000ppm	1600ppm	,40000	1,27660	1,000	-3,9590	4,7590
	1400ppm	-4,65000*	1,27660	,033	-9,0090	-,2910
	1200ppm	-5,86667*	1,27660	,006	-10,2257	-1,5076
	1000ppm	-6,70000*	1,27660	,002	-11,0590	-2,3410
	Control negativo (Agua)	-14,54333*	1,27660	,000	-18,9024	-10,1843
	Control positivo (DMSO)	-13,85000*	1,27660	,000	-18,2090	-9,4910
1600ppm	2000ppm	-,40000	1,27660	1,000	-4,7590	3,9590
	1400ppm	-5,05000*	1,27660	,019	-9,4090	-,6910
	1200ppm	-6,26667*	1,27660	,003	-10,6257	-1,9076
	1000ppm	-7,10000*	1,27660	,001	-11,4590	-2,7410
	Control negativo (Agua)	-14,94333*	1,27660	,000	-19,3024	-10,5843
	Control positivo (DMSO)	-14,25000*	1,27660	,000	-18,6090	-9,8910
1400ppm	2000ppm	4,65000*	1,27660	,033	,2910	9,0090
	1600ppm	5,05000*	1,27660	,019	,6910	9,4090
	1200ppm	-1,21667	1,27660	,956	-5,5757	3,1424
	1000ppm	-2,05000	1,27660	,681	-6,4090	2,3090
	Control negativo (Agua)	-9,89333*	1,27660	,000	-14,2524	-5,5343
	Control positivo (DMSO)	-9,20000*	1,27660	,000	-13,5590	-4,8410
1200ppm	2000ppm	5,86667*	1,27660	,006	1,5076	10,2257
	1600ppm	6,26667*	1,27660	,003	1,9076	10,6257
	1400ppm	1,21667	1,27660	,956	-3,1424	5,5757
	1000ppm	-,83333	1,27660	,993	-5,1924	3,5257
	Control negativo (Agua)	-8,67667*	1,27660	,000	-13,0357	-4,3176
	Control positivo (DMSO)	-7,98333*	1,27660	,000	-12,3424	-3,6243
1000ppm	2000ppm	6,70000*	1,27660	,002	2,3410	11,0590
	1600ppm	7,10000*	1,27660	,001	2,7410	11,4590
	1400ppm	2,05000	1,27660	,681	-2,3090	6,4090
	1200ppm	,83333	1,27660	,993	-3,5257	5,1924
	Control negativo (Agua)	-7,84333*	1,27660	,000	-12,2024	-3,4843
	Control positivo (DMSO)	-7,15000*	1,27660	,001	-11,5090	-2,7910
Control negativo (Agua)	2000ppm	14,54333*	1,27660	,000	10,1843	18,9024
	1600ppm	14,94333*	1,27660	,000	10,5843	19,3024
	1400ppm	9,89333*	1,27660	,000	5,5343	14,2524
	1200ppm	8,67667*	1,27660	,000	4,3176	13,0357
	1000ppm	7,84333*	1,27660	,000	3,4843	12,2024
	Control positivo (DMSO)	,69333	1,27660	,998	-3,6657	5,0524
Control positivo (DMSO)	2000ppm	13,85000*	1,27660	,000	9,4910	18,2090
	1600ppm	14,25000*	1,27660	,000	9,8910	18,6090
	1400ppm	9,20000*	1,27660	,000	4,8410	13,5590
	1200ppm	7,98333*	1,27660	,000	3,6243	12,3424
	1000ppm	7,15000*	1,27660	,001	2,7910	11,5090
	Control negativo (Agua)	-,69333	1,27660	,998	-5,0524	3,6657

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Subconjuntos homogéneos

Hipocotilo

HSD Tukey[a]

concentracion	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
1600ppm	3	13,0667		
2000ppm	3	13,4667		
1400ppm	3		18,1167	
1200ppm	3		19,3333	
1000ppm	3		20,1667	
Control positivo (DMSO)	3			27,3167
Control negativo (Agua)	3			28,0100
Sig.		1,000	,681	,998

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.