

Comparación de la actividad de la colinesterasa en lombrices en distintas prácticas agrícolas en el cantón de Zarceró, Costa Rica para el año 2022

Ariana Chacón Navarro¹, Brayan Alonso Monge Blanco², Marco Espinoza Marín³

Escuela de Estadística, Universidad de Costa Rica⁴

RESUMEN

En actividades agrícolas, el uso de plaguicidas resulta útil para el control de plagas y dentro de los compuestos químicos más utilizados se ubican los organofosforados y los carbamatos. Las lombrices tienen receptores sobre su cuerpo que causan sensibilidad a dichos compuestos. Por lo tanto, en el estudio del impacto de plaguicidas en el suelo, el biomarcador actividad colinesterasa en lombrices *Lumbricus Terrestris* es de gran utilidad al determinar la gravedad del daño del suelo. Por esa razón, la presente investigación busca comparar la magnitud de la actividad colinesterasa entre cada tipo de práctica de uso del suelo dada la estación climática. El estudio se llevó a cabo en febrero y junio del 2022 en el cantón de Zarceró, Alajuela. Además, se utilizaron tres fincas que corresponden a los diferentes tratamientos de tipo de práctica de uso del suelo los cuales son convencional, BPA, orgánico y el control fue el bosque. Se utilizó un diseño factorial cuasiexperimental y se construyeron intervalos simultáneos de Bonferroni. En términos de los resultados, la actividad colinesterasa para cada tipo de práctica de uso del suelo es diferente para cada estación climática. Por último, se encontró que las diferencias del tipo de práctica convencional contra BPA resultaron ser de relevancia para la investigación.

PALABRAS CLAVE: Actividad colinesterasa, tipo de práctica de uso del suelo, diseño factorial, intervalos simultáneos de Bonferroni.

ABSTRACT

In agricultural activities, the use of pesticides is useful for controlling them, the organophosphates and carbamates are among the most used chemical compounds. Earthworms have receptors on their bodies that cause sensitivity to these compounds. Therefore, in the study of the impact of pesticides on the soil, the cholinesterase activity biomarker in *Lumbricus Terrestris* earthworms is very useful in determining the severity of soil damage. For this reason, the present investigation seeks to compare the magnitude of cholinesterase activity between each type of land use practice given the climatic season.

¹ Carné B72022, ariana.chaconnavarro@ucr.ac.cr

² Carné B94946, brayan.mongeblanco@ucr.ac.cr

³ Carné B82760, marco.espinozamarin@ucr.ac.cr

⁴ Proyecto de Diseño Experimental

The study was carried out in February and June 2022 in the canton of Zarcero, Alajuela. In addition, three farms were used that correspond to the different land use practice type treatments which are conventional, BPA, organic and the control was the forest. A quasi-experimental factorial design was acquired, and simultaneous Bonferroni intervals were constructed. In terms of the results, the cholinesterase activity for each type of land use practice is different for each climatic season. Finally, it was found that the differences in the type of conventional practice against BPA turned out to be relevant for the investigation.

KEYWORDS: Cholinesterase activity, type of land use practice, factorial design, Bonferroni simultaneous intervals.

INTRODUCCIÓN

El estudio del biomarcador actividad colinesterasa en lombrices *Lumbricus terrestris* es de gran interés en el campo de la ecotoxicología debido a su utilidad para la vigilancia biológica (Stenersen et al., 1992). Las lombrices son capaces de construir profundidad de forma vertical y subir para buscar alimento, esto las deja expuestas a los plaguicidas tanto en la superficie como en el interior del terreno (Calisi et al., 2011).

Gran parte de los plaguicidas poseen compuestos químicos como los carbamatos y los organofosforados que resultan muy tóxicos para las lombrices, lo cual les provoca rigidez e inmovilidad. Dichos síntomas están relacionados a la inhibición de la colinesterasa (Stenersen, 1979), donde la actividad colinesterasa es uno de los primeros biomarcadores validados de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en el monitoreo (Lionetto, Caricato y Schettino, 2011).

La colinesterasa es una enzima clave que se encuentra presente en las uniones neuromusculares del sistema nervioso central. Esta enzima previene los constantes impulsos nerviosos y es esencial para el funcionamiento del sistema nervioso central y periférico. Por esta razón, si un ser vivo se encuentra expuesto a niveles importantes de organofosforados y carbamatos, se sabe que esta enzima tendrá compuestos inhibidores funcionalmente irreversibles, lo cual implica que el tiempo necesario para liberar la enzima pueda exceder el tiempo requerido para la síntesis de nuevas enzimas de colinesterasa (Lionetto, Caricato y Schettino, 2011).

Los compuestos organofosforados y carbamatos son los plaguicidas más utilizados en la actualidad, puesto que contribuyen al control de plagas en cultivos agrícolas y ganaderos. Dichos plaguicidas pueden degradarse rápidamente alrededor de las áreas agrícolas (áreas donde se usan durante largos períodos de tiempo al año). No obstante, si hay presencia de altas concentraciones, estos actúan como inhibidores de la actividad colinesterasa durante varios meses.

Según Argota, Argota y Ianaconne (2013) el desarrollo de biomarcadores ha cobrado gran interés debido a que pueden ser utilizados como indicadores de presencia de sustancias exógenas o cambios biológicos ocurridos como respuestas a distintos xenobióticos. Luego, las lombrices son invertebrados que se encuentran estrechamente relacionados con el medio en el que viven, puesto que poseen receptores sobre su cuerpo que les permite ser sensibles a compuestos químicos que hay en el suelo. Además, estas ingieren tanto partículas como microorganismos presentes en el suelo en el que se ubican.

Ahora bien, a pesar de que es difícil correlacionar directamente la densidad de estos organismos y la aplicación de plaguicidas, se tienen evidencias de que el uso de dichos compuestos químicos disminuye la población de lombrices. Por ende, podría suponerse que la baja densidad se debe a una alta actividad colinesterasa en las lombrices (Albendín García, 2009). También, se ha encontrado que la estación climática puede influir directamente en la lixiviación. En invierno, la medición de actividad colinesterasa en lombrices podría ser menor, porque se espera encontrar una mayor concentración de químicos en el suelo al ser la presencia de lluvias más abundante en comparación con la época de verano.

En los últimos años, se han realizado avances en ecotoxicología que corresponde al área de estudio que brinda herramientas para analizar los efectos adversos que provocan los químicos en organismos que se encuentran en el medio. Los resultados de dichas investigaciones permiten desarrollar herramientas capaces de proporcionar evidencias y respuestas a problemas relevantes en materia ambiental, incluso si se tiene información escasa del fenómeno (Vughi y Villa, 2013).

Asimismo, estos avances pueden ser complementados con diseños factoriales que permitan establecer una causa-efecto en los análisis obtenidos y, de esta manera, por ejemplo, determinar las diferencias que existen en la actividad colinesterasa de las lombrices entre cada tipo de práctica agrícola o de uso del suelo.

Las prácticas agrícolas que se pueden establecer son variadas, entre estas se ubican: el bosque, donde las lombrices tienen un bajísimo contacto con organofosforados y carbamatos; el convencional, que corresponde a la práctica en la que se da un mayor uso de organofosforados y carbamatos; las buenas prácticas agrícolas, que no erradican el uso de organofosforados y carbamatos, sino que los usan en menor cantidad y, además, introducen otros modelos productivos que permiten generar mejores resultados sin el uso de organofosforados y carbamatos; por último, el orgánico, que se caracteriza por la producción agrícola que no tiene ningún uso de organofosforados y carbamatos y los insumos son principalmente de origen natural. Dichas prácticas también permiten observar si el efecto del tipo de práctica agrícola o de uso sobre el suelo varía entre cada estación (verano e invierno).

En Costa Rica, se siguen encontrando efectos de factores de estrés antropogénico debidos a la aplicación de agroquímicos, los cuales dependen del tipo de prácticas o uso que se le dé al suelo. Entre los años 2013 y 2016, el Instituto Regional de Estudios de Sustancias Tóxicas (IRET) participó en el programa “Las buenas prácticas agrícolas en el uso y manejo de plaguicidas en la zona hortícola de Zarcero, Alajuela”, proyecto mediante el cual se recolectó información a través de encuestas acerca de los tipos de plaguicidas que se utilizan en mayor proporción.

En los resultados de dicho programa, se encontró que se utilizan un total de 119 diferentes ingredientes activos, que se han tabulado por cultivo (ver Figura 2 en anexos). De estos, cuatro están considerados como plaguicidas altamente peligrosos (PAP) de acuerdo con los criterios de toxicidad aguda, toxicidad crónica y toxicidad ambiental. Además, siete son de origen botánico o biológico (Ramírez Muñoz, Orozco Aceves, Fournier Leiva, Berrocal Montero, Echeverría Sáenz, de la Cruz Malavassi, Chaverri Fonseca, Moraga

López, Solano Díaz, Alfaro Alfaro, Pinnock Branford, Rodríguez Rodríguez, Bravo Durán, Calvo Araya y Ruepert, 2017).

El IRET junto con la Agencia de Extensión del MAG de Zarcero y la Fundación Limpiemos Nuestros Campos brindaron capacitaciones en BPA, cuyos resultados fueron satisfactorios, debido a que estas han generado una disminución en prácticas inadecuadas (Muñoz, et al, 2017). A pesar de que han existido buenos resultados en cuanto al alcance que ha logrado el proyecto en cuestión, se sabe que siguen existiendo agricultores que hacen un inadecuado manejo desde el uso de agroquímicos, por lo que interesa generar evidencia científica que permita demostrar la afectación que se estaría dando al medio, en cuanto a las prácticas agrícolas o el uso del suelo, a saber: bosque, convencional, buenas prácticas agrícolas y orgánico.

En Zarcero, se encontró mediante encuestas aplicadas a productores, que dentro de los plaguicidas mencionados como de mayor uso, cinco son considerados como plaguicidas ligeramente peligrosos (PLP), a saber: clorotalonil (fungicida carbamato), cipermetrina (insecticida organofosforado), mancozeb (fungicida carbamato), boscalid (fungicida carbamato) y piraclostrobina (fungicida carbamato); los cuales tienen efectos negativos en la salud de las especies y el ambiente. Al analizar el uso de plaguicidas por años individuales se encontró que el clorotalonil, el cual es denominado un carbamato, fue el plaguicida de mayor uso en los tres años de estudio, al igual que plaguicidas como propineb (carbamato) y carbendazim. Asimismo, el IRET detectó que el 48 % y el 20 % de las hortalizas eran provenientes de fincas convencionales y orgánicas, respectivamente.

El objetivo de esta investigación es comparar la actividad colinesterasa en lombrices para cada tipo de práctica agrícola o uso de suelo dada la estación de verano o invierno. Y nuestro objetivo específico es analizar cómo la actividad colinesterasa es distinta para cada estación climática.

METODOLOGÍA

Para esta investigación se hizo uso de un diseño cuasiexperimental factorial desbalanceado, el cual utilizó como variable respuesta la actividad colinesterasa en lombrices. Se consideró un diseño cuasiexperimental debido a que la lombriz no puede asignarse de forma aleatoria al tipo de práctica agrícola o de uso del suelo ni a la estación climática. Además, se tomó como factor de diseño el tipo de práctica agrícola o de uso del suelo, que cuenta con 4 niveles: bosque, convencional, buenas prácticas agrícolas y orgánico, mientras que el segundo factor no controlable el cual es la estación climática, cuenta con 2 niveles, época de verano o invierno. Finalmente, se tiene un experimento con 8 tratamientos. .

Un factor de confusión fue el hecho de que no se toma en cuenta el tipo de vegetal que se siembra en la finca en ambos momentos, por lo que este factor no se controló y podría afectar la medición de la actividad colinesterasa en lombrices entre prácticas y estaciones. Por consiguiente, es necesario aclarar que según el tipo de producto que se cultive en la finca puede haber un mayor uso de plaguicidas (ver Figura 2 en Anexos). Asimismo, se debe de tomar en cuenta que el punto de bosque fue elegido a la par de una calle pavimentada, por lo que hay una mayor presencia de contaminantes que podrían afectar el resultado de la actividad colinesterasa de la muestra.

Los datos generados que se utilizaron para esta investigación están basados en muestras de lombrices recolectadas en tres fincas diferentes (manejo convencional, BPA y orgánico) y un punto de muestreo en el bosque de la zona de Zarcero, Alajuela, durante el periodo de febrero y junio del año 2022. La selección de las fincas fue a través de juicio experto, criterio que dio el especialista Freylan Mena, biólogo de la Universidad Nacional. El muestreo empleado se divide en dos puntos temporales:

1. La primera fase se realizó durante el mes de febrero del año 2022 en la zona de Zarcero para la recolección de las lombrices durante el verano.
2. Posteriormente, la segunda selección de la muestra se realizó en la segunda semana de junio del año 2022 en el mismo punto en la zona de Zarcero para la recolección de las lombrices durante el invierno.

Se obtuvo un tamaño de muestra de 79 lombrices en total, donde se tienen como mínimo 5 lombrices para análisis de la actividad de colinesterasa en el bosque y en la finca convencional. Esto se dio porque en cada cuadrante de 50x50 cm de donde se tomó la muestra en cada finca y bosque así como el tamaño de muestra de lombrices era incierto dado que dependía del número de lombrices que hubiera en el cuadrante seleccionado. También, hay que tomar en cuenta que para guardar la muestra se tuvo que recurrir a un tanque de hidrógeno donde a la hora de extraerla para la limpieza y refrigeración se da un choque de temperatura y esta podía explotar y, por ende, se pierden algunas de las muestras. Es por esta razón que el experimento es desbalanceado, dado que la cantidad de lombrices por tratamiento difiere en cada caso.

La medición de la actividad colinesterasa, el cual es un componente químico el cual tiene como nombre ChE, se hizo mediante un análisis de espectrofotometría, método que tiene como principio básico medir la intensidad de luz que llega a absorber una sustancia química. El instrumento de medición utilizado fue un espectrofotómetro, instrumento que mide la cantidad de fotones (la intensidad de la luz) absorbidos después de pasar a través de la solución de muestra (Chalén Benites, Demera Sánchez, 2021).

Para llevar a cabo el análisis de actividad colinesterasa, se procedió de la siguiente manera:

1. A cada una de las muestras se le agregó una sustancia con un pH neutro.
2. Seguidamente, estas fueron introducidas a una máquina llamada sonificadora, donde esta se movió a altas frecuencias produciendo que se rompa el tejido de la muestra y con esto se liberan las proteínas de colinesterasa.
3. Luego de este proceso, las muestras fueron centrifugadas y se extrajo el sobrante, que es el tejido.
4. Por último, se colocaron las muestras de tejido en una placa multi pozo para ser analizadas por el espectrofotómetro y dar las mediciones de colinesterasa.

El modelo inicial que se planteó para hacer el análisis estadístico de los resultados de la variable respuesta es a partir del modelo lineal:

$$\mu_{ij}^{Cl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij}$$

Donde:

μ : Media general.

α_i : Tipo de práctica de uso del suelo.

β_j : Estación climática.

$(\alpha\beta)_{ij}$: Interacción entre el tipo práctica agrícola o de uso del suelo y la estación climática.

En primera instancia, a lo largo del análisis se utilizó una significancia del 5 %. Posteriormente, se verificó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad. La prueba utilizada para el supuesto de normalidad fue mediante un gráfico cuantil-cuantil que toma los datos ordenados ascendentemente y los grafica contra los cuantiles calculados de una distribución teórica (Ford, 2015). Para la verificación de homocedasticidad, se llevó a cabo con la prueba de Bartlett, la cual se deriva de la prueba de razón de verosimilitud bajo una distribución normal, lo que la hace sensible al supuesto de normalidad. Esta prueba tuvo como hipótesis nula que las varianzas de la población son iguales (Arsham et al., n.d.). No se cumplió el supuesto de homocedasticidad y si se cumplió el supuesto de normalidad.

Al no cumplirse el supuesto de homocedasticidad, se empleó el método de Mínimos Cuadrados Ponderados para el resto del análisis, donde se utilizó como ponderaciones los inversos de las varianzas dentro de tratamientos, una vez calculados estos se agregaron al cálculo del modelo (Alvarado, 2021), esto con el fin de obtener mejores estimaciones a pesar de que se trabaje en condiciones de heterocedasticidad. Seguidamente, se realizó un análisis de interacción entre el tipo de práctica agrícola o de uso del suelo y la estación climática, por lo que se plantearon las siguientes hipótesis:

$$(\alpha\beta)_{ij} = 0$$

$$(\alpha\beta)_{ij} \neq 0$$

Una vez hecho esto, se aplicó una prueba de diferencias de medias utilizando un ANOVA con el propósito de observar si hay un efecto del tipo de práctica agrícola o de uso del suelo dentro de cada época climática, en caso de que haya interacción. En caso de que

no se pruebe interacción, se observa el efecto del tipo de práctica agrícola sin importar la estación climática en la que se esté. En los casos en los que se encontró diferencias, se procedió a calcular los intervalos de confianza de diferencias de medias por el método de intervalos simultáneos de Bonferroni (esto por la presencia de interacción entre ambos factores), con el fin de establecer el rango en el cual se podían encontrar las diferencias si es que las había, esto se compara con la medida de la diferencia relevante que estableció el experto ($\delta = 100$).

Luego, se calculó la potencia. Para esto, se omitió la prueba de interacción y se comenzó a partir de la función, donde de antemano se tienen los vectores con la cantidad de réplicas al ser un diseño factorial desbalanceado. Posteriormente, se definió el vector de medias para los ocho tratamientos donde se definieron las diferencias relevantes de 100 unidades solamente para una estación climática, en este caso, la época de invierno..

Seguidamente, se realizó la técnica de Mínimos Cuadrados Ponderados para el resto del análisis. Se construyeron los intervalos simultáneos de Bonferroni y, por último, se simuló la cantidad de veces que se lograron detectar diferencias relevantes cuando las hay para el tipo de práctica agrícola o de uso del suelo convencional versus el resto de los tipos de prácticas de uso del suelo y bosque.

La aplicación de los métodos estadísticos se realizó en el lenguaje de programación R (R Core Team, 2022) en su versión 4.1.3. Asimismo, la visualización de los resultados se logró utilizando las librerías ggplot2 (Wickham, 2019) y car (Fox y Weisberg, 2019).

RESULTADOS

De manera inicial y como se indicó en la metodología, se analizó por medio de gráficos de cajas y la prueba `barlett.test` si el supuesto de homocedasticidad se estaba cumpliendo. Como resultado, se observa en el gráfico (ver Figura 3 en anexos) que hay evidencia de heterocedasticidad dentro de los tratamientos, lo cual se corrobora al aplicar la prueba de hipótesis, dado que la probabilidad asociada obtenida es de 0.0184, suficiente evidencia estadística para no asumir igualdad de varianzas dentro de los tratamientos.

El gráfico cuantil-cuantil (ver Figura 4 en anexos) presenta que el supuesto de normalidad de los residuales se estaba cumpliendo, los residuales con los cuantiles teóricos de una distribución normal, todos ellos se colocan muy cerca de una línea recta, esto indica que hay una proporcionalidad entre ellos, con lo cual se puede asumir que provengan de una distribución normal.

La interacción entre el tipo de práctica agrícola o de uso del suelo y la estación climática se muestra por los resultados de graficar ambos factores (ver Figura 1) y se observa que para la estación climática en invierno, las diferencias entre los promedios para los tipos de práctica agrícola o de uso del suelo convencional y orgánico son más pequeñas comparado con estas mismas prácticas de uso del suelo en el verano, puesto que sus promedios resultaron más distantes. Al igual que para bosque y BPA en el invierno se observa un efecto más grande que en el verano. Precisamente, esto representa un indicio de la existencia de interacción entre los factores tipo de práctica agrícola o de uso del suelo y la estación climática.

En la Tabla 1, es evidente que los promedios observados son muy distintos de los promedios estimados, por lo que indica la presencia de interacción. De igual forma, se realizó la prueba de hipótesis de no interacción para la cual se obtuvo una probabilidad asociada de 0.0292, por lo que hay suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula de independencia entre el tipo de práctica agrícola o sobre el uso del suelo y la estación. Por lo que la presencia de interacción implicó que la práctica de uso de suelo tiene un efecto sobre la actividad colinesterasa en al menos una estación climática.

Figura 1

Interacción a partir de la actividad de la colinesterasa entre el tipo de práctica agrícola o de uso del suelo y la época climática

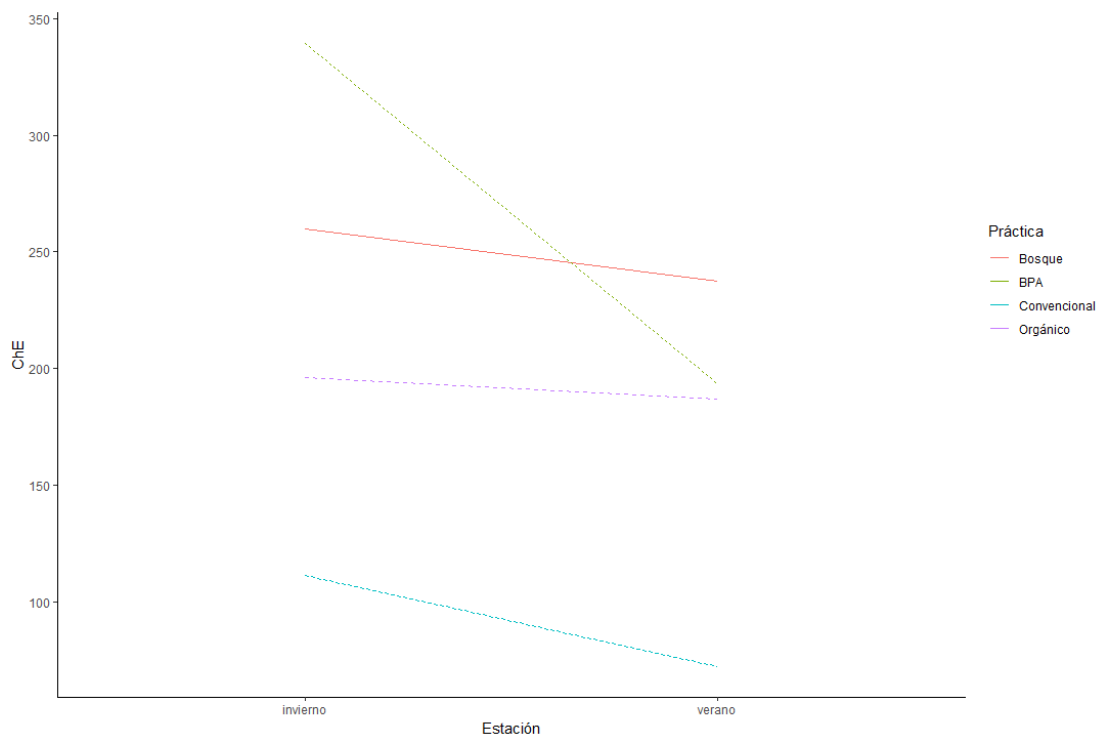


Tabla 1

Promedios observados y estimados de la actividad de la colinesterasa (unidades)

Tratamiento	Promedios	
	Observados	Estimados
Bosque – verano	259.86	277.21
BPA – Verano	339.28	290.89
Convencional – Verano	111.46	123.68
Orgánico – Verano	196.21	214.95
Bosque – Invierno	237.32	223.68
BPA – Invierno	193.71	237.35
Convencional – Invierno	72.50	70.15
Orgánico – Invierno	187.07	161.41

Como se observa en la Tabla 2, las diferencias de medias que resultaron significativas, debido a que se encontró una diferencia de más de 100 ChE de actividad colinesterasa, fue en el bloque de invierno fueron BPA-convencional, BPA-orgánico y bosque-convencional, mientras que en el caso de verano fueron bosque-convencional, BPA-convencional y orgánico-convencional respectivamente. Los intervalos de confianza simultáneos de Bonferroni probaron ortogonalidad tanto verano como invierno no resultaron ortogonales.

Tabla 2

Intervalos de confianza de diferencia de medias

Estación	Diferencias de medias significativas	Intervalos de confianza de diferencias de medias	
		Intervalo de confianza inferior	Intervalo de confianza Superior
Invierno	BPA – Convencional	153.96***	301.68
	BPA – Orgánico	36.32	249.82
	Bosque – Convencional	46.60	250.20
Verano	BPA – Convencional	74.71	167.70
	Orgánico – Convencional	57.03	172.10
	Bosque – Convencional	87.53	242.11

***Diferencias de 100 ChE

Como parte final de los resultados, la simulación de la potencia de la prueba es de 0.23, lo que indica que hay una probabilidad baja de encontrar diferencias de 100 unidades de ChE (componente químico actividad colinesterasa) entre los tratamientos cuando estas existen en la actividad colinesterasa en lombrices entre cada tipo de práctica agrícola o de uso del suelo dada la estación climática. Además, se definió un mínimo de 5 réplicas como una cantidad adecuada para asegurar una probabilidad alta de ver diferencias entre promedios.

CONCLUSIONES

Se concluyó que el tipo de práctica de uso del suelo de bosque no debería variar ni mucho menos estar por debajo de un tipo práctica donde hay una mayor exposición a plaguicidas (ver Figura 1). Una posible razón de esto puede ser el fenómeno de transporte de contaminantes y su cercanía al punto de extracción en el bosque que puede incurrir en la alteración de la medición de la actividad colinesterasa en lombrices. Sin embargo, se deben analizar con detenimiento los estudios de suelo para respaldar esta posible evidencia (Mena, 2022).

Como observó en la tabla 2, al comparar el tipo de práctica agrícola convencional versus BPA, orgánico y bosque dada la estación climática estas diferencias fueron muy pequeñas, lo cual no era de esperarse debido a que se esperaba que el tipo de práctica agrícola convencional presentara niveles de actividad colinesterasa más bajos que en los demás tipos de prácticas agrícolas debido a un mayor uso de plaguicidas. Por lo tanto, se esperaba que las diferencias fueran más grandes al comparar convencional versus el resto. Una de las posibles razones es una sobre estimación a la hora de medir los niveles de proteína en el ensayo enzimático (Mena, 2022). Seguidamente, se recomendó que debido a que la variable respuesta del biomarcador es la inhibición, debe enfocarse en las diferencias del tipo de uso de suelo o práctica convencional con respecto al resto de prácticas agrícolas o de uso de suelo puesto que está cien unidades por debajo del resto de prácticas de uso del suelo y el bosque.

Una de las complejidades de esta investigación fue que no se conocía con seguridad cómo varía la actividad colinesterasa en lombrices, en vista de que es la primera vez que se estudia en este tipo de organismo. Estudios previos recalcan la importancia de este biomarcador y recomiendan emplear otros biomarcadores como lo es la carboxilesterasa, porque puede resultar más sensible a los plaguicidas (Sanchez-Hernandez & Wheelock, 2009).

Algunas otras limitaciones que perjudicaron el diseño cuasiexperimental y, por ende, el análisis precedente se describen a continuación: primer lugar, las dimensiones del terreno no eran uniformes y contaba con pendientes, lo cual puede contribuir en que en

algunas zonas de la finca haya una mayor concentración de plaguicidas, esto por el transporte de contaminantes; en segundo lugar, no se consideró el tipo de cultivo que se siembra en la finca, y las cantidades de pesticida pueden cambiar como se puede observar en la figura 2 en anexos y; en tercer lugar, se seleccionó un solo cuadrante por conveniencia en cada finca. Finalmente, en estudios anteriores la recolección de los organismos fue completamente aleatoria y en una misma cantidad para asegurar una muestra uniforme (Calisi et al., 2013), por lo que para futuras investigaciones se sugiere seleccionar varios cuadrantes de las fincas y asegurar que la recolección de las lombrices se realice de forma aleatoria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albedín García, M. G. (2009). Caracterización de las colinesterasas presentes en cerebro y músculo de dorada (*Sparus aurata*) y estudio de su inhibición por insecticidas organofosforados. Universidad de Cádiz.
- Alvarado, R. (2021) Modelos de Regresión Aplicados: IV. Construcción del modelo. Universidad de Costa Rica. Presentación del curso.
- Argota, G., Argota, H., & Iannacone, J. (2013). Evaluación ecotoxicológica histórica en el ecosistema de San Juan, Santiago de Cuba, Cuba. https://revistas.unfv.edu.pe/rtb/article/view/403/355https://rodin.uca.es/bitstream/handle/10498/15731/Tes_2009_22.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Arsham, H., Wright, H., & Lovric, M. (n.d.). Bartlett's test. https://www.researchgate.net/profile/Dr-Hossein-Arsham/publication/344731676_BARTLETT'S_TEST/links/5f8ce5cb299bf1b53e324a18/BARTLETTS-TEST.pdf
- Calisi, A., Lionetto, M., & Schettino, T. (2011). Biomarker response in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to chemical pollutants. *Science of The Total Environment*, 409(20), 4456–4464. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.058>
- Calisi, A., Zaccarelli, N., Lionetto, M., & Schettino, T. (2013). Integrated biomarker analysis in the earthworm *Lumbricus terrestris*: Application to the monitoring of soil heavy metal pollution. *Chemosphere*, 90(11), 2637–2644. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.040>
- Chalén Benites, N., & Demera Sanchez, J. (2021). Estudio bibliográfico de los niveles de colinesterasa como biomarcador de exposición a plaguicidas organofosforados y carbamatos en agricultores, Repositorio Universidad de Guayaquil: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/58413/1/BCIEQ-T-%200657%20Chal%C3%A9n%20Benites%20%20Nicole%20Isabel%3B%20Demera%20S%C3%A1nchez%20Jos%C3%A9%20Alberto.pdf>

- Cruz, E; Bravo,V;Ramirez,F. (2022). Manual de plaguicidas de Centroamérica. Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas. Universidad Nacional, Costa Rica.
- Ford, C. (2015, August 26). Understanding Q-Q Plots. University of Virginia Library. <https://data.library.virginia.edu/understanding-q-q-plots/>
- H. Wickham. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016.
- John Fox and Sanford Weisberg (2019). An {R} Companion to Applied Regression, Third Edition Thousand Oaks CA: Sage. <https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/>
- Lionetto, M;Caricato, R; Calisi, ; Schettino, T. (2012). In: Ecotoxicology around the Globe Acetylcholinesterase Inhibition As A Relevant Biomarker In Environmental Biomonitoring: New Insights And Perspectives. (Pdf) In: Ecotoxicology Around The Globe Acetylcholinesterase Inhibition As A Relevant Biomarker In Environmental Biomonitoring: New Insights And Perspectives (researchgate.net)
- Lionetto, M; Caricato, R; Calisi; Schettino, T. (2011). Biomarker response in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to chemical pollutants. 10.1016/j.scitotenv.2011.06.058
- Mena, F. (2022). Charlas introductorias al proyecto. El Instituto Regional de Estudios en Sustancias Tóxicas de la Universidad Nacional
- Ramírez Muñoz, F.; Orozco Aceves, M.; Fournier Leiva, M.L.; Berrocal Montero, S.E.; Echeverría Sáenz, S.; de la Cruz Malavassi, E; Chaverri Fonseca, F; Moraga López, G.; Solano Díaz, K.; Alfaro Alfaro, A.; Pinnock Branford, M.; Rodríguez Rodríguez, G.; Bravo Durán, V.; Calvo Araya, J.A.; Ruepert, C. (2017). Las buenas prácticas agrícolas en el uso y manejo de agroquímicos en la zona hortícola de Zarcero, Alajuela. Universidad Nacional.
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Sanchez-Hernandez, J. C., & Wheelock, C. E. (2009). Tissue distribution, isozyme abundance and sensitivity to chlorpyrifos-oxon of carboxylesterases in the earthworm

- Lumbricus terrestris. *Environmental Pollution*, 157(1), 264–272.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.06.041>
- Stenersen, J., Brekke, E., & Engelstad, F. (1992). Earthworms for toxicity testing; species differences in response towards cholinesterase inhibiting insecticides. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(12), 1761–1764. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90184-y](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90184-y)
- Stenersen, J. (1979). Action of pesticides on earthworms. Part I: The toxicity of cholinesterase-inhibiting insecticides to earthworms as evaluated by laboratory tests. *Pesticide Science*, 10(1), 66–74. <https://doi.org/10.1002/ps.2780100109>
- Vughi M, Villa S. (2013) Ecotoxicology: The Challenges for the 21st Century. *Toxics*, 1(1):18-35. <https://doi.org/10.3390/toxics1010018>

ANEXOS

Figura 2

Número total de ingredientes activos utilizados por cultivo, Zarcero, Alajuela, en el período 2014 a 2016

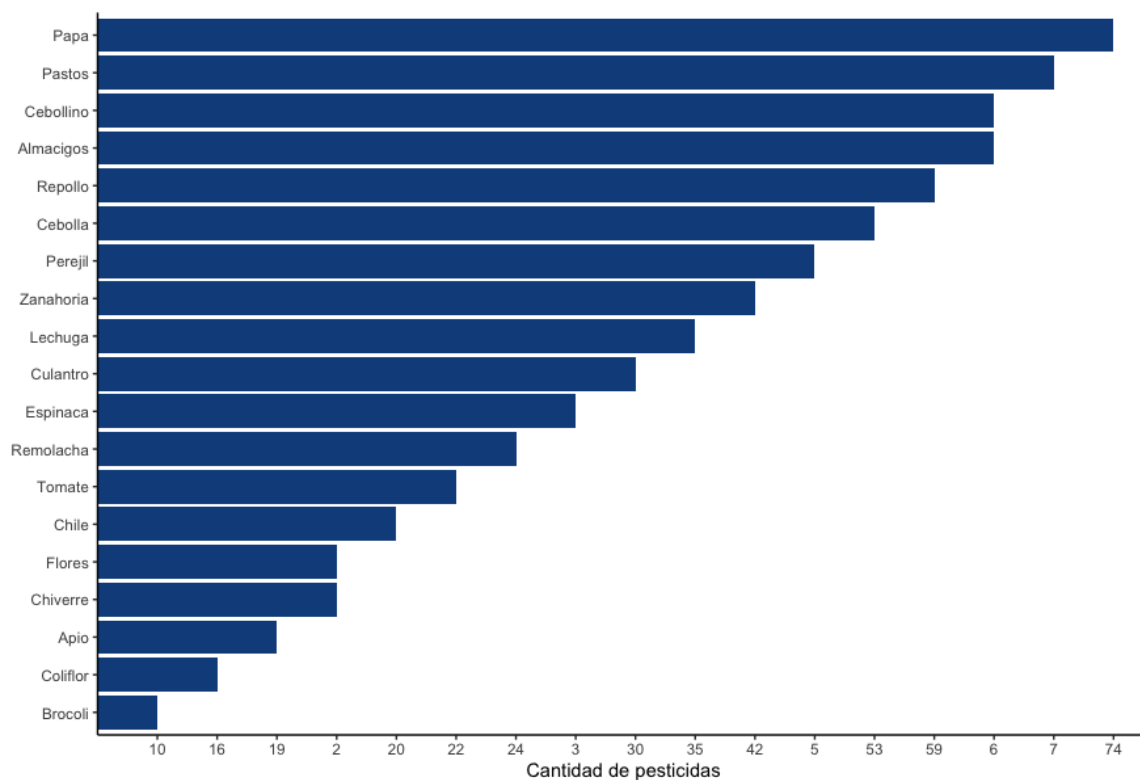


Figura 3

Variabilidad dentro de tratamientos

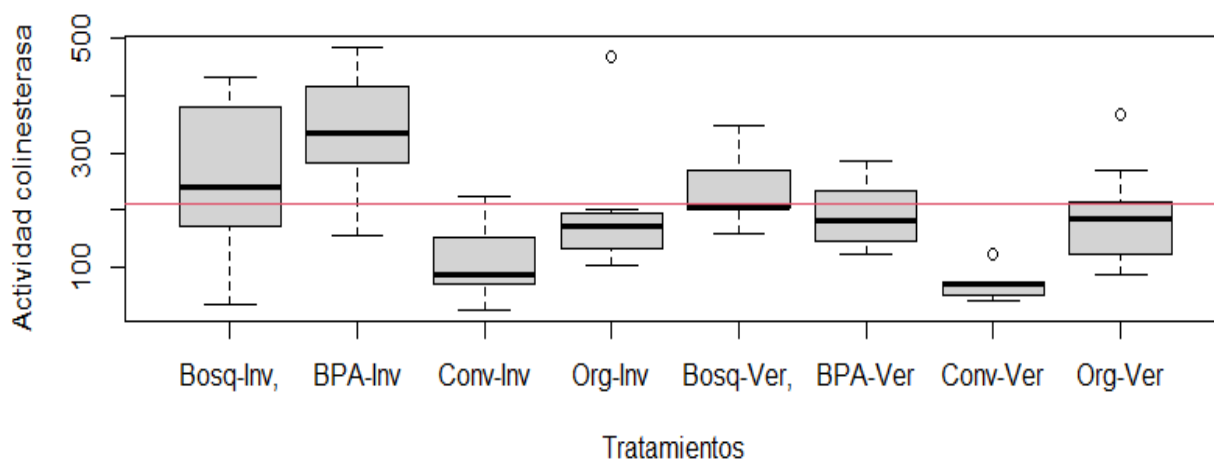


Figura 4

Gráfico QQ-Plot de normalidad

