

EFFECTO GENOTOXICO E IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN
EXTRACTOS DE PULPA DE DURAZNO (*Prunus pérsica (L.)Batsch*) CULTIVADOS EN
TRES MUNICIPIOS DE NORTE DE SANTANDER

Luis Fabián Yáñez Urbina
Biólogo

Universidad de Pamplona
Facultad de Ciencias Básicas
Maestría en Biología Molecular y Biotecnología
Universidad de Pamplona
Pamplona
2017

EFFECTO GENOTOXICO E IDENTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE PESTICIDAS EN
EXTRACTOS DE PULPA DE DURAZNO (*Prunus pérsica (L.)Batsch*) CULTIVADOS EN
TRES MUNICIPIOS DE NORTE DE SANTANDER

Luis Fabián Yáñez Urbina
Biólogo

Mgs. Iván Meléndez Gelvez
Director del Proyecto

Universidad de Pamplona
Facultad de Ciencias Básicas
Maestría en Biología Molecular y Biotecnología
Universidad de Pamplona
Pamplona
2017

Dedicatoria

A Dios, a mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su gran ejemplo de superación , por su incondicional apoyo perfectamente en todo y demás amigos quienes de una u otra manera aportaron en la motivación para la conclusión del presente proyecto.

Agradecimientos

A mi tutor, Iván Meléndez Gélvez por compartir su valioso conocimiento. Quien con su sabiduría, y metodología me supo encaminar hacia la feliz culminación.

A los docentes Alfonso Quijano, Reinaldo Gutiérrez, Gladis Montañez por su apoyo brindado en la ejecución de este trabajo.

LUIS FABIAN YAÑEZ URBINA

Título académico	Identificación	Correo electrónico	Teléfono	Institución	Grupo de Investigación
Biólogo	1094243797	Luisfa888@hotmail.com	3177376892	UNIVERSIDAD DE PAMPLONA	BIOMOGEN

IVÁN MELENDEZ GÉLVEZ

Título académico	Identificación	Correo electrónico	Teléfono	Institución	Grupo de Investigación
Biólogo. Msc,	70565125	ivorivan2010@hotmail.com	3012530634	UNIVERSIDAD DE PAMPLONA	BIOMOGEN

ALFONSO QUIJANO PARRA

Título académico	Identificación	Correo electrónico	Teléfono	Institución	Grupo de Investigación
PhD	13841120	alfonsoquijanoparra@gmail.com		UNIVERSIDAD DE PAMPLONA	QUIMICA

Información general del proyecto

Línea de Investigación: mutagénesis ambiental	
Lugar de ejecución del proyecto: El proyecto se ejecutó en el Departamento Norte de Santander, La muestras fueron tomadas en los municipios de Pamplonita, Cacota y Chitagá y analizadas en la Universidad de Pamplona	
Duración del proyecto (en meses): 18 meses	
Valor total del proyecto:	\$46.000.000 (en pesos)
Área: Mutagénesis, Biología molecular, biotecnología	
Línea estratégica: Mutagénesis y genotoxicidad	
Descriptor/Palabras claves: Durazno, genotoxicidad, ensayo cometa, cromatografía, pesticida.	
Universidad de Pamplona, Pamplona Abril de 2017	

Contenido

	Pág.
Resumen	11
Capitulo I.....	13
Titulo	13
Introducción.....	13
Justificacion	14
Pregunta de investigación.....	15
Objetivos.....	16
Objetivo General.....	16
Objetivos Especificos.....	16
Capitulo II	17
Marco Referencial	17
El duranzo.....	17
Cromatografía de Gases μ ECD.....	28
Capitulo III	30
Diseño metodológico.....	30
Área de estudio	30
Toma de la muestra.....	32
Obtención y preparación del extracto	32
Extracción de linfocitos	33
Prueba de citotoxicidad mediante la exclusión con el colorante azul de tripáno	33
Detección de daño del ADN por el Ensayo Cometa	33
Identificación de pesticidas en extractos de duraznos por Cromatografía de Gases μ ECD.....	34
Procesamiento y análisis de datos	35
Capitulo IV	36
Presentación e interpretación de resultados	36

Resultados.....	36
Detección de daño del ADN por el Ensayo Cometa	41
Genotóxicidad inducida por extractos de durazno. *: Diferencia significativa respecto al control negativo, P<0.05.....	44
Matriz de correlaciones	45
Resultados de ANOVA	47
Identificación de pesticidas en extractos de duraznos por Cromatografía de Gases μ ECD.....	36
Discusión.....	52
Conclusiones	57
Recomendaciones.....	58
Bibliografía.....	58

Listado de Tablas

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad expresada en DL 50 (mg/kg).....	19
Tabla 2. Clasificación de pesticidas, Basado en el objetivo de la plaga.....	20
Tabla 3. Clasificación de pesticidas Basado en el modo de formulación.....	21
Tabla 4. Clasificación de los plaguicidas según su vida media de efectividad	21
Tabla 5. Clasificación de los plaguicidas, según la familia química.....	23
Tabla 6. Técnicas de análisis utilizadas para la monitorización biológica de plaguicidas	29
Tabla 7. Porcentaje de Viabilidad de leucocitos humanos, antes y después del tratamiento	40
Tabla 8. Promedio de daño inducido en el ADN de linfocitos humanos por diferentes dosis de extracto de durazno cultivado en el municipio de Pamplonita N/S.	42
Tabla 9. Promedio de daño inducido en el ADN de linfocitos humanos por diferentes dosis de extracto de durazno cultivado en el municipio de Cacota N/S.	42
Tabla 10. Promedio de daño inducido en el ADN de linfocitos humanos por diferentes dosis de extracto de durazno cultivado en el municipio de Chitagá N/S.	43
Tabla 11. Matriz de correlaciones de la longitud del cometa con cada una de las demás variables.	45
Tabla 12. Daños en linfocitos humanos Inducidos por extractos de durazno cultivados en tres municipios de Norte de Santander	48

Lista de figuras

Figura 1. Área de estudio, Pamplonita Norte de Santander, Colombia.	30
Figura 2. Área de estudio, Cacota Norte de Santander, Colombia.....	31
Figura 3. Área de estudio, Chitagá Norte de Santander, Colombia.	32
Figura 4. Cromatograma patrón Pesticida Endosulfán II.	37
Figura 5. Cromatograma Patrón pesticida Beta BHC.	37
Figura 6. Cromatograma Patrón pesticida Eldrin Aldehído.	37
Figura 7. Cromatograma correspondiente al extracto de durazno Municipio de Pamplonita.	38
Figura 8. Cromatograma correspondiente al extracto de durazno Municipio de Cacota.	39
Figura 9. Cromatograma correspondiente al extracto de durazno Municipio de Chitagá.....	39
Figura 10. Porcentaje de viabilidad en linfocitos humanos inducida por extractos de durazno después del tratamiento.	41
Figura 11. Comparación Longitud del cometa, presentado en los diferentes municipios	44
Figura 12. Imágenes del daño inducido en linfocitos humanos por muestras de extracto de durazno, cultivados en tres municipios, Norte de Santander.	50

Resumen

Los pesticidas son considerados como uno de los principales factores de contaminación del medio ambiente, ya que como es conocido son ampliamente utilizados para mejorar la producción de alimentos en la agricultura, el control de plagas y vectores de enfermedades. Muchos han sido clasificados como cancerígenos porque inducen daño en el material genético. En este trabajo se determinó la genotoxicidad producida por extractos de durazno (*Prunus pérsica (L.)Batsch*) cultivados en tres municipios de Norte de Santander, (Pamplonita, Cacota y Chitagá). El ensayo cometa fue utilizado para la evaluación de la actividad genotóxica y para la detección de residuos de pesticidas se usó la técnica de cromatografía de gases μ ECD ; Por cromatografía, se detectaron pesticidas como Endosulfán II, Beta BHC y Endrin Aldehído, que pertenecen a la familia de los organoclorados. Los resultados obtenidos indican que el extracto de durazno induce lesiones en el ADN de linfocitos humanos, que varían de acuerdo a la concentración del extracto. Dado que el durazno es un producto de exportación y de alto consumo en nuestra región, la ingesta de este podría convertirse en un factor de riesgo para la población.

Palabras Clave: Durazno, genotoxicidad, ensayo cometa, cromatografía, pesticida.

Abstract

Pesticides are considered as one of the main factors of pollution of the environment; as is known are widely used to improve food production in agriculture and for the control of pests and vectors of diseases; many have been classified as carcinogenic, because they induce damage to the genetic material. In this work the genotoxicity produced by extracts of peach (*Prunus persica* (L.) Batsch) cultivated in three municipalities of Norte de Santander, (Pamplonita, Cacota and Chitagá) was determined. The kite test was used for the evaluation of genotoxic activity. For the detection of pesticide residues, μ ECD gas chromatography was used; by chromatography, pesticides such as Endosulfan II, Beta BHC and Endrin Aldehyde, which belong to the organochlorine family, were detected. The results obtained indicate that the peach extract induces lesions in the DNA of human lymphocytes, which vary according to the dose of the extract;. Since peach is an export product and high consumption in our region, its intake could become a risk factor for the population.

Keywords: Peach, genotoxicity, comet assay, chromatography, pesticide.

Capítulo I

1. Título

Efecto genotóxico e identificación de residuos de pesticidas en extractos de pulpa de durazno (*Prunus pérsica* (L.)Batsch) cultivados en tres municipios de Norte de Santander.

1.1 Introducción

El uso creciente y la inadecuada manipulación de sustancias destinadas a eliminar o atenuar el efecto de plagas animales o vegetales, han despertado cada vez mayor inquietud sobre los riesgos y daños que podrían provocar en el ambiente y en la salud pública. Los plaguicidas pueden causar problemas de intoxicación aguda o crónica para las personas que manipulan, aplican o trabajan con estos productos. La aplicación repetida de plaguicidas conduce a la pérdida de biodiversidad y al aumento de la resistencia a las plagas, mientras que sus efectos sobre otras especies facilitan el resurgimiento de plagas (Damalas, 2011). Se estima que en un 90 % de Los plaguicidas aplicados tienen el potencial de afectar a los organismos no objetivo y llegar a ser ampliamente dispersos en el medio ambiente (Simeonov, Macaev, & Simeonova, 2013).

La exposición a plaguicidas se ha asociado con el cáncer, las enfermedades neurológicas degenerativas y la respuesta inmune alterada, entre otras (Simoniello, Kleinsorge, Scagnetti, Grigolato, & Poletta, 2008). Este uso y manejo incorrecto de los plaguicidas es peligroso para el hombre, lo cual se puede manifestar por intoxicaciones en diversos grados y por efectos nocivos que pueden presentarse a mediano o largo plazo, tales como carcinogénesis, teratogénesis, esterilidad, mutagénesis y otros (Klaasen, Watkins, & Casarett, 1999.).

Los pesticidas pueden producir alteraciones genéticas, incluyendo desde micro a macro mutaciones. Estas alteraciones tienen la capacidad de producir modificaciones en las proteínas resultantes, alterando su funcionalidad y pudiendo causar, a largo plazo, trastornos en la salud humana. El daño generado por mutaciones puede incluir un amplio rango de enfermedades hereditarias, cáncer, anomalías congénitas y se lo vincula además con envejecimiento precoz o procesos de senescencia en general (Muchut, Simoniello, Scagnetti, Poletta, & Kleinsorge, 2011). Diversos agentes genotóxicos pueden entrar en el cuerpo a través de la ruta oral, el tracto gastro intestinal, el sistema respiratorio y la piel. Estos productos químicos o sus componentes pueden ser

absorbidos por los fluidos corporales y órganos en los que residen los linfocitos. Entre estos encontramos el sistema circulatorio, el sistema linfático, médula ósea, los ganglios linfáticos, el bazo y el timo. Cuando son absorbidos y circulan en el cuerpo humano pueden llegar a ser activados o transformados por diferentes órganos y por lo tanto influir en el grado de exposición de los linfocitos e inducir al riesgo químico de daño del ADN (Fenecha, y otros, 2016),

Según (Bianchi, Mantovani, & Marin, 2015) . La contaminación ambiental actualmente es de gran preocupación, ya que afecta a todo el mundo. Por lo tanto, es de gran importancia realizar estudios que clarifiquen los efectos de los contaminantes ambientales (residuos industriales, metales pesados y pesticidas) en los seres vivos y cómo interactúan, teniendo en cuenta el mecanismo de toxicidad de estos compuestos. Para lograr este objetivo, las pruebas con diferentes modelos están disponibles, lo que permite el acceso de una gama de puntos finales de los agentes tóxicos. Varias pruebas moleculares y bioquímicas se han desarrollado con el fin de determinar la magnitud de los daños en los seres vivos, sin embargo, algunas de ellas son bastante costosas y necesitan varios trabajos meticulosos (Dikilitas, Kocyigi, & Yigit, 2009).

En este sentido, bioensayos simples se pueden utilizar para detectar daños causados por sustancias tóxicas o contaminantes del medio ambiente a través de células modelo. Evitando en estas investigaciones científicas el uso de animales como modelos (Hartung, 2009). De los ensayos disponibles para este fin, el ensayo de cometa se considera una herramienta ideal en estudios toxicológicos (Kuroda, Jain, Tezuka, & Kada, 1992; Avishai, Rabinowitz, Moiseeva, & Rinkevich, 2002; Collins, 2004). Se destaca por su rapidez, sencillez, sensibilidad y de bajo costo para la detección y el análisis de roturas en el ADN en las células individuales (Brendler, Hartmann, Pfuhler, & Speit, 2005).

1.2 Justificación

La Producción del durazno en Colombia se concentra en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Norte de Santander, Santander, Antioquia, Caldas y Nariño, el principal productor es Boyacá con 677 ha, especialmente en el municipio de Sotaquirá y en otros municipios como Jenesano, Nuevo Colón, Combita y Tuta; el tercer departamento productor es Norte de Santander con 480 Ha, la mayor producción se encuentra en el municipio de Chitagá. Actualmente

concentrada la producción principalmente en los municipios de Cacota, Chitagá y Pamplonita con calidad de exportación. En el campo nacional este fruto es apetecido y altamente consumido en todos las regiones. El abuso indiscriminado en la utilización de pesticidas por parte de los agricultores superando las dosis requeridas para el control de plagas ya sea por cultura, para evitar pérdidas en la producción, aumentar la productividad e intentar reducir costos; posiblemente ocasionan que queden residuos en partes de la planta y en el fruto, los cuales llegan de forma directa a los consumidores. (Pabuena, y otros, 2015). Según reportes de los cultivadores de la región, los productos que más usan son: el funlate score, karate, sunfire, vertimek, lannate, fipronil, microthiol, daconil, derosal, forum, manzate, finale, baycor, difenoconasol, opera, tilt, azimut, nilo.(muchos de los cuales han demostrado tener efectos adversos en la salud y ocasionar daño genotóxico) (Xiang, y otros, 2013; Pabuena, y otros, 2015).

Considerando que el durazno es un fruto ampliamente producido y comercializado en el ámbito local, nacional e internacional, se hace necesario realizar estudios que nos indiquen presencia o ausencia de residuos de pesticidas, los cuales pueden llegar a generar un efecto genotóxico y cancerígeno sobre los consumidores. Es por este motivo que se realizó la evaluación genotóxica, así como la identificación de residuos de pesticidas, para lograr determinar si existe una relación entre el consumo de alimentos con residuos de pesticidas y la inducción de genotoxicidad en células humanas.

1.3 Pregunta de investigación

Teniendo en cuenta que para la producción del durazno se utiliza una amplia gama de pesticidas y que además es un producto ampliamente consumido y comercializado en toda la región, nos preguntamos ¿podremos encontrar residuos de dichos pesticidas en extractos de este fruto, y si estos podrán inducir algún tipo de daño genotóxico en células humanas? .

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General.

Aportar conocimientos a la comunidad científica con respecto a la acción genotóxica de algunos productos agrícolas consumidos en Norte de Santander

1.4.2 Objetivos Especificos.

Identificar los residuos de pesticidas en extractos de duraznos por Cromatografía de Gases μ ECD cultivados en los municipios Pamplonita, Cacota y Chitagá.

Determinar la actividad genotóxica inducida por extractos de pulpa de durazno, cultivados en los municipios de Pamplonita, Cacota y Chitagá.

Evaluar el daño genotóxico en linfocitos humanos bajo diferentes concentraciones de extracto de durazno, cultivados en los municipios de Pamplonita, Cacota y Chitagá.

Determinar cuál de las mediciones usadas para cuantificar el daño genotóxico es la más indicada por medio del ensayo cometa.

Capítulo II

2. Marco Referencial

2.1 El durazno

El durazno es una de las especies frutales caducifolias más populares cultivadas en las zonas templadas de todo el mundo. Su nombre científico, *Prunus persica* (L.) Batsch, sugiere que sería oriundo de Persia lo que, actualmente, se conoce como Irán (Cárdenas & Fischer, 2013). Es la segunda especie frutal de mayor importancia después del manzano, en las rosáceas (Cárdenas & Fischer, 2013; Bardenes, Lorente, Martínez, & Yacer, 1999; United State Department of Agriculture – USDA-. , 2013). Es uno de los frutales comúnmente más sembrados en zonas de trópico alto, dentro de la llamada fruticultura de clima frío, debido a las ventajas comparativas que estas regiones poseen, como clima, suelos, precipitación y acumulación de horas frío (Puentes, Rodríguez, & Bermúdez, 2008).

La producción en Colombia, se concentra en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, Norte de Santander y Santander (Ministerio de agricultura y desarrollo rural –MADR-. , 2012), en municipios principalmente ubicados entre 1.600 y 3.332 msnm (Carranza & Miranda, 2013). El departamento de Boyacá es el mayor productor de duraznero, con una producción de 12.00t, un rendimiento de 14,4t ha⁻¹, en un área de siembra (Ministerio de agricultura y desarrollo rural –MADR-. , 2012). Norte de Santander se ha venido posicionando como un departamento con una gran vocación hacia los frutales caducifolios, destacándose la incorporación de nuevas áreas de siembra de duraznero, tendencia que se evidencia, ya que se pasó de 168ha, reportadas en 2007, a 463ha, para el 2011, mostrando un incremento del 285% en el área; su participación en el mercado nacional es del 27,2%. El incremento en los dos últimos años, aproximadamente de 1000 a 1500 hectáreas puede posicionar al departamento norte de Santander en el primer lugar en el país, no solamente por área sembrada sino también por productividad por planta (Pinzón, Morillo, & Fischer, 2014; Peñaranda, 2012).

Entre los factores que limitan la producción agrícola y la calidad de las cosechas están las enfermedades y las plagas, las cuales pueden atacar los cultivos desde que las plantas inician su crecimiento, hasta la cosecha y su almacenamiento. Por tal motivo, actualmente se puede

evidenciar un uso creciente y una inadecuada manipulación de estas sustancias destinadas a eliminar o atenuar el efecto de plagas animales o vegetales, así mismo han despertado cada vez mayor inquietud sobre los riesgos y daños que podrían provocar en el ambiente y la salud pública (Simoniello, y otros, 2008). No obstante la importancia económica de estos productos, es necesario destacar que su aplicación indiscriminada y sin control puede ocasionar daños en el ambiente, deterioro de la flora y la fauna silvestre, contaminación del suelo, y aguas en general. Así como la generación de plagas resistentes (Klaasen, Watkins, & Casarett, 1999.).

La exposición no deseada a pesticidas puede ser peligrosa para los seres humanos y otros organismos vivos, ya que los pesticidas están diseñados para ser venenosos (Sarwar, 2015). También pueden ser perjudiciales para las personas expuestas a través del uso ocupacional (o doméstico), así como la ingesta de alimentos o líquidos que contengan residuos de pesticidas o a través de su inhalación (o contacto) de aire contaminado con plaguicidas (Pimentel, D, Culliney, & Bashore, 2013.), incluso niveles muy bajos de exposición pueden tener efectos adversos para la salud en el desarrollo temprano (Damalas, 2011). Los plaguicidas pueden también causar problemas de intoxicación aguda o crónica para las personas que manipulan, aplican o trabajan con estos productos. La exposición a plaguicidas se ha asociado con el cáncer, las enfermedades neurológicas degenerativas y la respuesta inmune alterada, entre otras (Simoniello, y otros, 2008).

Los pesticidas contribuyen a la contaminación ambiental por medio de productos degradados en aire, suelo, agua y alimentos; este contacto a largo plazo puede inducir daño en las poblaciones perturbando órganos, tejidos, sistemas entre otros (Collotta, Bertazzi, & Bollati, 2013). Los pesticidas son considerados como uno de los principales factores de contaminación que intervienen en el medio ambiente y el mundo de hoy (Mostafalou, 2013). Un pesticida se puede definir como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar cualquier tipo de plagas (insectos, ácaros, nematodos, malezas, ratas, y etc.). Los plaguicidas son una de las pocas sustancias tóxicas liberadas deliberadamente en el medio ambiente para matar organismos vivos (por ejemplo, malezas (herbicidas), insectos (insecticidas), hongos (fungicidas) y roedores (rodenticidas).

Aunque el término pesticida es a menudo mal entendido para referirse sólo a los insecticidas, también es aplicable a los herbicidas, fungicidas y otras sustancias utilizadas para controlar las plagas (Matthews, 2006). Se pueden clasificar en insecticidas, herbicidas, fungicidas, y varias otras sustancias (EPA, 2009). Estas sustancias químicas se encuentran diseñadas para ser tóxicas con las plagas y vectores de enfermedades. Contienen más de 1.000 ingredientes activos que son altamente comercializados (Mostafalou & Mohammad, 2013).

Según describe (Mostafalou S. M., 2013) aunque los pesticidas han beneficiado en gran medida la vida humana a través de la mejora de los productos agrícolas y el control infeccioso de enfermedades, su uso extendido y exagerado a su vez ha afectado la salud humana. Los plaguicidas se clasifican principalmente en la función de algunas de sus características principales, como son la toxicidad aguda, la vida media, la estructura química y su uso (López, 1993). En 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda (López, 1993), la cual se define como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto (tabla 1) (Organización Mundial de la Salud, 1993). La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL50) o de la concentración letal media (CL50).

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad expresada en DL 50 (mg/kg)

Clase	Toxicidad	Ejemplos
Clase ia	Extremadamente peligrosos	Partión, dieldrin
Clase iib	Altamente peligrosos	Eldrin, diclorvos
Clase ii	Moderadamente peligrosos	Ddt, clordano
Clase iii	Ligeramente peligrosos	Malation

Fuente: (Ramírez & Lacasaña, 2001)

Así mismo pueden clasificarse según diversos criterios, tales como sus componentes químicos, grupos funcionales, modo de acción y toxicidad (García, Ascencio, Oyarzun, Hernández, & Vázquez, 2012.) La Tabla 2, 3 y 4 proporciona la clasificación de los pesticidas

basándose en criterios diferentes. Los ingredientes activos de la mayoría de los pesticidas son orgánicos (contienen carbono) o inorgánicos (sulfato de cobre, sulfato ferroso, cobre, cal, azufre, etc.) (Gunnell, Eddleston, Phillips, & Konradsen, 2007). Las sustancias químicas de los plaguicidas orgánicos tienden a ser más complejas y menos solubles en el agua que las de los plaguicidas inorgánicos (Debost-Légrand, Warembourg, Chevrier, & Bonvallot, 2016).

Tabla 2. Clasificación de pesticidas, Basado en el objetivo de la plaga

Tipo de pesticida	Peste
Alguicida	Algas
Avicida	Aves
Bactericida	Bacterias
Fungicida	Hongos
Herbicida	Hierba
Insecticida	Insectos
Miticida	Ácaros
Molusquicida	Caracoles, babosas
Nematicida	Nematodos
Piscicida	Peces
Rodenticida	Roedores

Fuente: Tomado de (Aktar, Sengupta, & Chowdhury, 2009)

Tabla 3. Clasificación de pesticidas Basado en el modo de formulación

Estado físico	Características
Emulsionables concentrados	No requiere agitación constante antes de su utilización
Polvo Humectable	Requiere agitación constante antes de su utilización
Granulos	Obtenido mezclando el ingrediente activo con arcilla
Cebos	Obtenido mezclando el ingrediente activo con los alimentos
Polvo	Los polvos no pueden mezclarse con agua y deben ser Aplicado seco

Fuente: Tomado de (Mascarelli, 2013.)

Por su vida media, los plaguicidas se clasifican en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (Organización Mundial de la Salud, 1990; Briggs SA, 1992; Al-Saleh I, 1994). Véase Tabla. 4.

Tabla 4. Clasificación de los plaguicidas según su vida media de efectividad

PERSISTENCIA ^a	VIDA MEDIA ^b	EJEMPLOS
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malation, diazinón, carbarilo, diametrín.
Moderadamente persistente	Se 1 a 18 meses	Paratión, lannate.
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín.

Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de Mercurio, Plomo y Arsénico.
-------------	-----------------	--

Fuente: (Ramírez & Lacasaña, 2001)

Los plaguicidas se clasifican a veces por el tipo de plaga para la que se aplican (tabla 2) (Aktar, Sengupta, & Chowdhury, 2009). Según (Ki-Hyun, Ehsanul, & Shamin, 2017) Los plaguicidas tienen diferentes modos de acción o maneras de controlar la plaga. Además, ciertos herbicidas pueden simular la función de los reguladores del crecimiento de las plantas, mientras que otros pueden controlar efectivamente la capacidad de una planta para convertir la luz en alimento. Del mismo modo, un fungicida puede afectar a la división celular, mientras que otros pueden ser eficaces para frenar la creación de ciertos compuestos en los hongos. Como un fungicida se utiliza para controlar el crecimiento de hongos, acaricidas, insecticidas y herbicidas se utilizan para los ácaros, insectos y malas hierbas, respectivamente. Los insecticidas son capaces de matar a los insectos al penetrar en sus cuerpos por contacto directo (entrada dérmica), oral y / o respiratoria. Los herbicidas se usan para matar las plantas por contacto directo y / o matando las malas hierbas cuando son absorbidas a través de las hojas, tallos o raíces (Mnif, y otros, 2011.).

Según (Ramírez & Lacasaña, 2001) De acuerdo a su estructura química, los plaguicidas se clasifican en diversas familias, que incluyen desde los Compuestos Organoclorados y organofosforados hasta compuestos inorgánicos (tabla 5). Solo hacen referencia algunas familias de plaguicidas relevantes por el daño que causan a la salud y por su gran demanda de uso.

Tabla 5. Clasificación de los plaguicidas, según la familia química.

Familia química	Ejemplos
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, Endrín
Organofosforados	Bromophos, diclorvos, malatión
Carbamatos	Carbaryl, methomyl, propoxur
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
Piretroides	Cypermethrin, fenvalerato, permetrín
Derivados bipiridilos	Cloromequat, diquat, paraquat
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, picram, silvex
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
Derivados de triazinas	Atrazine, ametryn, desmetryn, simazine
Compuestos Orgánicos del Estaño	Cyhexatin, dowco, plictran
Compuestos Inorgánicos	Arsénico, pentóxido, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio y fosforo blanco
Compuestos de origen Botánico	Rotenona, nicotina, aceite de canola

Fuente: (López, 1993).

Los pesticidas carbamatos, organofosforados y pesticidas organoclorados son ampliamente aplicados a los cultivos de frutas y hortalizas en todo el mundo (Zhang & Jiang F, 2011). Los organoclorados (OC) son los plaguicidas ampliamente utilizados. Su estructura química corresponde a la de los hidrocarburos clorados (Organización Mundial de la Salud, 1990.), lo que les confiere una alta estabilidad física y química, haciéndolos insolubles en agua, no volátiles y altamente solubles en disolventes orgánicos. Estas características favorecen su persistencia en el ambiente (Organización Mundial de la Salud, 1990.) Y su lenta biodegradabilidad (Al-Saleh I, 1994). Su vida media es de 5 años, aunque varía según el producto; por ejemplo, para el beta hexaclorociclohexano es de 3 años, para el aldrín de 6 años y para el DDT es de 30 años (Ramírez

& Lacasaña, 2001). El compuesto como tal o sus metabolitos son contaminantes ubicuos de varios tejidos en humanos y de los mamíferos en general. A causa de su alta lipofilia tienden a acumularse principalmente en el tejido celular subcutáneo, en el componente graso de la leche materna y de la sangre (Al-Saleh I, 1994) Productos representativos de este grupo son el DDT, el aldrín, el dieldrín y el endrín, así como el endosulfán y el lindano (Ramírez & Lacasaña, 2001).

El uso de estos productos químicos, especialmente organoclorados en ocasiones ha estado acompañado por los riesgos para la salud humana y el medio ambiente debido a su potencial tóxico, alta persistencia, bioconcentración, y, en particular, su toxicidad no específica (Bempah & Donkor, 2011). A pesar de que el uso de ciertos plaguicidas Organoclorados en la agricultura está prohibido en muchos países, estos compuestos han sido detectados en el medio ambiente debido a su persistencia en todo el mundo. Estos plaguicidas Organoclorados son productos químicos ubicuos altamente persistentes y tóxicos. La mayor parte de su utilización ha sido prohibida o restringida en todo el mundo desde los años 1970 y 1980 debido a su persistencia en el ambiente y los posibles efectos adversos sobre la fauna y la salud humana (CDC, 2013). Sin embargo, varios de estos compuestos se siguen utilizando en programas de agricultura y de salud pública en los países en vía de desarrollo de Asia, África y América Latina, en especial para el control de vectores (Van den Berg, 2009). Debido a su uso continuado en algunas partes del mundo, su resistencia a la degradación, y a la afinidad por la grasa, Estos plaguicidas tienen la particularidad de permanecer en el medio ambiente y tejidos humanos (CDC, 2013).

Según (Benny L, 2005). Endrin es un insecticida sintético organoclorado, rodenticida y avicida, que se usó principalmente en algodón, arroz, caña de azúcar, maíz, así como otros cultivos. Es persistente en suelos, con una vida media de hasta 12 años. La endrina produce una inhibición no competitiva del transporte de cloruro regulado con ácido γ -aminobutírico (GABA), bloqueando la estimulación de la entrada de cloruro en la neurona, causando hiper excitabilidad del sistema nervioso central.

Las especies terrestres tienen LD₅₀ valores que van de 1 a 10 mg kg⁻¹ peso corporal. Hay evidencia de alteraciones reproductivas en ciertas especies. Además, algunos organismos acuáticos y terrestres parecen ser capaces de desarrollar una resistencia a la endrina en el tiempo. La endrina

ya no se utiliza en la mayor parte del mundo, y se han identificado en estudios recientes cantidades mínimas, si las hay, en muestras de sangre de alimentos, aire, agua o sangre humana (M & L, 2014)

Los compuestos organofosforados (OF), que son ésteres, amidas o tioles derivados de los ácidos fosfórico, fosfónico y fosforico (Organización Mundial de la Salud, 1993), forman otro grupo. Se descomponen con mayor facilidad y se degradan por oxidación e hidrólisis, dando origen a productos solubles en agua, tentativamente menos persistentes y poco acumulables en el organismo humano (Organización Mundial de la Salud, 1993). Pertenecen a este grupo el paratión, el malatión, el diazinón, el clorpirifos y el diclorvos.

Los carbamatos (C) son otro grupo de plaguicidas que pueden ser de tres tipos principales: *a)* derivados de ésteres carbamatados, comúnmente usados como insecticidas; *b)* derivados del ácido tiocarbámico, utilizados como fungicidas, y *c)* carbamatos propiamente dichos, que se emplean como herbicidas (Organización Mundial de la Salud, 1993) Todos ellos son relativamente inestables, se les atribuye un tiempo corto de persistencia ambiental y cuentan con cierta selectividad (Organización Mundial de la Salud, 1993). Su degradación se realiza por oxidación y sus metabolitos finales son hidrosolubles pudiendo excretarse por la orina y las heces fecales (Al-Saleh I, 1994). Entre los más comunes se encuentran el lannate, el carbarilo y el carbyl.

Las moléculas de piretrinas son neuroactivas, de baja absorción dérmica, con un metabolismo rápido y no dejan residuos en la atmósfera (Al-Saleh I, 1994) . Según (Organización Mundial de la Salud, 1990.). Los piretroides son piretrinas sintéticas que surgen en los años cincuenta. Químicamente, se dividen en dos tipos: *a)* sin grupo alfaciano, como el permetrín y resmetrín, y *b)* con grupo alfaciano, como fenvalerato, diametrín y cypermetrín. Todos son metabolizados por hidrólisis, oxidación y conjugación, con poca tendencia a acumularse en los tejidos. Además son rápidamente degradados en el ambiente, pues aunque se absorben masivamente por el suelo, se eliminan fácilmente con el agua (Al-Saleh I, 1994)

La situación de la contaminación por plaguicidas en Medios ambientales (como el aire, el agua y el suelo) se resume en Algunos pesticidas (por ejemplo, aldrina, clordano, diclorodifeniltricloroetano (DDT), dieldrina, endrina, heptaclo y hexaclorobenceno) Contienen

contaminantes orgánicos persistentes (POP) que resisten la degradación Y por lo tanto permanecer en el medio ambiente durante años (Yadav & Devi, 2015).

Estudios como el realizado por (Haibing, Yuling, & Cheng., 2010) demuestra que Lambda-Cyhalothrin, componente activo de Karate Zeon (insecticida piretroide), es utilizado altamente en la agricultura y puede causar alteración de la conciencia y convulsiones ya que afecta directamente al sistema nervioso central de los seres humanos, además de ocasionar efectos disruptores endocrinos. Otros estudios involucran pesticidas como el insecticida y acaricida Lannate, el cual se identifica por contener un potencial de citotoxicidad y genotoxicidad de su componente activo metomilo(S-Metil-N-[(metilcarbamoil) oxi]tioacetamidato) (Xiang, y otros, 2013) . A sí mismo en estudios realizados por (Bolognesi, y otros, 1994)nos muestran una considerable genotoxicidad de metomilo en linfocitos humanos, induciendo aberraciones cromosómicas y micronúcleos dependientes de la dosis.

Residuos de plaguicidas pueden ser encontrados en frutas y verduras y se han convertido en un importante problema de salud pública, probablemente debido al corto intervalo entre las cosechas y el tiempo transcurrido al ser llevados a los mercados y al ser consumidos en crudo (Pabuena, y otros, 2015) . Se encuentra amplia evidencia en donde muchos pesticidas están asociados con la capacidad de generar daño a nivel del material genético por ejemplo Rupturas en el ADN, aductos en el ADN, aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas (Lander, Knudsen, Gamborg, Jarventaus, & Norppa, 2000). Cada vez hay más pruebas de la relación de la exposición de pesticidas con la incidencia de enfermedades crónicas humanas, pues son consideradas como la principal causa de mortalidad en el nuevo mundo, lo que representa más del 60% de todas las muertes (Mostafalou & Mohammad, 2013)Estos agentes genotóxicos también afectan negativamente la integridad del material genético de una célula. Aunque la capacidad de una sustancia para dañar el ADN no la convierta automáticamente en un peligro para la salud, la preocupación radica en saber si la sustancia puede ser potencialmente mutagénica o carcinógena (Alborghetti, y otros, 2015).

La exposición a los residuos de plaguicidas a través de la dieta se supone que es cinco órdenes de magnitud mayor que otras vías de exposición, como el agua y el aire. (Juraske, Mutel,

Stoessel, & Hellweg) Aunque la exposición a plaguicidas puede ocurrir a través de diferentes vías, como la inhalación, la exposición cutánea y la ingesta alimentaria y no alimentaria, el consumo de alimentos ha sido reconocido como la ruta principal de exposición a residuos de plaguicidas para los consumidores que no trabajan con pesticidas (Juraska, Mutel, Stoessel, & Hellweg)

Así mismo la exposición a plaguicidas se relaciona con diversas enfermedades, incluyendo cáncer, alteración hormonal, asma, alergias e hipersensibilidad (Baldi, 2009). También existe una línea de evidencia para los impactos negativos de la exposición a los plaguicidas, lo que conduce a defectos congénitos, reducción del peso al nacer, muerte fetal, etcétera (Wickerham, Lozoff, J. Shao, & Kaciroti, 2012).

El ensayo de cometa se considera una herramienta ideal en estudios toxicológicos que se destaca por su rapidez, sencillez, sensibilidad y bajo costo. Es una herramienta ideal para la detección y el análisis de roturas en el ADN en células individuales. Además, el ensayo cometa permite calificar y cuantificar la gravedad de los daños en el ADN mediante el análisis de la fragmentación originada por su ruptura (Brendler, Hartmann, Pfuhler, & Speit, 2005).

Una de las ventajas del ensayo Cometa es su sensibilidad para detectar el daño del ADN en el nivel más bajo (0,1 rupturas de ADN por $10^{(9)}$ daltons) en comparación con las pruebas de aberración cromosómica y el ensayo de micronúcleos (Gedik & S. Ewen, 1992). Además, el requisito de un pequeño número de células (~ 10.000) por muestra, la flexibilidad para utilizar la proliferación, así como las células no proliferantes, de bajo costo, la fácil aplicación y la corta duración del ensayo (Tice, y otros, 2000). Según (Muchut, Simoniello, Scagnetti, Poletta, & Kleinsorge, 2011) El Ensayo Cometa, también llamado Electroforesis en gel de células individuales, permite evaluar los niveles de lesión y reparación del ADN en cualquier población celular, sin necesidad de que la misma se encuentre en proliferación. El Ensayo Cometa es un método versátil y sensible para medir roturas de simple y doble cadena del ADN y sitios alcalilábiles. El mismo se basa en montar las células de interés sobre un portaobjeto, embebidas en un gel de agarosa, lisarlas para liberar el material genético y permitir la relajación y expansión de la cromatina, exponiendo de esta manera las lesiones previamente generadas por el agente genotóxico.

Al someter a los nucleoides a un campo electroforético, los fragmentos migran hacia el ánodo (Collins, Dobson, Dusinska, Kennedy, & Stetina, 1997), dando como resultado la aparición de pequeños “cometas” que pueden observarse al microscopio, preferentemente de fluorescencia. A mayor daño inducido a la doble hélice de ADN, mayor longitud del cometa. La versión alcalina del ensayo es capaz de detectar rupturas de simple cadena, sitios álcali-lábiles, entrecruzamientos ADN-ADN/ ADN-proteína y rupturas de cadena simple asociadas con sitios de reparación por escisión incompletos (Tice, y otros, 2000.). El Ensayo cometa es aplicable a casi todos los grupos de organismos y a pequeñas muestras de células. También se ha adoptado en varios pasos para que sea adecuado para el estudio fundamental daños y reparación el ADN .Es una herramienta ideal para pruebas de estudio de genotóxicidad, y biomonitorización ambiental. (Cortes-Gutierrez, Davila-Rodríguez, Fernandez, C. Lopez- Fernandez, & A. Gosalbez, 2011)

2.1.1 Cromatografía de Gases μ ECD.

La cromatografía de gases (GC) es una técnica de separación ampliamente usada en el análisis de residuos de plaguicidas, debido a su sensibilidad y a su selectividad de detectores con los que cuenta, como el detector de captura de electrones (ECD) micro captura de electrones (μ ECD), detector de nitrógeno fósforo (NPD), espectrometría de masas (SM) entre otros (Columbe, Cardenas, Gallego, & Valcarcel, 2001) Cualquier metodología analítica para determinación de plaguicidas debe ser rápida, económica y aplicable, además con pocas modificaciones cuando se decida cambiar de matriz.

Las técnicas de laboratorio utilizadas para la biomonitorización de los plaguicidas o sus metabolitos son diversas. En la tabla 6 se mencionan las más comunes según las familias químicas de plaguicidas en las que se utilizan. (Organización Mundial de la Salud, 1990.)

Tabla 6. Técnicas de análisis utilizadas para la monitorización biológica de plaguicidas

Prueba de laboratorio	Tipo de plaguicida a detectar
Cromatografía de gases	Organoclorados, organofosforados y carbamatos
Cromatografía líquida de gases	Organoclorados y piretroides
Cromatografía líquida de alta resolución	Organoclorados y organofosforados
Detección por electrón captura	Organoclorados
Análisis de neutrón activación	Organoclorados
Espectrofotometría de masas	Organoclorados, organofosforados y carbamatos
Espectroscopia de masas de alta resolución	Organoclorados, organofosforados y carbamatos
Dilución de isótopos	Organoclorados, organofosforados y carbamatos

Fuente: (Ramírez & Lacasaña, 2001)

De igual manera, puede analizarse un mismo lote de muestras con dos o tres pruebas simultáneamente para mejorar la sensibilidad y la especificidad (Al-Saleh I, 1994) aunque la monitorización biológica puede considerarse el método óptimo en la medición de la exposición a plaguicidas, tiene algunas limitaciones, la principal es que las pruebas sólo se han desarrollado para un número proporcionalmente pequeño de ingredientes activos, debido a que se carece de información suficiente y adecuada, sobre el metabolismo de muchos compuestos químicos en humanos (Hill, Head, Gregg, Shealy, & Bailey, 1995)

Capítulo III

3. Diseño metodológico

3.1 Área de estudio

Las muestras de durazno fueron tomadas en cultivos pertenecientes a tres municipios del Departamento de Norte de Santander. En el municipio de Pamplonita, el cual está ubicado en la Región Sur-Occidental del Departamento Norte de Santander, junto con los Municipios de Pamplona, Mutíscua, Silos, Chitagá y Cácuta. 72° 39' al oeste del meridiano de Greenwich (longitud) y a 7° 26' al norte del paralelo ecuatorial (latitud); Altitud (metros sobre el nivel del mar): 1.750 Metros. Temperatura media: media 10 °C, en las zonas más altas, y de 22° C en las más bajas.

Figura 1. Área de estudio, Pamplonita Norte de Santander, Colombia.



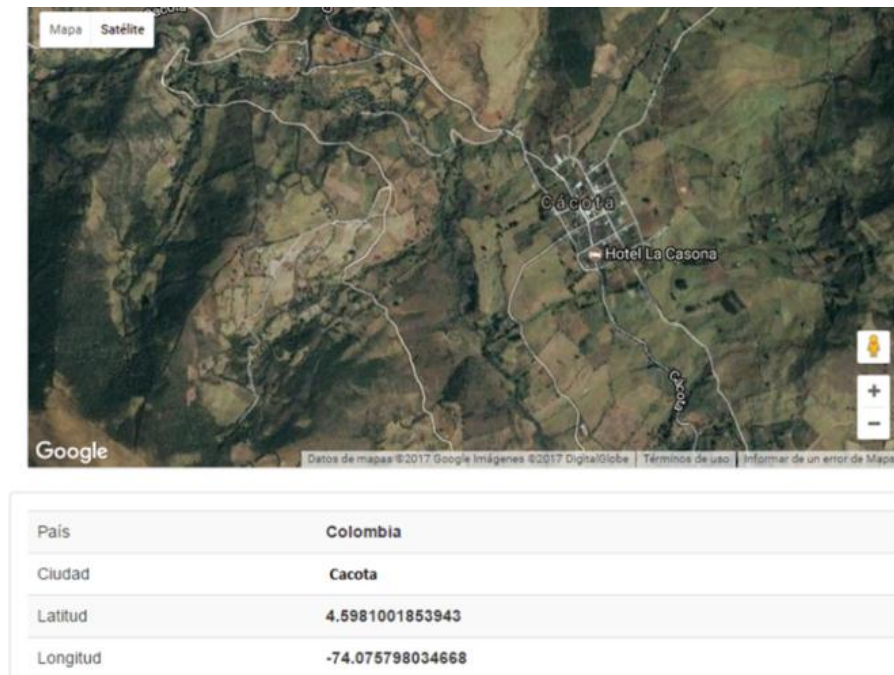
País	Colombia
Ciudad	Pamplonita
Latitud	4.5981001853943
Longitud	-74.075798034668

Fuente: <https://www.cual-es-mi-ip.net/geolocalizar-ip-mapa>

En el Municipio de Cácuta de Velasco está ubicado en la zona suroccidental del Departamento Norte de Santander, siendo su posición geográfica la siguiente: desde 1.148.600 a

1.165.420 longitud oeste y desde 1.287.090 a 1.302.850 latitud norte. Su superficie tiene un área de 139.71 kilómetros cuadrados.

Figura 2. Área de estudio, Cacota Norte de Santander, Colombia.



Fuente: <https://www.cual-es-mi-ip.net/geolocalizar-ip-mapa>

El municipio de Chitagá está ubicado en la zona suroccidental de Norte de Santander. Su altitud de 2.350 metros sobre el nivel del mar y su clima es frío. Su temperatura media es de 14°C. Hace parte de la región sur-occidental del departamento y de la Provincia de Pamplona. Su superficie tiene un área de 1200 kilómetros cuadrados. Coordenadas geográficas: Longitud al oeste de Greenwich 72° 40', Latitud Norte 7° 08'

Figura 3. Área de estudio, Chitagá Norte de Santander, Colombia.



Pais	Colombia
Ciudad	Chitagá
Latitud	4.5981001853943
Longitud	-74.075798034668

Fuente: <https://www.cual-es-mi-ip.net/geolocalizar-ip-mapa>

3.2 Toma de la muestra

Se realizaron dos (2) muestreos por municipio justo en el momento en el que son recolectados para ser llevados al mercado. Se recolectó 1 kg del fruto, el cual se guardó en cajas o termos de icopor para evitar cualquier tipo de contaminación y posteriormente almacenado a bajas temperaturas hasta el momento de su procesamiento.

3.3 Obtención y preparación del extracto

Para la obtención y preparación del extracto de durazno, Se maceró 120 g de durazno durante 15 minutos hasta obtener el jugo, luego se adicionó 30 mL de acetona, se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos se retiró y se almaceno el sobrenadante. Este procedimiento se repite 5 veces. Para la concentración del material presente en el extracto, el sobrenadante recolectado se pasó a través de una columna que contenía amberlita XAD-2 (15g) a una velocidad de 15 mL/min; el material retenido por la amberlita fue eluido con 100 mL de diclorometano. Después de obtenido el extracto, se concentró en un evaporador rotatorio de vacío a baja presión (Heidolph modelo

Laborota 400-1), hasta la sequedad, seguidamente se cuantificó el extracto seco equivalente a los 120 gramos iniciales.

El extracto obtenido se dividió en dos partes, la primera parte para los análisis genotóxicos el cual se diluyó en 3 ml de dimetil sulfóxido al 1% y la parte restante para el análisis cromatográfico.

3.4 Extracción de linfocitos

Para los experimentos de genotoxicidad, se usaron linfocitos de sangre periférica, que se extrajeron de una persona joven y sana. Los linfocitos se separaron de sangre total, usando un gradiente de ficoll-hipaque. Seguidamente, se realizó una prueba de citotoxicidad mediante exclusión con azul de tripano

3.5 Prueba de citotoxicidad mediante la exclusión con el colorante azul de tripano

Se utilizó el protocolo descrito por (Strober, 2001), con algunas modificaciones:

La viabilidad se determinó antes y después del tratamiento. Se trataron 40.000 células o linfocitos con tres (3) concentraciones (100µg, 200µg y 300µg) de extractos de durazno, se realizaron los controles negativos con dimetil sulfóxido al 1%, cada experimento se realizó por duplicado, posteriormente se incubó a 37°C durante una hora. Se tomaron 10 uL de células tratadas más 90 µL de azul tripano 0,4% (Dilución 1:10), se espera que actué el colorante durante 10 minutos y se procedió al conteo en un microscopio óptico binocular. Finalmente se determinó el porcentaje de viabilidad celular. Los datos se presentan como el valor medio obtenido para el porcentaje de viabilidad celular y el error estándar de la media.

$$\% \text{ de viabilidad celular} = \text{número total de células vivas} / \text{número total de células} * 100$$

3.6 Detección de daño del ADN por el Ensayo Cometa

Para detectar el daño o la ruptura del ADN se utilizó el ensayo cometa en microgel de agarosa. Se siguió la metodología propuesta por (Singh, McCoy, Tice, & Schneider, 1998) y modificada por (Pandurangi, Petras, Ralph, & Vrzoc, 1995)

Se trataron alrededor de 40.000 células o linfocitos con tres concentraciones (100µg, 200 µg y 300 µg) de extractos de durazno, se incubaron por un periodo de 1 hora a 37°C, Posteriormente se tomaron 20µL de suspensión celular para resuspender con 80µL de agarosa de bajo punto 31 de fusión (Sigma) 0,5% a 37°C y se depositó sobre un portaobjetos previamente recubierto con una capa de agarosa de punto de fusión normal (Sigma) al 1%. La suspensión celular se cubrió con cubreobjetos y se refrigeró a 4°C por 6 minutos. Luego se removió cuidadosamente el cubreobjetos y se adicionó una segunda capa de agarosa de bajo punto de fusión, se volvió a cubrir con un cubreobjetos se refrigeraron a 4°C por otros 6 minutos. Después de la solidificación, las placas se sumergieron 1h en solución de lisis, luego, las placas se lavaron con PBS y se sumergieron en una cámara de electroforesis horizontal con un buffer pH>13, la cual se incubó por 30 minutos a 4°C, luego se realizó el corrido electroforético a 25V y 300 mA por 30 minutos.

Después de la electroforesis, las placas fueron lavadas con un buffer neutralizante, luego se tiñeron con 50 µl de Bromuro de etidio (0.02mg/mL). Las observaciones se realizaron en un microscopio de fluorescencia (Olimpus Cx41) equipado con filtro de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Se realizaron tres experimentos por cada tratamiento y en cada uno se contaron 300 células. Como control negativo se utilizó, el DMSO al 1%, que fue el solvente en el cual se diluyeron las muestras. La ocurrencia de daño en el ADN se determinó mediante el uso del software (Tritek Comet Score™ freeware v1.5) basado en las siguientes mediciones: longitud total del cometa, diámetro de la cabeza (µm), %DNA en cabeza, longitud de la cola µm, %DNA en cola.

3.7 Identificación de pesticidas en extractos de duraznos por Cromatografía de Gases µECD

Para identificar residuos de pesticidas presentes en extractos de durazno se siguió la metodología propuesta por (Chaparro, Quijano, Rodríguez, & Lizarazo, 2015) utilizando para la extracción diclorometano y acetona. Se utilizó un equipo de cromatografía de gases marca Agilent Technologies 6890A Plus Series II Hewlet-Packard Plus con detector µECD (microcaptura electrones). La columna es Restek Rtx-5 30m de longitud, 0.32mm de diámetro, 0.25µm de diámetro interno (Crossbond 5% diphenyl 95% dimethylpolysiloxane). Para la identificación de los pesticidas, se utilizó patrones puros, que se inyectaron individualmente. La identificación cualitativa de los pesticidas presentes en el extracto se realizó de acuerdo a las siguientes

condiciones: detector μ ECD a 320°C Mezcla (mL/min): Aire 400 – H₂ 30 – N₂ 45. Se inyectó 1 μ l, modo splitless a 320°C. Temperatura inicial 45°C por 0.8 min y se incrementó de la siguiente manera: 45°C/min hasta 200°C, 2,50°C/min hasta 225°C, 3°C/min hasta 266°C, 5°C/min hasta 300°C, 10°C/min hasta 320°C durante 4,50min. Tiempo de análisis por muestra 41.21 min. Gas de arrastre Helio, flujo 20 mL/min. Temperatura del inyector 250 °C.

3.8 Procesamiento y análisis de datos

En concordancia con la normatividad, en el protocolo del experimento se dejó constancia y evidencia de las condiciones, controles y mediciones del mismo. Para analizar la información se presentarán a través de tablas los estadísticos descriptivos, ya que se trata de variables numéricas. Por otra parte, como uno de los objetivos de la investigación refiere evaluar el daño genotóxico en los valores promedio porcentuales de la viabilidad celular luego de someter a las células a los diferentes concentraciones de extractos de durazno, se aplicará un ANOVA de dos factores, donde las variables dependientes son la longitud del cometa, diámetro de la cabeza, % de ADN en la cabeza, longitud de cola, % de ADN en cola. Un factor es el extracto de durazno, con tres concentraciones (100 ug; 200ug; 300ug y DMSO1). El segundo factor el lugar de cultivo (Pamplonita, Cacota y Chitagá. Para el procesamiento de los datos se utilizarán softwares estadísticos tales como: SPSS, STATISTIX. El nivel de significancia fijado es del 5% y nivel de confianza de 95%. Se verificarán previamente los supuestos para la validación de las pruebas que se requieran.

Capitulo IV

4. Presentación e interpretación de resultados

Para una mejor comprensión de los resultados obtenidos en la investigación y en concordancia con los objetivos de la misma, se presenta en primer lugar la tabla 7 y figura 10 sobre las pruebas de citotoxicidad mediante exclusión con el colorante azul de tripáno, % de viabilidad antes y después del tratamiento en cada uno de los municipios investigados. En las tablas 8, 9,10, se presentan los valores promedio de daño inducido en el ADN de linfocitos humanos por diferentes concentraciones de extracto de durazno cultivado en cada uno de los municipios referenciados en la investigación. En la figura 11 Los valores de la longitud del cometa obtenidos en cada municipio. En la tabla 11 la matriz de correlaciones y finalmente los resultados de la prueba estadística ANOVA en la tabla 12.

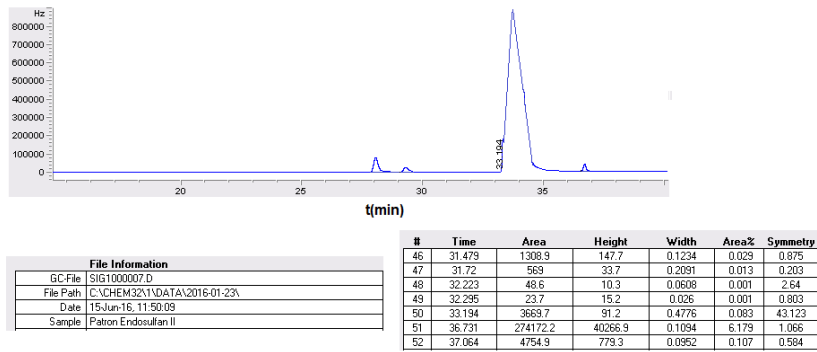
4.1 Resultados

4.2 Identificación de pesticidas en extractos de duraznos por Cromatografía de Gases

μ ECD

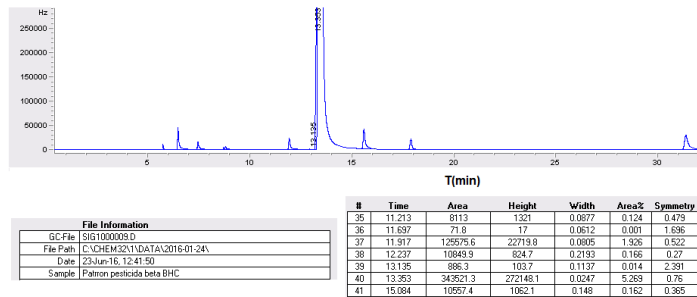
Se pueden observar los cromatogramas patrón de los pesticidas (Endosulfán, Delta BHC y Endrín Aldehído) en la figuras 4, 5, 6. Para el patrón Endosulfan (figura 4) se detecta a los 33.194 minutos, el patrón Delta BHC (figura 5) se detecta a los 13.135 minutos y para el patrón correspondiente al pesticida Eldrin Aldehído (figura 6) se detecta 56.3 minutos. Estos cromatogramas patrón nos sirven como referencia cualitativa para la comparación de cada uno de los cromatogramas que se obtuvieron para cada una de las muestras de durazno analizadas en el ensayo de laboratorio, facilitando la identificación de los pesticidas presentes en este fruto.

Figura 4. Cromatograma patrón Pesticida Endosulfán II.



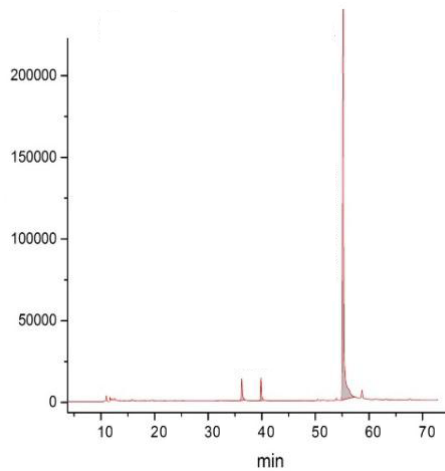
Fuente: Yáñez, F., 2017.

Figura 5. Cromatograma Patrón pesticida Beta BHC.



Fuente: Yáñez, F., 2017.

Figura 6. Cromatograma Patrón pesticida Eldrin Aldehído.



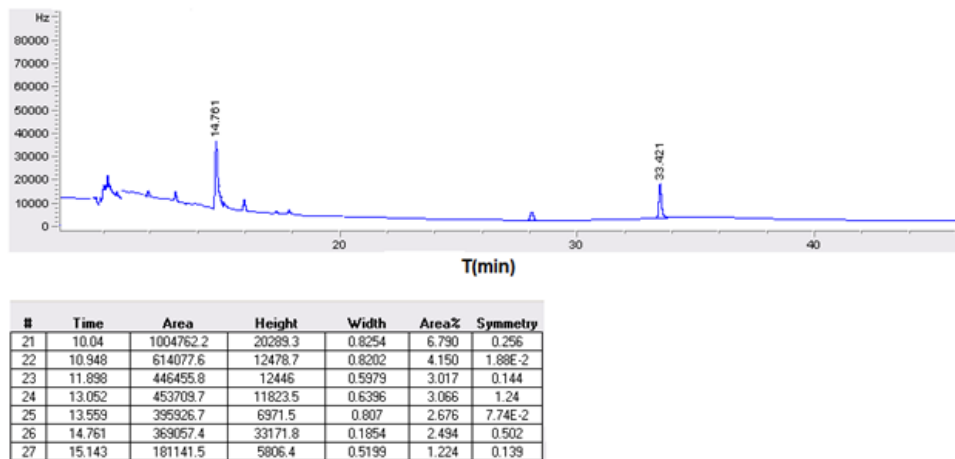
Fuente: Yáñez, F., 2017.

La figura 7 corresponde al cromatograma del extracto de durazno proveniente del Municipio de Pamplonita. Se observan dos picos representativos, el primero a los 14.761 min y el segundo a los 33.421 minutos los cuales coinciden con el patrón Delta BHC figura 8 y con el patrón de Endosulfan figura 4.

En la figura 8 se puede observar el cromatograma del extracto de durazno proveniente del Municipio de Cacota; se evidencian dos picos, el primero a los 14.761 min y el segundo a los 56.3 minutos los cuales coinciden con el patrón Delta BHC figura 5 el patrón Endrin Aldehído Figura 6.

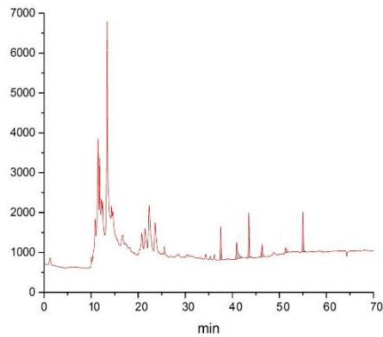
En la figura 9 se puede observar el cromatograma del extracto de durazno que correspondiente al Municipio de Chitagá se evidencian dos picos representativos, el primero a los 14.761 min y el segundo a los 33.423 minutos los cuales coinciden con el patrón Delta BHC figura 5 y con el patrón correspondiente a Endosulfán Figura 4.

Figura 7. Cromatograma correspondiente al extracto de durazno Municipio de Pamplonita.



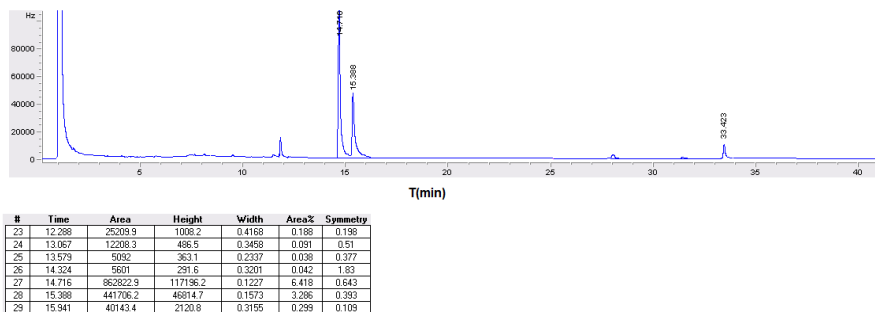
Fuente: Yáñez, F., 2017.

Figura 8. Cromatograma correspondiente al extracto de durazno Municipio de Cacota.



Fuente: Yáñez, F., 2017.

Figura 9. Cromatograma correspondiente al extracto de durazno Municipio de Chitagá.



Fuente: Yáñez, F., 2017.

4.3 Prueba de citotoxicidad mediante la exclusión con el colorante azul de tripánó.

Este colorante es uno de varios empleados para evaluar la viabilidad de células por exclusión de captación, ya que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras. El azul tripánó no es necesario para realizar conteos simples de células pero sí es imprescindible para diferenciar entre las células muertas (con disrupción membranal) de las vivas con membranas íntegras (Cell Culture Manual, 2008-2009). Esta prueba se basa en que las células vivas poseen membranas celulares intactas, logran excluir el azul de tripano mientras que las células muertas no lo hacen. Cuando los linfocitos se exponen al efecto de las dosis de extractos de durazno, esta técnica nos permite observar y cuantificar el daño inducido sobre la membrana celular.

Tabla 7. Porcentaje de Viabilidad de leucocitos humanos, antes y después del tratamiento

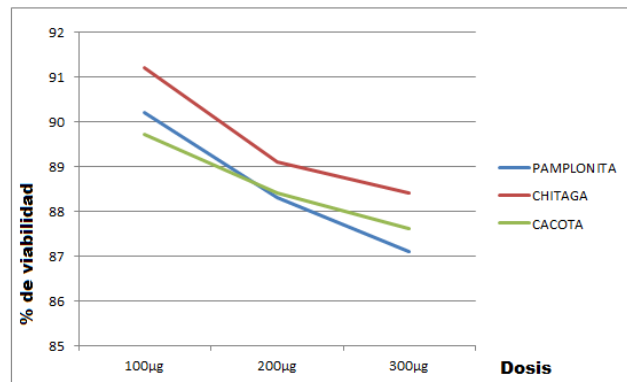
Lugares y niveles de tratamiento	% viabilidad Antes del tratamiento	% viabilidad después del tratamiento
Pamplonita		
100µg	94.1	90.2 %
200µg	93.7	88.3 %
300µg	93.1	87.1 %
DMSO 1%	96.4 %	94.8 %
Chitagá		
100µg	94.7	91.2 %
200µg	92.8	89.1 %
300µg	92.1	88.4 %
DMSO 1%	95.7%	94.2 %
Cacota		
100µg	94.6	89.7 %
200µg	94.2	88.4 %
300µg	93.8	87.6 %
DMSO 1%	95.3 %	93.1%

Fuente: Yáñez, F., 2017.

Como se dijo anteriormente las dosis subtoxicas se determinaron mediante la técnica exclusión con azul de tripáno, la cual sirve para establecer el porcentaje de células vivas y así determinar que el daño en el ADN en las células es debido al tratamiento realizado y no a factores que conducen a la apoptosis celular. Se observa (tabla 7) el porcentaje de viabilidad de los linfocitos expuestos a las diferentes dosis de los extractos de durazno obtenidos en los diferentes lugares de estudio (Pamplonita, Cacota y Chitagá), así mismo, el respectivo control negativo. Los valores representan la media del porcentaje de la viabilidad celular luego de someter a las células a los diferentes extractos; se puede observar (figura 10) que la viabilidad de los linfocitos disminuye gradualmente a medida que aumentan las dosis de los extractos, obteniendo una viabilidad menor en las concentraciones de 300µg, con porcentajes de 87.1 % para el municipio de Pamplonita, 88.4 % para el municipio de Cacota y 87.6 %, para el municipio de Chitagá Cabe resaltar que la

viabilidad se mantiene por encima del 80 %, con un porcentaje de 87.1 mínima obtenida en la realización del ensayo del municipio de Pamplonita (figura 10).

Figura 10. Porcentaje de viabilidad en linfocitos humanos inducida por extractos de durazno después del tratamiento.



Fuente: Yáñez, F., 2017.

4.4 Detección de daño del ADN por el Ensayo Cometa

En las tablas 8,9 y 10 se muestra la detección de Daño del ADN mediante el ensayo cometa evidenciando la genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a extractos de durazno, detectado por el ensayo cometa. Los resultados indican que existe un efecto genotóxico (longitud del cometa), dependiente de la concentración utilizada, con un $P < 0.05$ según la prueba Tukey. Se observa que a medida que se aumenta la dosis los valores analizados aumentan comparados con el control negativo.

Tabla 8. Promedio de daño inducido en el ADN de linfocitos humanos por diferentes dosis de extracto de durazno cultivado en el municipio de Pamplonita N/S.

	Longitud cometa (μm)	Diámetro cabeza (μm)	%DNA cabeza	Longitud cola (μm)	%DNA cola	Momento de cola	Momento Olive
DMSO 1 %	47.3	42.8	98.3	5.1	2.4	0.1	0.3
H2O2 100 μM	87.7	38.7	95.9	48.3	4.4	1.9	1.2
100 μg	60.2	36.9	95.6	21.2	2.8	0.5	0.4
200 μg	80.1	33.8	92.8	44.1	4.3	1.5	1.0
300 μg	140.2	31.3	87.6	106.1	6.8	5.5	3.1

Fuente: Yáñez, F., 2017.

Como control negativo se utilizó DMSO 1%. Como control positivo se utilizó peróxido de hidrogeno H₂O₂ 100 μM control, Diferentes dosis de extracto de durazno 100 μg , 200 μg , 300 μg .

Tabla 9. Promedio de daño inducido en el ADN de linfocitos humanos por diferentes dosis de extracto de durazno cultivado en el municipio de Cacota N/S.

	Longitud cometa (μm)	Diámetro cabeza (μm)	%DNA cabeza	Longitud cola (μm)	%DNA cola	Momento de cola	Momento Olive
DMSO 1 %	47.3	42.8	98.3	5.1	2.4	0.1	0.3
H2O2 100 μM	87.7	38.7	95.9	48.3	4.4	1.9	1.2
100 μg	50.3	40.6	97.6	16.7	1.9	0.3	0.3
200 μg	73.9	36.4	94.8	40.0	3.5	1.5	0.8
300 μg	116.7	34.5	91.8	71.5	5.8	3.8	2.1

Fuente: Yáñez, F., 2017.

Como control negativo se utilizó DMSO 1%. Como control positivo se utilizó peróxido de hidrogeno H_2O_2 100 μM control, Diferentes dosis de extracto de durazno 100 μg , 200 μg , 300 μg -

Tabla 10. Promedio de daño inducido en el ADN de linfocitos humanos por diferentes dosis de extracto de durazno cultivado en el municipio de Chitagá N/S.

	Longitud cometa (μm)	Diámetro cabeza (μm)	%DNA cabeza	Longitud cola (μm)	%DNA cola	Momento de cola	Momento Olive
DMSO 1 %	47.3	42.8	98.3	5.1	2.4	0.1	0.3
H_2O_2 100 μM	87.7	38.7	95.9	48.3	4.4	1.9	1.2
100 μg	56.6	38.1	96.9	18.6	1.9	0.3	0.3
200 μg	77.7	35.2	94.0	42.4	4.2	1.5	0.9
300 μg	121.2	32.9	90.8	81.5	6.4	3.9	2.3

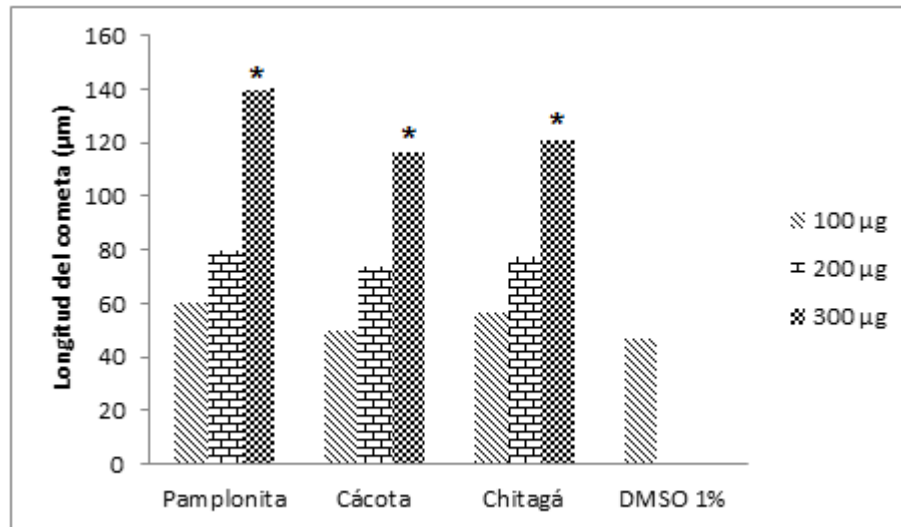
Fuente: Yáñez, F., 2017.

Como control negativo se utilizó DMSO 1%. Como control positivo se utilizó peróxido de hidrogeno H_2O_2 100 μM control, Diferentes concentraciones de extracto de durazno 100 μg , 200 μg , 300 μg -

Las células tratadas con DMSO 1%, muestran un daño espontáneo, de 47.3 μm de longitud (tablas 8, 9 y 10); de igual manera, las células tratadas con H_2O_2 100 μM llegan a un valor de 87.7 μm , casi superando el doble en longitud del cometa al control negativo (tablas 8, 9 y 10). Como se puede evidenciar en el Municipio de Pamplonita (tabla 8), la dosis de 100 μg muestra un valor de 60.2 μm , en el Municipio de Cacota (tabla 9) un valor de 50.3 y en el Municipio de Chitagá (tabla 10) un valor de 56.6 que al ser comparados con el control negativo no muestra una *: Diferencia estadísticamente significativa $P > 0.05$ (Figura 11, tabla 12. Si observamos la concentración de 200 μg en los diferentes Municipios supera aproximadamente (tablas 8, 9 y 10) una vez la respuesta del control negativo, nos damos cuenta que se genera incremento moderado del daño genético de las células expuestas al extracto. De igual manera la concentración de 300 μg supera 2.5 veces

(tablas 8, 9 y 10) la respuesta del control negativo, indicando que a esta concentración genera un daño *: estadísticamente significativo $P > 0.05$ (Figura 5, tabla 12).

Figura 11. Comparación Longitud del cometa, presentado en los diferentes municipios



Fuente: Yáñez, F., 2017.

4.5 Genotóxicidad inducida por extractos de durazno. *: Diferencia significativa respecto al control negativo, $P < 0.05$.

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el promedio de la longitud de cola para Pamplonita, Cacota y Chitagá, el comportamiento es similar es los tres lugares; lo que nos indica que la inducción de daño en el DNA de los linfocitos expuestos es similar, suponemos que esto quizás es debido a que los agricultores, por estar en regiones tan cercanas, utilizan las mismas técnicas de aspersión, los mismos pesticidas, concentraciones similares y en las mismas épocas del año (tabla 12).

Se evidencia en las tablas 8, 9 y 10 que a medida que se incrementa la concentración de extracto en cada dosis disminuye el diámetro de la cabeza (μm) progresivamente en comparación con el control negativo (DMSO 1%, 42.8 μm). En el Municipio de Pamplonita, en la dosis de 100 μg disminuye su diámetro en un 13.78%, en la dosis de 200 μg en un 21.02% y en la dosis de 300

μg en un 26.86%. En el Municipio de Cacota, en la dosis de 100 μg disminuye su diámetro en un 5.14%, en la dosis de 200 μg en un 14.95% y en la dosis de 300 μg en un 19.39%. En el Municipio de Chitagá en la dosis de 100 μg disminuye su diámetro en un 10.98 %, en la dosis de 200 μg en un 17.75% y en la dosis de 300 μg en un 23.13%.

4.6 Matriz de correlaciones

A continuación se presenta la tabla donde se puede observar la correlación de la longitud del cometa con cada una de las demás variables.

Tabla 11. Matriz de correlaciones de la longitud del cometa con cada una de las demás variables.

Variable	Longitud del cometa	Diámetro de la cabeza	% de adn en cabeza	Longitud de cola	% de adn en cola
Longitud del cometa	1,0000	-	-	-	-
Diámetro de la cabeza	-0,8353	1,0000	-	-	-
% de ADN en cabeza	-0,9241	0,9443	1,0000	-	-
Longitud de cola	0,9930	-0,8664	-0,9398	1,0000	-
% de ADN en cola	0,9771	-0,8198	-0,9252	0,9797	1,0000

Fuente: Yáñez, F., 2017.

Se evidencia una correlación existente entre la longitud del cometa y Diámetro de la cabeza de (- 0.8353) (Tabla 11), Presentan un comportamiento que es inversamente proporcional; lo que significa que a medida que aumenta la longitud del cometa por el daño ocasionado a la célula por la exposición a las diferentes dosis de extracto de durazno el diámetro de la cabeza de estas células disminuye significativamente.

Así mismo observamos (tabla 11) una correlación existente entre el porcentaje de ADN en cabeza y la longitud del cometa de (-0,9241), Presentan un comportamiento Inversamente proporcional. A medida que disminuye el porcentaje de ADN en cabeza, aumenta la longitud del cometa, evidenciando un claro daño de las células tratadas con las diferentes dosis de extractos de durazno.

Se muestra una correlación (tabla 11) entre la longitud del cometa y dos medidas en este caso, la longitud de cola (0,9930) y el porcentaje de ADN en cola (0,9771), la cual es directamente proporcional ya que a medida que aumenta la longitud del cometa, aumenta tanto la longitud de la cola como el porcentaje de ADN en cola.

Así mismo se observan que los rangos de porcentaje de ADN en cabeza tiene la misma tendencia a disminuir a medida que se aumenta la concentración de cada extracto de durazno, en el control negativo (DMSO 1%) (Tablas 8, 9 y 10) En la tabla 8 se evidencia un porcentaje de 98.3 de ADN en cabeza referente al Municipio de Pamplonita donde la dosis de 100 µg arroja un valor de 95.6%, en la concentración de 200 µg 92.8%, y en la concentración de 300 µg 87.6%. En el Municipio de Cacota(Tabla 9) la concentración de 100 µg 97.6%, en la concentración de 200 µg 94.8%, y en la concentración de 300 µg 91.8% y en el Municipio de Chitagá (Tabla 10) con los siguientes valores la concentración de 100 µg 96.9%, en la concentración de 200 µg 94 %, y en la concentración de 300 µg 90.8% estos datos varían inversamente proporcional a la concentración; si las concentraciones aumentan, disminuye tanto el diámetro de la cabeza como su porcentaje de ADN.

La longitud de cola (µm), se observa para el control negativo valores en longitud de cola de 5.1 µm. (Tablas 8, 9 y 10) Las dosis evaluadas nos muestran que para el Municipio de Pamplonita (Tabla 8) en la concentración de 100ug se da un aumento en 4.1 veces; la concentración de 200 µg nos muestra un aumento de 8.6 veces; de igual manera, la concentración de 300 µg nos muestra un aumento de 21 veces en la longitud de cola. Para el municipio de Cacota (Tabla 9) los valores observados para la concentración de 100ug un aumento en 3.2 veces. La concentración de 200 µg nos muestra un aumento de 7.8 veces; de igual manera, la concentración de 300 µg nos muestra un aumento de 14 veces en la longitud de cola. Para el Municipio de Chitagá (Tabla 10) los valores

observados para la concentración de 100ug un aumento en 3.6 veces; la concentración de 200 µg nos muestra un aumento de 8.3 veces; e igual manera, la concentración de 300 µg nos muestra un aumento de 16 veces en la longitud de cola. Se obtienen aumentos significativos en los tres municipios en comparación con el control negativo, aumentando hasta 20 veces la longitud de cola lo que indica un daño gradual de los linfocitos a medida que se aumenta la concentración de extractos de durazno.

4.7 Resultados de ANOVA

Como se dijo en el ítem 3.8 para evaluar el daño genotóxico en los valores promedio después de someter las células a diferentes concentraciones de extractos de durazno, (100, 200 y 300 µg) cultivados en tres municipios, se aplica la técnica estadística ANOVA, cuyo modelo para este tipo de diseño es:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} : Representa la respuesta o medición de cada una de las variables dependientes bajo el i -ésimo nivel de extracto del durazno tratamiento y el j -ésimo municipio.

μ : Representa el promedio global del experimento.

τ_j : Es el efecto del n -ésimo nivel del extracto del durazno en el j -ésimo municipio.

ε_{ij} : Es el error experimental

En general el contraste de hipótesis a probar es el siguiente:

$$H_0: \mu_{(100\text{ug})} \dots = \dots \mu_{300\text{ug}}$$

$$H_1: \mu_{(100\text{ug})} \dots \neq \dots \mu_{300\text{ug}}$$

Tabla 12. Daños en linfocitos humanos Inducidos por extractos de durazno cultivados en tres municipios de Norte de Santander

Daños en linfocitos humanos inducidos por extractos de durazno				
Nivel de significancia: 5%				
Técnica estadística anova: comparación de los municipios, pamplonita, cacota y chitagá según tratamiento				
Longitud del cometa				
Factores	Concentraciones	Promedios	P-valor	Interpretacion
Concentración extracto de durazno.	300µg	126.05	0.0000	Hay diferencias significativas tratamientos
	H ₂ O ₂ 100µg	87.67		
	200 µg	77.20		
	100 µg	55.70		
Lugar	Dms0 1%	47.34	0.1123	Estadísticamente, no se observan diferencias significativas entre los lugares trabajados
	Pamplonita	83.101		
	Chitagá	78.085		
	Cácota	75.186		
Diametro de cabeza				
Tratamiento Solucion	300µg	32.886	0.0000	Hay diferencias significativas
	H ₂ O ₂ 100µg	38.671		
	200 µg	35.149		
	100 µg	38.516		
Lugar	Dms0 1%	42.765	0.0317	Hay diferencias significativas
	Pamplonita	36.698		
	Chitagá	37.52		
	Cácota	38.571		
% de adn en cabeza				
Tratamiento Solucion	300µg	90.068	0.0000	Hay diferencias significativas
	H ₂ O ₂ 100µg	95.928		
	200 µg	93.882		
	100 µg	96.688		

	Dms0 1%	98.253		
Lugar	Pamplonita	94.039	0.0554	Estadísticamente, no se observan diferencias significativas
	Chitagá	95.169		
	Cácota	95.683		
Longitud de cola				
Tratamiento	300µg	86.346	0.0000	Hay diferencias significativas
Solucion	H ₂ O ₂ 100µg	48.287		
	200 µg	42.186		
	100 µg	18.850		
	Dms0 1%	5.086		
Lugar	Pamplonita	44.956	0.2443	Estadísticamente, no se observan diferencias significativas
	Chitagá	39.173		
	Cácota	36.324		
% de adn en cola				
Tratamiento	300µg	4.4093	0.0000	Hay diferencias significativas
Solucion	H ₂ O ₂ 100µg	1.9450		
	200 µg	1.8140		
	100 µg	0.4130		
	Dms0 1%	0.0990		
Lugar	Pamplonita	1.91	0.5786	Estadísticamente, no se observan diferencias significativas
	Chitagá	1.7356		
	Cácota	1.55		

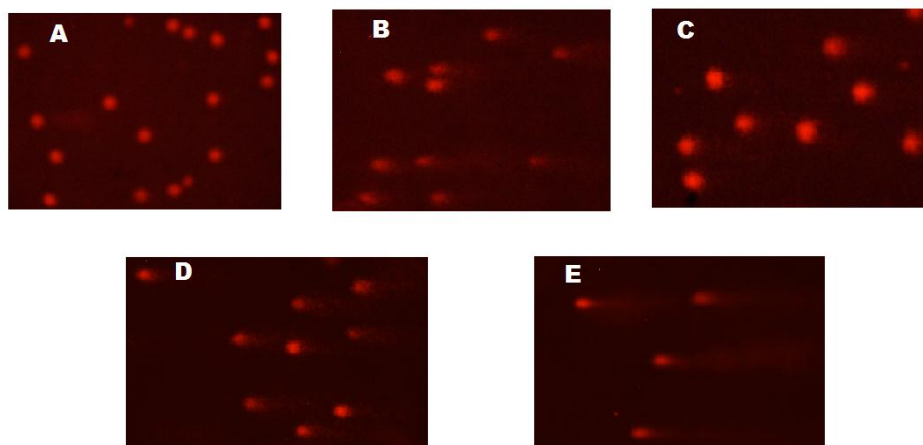
Fuente: Yáñez, F., 2017.

Se puede observar en las tablas 8, 9 y 10 que cuando se analiza el parámetro longitud del cometa existen diferencias estadísticamente significativas a medida que se aumenta la concentración del extracto de durazno- También se puede evidenciar en la tabla 12, que no se encuentra una diferencia estadísticamente significativa de la longitud del cometa cuando se comparan los tres municipios (Pamplonita, cacota y Chitagá).

Cuando se analiza la medida del diámetro de la cabeza de los linfocitos (tabla 12) encontramos diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones utilizadas (100 μg , 200 μg y 300 μg) la cual disminuye a medida que se aumenta la concentración. *Podemos darnos cuenta que cuando se comparan los lugares* (pamplonita, cacota y Chitagá); también se puede observar que el extracto obtenido del municipio de pamplonita induce mayor daño a las células, evidenciado en la disminución del diámetro de la cabeza el promedio arrojado es de 36.698 μm comparado con el municipio de Chitagá con un promedio de 37.52 μm y cacota con un promedio de 38.57 μm .

De acuerdo a la tabla 12 nos podemos dar cuenta que cuando utilizamos los parámetros % de ADN en cabeza, longitud de cola y % de ADN en cola, obtenemos resultados estadísticamente significativos, cuando comparamos las dosis ensayadas, pero cuando se compara la genotoxicidad de los diferentes lugares (pamplonita, cacota y Chitagá); no se encuentran resultados significativos.

Figura 12. Imágenes del daño inducido en linfocitos humanos por muestras de extracto de durazno, cultivados en tres municipios, Norte de Santander.



Fuente: Yáñez, F., 2017.

A: DMSO 1%, **B:** H_2O_2 100 μM , **C:** 100 μg , **D:** 200 μg y **E:** 300 μg . Las imágenes fueron obtenidas usando un microscopio de fluorescencia Olympus Cx41 equipado con filtro de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm, objetivo 10 x)

De acuerdo a lo observado en las tablas 8, 9 y 10 y 12 y en la Figura 12, podemos deducir que cualquiera de los parámetros usados para determinar daño en los linfocitos humanos, son optimos y nos ofrecen una medición confiable del daño (longitud cometa, diámetro cabeza, %DNA cabeza, longitud cola, %DNA cola, momento de cola, momento Olive) mediante el uso del software (Tritek Comet Score™ freeware v1.5).

5. Discusión

En los resultados obtenidos en cada una de las dosis de extracto de durazno y comparados con el control negativo, se notó una tendencia creciente de daño genotóxico según el aumento de la concentración de las mismas, llevando a un incremento de las lesiones primarias sobre el ADN, lo cual, está directamente relacionado con el aumento en las alteraciones genéticas celulares. Resultados similares han sido reportado por (Idris, Ambali, & Ayo, 2012), quienes encontraron que los pesticidas inducen daño oxidativo en el ADN a través de especies reactivas de oxígeno. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) están implicadas en la toxicidad de diversos plaguicidas incluidos los plaguicidas organofosforados. Se sabe que ROS induce varios tipos de lesiones en el ADN incluidas rupturas simples y dobles, sitios lábiles alcalinos y oxidación de purinas y pirimidinas que son detectados fácilmente por el ensayo de cometa (Collins, Dobson, Dusinska, Kennedy, & Stetina, 1997). En estudios realizados por (Meléndez, Martínez, & Quijano, 2012), observaron que las dosis en la que se induce mayor frecuencia de células con daño en el ADN, también muestran mayor longitud de migración del ADN.

Esto podría indicar que los genotóxicos que producen más daño en el ADN, también afectan más número de células. Otros estudios demuestran que el efecto que produce alteraciones en el material genético es probablemente causado, además, por la presencia de metales, incluyendo el hierro, manganeso, cobre, zinc y arsénico, debido a su alta actividad mutagénica y genotóxica (Vargas, Migliavacca, Melo, & Horn, 2001). Se ha demostrado que los iones metálicos presentes en algunos pesticidas pueden interferir con la reparación del ADN y producir especies reactivas de oxígeno (ROS), que conducen a daño oxidativo (Bull, Fletcher, Boobis, & Battershill, 2006). Hay evidencia que demuestra que el exceso de metales como el cobre puede inducir estreses oxidativo que puede dar lugar a ataques de radicales libres, vía reacciones Fenton (Bertoncini & Meneghini, 1995).

Aunque el cobre es un metal bioesencial para el funcionamiento normal de las células, también puede catalizar la formación de radicales libres de hidroxilo en las reacciones de Haber-Weiss catalizada por metales Fenton, lo que resulta en daño oxidativo del ADN (Shrivastava, Upreti, Seth, & Chaturvedi). Existen evidencias que han sugerido que el arsénico es causante de

enfermedades como cáncer de vejiga, pulmón, hígado y piel, así como trastornos del sistema cardiovascular y nervioso (Nesnow, Roop, & Lambert, 2002) Estudios de (Basu, Ghosh, Das, Banerjee, & Ray K, 2004), describen el arsénico como causante de intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y aneuploidías. Además, se ha encontrado que causa la inhibición del crecimiento celular, bloqueo del ciclo celular en la mitosis induciendo apoptosis (Ling, Jiang, Holland, & Perez, 2002)

De acuerdo a los reportes en literatura y a los encontrados en este estudio, podríamos relacionar la genotoxicidad encontrada en este ensayo con la presencia de residuos de pesticidas en el fruto del durazno, dado que cuando se realizó la identificación a través de cromatografía de Gases μ ECD, en el cromatograma obtenido del municipio de Pamplonita se evidenció la presencia del pesticida de la familia de los organoclorados como el Endosulfán II detectado a los 33.421 min (figura 10), el cual coincide con el cromatograma del patrón puro observado a los 33.194 minutos (figura 8). También se observó a los 14.761 min (figura 10) un pico, que corresponde al compuesto puro Beta BHC, que se ha detectado a los 13.135 min (figura 8). Es de resaltar, que aunque estos compuestos no se reportan por parte de los agricultores, se evidencia su uso.

Los plaguicidas Organoclorados (OCP) se caracterizan por ser altamente liposolubles y tóxicos. Su gran estabilidad fisicoquímica los hace muy persistentes y bioacumulables, son altamente efectivos contra las plagas, por lo que aumentan la producción y el rendimiento agrícola, pero su elevada toxicidad y uso desmesurado afecta tanto a los ecosistemas como a los agricultores y consumidores de alimentos con estos residuo, por lo que han sido regulados y ampliamente estudiados (Gutiérrez, y otros, 2014) Estudios científicos por (Antherieu, y otros, 2007) caracterizan a Endosulfán como un agente carcinógeno potencial en humanos así como genotóxico en bacterias, células humanas y en células de ratones, además de ser promotor de tumores y agente mutagénico (Chaudhuri, Selvaraj, & Pal, 1999.) El Endosulfán (EDS) es uno de los compuestos organoclorados (OC) que ha sido clasificado como altamente tóxico por la mayoría de las agencias de protección ambiental.

El Endosulfán (EDS) es persistente en el Ambiente y puede bioacumularse en los organismos a lo largo de la Cadena trófica (Sutherland, Home, Weir, Russell, & Oakeshott, 2004.) Sin

embargo, EDS se ha utilizado como pesticida desde 1995 en muchas partes del mundo en una gran variedad de campos de cultivo (Jia, y otros, 2009.) Aunque paradójicamente actualmente su uso ha sido restringido (UNEP-POPS-COP, 2011). Residuos de este compuesto se han detectado en la fruta, Hortalizas, carne y leche (Nag & Raikwar, 2008.) Se considera tóxico para todo tipo de organismos Y sus residuos se han detectado en varios lugares geográficos regiones que van desde ambientes templados hasta el Ártico (Weber, y otros, 2010) Así mismo el Endosulfán es clasificado Como uno de los pocos Organoclorados aún registrados para su uso, el Endosulfán ha suscitado preocupación mundial por muchas razones. El Endosulfán actúa como insecticida de contacto para cultivos alimentarios y no alimentarios, también es tóxico para los peces y otros organismos acuáticos (M.C.F; Toledo, 1992) .Así mismo considerado un contaminante orgánico persistente (IPEN, 2008).

El lindano (como γ -hexaclorociclohexano BHC), hexaclorociclohexano (grado técnico) y otros isómeros de hexaclorociclohexano son razonablemente sustancias cancerígenas para el ser humano basadas en pruebas suficientes carcinogenicidad de estudios en animales (IARC, 1987.) Exposición oral en roedores causaron tumores en dos sitios de tejido diferentes. Administración dietética de lindano, α - o β -hexaclorociclohexano, o mezclas de varios isómeros causó tumores hepáticos y en el sistema linfático en ambos sexos de varias Cepas de ratones (Schulte-Hermann & Parzefall, 1981.) Estudios realizados en ratones por (Chadwick, Copeland, Froelich, & Cooke) Demuestran que La endrina y el lindano inducen efectos feto tóxicos Estos efectos Incluyen retardo del crecimiento fetal y disminuciones en el timo fetal Y pesos placentarios.

En el cromatograma obtenido del municipio de Cacota se evidenció la presencia del pesticida de la familia de los Organoclorados como el Delta BHC detectado a los min 14.761 (figura 11), el cual coincide con el cromatograma del patrón puro observado a los 13.135 min (figura 8). También se observó a los 56.3 minutos min (figura 11) un pico, que corresponde al compuesto puro del patrón Endrin Aldehído (Figura 9), que se detectado a los 56.2 min (figura 9).

A pesar de la prohibición del uso del Endosulfán en muchos países como Alemania, Reino Unido, Suecia, Países Bajos, Colombia y Singapur, todavía es ampliamente utilizado en la mayoría de los países en vía de desarrollo debido a su eficacia y bajo costo de aplicación (Ondarza,

Gonzalez, Fillmann, & Miglioranza, 2014). En países como la India, el Endosulfán está clasificado como un pesticida extremadamente peligroso; Afectando el sistema nervioso central, el sistema reproductivo y el sistema inmune (Ganeshwade, Dama, Deshmukh, Ghanbahadur, & Sonawane, 2012). Según (EPA, 2002) el Endosulfán tiene efectos nocivos sobre la salud de los organismos acuáticos en concentraciones superiores a 0,22 lg L⁻¹ (aguda) y 0,056 lg L⁻¹ (crónica) (Mersie, Seybold, McNamee, & Lawson, 2010). Así mismo existen estudios en ciprina de agua dulce (*Carassius carassius* L.) donde se demuestra que el Endosulfán induce Genotóxicidad y mutagenicidad y se manifiesta por vías de estrés Oxidativo.

Estudios realizados por (Wei, y otros, 2017.), demuestran que el Endosulfán indujo daños en el ADN y activó la vía de señalización de respuesta al daño del ADN (ATM / Chk2 y ATR / Chk1) y por consiguiente al control del ciclo celular. Además, el Endosulfán promovió la apoptosis celular a través de la vía del receptor de muerte (complejo de señalización inductor) resultante del estrés oxidativo.

Hay evidencia que demuestra un nivel elevado daño en el ADN en pacientes con insuficiencia cardíaca CVD (crecimiento ventricular derecho) (Mondal, y otros, 2013.). Las CVD representan la principal causa de mortalidad en seres humanos. La disfunción endotelial se ha reconocido en la CVD como un refuerzo primario patogénico de diversos eventos cardiovasculares que acelera la lesión vascular resultante del daño de la pared vascular y la formación de placa aterosclerótica (Cimellaro, Perticone, Fiorentino, .Sciacqua, & Hribal, 2016.)Se ha sabido que el estrés oxidativo puede conducir al daño del ADN que desempeña un papel vital en la progresión de la CVD). La inestabilidad genómica debido a la lesión del ADN se produce cuando las células incurran daños persistentes al ADN como respuesta al estrés genotóxico (Marin-Garcia, 2016.)

Un estudio reciente demostró que el Endosulfán induce daños en el ADN y perturbaciones en el DDR (una red de vías de transducción de señales que pueden detectar y reparar el daño del ADN para mantener la integridad genómica), promoviendo así la inestabilidad genómica en las enfermedades del sistema reproductivo (Wei, y otros, 2015) han demostrado que el Endosulfán puede conducir al daño del ADN y a la detención del ciclo celular en las células endoteliales. Sin embargo, si DDR está involucrado en el proceso de acción tóxica en las células endoteliales su du

funcionamiento es aún poco conocido. Por lo tanto, se han diseñado diferentes investigaciones para aclarar más el papel del Endosulfán en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares.

Así mismo se evidencia en el cromatograma obtenido del municipio de Chitagá la presencia del pesticida de la familia de los organoclorados como el endosulfan II detectado a los 33.423 min (figura 12), el cual coincide con el cromatograma del patrón puro observado a los 33.194 minutos (figura 7). También se observó a los 14.761 min (figura 12) un pico, que corresponde al compuesto puro Beta BHC, que se detectado a los 13.135 min (figura 8).

Podemos concluir que extractos de durazno cultivados en la Provincia de Pamplona y que están siendo comercializados en toda la región , inducen actividad genotóxica en linfocitos humanos, lo cual podría constituir un factor de riesgo para la población expuesta, teniendo en cuenta la relación que existe entre daño genotóxico y aparición de enfermedades tales como el cáncer.

Se deben plantear alternativas para disminuir el uso indiscriminado de plaguicidas organoclorados ya que son considerados como uno de los principales problemas ambientales y de salud humana en el mundo.

Conclusiones

Extractos de durazno cultivados en la provincia de Pamplona y que están siendo comercializado en la provincia de pamplona inducen actividad genotóxica en linfocitos humanos, lo cual podría constituir un factor de riesgo para la población expuesta, teniendo en cuenta la relación que existe entre daño genotóxico y aparición de enfermedades tales como el cáncer.

Podemos deducir que cualquiera de las parámetros usados para determinar daño en los linfocitos humanos (longitud cometa, diámetro cabeza, %DNA cabeza, longitud cola, %DNA cola, momento de cola, momento Olive), nos ofrecerán una medición confiable del daño causado por los extractos de durazno.

La inducción de daño en el DNA de los linfocitos expuestos es similar en los tres lugares de muestreo, quizás debido a que los agricultores, por estar en regiones tan cercanas, utilizan las mismas técnicas de aspersión, los mismos pesticidas, las mismas concentraciones y realizan las aspersiones en las mismas épocas del año.

En este estudio pudimos evidenciar que los agricultores de la zona utilizan básicamente pesticidas que ya han sido discontinuados en otros países, como el caso del Endosulfán, el cual fue hallado en trazas de extractos de durazno analizados.

Recomendaciones

Se deben plantear alternativas para disminuir el uso indiscriminado de plaguicidas Organoclorados ya que son considerados como uno de los principales problemas ambientales y de salud humana en el mundo.

Es muy importante Desarrollar con precisión perfiles de seguridad sobre plaguicidas para intentar reducir los efectos adversos que estos tienen sobre la salud humana y el medio ambiente. Además, debe haber un enfoque que determine con claridad que tipos de productos químicos o fórmula son las herramientas más apropiadas para la gestión ambiental y ecológica de plagas. Por lo tanto, los agentes naturales de control biológico, tales como bacterias beneficiosas, Virus, insectos y nematodos, deben ser utilizados con fines agrícolas. Se debe poner mucho más esfuerzo en la investigación, en el desarrollo de productos, pruebas de productos y registro, y la aplicación de estrategias de uso continuado de plaguicidas.

En el análisis de residuos de pesticidas realizados en frutas como el durazno, es primordial emplear técnicas y metodologías sistemáticas que permitan la extracción, separación, identificación y cuantificación, que ofrezcan al país una herramienta analítica de gran valor, confiable e idónea que faciliten estudios y monitoreos en la determinación de residuos de pesticidas en frutas, como el durazno.

Los resultados de este estudio son muy importantes para Colombia y la región pues las posibilidades de comercialización y exportación de los productos colombianos son muy altas si se asegura la no presencia de residuos de pesticidas en nuestras frutas. También es importante recalcar que este estudio es un aporte para la comunidad pues el hecho de consumir productos libres de pesticidas, garantiza productos apropiados para el consumo humano eliminando el riesgo para la salud humana.

Bibliografía

Aktar, M., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. (2, Ed.) Interdiscip. Toxicol., 1–12.

Alborghetti, G. N., Casanova, M., de Oliveira, G., Tavares, Fonseca, L. F., & Gatti Silva, S. P. (2015). Evaluación de la genotoxicidad inducida por la administración repetida de anestésicos locales: un estudio experimental en ratones. Rev Bras Anestesiología., 5, 21–26.

Al-Saleh I. (1994). Pesticides: a review article. J Environ Pathol Toxicol Oncol.; 13:151-161.

- Antherieu, S., Ledirac, N., Luzy, A., Lenormand, P., Caron, J., & Rahmani, R. (2007). Endosulfan decreases cell growth and apoptosis in human HaCaT keratinocytes: Partial ROS-dependent ERK1/2 mechanism. *J Cell Physiol.*; 213: 177-86.
- Avishai, N., Rabinowitz, C., Moiseeva, E., & Rinkevich, B. (2002). Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay. (Vol. 518:). *Mutat. Res.* Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12063064>
- Baldi, A. G. (2009). Fabrigoulec neurobehavioral effects of long-term exposure to pesticides: results from the 4-year follow-up of the PHYTONER study *Occup. Environ. Med.*, 68 (2) (2010), pp. 108–115, 10.1136/oem. Obtenido <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21097948>
- Bardenes, M., Lorente, M., Martínez, J., & Yacer, G. (1999). Variedades de melocotón y Nectarina Temprana. . Valencia. España : Universidad Politécnica de Valencia .
- Basu, A., Ghosh, P., Das, J., Banerjee, A., & Ray K, G. A. (2004). Micronuclei as biomarkers of carcinogen exposure in populations exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India: a comparative study in three cell types. *Cancer Epidemiology Biomarkers a. Pubmed*, 13(5). Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15159315>
- Bempah, C., & Donkor, A. (2011). Pesticide residues in fruits at the market level in Accra Metropolis, Ghana, a preliminary study. *Monit. Assessment*(175), 551–561. Obtenido de [http://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1726493](http://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1726493)
- Benny L, B. (2005). *Encyclopedia of Toxicology* . (E. Inc, Ed.) 2(2), 176–178.
- Bertoncini, C., & Meneghini, R. (1995). DNA strand breaks produced by oxidative stress in mammalian cells exhibit 3-phosphoglycolate termini *Nucleic Acids.*, 23, 2995–3002.

- Bianchi, J., Mantovani, M., & Marin, M. M. (2015). Analysis of the genotoxic potential of low concentrations of Malathion on the *Allium cepa* cells and rat hepatoma tissue culture J. Environ. Sci. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26456612>
- Bolognesi, C., Peluso, M., Degan, P., Rabboni, R., Munnia, A., & Abbondandolo, A. (1994). . Genotoxic effects of the carbamate insecticide, methyomyl. II. In vivo studies with pure compound and the technical formulation, "Lannate 25". Environmental and Molecular Mutagenesis. Obtenido de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/em.v2850240313/abstract>
- Brendler, S. S., Hartmann, A., Pfuhler, S., & Speit, G. (2005). The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing Mutagenesis. (Vols. 13-30). Obtenido de <https://academic.oup.com/mutage/article/20/4/245/1069223/The-in-vivo-comet-assay-use-and-status-in>
- Briggs SA, R. C. (1992). Basic guide to pesticides. Their characteristics and hazards. Washington: Taylor & Francis publishers. Obtenido de <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19932334845>
- Bull, S., Fletcher, K., Boobis, A., & Battershill, J. (2006). Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators. Mutagenesis, 2(21), 93-103.
- Cárdenas, J., & Fischer, G. (2013). Clasificación botánica y morfología de manzano, peral, duraznero y ciruelo. Situación actual, sistemas de cultivo y plan de desarrollo. Soc. Col. Cienc. Hort.
- Carranza, C., & Miranda, D. (2013). Zonificación actual de los sistemas de producción de frutales caducifolios en Colombia. Situación actual, sistemas de cultivo y plan de desarrollo. Soc. Col. Cienc. Hort. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000092&pid=S0123-4226201400020001100008&lng=en

CDC. (2013). National Biomonitoring Program. (C. f. Prevention, Ed.) Organochlorine Pesticides Overview CDC. Obtenido de https://www.cdc.gov/biomonitoring/DDT_Biomonitoring_Summary.html

Cell Culture Manual . (2008-2009). Sigma Life Science. 3, 230-231.

Chadwick, R., Copeland, M., Froelich, R., & Cooke, N. (s.f.). Chlorobenzene, lindane or chlorobenzene plus lindane. *J. Toxicol. Environ. Hlth.* 12:599-610;1983.

Chaparro, A. L., Quijano, A., Rodríguez, R., & Lizarazo, L. F. (2015). Desarrollo y validación de un método ambientalmente amigable para la determinación de carbofurano en suelos . Mosquera (Colombia): Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria. obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v18n1/v18n1a05.pdf>

Chaudhuri, K., Selvaraj, S., & Pal, A. (1999.). Studies on the genotoxicity of endosulfan in bacterial systems. (*M. Res, Ed.*) 63-7.

Cimellaro, A., Perticone, M., Fiorentino, T., Sciacqua, A., & Hribal, M. (2016.). Role of endoplasmic reticulum stress in endothelial dysfunction. . *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*

Collins, A. (2004). The comet assay for DNA damage and repair *Mol. Biotechnol.* (Vol. 12.).

Collins, A., Dobson, V., Dusinska, M., Kennedy, G., & Stetina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us. *Mutat.*, 375 : .183–193.

Collotta, M., Bertazzi, P., & Bollati, V. (2013). Epigenetics and pesticides. *Toxicology.*

Columbe, A., Cardenas, S., Gallego, M., & Valcarcel, M. (2001). Multiresidue Screening of Pesticides in Fruits Using an Automatic SolidPhase Extraction System. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1109-1116.

- Cortes, Gutierrez, E., Davila, Rodríguez, M., Fernandez, J., C. Lopez- Fernandez, & A. Gosalbez, J.G. (2011). New application of the comet assay: chromosome-comet assay, *J. Histochem. Cytochem.* 59. 655–660.
- Damalas, C. (2011). Eleftherohorinos G.E. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*, 8 (5), 1402–1419.
- Damalas, C. (2011). Eleftherohorinos G.E.. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int. J. Environ. Res. Public Health.*
- Debost-Legrand, A., Warembourg, C. M., Chevrier, C., & Bonvallot, N. M. (2016). Prenatal exposure to persistent organic pollutants and organophosphate pesticides, and markers of glucose metabolism at. *Environ. Res.* , 146, 207–217.
- Dikilitas, M., Kocyigi, A., & Yigit, F. A. (2009). Molecular-based fast method to determine the extent of DNA damages in higher plants and fungi . *Afr. J. Biotechnol.*, 8(14), 3118–3127.
- EPA . (2009). What is a pesticide? . Environmental Protection Agency, EEUU. Obtenido de <http://www.epa.gov/pesticides>
- EPA. (2002). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. United States . (EPA 821-R-02-012, Ed.) Environmental Protection Agency Report , 266.
- Fenecha, M., Knasmuellerb, S., Bolognesic, C., Bonassid, S., Hollande, N., Miglioref, L., Kirsch, V. (2016). Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutation Research/Reviews.*
- Ganeshwade, R., Dama, L., Deshmukh, D., Ghanbahadur, A., & Sonawane, S. (2012). Toxicity of endosulfan on freshwater fish *Channa striatus*. *Trends Fish. Res.* 1, , 29–31.

- García, F., A. S., Oyarzun, J., Hernández, A., & Vázquez, P. (2012). Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *J. Res. Environ. Sci. Toxicol.*, 279–293.
- Gedik, C., & S. Ewen, A. C. (1992). gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells, *Int. J. Radiat. Biol.* 62 . 313–320.
- Gunnell, D., Eddleston, M., Phillips, M., & Konradsen, F. (2007). The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC Public Health* , 7, 357–371.
- Gutiérrez, J; Parra, C.; Blanch, D.; Zuluaga, D; Zárate, M; Rojas, A; Nieto, M; Londoño, A
- Haibing, L., Yuling, L., & Cheng., J. (2010). Molecularly Imprinted Silica Nanospheres Embedded CdSe Quantum Dots for Highly Selective and Sensitive Optosensing of Pyrethroids. . Central China Normal University., 2451–2457.
- Hartung, T. (2009). Toxicology for the twenty-first century *Nature*.
- Hill, R. J., Head, S. B., Gregg, M., Shealy, D., & Bailey, D. (1995). et al. Pesticide residues in urine of adults living in the United States: reference range concentrations. *Environ Res* 1995. 71, 99-108.
- IARC. (1987.). Hexachlorocyclohexanes. In Overall Evaluations of Carcinogenicity. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, suppl. 7. Lyon, France:.. International Agency for Research on Cancer, 220-222.
- Idris, S., Ambali, S., & Ayo, J. (2012). Cytotoxicity of chlorpyrifos and cypermethrin: the ameliorative effects of antioxidants. . *Afr J Biotechnol.*, 99(11), 16461-16467.
- IPEN. (2008). International Persistent Organic Pesticide Elimination Network. Obtenido de <www.ipen.org/ipenweb/poprc/newpops.html>.

- Jia, H., Li, Y., Wang, D., Cai, D. Y., Ma, J., & Hu, J. (2009.). Endosulfan in China gridded usage inventories. *Environ.Sci.Pollut.Res.*16., 295–301.
- Juraske, R., Mutel, C., Stoessel, F., & Hellweg, S. (s.f.). Life cycle human toxicity assessment of pesticides: comparing fruit and vegetable diets in Switzerland and the United States. *Chemosphere.* 7(77), 939–945.
- Ki-Hyun, K., Ehsanul, K., & Shamin, A. J. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment*(575), 525–535.
- Klaasen, C., Watkins, J. I., & Casarett, D. (1999.). *Manual de toxicología*. Mexico: Mac Graw-Hill .
- Kuroda, Y., Jain, A., Tezuka, H., & Kada, T. (1992;). Antimutagenicity in cultured mammalian cells. (Vol. 267). *Mutat. Res.*
- Lander, B., Knudsen, L., Gamborg, M., Jarventaus, H., & Norppa, H. (2000). Chromosome aberrations in pesticide-exposed greenhouse workers. *Scand J Work Environ Health.*, 26(5), 436-442.
- Ling, Y., Jiang, J., Holland, J., & Perez, S. R. (2002). Arsenic trioxide polymerization of microtubules and mitotic arrest before apoptosis in human tumor cell lines. *Molecular Pharmacology.* . 62, 529–538.
- López, C. (1993). Exposición a plaguicidas organofosforados. *Perspectivas en Salud Pública*(18).
- M, H., & L, J. (2014). Toxicology Division, . (T. U. Austin, Ed.) Reference Module in Biomedical Sciences *Encyclopedia of Toxicology*, 3(3), 344–347.
- M.C.F. Toledo. (1992). Jonsson Bioaccumulation and elimination of endosulfan in zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Pesticide Sci*, 207-211.

- Marin, Garcia, J. (2016.). Mitochondrial DNA repair: a novel therapeutic target for heart failure. *Heart Fail. Rev.* 21, 475–487.
- Mascarelli, A. (2013.). Growing up with pesticides. . *Science* 341 , (6074), 740. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.1126/science.341.6147.740>.
- Matthews, G. (2006). *Pesticides: Health, Safety and the Environment* Blackwell Publishing, . Oxford, UK.
- Meléndez, G. I., Martínez, M. M., & Quijano, P. A. (2012). Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable MP2,5 en . *Iatreia*, 4(25), 347-356.
- Mersie, W., Seybold, C., McNamee, C., & Lawson, M. (2010). Abating endosulfán from runoff using vegetative filter strips: the importance of plant species and flow rate. *Agric. Ecosyst. Environ.* 97, 215–223. Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., Roundup. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167880903000355>
- Ministerio de agricultura y desarrollo rural –MADR-. (2012). Anuario estadístico de frutas y hortalizas.
- Mnif, W., Hassine, A., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., & Roig, B. (2011.). Effect of endocrine disruptor pesticides: *Public Health*(8), 2265–2303.
- Mondal, N., Sorensen, E., Hiivala, N., Feller, E., Griffith, B., & Wu, Z. (2013.). Oxidative stress, DNA damage and repair in heart failure patients after implantation of continuous flow left ventricular assist devices. . *Int. J. Med. Sci.* 10, , 883–893. .
- Mostafalou, S. M. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*.

- Mostafalou, S., & Mohammad, A. (2013). Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268: 157–177.
- Muchut, S., Simoniello, M. F., Scagnetti, J., Poletta, G. L., & Kleinsorge, E. C. (2011). Evaluación de genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a mezclas de biocidas mediante electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa) (Vol. 15). FABICIB. Obtenido de <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/ojs/index.php/FABICIB/articulo/view/885/1313>
- Nag, S., & Raikwar, M. (2008.). Organo chlorine pesticide residue sinbo vine milk. *Bull. Environ.Contam.Trans*80(1), 5–9.
- Nesnow, S., Roop, B., & Lambert, G. K. (2002). DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chemical Research Toxicology*, 15, 1627–1634.
- Ondarza, P., Gonzalez, M., Fillmann, G., & Miglioranza, K. (2014). PBDEs, PCBs and organochlorine pesticides distribution in edible fish from Negro River basin, Argentinean Patagonia. 94, 135–142.
- Organización Mundial de la Salud. (1990.). Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Serie Vigilancia, . Plaguicidas organoclorados. OMS/OPS. México: Organización Panamericana de la Salud (OPS), .
- Organización Mundial de la Salud. (1993). Plaguicidas y salud en las Américas, , 1993. Organización Panamericana de la Salud (OPS), División Salud y Ambiente. . Washington: (OMS).
- Pabuena, D. E., Ortiz, I. C., López, J., Orozco, L. J., Quijano, P. A., Pardo, E., & Meléndez, I. (2015). Actividad genotóxica inducida por extracto de fresa fumigada con pesticidas en Pamplona, Norte de Santander, Colombia. Universidad, Ciencia y Tecnología.

- Pandurangi, R., Petras, M., Ralph, S., & Vrzoc, M. (1995). Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. Ontario, Canada: Department of Biological Sciences, University of Windsor.
- Peñaranda, C. G. (2012). Análisis de costos de la producción de durazno (*Prunus pérsica*) en la provincia de Pamplona, Norte de Santander. *face*. Pamplona .
- Pimentel, D, Culliney, T., & Bashore, T. (2013.). Public Health Risks Associated with Pesticides and Natural Toxins in Foods. IPM World Textbook. Regents of the University of Minnesota.
- Pinzón, E., Morillo, C., & Fischer, G. (2014). Aspectos fisiológicos del duraznero (*Prunus persica* [L.] Batsch) en el trópico alto. Una revisión. *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.*, 17 (2): 401-411. Obtenido de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/13929>
- Puentes, G., Rodríguez, L., & Bermúdez, L. (2008). Análisis de grupo de las empresas productoras de frutales caducifolios del departamento de Boyacá. . *Agr. Col.*
- Ramírez, J., & Lacasaña, M. (2001). 70 Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. . . Instituto Nacional de Salud Pública, Dirección de Ciencias Ambientales, Cuernavaca. Morelos. México .
- Sarwar, M. (2015). The dangers of pesticides associated with public health and preventing of the risks. *Int. J. Bioinfor. Biomed. Eng.*
- Schulte-Hermann, R., & Parzefall, W. (1981.). Failure to discriminate initiation from promotion of liver tumors in a long-term study with the phenobarbital-type inducer alpha-hexachlorocyclohexane and the role of sustained stimulation of hepatic growth and mono. 4140-4146. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6169434>

- Shrivastava, R., Upreti, R., Seth, P., & Chaturvedi, U. (s.f.). Effects of chromium on the immune system FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2002, 1–7. Obtenido de [https:// www. ncbi. nlm.nih.gov/pubmed/12208600](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12208600)
- Simeonov, L., Macaev, F., & Simeonova, B. (2013). Environmental Security Assessment and Management of Obsolete Pesticides in Southeast Europe. Springer Netherlands.
- Simoniello, M., Kleinsorge, E., Scagnetti, J., Grigolato, R., & Poletta, G. C. (2008). DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. (Vol. 28). J. Appl. Toxicol.
- Simoniello, M.F, Kleinsorge, E., Scagnetti, J., Grigolato, R., Poletta, G., & Carballo, M. (2008). DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. J. Appl. Toxicol.
- Singh, N., McCoy, M., Tice, R., & Schneider, E. (1998). A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. 175: 184-191: Exp. Cell Res.
- Strober, W. (2001). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, Inc.
- Sutherland, T., Home, I., Weir, K., Russell, R., & Oakeshott, J. (2004.). Toxicity and residues of endosulfan isomers. Rev. Environ. Contam. Trans., 183, 99–113.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., . . . Ryu J. C. y Sasaki, Y. F. (2000.). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. Environ. Mol. Mutagen.
- Tice, R., E. Agurell, D., Anderson, B., Burlinson, A., Hartmann, H., Kobayashi, Y., . . . Ryu, Y. (2000). R. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, Environ. Mol. Mutagen 35. 206–221. Obtenido de [http://online library. wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3%3C206::AID-EM8%3E3.0.CO;2-J/abstract](http://online.library.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3%3C206::AID-EM8%3E3.0.CO;2-J/abstract)

UNEP-POPS-COP. (2011). Endosulfan include under the Convention. Fifth meeting of The Conference of the Parties to the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. Obtenido de <http://chm.pops.int/Convention/COP/Meetings/COP5/tabid/1267/mctl/ViewDetails/Eve>

United State Department of Agriculture – USDA-. . (2013). Natural Resources Conservation Service, Plant Database.

Van den Berg. (2009). Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease *Environ. Health Perspect*, 1656–1663. Obtenido de [https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2801202/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2801202/)

Vargas, V., Migliavacca, S., Melo, A., & Horn, R. (2001). Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. 490, 141-158. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000123&pid=S0123-4226201500010000300036&lng=en

Weber, J., Halsall, C., Muir, D., Teixeira, C., Small, J., Solomon, K. Hung, H. (2010). Endosulfan, a global pesticide: a review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Sci. Total Environ.* 408(15), 2966–2984.

Wei, J., Zhang, L., Ren, L., Zhang, J., Yu, Y., Wang, J., . . . Zhou, X. (2017.). Endosulfan inhibits proliferation through the Notch signaling Path way in human umbilical vein endothelial cells. *Environ. Pollut.* , 221, 26–36.

Wei, J., Zhang, L., Wang, J., Guo, F., Li, Y., Zhou, X., & Sun, Z. (2015). Endosulfan inducing blood hypercoagulability and endothelial cells apoptosis via the death receptor pathway in Wistar rats. *Toxicol. Res.* 4., 1282–1288.

- Wickerham, E., Lozoff, B., J. Shao, N., & Kaciroti, Y. X. (2012). . Meeker Reduced birth weight in relation to pesticide mixtures detected in cord blood of full-term infants *Environ. Int.*, 47. 80-85.
- Xiang, G., Li, D., Yuan, J., Guan, J., Zhai, H., Shi, M., & Tao, L. (2013). Carbamate insecticide methomyl confers cytotoxicity through DNA damage induction.: *Food and Chemical toxicology*. Obtenido de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512008939>
- Yadav, I., & Devi, N. S. (2015). Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: a comprehensive review. of *India. Sci.*, 123-137. Obtenido de [http://www.research.lancs.ac.uk/portal/en/publications/current-status-of-persistent-organic-pesticides-residues-in-air-water-and-soil-and-their-possible-effect-on-neighboring-countries\(e9023bf9-acfc-44ad-ae21-57bdd473e1b0\).html](http://www.research.lancs.ac.uk/portal/en/publications/current-status-of-persistent-organic-pesticides-residues-in-air-water-and-soil-and-their-possible-effect-on-neighboring-countries(e9023bf9-acfc-44ad-ae21-57bdd473e1b0).html)
- Zhang, W., & Jiang F, O. J. (2011). Global pesticide consumption and pollution : with China as a focus *Proc. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.*, 125–144. Obtenido de <http://www.iaees.org/publications/journals/piaees/articles/2011-1%282%29/Global-pesticide-consumption-pollution.pdf>