

ACTIVIDAD GENOTÓXICA INDUCIDA POR EXTRACTO DE FRESA FUMIGADA CON PESTICIDAS EN PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA.

Duban E. Pabuena, Isabel C. Ortiz, Juan López, Luz J. Orozco, Alfonso Quijano Parra, Enrique Pardo, Iván Meléndez

Resumen: Muchos pesticidas han sido clasificados como cancerígenos, ya que su principal efecto es inducir daño estructural o funcional en el material genético. Los agricultores en su afán de erradicar las plagas de los cultivos exceden la cantidad sugerida, esto hace que queden residuos en partes de la planta. En el presente trabajo se evalúa el efecto genotóxico en linfocitos humanos, inducido por extractos de fresas fumigadas con y sin pesticidas. Para evaluar la actividad genotóxica se utilizaron las técnicas de ensayo cometa e intercambio de cromátidas hermanas, la toxicidad se determinó mediante la prueba exclusión con azul de tripano. Los resultados de los ensayos indicaron que existe un efecto genotóxico dependiente de la dosis, con un $P < 0.05$ según la prueba Tukey. El extracto sin pesticidas comparado con el control negativo mostró diferencias no significativas con un $P < 0.05$. Los resultados nos muestran la existencia de compuestos en el extracto de fresa fumigado con pesticidas. Posiblemente estos pesticidas son los que inducen las lesiones en el ADN de linfocitos humanos. Dado que la fresa es un producto de alto uso en nuestra región, el consumo de esta podría convertirse en un factor de riesgo para la población consumidora.

Palabras claves: Genotoxicidad, fresa, Pesticidas, Intercambio de cromátidas, Ensayo cometa, Linfocitos.

GENOTOXIC ACTIVITY INDUCED BY STRAWBERRY EXTRACT SPRAYED WITH PESTICIDES IN PAMPLONA, NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA.

Abstract: Many pesticides are classified as carcinogenic, because its main effect is to induce structural or functional damage to genetic material. Farmers in their desire to eradicate pests of crops exceed the suggested amount, this makes residues in plant parts. In this paper we evaluate the genotoxic effects in human lymphocytes induced by extracts of fumigated strawberry with and without pesticides. To evaluate the genotoxic activity, comet assay and sister chromatid exchange techniques were used; toxicity test was determined by trypan blue exclusion. The test results indicated that there is a dose-dependent effect, with $P < 0.05$ according to Tukey test. The extract without pesticides compared to the negative control showed no significant differences with $P < 0.05$. The results we all display the existence of compounds in strawberry extract sprayed with pesticides. Possibly these pesticides are agents that induce DNA damage in human lymphocytes. Because the strawberry is a product of high use in our region, the consumption of this could be a risk factor for the consumer population.

Keywords: Genotoxicity, strawberry, Pesticides, chromatid exchange, comet assay, lymphocytes.

I. INTRODUCCIÓN

La fresa cultivada o *Fragaria x ananassa* ($2n = 8x = 56$), pertenece a la familia de las rosáceas. Fue descrita y nombrada en 1776 por el botánico Francés Duchesne. La especie se originó a partir de hibridaciones casuales que ocurrieron en algunos jardines botánicos europeos entre dos especies octaploides, *Fragaria virginiana* y *Fragaria chiloensis*, fue importada desde el nuevo mundo a finales del siglo XVI y mediados del siglo XVIII [1]. La fresa es un alimento natural cultivado en la provincia de Pamplona, Norte de Santander, Colombia; el cual según datos de AGRONET, reporta que dicho Departamento hasta el año 2012 tuvo una producción total de 3.543 Toneladas con un 8.2% de la producción nacional, siendo superado por los departamentos de Cundinamarca y Antioquia [2]. Es un producto alimenticio con alta aceptación por parte de los habitantes de la zona; la fruta es cultivada en una altura promedio entre 1300 y 2000 metros sobre el nivel del mar [3]. En mayor o menor grado la población humana está inevitablemente expuesta a pesticidas, los cuales 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 [4]. Cada vez hay más pruebas de la relación de la exposición de pesticidas con la incidencia de enfermedades crónicas humanas, pues son considerados como la principal causa de mortalidad en el nuevo mundo, lo que representa más del 60% de todas las muertes [5]. Muchos pesticidas han sido clasificados como cancerígenos según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos [6] y la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer [7]. La exposición a compuestos organoclorados se ha relacionado con un aumento de la incidencia de cáncer de mama [8]. Los organoclorados son una clase de pesticidas químicos que actúan como xenoestrógenos por interrumpir la función endocrina normal [9]. Un estudio piloto se llevó a cabo en trabajadores para evaluar la exposición de pesticidas organofosforados en el que se detectó daño oxidativo del DNA en cultivos celulares de linfocitos [10]. Otro estudio realizado [11] en 81 trabajadores dedicados a la agricultura, evaluó los cambios en las enzimas antioxidantes de eritrocitos durante el curso de una temporada de aplicación de plaguicidas. Se concluyó, que como consecuencia del período de alta exposición, los niveles de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión reductasa disminuyeron en comparación con los controles. Los pesticidas, además de ser un riesgo laboral, han sido una grave amenaza

para la salud en la humanidad, la preocupación radica en que residuos de pesticidas en los alimentos han aumentado durante la última década [12]. De acuerdo con [13], más de 500 toneladas de plaguicidas obsoletos y no utilizados están amenazando el medio ambiente y la salud pública en muchos países, siendo los campesinos los principales afectados por exponerse a estos insumos químicos sin protección o bioseguridad laboral; la preocupación aumenta cuando estos campesinos en su afán de acabar o erradicar las plagas de sus cultivos exceden la cantidad sugerida de empleo en dicho cultivo, lo que hace que cierta cantidad no se degrade y por el contrario queden residuos en partes de la planta y aún más en los frutos. La provincia de Pamplona no es ajena a esta problemática dado que los agricultores utilizan frecuentemente los pesticidas clorpirifos, azoxystrobin, carbofuran, cipermetrina, pyraclostrobin, paraquat, glifosato y endosulfan lo que contribuye a que muy posiblemente estos se absorban en los frutos y lleguen de una u otra forma a los organismos que la consumen. Por lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo nos propusimos evaluar la genotoxicidad en linfocitos humanos inducida por extractos de fresas cultivadas bajo fumigación con pesticidas en la provincia de Pamplona. Para el estudio de la genotoxicidad usamos la prueba de intercambio de cromátidas hermanas [14] y la electroforesis en gel de células individuales [15], los cuales además de proporcionar información valiosa se caracterizan por ser muy sensibles

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

La muestra de fresa (*Fragaria x ananassa*, variedad Albión) fue tomada en un cultivo con edad de 12 meses, localizado en la provincia de Pamplona (N. de S/der) vereda Monte adentro entre las coordenadas gráficas $07^{\circ} 20' 42.0''$ de latitud norte y $72^{\circ} 39' 43.7''$ longitud oeste, franja Altoandina Filo el Escorial a 2600 m de altura, con una precipitación de 913 mm anuales, temperatura media $15,05^{\circ}\text{C}$, temperatura media máxima 22.2°C , luminosidad 1516 Hrs / mes. Una humedad relativa del 78% (Estación ISER Pamplona 2013).

Toma de la muestra

Se realizaron dos (2) muestreos justo en el momento en el que son colectadas para ser llevadas al mercado. Se utilizó un cuadrante de 1 m^2 ($1 \times 1 \text{ m}$) esto para

evitar el efecto borde o no tomar frutas que tuviesen menos probabilidad de ser fumigadas dicho cuadrante se lanzó 5 veces al azar de tal manera que la muestra sea representativa, colectando en total 1 kg de fresa, luego se guardó en cajas o termos de icopor para evitar cualquier tipo de contaminación y posteriormente almacenada a bajas temperaturas hasta el momento de su procesamiento.

Obtención y concentración del extracto

Se maceró 120 g de fruta fresca durante 15 minutos hasta obtener el jugo crudo, luego se adicionó 30 mL de acetona, posteriormente se centrifuga a 3500 rpm durante 20 minutos después de los cuales se retiró y se almacena el sobrenadante. Este procedimiento se repite 4 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. Una vez obtenido el extracto, se concentra 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 g de fresas iniciales. El extracto obtenido en adelante lo llamaremos extracto 1. Para establecer diferencias entre plantas sometidas a fumigación y plantas que no lo fueron, el mismo procedimiento se realizó con fresas que fueron cultivadas sin ningún tipo de pesticidas, las cuales fueron donadas por el invernadero del Instituto de Educación Rural de Pamplona (ISER) y que en adelante lo llamaremos extracto 2

Detección de daño del ADN por el Ensayo Cometa

El daño en el ADN de los extractos de fresa fumigadas con diferentes tipos de pesticidas y extracto orgánico (sin pesticidas) se realizó haciendo uso del ensayo "COMETA" en microgel de una célula, siguiendo la metodología propuesta por [15] y modificada por [16]. Se trataron 40.000 células o linfocitos con tres dosis (100µg, 300 µg y 500 µg) de extractos de fresas, se incubaron por un periodo de 1 hora a 37°C, las placas se sumergieron como mínimo 1h en solución de lisis. Las placas se lavaron con PBS y se colocaron en una unidad de electroforesis horizontal con un buffer pH>13 y se incubó por 30 minutos, luego se corrió a 25V y 300 mA por 30 minutos. Después de la electroforesis, las placas fueron lavadas con un buffer neutralizante por 5, 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. Para medir la reproducibilidad de los resultados se hicieron tres experimentos por cada tratamiento y en cada uno se contaron 100 células. Como control negativo se utilizó, el DMSO al 2%, que fue el solvente de las muestras.

La ocurrencia de daño en el ADN se basó midiendo la longitud total del cometa haciendo uso del software (Tritek Comet Score™ freeware v1.5). Se definió el rango para los tipos de daño de la siguiente manera: de 0 a 38 µm = sin daño; de 39 a 80 µm = daño bajo; de 81 a 117 µm, = daño medio y mayor a 118 µm, tipo = daño alto.

Intercambio de cromátidas hermanas (ICH)

Se sembraron cultivos celulares a partir de sangre total heparinizada. A cada frasco de cultivo se agregó 9 mL de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero fetal bobino (SBF) al 10%, 100µL de Fitoheماغlutinina 10% (PHA) y 0.5 mL de sangre. A cada medio se le agregó 100µL del análogo de base de la timina, la bromodeoxiuridina a una concentración de 4 µg/mL. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 56 horas tiempo equivalente a dos ciclos celulares manteniendo los frascos en la oscuridad; los tratamientos con las distintas concentraciones de los extractos de fresas se hicieron a las 36 horas de incubación.

Análisis estadístico

Para las pruebas de genotoxicidad en cuanto a Ensayo Cometa e Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), se hizo un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico SPSS versión 19; se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas, La prueba Tukey con un alfa de 0,05 para hacer comparaciones múltiples Los valores se expresaron como la media, la desviación estándar ($X \pm DS$) y las pruebas se consideraron significativas ($p \leq 0.05$). Los datos de las medias obtenidas para cada una de las técnicas de genotoxicidad fueron graficadas en el software Microsoft Excel 2010.

III. RESULTADOS

Se determinaron dosis subtóxicas mediante la técnica de exclusión con azul de tripano, lo cual nos garantiza que el daño en el ADN en las células, es debido al tratamiento y no a otros factores que conducen a la

muerte celular. En la Figura 1 se observa el porcentaje de viabilidad de los linfocitos expuestos a las diferentes dosis del extracto 1 (con pesticidas) y extracto 2 (sin pesticidas), así mismo, el control negativo.

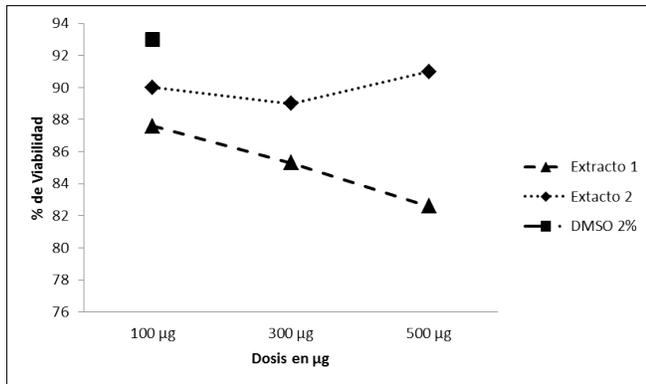


Figura 1. Porcentaje de viabilidad en linfocitos humanos inducida por extractos de fresas.

Los datos corresponden a la media de tres experimentos individuales y por duplicado con cada una de las dosis. Extracto 1 corresponde a fresas cultivadas bajo fumigación con pesticidas, Extracto 2 corresponde a fresas cultivadas sin fumigación con pesticidas. Como control negativo se usó DMSO al 2%.

Los valores representan la media del porcentaje de la viabilidad celular luego de someter a las células a los diferentes extractos; se puede observar que la viabilidad de los linfocitos disminuye gradualmente a medida que aumentan las dosis del extracto, mientras que en el extracto orgánico el comportamiento es inversamente proporcional en cuanto a la viabilidad. Los porcentajes de viabilidad obtenidos son mayores al 80% después de los respectivos tratamientos con los diferentes extractos, lo que confirma que se pueden tratar como dosis subtoxicas; evidentemente el efecto citotóxico fue más sensible en las células tratadas con el extracto 1 ya que los valores de viabilidad son cercanos al 80% mientras que en el extracto 2 son próximos al 90% comportamiento parecido al control negativo.

En la Figura 2 se muestra la genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a extractos de fresas, detectado por la prueba de electroforesis en gel de células individuales o ensayo cometa. Los resultados indican que existe un efecto genotóxico dependiente de la dosis para el extractos 1 con un $P < 0.05$ según la prueba Tukey. El extracto 2 comparado con el control negativo no mostró diferencias significativas con un $P > 0.05$.

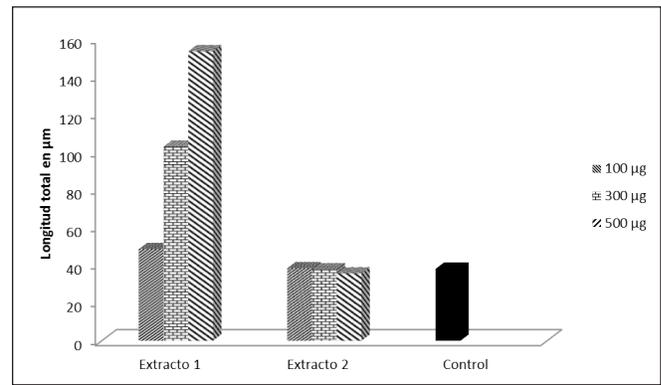


Figura 2. Genotoxicidad inducida por extractos de fresas (Fragaria x ananassa)

Los datos corresponden a la media de la longitud total de 300 cometas por dosis. Extracto 1 corresponde a fresas cultivadas bajo fumigación con pesticidas, Extracto 2 corresponde a fresas cultivadas sin fumigación con pesticidas. Como control negativo se usó DMSO al 2%.*: Diferencia significativa respecto al control negativo, $P < 0.05$.

Además, se establecieron categorías de daño para mostrar que este no se distribuye uniformemente en todas las células (Figura 3), lo cual puede ser una ventaja, debido a que la exposición no necesariamente afecta a todas las células, disminuyendo así el riesgo.

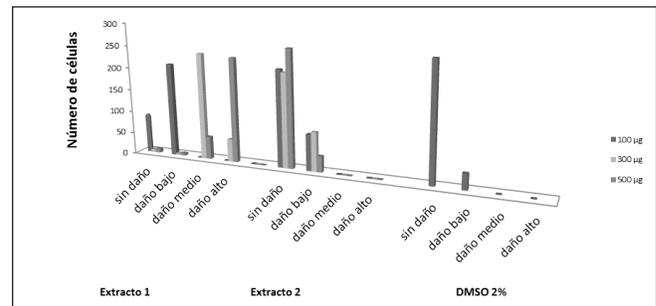


Figura 3. Rangos de genotoxicidad en linfocitos humanos inducida por extractos de fresas.

Los datos corresponden al total de 300 células por dosis distribuidas en las siguientes rangos de daños: de 0 a 38 µm, = sin daño; de 39 a 80 µm, = daño bajo; de 81 a 117 µm, = daño medio y mayor a 118 µm, = daño alto. Extracto 1 corresponde a fresas cultivadas bajo fumigación con pesticidas, Extracto 2 corresponde a fresas cultivadas sin fumigación con pesticidas. Como control negativo se usó DMSO al 2%

Como se puede observar en la Figura 3, la longitud de la cola de las células tratadas con DMSO 1% muestran daño espontáneo, ya que no supera los 38 µm y la mayoría de las células (88 %) están en el rango sin daño o daño bajo, lo que muestra que no tienen daño o si lo tienen, es muy bajo. De igual manera, con la dosis de 100 µg, 300 µg y 500 µg del extracto 2 se

puede observar que el 70% de las células tratadas se ubicaron en el rango sin daño y un poco menos del 30% en daño bajo y ninguna de las células mostraron daño medio o alto. Por su parte las células tratadas con el extracto 1 de fresas fumigadas con diferentes pesticidas presentaron porcentajes de células dañadas mayores al 80% categorizándose en los tipos de daño medio y alto, excepto para las que fueron tratadas con las dosis de 100 µg las cuales se encontraron en su mayoría en daño bajo (84% y 70% respectivamente).

En la Figura 4 se observa la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en células (linfocitos) tratadas con extractos de fresas, el control negativo mostró un frecuencia de intercambio de $3,56 \pm 1,35$ comportamiento similar al de las dosis de 100 µg, 300 µg y 500 µg, del extracto 2, mostrando diferencias no significativas con $P > 0.05$ según la prueba Tukey, el extracto 1 reportó frecuencias de intercambio de cromátidas hermanas proporcional a la dosis, siendo 300 µg y 500 µg de comportamiento similar. La frecuencia de daño del control positivo fué de $20,64 \pm 2,52$. Cabe resaltar que al comparar el control negativo con el extracto 1 fumigados con diferentes tipos de pesticidas mostraron diferencias significativas con un $P < 0.05$, lo que quiere decir que el daño observado se debe al tratamiento dado.

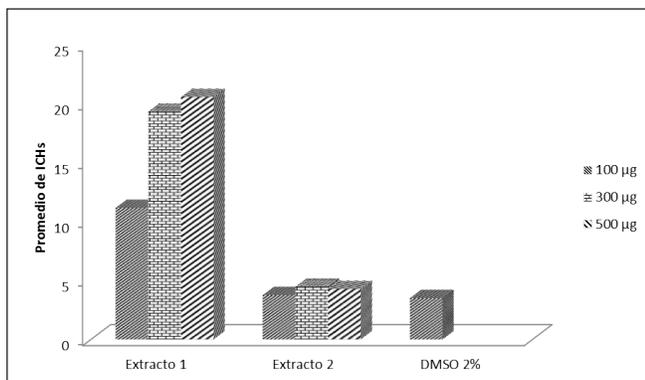


Figura 4. Promedio de intercambio de cromátidas hermanas (ICH)

Los datos corresponden a la media de ICHs encontradas en 50 células (cariotipos). *: Diferencia significativa respecto al control negativo, $P < 0.05$.

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Cuando se realizó un análisis de varianza para comparar el efecto genotóxico inducido por el extracto 1 de fresas sometidos a fumigación y el efecto del control negativo (DMSO 1%), se encontró diferencias significativas ($P < 0.05$). Todo lo contrario se observó cuando se hizo la

misma comparación con el extracto 2 de fresa cultivado naturalmente (sin pesticidas) y el control negativo, es decir, no fue estadísticamente significativa ($P > 0.05$). Lo anterior nos indica que el efecto genotóxico observado está siendo inducido por los residuos de pesticidas presentes en el extracto de fresa. Según información suministrada por los agricultores de la zona los pesticidas más utilizados durante el periodo de cultivo de fresa en estudio fueron: Clorpirifos, Azoxystrobin, Carbofuran, Cipermetrina, Pyraclostrobin, Paraquat y Glifosato; la mayoría de estos pesticidas son o pueden ser degradados por efecto de agua, temperatura y luz esto puede ser en un periodo de días o años; existe amplia evidencia en donde muchos de ellos 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 [17-20]. Lo anterior ha sido demostrado utilizando organismos modelos, los cuales arrojan información valiosa del impacto causado por pesticidas en diferentes ambientes, por ejemplo en ecosistemas acuáticos, tal es el caso de un estudio realizado en Brasil, donde se determinó el potencial genotóxico que tiene el glifosato (Roundup®) sobre el ADN de linfocitos de Caimán (Caiman latirostris) encontrándose que los niveles de daño fueron dependientes de las dosis ensayadas [21], el ADN de espermatozoides de ratas se ve afectado al ser expuestos a mezclas de pesticidas (permetrina y DEET [22]. Los resultados obtenidos en este la presente investigación, demuestran que los extractos de fresas fumigadas con pesticidas afectan el ADN de células linfocitarias (Figura 2, Figura 3 y Figura 4), Nuestros resultados concuerdan con estudios realizados, en los que se reporta daño en el ADN producto de la exposición a herbicidas e insecticidas [23]; por su parte en un estudio realizado por [24] encontraron daño en el ADN de linfocitos de trabajadores expuestos a mezclas de organofosforados, carbamatos y piretroides [25] señalan que pesticidas o mezclas de ellos causan daño oxidativo al ADN ya que se producen radicales que reaccionan con las membranas celulares e inician el proceso de peroxidación lipídica, la acumulación de estos radicales causa estrés oxidativo [26]. 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 [27]. En un estudio realizado por [28] en linfocitos de ratas expuestos a diferentes pesticidas se detectó mediante la prueba ensayo cometa la capacidad que tienen dichos pesticidas de generar rupturas de cadena sencilla y doble a causa del estrés oxidativo el cual fue corroborado midiendo la actividad de las

enzimas de reparación del ADN glicosilasa, formamido aminopirimidina (FPG) y la endonucleasa (Endo III).

La evaluación del efecto genotóxico utilizando el ensayo cometa en linfocitos tratados con extractos de fresas fumigados con diferentes pesticidas mostró daño del ADN (Figura 2, Figura 3 y Figura 4, allí se observa como el daño se va incrementando a medida que se incrementa la dosis en este caso 100µg, 300 µg y 500 µg, es decir, las dosis en la que se induce mayor frecuencia de células con daño en el ADN, también mostraron 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; estos resultados concuerdan con estudios en los que se demuestra que con el aumento de la dosis, hay mayor producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) [29,30]

Finalmente se evidencia que los resultados detectados por el ensayo cometa fueron concordantes al mostrado por la prueba ICH, de ahí el interés en el uso de ambos métodos, siendo métodos sensibles, simples, rápidos y económicos que permiten trabajar con diferentes tipos celulares (células sanguíneas, células epiteliales, semen, etc.) [31].

V. CONCLUSIONES

Podemos concluir que la fresa que está siendo comercializada en la provincia de Pamplona induce actividad genotóxica en linfocitos humanos, lo cual constituye un factor de riesgo para la población expuesta, ya que se sabe de la estrecha relación que existe entre daño genotóxico y aparición de enfermedades tales como el cáncer.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Lerceteau-Köhler E, Guérin G, Laigret F, Denoyes-Rothan B, Characterization of mixed disomic and polysomic inheritance in the octoploid strawberry (*Fragaria × ananassa*) using AFLP mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(4), 2003,pp 619-628.

[2] AGRONET. 2012. Sistema de Estadísticas Agropecuaria- SEA. Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. (<http://www.agronet.gov.co/agronetweb1/Estad%C3%ADsticas.aspx>)

[3] Portilla M MC, Vargas V MH, Quijano Parra A,

Composición de HAPs en la fresa (Variedad, Camarrosa), cultivada en Pamplona, Colombia. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 2013, pp 14-20.

[4] Collotta M, Bertazzi PA, Bollati V, Epigenetics and pesticides. *Toxicology*, 0, 2013, pp 1-7.

[5] Mostafalou S, Abdollahi M, Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 268(2), 2013, pp 157-177.

[6] United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2004. Office of Pesticide Programs, H. E. D., Science Information Management Branch. Chemicals evaluated for carcinogenic potential.

[7] IARC . International Agency for Research on Cancer. 1991. Working Group. Occupational exposures in spraying and application of insecticides. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* , 53, pp 45–92.

[8] Recio-Vega R, Velazco-Rodriguez V, Ocampo-Gómez G, Hernandez-Gonzalez S, Ruiz-Flores P, Lopez-Marquez F, Serum levels of polychlorinated biphenyls in Mexican women and breast cancer risk. *Journal of Applied Toxicology*, 31(3), 2011 pp 270-278.

[9] Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ, Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(3–5), 2011, pp 204-215.

[10] Kisby GE, Muniz JF, Scherer J, Lasarev MR, Koshy M, Kow YW, McCauley L, Oxidative Stress and DNA Damage in Agricultural Workers. *Journal of Agromedicine*, 14(2), 2009, pp 206-214.

[11] López O, Hernández AF, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano J L, Pla, A, Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. *Toxicology Letters*, 171(3), 2007, pp 146-153.

[12] Carvalho FP, Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science & Policy*, 9(7–8), 2006, pp 685-692.

[13] Food and Agriculture Organization (FAO). 2002. Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed (1st ed.). Rome: Food and Agriculture Organization. <<http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/p.htm>>.

- [14] Perry P, Evans HJ, Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. [10.1038/258121a0]. *Nature*, 258(5531), 1975, pp 121-125.
- [15] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 1988, pp 184-191.
- [16] Pandrangi RPM, Ralph S, Vrzoc M, Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ Mol Mutagen.*, 26(4), 1995, pp 345-356.
- [17] Lander BF, Knudsen LE, Gamborg MO, Jarventaus H, Norppa H, Chromosome aberrations in pesticide-exposed greenhouse workers. [Comparative Study Research Support, Non-U S Gov't]. *Scand J Work Environ Health*, 26(5), 2000, pp 436-442.
- [18] Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V, Sister chromatid exchange and proliferative rate index in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. *Chemosphere*, 46(2), 2002, pp 295-303.
- [19] Grover P, Danadevi K, Mahboob M, Rozati R, Banu, BS, Rahman MF, Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet assay. *Mutagenesis*, 18(2), 2003, pp 201-205.
- [20] Lee WJ, Blair A, Hoppin JA, Lubin JH, Rusiecki JA, Sandler DP, Alavanja MC. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the Agricultural Health Study. *J Natl Cancer Inst.* 96(23) 2004 pp 1781-1789.
- [21] Poletta GL, Larriera A, Kleinsorge E, Mudry MD, Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 672(2), 2009, pp 95-102.
- [22] Manikkam M, Tracey R, Guerrero-Bosagna C, Skinner MK. Pesticide and insect repellent mixture (permethrin and DEET) induces epigenetic transgenerational inheritance of disease and sperm epimutations. *Reproductive Toxicology*, 34(4), 2012, pp 708-719.
- [23] Giri S, Giri A, Sharma GD, Prasad SB, Mutagenic effects of carbosulfan, a carbamate pesticide. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 519(1-2), 2002, pp 75-82.
- [24] Bhalli JA, Khan QM, Nasim A, DNA damage in Pakistani pesticide-manufacturing workers assayed using the Comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 47(8), 2006, pp 587-593.
- [25] Benedetti D, Nunes E, Sarmiento M, Porto C, Santos CEI, Dias JF, da Silva J, Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: Evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 752(1-2), 2013, pp 28-33.
- [26] Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, Štětina R, The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23(3), 2008 pp 143-151.
- [27] Bull S, Fletcher K, Boobis AR, Battershill JM, Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis*, 21(2), 2006, pp 93-103.
- [28] Ojha A, Srivastava N, In vitro studies on organophosphate pesticides induced oxidative DNA damage in rat lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 761(0), 2014, pp 10-17.
- [29] Idris S, Ambali S, Ayo J, Cytotoxicity of chlorpyrifos and cypermethrin: the ameliorative effects of antioxidants. *Afr J Biotechnol*, 11(99), 2012, pp 16461-16467.
- [30] Meléndez I, Martínez ML, Quijano PA, Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable MP2,5, en Pamplona, Norte de Santander, Colombia. *Iatreia* 25 (4), 2012, pp 347-356.
- [31] Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D, Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 2009, pp 5-32.