



**DETECCIÓN DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ESTROGÉNICA EN
HORTALIZAS DEL DEPARTAMENTO DE BOYACÁ MEDIANTE LA TÉCNICA
YEAST ESTROGEN SCREEN**

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Trabajo de Grado
Bogotá
2020



**DETECCIÓN DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ESTROGÉNICA EN
HORTALIZAS DEL DEPARTAMENTO DE BOYACÁ MEDIANTE LA TÉCNICA
YEAST ESTROGEN SCREEN**

Danilo Mora Otalvaro
Paola Andrea Niño Sutta

Trabajo de grado presentado como requisito para obtener el título de Bacteriólogo y
Laboratorista Clínico

Asesor
Patricia Cifuentes Prieto MSc.
Profesor Facultad de Ciencias de la Salud

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Bogotá
2020

Agradecimientos

Agradezco a mis padres por el apoyo durante toda la carrera, a Paco, Policarpa y Molly por su compañía y a Lorena por su acompañamiento y palabras de ánimo.

Danilo

Agradezco a mi familia por su apoyo y paciencia, durante el desarrollo del pregrado, a mis hermanos, especialmente, por su preocupación y amor.

Paola

Agradecemos a la profesora Patricia Cifuentes Prieto, quien fue nuestra guía para el desarrollo del proyecto y la universidad por los espacios brindados.

Tabla de contenido

Resumen.....	10
Introducción.....	12
1. Antecedentes	14
2. Marco teórico	20
2.1 Hormonas esteroideas	20
2.1.1 Estrógenos	21
2.2 Compuestos de disrupción endocrina y su mecanismo de acción.	23
2.2.1 Mecanismo de acción.....	23
2.2.2 Receptores estrogénicos.....	24
2.2.3 Tipos de SAE que están involucrados en disrupción endocrina.....	27
2.3 Plaguicidas.....	29
2.3.1 Clorotalonil	29
2.3.2 Malation.....	29
2.3.3 Cipermetrin.....	30
2.3.4 Clorpirifos	30
2.3.5 Metomilo.....	30
2.4 Interacción de SAE tras el contacto con la planta	30
2.5 Tipos de sustancias con actividad estrogénica en hortalizas.	34
2.6 Caracterización del departamento de Boyacá y comportamiento agrícola en hortalizas.....	35
2.7 La salud humana y los DE	37
3. Objetivos	39
3.1 Objetivo general	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. Diseño metodológico.....	40
4.1 Tipo de estudio.....	40
4.2 Nivel, enfoque o alcance de la investigación.....	40
4.3 Universo, población y muestra	40
4.4 Hipótesis y variables	40
4.4.1. Hipótesis	40
4.4.2. Variables	41
4.4.3. Indicadores.....	41

4.5 Materiales y métodos	42
4.5.1 Puntos de muestreo	43
4.5.2 Preparación de las muestras para el montaje con la levadura	44
4.5.3 Técnica <i>YEAST ESTROGEN SCREEN</i>	45
4.5.4 Montaje de la técnica	46
4.5.5 Montaje de las muestras	47
5. Resultados	49
6. Discusión.....	54
7. Conclusiones.....	58
8. Recomendaciones.....	59
ANEXO 1: Preparación y almacenamiento del medio de crecimiento.....	60
ANEXO 2: Preparación del medio YNB.....	63
ANEXO 3: Tabla de densidades ópticas corregidas de las curvas para la carta control.	64
ANEXO 4. Tabla de resultados del Muestreo 1 (M1)	64
ANEXO 5. Tabla de resultados del Muestreo 2 (M2) y Muestreo 3 (M3)	65
9. Bibliografía	67

Lista de tablas

Tabla 1. Diferencias entre los receptores alfa y beta	25
Tabla 2. Diferentes tipos de sustancias disruptoras endocrinas.	28
Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas.	29
Tabla 4. Tipos de plaguicidas usados en las hortalizas que actúan como DE.....	35
Tabla 5. Posibles enfermedades relacionadas con la presencia de SAE en el cuerpo.	38
Tabla 6. Muestreos	40
Tabla 7. Puntos del muestreo N° 1 - (1/oct/2018).....	43
Tabla 8. Punto del muestreo N° 2 - (12/feb/2019)	44
Tabla 9. Punto del muestreo N°3 - (13/may/2019).....	44

Lista de figuras

Figura 1. Síntesis de hormonas esteroideas	21
Figura 2. Mecanismo de acción de un imitador hormonal o DE.	24
Figura 3. Mecanismo molecular de los RE	26
Figura 4. Estructuras químicas de los estrógenos en comparación con los pesticidas, fitoestrógenos y otros compuestos.	27
Figura 5. Zonas agrícolas del departamento boyacense.....	36
Figura 6. Hidrografía del departamento de Boyacá	37
Figura 7. Diagrama de procedimiento.	42
Figura 8. Modificación genética de la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
Figura 9. Distribución de la placa de ensayo	48
Figura 10. Montaje del experimento en la microplaca	49
Figura 11. Reacción colorimétrica	50
Figura 12. Carta control de la técnica YES con 17 B-estradiol.....	51
Figura 13. Resultados muestreo 1	52
Figura 14. Resultados muestreo 2 y 3.....	52
Figura 15. Extractos Vs arrastres	53



DETECCIÓN DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ESTROGÉNICA EN HORTALIZAS DEL DEPARTAMENTO DE BOYACÁ MEDIANTE LA TÉCNICA **YEAST ESTROGEN SCREEN**

Resumen

Debido a que el departamento de Boyacá participa activamente en la producción hortícola de Colombia, el presente estudio buscó identificar sustancias con actividad estrogénica en hortalizas de la ruta Duitama-Sogamoso para lo cual se recolectaron 28 muestras en total y se utilizaron dos técnicas de extracción con etanol (arrastre en la superficie y macerado) que fueron procesadas mediante la técnica Yeast Estrogen Screen (YES) que utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante como bioindicador que determina cualitativa y cuantitativamente estas sustancias.

En el primer muestreo solo se realizó la extracción por arrastre para 10 muestras de las cuales 4 presentaron actividad estrogénica. Para los muestreos 2 y 3, 14 de las 18 muestras presentaron valores ≥ 4 ng/L en equivalentes de estradiol (EEQ), de las cuales 12 fueron detectadas en el macerado y 2 por ambas técnicas. La presencia de estos compuestos se puede atribuir a la aplicación de plaguicidas y otros químicos que tienen dentro de su formulación disruptores endocrinos. Así mismo, estos compuestos pueden llegar a contaminar las fuentes hídricas aledañas utilizadas como agua de riego, que durante su trayecto ha tenido contacto con otros contaminantes de origen antropogénico. La identificación de estos compuestos en productos de consumo cotidiano representa un factor de riesgo que puede afectar la salud humana. El uso de la técnica YES permite identificar de forma rápida la presencia de disruptores endocrinos de tipo estrogénico en estos productos de alto consumo en el país.

Palabras clave: *Disruptores endocrinos, estrógenos, Yeast Estrogen Screen, sustancias con actividad estrogénica, plaguicidas.*

Estudiantes: Danilo Mora Otalvaro y Paola Andrea Niño Sutta

Docente: Patricia Cifuentes Prieto MSc.

Fecha: febrero 20 de 2020

Abstract

Because the department of Boyaca actively participates in the horticultural production of Colombia, this study sought to identify substances with estrogenic activity in vegetables on the Duitama-Sogamoso route, for which 28 samples were collected in total and two extraction techniques were used with ethanol (surface swept and macerated) that were processed using the Yeast Estrogen Screen (YES) technique that uses the recombinant *Saccharomyces cerevisiae* yeast as a bioindicator that determines qualitatively and quantitatively these substances.

In the first sampling, sweep extraction was only carried out for 10 samples of which 4 presented estrogenic activity. For sampling 2 and 3, 14 of the 18 samples presented values ≥ 4 ng / L in estradiol equivalents (EEQ), of which 12 were detected in the mash and 2 by both techniques. The presence of these compounds can be attributed to the application of pesticides and other chemicals that have endocrine disruptors in their formulation. Likewise, these compounds can contaminate nearby water sources used as irrigation water, which during its journey has had contact with other pollutants of anthropogenic origin. The identification of these compounds in everyday consumer products represents a risk factor that can affect human health. The use of the YES technique allows to quickly identify the presence of endocrine disruptors of estrogenic type in these high consumption products in the country.

Key words: *Endocrine disruptors, estrogens, Yeast Estrogen Screen, substances with estrogenic activity, pesticides.*

Introducción

Las zonas agrícolas de Colombia, se mantienen a la vanguardia con el uso de químicos para proteger las plantas y con los que se pretende mejorar los estándares de calidad de los productos hortícolas, que son esenciales para la economía y alimentación a nivel nacional. El departamento de Boyacá, es el epicentro de producción, dada su variabilidad climática y la fertilidad de sus suelos (1). La implementación de los diferentes insumos químicos referidos para el control de plagas, restablece la discusión de las múltiples fuentes de contaminación a las que están expuestos frecuentemente las hortalizas y vegetales.

Organizaciones internacionales como la Unión Europea, vienen identificando los presuntos químicos disruptores endocrinos. En la variedad de compuestos evaluados, se muestra que algunos ingredientes activos de los pesticidas, metales pesados, son seleccionados en el mencionado grupo de sustancias (2). Basado en estudios experimentales se ha demostrado, que las propiedades de las sustancias químicas disruptoras endocrinas interactúan con el sistema endocrino ocasionando efectos adversos para la salud (3). Aparentemente, se pensaría, que los agricultores que intervienen en la producción y cosecha tienen mayor grado de exposición, pero al final todas las personas en general han tenido contacto con los disruptores endocrinos. La exposición ocurre al beber agua contaminada, respirar aire contaminado, ingerir alimentos o al tener contacto con tierra contaminada (4). Dichas sustancias químicas tienen homología con hormonas de tipo estrogénico que produce naturalmente el cuerpo para regular el equilibrio del sistema endocrino y demás sistemas funcionales del cuerpo. Su mecanismo de acción se da por imitación, neutralización y/o bloqueo en sus respectivos receptores ocasionando disrupción en hormonas endógenas como el estradiol, estriol y estrona (5). Estas sustancias están presentes en los vegetales por aplicación superficial en las hojas o por el ingreso a través de la raíz de compuestos tipo pesticida y aguas contaminadas con sustancias que tengan actividad estrogénica. A nivel fisiológico, la planta desencadena diferentes procesos con los que busca metabolizar y eliminar dichas sustancias exógenas que han ingresado a la planta. En el proceso mencionado se han descrito tres fases transformación, conjugación y

almacenamiento, que permiten la eliminación o bioacumulación de dichas sustancias (6).

En el departamento de Boyacá, el afluente del Río Chicamocha presenta contaminación por la industria y desechos humanos, este es usado como agua de riego y además de los plaguicidas, es el principal vehículo de Sustancias con Actividad Estrogénica (SAE), que por su persistencia entra en contacto con plantas y humanos. Por consiguiente, en el presente trabajo experimental se utilizó la técnica Yeast Estrogen Screen (YES), la cual utiliza la levadura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante como un bioindicador que expresa los receptores presentes en las células humanas para el reconocimiento de las hormonas esteroideas o de las SAE que están presentes en las hortalizas cultivadas en Boyacá.

1. Antecedentes

Desde las primeras décadas del siglo XX se ha tratado el concepto de disruptor endocrino (DE). En el año 1991, se realizó una de las primeras menciones de este término en la conferencia de Wingspread (7), en el que se declaró que hay sustancias que tienen la capacidad de alterar el sistema hormonal de animales y humanos, tratándose de componentes relacionados a modificaciones como: compuestos bioacumulativos (pesticidas y productos afines), algunos metales pesados, químicos industriales y otros productos sintéticos.

Para 1997, Schardt expone el manejo del consumo de frutas y verduras como complemento en la prevención de enfermedades y mejora de la salud. La contraparte, que no era evidente, es que para el cuidado de los campos de cultivo se utilizan pesticidas y éstos persisten en cáscaras con variabilidad respecto a la absorción. Dependiendo de la fruta pueden ser absorbidos pues según los análisis respectivos que relacionan exposición y su modo de acción en el cuerpo humano, describen que los sistemas endocrino, nervioso e inmune se han afectado. Estos alimentos tienen mayor probabilidad de persistencia de los plaguicidas y otros afines, por la tendencia a permanecer en cáscaras y tras la ingesta entran al organismo, pero no pueden volver a salir actuando como un tóxico (8).

En 1998 Bolger et al menciona la forma en que los ensayos *in vitro* definen mecanismos moleculares responsables de los efectos que presentan los Químicos Disruptores Endocrinos (QDE), apreciación que toma mayor relevancia pues se conoce la forma en que estos mimetizan o bloquean la acción de los estrógenos naturales y lo hacen porque modifican el control transcripcional de genes en células específicas, por el Receptor Estrogénico (RE), ya sea asociado a crecimiento, diferenciación y/o funcionamiento de tejidos, donde se presenta la unión receptor-ligando (9).

Nishihara et al en el año 2000, utilizó una prueba de ensayo con dos levaduras híbridas, para la identificación de los DE en más de 500 sustancias químicas que mostraron una actividad estrogénica. Se logró mediante la modificación del

microorganismo que con interacción celular realiza la detección, demostrando la funcionalidad como herramienta primaria. En este estudio, las sustancias probadas, mayoritariamente contienen el anillo fenólico en su composición estructural, aunque también resalta sustancias que sin fracción fenólica actúan como DE. En esta prueba no se requiere considerar los estrógenos endógenos de las levaduras, pues ellas carecen de estas moléculas (10).

La composición de la dieta, está claramente expuesta a ser relacionada como una fuente de DE como se puede apreciar en el trabajo de Ward y Thompson (11) en el 2001 donde explica la forma en que los fitoestrógenos (presentes en verduras, legumbres, frutas y algas marinas) y los micoestrógenos (principalmente en cereales almacenados) ingeridos en la alimentación pueden representar un riesgo a la salud por las dosis consumidas, el tipo de compuesto, la etapa del ciclo de vida y la susceptibilidad de desarrollar enfermedades más complejas en la adultez, debido a que la estructura de dichos compuestos es similar al 17-beta-estradiol, que es un modulador propio del cuerpo humano, relacionado con el desarrollo y crecimiento posnatal, además de mantener la salud reproductiva, cardiovascular y ósea.

Con respecto a otros procedimientos para detectar los QDE, Mueller (12) en 2004, exploró el desarrollo de diferentes técnicas, que se miden por la unión del xenoestrógeno a los RE, y tras ello se evidenciaron con fluorescencia, coloraciones, o también radioactividad. Demostraron que los compuestos endocrinos activos, pueden medirse con ensayos de transactivación transitoria, en los cuales las células se transfectan con el cDNA para RE α o RE β y un gen indicador que contiene un elemento de respuesta al estrógeno o un promotor sensible al estrógeno. El sistema de estrogenicidad de levadura (en inglés Yeast Estrogen Screen) mide la actividad de RE en la levadura sin perjudicar el crecimiento de la misma y los contaminantes presentes en estas muestras generalmente no estériles en general no van a perjudicar la proliferación celular en contraste con las células de mamíferos.

Las células de otros animales también se han utilizado de manera experimental para probar la presencia de los DE como la descrita por Sugiyama et al (13), en el 2005, el ensayo en línea celular de *Xenopus laevis* (nombre común: rana de uñas), la cual

se tradujo con un vector que contiene el gen que codifica para luciferasa. Esta enzima se activa específicamente por las diferentes hormonas tiroideas (TH) es decir, es inducible por este tipo de hormonas. Durante la realización de este ensayo se analizaron productos químicos como ftalatos (ftalato de dicitclohexilo, ftalato de N-butilbencilo y ftalato de di-n-butilo), dos herbicidas (ioxinilo y pentaclorofenol) y un miticida (dicofol) los cuales tienen actividad antagonista a diferentes concentraciones e inhiben la expresión de Triyodotironina primaria, observando actividad disruptiva del sistema endocrino por las diferentes sustancias que son utilizadas en la producción agrícola observando alteración metabólica.

Todo el auge de las sustancias que actuaban como DE, estableció que los alimentos de origen agrícola no deberían tener restos de pesticidas que actuarán como contaminantes y si estos estaban presentes deberían estar en bajas concentraciones dependiendo de las regulaciones mundiales establecidas por la Unión Europea, Japón y/o Estados Unidos, que han definido listados de compuestos catalogados como DE. En el 2008, Wylie et al, hace mención a una hortaliza, la espinaca, en forma de extracto, en donde se logró identificar el *p,p'* DDE, que es un producto de descomposición del DDT, clasificado como DE y otros 10, mediante la ya conocida GC-MS acoplada con software especializado (llamado DRS), que relaciona la biblioteca de pesticidas y DE, de forma que involucra la sustancia determinando si tienen disrupción endocrina, en la muestra (productos alimenticios) a examinar (14).

Lundgren et al en el año 2009, realizó un estudio en el cual analizó las aguas residuales de 19 industrias en USA, que se dedicaban a procesar diferentes tipos de plantas incluyendo fabricantes de biocombustibles, se evidenció la presencia de fitoestrógenos como Genisteína, Daidzeína, Cumestrol, Formononetina, Biochanina A y Zearalenona. Posteriormente, se analizaron muestras de agua con previo tratamiento biológico y lodo activado y se demostró que al someterlas a estos procedimientos se logra la eliminación de estos compuestos. Sin embargo, se encontraron resultados con concentraciones mayores a 1.000 ng/L de fitoestrógenos en las muestras de agua con tratamiento (15).

En 2011, Mnif et al (16) realizó una revisión en la cual menciona que la OMS informa anualmente tres millones de casos de intoxicación con plaguicidas provocando 220.000 muertes en todo el mundo y en otros casos alterando diferentes sistemas del cuerpo humano como el neurológico, reproductor y generando enfermedades como el cáncer. Entre los pesticidas más utilizados se pueden encontrar los organoclorados, organofosfatos y carbamatos, los cuales pueden actuar como disruptores endocrinos y causar diferentes patologías. Es importante reconocer la edad como factor predisponente, ya que se puede presentar mayor susceptibilidad y como consecuencias se manifiestan con bajo peso al nacer, muerte fetal y criptorquidia e hipospadias en fetos; en mujeres en estado de lactancia se puede ver alterada la función intelectual y retardos en el sistema nervioso central. Según estudios epidemiológicos que se realizaron desde el año 2000, se vio una decadencia en la fertilidad masculina dada por mala calidad del semen y se encontró la relación entre algunos pesticidas y la alteración de la espermatogénesis y en las mujeres el desarrollo de cáncer de mama con más probabilidades.

En las fuentes hídricas, también se pueden encontrar los QDE, como en el estudio elaborado por González et al (17) en el año 2012 en el que catalogaron los pesticidas de uso frecuente en los cultivos de la región, donde el predominio de uso fue del principio activo Mancozeb (para cultivos de papa), que se encuentra catalogado como un DE, además de otros como el Malatión y Clorpirifos. La presencia de estos varía dependiendo de la concentración aplicada en la siembra y las proximidades de los cultivos a los ríos, pues llegan a circulación por escorrentías.

Es así cómo, teniendo en cuenta el vínculo que se establece entre los DE y el manejo de pesticidas que llegan a las fuentes hídricas de formas exógenas, Cifuentes (18), en el año 2013, evaluó la presencia de sustancias con actividad estrogénica en el agua demostrando que tras la implementación de la técnica en el análisis de diferentes muestras provenientes de los ríos Bogotá y Tunjuelo se detectaron estos compuestos en las muestras ambientales, los cuales son

indicadores de contaminación y representan un riesgo en el equilibrio endocrino del cuerpo humano.

En México en 2013, en un estudio realizado por Pérez et al (19), tras el análisis de los datos de varios trabajos en cuanto a la cuantificación mínima de algunos plaguicidas utilizados que se encuentran presentes en hortalizas y frutas, la mayoría presentaron residualidad de estas sustancias que están asociadas a los QDE. Algunos de estos son compuestos organoclorados y organofosforados como el diazinon, metil-paratión, etion, entre otros. Las organizaciones internacionales ya han catalogado estas sustancias con capacidad disruptora en el ser humano, además de afectar el medio ambiente, por ello solo su presencia en el alimento genera un riesgo en el cuerpo de los seres vivos, sin tener en cuenta el LMR (Límite Máximo de Residuos) intervalo que se ha declarado para estos químicos analizados.

Por otra parte, en el departamento de Boyacá, uno de sus grandes afluentes es el río Chicamocha, este se ha visto implicado en estudios que revelan la contaminación que se ha generado a través de los años (20). En 2015, Vergara y Rodríguez (21) en su investigación, determinaron metales pesados como el mercurio y el plomo los cuales están clasificados como DE, estos se encontraban dentro de los límites permitidos, pero su presencia constituye un riesgo para la salud ambiental, teniendo en cuenta las fuentes hídricas, los ciclos de vida de los animales que pertenecen a este ecosistema y finalmente para la salud humana dado que la ingesta prolongada de los DE pueden ser un factor de riesgo para alterar el equilibrio corporal.

En el año 2016, dada la preocupación mundial de la inocuidad tanto microbiológica como química en alimentos frescos Mutengw et al (22), realizaron un estudio en África, en el cual analizaron frutas y verduras recolectadas entre el 2012 y 2014, para determinar residuos químicos provenientes de los pesticidas. Se realizó un extracto de la muestra con Acetonitrilo y otros compuestos y su detección se realizó con técnicas como espectrometría de masas y cromatografía de gases. Resultó que el 91% de las muestras cumplían con el LMR establecido por el *Codex Alimentarius*,

el 8% contenían productos químicos no registrados y el 1% restante excede el LMR. En este análisis se encontraron 74 tipos de plaguicidas diferentes que se usan en el sector hortícola que estaban presentes en productos que no eran para exportación, sino para consumo local. Lo anterior genera una alta preocupación, dado que a los productos de tipo exportación si se realiza un control de residuos de sustancias químicas, diferente a los que están para consumo local teniendo en cuenta que estos residuos pueden afectar a cualquier persona se deberían implementar acciones legales para los productores que no realicen el control establecido por el Codex Alimentarius.

Teniendo en cuenta las evidencias mostradas hasta el momento y para concluir en el año 2016 Ferré et al (23), analizó y comparó los plaguicidas que se utilizan en la producción de carne, frutas y verduras. Simultáneamente en Mendoza, Argentina, se encontró que los Clorpirifos y la Cipermetrina eran utilizados por los tres sistemas de producción en diferentes concentraciones, lo que originó una residualidad que supera el LMR permitido según el Plan Nacional de Control de Residuos. Este estudio muestra la importancia que debería tener la utilización y control de pesticidas ya que no solamente se pueden encontrar residuos en frutas y verduras sino también en carne, lo que puede ocasionar disrupción endocrina generando factores de riesgo para desarrollar enfermedades como el cáncer.

2. Marco teórico

El funcionamiento del cuerpo humano está mediado por diferentes sistemas, los cuales interactúan entre sí por medio de hormonas y receptores celulares. Dichas sustancias son producidas por un grupo heterogéneo de glándulas que modulan las reacciones manteniendo el mecanismo natural (24). Hay sustancias externas que presentan similitud estructural, a nivel molecular, con las hormonas y provoca una disrupción alterando las rutas metabólicas generando posibles riesgos que pueden ocasionar daño a largo plazo (4,10).

2.1 Hormonas esteroideas

Las hormonas esteroideas son sustancias derivadas del colesterol sintetizadas en células específicas como el ovario, testículos, placenta y corteza suprarrenal que se caracterizan por tener en común un anillo de ciclopentanofenantreno. Están compuestas por tres anillos de 6 carbonos (llamados A, B y C) y uno de 5 carbonos (D). Este compuesto presenta dos metilaciones en las posiciones carbono 10 (Metilo C19) y carbono 13 (Metilo C18) y una cadena lateral en el carbono 17, dichas hormonas regulan múltiples procesos en los mamíferos como la respuesta al estrés y la función reproductiva (25).

Como hormona precursora se encuentra la Pregnenolona que es sintetizada a partir del colesterol por la Desmolasa mitocondrial en una serie de reacciones enzimáticas. Posteriormente, actividades de isomerización y oxidación dan lugar a nuevas moléculas como estrógenos, andrógenos o progestágenos (26), como se observa en la Figura 1, los cuales son liberados al torrente sanguíneo para ser transportadas por proteínas con destino a una célula diana específica la cual expresará el receptor intracelular que puede estar presente en el núcleo o citoplasma de la célula, en algunos casos la unión del complejo receptor-hormona actúa como mecanismo de inducción genómica para la producción de proteínas,

también se ha observado que no solo tienen mecanismo inductor, sino que además pueden modular la actividad de receptores para otros mensajeros químicos (27).

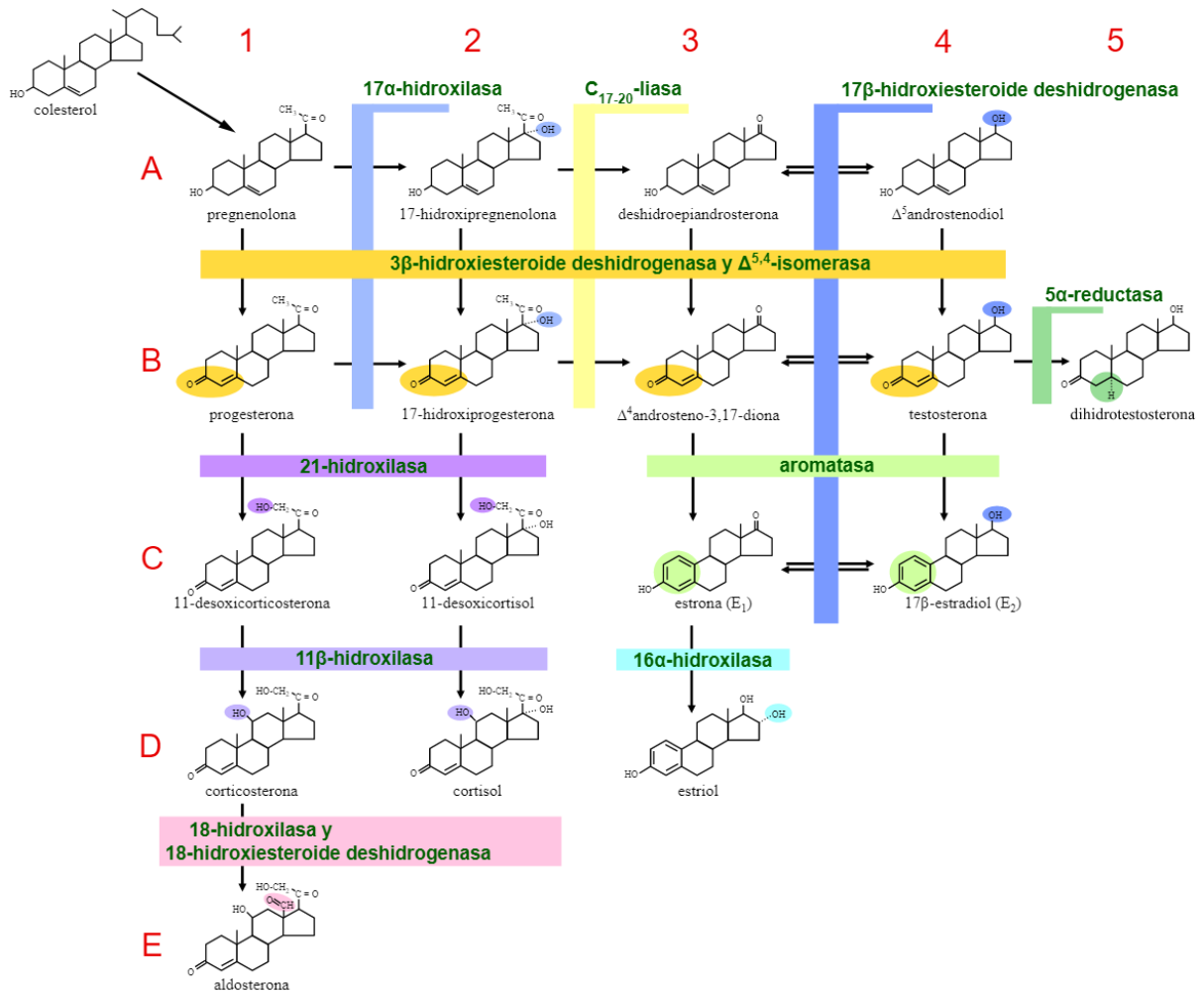


Figura 1 . Síntesis de hormonas esteroideas. Fuente: Biomodel UAH. España, 2020

Los efectos de las hormonas esteroideas ocurren a corto, mediano y largo plazo dado sus diferentes mecanismos de acción, teniendo en cuenta que son las encargadas de procesos como la organogénesis, la reproducción, el periodo menstrual y de gestación (28).

2.1.1 Estrógenos

Los estrógenos son hormonas esteroideas con naturaleza no polar lo que les permite atravesar la membrana de la célula con facilidad; debido a esto sus receptores actúan a nivel intracelular los cuales son factores de transcripción activados por unión al ligando, es decir, son inducibles (29).

Estas hormonas sexuales son producidas por el ovario y transportadas por el torrente sanguíneo a los diferentes órganos reproductores femeninos que le permiten su correcto funcionamiento y tienen funciones como permitir el ciclo menstrual en la mujer, regular el nivel de colesterol en la sangre influyendo en el metabolismo de las grasas, inducir la producción del colesterol HDL y actuar como protector de la médula ósea evitando el deterioro en la calidad del hueso y así mismo previene y revierte la osteoporosis (30).

Según Gruber et al (31), las acciones fisiológicas de los estrógenos en la mujer están dados en diferentes tejidos como el mamario en el cual estimula la actividad mitótica logrando el crecimiento y diferenciación del epitelio ductal y del tejido conectivo. En el hígado incrementa la producción de las proteínas de coagulación y otros factores, además de estimular la absorción de lipoproteínas séricas, otra de las funciones es mantener el sistema cardiovascular dado que son vasodilatadores arteriales con acción cardioprotector. En el sistema nervioso central actúa como un neuroprotector y reduce los cambios en el estado de ánimo en la perimenopausia.

En el sexo masculino los estrógenos son producidos por secreción directa de los testículos y tienen formación extraglandular a partir de hormonas precursoras como la testosterona. Su concentración es muy baja y el estradiol es el estrógeno más importante en el hombre, ya que tiene funciones como la regulación del eje hipotálamo - hipófisis - gónadas, permite la retroalimentación negativa de las gonadotropinas además al igual que en las mujeres es un protector de los huesos y favorece el metabolismo lipídico, hepático (32).

Los estrógenos y la testosterona son diferenciadores en el metabolismo masculino, ya que la deficiencia de estrógenos empeora los índices glucémicos en los hombres, lo que es un factor para que aumente la resistencia insulínica. Además, la baja concentración de estrógenos es un componente de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares ya que las hormonas sexuales regulan el colesterol LDL y el total (33).

2.2 Compuestos de disrupción endocrina y su mecanismo de acción.

El término sustancia con actividad estrogénica (SAE), ha sido estudiado a través de las décadas por grupos de científicos en diferentes áreas, que, mediante evidencia experimental, han logrado establecer que hay compuestos que interactúan con las células, a modo de receptor-ligando y tras la exposición, pueden alterar el funcionamiento del sistema endocrino (4,7).

Estos compuestos representan una gran variedad de sustancias. Han sido catalogadas de diversas maneras, pero sus orígenes permiten enfocarlos de manera común. Se pueden distinguir los presentes en el entorno: como los fitoestrógenos (en vegetales) y micoestrógenos, además de algunos metales pesados. Por otra parte, están aquellos donde ha intervenido el hombre: relacionado con procesos industriales para su síntesis como los pesticidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas) y otros productos químicos sintéticos (7).

Por lo anteriormente expuesto, se ha descrito que, tras la exposición a estas sustancias, en todo el ciclo de vida, con aumento de riesgo en etapas específicas, el cuerpo humano pierde el equilibrio de la homeostasis regular y hay interferencia con los procesos metabólicos corporales, siendo el sistema hormonal el más afectado (3), es por esto que se han designado como disruptores endocrinos (DE). Es importante mencionar que también están implicadas: la vida silvestre y el medio ambiente.

2.2.1 Mecanismo de acción

Metabólicamente todas las células tienen diferentes formas de comunicación, en la mayoría de éstas hay receptores específicos, que son activados por el reconocimiento de una molécula afín, generando una cascada de señalización para desarrollar una actividad específica en el organismo como la producción de hormonas (34).

El sistema endocrino cuenta con un modulador esencial que es el 17 beta estradiol, el cual permite el crecimiento y desarrollo durante todas las etapas de vida,

incluyendo la etapa gestacional. Esta molécula puede alterar dicha homeostasis de dos formas diferentes (5).

1. La unión ligando-receptor la cual se ve afectada por la participación de sustancias que se mimetizan actuando como antagonistas o agonistas, inhibiendo o incrementando, respectivamente, la producción hormonal.

2. Tras la señalización efectuada por la acción anterior, la estimulación celular se puede ver afectada por la variación, baja o alta, en la producción hormonal.

En la figura 2 se muestran las posibles reacciones de una célula con una hormona corporal, un bloqueador hormonal y un imitador hormonal (35).

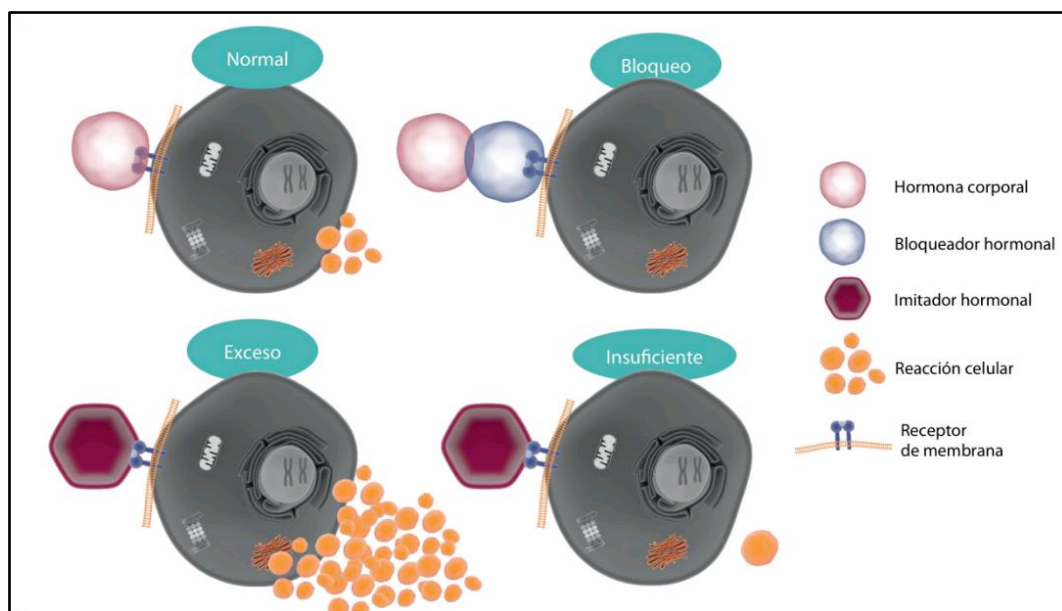


Figura 2. Mecanismo de acción de un imitador hormonal o DE. Fuente: Rev. Medicina de la conservación y enfermedades de la fauna silvestre. Monsalve-Buriticá S. 2019

2.2.2 Receptores estrogénicos

Los receptores estrogénicos (RE) pertenecen a una serie de eventos que son denominados señalización estrogénica, la cual permite la transducción celular. Dichos receptores están inactivos por proteínas de choque térmico en el interior de la célula (36).

La unión de la hormona o sustancia estrogénica con su correspondiente receptor provoca cambios de conformación que los separan de las proteínas de choque térmico posibilitando su transporte al núcleo, posterior a esto se inicia la transcripción de genes que se activan en presencia de estas sustancias (genes responsivos a estrógenos). Estos receptores estrogénicos fueron descubiertos en 1958 por Green y colaboradores, los cuales determinaron su estructura y composición. En 1996 Kuiper y colaboradores descubrieron una segunda molécula capaz de activarse con interacción específica de estrógenos, el primer receptor fue identificado como RE Alfa y el segundo como RE Beta (33,36). Con ello es posible evidenciar diferencias entre los receptores. Ver tabla 1 (30).

Tabla 1. Diferencias entre los receptores alfa y beta

RE Alfa	RE Beta
Longitud 600 aminoácidos Peso 67 kDa Presenta más afinidad por el estradiol	Longitud 500 aminoácidos Peso 55 kDa Presenta más afinidad por los fitoestrógenos

Fuente: Neurobiología. Lacia-Espinosa J, et al. 2013

Los receptores tipo alfa se expresan con mayor frecuencia en los tejidos llamados clásicos que se encuentran en el útero, placenta, glándula mamaria, hígado, sistema nervioso central, sistema cardiovascular y en los huesos. En los tejidos que son considerados no clásicos como la próstata, ovarios, glándula pineal, tiroides, paratiroides, páncreas y adrenales, piel, músculo estriado, vesícula biliar y algunas partes del cerebro presentan baja actividad de receptores tipo alfa, éstos, a diferencia de los clásicos presenta mayor actividad de receptores tipo beta (30).

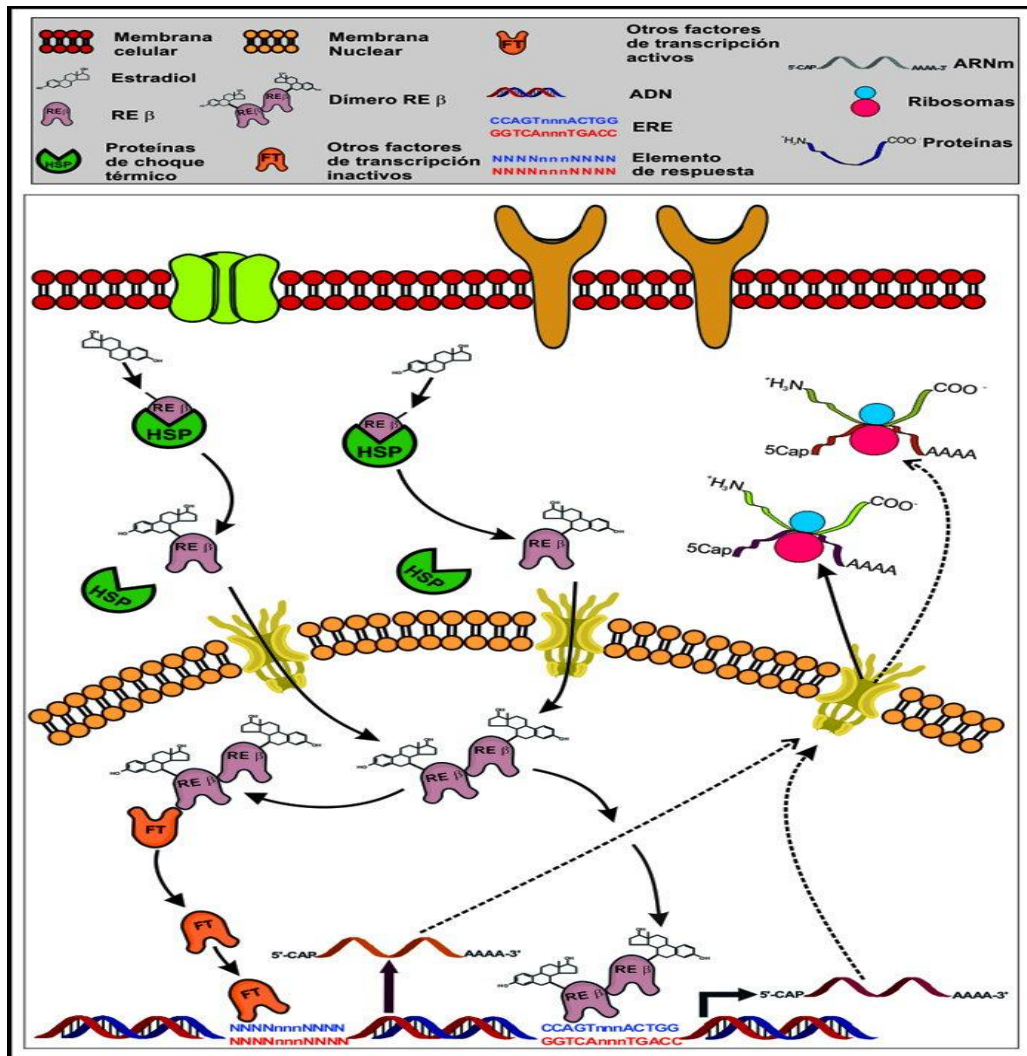


Figura 3. Mecanismo molecular de los RE. Fuente: Neurobiología. Locia-Espinoza J et al. 2013

Teniendo en cuenta la funcionalidad de los receptores estrogénicos se debe mencionar la utilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que es un organismo eucariota unicelular y generalmente son ovaladas, pero pueden llegar a ser esféricas, cilíndricas o elípticas. Estas son de crecimiento rápido y fácil de mantener y conservar en el laboratorio, su genoma está compuesto por 6000 genes en 16 cromosomas nucleares y fue el primer organismo eucariota en ser secuenciado en su totalidad (37,38).

Esta levadura dada su facilidad de manipulación es modificada genéticamente realizando deleciones o inserciones directamente en los genes o por implantación de plásmidos. En este caso se realiza la recombinación con DNAc, el cual va a codificar para los receptores estrogénicos presentes en las células humanas y un

gen reportero plasmídico *Lac Z* que codifica para la beta galactosidasa como respuesta de la formación del ligando (39,40).

2.2.3 Tipos de SAE que están involucrados en disrupción endocrina.

La composición de las sustancias que actúan como DE tiene la particularidad de tener homología en su estructura molecular, con las hormonas (a su vez éstas son derivadas de compuestos esteroideos), en la posición del anillo fenólico. Sin embargo, no es una característica exclusiva (10), a lo largo de los años esta propiedad ha permitido caracterizar a la mayoría de sustancias sospechosas con este tipo de acción.

En la figura 4 se observa la característica del estradiol, hormona natural, comparando su estructura frente a otros QDE (41–44), resaltando el anillo fenólico.

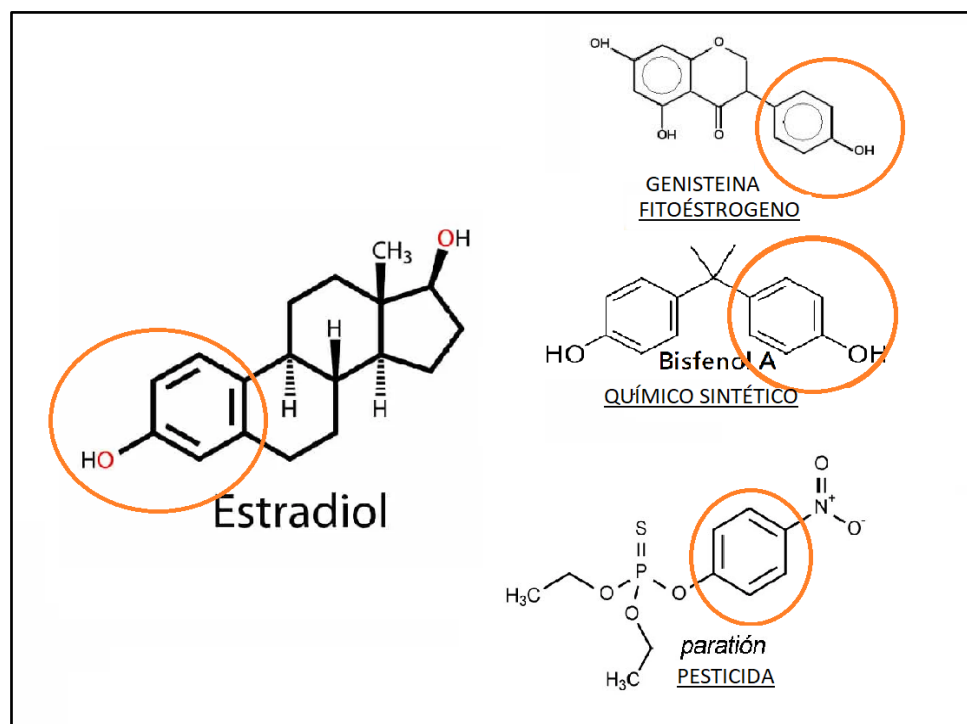


Figura 4. Estructuras químicas de los estrógenos en comparación con los pesticidas, fitoestrógenos y otros compuestos. Fuente: Ecured.cu. Genisteina. 2020; desinsectador.com. PARATION-FORMULA. 2016; Es.123rf.com. Hormonas sexuales fórmula estructural estradiol. 2020; Foodpackagingforum.org. Bisfenol A. 2014.

Debido a la gran variabilidad que se presenta en la naturaleza de SAE, no se ha establecido una categorización estándar por entes internacionales, por lo cual se

adaptó una clasificación de éstas (5,45) teniendo en cuenta diferentes autores. (Tabla 2).

Tabla 2. Diferentes tipos de sustancias disruptoras endocrinas.

Medioambientales estrogénicos	Fitoestrógenos: Isoflavonas, soya Químicos sintéticos: Los agonistas del 17 alfa-etinilestradiol La estrona, el 17 alfa-estradiol y el 17 alfa-etinil-estradiol (grupo bisfenol A). Ftalatos (productos empleados en plásticos).
Pesticidas y químicos industriales relacionados	- Organoclorados (DDT, hexaclorobenceno, clordano, clordecona, mirex, toxafeno, lindano, linurón, acetoclor y alaclor) - Organofosforados (Paratión, Malation, Clorpirifos, Diazinon, Diclorvos, etc.) - Carbamatos, piretrinas y piretroides, - Herbicidas (glifosato, atrazina, etc.) - Fungicidas (vinclocin y otros)
	ftalatos
	fenoles
Compuestos orgánicos persistentes	Sustancias organocloradas (PCB, dioxinas, HCB), perfluoradas (PFOS, PFOA), bromadas (PBB, PBDE), entre otras
Metales y metaloides	Plomo, cadmio, níquel, mercurio, compuestos organoestánicos, arsénico.
Disolventes	Estireno, percloroetileno, triclorobenceno, resorcinol, parafinas cloradas, etc

Fuente: Ecologistas en Acción. Romano-Mozo D. 2014; Iatreia. González AR, Alfaro Velásquez JM. 2005

La FDA ha desarrollado a través de su división del Centro Nacional de Investigación Toxicológica una base de datos denominada: Base de Datos de Actividad Estrogénica (EADB) que pone a disposición la información de más de 18.000 sustancias con actividad estrogénica, donde se muestra el nombre de la sustancia y

tipo de ensayo, además de otros datos específicos que ofrecen la información concreta (46).

2.3.1 Clorotalonil

Es un fungicida de contacto de alto espectro que proviene de la familia de los clorofenilos, presenta alta toxicidad en mamíferos aumentando la posibilidad de mutaciones, reacciones alérgicas y puede ser un factor predisponente para desarrollar cáncer, su principal vía de ingreso es la respiratoria, pero también puede ingresar vía dérmica o digestiva (47,48).

2.3 Plaguicidas

Dentro de las principales sustancias que actúan como DE se encuentran los plaguicidas, los cuales son sustancias químicas formuladas que se utilizan para el control de plagas como insectos (insecticidas), hongos (antifúngicos) y mala hierba (herbicidas) a nivel mundial. Estas además de ser DE, tienen la capacidad de bioacumularse en diferentes entornos, se pueden clasificar teniendo en cuenta el organismo que controlan y su composición química (49) como se observa en la tabla a continuación.

Tabla 3. Clasificación de los plaguicidas.

Insecticidas	Fungicidas	Herbicidas
Organoclorados	Dinitrofenoles	Compuestos de cobre
Organofosforados	Triazinas	Compuestos de azufre
Carbamatos	Ácidos tricloroacéticos	Fenoles
Piretroides		

Fuente: Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México. Bejarano F. et al. 2017

2.3.2 Malation

Es un insecticida del grupo de los organofosforados, es de amplio espectro y su degradación en el ambiente es rápida, presenta una baja selectividad, es decir, puede afectar diferentes tipos de organismos incluyendo mamíferos, anfibios e insectos. Un estudio realizado en ratones machos que fueron expuestos al

insecticida, demostró que había alteración significativa a nivel histológico y en la espermatogénesis (50,51).

2.3.3 Cipermetrin

Es un insecticida de la familia de los piretroides que actúa en el sistema nervioso generando alteraciones. Su absorción se da por vía respiratoria y gastrointestinal. En algunos estudios se han detectado concentraciones en el líquido amniótico, suero del cordón umbilical y suero materno de mujeres embarazadas. Dado su carácter lipofílico puede ser retenido por el tejido adiposo teniendo variación en los picos de concentración y alterando los niveles plasmáticos de adrenalina y noradrenalina (52).

2.3.4 Clorpirifos

Es un insecticida organofosforado muy utilizado en Colombia en cultivos de hortalizas, flores y frutas. Es altamente tóxico para la fauna terrestre, acuática y para los seres humanos. Su baja descomposición permite que se pueda almacenar en el suelo hasta por 20 años, generando riesgos para la población ya mencionada. La principal vía de eliminación es la orina tanto en humanos como en ratones y se pueden encontrar en altas concentraciones en el hígado y el riñón (53,54).

2.3.5 Metomilo

Es un insecticida que pertenece al grupo de los carbamatos que actúa por contacto e ingestión, inhibe la acetilcolinesterasa como la gran mayoría de insecticidas afectando la funcionalidad del sistema nervioso, presenta baja persistencia en el suelo y tienen alta solubilidad en el agua con una bioacumulación ligera. En los humanos no causa neurotoxicidad, ni mutagenicidad, pero puede actuar como DE (55).

2.4 Interacción de SAE tras el contacto con la planta

Con el progreso de la agricultura a gran escala, se ha convertido en prioridad mantener la calidad de los cultivos protegiéndolos de diversas especies de plagas potencialmente desfavorables. Las propiedades físicas de un pesticida en particular determinan su modo de acción, dosis, modo de aplicación y la química dinámica ambiental posterior, además varía mucho según su naturaleza química y formulación (56).

Especialmente los pesticidas tienen propiedades fisicoquímicas características como: ser liposolubles, a su vez esto se relaciona con la bioacumulación representando alto riesgo para los sistemas biológicos (57), son muy polares, no se vaporizan fácilmente, son térmicamente lábiles (14).

En las primeras investigaciones, como la realizada por Norris (58), se encontró que el comportamiento del químico al interior, depende de las altas dosis que sean absorbidas por la planta, en consecuencia, se determina la residualidad interna generada.

El proceso del pesticida comprende:

Translocación: las partes involucradas mayoritariamente son el floema (transporta la fotosintetasa) y el xilema (distribuye agua a los tejidos de la planta), aquí se relaciona la circulación del pesticida teniendo en cuenta la solubilidad propia.

Almacenamiento: las cantidades altas se encuentran cerca de punto de absorción, en células adyacentes a las vías de translocación, la planta las absorbe por actividad metabólica sea activa o pasiva.

Metabolismo: la estructura inicial del químico se altera y puede producirse una desintoxicación o activación de diferentes mecanismos los cuales pueden resultar tóxicos, en una parte diferente de la planta.

Exudación: la salida del compuesto varía por su volatilidad, si posee dicha propiedad, será expulsado por los estomas, ubicados en la superficie de la hoja y si, por el contrario, no es volátil, la raíz los envía a la tierra

Teniendo en cuenta estos fundamentos y los avances de la biología celular y molecular, han sido establecidas puntualmente, tres fases que describen el metabolismo de la planta y el plaguicida (6). Inicialmente se describe la transformación, donde la molécula que ingresa es modificada por las enzimas que actúan hidrolizando y reduciendo la molécula inicial disminuyendo la fitotoxicidad mediante las reacciones químicas generadas en el proceso. Luego la conjugación, como el pesticida original se divide, el glutatión y glucosil transferasas se activan, aquí la planta lo trata de convertir en un constituyente natural, como si fuera la glucosa, un aminoácido u otro similar. La fase final comprende el almacenamiento

de los productos de la etapa anterior para que no sean tóxicos, disminuyendo la solubilidad en agua y la reactividad que posean (6). Puede ocurrir 2 sub fases como: almacenamiento en vacuolas, para los conjugados solubles; o en pared celular para conjugados insolubles (59); no permite que se extraigan los residuos (6).

Lo anteriormente expuesto es clave para identificar la ruta del pesticida en condiciones normales. Ahora las alteraciones se dan por la cantidad de químicos utilizados sobre los vegetales, el exceso, principalmente, desencadena en efectos negativos, está dada por cambios en la fisiología propia que inducen al estrés oxidativo (6) lo que se explica a continuación:

1. Inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS 'Reactive Oxygen Species'): es el efecto más conocido de los pesticidas que es producido en varios sitios como mitocondrias, cloroplastos, reacciones fotorespiratorias en peroxisomas y otras oxidasas (60). Las moléculas generadas por este estrés oxidativo van a actuar falsamente en la señalización, como en activación de vías reguladoras, entre otros. Ejemplos de ROS son: O_2 ó H_2O_2 y numerosas formas de proteínas desnaturalizadas o modificadas y ácidos nucleicos. En consecuencia, pueden aparecer otros cambios como presentación de nuevas vías metabólicas, metabolitos de bajo peso molecular acumulados, proteínas especiales emergentes, niveles de fitohormonas alterados y la activación de los mecanismos de desintoxicación.

2. Inhibición de las vías bioquímicas: el pesticida inhibe o altera las reacciones bioquímicas normales e induce estrés a cloroplastos y mitocondrias, provocando la limitación de la fijación de CO_2 por la sobreproducción de radicales superóxidos y H_2O_2 .

De acuerdo a la información expuesta en el estándar internacional del *Codex Alimentarius*, de los múltiples plaguicidas disponibles en el mercado se destacan los fungicidas, herbicidas e insecticidas, por su variedad de formulaciones (61). La categoría de herbicidas dependiendo de los requerimientos del agricultor y su uso, presentan una permanencia en la tierra sobre la cual ha sido expuesta. Se ha documentado que los ingredientes activos de los herbicidas persistentes se mimetizan con las auxinas de las plantas, que son las hormonas responsables del crecimiento y desarrollo (62).

Las zonas acuíferas son afectadas por otros xenoestrógenos como los metales pesados que llegan allí por procesos a cargo del hombre como la minería o uso industrial. Generalmente, ocurre por disposición indebida de las aguas utilizadas, modificando su composición original y adicionalmente siendo cargadas con otros elementos, la distribución final involucra ser vertidas a ríos y permitiendo transportarse sin un aparente riesgo, por falta de tratamiento, llegar al riego de cultivos. Los metales en contacto con las plantas interfieren en la fotosíntesis, la nutrición mineral y la absorción de agua (63,64).

Los metales al igual que los plaguicidas, también pueden participar en procesos intramoleculares de la célula vegetal. Esta situación está sujeta al ambiente en el cual se desarrolle, pues puede absorber metales a los que se encuentre expuesta. La manera como interactúa la planta con el metal está relacionada con el grado de tolerancia: hipotolerantes, tolerantes basales (o no acumuladoras) e hipotolerantes. Generalmente en el reino vegetal son no acumuladoras (65,66).

Cuando la planta hace uso de sus mecanismos para captar los metales requeridos como: hierro, manganeso, sodio, zinc, cobre, molibdeno y níquel, son necesarios en mínimas proporciones (también algunos metaloides como boro y cloro), utiliza quelantes enviados desde la raíz a la rizosfera, permitiendo mejora de solubilidad para su ingreso en la planta. Esto puede conllevar a dos situaciones: la primera, aparentemente ser un mecanismo de defensa, creando complejos metálicos menos solubles que son inadecuados para la planta evitando su ingreso o la segunda, estabilizar la actividad redox de metales inestables y competir con metales que, si son necesarios, permitiendo su paso (65,66).

Cuando logran llegar al espacio intracelular, actúan unos compuestos de bajo peso molecular para que puedan participar en las rutas metabólicas. Luego entran los agentes quelantes de las plantas, como la nicotianamina, ácidos orgánicos como el citrato, el glutatión y las metalotioneínas, estas últimas contienen metales que podrían ser reemplazados por otros, como el níquel o cadmio, y lo hacen debido a su flexibilidad geométrica (65).

Lo anteriormente descrito hace posible la denominada especiación intracelular de los metales, es decir, su ingreso a la planta en el espacio citoplasmático provocando

cambios en el ambiente celular redox, permitiendo que haya inducción de ROS y que para la desintoxicación de metales pesados implique la utilización del glutatión, que se debe recordar es un agente quelante (65).

Según el estudio de la biología molecular vegetal, fisiología y genética la planta *Arabidopsis thaliana* (67), ha permitido dilucidar diferentes características como rutas bioquímicas intracelulares, respuesta a los tipos de estrés abiótico o biótico, entre otros. En una revisión publicada recientemente por Dávila, R. et al describe que aún con los tipos de endocitosis, la mediada por clatrina, es la vía principal, los factores abióticos, como metales, pueden inducir a la endocitosis, ocurre que tras la respuesta al estrés se activan los receptores, que son proteínas de membrana transportadoras para hierro y boro, los cuales son fundamentales para el desarrollo de la planta. Durante este ingreso es posible que den paso a metaloides innecesarios para el desarrollo vegetal, como el níquel y el cadmio; el ingreso de estos metales en bajas concentraciones resulta ser degradado al interior de la célula aunque no se reconoce con claridad la ruta final del elemento (68).

La respuesta de la planta en relación con el metal expuesto depende de la propiedad química y así se determinarán los mecanismos de tolerancia siendo más específicos (66).

2.5 Tipos de sustancias con actividad estrogénica en hortalizas.

Para identificar las sustancias que pueden estar relacionadas con actividad estrogénica, se tiene como base la resolución 2906 de 2007 (69). En dicha norma se presenta un listado en el que se mencionan los productos agrícolas colombianos, seleccionando las hortalizas y los pesticidas que pueden ser usados para el riego, teniendo en cuenta el límite máximo de residuos (LMR). Se relaciona también el registro de pesticidas vigente a diciembre de 2019 (70). En este punto se utilizó la anteriormente mencionada Base de datos de actividad estrogénica (EADB) de manera que se encontró lo siguiente:

Tabla 4. Tipos de plaguicidas usados en las hortalizas que actúan como DE.

Hortaliza	Res. 2906/2007 Tipos de pesticidas: ingrediente activo	compuestos encontrados en la EADB
Cebolla de bulbo	Clorotalonil, Clorpirifos, diazinon, dicloran, ditiocarbamatos, endosulfan, folpet, Malation, metidation, Metomilo (methomyl), procimidona, vinclozolin	Clorotalonil, Clorpirifos, folpet, Malation, Metomilo (methomyl)
Coliflor	Acefato, Clorotalonil, Clorpirifos, dimetoato, endosulfan, fenvalerato, Metomilo, vinclozolin	Clorotalonil, Clorpirifos, dimetoato
Espinaca	Cipermetrin, diazinon, endosulfan, Malation	Cipermetrin, Malation
Hortalizas de hojas	Aldrin, dieldrin, deltametrin, tebuconazole	deltametrin, tebuconazole
Lechugas arropolladas	Cipermetrin, diazinon, diclofluanida, dimetoato, ditiocarbamatos, endosulfan, fenvalerato, folpet, iprodiona, Metomilo, metoxifenoazida, procimidona, vinclozolin	Cipermetrin, dimetoato, folpet, iprodiona, Metomilo
Perejil	Clorotalonil	Clorotalonil

Fuente: Resolución 2906 de 2007: 'Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas, LMR, en alimentos para consumo humano'

2.6 Caracterización del departamento de Boyacá y comportamiento agrícola en hortalizas.

Colombia cuenta con una ubicación geográfica privilegiada que lo convierte en un país apto para producir gran variedad de alimentos de cosecha dada la variabilidad climática. El departamento de Boyacá emplea múltiples extensiones de hectáreas para siembras estratégicas de verduras, hortalizas y frutas. Estas son regadas con las aguas provenientes de los ríos que atraviesan la región de manera que los pueblos utilizan estas aguas como sistemas de riego de cultivos como la papa, cebolla, maíz y legumbres (20).

Este departamento presenta aproximadamente 8 tipos de suelo, los cuales están categorizados en clases agrológicas que van del tipo I a la tipo VIII, teniendo como referencia que las clases I y II son las que poseen las condiciones ideales para la producción agrícola. Según el IGAC (Instituto Geográfico Agustín Codazzi) Boyacá no cuenta con la presencia de estos dos tipos de suelos, por lo cual para la

producción agrícola y ganadera se deben realizar diferentes prácticas de conservación de suelo con diferentes tecnologías que eviten su degradación, disminución de la fertilidad y lo más importante evitar el agotamiento del recurso (1). (Figura 5).

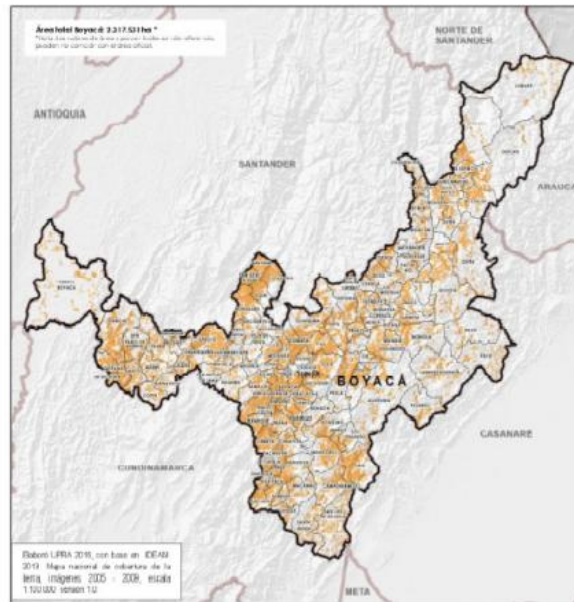


Figura 5. Zonas agrícolas del departamento boyacense

Fuente: Instituto Geográfico Agustín Codazzi IGAC. 2012

Esta zona cuenta con gran variabilidad hídrica y está conformada por diferentes ríos y quebradas que nacen en la cordillera oriental, los cuales pueden ser afluentes directos o corrientes de los ríos Magdalena, Meta y Arauca (1).

En la zona centro uno de los principales cuerpos de agua es el río Chicamocha, el cual nace en los municipios de Tuta y Jordán en Tunja, durante su recorrido abastece a gran parte de los municipios cercanos, la demanda de agua no es solamente para consumo humano sino para agricultura y ganadería. Es importante aclarar que durante el recorrido del Chicamocha se encuentran diferentes fuentes de contaminación como aguas negras generadas por el hombre, residuos hospitalarios e industriales, aportando diferentes sustancias que son nocivas para el hombre y que llegan a éste indirectamente por medio de los diferentes cultivos que se presentan en la zona (1,20).

Tabla 5. Posibles enfermedades relacionadas con la presencia de SAE en el cuerpo.

RELACIÓN CON ENFERMEDADES	PRINCIPAL EFECTO
Daños al sistema reproductor masculino	Disminución de la calidad del semen e infertilidad, malformaciones congénitas del tracto urogenital como criptorquidia (no descenso testicular) e hipospadia (posición anormal de la apertura de la uretra).
Daños al sistema reproductor femenino	Pubertad precoz, reducción de la fecundidad, síndrome de ovarios poliquísticos, reducción de la fertilidad, resultados adversos del embarazo, endometriosis y fibromas uterinos (tumores no cancerosos).
Tumores en órganos hormono dependientes	Cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de tiroides.
Alteraciones en el desarrollo del sistema neurológico	Déficits cognitivos o de conducta (hiperactividad, dificultad de concentración, pérdida de memoria, pérdida auditiva, falta de coordinación motora, dificultades en el aprendizaje, etc.).
Enfermedades metabólicas	Síndrome metabólico, diabetes y obesidad.
Trastornos del sistema neuroinmunológico	Encefalopatía miálgica/ síndrome de fatiga crónica/ síndrome de fatiga post-viral (EM/SFC/SFPV), fibromialgia, y esclerosis múltiple.

Fuente: Sustancias que alteran el sistema hormonal. Romano-Mozo D. 2014.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar la presencia de sustancias con actividad estrogénica en hortalizas obtenidas en el departamento de Boyacá mediante la técnica YES (*Yeast Estrogen Screen*)

3.2 Objetivos específicos

- Comparar los métodos de macerado y arrastre, para la obtención de los extractos a partir de las hortalizas que serán procesadas por la técnica YES.
- Cuantificar en equivalentes de estradiol (EEQ) sustancias con actividad estrogénica en hortalizas del Departamento de Boyacá.

4. Diseño metodológico

4.1 Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo experimental.

4.2 Nivel, enfoque o alcance de la investigación

Descriptivo transversal.

4.3 Universo, población y muestra

El universo de estudio está constituido por sustancias con actividad estrogénica que podían estar presentes en las hortalizas.

La población son las hortalizas pertenecientes al departamento de Boyacá tomadas aleatoriamente en fincas encontradas en la ruta Duitama-Sogamoso, cercanas al Río Chicamocha.

Se realizaron 3 muestreos aleatorios en diferentes localizaciones del departamento de Boyacá, se tomaron un total de 28 hortalizas y se procedió de la siguiente manera:

Tabla 6. Muestreos

Fecha de muestreo	Fecha de procesamiento de la muestra	Número de muestras analizadas
1/oct/2018	3/oct/2018	10
12/feb/2019	14/jun/2019	3
13/may/2019	14/jun/2019	15

Fuente: Construcción propia. Mora D., Niño PA. 2019.

4.4 Hipótesis y variables

4.4.1. Hipótesis

Las sustancias y compuestos de tipo estrogénicos están presentes en varios vegetales cultivados en el departamento de Boyacá. Además, muchos de estos cultivos utilizan fuentes de agua altamente contaminadas y junto con el uso de

pesticidas podrían aportar sustancias químicas que pueden ser metabolizadas por la planta y podrían encontrarse pos-cosecha.

4.4.2. Variables

Dependientes: sustancias con actividad estrogénica en las hortalizas provenientes del departamento de Boyacá.

Independientes: hortalizas pertenecientes a los cultivos ubicados en la ruta Duitama-Sogamoso, en Boyacá.

Controladas: temperatura (28°C) y agitación (100 rpm) para el crecimiento de la levadura.

4.4.3. Indicador

La enzima Beta-galactosidasa producida como estímulo de las SAE en los receptores de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante.

4.5 Materiales y métodos

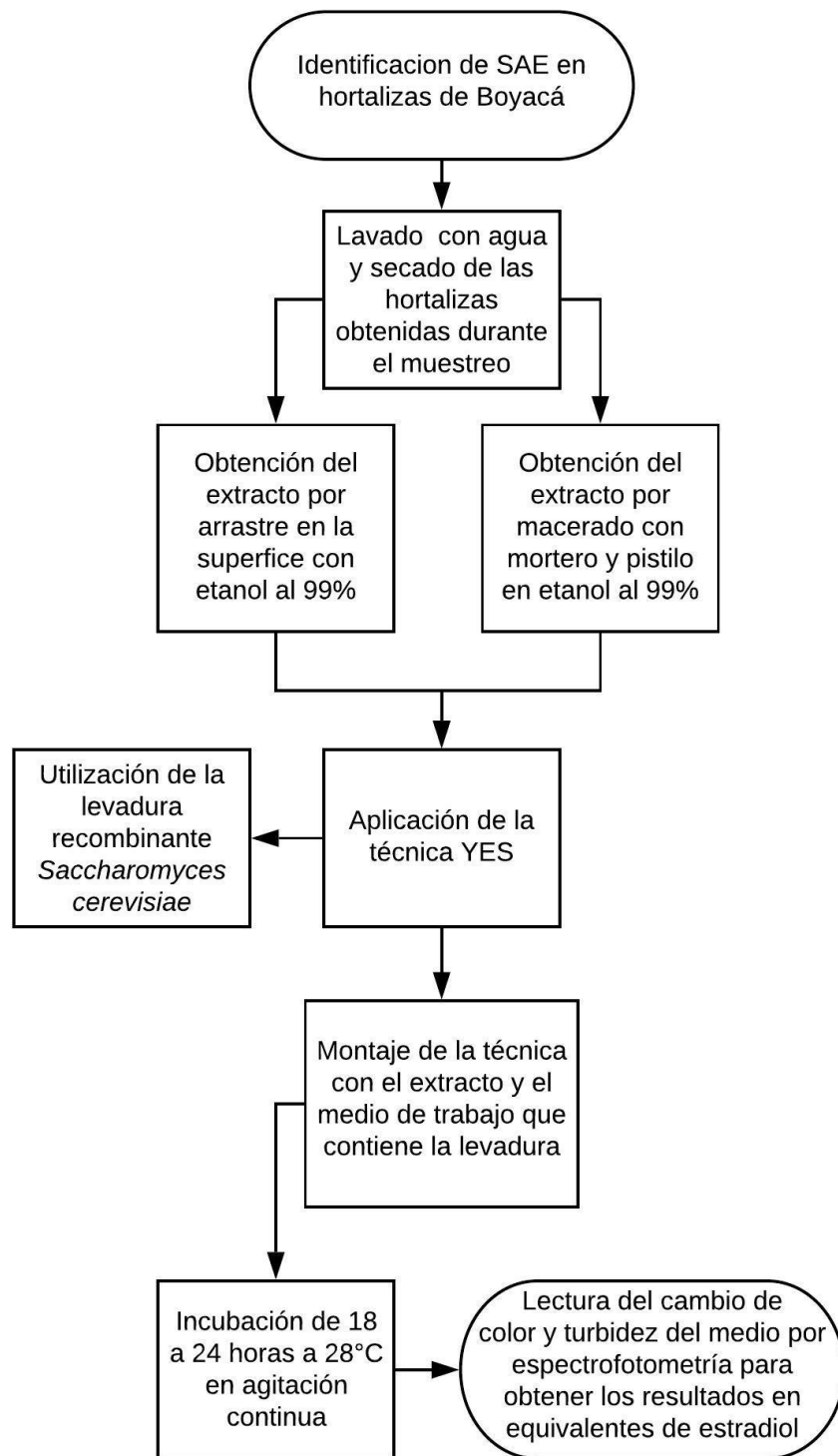


Figura 7. Diagrama de procedimiento.

Hortalizas utilizadas:

Acelga (*Beta vulgaris* var. cicla)

Espinaca (*Spinacia oleracea*)

Cilantro (*Coriandrum sativum*)

Cebolla (*Allium cepa*)

Brócoli (*Brassica oleracea* var. italica)

Coliflor (*Brassica oleracea* var. botrytis)

Repollo morado (*Brassica oleracea* var. capitata f. rubra)

Repollo verde (*Brassica oleracea* var. sabellica)

Lechuga crespita (*Lactuca sativa* var. crispa)

Lechuga lisa (*Lactuca sativa*)

Perejil (*Petroselinum crispum*)

4.5.1 Puntos de muestreo

Tabla 7. Puntos del muestreo N° 1 - (1/oct/2018)

Lugar de recolección (posición geográfica)	Muestra tomada
5° 47' 09' N 73° 04' 56.3' W Paipa, Ramita	Cebolla larga (pequeña)
5°46'27.4"N 72°58'28.5"W Punta Larga	Repollo morado híbrido
5° 47' 12' N 72° 59' 03.7' W ruta Duitama-Sogamoso	Acelga
5°44'38.5' N 72°56'30.8' W	Acelga, Lechuga crespita, Perejil
5°44'38.5' N 72°56'30.8' W	lechuga crespita
5°47'11.9"N 72°59'04.2"W	Repollos morado y verde
5°44'16.3' N 72° 56'19.5' W	Lechuga lisa

Fuente: construcción propia. Mora D., Niño PA. 2019.

Tabla 8. Punto del muestreo N° 2 - (12/feb/2019)

Lugar de recolección	Muestra tomada
Central de Abastos de Sogamoso Calle 11 # 16-52.	Cebolla larga, repollo y acelga

Fuente: construcción propia. Mora D, Niño PA. 2019.

Tabla 9. Punto del muestreo N°3 - (13/may/2019)

Lugar de recolección (posición geográfica)	Muestra tomada
M1 5°44'25.9"N 72°56'00.3"W	Repollo morado, repollo verde, cilantro
M2 5°44'27.0"N 72°56'09.3"W	Cebolla
M3 5°43'36.3"N 72°55'58.6"W	Lechuga crespá
M4 5°44'19.9"N 72°56'06.4"W	Cilantro
M5 5°43'36.6"N 72°55'58.3"W	Lechuga
N (1-7) 5°44'28.8"N 72°56'32.1"W	Brócoli, acelga, perejil, coliflor, cilantro, lechuga, espinaca

Fuente: construcción propia. Mora D, Niño PA. 2019.

4.5.2 Preparación de las muestras para el montaje con la levadura

Las hortalizas recolectadas se lavaron inicialmente con agua de grifo como se procede de manera habitual para el consumo. Luego se secaron con toallas desechables para evitar hacer arrastre del agua de lavado ya que esto podía generar interferencias en la técnica. Posteriormente, se pesaron 100g del alimento y se procedió de dos maneras para realizar las extracciones por dos métodos diferentes:

Arrastre: Se aplicaron 10 ml de etanol absoluto sobre la superficie de cada una de las hortalizas analizadas pasando el etanol varias veces, obteniendo así el extracto

que sería utilizado en el montaje de la técnica. Este extracto se recolectó en frascos y se mantuvo en oscuridad y refrigeración mientras se realizaron los montajes.

Macerado: Con ayuda de mortero y pistilo se maceraron las hortalizas cada una por separado agregando 10 mL de etanol absoluto. El extracto obtenido se recolectó en frascos y se mantuvo en oscuridad y refrigeración mientras se realizaron los montajes.

4.5.3 Técnica *YEAST ESTROGEN SCREEN*

El ensayo realizado por medio de esta técnica comprende el uso de la levadura recombinante *Saccharomyces cerevisiae* como lo describen Routledge, J y Sumpter, J (72). Esta cepa fue manipulada genéticamente por el Dr. John Sumpter en la empresa Glaxo en el Reino Unido, para generar la expresión del receptor que presentan las células humanas cuando detectan sustancias de tipo estrogénico.

Las principales variables que se tuvieron en cuenta para dicha modificación fueron: el conocimiento completo del genoma y la simplicidad para su crecimiento y viabilidad, su ADN fue alterado incorporando una secuencia que codifica para el receptor estrogénico el cual fue aislado de un gen cromosómico humano y un plásmido que contenía un gen reportero (*lac Z*) el cual induce a la producción de la enzima Beta-Galactosidasa.

Este biosensor manipulado genéticamente al entrar en contacto con la SAE se convertirá en un receptor activo, lo que estimulará el proceso transcripcional del gen reportero en este caso para producir la enzima B-Galactosidasa. Este metabolito liberado en el medio actúa sobre un sustrato cromogénico como el CPRG (Cloro Fenol Rojo β -D Galactopiranósido) o el ONPG (*o*-Nitrofenil β -D Galactopiranósido) los cuales producen Galactosa y Clorofenol Rojo ó Galactosa y *o*-Nitrofenol respectivamente. En el presente estudio se utilizó CPRG por lo cual el medio quedó en una tonalidad rojiza y la lectura se realizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 y 630 nm [17].

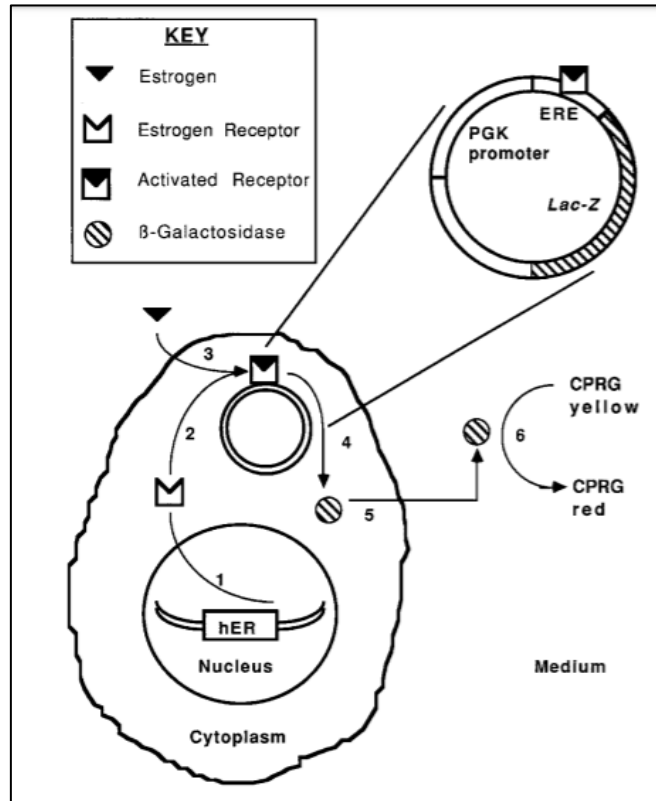


Figura 8. Modificación genética de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Fuente: Environ Toxicol Chem. Routledge, J & Sumpter, J. 1996

4.5.4 Montaje de la técnica

Para el montaje de la técnica se estableció un protocolo de lavado con agua, secado y etanol absoluto a todos los implementos que se utilizaron como el material de vidrio, plástico y demás, esto con el fin de eliminar las sustancias de origen estrogénico que pudieran interferir en la técnica, y dar falsos positivos.

Para la preparación de medio mínimo de crecimiento se utilizó: glucosa, ácido aspártico y treonina, posteriormente se agregó solución de vitaminas y sulfato de cobre previamente filtrado en poro de 0.2 μm . Para el crecimiento de la cepa se realizaron dos inóculos y se incubaron a 28°C en agitación (100 rpm) de 18 a 24 horas. Luego de este tiempo se procedió a realizar la lectura de la densidad óptica la cual se debía ajustar a 1 para la realización del ensayo.

Luego del procedimiento anterior se preparó el medio de trabajo el cual se compone de: 45 ml del medio de crecimiento, 500 μL del inóculo de la levadura ajustada a la densidad óptica 1 y 500 μL de sustrato cromogénico previamente reconstituido en agua desionizada y filtrado en poro de 0.2 μm .

4.5.5 Montaje de las muestras

Para el montaje de las muestras, inicialmente se preparó una solución patrón con 20 mg de 17 β - estradiol en 50 mL de etanol absoluto, luego se tomaron 5,4 mL y se aforan en 100 mL de etanol; posteriormente se realizaron 24 diluciones seriadas tomando 10 μ L de cada una, con volumen final de 100 μ L para construir una curva patrón con diferentes concentraciones: (16875, 8437.5, 4218.75, 2109.38, 1054.70, 527.35, 263.70, 131.85, 66, 33, 16.5, 8.25, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.128 ng/L), luego de obtener la curva se interpolan las densidades ópticas corregidas para obtener el resultado en ng/L en equivalentes de estradiol (EEQ).

En cada pozo se colocaron 10 μ L de la muestra, la cual se dejó evaporar en cabina de flujo laminar para evitar contaminación. Luego se agregaron 200 μ L del medio de trabajo en cada pozo. La incubación se llevó a cabo en agitación a 28°C durante 72 horas. Cada muestra se montó por triplicado para observar su reproducibilidad.

Posterior a las 72 horas se realizó la lectura en el lector de Elisa BioRad a una densidad óptica de 540 nm para la medición colorimétrica dada por el CPRG y a 630 nm para leer la turbidez que proporcionó el crecimiento de la levadura.

Para obtener el valor en equivalentes de estradiol (EEQ) los resultados fueron corregidos por medio de la fórmula:

$$\text{Valor corregido} = \text{DO Mx (540nm)} - [\text{DO Mx (630nm)} - \text{DO Blanco (630nm)}]$$

La curva patrón con 17 β -estradiol se ajustó (función sigmoideal con pendiente variable) utilizando el programa Sigma Plot el cual calcula el valor de EC50 (concentración efectiva media) teniendo en cuenta los resultados de las 20 últimas curvas con 17 β -estradiol.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

A-B Curva patrón con diferentes concentraciones de 17 β -estradiol y etanol
C Control negativo: (Etanol, CPRG y medio de trabajo con la levadura)
D Blanco: (CPRG y medio de trabajo con la levadura)
E-H Muestras: (Extracto obtenido y medio de trabajo con la levadura)

Figura 9. Distribución de la placa de ensayo

5. Resultados

El montaje se realizó en microplacas como se muestra a continuación teniendo en cuenta el siguiente orden: Curva, blanco, control negativo como validación de la prueba y muestras teniendo en cuenta el método de extracción en este caso arrastre con etanol.



Figura 10. Montaje del experimento en la microplaca

A continuación, se presenta la imagen de la microplaca en la cual se montaron los extractos por macerado en etanol de las muestras reflejando el viraje de color.



Figura 11. Reacción colorimétrica

La realización de la técnica YES permitió identificar la presencia de SAE en diferentes productos vegetales provenientes del departamento de Boyacá como se presenta en las figuras 13 y 14.

Para la elaboración de la carta control de la técnica YES con 17 β -estradiol, se realizaron 20 ensayos, en la cual se tienen en cuenta concentraciones entre 16875 ng/L y 0,128 ng/L. Para cada ensayo se calculó la concentración efectiva media EC50 en Excel, con la siguiente fórmula matemática $EC50=10^{(LN(A)/-B)}$, con los resultados se obtuvo el promedio, el límite superior (106 ng/L) y el inferior (47 ng/L) con el fin de definir el intervalo de variación en el que se encuentra la EC50.

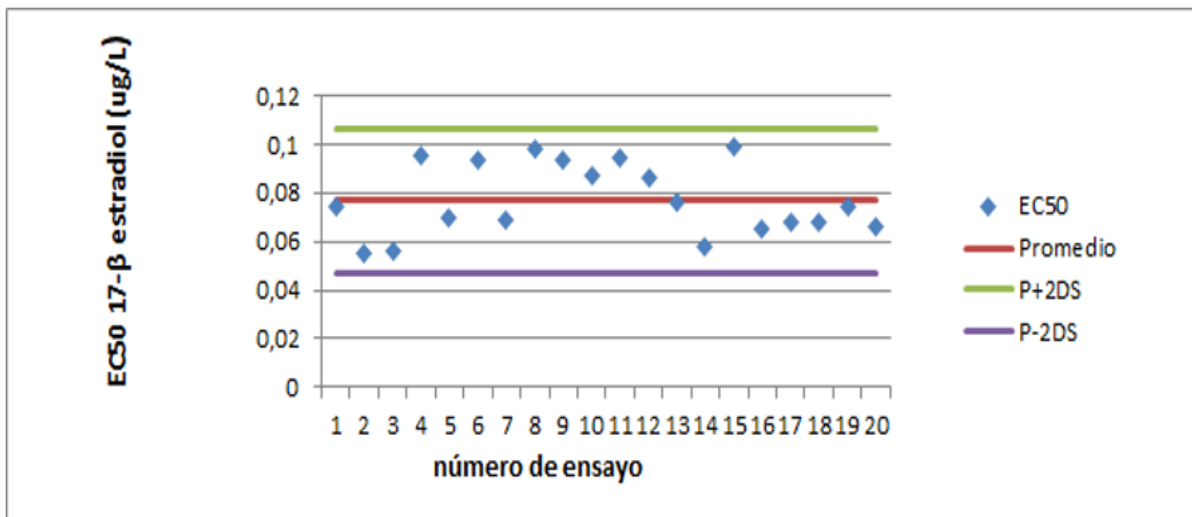


Figura 12. Carta control de la técnica YES con 17 β-estradiol.

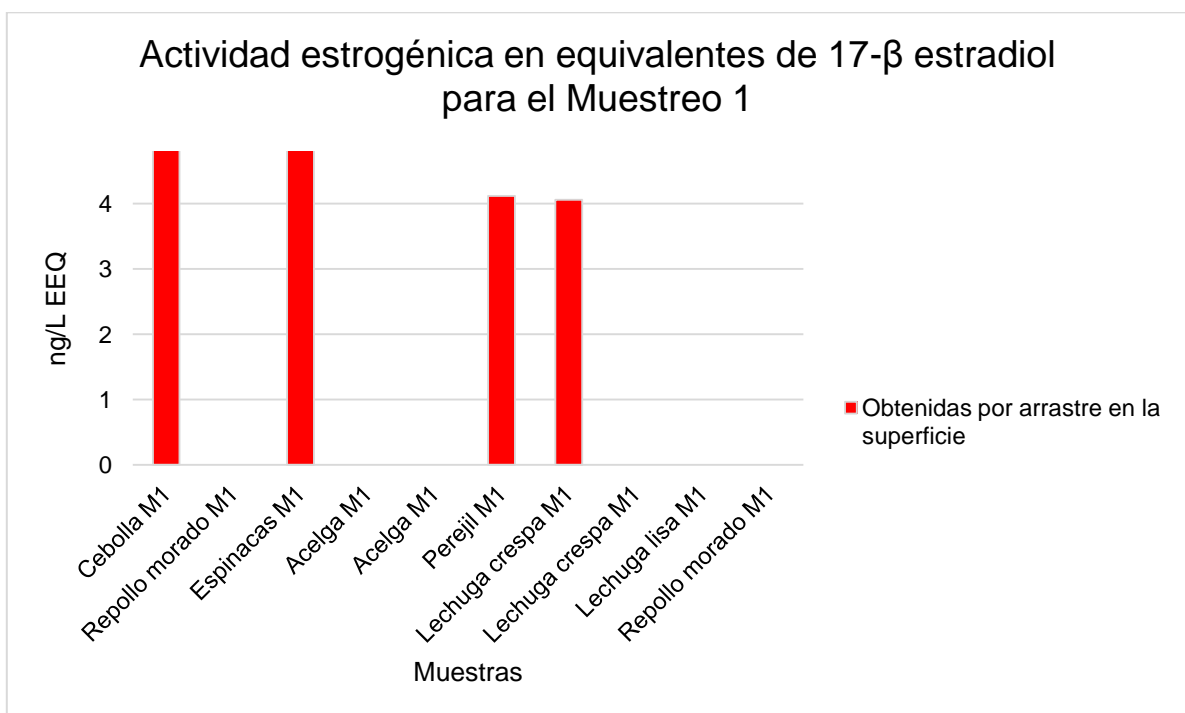


Figura 13. Resultados muestreo 1

En el muestreo 1 (ver anexo 4), se implementó únicamente el arrastre de superficie con el uso del etanol, donde se evidenció que las muestras: cebolla M1, espinacas M1, perejil M1 y lechuga M1, alcanzaron una lectura mayor o igual a 4 ng/L EEQ, lo que indica detección de actividad estrogénica por parte de levadura. Las muestras restantes son menores a 4 ng/L EEQ y no se detecta la actividad estrogénica.

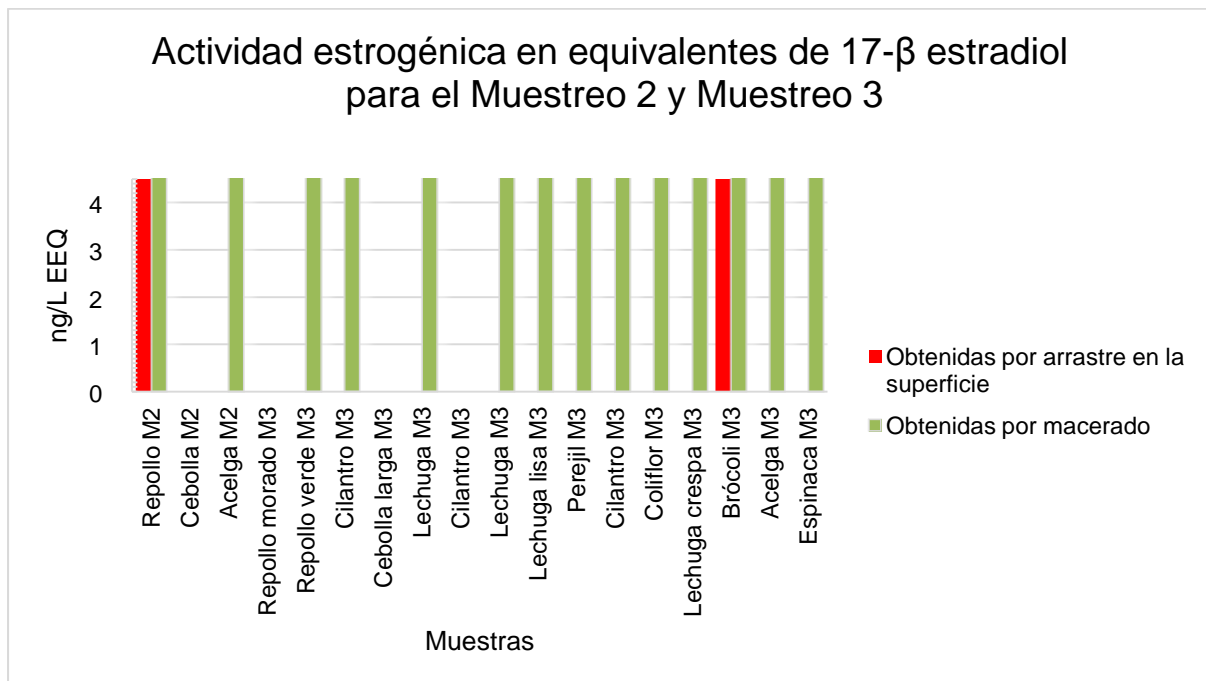


Figura 14. Resultados muestreo 2 y 3

Para los muestreos 2 y 3 (ver anexo 5), se utilizaron dos técnicas de extracción, se logró evidenciar que en las muestras de repollo M2 y brócoli M3, mostraron concentraciones mayores o iguales a 4 ng/L EEQ, tanto en el arrastre realizado con etanol en la superficie de la planta como en el extracto obtenido por macerado se detectaron SAE. La mayoría de los extractos obtenidos por macerado se cuantificó y se evidenció la presencia de SAE. Finalmente, las muestras: cebolla M2, repollo morado M3, cebolla larga M3 y cilantro M3, no se detectó actividad estrogénica pues los valores fueron menores a 4 ng/L EEQ.

Como se mencionó en la realización de la técnica, se utilizaron dos métodos de extracción, los cuales presentaron variación, siendo los extractos obtenidos por macerado las muestras con mayor presencia de SAE como se muestra en la figura 15.

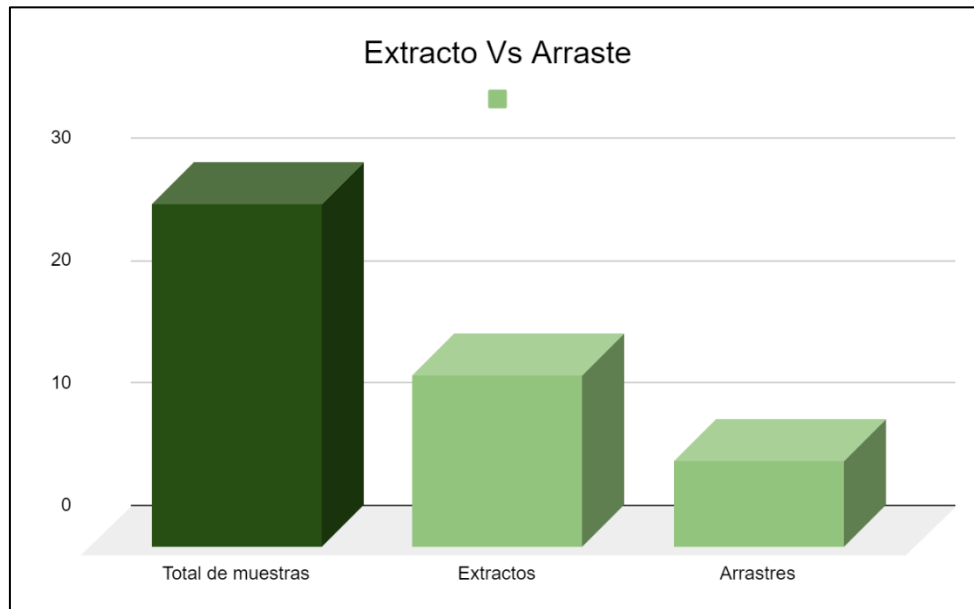


Figura 15. Extractos Vs arrastres

6. Discusión

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos de la actividad estrogénica se infiere que las SAE están presentes en algunas de las hortalizas provenientes de puntos de recolección aleatorios del departamento de Boyacá y que la técnica utilizada como tamizaje para esta identificación fue efectiva.

Las hortalizas obtenidas de los muestreos realizados, se sometieron a la técnica de extracción por medio de arrastre con etanol en la superficie de la planta (ver figura 13) como en el estudio realizado por Aguirre, C en 2015 (73), en el cual se obtuvieron 4 con presencia de SAE, 2 espinacas, acelga y tomate, de 48 muestras (entre frutas y hortalizas). Lo anterior se relaciona con el presente trabajo donde se obtuvieron 6 muestras de las 28: cebolla M1, espinacas M1, lechuga crespa M1, perejil, M1 repollo M2 y brócoli M3, en las que se detectó actividad estrogénica mayor o igual a 4 ng/L EEQ. Esto puede estar relacionado con la composición externa de las hojas de la planta, las cuales en la superficie presentan una capa de cera denominada cutícula, que está conformada por una matriz de cutina y ceras solubles. La cutícula no es una capa homogénea y es altamente lipofílica en la superficie externa e hidrofílica en la interna (74). De acuerdo con Devine et al (75) en 1993 la cutícula puede describirse, como una esponja compuesta de regiones polares y no polares discontinuas. Teniendo en cuenta lo anterior, las sustancias con actividad estrogénica se moverían a través de estos canales o discontinuidades de la cutícula, en función de sus propiedades fisicoquímicas.

Para los muestreos 2 y 3 (ver figura 14) en los que se implementó la técnica de extracción por macerado se detectó actividad estrogénica en las muestras de repollo M2, acelga M2, repollo verde M3, cilantro M3, lechuga M3, lechuga lisa M3, perejil M3, cilantro M3, coliflor M3, lechuga crespa M3, brócoli M3, acelga M3 y espinaca M3. Estos resultados se pueden asociar al estudio de Dubey G et al en 2016, en el cual explica la actividad metabólica normal de un pesticida en la planta, ingresando al sistema vascular vegetal desencadenando diferentes procesos como la transformación, en el que actúan diferentes enzimas hidrolizando y reduciendo la molécula inicial, luego con la molécula transformada ocurre la conjugación, donde la

planta lo trata de convertir en un constituyente natural, como si fuera la glucosa, un aminoácido u otro similar; el almacenamiento, finalmente, ocasiona la bioacumulación de los productos de la etapa anterior como conjugados insolubles que se acumulan en la pared celular y permanecen en planta como residuos (6). La composición del plaguicida juega un papel fundamental dado que puede ser absorbido por las diferentes partes de la planta ya sea la hoja, el tallo o la raíz (58). En el estudio de González-Rodríguez, R et al, en 2008, realizaron un análisis de insecticidas y fungicidas en extractos de hortalizas de hoja como: lechuga, acelga y espinaca, se detectaron plaguicidas como Cipermetrina (insecticida) con mayor concentración en acelgas y el Tebuconazol (fungicida) principalmente en las lechugas (76). Este hallazgo se puede correlacionar según los resultados, con la detección de SAE en las muestras obtenidas por macerado en plantas de hoja. Es importante mencionar la eficiencia del uso de los extractos de hortalizas para la identificación de las SAE, como se realizó en un estudio en África por Mutengw et al (22) en 2016, se identificó en el extracto de frutas y verduras de consumo local 74 tipos de plaguicidas diferentes usados en el sector.

Otro factor al que se puede atribuir la presencia de SAE en las muestras analizadas, son las aguas de riego utilizadas, por su carga con sustancias exógenas, como lo describió Manrique F et al (2006) se evidenció que desde la cuenca alta y durante todo el recorrido el Río Chicamocha está expuesto a contaminación por múltiples desechos antropogénicos que no son controlados por entes gubernamentales (20). En un análisis más reciente elaborado por Vergara y Rodríguez (2015), se encontró plomo y mercurio en peces de la cuenca alta del Río Chicamocha, dichos metales tienen actividad estrogénica y además son bioacumulables (21). Los xenoestrógenos como los metales y pesticidas (además de otros QDE), están presentes en las aguas residuales y representan un riesgo para los cultivos. Los efectos en las plantas que ha descrito la investigación científica apuntan a la inhibición de procesos fisiológicos importantes como la afectación de actividades enzimáticas, alterando la fotosíntesis y otras alteraciones en estudio (64).

Durante los recorridos de muestreo se pudo evidenciar que, por la cercanía del Río Chicamocha a las múltiples fincas productoras, la mayoría tiene instalaciones de tuberías, que se conectan directamente del río, sin ningún tipo de tratamiento previo

para el uso en los campos como fuente riego permanente por los requerimientos de agua para los cultivos. Según un estudio de Nasu et al (77) realizado en Japón, las aguas residuales sin tratamiento están altamente cargadas con SAE, ellos lograron demostrar que posterior al tratamiento su concentración disminuye, lo que puede ser un factor a tener en cuenta en el momento de la utilización de las diferentes vertientes hidrográficas evitando la contaminación de las hortalizas y así mismo la afectación en el cuerpo humano.

Boyacá cuenta con diferentes fuentes de agua, que son utilizadas para el abastecimiento del riego en los cultivos de producción hortícola, en las cuales el Lago de Tota, es considerado el cuerpo de agua natural más aprovechable por su extensión, según un estudio en 2013 publicado por Mojica y Guerrero, se demostró la presencia de plaguicidas como Malatión, Tebuconazol y Clorotalonil en aguas superficiales que con el tiempo tienden a sedimentarse y bioacumularse a largo plazo afectando a la flora y fauna nativa (78).

Teniendo en cuenta el uso de fuentes hídricas, el posterior riego con agua contaminada en los cultivos genera el movimiento del plaguicida y las SAE en la tierra las cuales pueden llegar hasta la raíz e interactuar con la planta, permitiendo la activación del metabolismo. Dicho movimiento o grado de lixiviación está influido por las características fisicoquímicas del suelo, solubilidad del producto, frecuencia e intensidad de la lluvia y la naturaleza química de los compuestos utilizados (79).

Las muestras que no presentaron actividad estrogénica como: repollo morado M1, acelga M1, acelga M1, lechuga crespa M1, lechuga lisa M1, repollo morado M1, cebolla M2, repollo morado M3, cebolla larga M3 y cilantro M3, puede estar relacionado a que la técnica está limitada por el rango mínimo de detección de la levadura (4 ng/L EEQ) y se debe usar otra metodología para evaluar los diferentes SAE.

El presente estudio se realizó como una prueba de tamizaje para la detección de SAE en hortalizas del departamento de Boyacá. Se deberán realizar pruebas más específicas como la cromatografía líquida y la espectrometría de masas que logran la identificación de las sustancias que son las responsables de la disrupción endocrina, como se determinó en el estudio que realizó Huérfano Barco et al (80),

en el 2018, en el cual se propuso un protocolo para la identificación de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas, mediante el uso de la cromatografía de gases que se usó para la separación de los diferentes componentes y el espectrofotómetro de masas para la identificación de las posibles sustancias en estudio, teniendo en cuenta diferentes patrones de plaguicidas con una pureza superior al 95%. Se identificaron residuos de sustancias como Clorpirifos, Pirimetanil, Diazinon, Fentoato. Además, esta técnica también permite la identificación de tensoactivos alquilfenólicos y productos farmacéuticos teniendo en cuenta protocolos alternativos para la extracción y purificación de los extractos que poseen estas sustancias en los ambientes que se propician para la bioacumulación de estas (81).

Para finalizar, se debe reconocer que el lavado que se realiza rutinariamente para el posterior consumo de este grupo alimenticio no permite la eliminación de las SAE, dado que estas por tener un carácter lipofílico no son arrastradas de la superficie por el agua con la que se realiza la limpieza.

7. Conclusiones

Considerando que se implementaron dos formas diferentes de extracción se determinó que la más efectiva fue la maceración, ya que en comparación con la técnica de arrastre en la superficie el número de muestras que presentaron actividad estrogénica fue menor.

Mediante la técnica YES se obtuvieron resultados cuantitativos y cualitativos en los extractos obtenidos de las hortalizas, teniendo en cuenta que aquellos mayores o iguales a 4 ng/L EEQ, presentaron actividad estrogénica y en las menores de 4 ng/L EEQ no se detectó actividad estrogénica.

8. Recomendaciones

Teniendo en cuenta los resultados se hacen las siguientes recomendaciones:

- Posterior a la aplicación de la técnica YES como tamizaje, se recomienda aplicar métodos como cromatografía de gases y espectrofotometría de masas para determinar específicamente las sustancias que actúan como disruptor endocrino.
- A nivel departamental se deben tomar acciones con el fin de disminuir la contaminación en las fuentes hídricas que son utilizadas como agua de riego en los cultivos aledaños.
- A nivel nacional se deberían establecer normativas relacionadas que regulen la presencia de disruptores endocrinos, teniendo como referencia bases de datos como por ejemplo, la EADB de la FDA.

ANEXO 1: Preparación y almacenamiento del medio de crecimiento

MEDIO DE CRECIMIENTO PARA LA LEVADURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EMPLEADA EN LA TÉCNICA <i>Yeast Estrogen Screen</i>.					
MEDIO MÍNIMO ESENCIAL (pH 7.1) ↓ Utilizar agua destilada desionizada	900 ml Medio Mínimo Esencial	400 ml Medio Mínimo Esencial	200 ml Medio Mínimo Esencial	50 ml Medio Mínimo Esencial	OBSERVACIONES Y ALMACENAMIENTO
KH ₂ PO ₄	13,61 gr	5,44 gr	2,72 gr	0,6805 gr	Esterilizar a 121°C y almacenar a temperatura ambiente
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,95 gr	0,78 gr	0,39 gr	0,099 gr	
KOH	4,2 gr	1,68 gr	0,84 gr	0,210 gr	
MgSO ₄	0,2 gr	0,08 gr	0,04 gr	0,010 gr	
Solución de Fe(SO ₂) ₃ (Se mezclan 4 mg de Fe(SO ₄) ₃ y 5 ml de agua destilada)	1 mL	0,4 mL	0,2 mL	0,050 mL	
Leucina	50 mg	20 mg	10 mg	2,5 mg	
Histidina	50 mg	20 mg	10 mg	2,5 mg	
Adenina	50 mg	20 mg	10 mg	2,5 mg	
Arginina	20 mg	8 mg	4 mg	1 mg	
Metionina	20 mg	8 mg	4 mg	1 mg	
Tirosina	20 mg	12 mg	6 mg	1,5 mg	
Isoleucina	30 mg	12 mg	6 mg	1,5 mg	
Lisina	30 mg	12 mg	6 mg	1,5 mg	
Fenilalanina	25 mg	10 mg	5 mg	1,25 gr	

Ácido Glutámico	100 mg	40 mg	20 mg	5 mg	
Valina	150 mg	60 mg	30 mg	7,5 mg	
Serina	375 mg	150mg	75 mg	18,75 mg	

COMPLEMENTOS QUE SE ADICIONAN AL MEDIO MÍNIMO ESENCIAL					
Complemento Adicional	900 ml Medio Mínimo Esencial	400 ml Medio Mínimo Esencial	200 ml Medio Mínimo Esencial	50 ml Medio Mínimo Esencial	Observaciones y Almacenamiento
Solución De Glucosa (Se realiza en un frasco aparte y se adiciona 1 gr/5 ml)	100 mL (20 gr)	40 mL (8 gr)	20 mL (4 gr)	5 mL (1 gr)	Esterilizar a 121°C y almacenar a temperatura ambiente
Ácido Aspártico (Se realiza en un frasco aparte y se adicionan 4 mg/ml)	25 mL (100 mg)	10 mL (40 mg)	5 mL (20 mg)	1,25 mL (5 mg)	Esterilizar a 121°C y almacenar a temperatura ambiente
Treonina (Se adicionan 24 mg/ml)	8 mL (192 mg)	4 mL (96 mg)	1,6 mL (38 mg)	0,4 mL (9,6 mg)	Esterilizar a 121°C y almacenar a 4°C
CuSO ₄ (5 ml → 25 mg)	2,5 mL	1 mL	0,5 mL	125 µL	Filtrar (0,2µm) y almacenar a temperatura ambiente
SOLUCIÓN DE VITAMINAS QUE SE ADICIONA AL MEDIO MÍNIMO ESENCIAL					
Vitaminas Adicionales	900 ml Medio Mínimo Esencial	400 ml Medio Minino Esencial	200 ml Medio Mínimo Esencial	50 ml Medio Mínimo Esencial	Observaciones

solución de vitaminas	10 ml	4 ml	2 ml	0,5 ml	
para realizar 90 ml de solución de vitaminas:					
tiamina: 4 mg					filtrar (0,2µm)
piridoxina: 4 mg					filtrar (0,2µm)
pantotenato: 4 mg					filtrar (0,2µm)
inositol: 20 mg					filtrar (0,2µm)
solución de biotina 10 ml (1mg / 50 ml de H ₂ O)					filtrar (0,2µm)
Es recomendable que cuando se realice la solución de vitaminas se adicione en el mismo momento en el que se prepara el medio de crecimiento.					

Formulación del medio mínimo según Roughtledge y Sumper (1996)

ANEXO 2: Preparación del medio YNB

MEDIO YNB (<i>Yeast Nitrogen Base Without Amino Acid</i>)
4 gr de agar base y 156 mL de agua destilada desionizada (Esterilizar a 121°C)
20 mL de solución de dextrosa 20%
2 mL de solución de Lisina (Filtrar (0,2µm))
2 mL de solución de Histidina (Filtrar (0,2µm))

ANEXO 3: Tabla de densidades ópticas corregidas de las curvas para la carta control.

	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
6	2,673	2,878	2,670	2,618	2,317	2,047	2,004	2,587	2,456	2,528	2,345	2,607	1,799
5	2,805	2,579	2,378	2,356	2,121	1,930	1,754	2,063	1,756	2,064	2,276	2,467	1,795
0	2,850	2,356	2,137	2,287	1,839	1,799	1,765	2,012	1,556	2,126	2,146	2,348	1,920
1	2,721	1,500	1,783	2,138	1,950	1,986	1,863	1,954	1,474	2,072	2,259	2,382	1,937
2	2,754	1,438	1,597	1,746	1,911	1,872	1,745	1,675	1,490	2,271	2,257	2,380	1,730
7	2,523	1,303	1,245	1,303	1,793	1,908	1,683	1,264	1,354	2,261	2,260	2,340	1,669
4	2,219	1,211	1,185	1,218	1,661	1,547	1,578	1,194	1,227	2,019	2,211	2,291	1,607
1	1,807	0,958	0,932	1,045	1,437	1,282	1,317	0,912	1,009	1,747	1,735	1,450	1,479
8	1,209	0,794	0,690	0,864	1,244	1,121	1,119	0,675	0,716	1,043	1,154	1,270	1,286
9	0,893	0,511	0,453	0,637	0,877	0,817	0,647	0,397	0,457	0,688	0,747	0,673	0,938
4	0,673	0,402	0,372	0,512	0,808	0,458	0,397	0,295	0,229	0,483	0,511	0,483	0,648
4	0,381	0,273	0,267	0,304	0,366	0,333	0,247	0,214	0,184	0,385	0,359	0,315	0,439
6	0,238	0,216	0,221	0,240	0,307	0,396	0,376	0,173	0,191	0,290	0,230	0,227	0,314
7	0,211	0,191	0,218	0,185	0,225	0,276	0,244	0,165	0,172	0,135	0,205	0,185	0,232
1	0,234	0,184	0,192	0,176	0,255	0,293	0,288	0,156	0,163	0,119	0,275	0,204	0,206
7	0,195	0,201	0,212	0,178	0,254	0,275	0,288	0,159	0,161	0,128	0,239	0,171	0,200
2	0,194	0,190	0,193	0,192	0,230	0,255	0,229	0,156	0,157	0,289	0,055	0,102	0,179
8	0,176	0,201	0,183	0,204	0,224	0,274	0,207	0,132	0,132	0,082	0,208	0,132	0,218

ANEXO 4. Tabla de resultados del Muestreo 1 (M1)

Actividad estrogénica en equivalentes de 17-β estradiol		
Obtenidas por arrastre de superficie		
Tipo de muestra	DO corregida	Actividad estrogénica ng/L EEQ
Cebolla M1	0,269	13,52
Repollo morado M1	0,192	<4
Espinacas M1	0,44	10,9

Acelga M1	0,199	<4
Acelga M1	0,2	<4
Perejil M1	0,274	4,12
Lechuga crespa M1	0,27	4,06
Lechuga crespa M1	0,177	<4
Lechuga lisa M1	0,189	<4
Repollo morado M1	0,177	<4

INTERPRETACIÓN: ≥4 ng/L: Actividad estrogénica

<4 ng/L: No se detecta actividad estrogénica

ANEXO 5. Tabla de resultados del Muestreo 2 (M2) y Muestreo 3 (M3)

Actividad estrogénica en equivalentes de 17-β estradiol					
Obtenidas por arrastre de superficie			Obtenidas por macerado		
Tipo de muestra	DO corregida	Actividad estrogénica ng/L EEQ	Tipo de muestra	DO corregida	Actividad estrogénica ng/L EEQ
Repollo M2	0,304	7,531	Repollo extracto M2	0,773	35,429
Cebolla M2	0,237	<4	Cebolla extracto M2	0,246	<4
Acelga M2	0,177	<4	Acelga extracto M2	1,259	205,82

Repollo morado M3	0,177	<4	repollo morado extracto M3	0,158	<4
Repollo verde M3	0,188	<4	Repollo verde extracto M3	0,513	16,246
Cilantro M3	0,189	<4	Cilantro extracto M3	0,357	8,844
Cebolla larga M3	0,181	<4	Cebolla larga extracto M3	0,22	<4
Lechuga M3	0,174	<4	Lechuga extracto M3	0,707	32,404
Cilantro M3	0,152	<4	Cilantro extracto M3	0,195	<4
Lechuga M3	0,158	<4	Lechuga extracto M3	1,782	540,7
Lechuga lisa M3	0,156	<4	Lechuga lisa extracto M3	1,758	533,41
Perejil M3	0,158	<4	Perejil extracto M3	1,325	134,69
Cilantro M3	0,191	<4	Cilantro extracto M3	1,166	73,291
Coliflor M3	0,228	<4	Coliflor extracto M3	0,8	36,66
Lechuga crespa M3	0,241	<4	Lechuga crespa extracto M3	1,636	267,43
Brócoli M3	0,431	13,649	Brócoli extracto M3	1,2	121,98
Acelga M3	0,159	<4	Acelga extracto M3	1,829	1031,02
Espinaca M3	0,191	<4	Espinaca extracto M3	0,731	33,5

INTERPRETACIÓN: ≥4 ng/L: Actividad estrogénica

<4 ng/L: No se detecta actividad estrogénica

9. Bibliografía

1. Gobernación de Boyacá. Ordenamiento territorial departamental de Boyacá: Productividad sector agropecuario [Internet]. 2018 [cited 2020 Feb 27]. 1–61 p. Available from: <http://www.dapboyaca.gov.co/wp-content/uploads/2018/09/PRODUCTIVIDAD-SECTOR-AGROPECUARIO.pdf>
2. European Commission. Which substances are of concern? [Internet]. Vol. 3, ec.europa.eu. 2019 [cited 2019 Sep 17]. p. 3–5. Available from: https://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/strategy/substances_en.htm
3. Bergman Å, Heindel J, Jobling S, Kidd K, Zoeller RT. State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012: an assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme and World Health Organization [Internet]. World Health Organization. 2013 [cited 2019 Oct 6]. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427412001221>
4. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* [Internet]. 2009 Jun [cited 2020 Feb 18];30(4):293–342. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/article->

- lookup/doi/10.1210/er.2009-0002
5. González AR, Alfaro Velásquez JM. New endocrine disruptors: their importance in pediatric population. *Iatreia* [Internet]. 2005 [cited 2019 Sep 21];18(4):446–56. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-07932005000400007&lng=en&nrm=iso&tlng=
 6. Dubey G, Mishra N, Prasad SM. Metabolic responses of pesticide in plants and their ameliorative processes [Internet]. Singh A, Prasad SM, Singh RP, editors. *Plant Responses to Xenobiotics*. Singapore: Springer Singapore; 2016 [cited 2019 Oct 26]. 1–346 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-2860-1>
 7. American Nutrition Association. Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection [Internet]. American Nutrition Association. American Nutrition Association; 1991 [cited 2019 May 20]. Available from: <http://americannutritionassociation.org/newsletter/chemically-induced-alterations-sexual-functional-development-wildlifehuman-connection>
 8. Schardt D. How to avoid pesticides. *Nutr Action Heal Lett* [Internet]. 1997 [cited 2019 Jun 13];24(5):4–7. Available from: <https://ezproxy.unicolmayor.edu.co:2136/docview/204127019/fulltextPDF/39C8CBAFBD5B4447PQ/1?accountid=50438>
 9. Bolger R, Wiese TE, Ervin K, Nestich S, Checovich W. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ Health Perspect* [Internet]. 1998 Sep [cited 2019 May 20];106(9):551–7. Available from: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.98106551>
 10. Nishihara T, Nishikawa J, Kanayama T, Dakeyama F, Saito K, Imagawa M, et al. Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay. *J Heal Sci* [Internet]. 2000 [cited 2019 Jun 13];46(4):282–98. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/jhs1999/46.282?from=CrossRef>
 11. Ward WE, Thompson LU. Dietary Estrogens of Plant and Fungal Origin: Occurrence and Exposure. In: *Endocrine Disruptors – Part I* [Internet]. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2001 [cited 2019 Jun 13]. p. 101–28. Available from: http://link.springer.com/10.1007/10690734_6
 12. Mueller SO. Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2004 Feb 1 [cited 2019 Jun 13];378(3):582–7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-003-2238-x>
 13. Sugiyama S, Shimada N, Miyoshi H, Yamauchi K. Detection of Thyroid System–Disrupting Chemicals Using in Vitro and in Vivo Screening Assays in *Xenopus laevis*. *Toxicol Sci* [Internet]. 2005 Dec 1 [cited 2019 Jun 20];88(2):367–74. Available from: <http://academic.oup.com/toxsci/article/88/2/367/1691250/Detection-of-Thyroid-SystemDisrupting-Chemicals>
 14. Wylie P, Zweigenbaum J, Churley M, Meng C-K, Zhe C. Comprehensive Screening , Confirmation , and Quantification of Organic Pesticides in Foods by The global focus on keeping food safe has intensified , resulting in major changes in the. *Curr trends Mass Spectrom* [Internet]. 2008 [cited 2019 Jun 20];11(November):33–8. Available from: https://www.agilent.com/cs/library/articlereprints/public/rep91038_ctms_final_LR.pdf
 15. Lundgren MS, Novak PJ. Quantification of phytoestrogens in industrial waste

- streams. *Environ Toxicol Chem* [Internet]. 2009 [cited 2019 Jun 20];28(11):2318. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1897/09-029.1>
16. Mnif W, Hassine AIH, Bouaziz A, Bartegi A, Thomas O, Roig B. Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2011 Jun 17 [cited 2019 Jun 21];8(6):2265–303. Available from: <http://www.mdpi.com/1660-4601/8/6/2265>
 17. Gonzalez G JP., Pacheco B, Visaus F, Ayla K. Movilidad de pesticidas en aguas superficiales empleadas en agricultura y riesgos para la salud humana en la zona centro del Departamento de Boyacá - Colombia. *L'esprit Ingénieux* [Internet]. 2012 [cited 2019 Nov 7];3:155–65. Available from: <http://revistas.ustatunja.edu.co/index.php/lingenieux/article/view/132>
 18. Cifuentes Prieto P. Implementacion de la tecnica Yeast Estrogen Screen para evaluar la presencia de sustancias estrogenicas en agua [Internet]. Universidad Nacional de Colombia; 2013 [cited 2019 Jul 2]. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/10699/>
 19. Pérez MA, Navarro H, Miranda E. Residuos de plaguicidas en hortalizas: Problemática y riesgo en México. *Rev Int Contam Ambient* [Internet]. 2013 [cited 2019 Oct 17];29(SPEC.ISSUE):45–64. Available from: <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/41423>
 20. Manrique F, Manrique D, Manrique R, Tejedor M. Contaminación de la cuenca alta del río Chicamocha y algunas aproximaciones sobre la salud humana. *Salud Hist.sanind on-line* [Internet]. 2006 [cited 2019 Oct 7];1(1):10–22. Available from: https://www.researchgate.net/publication/235947866_Contaminacion_de_la_Cuenca_alta_del_rio_Chicamocha_y_Algunas_aproximaciones_sobre_la_salud_humana
 21. Vergara Estupiñán EJ, Rodríguez Africano PE. Presencia de mercurio, plomo y cobre en tejidos de *Oreochromis niloticus*: sector de la cuenca alta del Río Chicamocha, vereda Volcán, Paipa, Colombia. *Prod + Limpia* [Internet]. 2015 [cited 2019 Nov 7];10(2):114–26. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1909-04552015000200011&script=sci_abstract&tlng=es
 22. Mutengwe MT, Chidamba L, Korsten L. Monitoring Pesticide Residues in Fruits and Vegetables at Two of the Biggest Fresh Produce Markets in Africa. *J Food Prot* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2019 Oct 9];79(11):1938–45. Available from: <https://meridian.allenpress.com/jfp/article/79/11/1938/174288/Monitoring-Pesticide-Residues-in-Fruits-and>
 23. Ferré DM, Quero AAM, Hernández AF, Hynes V, Tornello MJ, Lüders C, et al. Potential risks of dietary exposure to chlorpyrifos and cypermethrin from their use in fruit/vegetable crops and beef cattle productions. *Environ Monit Assess* [Internet]. 2018 [cited 2020 Jan 27];190(5):292. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6647-x>
 24. Lizcano F, Duque JJ. Hormonas, receptores y control endocrino. In: Jacome Roca A, editor. *Fisiología endocrina* [Internet]. 4a ed. Bogota D.C.: manual moderno; 2017 [cited 2020 Apr 23]. p. 1–43. Available from: https://www.researchgate.net/publication/320387179_Hormonas_receptor_y_control_endocrino
 25. Almaraz Nieves A, Prieto GA, Valdez Rodríguez H, Camacho Arroyo I, Saqui Salces M, Villamar Cruz O, et al. ¿Cómo actúan las hormonas esteroides?

- Educ Química [Internet]. 2018 Aug 25 [cited 2020 Feb 12];14(4):196. Available from: <http://revistas.unam.mx/index.php/req/article/view/66226>
26. Herráez A. Esteroides [Internet]. biomodel.uah.es. 2020 [cited 2020 Jan 20]. Available from: <http://biomodel.uah.es/metab/lipidos/esteroides.htm>
 27. King MW. Introducción a las Hormonas Esteroides [Internet]. Themedicalbiochemistrypage.org. 2017 [cited 2020 Feb 19]. Available from: <https://themedicalbiochemistrypage.org/es/steroid-hormones-sp.php#intro>
 28. Scaglia H, Chichizola C, Franconi MC, Ludueña B, Mastandrea C, Scaglia J. Disruptores endocrinos. Composición química, mecanismo de acción y efecto sobre el eje reproductivo. Reproduccion [Internet]. 2009 [cited 2019 Oct 17];24(2):74–86. Available from: http://www.samer.org.ar/revista/numeros/2009/vol24_n2/6_disruptores_endocrinos.pdf
 29. Fajardo Puig ME, Rodríguez Reyes O, Rodríguez Bacallao A. Las hormonas sexuales femeninas y su relación con la enfermedad periodontal [Internet]. Vol. 21, MEDISAN. Santiago de Cuba; 2017 [cited 2020 Apr 23]. p. 111–6. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/san/v21n1/san13211.pdf>
 30. Locia Espinoza J, Hernández Aguilar M, Aranda Abreu G, Rojas Durán F, Manzo Denes J, Coria Ávila G, et al. El papel de los estrógenos y sus receptores en la preevncion y promoción de enfermedades proliferativas de la glándula prostática. Neurobiología [Internet]. 2013 [cited 2020 Jan 13];4(8):1–24. Available from: [https://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2013/8/Locia/Locia-Espinoza4\(8\)300813.pdf](https://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2013/8/Locia/Locia-Espinoza4(8)300813.pdf)
 31. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC. Production and Actions of Estrogens. N Engl J Med [Internet]. 2002 Jan 31 [cited 2020 Jan 19];346(5):340–52. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra000471>
 32. Knoblovits P. Rol de los estrógenos en el varón. RAEM [Internet]. 2003 [cited 2020 Jan 20];40:57–9. Available from: <http://www.raem.org.ar/numeros/2003-vol40/suplemento/vol40-sup-025-esp.html>
 33. Marcos Becerro J. Las hormonas esteroideas sexuales, el envejecimiento y el ejercicio. Rev Andaluza Med del Deport [Internet]. 2008 [cited 2020 Feb 20];1(1):22–36. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=323327654005>
 34. Zimmermann LC, Gómez NE, Sabella SL, Traverso PM. Receptores fisiologicos [Internet]. 1st ed. Rosario; 2018 [cited 2020 Mar 23]. 1–40 p. Available from: http://rephip.unr.edu.ar/xmlui/bitstream/handle/2133/16113/Receptores_fisiológicos.pdf?sequence=3&isAllowed=y
 35. Buritica SM. Metales pesados, plaguicidas y efectos de los disruptores endocrinos en la salud humana y animal. In: Posada S, editor. Medicina de la conservación y enfermedades de la fauna silvestre [Internet]. Medellín; 2019 [cited 2019 Sep 10]. p. 70–80. Available from: <https://revistas.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/view/338530>
 36. Pérez-Rivero JJ, Aguilar-Setién Á, Villa-Godoy A, Serrano H. Relación entre estructura y función de receptores para hormonas esteroidales: Receptores estrogénicos. Vet México [Internet]. 2005 [cited 2020 Apr 27];36(4):437–52. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42336406>
 37. Suárez-machín C, Garrido-carralero NA, Guevara-rodríguez CA. Levadura Saccharomyces cerevisiae y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica.

- ICIDCA Sobre los Deriv la Caña Azúcar [Internet]. 2016 [cited 2020 Apr 28];50(1):20–8. Available from: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223148420004.pdf>
38. Coronel C, Valdez Taubas J. La levadura *saccharomyces cerevisiae*: de la cerveza a la biología de sistemas. bitacora Digit [Internet]. 2018 [cited 2020 Apr 28];1(9):1–9. Available from: <https://revistas.psi.unc.edu.ar/index.php/Bitacora/article/view/24262/23644>
 39. Keel K, Miguez D, Soares A, Parodi A. Optimización de una técnica de medida de disrupción endocrina por medio de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes. Rev del Lab Tecnol del Uruguay [Internet]. 2010 [cited 2020 Apr 28];(5):34–8. Available from: <https://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTECH/article/view/60>
 40. Martínez C. Estudio de la proteína de membrana de *Saccharomyces cerevisiae* Rot1 : Importancia de su dominio transmembrana [Internet]. Universitat de Valencia; 2016 [cited 2020 Apr 29]. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/71054185.pdf>
 41. Ecured.cu. Genisteína [Internet]. 2020 [cited 2020 Feb 15]. Available from: <https://www.ecured.cu/Archivo:Genisteína.jpeg>
 42. desinsectador.com. PARATION-FORMULA [Internet]. 2016 [cited 2019 Feb 15]. Available from: <https://desinsectador.com/biocidas-por-grupos/paration-formula/>
 43. Es.123rf.com. Hormonas sexuales fórmula estructural estradiol [Internet]. 2020 [cited 2020 Feb 15]. Available from: https://es.123rf.com/photo_12416061_hormonas-sexuales-fórmula-estructural-estradiol.html
 44. Foodpackagingforum.org. Bisfenol A [Internet]. 2014 [cited 2019 Feb 15]. Available from: <https://www.foodpackagingforum.org/es/envasado-de-alimentos-y-salud/bisfenol-a>
 45. Romano Mozo D. Sustancias que alteran el sistema hormonal [Internet]. Ecologistas en acción. 2014 [cited 2019 Aug 24]. 1–31 p. Available from: https://spip.ecologistasenaccion.org/IMG/pdf/cuaderno-23_alteradores_hormonales.pdf
 46. fda.gov. Accessing EDKB Database [Internet]. FDA. 2018 [cited 2019 Jul 19]. Available from: <https://www.fda.gov/science-research/endocrine-disruptor-knowledge-base/accessing-edkb-database>
 47. Pérez López E, Rodríguez Rodríguez RA. Comparación de dos métodos cromatográficos para determinar clorotalonil en un fungicida comercial. UNED Res J [Internet]. 2019 Dec 1 [cited 2020 Jan 13];11(3):334–44. Available from: <https://revistas.uned.ac.cr/index.php/cuadernos/article/view/2627>
 48. Ruales Flores AM. Estudio de los efectos que produce el fungicida clorotalonil a nivel de segmento anterior del globo ocular en productores de granadilla, provincia de Imbabura, cantón Cotacachi [Internet]. Instituto Tecnológico Cordillera; 2017 [cited 2020 Feb 15]. Available from: <http://www.dspace.cordillera.edu.ec:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3352/33-OPT-17-17-1721063368.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
 49. Bejarano González F, Aguilera Márquez D, Álvarez Solís JD, Arámbula Meraz E, Arellano Aguilar O, Bastidas Bastidas P de J, et al. Los Plaguicidas Altamente Peligrosos en México. In: Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México, AC (RAPAM) [Internet]. 2017 [cited 2020 Feb 15]. p. 351. Available from:

- https://www.researchgate.net/publication/319515704_Los_Plaguicidas_Altamente_Peligrosos_en_Mexico
50. Calderón Ruiz A, Delgado Blas VH, Uc Peraza RG. TOXICIDAD AGUDA DEL MALATION 500® Y TYSON 4E® EN *Capitella* sp. *Rev Int Contam Ambient* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2020 Feb 15];35(3):565–74. Available from: <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/RICA.2019.35.03.04/46870>
 51. Serrano R, Hernandez G, Hung S, Lozano R, Paoli M, Gomez R. Histopatología testicular de ratas BIOU : Wistar expuestas a malatión. *Rev Colomb Endocrinol y Metab* [Internet]. 2019 [cited 2020 Feb 16];6(4):252–9. Available from: <http://revistaendocrino.org/index.php/rcedm/article/view/544/710>
 52. Victorio Muñoz R. Estudio electroencefalográfico de las alteraciones de vigilia y sueño en ratas sometidas a pesticidas [Internet]. Universitat de Valencia; 2017 [cited 2020 Feb 23]. Available from: <https://core.ac.uk/reader/84749680>
 53. Lopera Mesa MM, Peñuela Mesa GA, Domínguez Gual MC, Mejía Zapata GM. Evaluación de la degradación del plaguicida clorpirifos en muestras de suelo utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. *Rev Fac Ing* [Internet]. 2005 [cited 2020 Feb 23];(33):58–69. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43003306>
 54. Morales Vallecilla C, Rodríguez Osorio N, Restrepo Betancur LF, López Córdoba C. Relación entre residuos de clorpirifos en leche y sangre de vacas Holstein y niveles séricos de estradiol y tiroxina - Chlorpyrifos residues in milk and blood in Holstein cows and their relation to estradiol and thyroxin serum levels. *Redvet* [Internet]. 2010 [cited 2020 Feb 23];11(1):177–90. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63613103006>
 55. Alfaro Flores AG, Flores Quiñones GK. influencia del tiempo y la concetracion inicial en la remocion de soluciones ideales del insecticida metomilo utilizando microalga *Chlorella* sp. [Internet]. Universidad nacional de trujillo; 2019 [cited 2020 Feb 23]. Available from: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/14114>
 56. Zacharia JT. Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis [Internet]. Stoytcheva M, editor. *Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis*. Rijeka: InTech; 2011 [cited 2020 Apr 25]. 3–20 p. Available from: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-trends-in-pesticides-analysis>
 57. Narvaez Valderrama JF, Baena Palacio JA, Pérez Molina JF. Persistencia De Plaguicidas En El Ambiente Y Su Ecotoxicidad Una Revisión De Los Procesos De Degradación Natural. *Gestión y Ambient* [Internet]. 2012 [cited 2019 Nov 17];15(3):27–38. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/35839/1/36278-151112-1-PB.pdf>
 58. Norris LA. Behavior of Pesticides in Plants. USDA Forest Service General Technical Report [Internet]. 1974 [cited 2019 Nov 17];6:1–10. Available from: <https://andrewsforest.oregonstate.edu/sites/default/files/lter/pubs/pdf/pub446.pdf>
 59. Sandermann H. Plant metabolism of xenobiotics. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 1992 Feb [cited 2019 Oct 29];17(2):82–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0968000492905076>
 60. Mhamdi A, Van Breusegem F. Reactive oxygen species in plant development. *Development* [Internet]. 2018 [cited 2019 Oct 17];145(15). Available from:

- <https://dev.biologists.org/content/145/15/dev164376>
61. FAO. Clases funcionales del plaguicida [Internet]. FAO. 2019 [cited 2019 Sep 26]. Available from: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/dbs/pestres/functional-classes/es/>
 62. Compostingcouncil. Persistent Herbicides [Internet]. Reston: the united states composting council; 2015 [cited 2019 Sep 13]. p. 1–6. Available from: https://cdn.ymaws.com/www.compostingcouncil.org/resource/resmgr/images/U_SCC-PH-Fact-Sheet-1-for-web.pdf
 63. Jiménez-Suanca SC, Álvaro S. OH, Balaguera-López HE. Fluorescencia como indicador de estrés en *Helianthus annuus* L. Una revisión. *Rev Colomb Ciencias Hortícolas* [Internet]. 2015 Aug 12 [cited 2020 Jan 14];9(1):149. Available from: http://revistas.uptc.edu.co/revistas/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/3753
 64. Srivastava PK, Parihar P, Singh R, Prasad SM. the risk associated with the xenobiotics released through wastewater reuse [Internet]. Singh A, Prasad SM, Singh RP, editors. *Plant Responses to Xenobiotics*. Singapore: Springer Singapore; 2016 [cited 2019 Sep 13]. 1–346 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-10-2860-1>
 65. Viehweger K. How plants cope with heavy metals. *Bot Stud* [Internet]. 2014 [cited 2019 Sep 13];55(1):35. Available from: <https://doi.org/10.1186/1999-3110-55-35>
 66. Azpilicueta CE, Pena LB, Gallego SM. Los metales y las plantas: entre la nutrición y la toxicidad. *Rev Cienc Hoy* [Internet]. 2010 [cited 2019 Sep 29];20(116):2–3. Available from: <http://www.cienciahoy.org.ar/ch/ln/hoy116/Metalesplantas.pdf>
 67. Cuesta C, Cires E. *Arabidopsis thaliana* como organismo modelo en Biología. *Boletín Ciencias Nat del RIDEA* [Internet]. 2014 [cited 2019 Sep 26];52:175–8. Available from: <https://www.coursehero.com/file/39501827/56ArabidopsisthalianacomoomodelomodeloenBiologapdf/>
 68. Dávila-delgado R, Gómez-méndez MF, Vera-estrella R, Sánchez-lópez R. Endocitosis En Plantas (Parte I): Inducida Por Factores Abioticos , Bioticos Y Hormonas *. *Rev Educ Bioquim* [Internet]. 2019 [cited 2019 Sep 20];38(1):14–22. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2019/reb191c.pdf>
 69. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y de la Protección Social. Resolución Número 2906 de 2007 [Internet]. República de Colombia colombia; 2007 p. 50. Available from: <https://www.invima.gov.co/images/stories/resoluciones/resolucion2906de2007plaguicidasalimentos.pdf>
 70. ICA. Registros plaguicidas - Diciembre de 2019 [Internet]. 2020 [cited 2019 Oct 15]. Available from: <https://www.ica.gov.co/getdoc/d3612ebf-a5a6-4702-8d4b-8427c1cdaeb1/registrosnacionales-pqua-15-04-09.aspx>
 71. Asohofrucol. Balance del sector hortifrutícola 2019. Frutas & hortalizas [Internet]. 2020 [cited 2020 May 1];8–13. Available from: asohofrucol.com.co/archivos/Revista/Revista69.pdf
 72. Routledge EJ, Sumpter JP. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ Toxicol Chem* [Internet]. 1996 [cited 2019 Jun 20];15(3):241. Available from:

- [http://entc.allenpress.com/perlserv/?request=get-abstract&doi=10.1897%2F1551-5028\(1996\)015%3C0241%3AEAOSAS%3E2.3.CO%3B2](http://entc.allenpress.com/perlserv/?request=get-abstract&doi=10.1897%2F1551-5028(1996)015%3C0241%3AEAOSAS%3E2.3.CO%3B2)
73. Aguirre Jiménez CC, Cifuentes Prieto P (dir). Determinación de la presencia de sustancias de tipo estrogénico en la superficie de alimentos para consumo en fresco procedentes de diferentes centrales de venta en la ciudad de Bogotá D.C [Internet]. Universidad Colegio Mayor De Cundinamarca; 2015 [cited 2020 Feb 15]. Available from: <http://janium.unicolmayor.edu.co:28080/janium-bin/detalle.pl?Id=20200507233446>
 74. Murillo Castillo R, Piedra Marin G, León R. Absorción de nutrientes a través de la hoja. Uniciencia [Internet]. 2013 [cited 2020 Apr 28];27(1):232–44. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4945327.pdf>
 75. Devine MD, Duke S, Fedtke C. Physiology of herbicide action. Choice Rev Online [Internet]. 1993 Feb [cited 2020 Apr 28];30(06):30-3265-30–3265. Available from: <http://choicereviews.org/review/10.5860/CHOICE.30-3265>
 76. Gonzalez-Rodriguez R, Rial-Otero R, Cancho- Grande B, Simal J. Occurrence of fungicide and insecticide residues in trade samples of leafy vegetables. Food Chem [Internet]. 2008 Apr 1 [cited 2020 Apr 28];107(3):1342–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607009636>
 77. Nasu M, Goto M, Kato H, Oshima Y, Tanaka H. Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants. Water Sci Technol [Internet]. 2001 Jan 1 [cited 2020 Feb 20];43(2):101–8. Available from: <https://iwaponline.com/wst/article/43/2/101/8901/Study-on-endocrine-disrupting-chemicals-in>
 78. Mojica A, Guerrero JA. Evaluación del movimiento de plaguicidas hacia la cuenca del lago de Tota, Colombia. Rev Colomb Química [Internet]. 2013 [cited 2020 Feb 20];214(2):1–27. Available from: <http://bdigital.unal.edu.co/43294/1/45887-222572-1-SM.pdf>
 79. Sanchez Martín MJ, Sanchez Camazano M. Los plaguicidas. Adsorción y evolución en el suelo [Internet]. 1st ed. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, editor. Salamanca; 1985. 1–51 p. Available from: <https://digital.csic.es/handle/10261/12919>
 80. Barco H, Mauricio I, Dallos G, Arturo J. Método cualitativo rápido (screening) para la detección de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas. Rev Colomb Química [Internet]. 2018 [cited 2020 Feb 20];47(1):1–26. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=309055254003>
 81. Lopez de Alda MJ, Díaz-Cruz S, Petrovic M, Barceló D. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. J Chromatogr A [Internet]. 2003 Jun [cited 2020 Feb 20];1000(1–2):503–26. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967303005090>