



DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ESTROGÉNICA EN PRODUCTOS AGRÍCOLAS PROVENIENTES DE LA SABANA DE BOGOTÁ

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Trabajo de Grado
Bogotá
2019



DETERMINACIÓN DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ESTROGÉNICA EN PRODUCTOS AGRÍCOLAS PROVENIENTES DE LA SABANA DE BOGOTÁ

Anny Elizabeth Moreno Velásquez
Luisa María Ramírez Gorrón
Valentina Rey Rodríguez

Trabajo de grado

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
2019

*“Las llaves de la ciencia,
están guardadas en el cofre de tu voluntad”*

R11

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarnos la sabiduría necesaria para llegar hasta la etapa final de nuestro pregrado, a nuestra universidad y maestros por el apoyo y acompañamiento en todo el proceso formativo.

Agradecemos a la profesora Patricia Cifuentes Prieto por su apoyo y asesoramiento durante la elaboración del proyecto.

A nuestra familia por su paciencia, colaboración y compromiso incondicional en cada una de las etapas de nuestra vida.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	13
1. ANTECEDENTES	15
2. MARCO TEÓRICO	18
2.1 DISRUPTORES ENDOCRINOS.....	18
2.2 PLAGUICIDAS.....	21
2.3 RECEPTORES ESTROGÉNICOS (ER).....	24
2.4 MECANISMOS DE ACCIÓN	25
2.5 SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ESTROGÉNICA EN EL AGUA	26
2.6 ALIMENTOS CON DISRUPTORES ESTROGÉNICOS	27
2.7 EFECTOS CLÍNICOS EN EL SISTEMA ENDOCRINO POR SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ESTROGÉNICA.....	30
3. OBJETIVOS	35
3.1 GENERAL	35
3.2 ESPECÍFICOS.....	35
4. DISEÑO METODOLÓGICO	36
4.1 TIPO DE ESTUDIO	36
4.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO	36
4.3 MUESTRA	36
4.4 HIPÓTESIS Y VARIABLES	36
4.5 TÉCNICA Y PROCEDIMIENTO	37
5. RESULTADOS	42
6. DISCUSIÓN	46
7. CONCLUSIONES	51
8. RECOMENDACIONES	52
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE TABLA

TABLA 1. Algunos plaguicidas con actividad estrogénica y sus efectos en el organismo	22
TABLA 2. Mecanismos de acción de algunas sustancias químicas con actividad estrogénica	26
TABLA 3. Sustancias disruptoras estrogénicas en alimentos	28
TABLA 4. Ingesta diaria admisible (IDA) de plaguicidas y límites máximos de residuos (LMR) para hortalizas	30
TABLA 5. Efectos adversos que generan los disruptores endocrinos sobre la salud.	31
TABLA 6. Efectos tóxicos de los plaguicidas en seres vivos.....	32
TABLA 7. Resultados de actividad estrogénica obtenidos en las diferentes muestras de hortalizas de la sabana de Bogotá.....	44
TABLA 8. Resultados porcentuales de la actividad estrogénica (EEQ) en las muestras analizadas.	45
TABLA 9. Pesticidas y plaguicidas usados generalmente en los cultivos de hortalizas.....	46
TABLA 10. Posibles fuentes hídricas de abastecimiento para riego de cultivos de las muestras analizadas.	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Síntesis de hormonas esteroideas (esteroidogénesis).	1919
FIGURA 2. Procedimiento para la reconstitución y viabilidad de la cepa. bioensayo preliminar utilizando la técnica YES (Yeast Estrogen Screen).	38
FIGURA 3. Procedimiento para la extracción de muestras problema. técnica de lavado con etanol realizada en cada hortaliza.	39
FIGURA 4. Disposición para el montaje en placas de ensayo. Ejecución de la curva control y muestras en microplaca para su respectivo análisis.	40
FIGURA 5. Viraje de color amarillo a rojo en las curvas realizadas con solución patrón de 17 β -estradiol	42
FIGURA 6. Carta control de la técnica Yeast Estrogen Screen con 17 β -estradiol... ..	42
FIGURA 7. Densidad óptica relativa vs concentración de 17 β -estradiol.....	43
FIGURA 8. Porcentaje de muestras con concentraciones >4 ng/l ó <4 ng/l EEQ....	45

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Preparación y almacenamiento del medio de crecimiento	53
ANEXO 2: Preparación del medio YNB	55
ANEXO 3: Tabla de densidades ópticas corregidas de las curvas para la carta control.	56

RESUMEN

Los Compuestos de Disrupción Endocrina (EDCs) son sustancias capaces de alterar el sistema hormonal del organismo humano o animal y generar un daño en su función; generalmente éstas provienen de actividades y/o productos altamente contaminantes. En la actualidad se ha logrado demostrar que ciertos productos de uso cotidiano, como los plaguicidas en el ámbito agrícola, poseen concentraciones considerables de disruptores endocrinos. De esta forma, al ser aplicados sobre diversos cultivos, se adhieren a ellos y una vez consumidos llegan al organismo humano, causando algunos problemas sistémicos.

El presente estudio buscó identificar disruptores endocrinos con actividad estrogénica en diferentes tipos de hortalizas determinando cuantitativamente en Equivalentes de Estradiol las concentraciones a las cuales se ve expuesto el consumidor. Se utilizó la técnica YES (Yeast Estrogen Screen) en 32 hortalizas provenientes de diferentes zonas de la sabana de Bogotá, de las cuales cinco presentaron actividad estrogénica. El cilantro de Tabio y Sopó, la espinaca de Cota y Bogotá y el perejil de Zipaquirá presentaron positividad (135ng/L, 8ng/L, 4ng/L, 11ng/L, y 10 ng/L Equivalentes de estradiol, respectivamente).

Teniendo en cuenta lo anterior, es importante considerar que la implementación de productos altamente tóxicos como los plaguicidas y el uso de agua contaminada en el riego de los cultivos puede influir directamente y en gran medida sobre la presencia de compuestos estrogénicos en las hortalizas. Sin embargo, se puso en evidencia que el uso de plaguicidas no es la única fuente de contaminación ya que las técnicas y herramientas empleadas en los diferentes tipos de cultivo pueden variar, y así mismo influir sobre la presencia de sustancias con actividad estrogénica en los productos agrícolas analizados.

Palabras clave: *Yeast Estrogen Screen, estrógenos, disruptores endocrinos, plaguicidas.*

ABSTRACT

Endocrine Disruption Compounds (EDCs) are substances capable of altering the hormonal system of the human or animal organism and generating damage to its function; Generally, these come from highly polluting activities and / or products. Today it has been demonstrated that certain products for everyday use, such as pesticides in the agricultural field, have considerable concentrations of endocrine disruptors. In this way, when applied to various crops, they adhere to them and once consumed they reach the human organism, causing some systemic problems.

The present study sought to identify endocrine disruptors with estrogenic activity in different types of vegetables by quantitatively determining in Estradiol Equivalents the concentrations to which the consumer is exposed. The YES (Yeast Estrogen Screen) technique was used in 32 vegetables from different areas of the Bogotá savannah, of which five had estrogenic activity. The cilantro of Tabio and Sopó, the spinach of Cota and Bogotá and the parsley of Zipaquirá presented positivity (135ng / L, 8ng / L, 4ng / L, 11ng / L, and 10 ng / L equivalent of estradiol, respectively).

Given the above, it is important to consider that the implementation of highly toxic products such as pesticides and the use of contaminated water in crop irrigation can directly and greatly influence the presence of estrogenic compounds in vegetables. However, it was shown that the use of pesticides is not the only source of contamination since the techniques and tools used in the different types of crops may vary, and also influence the presence of substances with estrogenic activity in the analyzed agricultural products.

Key words: *Yeast Estrogen Screen, estrogens, endocrine disruptors, pesticides.*

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha observado un aumento en la implementación de plaguicidas en el sector agrícola con el objetivo de controlar, beneficiar y maximizar las siembras; siendo las hortalizas uno de los principales cultivos a los que se le aplican las mayores dosis de estos productos. Si bien su uso mejora satisfactoriamente la producción agrícola, también es cierto que desde hace unas décadas atrás se ha podido evidenciar que ciertas sustancias que componen estos productos están implicadas en la aparición de diversas enfermedades en el ser humano (1). Según el ICA (Instituto Colombiano Agropecuario), en Colombia se pasó de 770 formulaciones de plaguicidas registradas a 1370 para el 2003, aumentando progresivamente en los siguientes años y en donde se sabe que al menos una quinta parte de las sustancias que componen estos productos tienen la capacidad potencial de perjudicar exponencialmente el sistema endocrino del ser humano a corto, mediano y/o largo plazo (2).

Actualmente, estas sustancias nocivas son conocidas como compuestos de disrupción endocrina (EDCs), los cuales pueden actuar modificando la biosíntesis, el transporte y el metabolismo de distintas hormonas como los estrógenos (3); por lo cual en el caso de una exposición con un agente químico que contenga disruptores estrogénicos, éste puede provocar alteraciones en el equilibrio fisiológico hormonal causando diferentes enfermedades (4). No obstante, estas sustancias no se limitan solo a productos químicos destinados al sector agrícola; también se pueden encontrar en alimentos de consumo en fresco por residualidad, al igual que en plásticos, detergentes, cosméticos y otros por sus componentes a la hora de su elaboración. Así mismo, se han detectado disruptores estrogénicos en ríos, lagos, océanos y hasta en el aire gracias en gran parte a la contaminación ambiental ocasionada por residuos generados en industrias, empresas, hogares, entre otros (5).

El impacto negativo que han tenido los disruptores con actividad estrogénica en el organismo ha generado la implementación de la vigilancia en la utilización de estas sustancias como parte de la composición de distintos productos de uso generalizado, sobre todo en el sector agrícola, llegando a aceptar por normatividad su presencia en algunos productos a determinadas concentraciones (6). No obstante, estudios publicados en los últimos 20 años han logrado evidenciar que a bajas dosis también son perjudiciales cuando la exposición es frecuente, debido a un proceso de bioacumulación que se genera en el organismo especialmente en el tejido graso (7, 8).

Colombia tiene una normatividad en relación a este tipo de sustancias en productos químicos comerciales asegurando que las concentraciones de cada disruptor estrogénico presente en los productos se encuentran por debajo del límite máximo establecido como seguro; sin embargo, no se tiene en cuenta que la presencia de dos sustancias débilmente estrogénicas puede tener un efecto más potente o producir más efectos conjuntamente, que por sí solas – efecto sinérgico – (9).

Considerando el uso frecuente de pesticidas, plaguicidas y otros componentes en actividades agrícolas, y teniendo en cuenta que en la mayoría de los casos hay

presencia de disruptores endocrinos con actividad estrogénica en estos productos; es fundamental determinar el tipo de efecto que estas sustancias químicas pueden generar sobre el alimento y que pueden prevalecer al momento de su ingesta, sobre todo si son responsables de daños a futuro en la salud del consumidor. Sin embargo, es difícil implementar técnicas para su determinación analítica sobre todo en cultivos gracias a su compleja estructura. Aun así, los métodos más empleados en la determinación de disruptores endocrinos con actividad estrogénica van desde la cromatografía, ya sea de gases o líquida, acompañada de espectrofotometría de masas, métodos no celulares como ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) ó ELRA (*Enzyme Linked Receptor Assay*), hasta métodos biológicos en donde uno de los ensayos más representativos es el YES (*Yeast Estrogen Screen*) (10).

En Colombia la normatividad vigente para alimentos no menciona ninguna técnica oficial para la determinación de sustancias con actividad estrogénica, aunque si se tiene conocimiento de la regulación del uso de plaguicidas y otras sustancias químicas no se conoce la relación de algunas de estas con su actividad como disruptor endocrino. Con respecto a lo anterior, se considera que existe una alta probabilidad de encontrar sustancias con actividad estrogénica en hortalizas, ya fuera por la utilización de productos químicos en el momento de su siembra y/o por la implementación de agua contaminada para el riego de las mismas. Por consiguiente, el presente trabajo se encamina a la implementación del método YES utilizando una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante para la cuantificación de disruptores endocrinos con actividad estrogénica en hortalizas cultivadas en la sabana de Bogotá, teniendo en cuenta plaguicidas empleados en las hortalizas y los ríos o cuencas aledañas con las que se riegan este tipo de cultivos.

1. ANTECEDENTES

Desde hace algún tiempo se han investigado diferentes compuestos químicos que podrían tener un efecto sobre la actividad hormonal de los seres vivos. Una de las acciones hormonales mejor documentada atribuible a los compuestos de disrupción endocrina (EDCs), es su capacidad para mimetizar el efecto de los estrógenos. Por ende, desde unas décadas atrás se han venido estableciendo registros de compuestos químicos con actividad disruptora, en donde para el caso se han logrado identificar más de 500 compuestos químicos con actividad estrogénica.

Los disruptores estrogénicos más investigados se relacionan principalmente con la presencia de compuestos farmacéuticos, alquilfenoles, ftalatos, bisfenoles, bisfenoles policlorados (PCBs), plaguicidas organoclorados, y dioxinas y furanos; los cuales dependen de la presencia de al menos una estructura de anillo fenólico hidroxilo para ser activos estrogénicamente; aun así, debido a que no son transportados por proteínas sus niveles son biológicamente activos pudiendo alterar el balance hormonal y por ende comprometiendo el organismo (11). No obstante, existen otros compuestos como los polietoxilatos, los cuales no son estrogénicos, pero pueden adquirir propiedades de tipo estrogénico por medio de la degradación microbiana; lo anterior ocurre por ejemplo por el tratamiento de aguas residuales en donde la cadena de los polietoxilatos se acorta y se liberan mono y dietoxilatos, alquilfenoles y ácidos alquilfenol carboxílicos (12).

La primera evidencia de disruptores estrogénicos en productos químicos fue publicada en 1936 a través de investigaciones de Dodds y Lawson (13) en donde demostraron que los para-alquilfenoles podrían ser estrogénicos; lo anterior fue confirmado en posteriores estudios por Muller y Kim en 1978 (14). También para 1936, Dodds y Lawson (13) investigaron los bisfenoles y los ftalatos, demostrando que la administración de bisfenoles a ratas actúa como mimetizador estrogénico causando cornificación vaginal e incremento de peso uterino, y en cuanto a los ftalatos mencionaron que poseen carácter estrogénico débil y pueden competir con el estradiol por su unión al receptor hormonal. Estas observaciones fueron apoyadas posteriormente por Reid y Wilson argumentando también acerca de la bioacumulación de bisfenoles y añadiendo que sustancias halógenas (clorados y bromados) estaban presentes en leche materna y bebida de consumo (12, 15, 16).

A finales del siglo XIX, se sintetiza el derivado organoclorado conocido como DDT (dicloro difenil tricloroetano) y gracias a Müller (17) se descubre su acción insecticida. Este plaguicida se utilizó ampliamente durante la segunda guerra mundial, pero actualmente la mayoría de los países industrializados ha prohibido la utilización del compuesto químico después de haberse revelado sus efectos adversos sobre la salud, sobre todo a nivel estrogénico; sin embargo, al tratarse de una molécula rígida y liposoluble, el DDT se acumula y se concentra por lo que aún hoy se puede encontrar a lo largo de toda la cadena alimentaria (18).

En el año 1991 Soto y colaboradores (19) empezaron a desarrollar diversos trabajos, los cuales tenían como propósito demostrar la actividad estrogénica en diferentes compuestos químicos de uso general. En uno de los primeros ensayos emplearon

células estrógeno-sensibles descubriendo que las células proliferaban aún en ausencia de estrógenos y aseguraron que este efecto se producía debido al nonilfenol, componente utilizado en la fabricación de los tubos de plástico de poliestireno utilizados para almacenar el medio de cultivo celular (19). En 1995 otro de sus trabajos demostró la estrogenicidad del endosulfán, plaguicida organoclorado de uso habitual, en donde éste ejercía un efecto proliferativo sobre las células responsables de cáncer de mama, mencionándose por primera vez la afinidad de estos plaguicidas por el receptor estrogénico y su capacidad para inducir la síntesis y secreción de proteínas estrógeno-inducidas (15). En ese mismo año Jobling y Sumpter (20) demostraron las propiedades estrogénicas de algunos alquilfenoles y alquilfenol polietoxilatos mencionando que estas sustancias se encontraban como productos de degradación en agua depurada, destinada para el consumo humano.

Los alimentos que constituyen parte fundamental de la nutrición de los seres vivos, sobre todo los productos de origen vegetal -frutas y hortalizas-, son uno de los productos más afectados por el uso de diferentes pesticidas, herbicidas, insecticidas y demás sustancias químicas cuyo objetivo se centra en mantener los cultivos óptimos y evitar que se dañen por diferentes plagas (2). Diversos estudios reportaron la presencia de residuos de plaguicidas en productos hortícolas en donde se analizaron algunos vegetales que ingresaron al mercado estadounidense durante el periodo 1996-2006. Se observó que de un total de 36.221 millones de toneladas métricas, el 5,2% de las muestras registró residuos de plaguicidas nocivos, siendo México el país que contribuyó con el mayor volumen (66%), y entre ellas el 52 % presentó residuos de algún tipo de plaguicida (21). No obstante, durante el año 2003 y 2011 en Colombia y Chile respectivamente, se determinaron residuos de plaguicidas en alimentos empleando métodos analíticos por cromatografía líquida y gaseosa. En Colombia, se detectó la presencia de clorpirifos en tomate (22) y en Chile se obtuvieron como resultados la presencia de Carbaril en jugo de naranja, Iprodiona en papillas de ciruela y durazno y concentraciones de Pirimifols-metil en sopa de espárragos (23).

Para el 2013 en Colombia, se realizó un estudio evaluando la presencia de sustancias estrogénicas en agua implementando la técnica *Yeast Estrogen Screen* (YES) (24); en donde se comprobó la sensibilidad de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, para detectar sustancias con actividad estrogénica en muestras ambientales. En el 2015 se volvió a emplear la misma técnica en dos trabajos de grado; uno de ellos determinó sustancias con actividad estrogénica en fresas (10) en donde se utilizaron diferentes métodos de extracción (acetato de etilo y hexano) para la posterior cuantificación de disruptores endocrinos de tipo estrogénico, validando la técnica en muestras falseadas y obteniendo resultados negativos en las muestras analizadas. El segundo trabajo, analizó la presencia de sustancias estrogénicas en alimentos de consumo en fresco que provenían de distintos puntos de venta en la ciudad de Bogotá (25) y se comprobó que existen sustancias con actividad estrogénica en la superficie de algunos de los alimentos provenientes de las distintas centrales de venta relacionándolo con el alto grado de contaminación ambiental por diversidad de compuestos.

Sin embargo; para el 2014, las ventas de pesticidas alcanzaron las 400.000 toneladas, de los cuales actualmente 33 plaguicidas de los más empleados a nivel mundial poseen propiedades de disrupción estrogénica (26). La Autoridad Europea

de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha publicado en múltiples informes que cerca de la mitad de las muestras de alimentos europeos tienen niveles detectables de residuos de cientos de pesticidas. Esto implica que la exposición a pesticidas a través de la dieta es generalizada y llega a millones de personas (27). En el año 2016 se determinó que los clorpirifos son los plaguicidas que más se hallaban en los residuos de alimentos, específicamente se encontraron restos de este insecticida en 20 alimentos diferentes. Estudios indican que los clorpirifos –presente en insecticidas– afectan al sistema hormonal humano y se relacionan con graves problemas a nivel cerebral en los niños. Adicionalmente, son persistentes, bioacumulables y pueden llegar a alterar el ADN cuando los niveles de exposición son diarios, aun cuando estén por debajo de los límites de residuos permitidos (26).

Otro factor que se empezó a considerar fue el agua, en donde lamentablemente durante su recorrido por diferentes lugares se contamina con desechos biológicos humanos, animales e industriales y genera que las fuentes hídricas contengan gran cantidad de sustancias tóxicas. Diversos estudios han comprobado que en el agua de ríos, lagos, lagunas e incluso agua tratada, existe presencia de sustancias con actividad estrogénica (28). El agua contaminada por este tipo de sustancias puede ser ingerida directamente, o bien puede ser utilizada para el riego de diferentes cultivos y absorbido y/o adsorbido por vegetales y frutas que finalmente serán utilizados en la cadena alimentaria. Es por ello que surgió la necesidad de tener un control eficiente de dichos compuestos en aguas empleando tecnologías eficientes de tratamiento para asegurar su plena calidad a la hora de su utilización (28).

El Río Bogotá es uno de los ríos más contaminados de Colombia, recorre toda la sabana de Bogotá con varias desembocaduras a lo largo y ancho del departamento. Muchos de los agricultores utilizan aguas extraídas del río Bogotá para regar sus cultivos; sin embargo, estadísticas recientes en Colombia demostraron que en corrientes superficiales de la cuenca media y baja del río Tunjuelito y la cuenca baja del río Bogotá y el río Sumapaz, poseen niveles altos de compuestos con actividad estrogénica (24). Aun así, actualmente se utilizan aguas que provienen directamente de ríos con altos grados de contaminación, como en el caso del río Bogotá, para diferentes usos agrícolas e incluso para consumo humano en algunas poblaciones vulnerables.

En Cundinamarca 47 municipios cercanos a la ribera del río Bogotá consumen verduras que probablemente se riegan con sus aguas contaminadas de metales pesados y bacterias que ponen en riesgo la salud. Estudios realizados en la capital del país demostraron la presencia de altas concentraciones de mercurio, cadmio, arsénico y plomo en hortalizas cultivadas en este territorio, metales pesados que son sustancias con actividad estrogénica. Se encontraron además coliformes, enterobacterias, protozoos y residuos de medicamentos (29). Por otro lado, se ha puesto en evidencia que campesinos de una vereda al norte de Bogotá regaban sus cultivos de hortalizas con aguas extraídas directamente del río Bogotá, hallazgo que puso en evidencia la baja calidad de algunos alimentos que se consumen en la sabana (30).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 DISRUPTORES ENDOCRINOS

Los disruptores endocrinos (EDCs) se definen como sustancias o mezclas de sustancias exógenas al organismo (naturales o sintéticas) que tienen la capacidad de alterar una o varias funciones del sistema endocrino (hormonal) por similitud, afinidad hormonal, antagonismo, interferencia fisiológica o modificación de receptores específicos provocando efectos adversos en la salud de un organismo, en sus descendientes, en la población en general o en una subpoblación en particular (31).

Cuando los EDCs reaccionan con los constituyentes celulares de diferentes tejidos a través de diversos mecanismos de acción, pueden producir un desequilibrio en el balance hormonal. Adicionalmente, en muchas ocasiones, estas sustancias tóxicas son persistentes en el organismo ya que una vez que entran no pueden ser eliminadas; por lo tanto, se bioacumulan en diferentes órganos convirtiéndose así en un factor más para que se originen múltiples y diversas enfermedades (32,33).

Los EDCs pueden ser de origen natural, procedentes de humanos, animales, plantas u hongos, y también pueden ser de origen químico (sintético). Dentro de los EDCs de origen natural, humano y animal, se encuentran los andrógenos como la testosterona y el 5- α -dihidrotestosterona y los estrógenos como el 17 β - estradiol (E2), estrona (E1) y estriol (E3), los cuales constituyen una clase de hormonas que regulan el crecimiento, desarrollo y diferenciación de los órganos sexuales secundarios de los mamíferos (24).

Los estrógenos son hormonas esteroideas derivadas del colesterol y son sintetizadas en células específicas de los ovarios, la placenta, la corteza adrenal y los testículos. En los mamíferos, los ovarios segregan estradiol, androstenediona y progesterona, la placenta secreta estradiol y progesterona, en la corteza adrenal se produce aldosterona, cortisol y la DHEA (dehidroepiandrosterona), y los testículos se encargan de secretar androstenediona y estradiol (Figura 1.) (34,35).

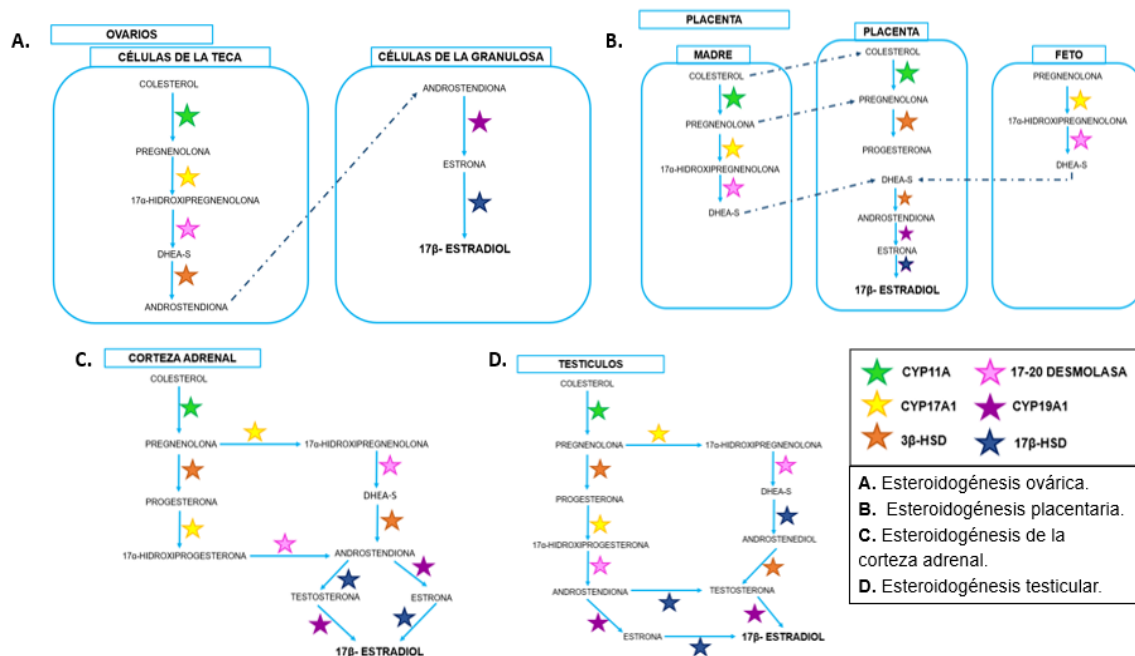


FIGURA 1. Síntesis de Hormonas Esteroideas (Esteroidogénesis).

Fuente: Elaboración propia. Tomando como referencia Becerro M. Las hormonas esteroideas sexuales, el envejecimiento y el ejercicio. Revista Andaluza de Medicina del Deporte. 2008; 1(1):22-36. y Gómez E, Larrea F, Martínez F. Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 2012; 15(1):24-36.

Existen tres estrógenos naturales principales en el organismo: la estrona, el estradiol y el estriol. Estos poseen 18 átomos de carbono (C18) y son derivados químicos del ciclo-pentano-perhidro-fenantreno, esteroides formados por tres anillos ciclohexanos (denominados A, B, C) y un anillo de ciclo pentano (denominado D). Dentro de este grupo de estrógenos naturales, uno de los más importantes y potentes es el 17 β -estradiol, el cual tiene 3 dobles ligaduras en el anillo A, un OH en C3, y otro OH en C17 en posición beta (24). El anillo fenólico A es la característica estructural que permite la unión selectiva y de alta afinidad a receptores estrogénicos (36).

La estrona es un producto de oxidación del estradiol, incorpora una función cetona en C17, se encuentra en menor concentración y es sintetizada a partir de la androstenediona. El estradiol es sintetizado a partir de la estrona. La testosterona es la hormona que se encuentra en mayor concentración en el organismo durante los años de fertilidad y el estriol es una consecuencia de la hidratación del estradiol, posee un OH adicional en C16, es sintetizado por la androsterona principalmente en el hígado y se encuentra en concentraciones elevadas durante el embarazo (37, 38, 39).

Los estrógenos son los principales responsables del desarrollo de las características sexuales en las mujeres, y desempeñan una función indispensable en el crecimiento, desarrollo y diferenciación de los tejidos reproductores. Así mismo, influyen en el mantenimiento de la fertilidad y el ciclo reproductivo. Sin embargo, existen muchas otras funciones en las que las hormonas esteroideas intervienen debido a que la

presencia de sus receptores en órganos diana externos son numerosos y se involucran en muchos otros procesos físicos del organismo (40). Algunas de estas funciones son: cambios en los depósitos de grasa corporal, el desarrollo y crecimiento mamario, el desarrollo del cuello uterino, endometrio, trompas de falopio y epitelio vaginal, la maduración de los ovarios, la producción de hormonas esteroideas durante la fase lútea del embarazo y la diferenciación de las características sexuales secundarias. De igual forma, también se encuentran implicados en el control de la conducta sexual femenina a nivel del sistema nervioso central (35, 41).

La principal función de los estrógenos es la proliferación y maduración celular en los diferentes tejidos donde se encuentren receptores estrogénicos, así como la regulación de la concentración de sus propios receptores, los cuales se encuentran localizados en múltiples sitios del organismo. Están involucrados en el metabolismo de los lípidos, las proteínas y el calcio. Participan en la coagulación sanguínea y en aspectos relacionados con la fisiología vascular tales como la proliferación epitelial de los vasos sanguíneos siendo factores cardioprotectores. Por otra parte, también participan en el sistema óseo, siendo necesarios para el mantenimiento del equilibrio de la masa ósea (41), y en el sistema nervioso los receptores estrogénicos están presentes en el hipotálamo, la amígdala, el hipocampo y el tronco cerebral basal, lo que explica sus efectos en la función reproductora y en la memoria (42).

Los fitoestrógenos u hormonas vegetales son componentes no esteroideos de origen natural que se encuentran presentes en alimentos, y pueden tener un origen directamente vegetal o pueden ser el resultado del metabolismo de sustancias precursoras presentes en las plantas. Dichos componentes se pueden encontrar en los flavonoides, especialmente de las subclases isoflavonas (genisteína, daidzeína y gliciteína) que se encuentran en la soja. Los lignanos de las semillas (cereales integrales), los cumestanos presentes en las leguminosas, las coles o la alfalfa y las lactonas del ácido resorcílico producidas por algunos hongos que contaminan los cereales (micoestrógenos) hacen parte de algunos de los fitoestrógenos frecuentemente más encontrados en los vegetales (43,44,45).

Los fitoestrógenos se ingieren y por medio de la acción enzimática de las bacterias intestinales son hidrolizadas por glucosidasas para ser transformados en formas activas (agliconas) para que se puedan absorber. Luego son conjugados en el hígado con ácido glucurónico o sulfúrico y son excretadas en la bilis, donde parte del contenido biliar se puede volver a desconjugar en el intestino para ser reabsorbido y reconjugado nuevamente en el hígado para finalmente ser excretados por la vía urinaria (43, 46). Teniendo en cuenta que los fitoestrógenos poseen una estructura química semejante a los estrógenos humanos, logran unirse a los receptores estrogénicos tipo alfa y beta (presentan mayor afinidad por los receptores estrogénicos beta), se desplazan hasta el núcleo de las células y pueden cambiar la expresión de ciertos genes. Sin embargo, tienen un efecto estrogénico débil (menor que el 17β -estradiol) y por lo tanto su respuesta es menor a la que ocurre con otras sustancias con actividad estrogénica o con los estrógenos propiamente sintetizados por el cuerpo (37, 43, 46).

Aunque los fitoestrógenos tienen un efecto estrogénico débil, se han estudiado por su capacidad de ser agonistas o antagonistas del receptor de estrógenos y pueden tener

una acción benéfica o generar efectos adversos en el organismo (46). Diferentes estudios han demostrado que estas moléculas también están dotadas de acción antioxidante, antiangiogénica, antiproliferativa e inhibidora de ciertas enzimas que desempeñan un papel importante en la tumorigénesis. Algunas clases de fitoestrógenos reducen los síntomas climatéricos como los sofocos, previenen la osteoporosis, reducen los factores de riesgo para enfermedad cardíaca e inhiben la carcinogénesis mamaria (43, 47, 48).

Por otro lado, los EDCs de origen químico sintético se pueden encontrar como contaminantes ambientales, en aguas residuales y en productos naturales e industriales (26). Estas sustancias se pueden producir intencionalmente para alterar o regular el sistema endocrino y tienen características estructurales similares a los estrógenos naturales de los humanos o animales (anticonceptivos y tratamientos de sustitución hormonal) (49). Las sustancias de origen químico sintético que no se producen intencionalmente, son fabricadas por el hombre para usos industriales o agrícolas (50). Muchos de estos se conocen como xenoestrógenos (XE), un grupo diverso de sustancias que no tienen similitudes estructurales con los estrógenos naturales pero que interfieren en la homeostasis hormonal. Estos incluyen los pesticidas, plaguicidas, fertilizantes, metales pesados, detergentes, envases plásticos, envolturas de alimentos y cosméticos (33, 51, 52). Los Xenoestrógenos (XE) funcionan uniéndose a los receptores estrogénicos, pueden originar rutas de señales bioquímicas o inducir la transcripción del ADN y esto a su vez genera una respuesta estrogénica, mediante la transmisión de señales que activan ciertos genes (53).

Son muchos los compuestos químicos y antropogénicos que se conocen como EDCs, día a día se añaden más en la lista de xenoestrógenos. A continuación, se tratan algunos grupos:

2.2 PLAGUICIDAS

Estos se utilizan a nivel mundial para el control de plagas en la agricultura y algunas situaciones de salud pública; sin embargo, algunas de las sustancias químicas que componen estos productos, además de tener características disruptoras a nivel endocrino, tienen la capacidad de bioacumularse tanto en el medio ambiente como en la grasa de los animales y del hombre llegando a poder detectarse concentraciones de éstos muchos años después de la exposición inicial (54).

Los plaguicidas organoclorados como diclorodifeniltricloroetano (DDT) y sus metabolitos (o,p'-DDT, p,p'-DDT, o,p'-DDD, p,p'-DDD, p,p'-DDE) se utilizaban como insecticidas, pero su uso fue prohibido en 1972 por su alta lipofilidad, estabilidad química, su capacidad para almacenarse en el tejido graso y su bioacumulación en el ambiente (tienen una vida media de aproximadamente 100 años). Los metabolitos del DDT son un ejemplo de plaguicidas que comparten como característica su capacidad para mimetizar a las hormonas naturales, estimulando o inhibiendo sus efectos estrogénicos. Al metabolito p,p'-DDE se le ha atribuido actividad estrogénica, o,p'-DDT induce el estro en ratas y es el isómero más estrogénico y p,p'-DDT muestra

características estrogénicas débiles tanto en útero de rata como en cultivos de células de cáncer de mama (12, 55).

Otros plaguicidas como los organofosforados también han demostrado producir alteraciones hormonales estrogénicas. Los clorpirifos por ejemplo, se emplean para el control de plagas contra insectos como cochinillas y barrenadores en la producción de frutas, hortalizas, cereales y plantas ornamentales, pero se ha observado que tiene efectos disruptores ya que en células dependientes de estrógenos puede incrementar su proliferación, mediante la fosforilación del receptor alfa (56). Sin embargo, existen muchos plaguicidas tóxicos que se usan en gran cantidad en cultivos agrícolas y actúan interfiriendo en la homeostasis estrogénica (Tabla 1.).

TABLA 1. Algunos Plaguicidas con Actividad Estrogénica y sus Efectos en el Organismo

Plaguicida	Uso	Efecto adverso
Endosulfán	Insecticida y acaricida	<ul style="list-style-type: none"> ● Atrofia testicular y disminución de los niveles de testosterona en ratas
Mancozeb	Fungicida	<ul style="list-style-type: none"> ● Inhibe la espermatogénesis (disminuye el número de espermatogonia, espermatocitos primarios, espermatidas y espermatozoides) ● Disminuye los niveles de estradiol, progesterona y testosterona en suero de ratas
Carbofurano	Insecticida	<ul style="list-style-type: none"> ● Aumento significativo de los niveles de estradiol y disminución de testosterona en el suero de ratas
Clorpirifos	Insecticida	<ul style="list-style-type: none"> ● Aumenta la proliferación celular
Metoxicloro	Insecticida	<ul style="list-style-type: none"> ● Actúa como disruptor estrogénico al imitar la acción de los estrógenos

Fuente: Elaboración propia. Tomando como referencia Kwon D, Chung Hk, Shin WS, Sun PY, Kwon SC, Song JS. Toxicological evaluation of dithiocarbamate fungicide mancozeb on the endocrine functions in male rats. *Molecular & cellular toxicology*. 2018; 14(1): 105-112.; Goat RT, Goad JT, Atieh BH, Gupta RC. Carbofuran-Induced Endocrine Disruption in Adult Male Rats. *Toxicology Mechanisms and Methods*. 2004; 14(4): 233-239.; Mueller GC, Displacement of Estradiol from Estrogen Receptors by Simple Alkyl Phenols. *Endocrinology*. 1978; 102(5):1429–1435.

2.2.1 PCBs, DIOXINAS Y FURANOS

Los PCBs, las dioxinas y los furanos son compuestos organoclorados muy estables y lipofílicos que pueden bioacumularse (no pueden ser expulsados por la orina, las heces o el sudor y tienden a alojarse en el tejido graso) y biomagnificarse a través de la cadena alimenticia, de un animal a otro, hasta llegar al ser humano quien puede alcanzar altas concentraciones al tener múltiples fuentes de exposición con estos

productos químicos (57). Los PCBs son compuestos sintéticos organoclorados ($C_{12}H_{10-n}Cl_n$) utilizados en la fabricación de equipamientos eléctricos como fluidos aislantes de transformadores y condensadores, plastificantes y fluidos hidráulicos, debido a su gran estabilidad química, resistencia al calor y propiedades aislantes. Las mezclas comerciales contienen diferentes isómeros en cantidades y concentraciones distintas lo cual determina sus características específicas y se pueden clasificar como homólogos (nombre general de un PCB dependiendo del número de átomos de cloro que éste posea), congéneres (indican la posición de cada cloro dentro de la molécula y se reconocen con el término genérico bifenilos policlorados) y mezclas (varios bifenilos con diferente grado de cloración) (58).

Los PCBs también se pueden clasificar en diferentes grupos de acuerdo a las características químicas de los congéneres. El grupo I posee una o dos posiciones “para” libres y dos carbonos no sustituidos en al menos uno de los anillos del bifenilo, el grupo II estructuralmente requiere ausencia de sustitución en las posiciones “orto” de los dos anillos y los congéneres del grupo III están altamente sustituidos (12, 59). Los compuestos orgánicos tricíclicos clorados como policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDDs) conocidos como dioxinas y policlorodibenzofuranos (PCDFs) conocidos como furanos, están compuestos por una molécula que es tricíclica aromática y halogenada, con un anillo común a todas. Se conocen 209 congéneres de las dioxinas y 153 de los furanos, estos son principalmente subproductos que se generan de forma natural o antropogénica de forma espontánea como resultado de una serie de procesos de combustión (erupciones volcánicas, incendios forestales, incineraciones, entre otros) y reacciones químicas en las que se encuentra presente materia orgánica y una fuente disponible de cloro (producción de papel y PVC, síntesis de plaguicidas, metales, entre otros) (60).

Diversos compuestos organoclorados han mostrado efectos adversos sobre las hormonas ya que algunos son estrogénicos y otros adquieren esta característica después de ser transformados in vivo por la desaparición y sustitución de algunos cloros por grupos hidroxilo, permitiendo que se puedan unir al receptor de estrógenos (12). Algunos PCBs han manifestado su actividad estrogénica al incrementar el peso del útero, producir proliferación de las células de cáncer mamario, competir por la unión al receptor estrogénico, favorecer el metabolismo de estradiol hacia la estrona e interrumpir la señalización a través de varios receptores inhibiendo la esteroidogénesis suprarrenal (61). Por otro lado, se ha evidenciado que las dioxinas pueden llegar a estimular y alterar la acción de la aromatasa lo cual afecta la conversión de testosterona a estradiol (62). Algunas dioxinas como el TCDD (2,3,7,8-tetracloro dibenzoparadioxina) y congéneres de los PCBs también pueden actuar como disruptores estrogénicos ya que inducen la expresión génica y la síntesis de enzimas pertenecientes a la familia del citocromo P450, que están involucrados en la reducción y aumento de la respuesta estrogénica (12, 63)

2.2.2 FTALATOS

Los ftalatos como DEHP (Dietilhexilftalato), DIBP (diisobutilftalato), DBP (dibutilftalato) o BBP (bencilbutilftalato) son compuestos químicos utilizados como plastificantes en la manufactura de materiales plásticos, fijadores de aromas

artificiales y antioxidantes en gran cantidad de productos comerciales empleados en el empaquetado, conservación o almacenaje de artículos para el consumo humano (alimentos, cosméticos, productos de limpieza y cuidado personal, productos hospitalarios, etc.). Su función como plastificante es incrementar la flexibilidad de polímeros de gran peso molecular como el cloruro de polivinilo para que sea más suave y manejable. No obstante, los ftalatos no están unidos químicamente a la matriz de plástico, por lo cual, pueden liberarse y migrar hacia diferentes medios como los alimentos, el agua, el suelo, entre otros (12, 64). La exposición a ftalatos se asocia con obesidad, resistencia a la insulina, cáncer de próstata, malformaciones genitales congénitas y efectos adversos en la tiroides, el sistema inmune o la fertilidad. También son disruptores estrogénicos débiles y actúan como agonistas compitiendo con el estradiol por su unión al receptor hormonal (20).

2.3 RECEPTORES ESTROGÉNICOS (ER)

Los estrógenos son hormonas esteroideas liposolubles de naturaleza no polar, esto les permite difundirse dentro y fuera de las células atravesando la membrana celular hasta alcanzar el núcleo (37). Las hormonas estrogénicas viajan a través del sistema sanguíneo y entran a la célula, una vez localizan al receptor estrogénico se une a este para formar el complejo hormona-receptor. La unión activa al receptor hormonal e inicia procesos celulares específicos, originando una cascada de señales para que se produzcan cambios como respuesta típica a este tipo de complejos (53).

El complejo receptor-estrógeno genera modificaciones en el receptor y se introduce en el núcleo de la célula, donde se une a la cromatina que tiene un sitio aceptor de estrógeno. Después de esta unión se generan una serie de factores de transcripción que activan determinados genes y a partir de esto se da la síntesis de moléculas proteicas reguladoras encargadas de generar el efecto deseado en el órgano en el que se encuentran. Se han identificado varios receptores de estrógenos, los más importantes y sobre los que se tiene más conocimiento son ER α , ER β y sus isoformas. Estos dos receptores son codificados por diferentes genes (37,40). Los receptores estrogénicos ER α se encuentran en los tejidos del útero, glándula mamaria, placenta, hígado, sistema nervioso central, sistema cardiovascular y hueso. Otras células diana poseen mayor cantidad de ER β y expresan poca cantidad de ER α . Estos tejidos son los de la próstata, ovarios, glándula pineal, glándula tiroides, paratiroides, adrenal, páncreas, vesícula biliar, piel, tracto urinario, tejido linfóide, tejido eritroide, pulmón, epitelio intestinal y algunas regiones del cerebro (65).

La acción de las hormonas esteroideas se ejerce mediante la unión a dos tipos de receptores; su unión a un receptor de la membrana o del citoplasma con una acción rápida (efectos no genómicos del receptor estrogénico) y su unión a un receptor nuclear con la consecuente activación de la transcripción de proteínas, una acción lenta (efectos genómicos del receptor estrogénico) (37). En los efectos no genómicos del receptor estrogénico no es necesaria la transcripción ni la síntesis de proteínas para que se genere un efecto; en este intervienen procesos de reclutamiento de señales que se localizan en la membrana celular e incluyen AMP cíclico, calcio y óxido nítrico, así como la activación de cinasas como tirosincinasa, proteincinasa A,

proteincinasa C, ERK (extracellular signal-regulated kinase), proteincinasa B, entre otros. Estos procesos se han observado en los tejidos como el útero, el páncreas, células endoteliales, sistemas cardiovascular, nervioso y óseo.

En los efectos genómicos, los receptores nucleares estrogénicos modulan la transcripción al interactuar con las secuencias reguladoras del ADN celular, al unirse con secuencias específicas del genoma (RE α está organizado en seis dominios, la región A/B activa la transcripción genética, la región de unión al ADN o dominio C que está presente en todos los receptores esteroidales, la región D o región de bisagra participa en la unión a la proteína chaperona y la región F/G o dominio de unión al ligando, donde se une la hormona), así como a correpresores y coactivadores para regular la acción del complejo de ARN polimerasa (24, 36). Al unirse los ER con los estrógenos, desencadenan cambios en la forma del receptor que consisten en la disociación de un complejo correpresor del ER y la unión de éste con un complejo coactivador. Estas moléculas interactúan con el receptor y le confieren la actividad de transcripción de genes que contienen elementos de respuesta a los estrógenos (65).

2.4 MECANISMOS DE ACCIÓN

Las hormonas se unen a un receptor celular específico y originan una cascada de señales que desencadenan una reacción para producir cambios como una respuesta típica a este tipo de complejos de acuerdo con la función metabólica que se esté regulando. Los disruptores endocrinos tienen la capacidad de interferir en el funcionamiento normal de los productos glandulares y mediante diferentes mecanismos de acción logran alterar la comunicación celular suplantando a las hormonas naturales, bloqueando su acción y aumentando o disminuyendo sus niveles de expresión (53).

Los mecanismos de acción de los disruptores endocrinos no se han establecido completamente debido a que intervienen diferentes factores como el órgano diana, las circunstancias de expresión y la función de los niveles de estrógenos, la potencia hormonal de los xenoestrógenos, la variedad en cuanto a su naturaleza, su estructura química y la falta de disponibilidad de métodos para evaluar tales efectos. Sin embargo, se han estudiado algunos mecanismos de acción que incluyen la mimetización o antagonización de la acción de las hormonas, la unión a otros receptores (puede activar o inactivar el receptor), la modificación del metabolismo hormonal (pueden efectuar el camino metabólico del estradiol, activar enzimas o modificar la producción normal de hormonas naturales), la modulación de los niveles de los receptores, la inhibición selectiva de la transcripción del DNA y la alteración de los patrones de síntesis y metabolismo (8, 66).

En una reacción hormonal dada entre mensajeros químicos y receptores celulares, en la que interfieren disruptores endocrinos, se puede producir una respuesta similar a la de la hormona endógena o una respuesta anormal. Incluso puede que no se genere ninguna respuesta al bloquear el sitio de unión del receptor y evitar así el acople de la hormona endógena. De esta manera, los disruptores endocrinos también pueden generar una reacción más potente o débil de la normal en el momento inadecuado (9). Se han descrito diferentes mecanismos, por inhibición o por

mimetización en las cuales los xenoestrógenos modifican la síntesis, metabolismo y acción de las hormonas esteroideas naturales (Tabla 2.) (42).

TABLA 2. Mecanismos de Acción de Algunas Sustancias Químicas con Actividad Estrogénica

Sustancia química	Uso	Mecanismo de acción como disruptor estrogénico
Atrazina	Herbicida	<ul style="list-style-type: none"> ● Aumenta la expresión de la enzima aromatasa
Clorpirifos	Insecticida	<ul style="list-style-type: none"> ● Fosforilación del ER
Metoxicloro	Insecticida	<ul style="list-style-type: none"> ● Fija el ER
Dicofol	Acaricida	<ul style="list-style-type: none"> ● Imitador débil de estrógenos ● Actúa como agonista de ER
Dioxinas cloradas (TCDD)	Hidrocarburos clorados generados durante procesos industriales y de combustión	<ul style="list-style-type: none"> ● Aumenta la expresión de las enzimas CYP1 que catalizan la hidroxilación del estradiol
Alquilfenoles	Producción de agentes tensioactivos o detergentes, humectantes, emulsionantes o plastificantes	<ul style="list-style-type: none"> ● Imitador de estrógenos ● Previenen la unión del estradiol ya que desplazan la hormona pre-unida de los ER

Fuente: Elaboración propia. Tomando como referencia Hoekstra PF, Kent B, Wayne A, Neheli T, Muir D. Estrogenic activity of dicofol with the human estrogen receptor: Isomer- and enantiomer-specific implications. *Chemosphere*. 2006; 64(1): 174-177.; Badawi AF, Cavalieri EL; Rogan EG. Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and 2- and 4-hydroxylation of 17 β - estradiol in female Sprague–Dawley rats. *Carcinogenesis*. 2000; 21(8): 1593-1599.; Mueller GC, Displacement of Estradiol from Estrogen Receptors by Simple Alkyl Phenols. *Endocrinology*. 1978; 102(5):1429–1435.

2.5 SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ESTROGÉNICA EN EL AGUA

El agua es uno de los principales componentes ambientales que tiene un alto riesgo de presentar contaminación por presencia de sustancias con actividad estrogénica. Uno de sus usos actualmente está enfocado en actividades agrícolas, en donde es empleada como riego para cultivos que luego son distribuidos y consumidos por la

población. Los principales compuestos que añaden estas sustancias con efecto endocrino al agua son los desechos industriales de aguas residuales a causa de jabones, fármacos, plaguicidas, plásticos y otros productos industriales procesados cuyos desechos son arrojados a ríos, lagunas, arroyos etc. Asimismo, otro medio por el que pueden llegar disruptores endocrinos a estas fuentes hídricas es a través de residualidad excretada en la orina por el consumo de píldoras anticonceptivas, fármacos u otros productos que son desechados por el inodoro o por lavado, los cuales finalmente van a desembocar en aguas naturales (28).

Por otra parte, el agua envasada también puede presentar disruptores endocrinos. Esto se debe a que los envases pueden ser una fuente de contaminación gracias a los diversos compuestos químicos empleados para la fabricación del envase, los tapones y las líneas de envasado. Esto sucede principalmente porque los aditivos pueden migrar al agua por procesos relacionados al almacenamiento. El reutilizar las botellas de agua y/o dejarlas expuestas al sol son factores que pueden desencadenar el paso de sustancias con efecto endocrino al agua, ya que el tiempo y la radiación ayudan a su liberación en la misma (67). No obstante, la implementación de tratamientos en el agua potable busca, mediante la oxidación, eliminar compuestos orgánicos indeseables incluyendo toxinas de cianobacterias y contaminantes antropogénicos. Estos procesos emplean una combinación de eliminación de partículas, oxidación del ozono y adsorción de carbón activado para reducir en gran medida los contaminantes orgánicos en el agua potable logrando resultados favorables; sobre todo con sustancias con actividad estrogénica en donde se ha demostrado una exitosa eliminación de más del 99% con ozono (44)

2.6 ALIMENTOS CON DISRUPTORES ESTROGÉNICOS

Según estudios, se evidencia que los consumidores podrían estar expuestos a un máximo de 30 residuos diferentes de sustancias con actividad estrogénica. Tales residuos están presentes en diversos alimentos como la lechuga, los tomates o los pepinos y pueden provocar efectos “muy negativos” en el organismo. La mayoría de las altas concentraciones de este tipo de sustancias en los alimentos son moduladas por la cantidad de fertilizantes, pesticidas y plaguicidas utilizados en los mismos al momento de la siembra. Sin embargo, la mayor concentración de dichas sustancias no siempre se encuentra en frutas y verduras de cultivos comerciales, sino también en productos cárnicos debido a que dichas sustancias con actividad estrogénica se acumulan en el tejido adiposo de los animales (Tabla 3) (37).

TABLA 3. Sustancias Disruptoras Estrogénicas en Alimentos

Compuesto o sustancia	Uso	Presencia en alimentos
Bisfenol A	Plásticos	Agua y jugos embotellados
Ftalatos		
Hidroxibutilanisol	Antioxidante	Cereales, pasteles, pastas, derivados de soya, aceites vegetales y grasas animales (manteca, mantequilla, lardo)
Ketoconazol	Antimicótico	Contaminante del agua
Metiltestosterona	Medicamento – Fármaco	Contaminante del agua
Flutamida		
Clomifeno		
Finasterida		
Letrozol		
Emate		
Dieldrín	Agricultura – Insecticida	Cultivos de frutas y verduras
Endosulfán		
Diazinon		
Lindano		
Metil clorpirifos, cipermetrina		
Fenoxicarb		
Deltametrin	Agricultura – Insecticida	Cereales
Clorpirifos	Agricultura – Insecticida	Productos cárnicos y procesados, frutas y verduras
Cipermetrina	Agricultura – Insecticida	Alimentos procesados Cultivos de frutas y verduras
Clozolinato	Agricultura – Fungicida	
Vinclozolina		
Bupirimato		
Captan		
Clorotalonil		
Ciproconazole		
Triadimenol		
Iprodiona	Agricultura – Fungicida	
Epoxiconazole	Agricultura – Fungicida	Cereales
Tebuconazole		
Propizamida	Agricultura – Herbicida	Cultivos de frutas y verduras

Fuente: Tomado y modificado de Romano D. Disruptores endocrinos. Nuevas respuestas para nuevos retos. Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud. 2013.

Teniendo en cuenta que los plaguicidas son sustancias tóxicas con actividad disruptora endocrina y se aplican directamente a los productos alimenticios, se establecen unas normas y leyes que rigen su uso, aplicación y manejo. A nivel mundial la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) a través de la Comisión del Codex Alimentarius, proponen a los gobiernos los Límites Máximos de Residuos (LMR) que establecen la concentración máxima de un residuo de plaguicida que se permite legalmente como aceptable en o sobre un producto agrícola para consumo humano o animal y publica el “Manual sobre la Presentación y Evaluación de Datos sobre Residuos de Plaguicidas para la Estimación de los Límites Máximos de Residuos en Alimentos y Piensos”, donde se incorporan los principios actuales de trabajo para la evaluación de residuos de plaguicidas y recomendar el LMR (68). La FAO también establece el Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas (69) donde se estipula la normatividad de carácter mundial para el manejo de plaguicidas, ensayo de plaguicidas, reducción de los riesgos para la salud y el ambiente, requisitos reglamentarios y técnicos, disponibilidad y utilización, distribución y comercio, cumplimiento del Código y seguimiento de su aplicación.

Adicionalmente, relativo al LMR en productos vegetales; se dispone del Real Decreto español 280/1994 de 18 de febrero (70) , sobre límites máximos y control de residuos de plaguicidas en productos vegetales y el Reglamento (CE) N ° 396/2005 del parlamento europeo y del consejo de 23 de febrero de 2005 (71) donde se estipula que los LMR en alimentos de origen vegetal y animal, a fin de proteger la salud animal y humana, fijan un límite máximo de 0,01 mg/kg aplicable por defecto.

En Colombia, según el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) se han registrado 2543 plaguicidas hasta la fecha (72) y tanto su uso como manejo se reglamenta mediante el Decreto 1843 de 1991, donde estipula que los LMR en alimentos del Codex Alimentario se adoptan como estándares nacionales. Además, se menciona la clasificación de toxicidad y permisos de uso en el país (capítulo III), La producción, proceso y formulación de plaguicidas (capítulo V). Los parámetros establecidos para la aplicación de plaguicidas en formas aérea y terrestre para los diferentes ámbitos: agrícolas, pecuarios, edificaciones, área pública, productos alimenticios (capítulo IX), los desechos y los residuos de plaguicidas (capítulo XII), la vigilancia epidemiológica y control sanitario de plaguicidas (capítulo XV) (73).

Aunque las concentraciones de disruptores estrogénicos que se han encontrado en la mayoría de alimentos –hortalizas-, cumplen con el LMR (74,75) y la Ingesta diaria admisible (IDA) establecidos por la Unión Europea (71) y el Codex alimentarius (76) (Tabla 4), el consumidor debe saber que estos valores no tienen en cuenta sus efectos acumulativos ni el efecto sinérgico que se puede llegar a presentar, ya que la combinación de dos o más plaguicidas presentes en el producto alimenticio y/o algunas formulaciones de plaguicidas que contienen aditivos (coadyuvantes) pueden aumentar la actividad de la sustancia estrogénica; por ende, estas combinaciones son generalmente más tóxicas (7,9).

TABLA 4. Ingesta diaria admisible (IDA) de plaguicidas y límites máximos de residuos (LMR) para hortalizas

Plaguicidas	IDA (mg/kg de peso corporal)	LMR (mg/kg)	
Endosulfan	0.006	Espinaca	2.0
		Apio	2.0
Malathion	0.02	Espinaca	3.0
Clorpirifos	0.01	Lechuga	0.1
Dimetotato	0.01	Lechuga	2.0
Diazinon	0.03	Lechuga	0.5
		Espinaca	0.5
Iprodiona	0.06	Lechuga	10
Clorotalonil	0,003	Perejil	3.0
Deltametrin	0.01	Rugula	2.0

Fuente: Elaboración propia. Tomando como referencia el Decreto Número 1843 de 1991, por el cual se reglamentan parcialmente los títulos III, V, VI, VII y XI de la ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas, la Resolución Número 2906 de 2007, por la cual se establecen los Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas – LMR- en alimentos para consumo humano y en piensos o forrajes y el Reglamento (UE) 2018/687 de la comisión de 4 de mayo de 2018, que modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) n.o 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de acibenzolar-S-metilo, benzovindiflupir, bifentrina, bixafen, clorantraniliprol, deltametrin, flonicamid, fluazifop-P, isofetamida, metrafenona, pendimetalina y teflubenzurón en determinados productos.

2.7 EFECTOS CLÍNICOS EN EL SISTEMA ENDOCRINO POR SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ESTROGÉNICA

El sistema endocrino está conformado por un conjunto de glándulas, tales como la de la tiroides, las gónadas y las glándulas adrenal y pituitaria, que sintetizan y liberan hormonas como tiroxina, estrógenos, progesterona y adrenalina, entre otras importantes para el desarrollo de muchos procesos del organismo como el crecimiento, la reproducción, el metabolismo y el comportamiento de animales (34).

Durante los últimos años, muchos estudios han querido determinar cómo se ve afectada la salud por la presencia de disruptores endocrinos en diferentes productos usados habitualmente. En muchos de ellos se concluye que la incidencia de enfermedades ocasionadas por estas sustancias ocurre en los países más industrializados; siendo estos lugares los que más datos han proporcionado en relación a efectos a largo plazo, no sólo observados en animales salvajes y/o de

experimentación, sino por los que ya se han podido observar en personas y en diversos estudios epidemiológicos (1).

Los efectos comprobados en diversos estudios varían desde, alteraciones en el sistema inmunológico (77) y aumento del retraso del crecimiento intrauterino y malformaciones tipo criptorquidia, hipospadias y politelia por exposición perinatal a PCBs y DDT respectivamente (78); disminución del recuento espermático (79); alteraciones del desarrollo sexual (menarquia precoz, ginecomastia) y de enfermedades hormono dependientes como la endometriosis (80). También se establece una relación en la aparición de células tumorales interviniendo en la formación de cáncer de ovario, testículos y tiroides, así como en el desarrollo de enfermedades neurológicas, inmunológicas y metabólicas tales como síndrome metabólico, obesidad y diabetes (19) (Tabla 5.).

TABLA 5. Efectos adversos que generan los disruptores endocrinos sobre la salud.

Sistema afectado	Enfermedades ocasionadas
Sistema reproductor masculino	Infertilidad y malformaciones congénitas tracto urogenital como criptorquidia (no descenso testicular) e hipospadias (posición anormal de la apertura de la uretra).
Enfermedades metabólicas	Síndrome metabólico, diabetes, obesidad.
Tumores en órganos Hormono –Dependientes	Cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de testículo, cáncer de tiroides.
Sistema neurológico	Déficits cognitivos o de conducta: hiperactividad y dificultad de concentración, pérdida de memoria, pérdida auditiva, falta de coordinación motora, dificultades en el aprendizaje.
Sistema reproductor femenino	Pubertad precoz, reducción de la fecundidad, síndrome de ovarios poliquístico, reducción de la fertilidad, resultados adversos del embarazo, endometriosis, fibroides uterinos (tumores no cancerosos).
Trastornos del sistema neuro-inmunológico	Encefalopatía miálgica, síndrome de fatiga crónica, síndrome de fatiga postviral, fibromialgia, esclerosis múltiple.
Enfermedades cardiovasculares	Riesgo de enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial (presión alta), cardiopatía coronaria (infarto de miocardio), enfermedad cerebrovascular (apoplejía), enfermedad vascular periférica, insuficiencia cardíaca, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita, miocardiopatías.

Fuente: Tomado y modificado de García K, Romano D. Directo a tus hormonas: guía de alimentos disruptores Residuos de plaguicidas con capacidad de alterar el sistema endocrino en los alimentos españoles. Ecologistas en Acción. 2016.

Por otro lado, la exposición de los seres vivos a los plaguicidas; cuya composición viene a estar dada como un cóctel de sustancias (algunas estrogénicas) y no solamente un principio activo; representan un gran peligro a la salud debido a que en su mayoría pueden producir efectos citotóxicos, genotóxicos, teratogénicos, carcinogénicos y demás (Tabla 6), produciendo así un efecto negativo en el desarrollo y reproducción de muchas especies; adicionalmente, muchos de estos compuestos son contaminantes orgánicos persistentes (COPs) y por ello tienen la capacidad de bioacumularse y biomagnificarse en el medio ambiente, la cadena alimenticia e incluso llegan a depositarse en el tejido adiposo de los animales y del hombre (54).

TABLA 6. Efectos tóxicos de los plaguicidas en seres vivos.

Plaguicida	Concentración	Modelo experimental	Efectos tóxicos
Clorpirifos	1-3 mg/L	Anfibios-Renacuajos	<ul style="list-style-type: none"> DL50 después de una exposición entre 24 y 96 horas
	7,5 – 17,5 mg/kg/día durante 30 días.	Ratas	<ul style="list-style-type: none"> Disminución significativa en los testículos del peso húmedo, la motilidad de los espermatozoides, el recuento de espermatozoides epididimarios y el contenido de ácido siálico y glucógeno. Disminución de testosterona en suero
	>12.5mg	Ratas	<ul style="list-style-type: none"> Cambios degenerativos severos con un marcado daño del epitelio, espermatogénesis irregular e incompleta y carencia de esperma en estudios histológicos testiculares
	40.4mg/L - 101mg/kg	Ratas	<ul style="list-style-type: none"> Aumenta la inhibición de acetilcolinesterasa entre 74,64% y 97,06%, respectivamente.
	Exposición aguda a 50 y 100mg/kg/día durante 3 días y exposición crónica 1,12 y 2,24mg/kg/día durante 90 días	Ratas	<ul style="list-style-type: none"> Se evidencia que el índice de daño del ADN aumenta significativamente y es dependiente de las dosis administradas. Tanto la exposición aguda como crónica es potencialmente genotóxica

Flurocloridona en presentaciones comerciales Twin Pack Gold (TPG) y Rainbow	0,25-15 µg/ml.	Línea celular CHO-K1 in vitro	<ul style="list-style-type: none"> • Los compuestos fueron capaces de inducir el intercambio de cromátides hermanas • El índice de proliferación celular decrece
	5 µg/ml de formulación comercial TPG	Líneas celulares CHO-K1 y HepG2 in vitro	<ul style="list-style-type: none"> • Incrementa la frecuencia de micronúcleos
	10 - 15 µg/ml	Líneas celulares CHO-K1 y HepG2 in vitro	<ul style="list-style-type: none"> • Efectos citotóxicos (cambios morfológicos, pérdidas de la integridad de la membrana plasmática y alteraciones nucleares) • En células HepG2 se observó que los formulados comerciales fueron capaces de inducir alteraciones de la actividad mitocondrial y lisosomal.
	2,96 mg/L de formulación comercial TPG y 2,85 mg/L de formulación comercial Rainbow	Anfibios- Renacuajos	<ul style="list-style-type: none"> • DL50 a las 96 horas después de exposición • Inducen efectos genotóxicos a las 48 como a las 96 horas de exposición
	0,71 mg/L de formulación comercial Rainbow	Anfibios- Renacuajos	<ul style="list-style-type: none"> • Incrementa la frecuencia de micronúcleos a las 48 horas de exposición
Dimetoato	24,64 µg/L y 60.00 µg/L	Pez cebrá	<ul style="list-style-type: none"> • DL50 después de 72 horas de exposición del embrión y DL50 después de 96 horas de exposición del adulto, respectivamente.
	35 µg/L	Pez cebrá	<ul style="list-style-type: none"> • La mortalidad de embriones se incrementó a 88%.
	0.03 y 0.4 mg/L	Anfibios- Renacuajos	<ul style="list-style-type: none"> • Se produce parálisis extensa
	0,041-0. 053 mg/L	Anfibios- Renacuajos	<ul style="list-style-type: none"> • La mortalidad de renacuajos se incrementa

Endosulfán	1mg/kg/día de endosulfán desde el día 6 al 20 del embarazo.	Ratas gestantes	<ul style="list-style-type: none"> • Potencialmente teratogénico • Induce toxicidad en el desarrollo (provoca hidrocefalia interna, hipoplasia cerebelosa, la microftalmia, los riñones contraídos y con muescas, el hígado multilobulado, la pelvis renal dilatada, la osificación incompleta de los huesos del cráneo, las anomalías de las costillas, etc.).
	1.25, 2.5, 5.0 y 10.0 mg/huevo	Huevos de gallinas fértiles	• Mortalidad del 6.66, 30.00, 63.33 y 70.00%, respectivamente.
Malatión	1.25, 2.5, 5.0 y 10.0 mg/huevo	Huevos de gallinas fértiles	• Mortalidad del 10.0, 30.0, 83.33 y 93.33%, respectivamente

Fuente: Elaboración propia. Tomando como referencia Sparling DW, Fellers G. Comparative toxicity of chlorpyrifos, diazinon, malathion and their oxon derivatives to larval *Rana boylii*. *Environmental Pollution*. 2007; 147(3): 535 – 539.; Suresh CJ, Mathur R, Gulati N. Testicular toxicity of chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in albino rat. *Toxicology and Industrial Health*. 2007; 23(7): 439 – 444.; Nilesh KM, How HS, Vishna DN. Evaluation of neurotoxicity of repeated dermal application of chlorpyrifos on hippocampus of adult mice. *Ann Agric Environ Med*. 2008; 15: 211-216.; Anugya M, Radhey SV, Nalini S. Chlorpyrifos-induced DNA damage in rat liver and brain. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2008; 49(6): 426 – 433.; Nikoloff N. Genotoxicidad de herbicidas de importancia agroeconómica en Argentina. [Trabajo de grado doctorado en Ciencias Naturales]. Argentina: Universidad Nacional de la plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo; 2013.; Shabnam A, Badre AA. Embryo and Fingerling Toxicity of Dimethoate and Effect on Fecundity, Viability, Hatchability and Survival of Zebrafish, *Danio rerio* (Cyprinidae). *World Journal of Fish and Marine Sciences*. 2011; 3(2): 167 – 173.; Berrill M, Coulson D, McGillivray L, Pauli B. Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anuran amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1998; 17(9): 1738 – 1744.; Pourmirza AA. Toxic Effects of Malathion and Endosulfan on Chick Embryo. *J. Agr. Sci. Tech*. 2000; 2: 161 – 166.

3. OBJETIVOS

3.1 GENERAL

Detectar la presencia de sustancias con actividad estrogénica en la superficie de diferentes productos agrícolas de la sabana de Bogotá previamente lavados de manera rutinaria utilizando la técnica YES (*Yeast Estrogen Screen*)

3.2 ESPECÍFICOS

- Cuantificar en Equivalentes de Estradiol (EEQ) sustancias con actividad estrogénica en hortalizas provenientes de la sabana de Bogotá.
- Comprobar la efectividad del lavado rutinario de los productos agrícolas frente a la eliminación de sustancias con actividad estrogénica
- Asociar con posibles prácticas agrícolas la presencia de sustancias con actividad estrogénica en hortalizas de la sabana de Bogotá.

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo es de tipo experimental.

4.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Hortalizas con posible presencia de sustancias con actividad estrogénica

4.3 MUESTRA

Hortalizas provenientes de cultivos ubicados en zonas aledañas a fuentes hídricas (ríos) de la sabana de Bogotá que posiblemente presentan contaminación con disruptores hormonales de tipo estrogénico.

4.4 HIPÓTESIS Y VARIABLES

4.4.1 HIPÓTESIS

Existe la presencia de sustancias y compuestos de tipo estrogénico en diversas hortalizas que se cultivan en la sabana de Bogotá. Muchos de estos cultivos utilizan fuentes hídricas con altos grados de contaminación y adicionalmente son tratados con una gran cantidad de plaguicidas que pueden quedar adheridos en la superficie de las hortalizas y que no pueden ser retirados eficientemente con un lavado rutinario.

4.4.2 VARIABLES INDEPENDIENTES

Hortalizas pertenecientes a cultivos ubicados en la sabana de Bogotá, de las cuales se sospecha el uso de plaguicidas y fuentes hídricas aledañas que se encuentran contaminadas

4.4.3 INDICADORES

Saccharomyces cerevisiae modificada genéticamente para detectar actividad estrogénica.

4.4.4 VARIABLES DEPENDIENTES

Sustancias con actividad estrogénica en las hortalizas provenientes de la sabana de Bogotá

4.5 TÉCNICA Y PROCEDIMIENTO

4.5.1 MÉTODO

El método empleado para detectar la presencia de disruptores endocrinos con actividad estrogénica en las hortalizas es la técnica *Yeast Estrogen Screen*; esta es utilizada para detectar y cuantificar actividades estrogénicas de compuestos capaces de unirse al receptor humano de estrógenos. Se basa en el uso de una levadura recombinante (*Saccharomyces cerevisiae*) que expresa el receptor estrogénico humano (hER α), y plásmidos de expresión que llevan secuencias sensibles al estrógeno (ER) que controlan la expresión del gen informador lac-Z, codificando la enzima β -galactosidasa. Por lo tanto, en presencia de estrógenos, la β -galactosidasa se sintetiza y se secreta en un medio que contiene un indicador cromogénico –CPRG (clorofenol rojo β -D galactopiranosido) –, actuando sobre él como sustrato y reduciéndolo para posteriormente producir galactosa y clorofenol rojo que causarán un cambio o viraje de color amarillo a rojo en el medio. El resultado se detecta mediante la lectura espectrofotométrica a 540 nm (24, 81).

Una de las ventajas de esta técnica es que la levadura naturalmente no posee un receptor de estrógeno y evita la compleja interacción que existe entre el receptor de estrógeno y los receptores para otros esteroides, hormonas peptídicas y factores de crecimiento que pueden estar asociados con los sistemas (82). Además, esta técnica arroja resultados cuali y cuantitativos, es altamente específica, reproducible y rápida.

4.5.2 RECONSTITUCIÓN DE LA CEPA

En esta fase inicial, se toma la cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* y se inocula en medio de crecimiento. Este medio se prepara siguiendo el protocolo de Roughtledge y Sumpter (1996) (ver Anexo 1); para ello, se tiene en cuenta que la preparación se debe realizar en recipientes de vidrio que no estén contaminados y que no hayan tenido contacto previo con una sustancia química estrogénica, de otro modo conducirán a falsos positivos. El material de vidrio, espátulas y todo el material del procedimiento se limpian escrupulosamente con etanol absoluto.

En el proceso se utiliza un frasco de 200 mL al cual se le agrega 50 mL de medio de crecimiento y un volumen de inóculo de 500 μ L, se deja incubando con agitación de 100 rpm a una temperatura de 30°C por 24 horas; posteriormente se realiza lectura de la densidad óptica a 630 nm ajustando el inóculo para que quede entre 0,8 y 1 con el medio de crecimiento con el fin de obtener una concentración aproximada de 4×10^7 ufc/mL. Por último, la evaluación y seguimiento de la levadura al término de la

cilantro (*Coriandrum sativum*), espinaca (*Spinacia oleracea*), perejil (*Petroselinum crispum*), apio (*Apium graveolens*) y rúgula (*Eruca vesicaria*).

Para la selección de las hortalizas se tuvieron en cuenta las siguientes características:

- Las muestras pueden provenir de un mismo municipio, pero no de un mismo cultivo (finca)
- Cercanía de los cultivos a una fuente hídrica con la que posiblemente riegan los cultivos
- Debe presentar un aspecto físico aceptado para su consumo (Color, olor, textura, apariencia)

4.5.5 PROCESO PARA EXTRACCIÓN DE MUESTRAS PROBLEMA

De cada hortaliza se pesan 150 gramos, se lavan con agua para retirar los restos de tierra o suciedad como se realiza rutinariamente en los hogares y posteriormente se secan por contacto con toallas de papel desechables. Luego, con ayuda de una jeringa se realiza un lavado durante 1 minuto con 5 mL de etanol absoluto para extraer de la superficie cualquier sustancia lipofílica que pueda estar presente, y que posiblemente tenga actividad de tipo estrogénico. El etanol que se obtiene después del lavado de las hortalizas (sobrenadante) se guarda en frascos color ámbar y se lleva a 4°C para su posterior análisis (Figura 3.).



FIGURA 3. Procedimiento para la extracción de muestras problema. Técnica de lavado con etanol realizada en cada hortaliza.

4.5.6 PROTOCOLO DE LA PRUEBA

Para realizar los ensayos se preparó una solución patrón de 26,1 mg/L 17β- estradiol marca Calbiochem (Merck) (CAS 50-28-2) de 97% de pureza en etanol absoluto y a partir de esta se hicieron 18 diluciones seriadas para obtener concentraciones de: 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. Estas diluciones de 17β- estradiol se hicieron para elaborar una curva de calibración con la que se interpolan los resultados de las muestras.

A partir de cada una de las diluciones preparadas de 17-β-estradiol y las muestras de etanol obtenidas después de la extracción de las hortalizas, se realizó el montaje por triplicado en donde se colocó 10 μL a cada uno de los pozos de la microplaca, se dejó evaporar en cabina de flujo laminar y luego se adicionaron 200 μL del medio de trabajo. Posteriormente, se incuban las placas a 30°C con agitación de 100 rpm durante 72 horas y se realiza la lectura en un lector de placas de ELISA BioRad a 540 nm (densidad óptica a la cual se realiza la lectura colorimétrica del CPRG) y a 630 nm (densidad óptica a la cual se lee la turbidez del crecimiento de la levadura) (Figura 4.).



FIGURA 4. Disposición para el montaje en placas de ensayo. Ejecución de la curva control y muestras en microplaca para su respectivo análisis.

Los resultados obtenidos de las diferentes diluciones de 17β- estradiol y las muestras se obtuvieron utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Valor corregido} = \text{D.O.muestra (540 nm)} - [\text{D.O muestra (630 nm)} - \text{D.O blanco (630 nm)}]$$

La actividad estrogénica de las muestras se calcula interpolando la lectura corregida en la curva dosis-respuesta del 17 β -estradiol realizada con concentraciones entre 16875 ng/L a 0,128 ng/L. La actividad estrogénica se expresó en Equivalentes de Estradiol (EEQ). La curva de 17 β -estradiol se ajustó (función sigmoideal con pendiente variable) utilizando el programa Sigma Plot, el cual calcula el valor EC50 (Concentración Efectiva Media).

Para establecer la reproducibilidad de la prueba se construyó la carta control con los resultados de EC50 obtenidos en veinte pruebas sucesivas con 17 β -estradiol, con la cual se puede verificar la estabilidad de la respuesta biológica obtenida con *Saccharomyces cerevisiae* recombinante. Se calculó el valor promedio y la desviación estándar de los resultados obtenidos, así como el límite superior e inferior (promedio más o menos dos desviaciones estándar) para definir el intervalo de variación en el que se encuentra el valor de EC50. Los valores EC50 se graficaron colocando el punto final (EC50) en la ordenada y el número del ensayo en la abscisa.

Además, se determinaron los valores NOEC (mayor concentración ensayada sin efecto observable) y LOEC (menor concentración ensayada con efecto observable) en la curva dosis- respuesta.

5. RESULTADOS

Las muestras fueron montadas en microplacas junto a una curva 17 β -estradiol (Figura 5.), un control negativo y un blanco; una vez incubadas las placas se realiza lectura por espectrofotometría. Se obtiene una curva óptima, un control negativo validando la prueba y los resultados para las muestras problema. Así mismo, se tiene en cuenta el viraje de color amarillo a rojo en presencia de sustancias con actividad estrogénica.

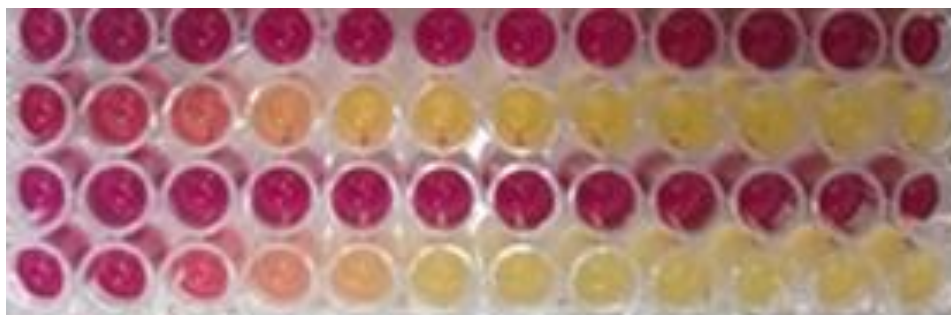


FIGURA 5. Viraje de color amarillo a rojo en las curvas realizadas con solución patrón de 17 β -estradiol

Se realizaron 20 ensayos con 17 β - estradiol con concentraciones entre 16875 ng/L y 0,128 ng/L. Los resultados de las 20 pruebas se presentan en la tabla del Anexo 3. Se calculó para cada ensayo la Concentración Efectiva Media (EC50) en excel con la fórmula matemática $EC50=10^{(LN(A)/-B)}$. Con estos valores se elaboró la carta control de la prueba, mostrando el promedio y el límite superior (106 ng/L) e inferior (47 ng/L) para definir el intervalo de variación en el que se encuentra el valor de EC50 (Figura 6).

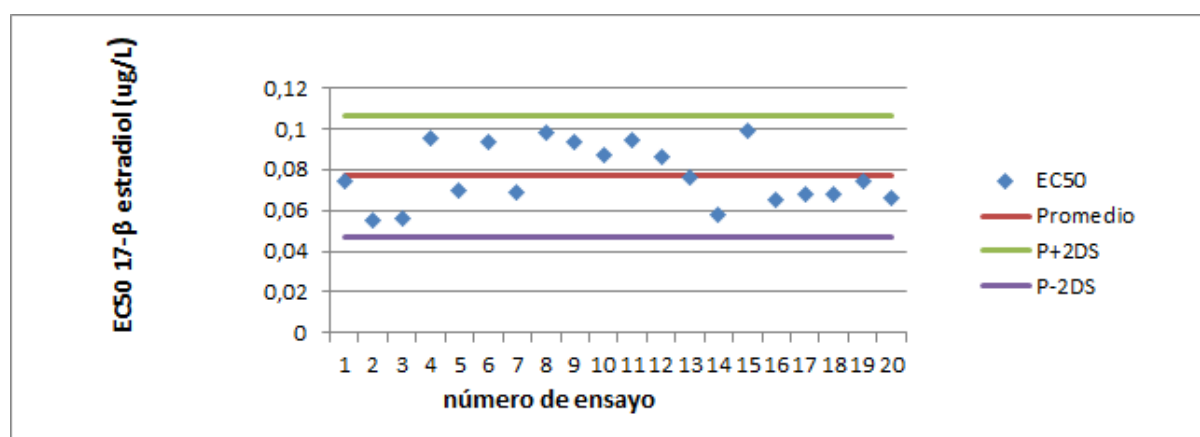


FIGURA 6. Carta control de la técnica Yeast Estrogen Screen con 17 β -estradiol.

En la figura 7 se presenta la curva dosis-respuesta para las diferentes concentraciones de 17 β -estradiol (0,128 ng/L a 16875 ng/L) expresada como la

actividad de la β -galactosidasa. Para la medición de esta actividad se utilizó el programa Sigma Plot. Los resultados correspondientes a los veinte ensayos mostraron que el valor promedio de la EC50 fue de 76,6 ng/L con una desviación estándar de 14,75 ng/L valores del mismo orden de magnitud que los obtenidos por Cifuentes en el año 2013 (24) de 79,1 ng/L con una desviación estándar de 11 ng/L. Además, se obtuvo una concentración de 2ng/L para NOEC y 4ng/L para LOEC.

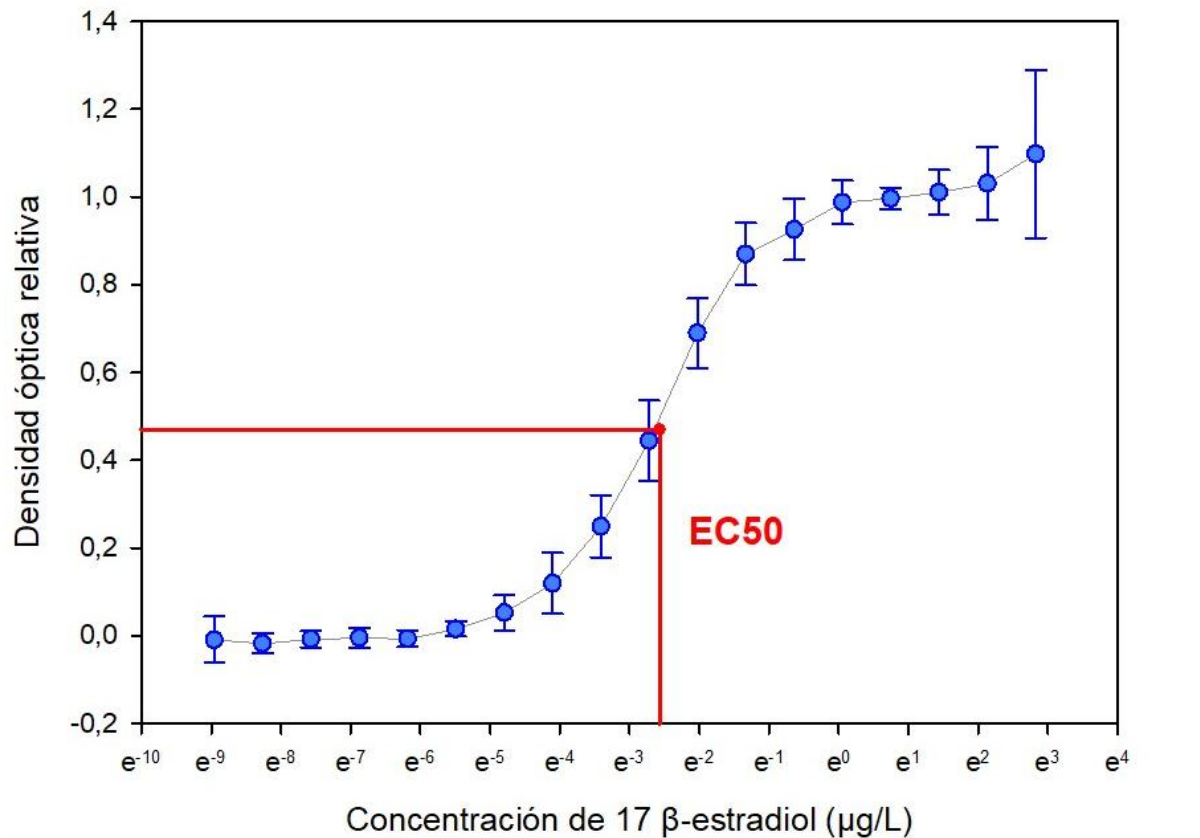


FIGURA 7. Densidad óptica relativa vs. concentración de 17β-estradiol.

Los resultados obtenidos de los ensayos frente a la actividad estrogénica de las hortalizas seleccionadas en los diferentes municipios de la sabana de Bogotá aparecen en la tabla 7, tabla 8 y la figura 8. Los datos que allí se encuentran son concentraciones equivalentes en estradiol (EEQ) en los cuales se tuvo en cuenta las densidades ópticas corregidas de las muestras y de las curvas en la carta control (Anexo 3).

TABLA 7. Resultados de actividad estrogénica obtenidos en las diferentes muestras de hortalizas de la sabana de Bogotá.

Ubicación	Muestra (Hortaliza)	Densidad óptica corregida	Actividad estrogénica (ng/L EEQ)
Cota	Perejil	0,179	<4
	Perejil	0,197	<4
	Lechuga Lisa	0,181	<4
	Espinaca	0,286	4
Tenjo	Lechuga Lisa	0,185	<4
	Espinaca	0,182	<4
Tabio	Cilantro	1,328	135
	Lechuga Lisa	0,205	<4
	Espinaca	0,211	<4
Facatativá	Lechuga Lisa	0,26	<4
	Lechuga Crespa	0,165	<4
	Lechuga Crespa	0,165	<4
	Lechuga Lisa	0,188	<4
	Espinaca	0,168	<4
	Espinaca	0,16	<4
	Perejil	0,166	<4
Mosquera	Lechuga Lisa	0,169	<4
	Cilantro	0,168	<4
	Espinaca	0,163	<4
	Lechuga Lisa	0,168	<4
	Apio	0,17	<4
Sopó	Lechuga Lisa	0,167	<4
	Cilantro	0,34	8
Chía	Espinaca	0,17	<4
	Lechuga Lisa	0,221	<4
Zipaquirá	Perejil	0,396	10
	Lechuga Lisa	0,167	<4
Gachancipá	Espinaca	0,197	<4
	Rúgula	0,25	<4
Bojacá	Lechuga Crespa	0,179	<4
Tocancipá	Lechuga Lisa	0,166	<4
Cultivo Orgánico de la capital de Cundinamarca (Bogotá D.C)	Espinaca	0,445	11

INTERPRETACIÓN: ≥ 4 ng/L: Actividad estrogénica

<4 ng/L: No se detecta actividad estrogénica

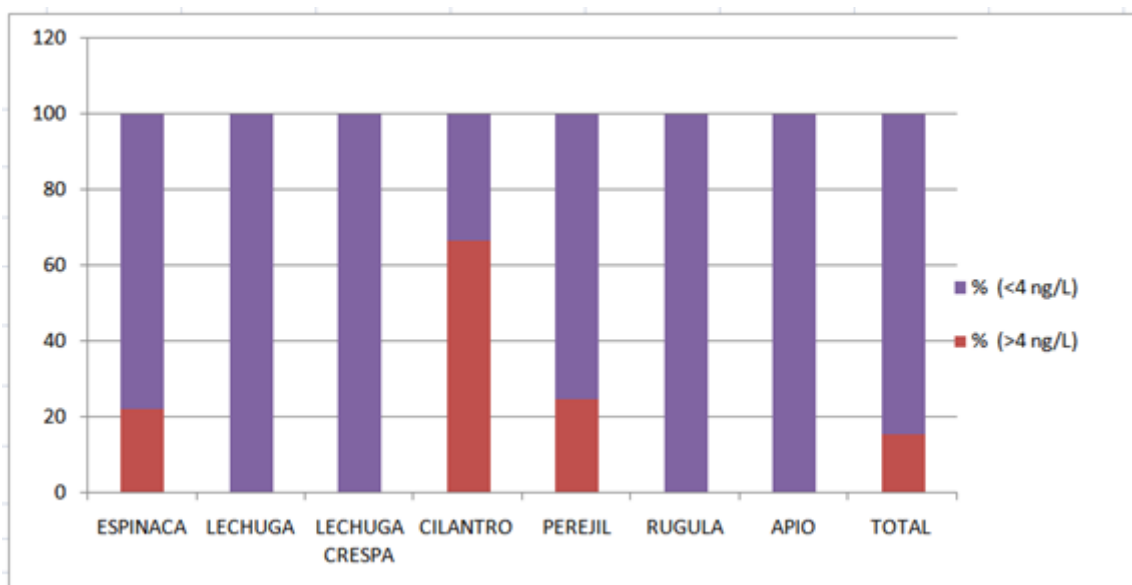


FIGURA 8. Porcentaje de muestras con concentraciones >4 ng/l ó <4 ng/l EEQ.

TABLA 8. Resultados porcentuales de la actividad estrogénica (EEQ) en las muestras analizadas.

MUESTRAS	MUESTRAS >4 ng/L	% (>4 ng/L)	MUESTRAS <4 ng/L	% (<4 ng/L)	TOTAL DE MUESTRAS
ESPINACA	2	22	7	78	9
LECHUGA LISA	0	0	9	100	9
LECHUGA CRESPA	0	0	5	100	5
CILANTRO	2	67	1	33	3
PEREJIL	1	25	3	75	4
RUGULA	0	0	1	100	1
APIO	0	0	1	100	1
TOTAL	5	16	27	84	32

6. DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos, se observa que de las 32 muestras analizadas sólo 5 presentan sustancias con actividad estrogénica mayor a 4 ng/L EEQ, las cuales fueron el cilantro de Tabio y Sopó, la espinaca de Cota y Bogotá y el perejil de Zipaquirá. Se tiene en cuenta que aun cuando se analizaron diversos tipos de hortalizas procedentes de un mismo municipio, cada muestra provenía de un cultivo distinto. Por lo anterior, las concentraciones >4 ng/L (Limite de detección de la levadura) puede corresponder a diferentes factores como el lugar de procedencia, el tipo de hortaliza y el diferente manejo que se le dé a la siembra en el proceso de cultivo ya sea por el uso de plaguicidas (Tabla 9), el uso de fuentes hídricas con las que se riega el cultivo (Tabla 10) y el tipo de suelo utilizado para la actividad agrícola.

TABLA 9. Pesticidas y plaguicidas usados generalmente en los cultivos de hortalizas.

Hortalizas	Plaguicidas utilizados
Lechuga crespa	<ul style="list-style-type: none">• Etilentiourea• Pronamida• Profam
Lechuga lisa	<ul style="list-style-type: none">• Etilentiourea• Pronamida• Profam• Ometoato
Cilantro	<ul style="list-style-type: none">• Clorpirifos• Endosulfán• Dimetoato
Espinaca	<ul style="list-style-type: none">• Ditiocarbamatos: maneb y mancozeb• Clorpirifos• Cipermetrina• Deltametrin
Apio	<ul style="list-style-type: none">• Clorotalonil
Rúgula	<ul style="list-style-type: none">• Clorpirifos
Perejil	<ul style="list-style-type: none">• Clorpirifos• Glifosato

Fuente: Elaboración propia. Tomando como referencia los Registros Nacionales de pesticidas y plaguicidas del 2019 del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y la Resolución Número 2906 de 2007, por la cual se establecen los Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas – LMR- en alimentos para consumo humano y en piensos o forrajes.

TABLA 10. Posibles fuentes hídricas de abastecimiento para riego de cultivos de las muestras analizadas.

UBICACIÓN	AGUA DE RIEGO
COTA	Río Bogotá y la subcuenca Sector Tibitó
TENJO	Río Chicú
TABIO	Río Frío
	Agua tratada
FACATATIVA	Río Los Andes
MOSQUERA	Laguna de la Herrera y Río Bogotá
	Río Bogotá
SOPÓ	Río Teusaca
TOCANCIPÁ	Río Tibitó Chiquito (entre el Río Neusa y Tibitó Grande)
ZIPAQUIRÁ	Río Neusa

Fuente: Elaboración propia tomando como referencia Miranda D, Carranza C, Fischer G. Calidad de agua de riego en la sabana de Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Grupo de Horticultura. 2008; Pérez Preciado J. La estructura ecológica principal de la Sabana de Bogotá. [Sociedad Geográfica de Colombia]. Academia de ciencias geográficas; 2018. CAR. Plan de ordenamiento y manejo de la cuenca hidrográfica del río Bogotá. [Resumen ejecutivo]. Autoridad Ambiental; 2006. CAR. Hidrogeología en la zona crítica en la sabana de Bogotá. [Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca]. Subdirección de administración de recursos naturales y áreas protegidas; 21 de mayo de 2009.

En el caso de la espinaca cultivada en la capital de Cundinamarca (Bogotá D.C) se esperaba que al provenir de un cultivo orgánico no debería mostrar altas concentraciones de sustancias con actividad estrogénica ya que se evita el uso de compuestos químicos como plaguicida o pesticidas y en lo posible se utilizan abonos sin fertilizantes. Sin embargo, fue una de las muestras donde se encontró mayor concentración de disruptores estrogénicos por lo que probablemente otros factores diferentes al uso de plaguicidas y el agua de riego proveniente de ríos aledaños sean las causantes de dicha presencia; sobre todo, considerando que es el agua de lluvia la utilizada para el riego del cultivo. En este caso se tiene en cuenta factores como el uso de abono orgánico producido mediante el compostaje y el uso de la misma agua lluvia; no obstante, no se puede descartar la posibilidad de que contrariamente a lo esperado en este tipo de cultivos alternativos, sí se estén utilizando compuestos químicos con el objetivo de maximizar la siembra. En el caso del compostaje, para su elaboración se utilizan residuos como la materia orgánica y las heces de algunos animales; esto hace que en el abono orgánico utilizado en el suelo del cultivo pueda haber una mayor probabilidad de concentración de fitoestrógenos, xenoestrógenos y hormonas naturales que se mezclan y actúan sinérgicamente potencializando así la acción de los mismos.

Con respecto al uso del agua lluvia como parte de la forma de riego del cultivo, se observa que también influye en la concentración de sustancias con actividad

estrogénica en las hortalizas debido a que contiene gran cantidad de contaminantes. Según estudios realizados por Torres y colaboradores (83), en la capital de Cundinamarca durante el 2011 se determinó que el agua de lluvia contiene metales pesados como cadmio o plomo y están presentes en elevadas concentraciones superando el valor límite recomendado para riego agrícola; y recientemente en el 2018 Madera y colaboradores (84), determinaron altas concentraciones de estronas, 4-iso-nonilfenol y bisfenol A en el ciclo urbano del agua en Colombia. Por lo cual, la calidad de este tipo de agua no es apta para aprovecharla en actividades de riego en plantas.

Por otro lado, la espinaca procedente del municipio de Cota arrojó resultados también positivos superiores a 4 ng/L EEQ; no obstante, esta hortaliza provenía de un cultivo convencional. Los pesticidas posiblemente empleados (Ver tabla 9) pueden ser la causa de la presencia de sustancias con actividad estrogénica en la superficie de la hortaliza. Con respecto a lo anterior, es necesario tener en cuenta que el cultivo de espinaca es bastante exigente, prefiere terrenos fértiles, profundos, bien drenados, ricos en materia orgánica y nitrógeno. Debido al alto contenido de nutrientes, este cultivo es propenso a diversas plagas y enfermedades como nematodos, pulgones, gusanos grises, moscas de la remolacha, entre otros. Lo anterior provoca que las múltiples sustancias pesticidas y químicos utilizados para combatir estas enfermedades sean suministrados en concentraciones elevadas. Dicha información ya ha sido comprobada en diversos análisis en los cuales se han cuantificado residuos de pesticidas y fungicidas superando los límites permitidos establecidos, lo que indica que probablemente sea el origen de la presencia de disruptores estrogénicos en la hortaliza (85).

Con el cilantro, se observa que las dos muestras obtenidas en dos municipios distintos (Tabio y Sopó) arrojaron resultados >4ng/L para sustancias con actividad estrogénica. Aunque no se conocen muchas enfermedades en el cilantro, es necesario usar pesticidas de amplio espectro debido a la posible enfermedad comúnmente conocida como mancha bacteriana; el patógeno causante se ubica en la semilla por lo que la enfermedad se propaga a través de la misma pudiendo llegar a contaminar a otros cultivos. La lluvia y el riego favorecen el desarrollo y la propagación de la enfermedad, por lo cual en la mayoría de los casos se usan clorpirifos junto a otros componentes químicos que actúan inhibiendo el crecimiento de la bacteria causante de la enfermedad, y a su vez actúan contra la maleza, insectos, plagas, roedores y otros a los que puede estar expuesto el cultivo de cilantro por la cercanía al suelo (40 a 60 cm de altura). Actualmente, otro de los pesticidas empleados en el cilantro es el endosulfán; en el mercado su uso es prohibido por la alta toxicidad y su alto potencial de contaminación ambiental y de bioacumulación por ser considerado como disruptor estrogénico. Sin embargo, en algunas regiones de Colombia se sigue comercializando, por lo cual no se descarta la posibilidad de su implementación en cultivos como la muestra de cilantro recolectada en el municipio de Tabio por la elevada concentración de estrógenos encontrados sobre su superficie (86,87).

La muestra de Perejil correspondiente al municipio de Zipaquirá mostró una concentración >4 ng/L EEQ. Los pesticidas más utilizados en estos cultivos, como en el caso anterior, son los clorpirifos, pero también se encuentra el glifosato. No obstante, estudios han demostrado que estas sustancias generan diversos riesgos

sobre la salud humana y los agro-ecosistemas a nivel mundial. Estos componentes pueden actuar como mimetizadores estrogénicos y ser responsables de la detección de disruptores con actividad estrogénica en el ensayo realizado para la cuantificación de dichas sustancias.

No obstante, se ha observado que las raíces de las plantas tienden a absorber del suelo residuos de plaguicidas, por lo que muchas veces es mayor su concentración en ellas que en las partes altas o aéreas de la planta (88,89). Aun así, la totalidad de la planta se puede ver afectada cuando son muy cercanas al suelo como en el caso de algunas hortalizas mencionadas previamente; lo anterior, debido a que este tipo de vegetales, en su mayoría, posee hojas grandes pudiendo retener mayor cantidad de pesticidas y evitando que una parte de dichas sustancias caiga en el suelo.

Posiblemente, algunos cultivos de donde se obtuvieron las muestras analizadas se abastecen para sus riegos de diversos puntos de ríos cercanos, en los cuales se evidencia que las fuentes hídricas presentan un alto grado de contaminación. El río Bogotá recorre varios municipios de Cundinamarca, abasteciendo a un gran número de personas, que utilizan esta fuente para actividades agrícolas e industriales. Este río presenta un 98% de contaminación en diferentes niveles por cuenta de las aguas residuales de más de ocho millones de bogotanos y de aproximadamente 47 municipios de Cundinamarca, sin contar con las aguas residuales de las industrias y los residuos de pesticidas utilizados en la agricultura de la sabana (90). La utilización del agua del río Bogotá o de las subcuencas altas y bajas para riego directo sobre los cultivos, hace suponer que incrementa la posibilidad de contaminación por disruptores estrogénicos en las muestras recolectadas para el análisis. Aun así, no se puede asegurar que es esta la principal razón de los hallazgos encontrados durante el estudio.

Finalmente, aunque de las 32 muestras analizadas solo el 16% obtuvieron resultados $> 4\text{ng/L}$ para sustancias con actividad estrogénica (Tabla 8.), no se garantiza que el porcentaje restante de las muestras analizadas (84%) que obtuvieron resultados $< 4\text{ng/L}$ en el bioensayo estén en efecto libres de compuestos estrogénicos, puesto que la detección de disruptores estrogénicos solamente se realizó de manera superficial en las hortalizas sin tener en cuenta procesos de absorción de pesticidas o la afinidad e interacción de estos con las células vegetales que puedan haber presentado las muestras analizadas disminuyendo de esta manera las concentraciones de actividad estrogénica a nivel superficial (91).

Se debe considerar que, aunque algunas hortalizas presentaron concentraciones muy bajas de este tipo de sustancias, los disruptores tienden a presentar procesos de bioacumulación en el organismo del consumidor generando problemas de salud. Esto se puede evidenciar en estudios realizados en diversos organismos donde la administración crónica de plaguicidas incluso en bajas dosis puede producir efectos teratogénicos, citotóxicos, genotóxicos y demás (ver tabla 6) que pueden generar efectos adversos en el desarrollo de los seres vivos.

Cabe resaltar que los procesos de limpieza que se le realizan a este tipo de productos para su consumo no serían suficientes para eliminar este tipo de sustancias. Por ello, este tema requiere más atención y análisis para aumentar las líneas de investigación

que propongan métodos y protocolos estandarizados que ayuden a detectar y regular los límites máximos de estos compuestos en los alimentos agrícolas consumidos en el país.

7. CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de sustancias con actividad estrogénica en la superficie de 5 muestras de las 32 hortalizas analizadas (sometidas previamente a un lavado rutinario con agua) a través de la técnica *Yeast Estrogen Screen*, la cual resulta útil para brindar un acercamiento en cuanto a la presencia de este tipo de sustancias. Se hallaron concentraciones >4ng/L EEQ en el cilantro de Tabio (135ng/L) y Sopó (8ng/L), la espinaca de Cota (4ng/L) y Bogotá (11ng/L) y el perejil de Zipaquirá (10 ng/L) y en las 27 muestras analizadas restantes se obtuvieron concentraciones <4ng/L EEQ. Lo anterior indica que las prácticas de limpieza que se realizan rutinariamente en los hogares colombianos con el uso de agua para retirar partículas de suciedad a este tipo de productos agrícolas no son suficientes para eliminar completamente compuestos con actividad estrogénica.

La presencia de sustancias con actividad estrogénica en las hortalizas se puede asociar a la implementación de diversas prácticas agrícolas como el uso de los plaguicidas y/o pesticidas. Los cuales dependiendo de su composición y necesidades específicas de los cultivos (control de insectos, hongos, maleza, etc.) se aplican directamente en los mismos y aumentan la concentración de sustancias con actividad estrogénica. Adicionalmente, la implementación de aguas provenientes de fuentes hídricas contaminadas puede influir aumentando las concentraciones de sustancias con actividad estrogénica o actuando sinérgicamente con los pesticidas logrando potencializar los efectos de disrupción endocrina.

Sin embargo, queda en evidencia que otras prácticas como el uso de agua lluvia para el riego del cultivo o el abono orgánico empleado por el agricultor durante la siembra puede llegar a influir directamente en el aumento o disminución de sustancias con actividad estrogénica que se puedan llegar a detectar en la superficie de las hortalizas.

8. RECOMENDACIONES

A partir de los presentes resultados se hacen las siguientes recomendaciones:

- Se debe realizar un estudio más profundo en otros posibles factores que puedan llegar a influir en la presencia de sustancias con actividad estrogénica en las hortalizas como el tipo de cultivo (hidropónico, orgánico, entre otros.), el tipo de abono, el uso de fertilizantes, etc.
- Hacer determinaciones de actividad estrogénica mediante la técnica Yeast Estrogen Screen en muestras agrícolas, y confirmar con análisis cromatográfico la presencia de compuestos químicos específicos

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 ₄) 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 Mínimo 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.

CONCENTRACION N 17 B ESTRADIOL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	PROMEDIO
16875	2,714	2,263	2,666	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	1,754	1,285	1,317	1,374	2,248
8437,5	2,796	2,629	2,795	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	1,743	1,253	1,231	1,327	2,106
4218,75	2,862	2,775	2,840	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	1,753	1,216	1,286	1,258	2,057
2109,38	2,789	2,654	2,881	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	1,813	1,162	1,170	1,171	1,983
1054,7	2,818	2,324	2,612	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	1,696	1,020	1,038	1,048	1,871
527,35	2,822	2,378	2,427	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	1,598	0,890	0,871	0,860	1,738
263,7	2,855	2,245	2,274	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	1,614	0,749	0,677	0,672	1,613
131,85	1,954	1,759	1,781	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	1,554	0,631	0,560	0,593	1,297
66	1,060	1,223	1,138	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	1,227	1,087	0,979	1,104	1,050
33	0,517	0,830	0,829	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	0,982	0,795	0,834	0,887	0,720
16,5	0,366	0,572	0,624	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	0,751	0,670	0,617	0,541	0,521
8,25	0,255	0,313	0,414	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	0,416	0,411	0,390	0,402	0,333
4	0,217	0,278	0,256	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	0,331	0,272	0,262	0,281	0,266
2	0,210	0,222	0,207	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	0,172	0,203	0,199	0,206	0,203
1	0,204	0,252	0,251	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	0,210	0,182	0,175	0,182	0,210
0,5	0,202	0,187	0,187	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	0,197	0,174	0,172	0,174	0,198
0,25	0,207	0,184	0,192	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	0,205	0,167	0,165	0,171	0,186
0,128	0,606	0,180	0,188	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	0,211	0,163	0,163	0,168	0,203

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Estors Sastre B. Exposición a disruptores endocrinos y otros factores paternos en la etiología del hipospadias y la criptorquidia. [Trabajo de grado doctorado en Investigación Translacional en Salud Pública y Enfermedades de Alta Prevalencia]. Palma de Mallorca: Universidad de las Islas Baleares. Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud; 2018.
- 2-Nivia E. Los plaguicidas en Colombia. *Revista Semillas*. 2004; 21:11–16. Disponible en: <http://www.semillas.org.co/es/los-plaguicidas-en-colombia>
- 3- Corporate Europe Observatory. Horel S. Un asunto tóxico: Cómo el lobby de la industria química bloqueó la adopción de medidas contra los disruptores endocrinos. París: Bruselas. 2015. Disponible en: https://corporateeurope.org/sites/default/files/attachments/info_un-asunto-toxico.pdf
- 4- 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. *SAMeR*. 2009; 24:74-86. Disponible en: http://www.samer.org.ar/revista/numeros/2009/vol24_n2/6_disruptores_endocrino.pdf
- 5- EUROSTAT Statistics Explained. Estadísticas sobre residuos. Disponible en: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Waste_statistics/es
- 6- Field B, Hughes CL, Selub M. Reproductive Effects of Environmental Agents. *Seminars in Reproductive Medicine*. 1990; 8(01): 44-54. doi: 10.1055/s-2007-1021422
- 7- Diel P, Smolnikar K, Michna H. In vitro test systems for the evaluation of the estrogenic activity of natural products. *Planta Médica*. 1999; 65(3):197-203. Available from: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/pdf/10.1055/s-1999-13980.pdf>
- 8- Romano D. Disruptores endocrinos. Nuevas respuestas para nuevos retos. Instituto Sindical de Trabajo, Ambiente y Salud. 2013. Disponible en: http://www.istas.ccoo.es/descargas/disruptores_endocrinos_final.pdf
- 9- ISTAS. Introducción a los disruptores endocrinos. Madrid; 2002. Disponible en: <http://istas.net/descargas/Introducci%C3%B3n%20a%20los%20Disruptores%20Endocrinos.pdf>
- 10-Parra A, Torres LM, Vargas JJ. Determinación de sustancias con actividad estrogénica en la fresa (*fragaria sp.*) mediante la técnica Yeast Estrogen Screen). [Trabajo de grado]. Bogotá D.C: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Facultad de ciencias de la salud. Programa bacteriología y laboratorio clínico; 2015.
- 11-Caserta D, Maranghi I, Mantovani A, Marci R, Maranghi F, Moscarini M. Impact of endocrine disruptor chemicals in gynaecology. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2008; 14(1):59-72. doi: 10.1093 / humupd / dmm025
- 12-Olea N, Fernandez MF, Martín P. Disruptores endocrinos. El caso particular de los xenobióticos estrogénicos. II Estrógenos sintéticos. *Revista de Salud ambiental*. 2001; 1(2): 64-72. Disponible en: http://www.estudiosecologistas.org/web/Curso/Curso%20Ecuador/Disruptores%20Endocrinos/Disrupci%C3%B3n_Endocrina_Humanos.pdf
- 13-Dodds EC, Lawson W. Synthetic strogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature*. 13 June 1936; 13: 996. doi: <https://doi.org/10.1038/137996a0>

- 14- Mueller, G.C., Kim,U.H. Displacement of estradiol from oestrogen receptors by simple alkylphenols. *Endocrinology*. 1978 de mayo; 102 (5): 1429-35. doi: 10.1210 / endo-102-5-1429
- 15-Brouwer W, Ahlborg UG, van Leeuwen FXR, Feely MM. Report of the WHO working group on the assessment of health risks for humans' infants from exposure to PCDDs, PCDFs and PCBs. *Chemosphere*. 1998; 37(9-12):1627-1643 [cited 25 October 2018]. doi: 10.1016 / s0045-6535 (98) 00230-6
- 16-Yang CZ, Yaniger SI, Jordan VC, Klein DJ, y Bittner GD. Most Plastic Products Release Estrogenic Chemicals: A Potential Health Problem That Can Be Solved. *Perspectiva de la salud Ambiental [Internet]* 2011; 119 (7): 989-996 [cited 11 July 2019]. doi: 10.1289/ehp.1003220
- 17-Mueller GC, Vonderhaar B, Kim UH, LeMahieru M. Estrogenic action: an inroad to cell biology. *Recent Prog Horm Res*. 1972; 28:1-49. doi: 10.1007/bf02558535
- 18-Soto AM, Sonnenschein C. Disruptores endocrinos: una historia muy personal y con múltiples personalidades. *Gaceta Sanitaria*. 2002; 16 (3): 209-211. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/gs/v16n3/edit02.pdf>
- 19-Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernández MF, Olea N, Olea Serrano MF. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect*. 1995; 103(3):113-122. doi: 10.1289 / ehp.95103s7113
- 20-Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect*.1995; 103 (6): 582–587. doi: 10.1289 / ehp.95103582
- 21-Pérez MA, Navarro H, Miranda E. Residuos de plaguicidas en hortalizas: problemática y riesgo en México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 2013; 29:45-64. Disponible en: <https://www.revistascca.unam.mx/rica/index.php/rica/article/view/41423>
- 22-Guerrero JA. Estudio de residuos de plaguicidas en frutas y hortalizas en áreas específicas de Colombia - Jairo Arturo Guerrero. *Agron. colomb*. [Internet]. 2003; 21(3): 198 – 209. [cited 25 October 2018]. Available from: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/19815>
- 23-Castillo C, Rivas C, Fuentes R, Pérez SO, Tur M, Josep A. Assessment of pesticide residues in processed foods in Chile. *SPANISH JOURNAL OF COMMUNITY NUTRITION*. [Internet]. 2011; 17(3): 146 – 150. [cited 25 October 2018]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/298422471_Assessment_of_pesticide_residues_in_processed_foods_in_Chile
- 24-Cifuentes P. Implementación de la técnica “Yeast Estrogen Screen” para evaluar la presencia de sustancias estrogénicas en agua. [Trabajo de grado Magister en Ciencias Microbiología] Bogotá; Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias; 2013. [cited 25 January 2019]. Available from: <http://bdigital.unal.edu.co/10699/>
- 25- Aguirre CC. Determinación de la presencia de sustancias de tipo estrogenico en la superficie de alimentos para consumo en fresco procedentes de diferentes centrales de venta en la ciudad de Bogotá D.C. [Trabajo de grado]. Bogotá D.C: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Facultad de ciencias de la salud. Programa bacteriología y laboratorio clínico; 2015.
- 26-García K, Romano D. Directo a tus hormonas: guía de alimentos disruptores Residuos de plaguicidas con capacidad de alterar el sistema endocrino en los

- alimentos españoles. *Ecologistas en Acción*. 2016. Disponible en: <https://www.ecologistasenaccion.org/IMG/pdf/informe-plaguicidas-2016.pdf>
- 27-European Food Safety Authority. The 2010 European Union Report on Pesticide Residues in Food. *EFSA Journal*. 2013; 11(3):3130. doi: 10.2903/j.efsa.2013.3130
- 28-Bistan M, Podgorelec M, Logar RM, Tisler T. Yeast Estrogen Screen Assay as a Tool for Detecting Estrogenic Activity in Water Bodies. *Food Technology and Biotechnology*. 2012; 50(4):427–433. Available from: https://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=139069
- 29-Miranda D, Carranza C, Fischer G. Calidad de agua de riego en la sabana de Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Grupo de Horticultura. 2008. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/257139332_Calidad_de_agua_de_riego_en_la_Sabana_de_Bogota
- 30-Alimentados con agua del río Bogotá. *Semana*. 2017. Sec Sostenible ideas que se vuelven acciones: Impacto. Disponible en: <https://sostenibilidad.semana.com/impacto/articulo/el-agua-del-rio-bogota-se-utiliza-en-cultivos-y-ganaderia/36796>
- 31-Coster S, Van Larebeke N. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanism of action. *J Environ Public Health*. 2012; 2012:1-52.. doi:10.1155/2012/713696
- 32-Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Contaminación, disruptores endocrinos y cáncer. *Investigación Clínica*. 2016; 57(1): 77 – 92. Disponible en: www.scielo.org.ve/pdf/ic/v57n1/art09.pdf
- 33-Miller WR, Sharpe RM. Environmental oestrogens and human reproductive cancers. *Society for Endocrinology*. 1998; 5(2):69-96. doi: 10.1677/erc.0.0050069
- 34-Gómez G. Hormonas esteroides. *Biopsicología*. 2012. Disponible en: <https://biopsicologia.net/nivel-3-participaci%C3%B3n-pl%C3%A1stica-y-funcional/7.-hormonas-esteroides>
- 35-Becerro M. Las hormonas esteroideas sexuales, el envejecimiento y el ejercicio. *Revista Andaluza de Medicina del Deporte*. 2008; 1(1):22-36. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3233/323327654005.pdf>
- 36-Gómez G. Participación plástica y funcional, estrógenos. *Biopsicología*. 2012. Disponible en: <https://biopsicologia.net/es/nivel-3-participaci%C3%B3n-pl%C3%A1stica-y-funcional/7.1.-estr%C3%B3genos>
- 37-Locía J, Hernández ME, Aranda GE, Rojas F, Manzo J, Coria GA et al. El papel de los estrógenos y sus receptores en la prevención y promoción de enfermedades proliferativas de la glándula prostática. *Revista Eneurobiología*. 2013; 4(8):1-23. [Informe Académico]. Disponible en: [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)
- 38-Gómez E, Larrea F, Martínez F. Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2012; 15(1):24-36. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/tip/v15n1/v15n1a3.pdf>
- 39-Malgor L, Valsecia M. Farmacología de las hormonas sexuales femeninas. Estrógenos, antiestrógenos, progesterona, progestágenos, antiprogestágenos y anticonceptivos hormonales. *Farmacología Médica*. 2000; 4:192-210. Disponible en: https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/cap26_femen.pdf
- 40-Harriott N, Feldman J. Pesticides That Disrupt Endocrine System Still Unregulated by EPA. *Beyond pesticides*. Available from: <https://beyondpesticides.org/assets/media/documents/gateway/health%20effects/endocrine%20cited.pdf>

- 41-Zhang L, Neme-Bechara V, Escobar A, Irlles C. Los sexoesteroides y la diferenciación sexual cerebral: ¿la contaminación de xenoestrógenos modificaría la estructura social humana?? *Gaceta Médica de México*. 2013; 149:325-333 Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/gaceta/gm-2013/gm133l.pdf>
- 42-López N, Errasti T, Santiago E. Estrógenos y desarrollo del cerebro femenino en la adolescencia: Anticoncepción de emergencia. *Cuadernos de Bioética*. 2011; 12(2):185-200. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/875/87519895004.pdf>
- 43-López MT. Fitoestrógenos. *Offarm*. 2002; 21(8):136-140. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-fitoestrogenos-13035874>
- 44-González E, Cañadas de la Fuente GA, Castillo RF, Álvarez J, González C. Fitoestrógenos y sus efectos sobre la Osteoporosis en la Mujer Posmenopáusica. *Revista Clínica de Medicina de Familia*. 2010; 3(3):201-205. Disponible en: <http://scielo.isciii.es/pdf/albacete/v3n3/especial3.pdf>
- 45-Hendrich S. Phytoestrogens and phytosterols. En: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition/ CRC Press/ Ian Shaw. *Endocrine-Disrupting Chemicals in Food*. Christchurch: University of Canterbury. 2009; 437 – 458. Available from: <https://www.sciencedirect.com/book/9781845692186/endocrine-disrupting-chemicals-in-food>
- 46- Izquierdo E, Zarain A. Mecanismos moleculares de los fitoestrógenos y su relación con el cáncer. *Revista de Educación Bioquímica (REB)*. 2017; 36(4):101-110. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=77735>
- 47-López MT. Fitoestrógenos: Eficacia y seguridad. *Offarm*. 2010; 29 (3): 86-90. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-fitoestrogenos-eficacia-seguridad-X0212047X10511945>
- 48-Díaz I, Munévar L. Fitoestrógenos: revisión de tema. *Revista Colombiana de obstetricia y ginecología*. 2009; 60 (3): 274-280. Disponible en: <https://revista.fecolsog.org/index.php/index>
- 49-Olea N, Fernández MF, Martín P. Disruptores endocrinos. el caso particular de los xenobióticos estrogénicos I. estrógenos naturales. *Revista de salud ambiental*. 2001; 1(1): 6-11. Disponible en: <http://www.ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/434/357>
- 50-Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. Disruptores endocrinos. Disponible en: <http://www.elika.net/datos/articulos/Archivo1191/Disruptores%20Endocrinos%20Art.pdf>
- 51-Ayuntamiento de zaragoza. ¿Qué sabes sobre los contaminantes hormonales? Disponible en: https://www.zaragoza.es/ciudad/medioambiente/contaminantes_hormonales.htm
- 52-Olea N, Fernández MF. Xenoestrógenos y cáncer de mama. En: Díaz J y Ruibal A. *Cáncer de mama: avances en diagnóstico, tratamiento e investigación*. León: Fundación de Estudios Mastológicos; 2006. p. 319-332. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/96c9/bf89c579a1e1976df5c6db368f83136ea272.pdf>
- 53-Canales A, Celis R, Salado H, Feria A. Xenoestrógenos: función y efectos. *e-Genesis*. 2003; 1: 0. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73000102>
- 54-Martinez R. Xenoestrógenos: qué son y cómo evitarlos. *Bioeco Actual*. 2018; 51: 34-35. Disponible en: https://www.bioecoactual.com/wp-content/uploads/2018/02/bioecoactual_marzo_18_cas.pdf

- 55-Gellert RJ, Leroy W, Swerdloff RS. DDT Homologues: Estrogen-Like Effects on the Vagina, Uterus and Pituitary of the Rat. *Endocrinology*. 1972; 91(4):1095-1100. DOI: <https://doi.org/10.1210/endo-91-4-1095>
- 56-Cocca C, Ventura C, Núñez M, Randi A, Venturino A. El organofosforado clorpirifos como disruptor estrogénico y factor de riesgo para el cáncer de mama. *Acta Toxicológica Argentina*. 2015; 23 (3): 142-152. Disponible en: <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/ata/article/view/5184>
- 57-García SI. La contaminación ambiental con bifenilos policlorados y su impacto en la salud pública. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/ministerio/intoxicaciones/policlorados/bifenilos_policlorados.pdf
- 58-Colombia. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Manual para la Gestión Integral de Bifenilos Policlorados – PCB. N°1 Generalidades y conceptos básicos sobre bifenilos policlorados – PCB. Disponible en: http://www.cornare.gov.co/residuos/gestion-integral-de-bifenilos-policlorados-PCB/Tomo1_web.pdf.
- 59-Franco DA. Determinación de disruptores endocrinos del tipo bifenilos policlorados (PCBs) en suero sanguíneo de mujeres gestantes de las comunas de lanco y san josé de la mariquina por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con ionización química negativa. [Trabajo de grado]. Valdivia: Universidad Austral de Chile. Facultad de ciencias. Escuela de química y farmacia; 2013. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2013/fcf825d/doc/fcf825d.pdf>
- 60-Agencia Española de consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Preguntas y respuestas sobre dioxinas y PCBs. [cited 25 October 2018]. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/gestion_riesgos/Ficha_FAQs_Dioxinas_PCBs.pdf
- 61-Cooke PS, Sato T, Buchanan DL. (2001). Disruption of Steroid Hormone Signaling by PCBs. En: Robertson LW, Hansen LG. (Eds.), *PCBs: Recent Advances in Environmental Toxicology and Health Effects*. Kentucky: University Press of Kentucky; 2001. p. 257-264. Available from: <http://www.jstor.org/stable/j.ctt130j2pw.36>.
- 62-Cruz A, Moreno G, Lara M. Toxicología de las dioxinas y su impacto en la salud humana. *Revista de Medicina Veterinaria*. 2010; 19: 73-84. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rmv/n19/n19a07.pdf>
- 63-Editorial Overview: Environmental Endocrine Disrupting Chemicals. *Reviews on Environmental Health*. 2011. 17(4): 249-252. doi: <https://doi.org/10.1515/REVEH.2002.17.4.249>
- 64-Bustamante P, García MM, Martínez E, Vázquez F, Muñoz S, Karam MA, et al. Exposición a ftalatos por procedimientos médicos en varones recién nacidos. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 2005; 21(2): 63-69. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37021202>
- 65-Pérez JJ, Aguilar A, Villa A, Serrano H. Relación entre estructura y función de receptores para hormonas esteroidales: Receptores estrogénicos. *Vet. Méx.* 2005; 36(4): 437-452. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=5309>
- 66-Chichizola C. Disruptores Endocrinos. Efectos en la Reproducción. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*. 2004; 41(2): 78-105. Disponible en: <http://www.raem.org.ar/numeros/2004-vol41/numero-02/3chichizola.pdf>
- 67-Ecologistas en acción. Un análisis de agua embotellada en España encuentra tóxicos en todas las botellas. *Ecologistas en acción*. 2015. Disponible en:

- <https://libresdecontaminanteshormonales.wordpress.com/2015/10/16/un-analisis-de-agua-embotellada-en-espana-encuentra-toxicos-en-todas-las-muestras/>
- 68-Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Presentación y evaluación de los datos sobre residuos de plaguicidas para la estimación de los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i5452s.pdf>
- 69-Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf>
- 70-España. Ministerio de la Presidencia. Real Decreto 280/1994, de 18 de febrero, por el que se establece los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos de origen vegetal. Madrid; 1994.
- 71-Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (CE) No396/2005 del parlamento europeo y del consejo de 23 de febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo.
- 72-Instituto Colombiano Agropecuario. Registros Nacionales de pesticidas y plaguicidas. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/getdoc/d3612ebf-a5a6-4702-8d4b-8427c1cdaeb1/registrosnacionales-pqua-15-04-09.aspx>
- 73-Colombia. Presidente de la República. DECRETO NÚMERO 1843 DE 1991, por el cual se reglamentan parcialmente los títulos III, V, VI, VII y XI de la ley 09 de 1979, sobre uso y manejo de plaguicidas. Bogotá D.C; 1991.
- 74-Colombia. Ministerio de la Protección Social. RESOLUCION NÚMERO 2906 DE 2007, por la cual se establecen los Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas – LMR- en alimentos para consumo humano y en piensos o forrajes. Bogotá D.C: El Ministerio; 2007
- 75-Diario Oficial de la Unión Europea. Reglamento (UE) 2018/687 de la comisión de 4 de mayo de 2018, que modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) n.o 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de acibenzolar-S-metilo, benzovindiflupir, bifentrina, bixafen, clorantraniliprol, deltametrin, flonicamid, fluazifop-P, isofetamida, metrafenona, pendimetalina y teflubenzurón en determinados productos.
- 76-Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius. Informe de la 25a reunión del Comité del Codex sobre Residuos de Plaguicidas. Disponible en: file:///C:/Users/valen/Downloads/al93_24As.pdf
- 77-Haase H, Fahlenkamp A, Schettgen T, Esser A, Gube M, Ziegler P, et al. Immunotoxicity Monitoring in a Population Exposed to Polychlorinated Biphenyls. *Int J Environ Res Public Health*. 2016; 13(3): 295. doi: <https://doi.org/10.3390/ijerph13030295>
- 78-Longnecker MP, Klebanoff MA, Brock JW, Zhou H, Gray KA, Needham LL, Wilcox AJ. Maternal serum level of 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene and risk of cryptorchidism, hypospadias, and polythelia among male offspring. *Am J Epidemiol*. 2002; 155(4):313-22. DOI: <https://doi.org/10.1093/aje/155.4.313>
- 79-Irvine, D. S. Male reproductive health: cause for concern? *Andrologia*. 2000; 32(4-5):195-208. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0272.2000.00388.x>
- 80-Yum, T., Lee, S. y Kim, Y. Association between precocious puberty and some endocrine disruptors in human plasma. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2013; 48 (8): 912-7. doi: <https://doi.org/10.1080/10934529.2013.762734>

- 81-Klein KO, Baron J, Colli MJ, McDonnell DP, Cutler GB Jr. Estrogen levels in childhood determined by an ultrasensitive recombinant cell bioassay. *The Journal of Clinical Investigation*. 1994; 94(6): 2475-2480. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI117616>
- 82-Routledge EJ, Sumpter JP. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1996; 15(3): 241-248. doi: <https://doi.org/10.1002/etc.5620150303>
- 83-Torres A, Méndez S, López L, Marín V, González JA, Suárez JC et al. Evaluación preliminar de la calidad de la escorrentía pluvial sobre tejados para su posible aprovechamiento en zonas periurbanas de Bogotá. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 2011; 14 (1): 127-135. Disponible en: <https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/765>
- 84-Madera CA, Jiménez EM, Toro AF, Lara JA, Bedoya DF, Duque V. Estudio exploratorio de la presencia de microcontaminantes en el ciclo urbano del agua en Colombia: caso de estudio Santiago de Cali. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 2018; 34(3): 475-487. doi: <http://dx.doi.org/10.20937/RICA.2018.34.03.10>
- 85-Gil R, Carrillo D, Jimenez J. Determinación de las principales plagas de la espinaca (*Spinacia oleracea*) en Cota, Colombia. *Revista colombiana de entomología*. 2007; 33 (2): 124-128. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882007000200006
- 86-Gutiérrez J, Parra C, Blach D, Zuluaga D, Zárate M, Rojas A et al. Determinación de residuos de plaguicidas en trabajadores agrícolas del municipio de Barcelona, Quindío - Colombia. *Rev Chil Salud Pública*. 2014; 18 (3): 263-273. doi: 10.5354/0719-5281.2014.33972
- 87-Instituto Nacional de Salud. Identificación de riesgos químicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia Disponible en: <https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Publicaciones%20ERIA%20y%20Plaguicidas/ER%20PELIGROS%20QUIMICOS%20EN%20LECHE.pdf>
- 88-Márquez SM, Mosquera R, Herrera MR, Monedero C. Estudio de la absorción y distribución del clorpirifos en plantas de pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hochst ex chiov.) cultivadas hidropónicamente. *Rev. Colomb. Cienc. Pecu.* 2010; 23(2) 158-165. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10495/8343>
- 89-Trabajo Microbiología. Problemática de los Plaguicidas. Disponible en <http://www.ugr.es/~cjl/plaguicidas.pdf>
- 90-Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca – CAR. Boletín del Índice de calidad de agua en corrientes superficiales “ICA” 2018-II. Disponible en: <https://www.car.gov.co/uploads/files/5c51b98998a3a.pdf>
- 91-Navarro S, Barba A. Comportamiento de los plaguicidas en el medio ambiente. Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. 1996; 9(95) Disponible en https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1995_09.pdf