

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

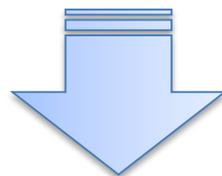


Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico
Asesora PATRICIA CIFUENTES
Bogotá
2019

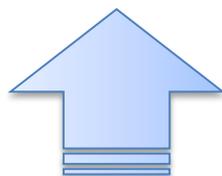
INTRODUCCIÓN

COMPUESTOS DE DISRUPCIÓN ENDOCRINA (EDCs)

DISRUPTOR CON ACTIVIDAD ESTROGÉNICA

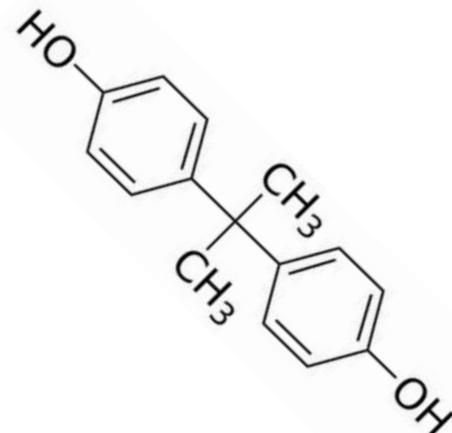


SISTEMA ENDOCRINO



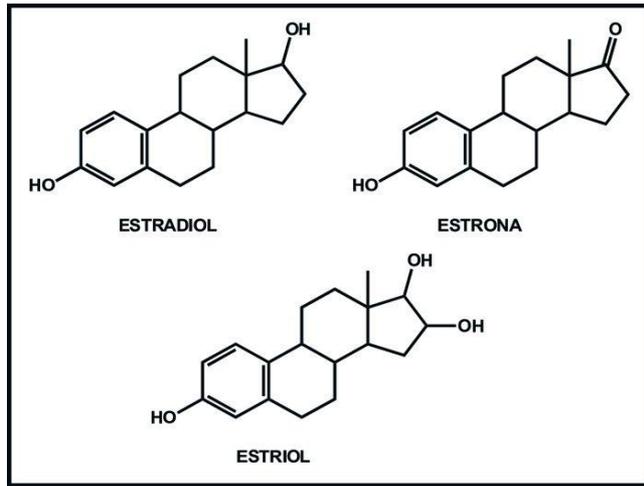
PLAGUICIDAS

CONTAMINANTES
HORMONALES

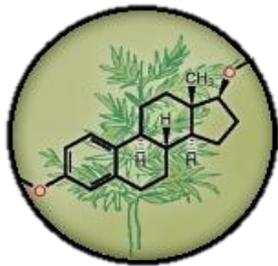


DISRUPTORES ENDOCRINOS

Naturales



Estrógenos



Fitoestrógenos

- Isoflavonas
- Lignanos
- Cumestanos

Sintéticos



Anticonceptivos



Plaguicidas

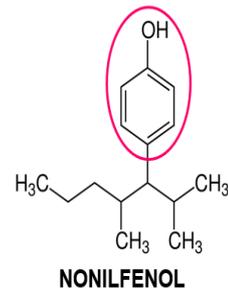
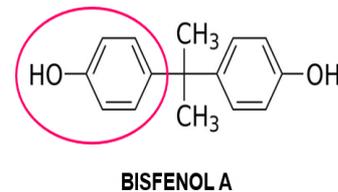
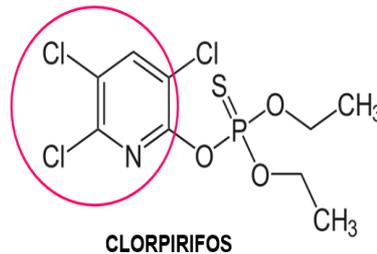
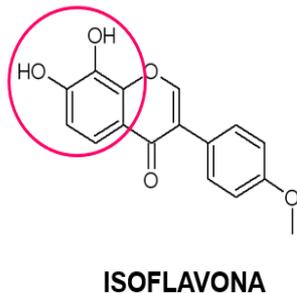
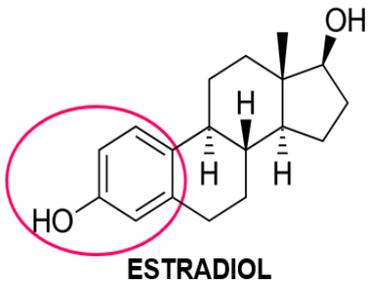
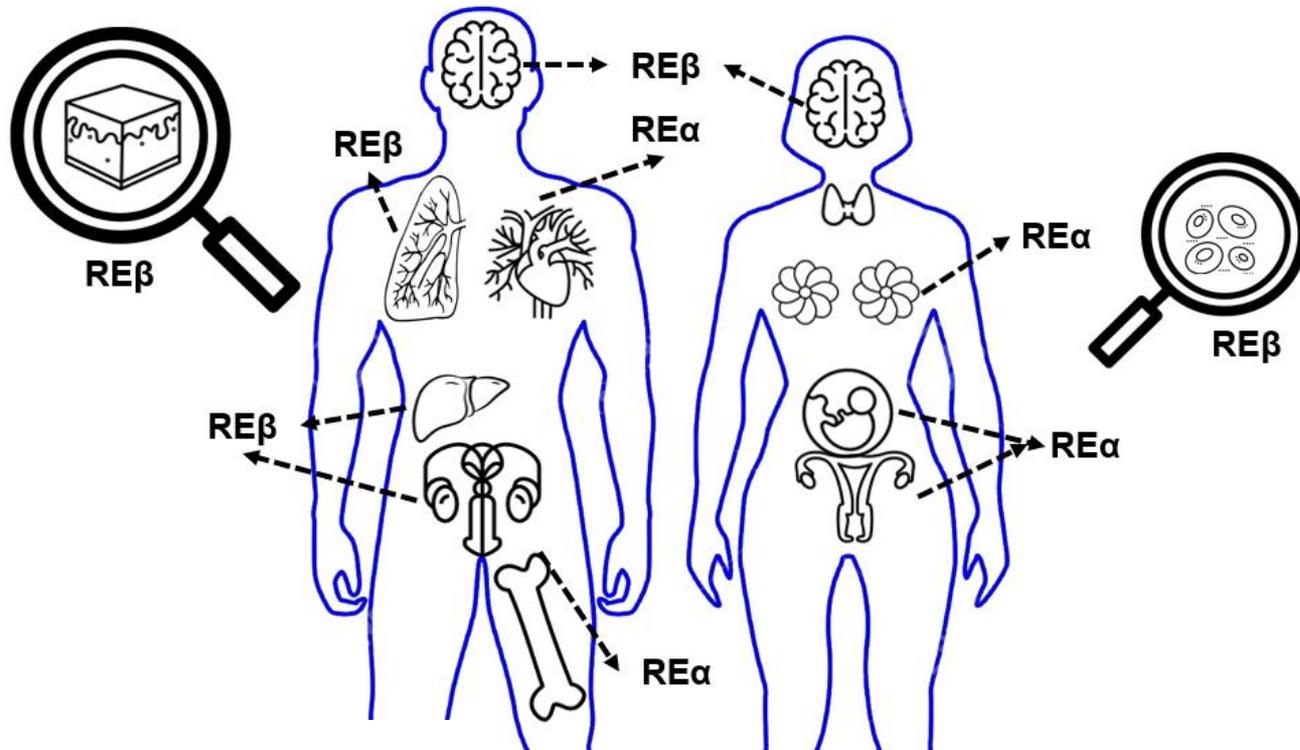


PCBs, dioxinas y furanos



Ftalatos

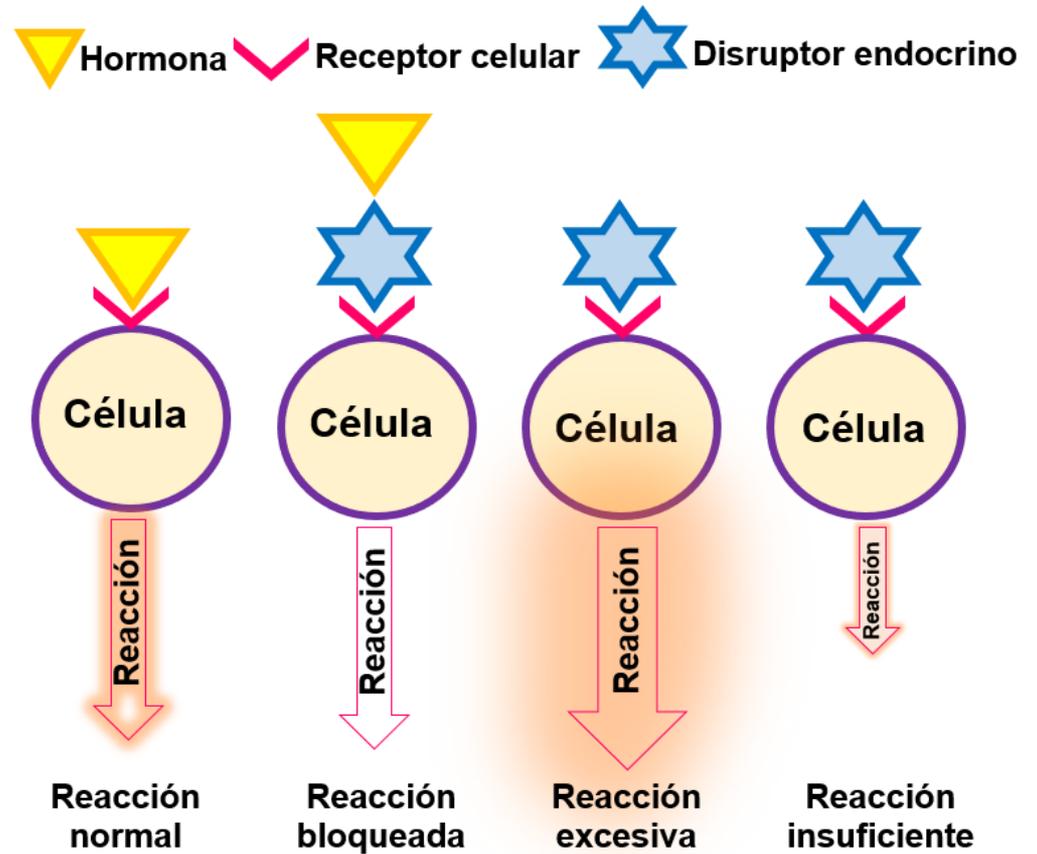
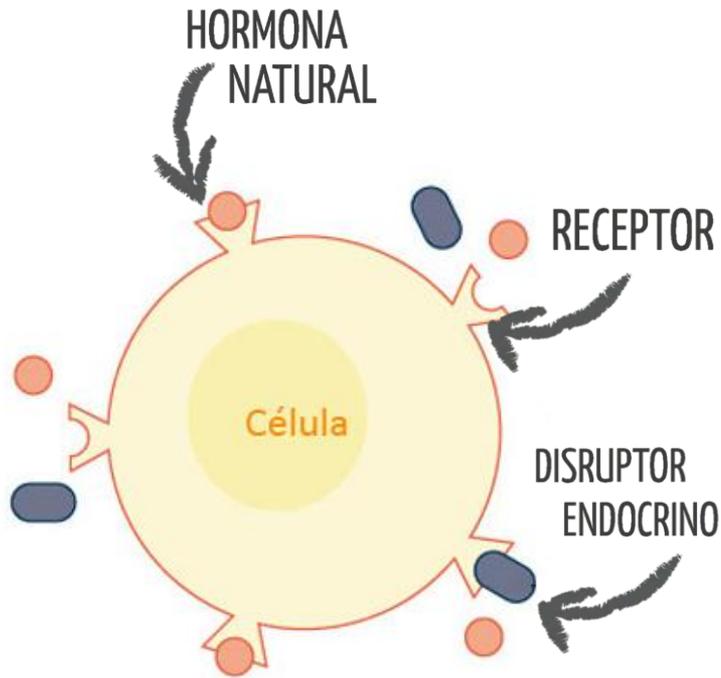
RECEPTORES ESTROGENICOS



Naturales

Sintéticos

MECANISMOS DE ACCIÓN





Clorpirifos → 3 días → 50-100 mg/Kg/día
 90 días → 1,12 – 2,24 mg/Kg/día
 Daños genotóxicos

Endosulfán → 1 mg/Kg/día → potencialmente teratogénico
 0,03 mg/L → parálisis



Decreto 1843 de 1991

Plaguicidas	IDA (mg/Kg de peso corporal)	LMR (mg/Kg)	
Endosulfán	0.006	Espinaca	2.0
		Apio	2.0
Clorpirifos	0.01	Lechuga	0.1

ANTECEDENTES



Proliferación de Cultivo celular estrógeno-sensible con el nonilfenol presente en los tubos de plástico de poliestireno



Presencia de residuos de metales pesados en hortalizas cultivadas en la sabana de Bogotá sometidas a riego con aguas del río Bogotá



1972

1991

1995

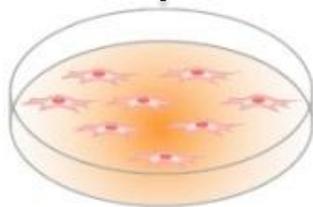
2008

2011

Se prohíbe el insecticida DDT (derivado organoclorado)

El endosulfán Induce proliferación de células cancerígenas y la síntesis-secretión de proteínas

Presencia de residuos de pesticidas en alimentos utilizando métodos analíticos por cromatografía



ANTECEDENTES



Cuantificación de disruptores estrogénicos en fresas con la técnica YES

Los clorpirifos son los plaguicida con actividad estrogénica más hallados en los alimentos

2013

2015

2015

2016

Implementación de la técnica YES para evaluar la presencia de sustancias con actividad estrogénica en agua.

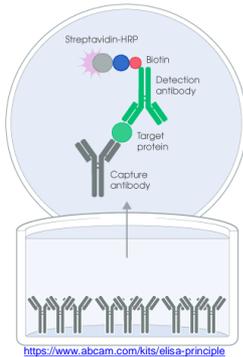


Se evidencian sustancias con actividad estrogénica en la superficie de alimentos que provenían de distintos puntos de venta en la ciudad de Bogotá empleando la técnica YES

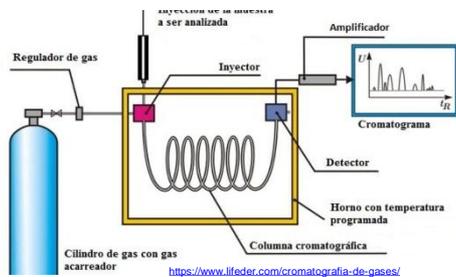


MÉTODOS DE DETECCIÓN DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ESTROGENICA

Compuestos



ELISA



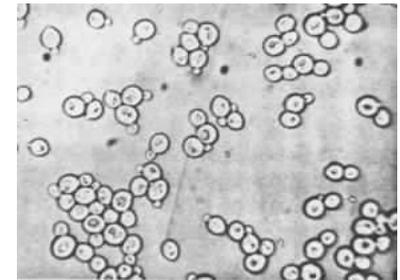
Cromatografía

Actividad



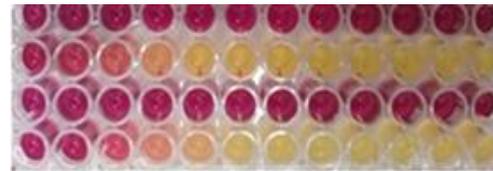
<https://www.becara.com/es/otros-accesorios/1183-pez-curvo-grcolores.html>

Vitelogenina



<https://www.barbonbeercompany.com/post/levadura-cervicera>

E- Screen



YES

OBJETIVOS

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)

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.

DISEÑO METODOLÓGICO

TIPO DE ESTUDIO

Experimental

TIPO DE MUESTRAS

Hortalizas de la sabana de Bogotá

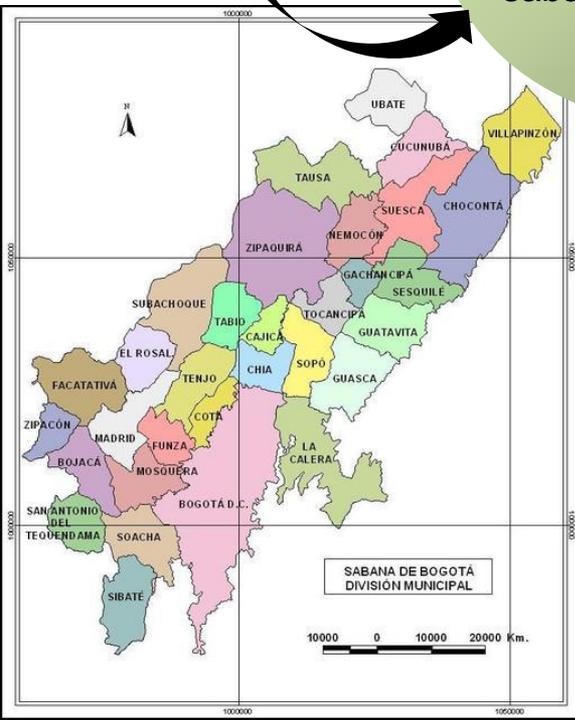


INDICADORES

Saccharomyces cerevisiae modificada genéticamente para detectar actividad estrogénica.

FINALIDAD

Detección de sustancias con actividad estrogénica



MÉTODO

Técnica Yeast Estrogen Screen (YES)

Uso de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que expresa el receptor estrogénico humano (hER α)

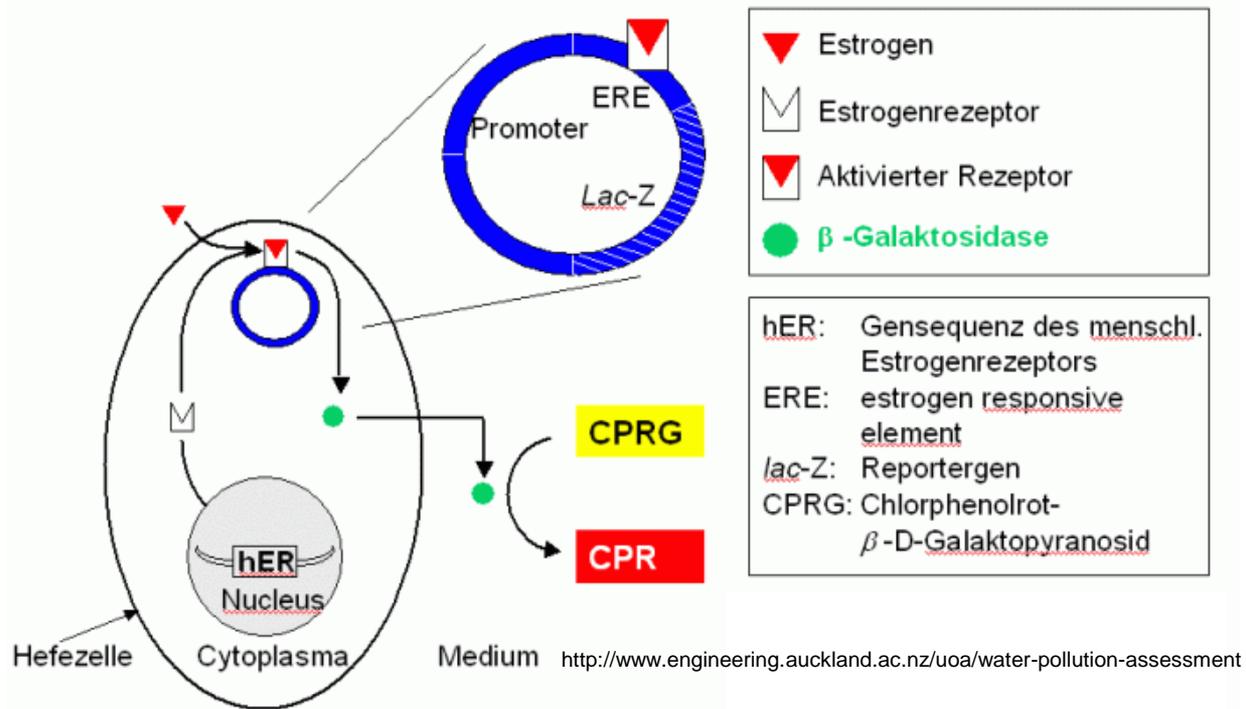
En presencia de estrógenos se sintetiza la enzima β -galactosidasa.

Indicador
cromogénico
CPRG (cloro fenol
rojo β -D
galactopiranosido)

La β -galactosidasa
metaboliza el
sustrato cromogénico
CPRG

Cambio o viraje de
color amarillo a rojo
en el medio

lectura
espectrofotométrica



RECOLECCIÓN DE HORTALIZAS

MUNICIPIOS DE RECOLECCION DE MUESTRAS

Tabio

Tenjo

Zipaquirá

Facatativá

Chía

Cota

Tocancipá

Gachancipá

Sopó

Mosquera

Bojacá

Bogotá

MUESTRAS POTENCIALES

Lechuga lisa

Lechuga crespa

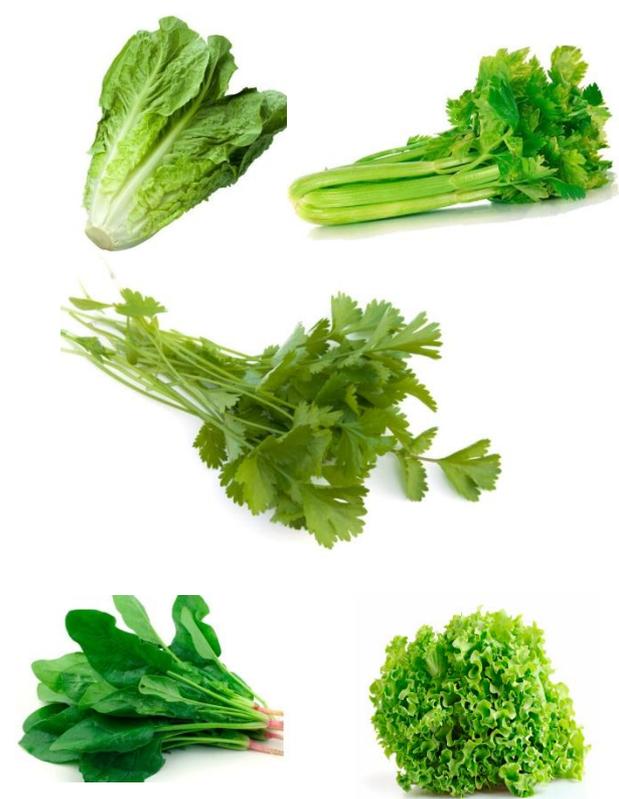
Cilantro

Espinaca

Perejil

Rúgula

Apio



CARACTERISTICAS

Las muestras pueden provenir de un mismo municipio pero no de un mismo cultivo

Ríos o cuencas aledañas con los que posiblemente riegan los cultivos de muestreo

Propiedades físicas del producto

EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

Recolección de las muestras

Hortalizas de la sabana de Bogotá



Lavar las hortalizas de manera rutinaria como en los hogares y luego secarlas por contacto con toallas de papel desechables



Pesar 150gr de cada muestra



Lavar con etanol absoluto la superficie de cada muestra para lograr extraer sustancias lipofílicas con posible actividad estrogénica



Recolectar el etanol absoluto con el que se lavo la superficie de las hortalizas en un frasco



PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

Preparación de una solución patrón de 26,1 mg/L de 17 β -estradiol (97%) en etanol absoluto



Realizar 18 diluciones seriadas

A partir de cada una de las diluciones de estradiol y de las muestras, añadir 10 μ L a cada uno de los pozos de la microplaca

Incubación de las placas a 30°C con agitación de 100 rpm durante 72 horas

Adicionar 200 μ L del medio de trabajo

Evaporación en cabina de flujo laminar



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

Ubicación del pozo	Concentración de 17- β -ESTRADIOL
A1	16875 ng/L
A2	8437.5 ng/L
A3	4218.75 ng/L
A4	2109.38 ng/L
A5	1054.70 ng/L
A6	527.35 ng/L
A7	263.70 ng/L
A8	131.85 ng/L
A9	66 ng/L
A10	33 ng/L
A11	16.5 ng/L
A12	8.25 ng/L
B1	4 ng/L
B2	2 ng/L
B3	1 ng/L
B4	0.5 ng/L
B5	0.25 ng/L
B6	0.128 ng/L

○ CURVA CONCENTRACIONES DE 17 β -ESTRADIOL
○ CONTROL NEGATIVO (ETANOL, CPRG Y MEDIO CON LA LEVADURA)
○ BLANCO (MEDIO CON LEVADURA Y CPRG)
○ MUESTRAS

LECTURA DE PLACAS

540 nm



Densidad óptica a la cual se realiza la lectura colorimétrica del CPRG

630 nm



Densidad óptica a la cual se lee la turbidez del crecimiento de la levadura



Se realiza la lectura en un lector de placas de ELISA BioRad



APLICACIÓN DE ECUACIÓN



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

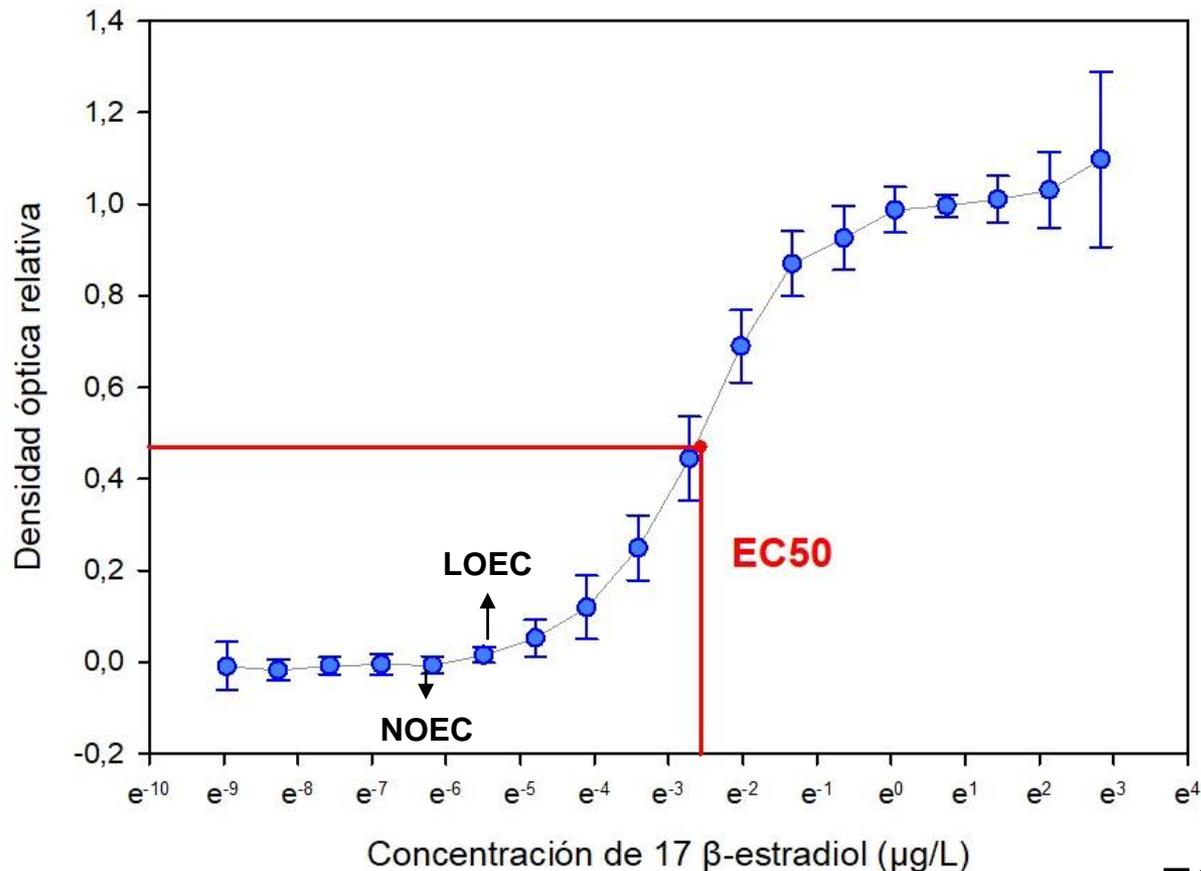
Beresford y colaboradores, 2000

RESULTADOS

Curva dosis-respuesta.

Curva de 17 β -estradiol se ajustó (función sigmoideal con pendiente variable) utilizando el programa Sigma Plot, el cual calcula el valor EC50, NOEC y LOEC.

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



Ubicación del pozo	Concentración de 17 - β - ESTRADIOL
A1	16875 ng/L
A2	8437.5 ng/L
A3	4218.75 ng/L
A4	2109.38 ng/L
A5	1054.70 ng/L
A6	527.35 ng/L
A7	263.70 ng/L
A8	131.85 ng/L
A9	66 ng/L
A10	33 ng/L
A11	16.5 ng/L
A12	8.25 ng/L
B1	4 ng/L
B2	2 ng/L
B3	1 ng/L
B4	0.5 ng/L
B5	0.25 ng/L
B6	0.128 ng/L

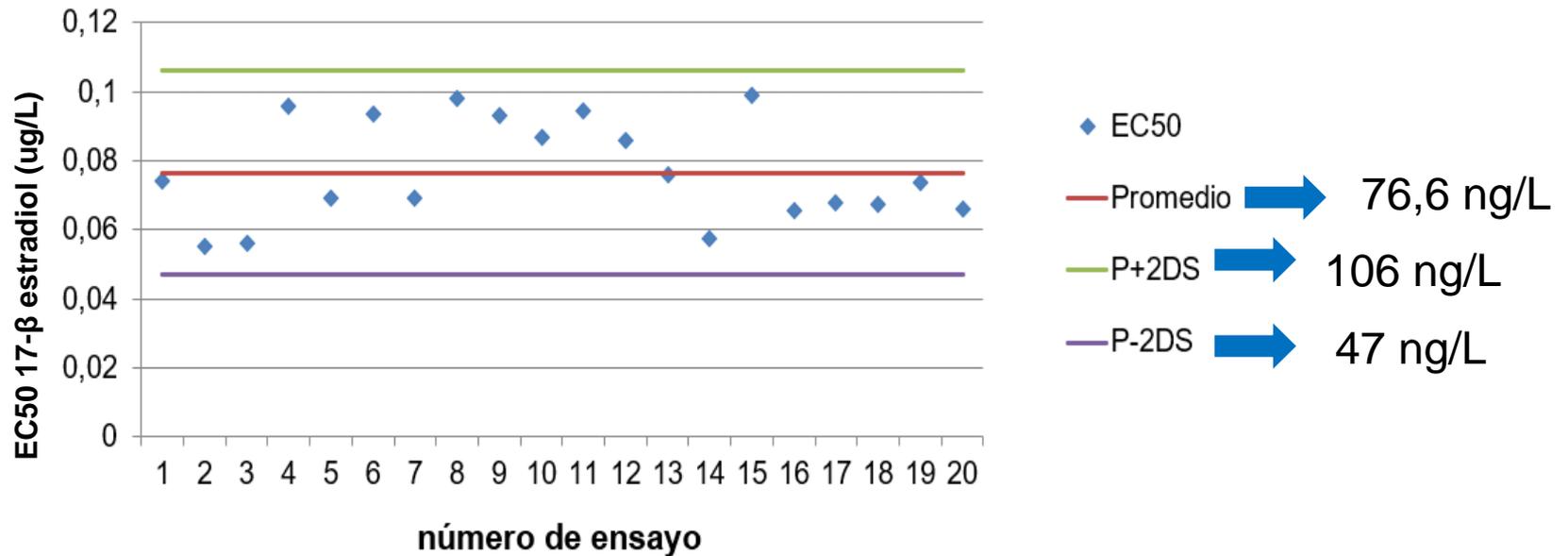
$$EC50 = 10^{(LN(A)/-B)}$$

RESULTADOS

Reproducibilidad de la prueba

Se construyó la carta control con los resultados de EC50 obtenidos en veinte pruebas sucesivas con 17 β -estradiol

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



RESULTADOS

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

Concentraciones equivalentes en estradiol (EEQ)



INTERPRETACIÓN

≥4 ng/L: Actividad estrogénica
<4 ng/L: No se detecta actividad estrogénica

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

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
SOPÓ	Río Teusaca
TOCANCIPÁ	Río Tibitó Chiquito (entre el Río Neusa y Tibitó Grande)
USME	Río Tunjuelo
ZIPAQUIRÁ	Río Neusa

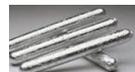
Fuente: Elaboración propia tomando como referencia Miranda D, Carranza C, Fischer G. Calidad de agua de riego en la sabana de Bogotá. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Grupo de Horticultura. 2008; Pérez Preciado J. La estructura ecológica principal de la Sabana de Bogotá. [Sociedad Geográfica de Colombia]. Academia de ciencias geográficas; 2016. 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.

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

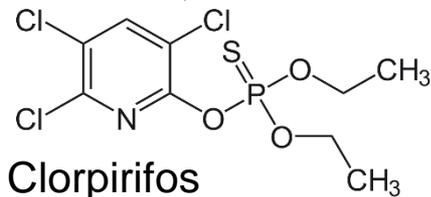
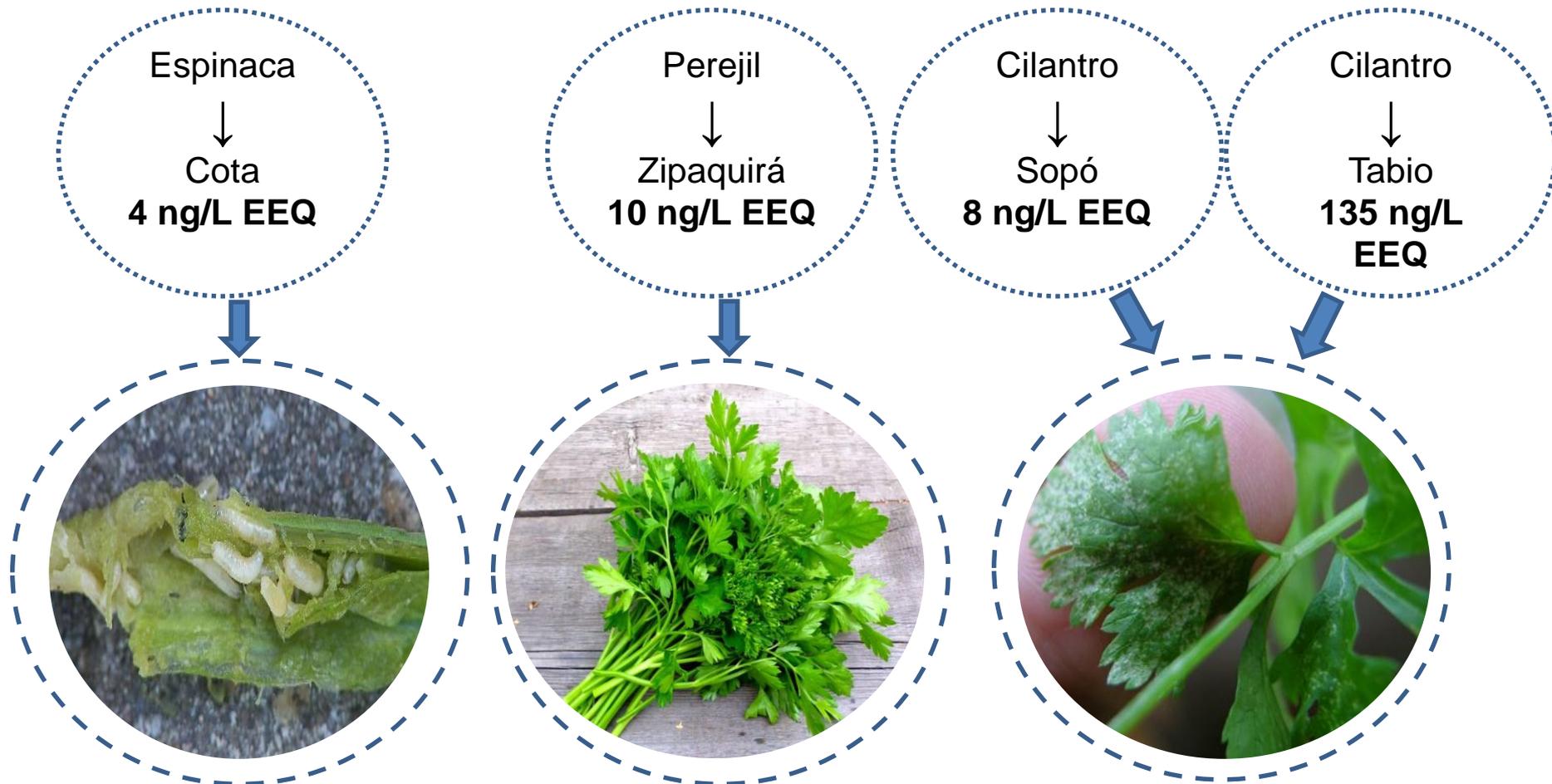
Fuente: Elaboración propia. Tomando como referencia los Registros Nacionales de pesticidas y plaguicidas del 2019 del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y la Resolución Número 2906 de 2007, por la cual se establecen los Límites Máximos de Residuos de Plaguicidas - LMR- en alimentos para consumo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

Concentraciones de metales pesados en los tejidos de las plantas sometidas a riego con las aguas del río Bogotá exceden los niveles máximos permitidos por la normatividad colombiana e internacional, lo cual es un valor inadmisibles para una hortaliza de consumo en fresco.



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.

DISCUSIÓN



Fosforilación del ER

En células dependientes de estrógenos puede incrementar su proliferación

DISCUSIÓN



ABONO ORGÁNICO



Mayor concentración de fitoestrógenos,
xenoestrógenos y hormonas naturales



AGUA LLUVIA



Compuestos farmacéuticos y disruptores endocrinos
en el ciclo urbano del agua de la ciudad de Santiago
de Cali, Colombia. Presencia superior al 48 % y una
concentración media de hasta 11 000 ng/L

Estronas, 4-iso-nonilfenol y bisfenol A.

DISCUSIÓN

Técnica
Yeast
Estrogen
Screen (YES)

16% de las muestras
analizadas obtuvieron
concentraciones
>4ng/L EEQ

84% de las muestras
analizadas obtuvieron
concentraciones
<4ng/L EEQ



BIOACUMULACIÓN



CONCLUSIONES

Con la técnica YES se logró realizar la cuantificación efectiva de sustancias con actividad estrogénica desde 4 ng/L con respecto a equivalentes de estradiol en la superficie de hortalizas provenientes de la sabana de Bogotá teniendo en cuenta la densidad óptica obtenida en cada una.



Las prácticas de limpieza que se realizan rutinariamente en los hogares colombianos 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 la implementación de aguas provenientes de fuentes hídricas contaminadas



RECOMENDACIONES

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

- Se deben seguir investigando otros posibles factores que puedan llegar a influir en la presencia de sustancias con actividad estrogénica como por ejemplo, el tipo de cultivo (hidropónico y orgánico), los componentes del abono, y el uso combinado de fertilizantes.



- Se recomienda realizar determinación de actividad estrogénica mediante la técnica *Yeast estrogen screen* a manera de tamizaje y confirmar los resultados positivos con cromatografía para determinar los compuestos específicos presentes en la muestra.



Gracias