



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



## **Monitoreo de estrogenicidad en productos de uso cotidiano**

**Trabajo final para la obtención del título de Licenciado en Gestión Ambiental.**

**Autor: Winston Aparicio Sosa**

**Tutores: Dr Javier García-Alonso y**

**PhD Pablo Inchausti.**

**2023**



## Resumen

En las últimas décadas el desarrollo de la industria química ha contribuido de forma significativa en varios aspectos del confort en el desarrollo de nuestra vida cotidiana, pero este desarrollo también tiene aspectos negativos. La exposición a formulaciones químicas y principios activos de productos que utilizamos a diario ha sido asociada a enfermedades vinculadas con el sistema endocrino, este grupo de sustancias y formulaciones se las conoce como Compuestos Disruptores Endocrinos (EDC's). Algunas de estas sustancias pueden imitar las señales estrogénicas, a este grupo de sustancias se las denomina xenoestrógenos. El objetivo de este trabajo fue identificar y cuantificar estrogénicidad en productos que utilizamos a diario en nuestros hogares y en el ambiente laboral utilizando la técnica Yeast Estrogen Screen (YES). Se evaluaron 59 muestras, de las cuales 17 presentaron actividad estrogénica, 5 corresponden a productos utilizados en el aseo del hogar (aromatizantes de ambiente, limpiadores de superficie y detergentes concentrados), 7 productos utilizados para el aseo personal (shampoo, acondicionadores y jabón de baño), 2 productos utilizados en el control plagas (un insecticida y un herbicida), 2 utilizados en ambientes laborales (una resina epoxi y un extracto de papel de ticket), 1 en la categoría de productos de protección personal y en la categoría de envases de alimentos no se identificó actividad estrogénica. El EC50 de los estándares de estradiol fue de  $146 \mu\text{g} / \text{L} \pm 20,8 \mu\text{g} / \text{L}$  y el límite de detección fue  $50 \mu\text{g} / \text{L}$ . Para las categorías Aseo del Hogar, Aseo Personal, Fitosanitarios, Laboral y Protección Personal las concentraciones más altas fueron de  $29 \mu\text{g} \text{EQ-E2/L}$ ,  $4,97 \mu\text{g} / \text{L}$ ,  $10,5 \mu\text{g} / \text{L}$ ,  $518 \mu\text{g} / \text{g}$  y  $2,5 \mu\text{g} / \text{L}$  respectivamente. Los resultados demuestran que la técnica YES es una valiosa herramienta para determinar actividad estrogénica en muestras complejas, permitiendo además clasificar muestras para ensayos más complejos y costosos, dichas propiedades la hacen una herramienta robusta para la vigilancia de la exposición a xenoestrógenos.

## Abstract

In recent decades, the development of the chemical industry has significantly contributed to various aspects of comfort in the development of our daily lives, but this development also has negative impacts. Daily exposure to chemical formulations and active principles of products that we use daily has been associated with diseases related to endocrine systems, this group of substances and formulations are known as Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs). Some of these substances can mimic estrogen signals, called xenoestrogens. The objective of this work was to detect and quantify estrogenicity in products that we use daily in our homes and work, using the Yeast Estrogen Screen (YES) technique. Fifty nine samples of different products were evaluated. Seventeen presented estrogenic activity, 5 correspond to products used in household cleaning (air fresheners, surface cleaners and detergents), 7 products used for personal hygiene (shampoos, conditioners and soap bathroom), 2 products used in pest control (an insecticide and a herbicide), one used in work environments (an epoxy resin), in thermo-paper and one in the category of personal protection products. In food packaging analysed no estrogenic activity was identified. The EC50 of the estradiol standards was  $146 \mu\text{g} / \text{L} \pm 20.8 \mu\text{g} / \text{L}$  and the limit of detection was  $50 \mu\text{g} / \text{L}$ . For the categories Home Cleaning, Personal Cleaning, Phytosanitary, Labor and Personal Protection, the highest concentrations were  $29 \mu\text{gEQ-E2/L}$ ,  $4.97 \mu\text{gEQ-E2/L}$ ,  $10.5 \mu\text{gEQ-E2/L}$ ,  $518 \mu\text{gEQ-E2/g}$  and  $2.5 \mu\text{gEQ-E2/L}$  respectively. The results show that the YES technique is a valuable tool to determine estrogenic activity in complex samples, also allowing to classify samples for more complex and expensive tests, these properties make it a robust tool for monitoring exposure to xenoestrogens.

## **Agradecimientos**

A mi tutor de carrera Javier García-Alonso por los valiosos aportes y comentarios realizados en diseño experimental y en la edición del contenido de esta tesis. A mi Co-tutor Pablo Inchausti quien me ha aportado de forma muy valiosa en la redacción, en el procesamiento estadístico de los datos obtenidos y en la presentación de los resultados.

Pero quiero destacar mi gratitud a la Lic. Alejandra Bertone por su disposición, compromiso y paciencia para entrenarme y poner en práctica el ensayo Yeast Estrogen Screen, en el cual me base para realizar este trabajo. De no ser por ella este trabajo no hubiera sido posible.

## Contenido

<b>Introducción.</b>	1
<b>Estrógenos.</b>	2
<b>Receptores de estrógenos.</b>	5
<b>Compuestos Disruptores Endócrinos (EDCs).</b>	6
<b>Mecanismos y modos de acción de los EDC´s.</b>	6
<b>Sustancias con efectos disruptores en el sistema endocrino.</b>	7
<b>Dioxinas.</b>	7
<b>Bifenilos policlorinados (PCBs) y Difenil éteres polibromados (PBDE).</b>	7
<b>Plaguicidas.</b>	8
<b>Ftalatos.</b>	8
<b>Parabenos.</b>	9
<b>Bisfenol-A.</b>	10
<b>Detección de sustancias estrogénicas.</b>	10
<b>Bioensayo <i>in vitro</i> Yeast Estrogen Screen.</b>	11
<b>Antecedentes en Uruguay.</b>	12
<b>Objetivo General.</b>	13
<b>Objetivos específicos.</b>	13
<b>Metodología.</b>	13
<b>Productos a testear.</b>	13
<b>Ajuste de concentración de las muestras.</b>	19
<b>Ensayo YES</b>	20
Reconstrucción de la cepa.	20
Ensayo YES.	22
Análisis de datos.	23
<b>Resultados.</b>	26
<b>Discusión.</b>	35
<b>Conclusiones.</b>	39
<b>Recomendaciones.</b>	39
<b>Bibliografía.</b>	40
<b>Anexo I.</b>	47
<b>Anexo II.</b>	52

## Introducción.

En los organismos pluricelulares, la comunicación entre células es un factor clave para garantizar el funcionamiento óptimo de los sistemas (órganos) de los que depende el desarrollo, manutención y reproducción de un organismo (individuo). La comunicación celular está basada en estímulos químicos, entre ellos se encuentran las hormonas, algunas de las cuales son producidas por células especializadas del sistema endócrino. Este sistema de información funciona con un mecanismo basado en estímulo-respuesta y permite a los organismos, ya sean vertebrados o invertebrados, desarrollarse, reproducirse, mantener sus funciones vitales, así como regular el metabolismo, el equilibrio de iones, la respuesta al estrés, entre otros procesos fisiológicos claves para el fitness de un individuo (Norris & Carr, 2013).

Las células endócrinas producen hormonas para generar respuestas específicas en células diana (o blanco) mediante la unión a receptores específicos de membrana o citoplasmáticos. Las células diana pueden estar ubicadas en órganos diferentes de donde fueron excretadas las hormonas. Por ejemplo, la glándula tiroides puede secretar hormonas que estimulan respuestas en todo los tejidos del cuerpo o bien pueden ser producidas para regular procesos locales o de la misma célula excretora (Norris & Carr, 2013; Tortora & Derrickson, 2010).

Las hormonas están controladas por el sistema endócrino y el sistema nervioso y su conjunción se denomina sistema neuroendocrino. En vertebrados, este sistema incluye el cerebro (e.g. hipotálamo, pineal), la glándula pituitaria o hipófisis, otras glándulas endocrinas clásicas de control tales como la tiroides, glándulas suprarrenales, gónadas (testículos y ovarios) y el hígado. También hay biorreguladores que no dependen del sistema nervioso que son secretados por la glándula paratiroides, el timo, el corazón y el riñón. Estas glándulas solamente responden a sustancias en sangre, y si bien están inervadas, su secreción no depende del sistema nervioso (Norris & Carr, 2013).

Para que el sistema endocrino funcione correctamente, es clave que en el proceso de comunicación no existan interferencias que alteren la recepción del mensaje por el receptor. La información debe estar entre ciertos parámetros y su destino (el receptor) debe ser específico, al igual que las instrucciones para recibir el mensaje. En condiciones normales, se puede garantizar la fiabilidad para reproducir el mensaje; de lo contrario, las implicancias de reproducir un mensaje alterado pueden comprometer funciones vitales claves para un organismo y su progenie que son de gran importancia para la salud pública y ambiental.

## Estrógenos.

Los estrógenos son parte de un grupo de hormonas esteroideas principalmente asociadas a las hembras de vertebrados. Estas hormonas desempeñan un papel vital en ciclos menstruales, en el desarrollo, e inducen etapas claves de la ovogénesis y de la diferenciación celular en tejido mamario, útero, vagina, ovario, testículos, epidídimo y próstata (Korach, 1994). También participan en el metabolismo de lípidos y síntesis de proteínas (Kiyama & Wada-Kiyama, 2015). Si bien su principal función está ligada con los órganos reproductivos, los estrógenos también pueden participar en otros procesos en tejidos de hueso, hígado, mama, sistema cardiovascular y cerebro (Katzenellenbogen et al., 2000; Noriega Reyes & Langley McCarron, 2008).

En las mujeres con ciclos menstruales normales, el estradiol (E2) es el principal estrógeno en circulación, seguido de la estrona y estriol, mientras que en los hombres los niveles de estradiol en sangre son bajos. El E2 puede ser sintetizado para ejercer efectos en órganos distantes actuando como un factor endocrino pero también puede ser sintetizado en sitios extragonadales como en las mamas, el cerebro, los huesos y el tejido adiposo, actuando como un factor paracrino e intracrino (Simpson et al., 2005).

Los estrógenos son esteroides de 18 carbonos producidos a partir del colesterol, sintetizados por glándulas en los ovarios, testículos, glándulas adrenales, cerebro y la placenta. En los mamíferos, los principales estrógenos son la estrona, estriol, y el 17-estradiol (E2) (Figura 1). Estas hormonas tienen una gran aplicación clínica, siendo utilizadas en terapias de insuficiencias endocrinas ya sea en la etapa fértil o posmenopáusica de la mujer. La presencia de estrógenos tiene un papel muy importante en los tratamientos de cáncer hormona-dependiente como el cáncer de mama en el que es importante disminuir o controlar la presencia de estrógenos utilizando fármacos que inhiben la síntesis o la recepción de estrógenos en tejido mamario (Cóppola et al., 2005; Noriega Reyes & Langley McCarron, 2008).

El mecanismo de acción del estrógeno está mediado por la unión a receptores hormonales específicos localizados en el citoplasma y membrana, denominados receptor de estrógeno (RE) (Couse, 1999; Prossnitz et al., 2008).

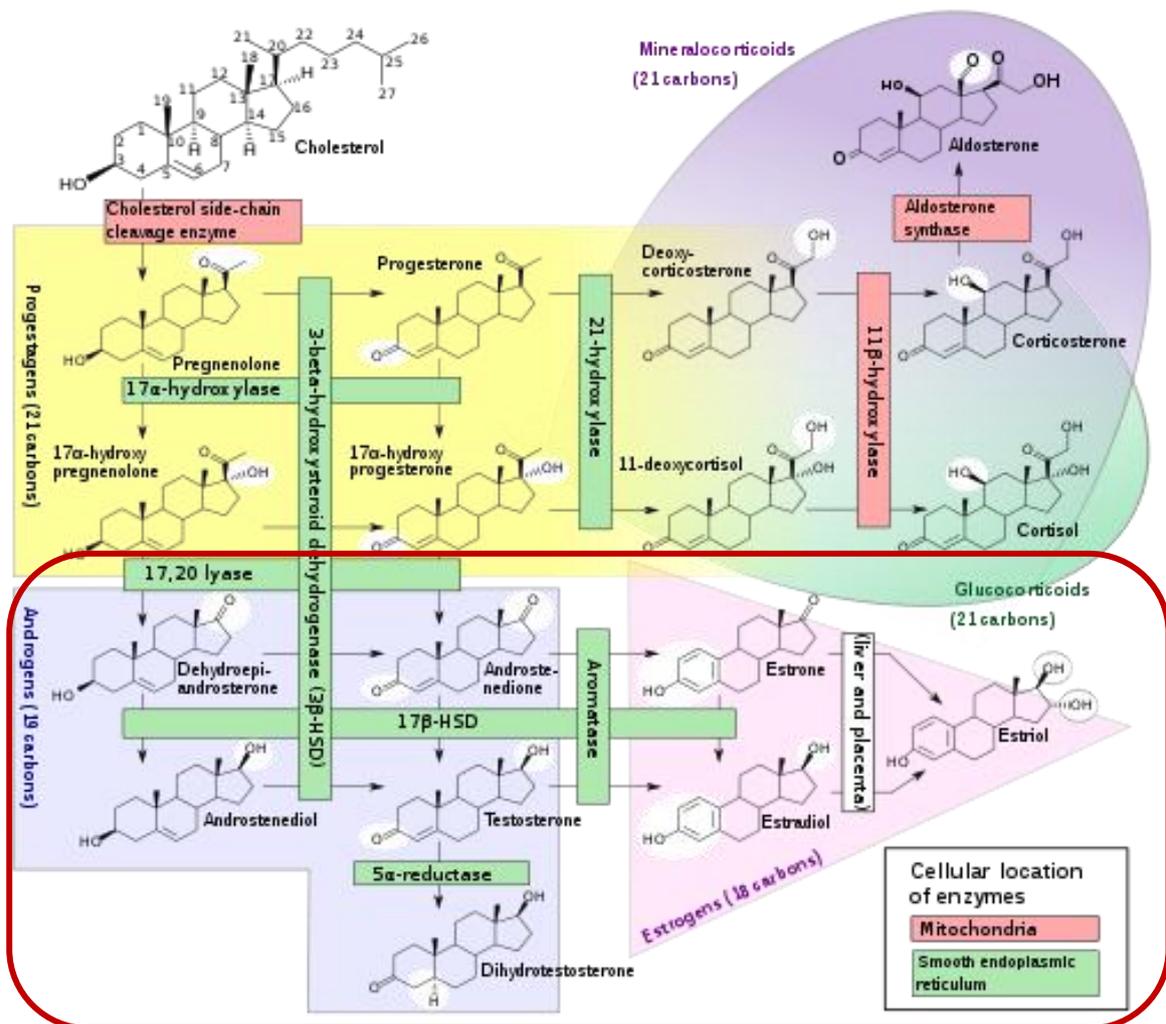
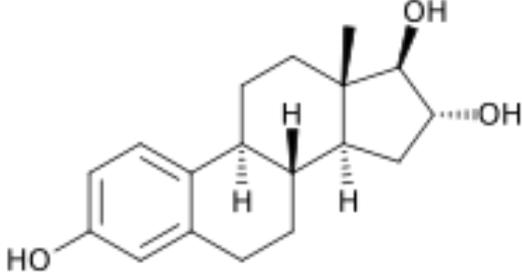
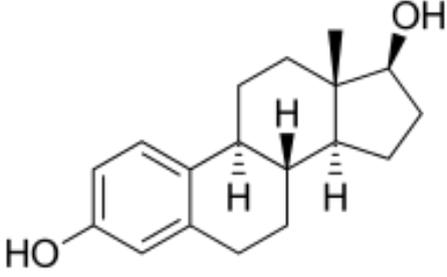
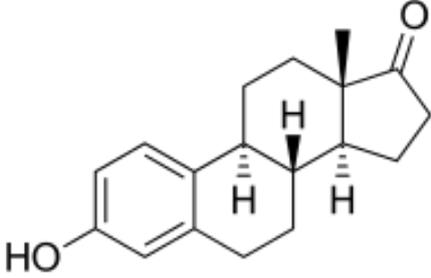
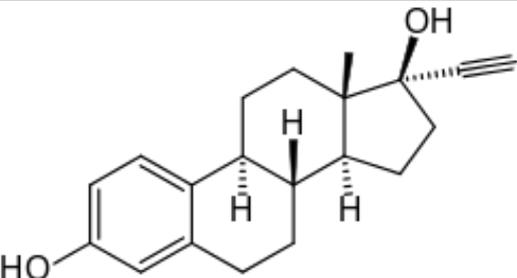
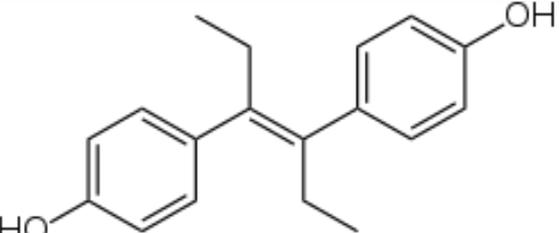


Figura 1: Proceso de esteroidogénesis, que se inicia con el colesterol, y que incluye distintos procesos enzimáticos, entre los cuales está la familia de enzimas aromatasas que van quitando carbonos en cascada hasta obtener los esteroides, tales como la estrona, estriol y estradiol (Modificado de Häggström et al 2014).

Tabla 1: Estructura química de los estrógenos más comunes en los vertebrados de sexo femenino, en todos se puede apreciar en común el anillo fenólico que es el sitio de unión al RE.

Estrógenos naturales	
Estriol	
Estradiol	
Estrona	
Estrógenos sintéticos	
Alpha etinil estradiol	
Dietilelbestrol	

## Receptores de estrógenos.

Los receptores estrogénicos citoplasmáticos pertenecen a la familia de receptores nucleares, y funcionan como factores de transcripción inducidos por ligando y en respuestas específicas a señales fisiológicas y patológicas (*Nilsson et al.*, 2001; *Warner et al.*, 2003).

El primer receptor RE- $\alpha$  fue descubierto por Jensen & Jacobson en 1962 en experimentos con ratas, y en 1995 se descubre otro receptor con gran homología (RE- $\beta$ ) con el primero (*Kuiper & Gustafsson*, 1997). Ambas isoformas funcionan como factores de transcripción cuando se unen a sus respectivos ligandos que comparten características y funciones generales similares (*Teppa Garrán & Terán Dávila*, 2005). Una vez que el ligando se une al receptor, éstos dimerizan y migran al núcleo, actuando como factores de transcripción en genes blanco mediante Elementos de respuesta estrogénica (ERE). Existen otros RE, y variantes homólogas en metazoos, receptores huérfanos con dominio de unión al ligando, o como el GPR30 en humanos el cual actúa de manera independiente, y que ha sido de gran interés en los estudios de la biología del cáncer de mama, y es un candidato para la terapia hormonal relacionada con esta enfermedad (*Noriega Reyes & Langley McCarron*, 2008).

Los RE alfa y RE beta son expresados por diferentes genes localizados en los cromosomas 6q25.1 y 14q23-24.1, respectivamente, y su expresión varía del tipo de tejido y especie. Esto último es importante dado que sus funciones no solo se limitan al sistema reproductivo, sino que se extienden a múltiples tejidos en ambos sexos (*Warner et al.*, 2003). El RE- $\alpha$  es expresado en su mayoría por órganos reproductivos (útero, mama y ovario), seguido por el hígado y el sistema nervioso central. En contraste, el RE- $\beta$  es mayoritariamente expresado en tejidos como hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario, sistema nervioso central y próstata (*Anderson*, 2002; *Nilsson et al.*, 2001).

Es importante tener en cuenta que estos no son los únicos receptores que puedan ser afectados por sustancias que son consideradas EDC's. Algunas sustancias químicas pueden interferir con el sistema endocrino, incluyendo el sistema estrogénico, sin necesariamente unirse directamente a los receptores estrogénicos. Estas sustancias pueden afectar la transcripción de genes específicos y alterar la síntesis de proteínas involucradas en la respuesta hormonal. Además de la vía clásica de señalización estrogénica a través de los receptores estrogénicos, se han identificado otras vías de señalización que pueden estar involucradas en la acción estrogénica, como los receptores de membrana GPR30. Algunas sustancias pueden activar estas vías alternativas y tener efectos estrogénicos independientemente de la interacción con los receptores estrogénicos (*Hliseníková et al.*, 2021).

Los mecanismos pueden ser múltiples. Por ejemplo, los ftalatos pueden modificar la liberación de hormonas hipotalámicas, hipofisarias y periféricas, interferir con los receptores nucleares, los receptores de membrana, las vías de

señalización intracelular y modular la expresión génica asociada con la reproducción (Hlisníková et al., 2021).

### **Compuestos Disruptores Endócrinos (EDCs).**

El concepto de EDC fue acuñado por Colborn Myers, y Dumanoski (1994) . En este libro, los autores exponen una gran cantidad de casos de trastornos reproductivos, desarrollo de enfermedades hereditarias, malformaciones y algunos tipos de cáncer en humanos y vida silvestre, atribuidas a un grupo de sustancias sintéticas con potencial de alterar la homeostasis hormonal (Colborn et al., 1997).

Los EDC conforman un grupo heterogéneo de sustancias que tienen la capacidad de interferir en el flujo de señales químicas de los organismos, alterando el normal funcionamiento del sistema endócrino, provocando efectos negativos en la capacidad reproductiva y otros aspectos fisiológicos en diferentes especies (Norris & Carr, 2013). Estas sustancias, conocidas como perturbadores (o disruptores) endócrinos, se definen más generalmente como: *“cualquier agente exógeno que interfiera con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de una hormona natural responsable de la manutención, reproducción, desarrollo y/o comportamiento de los organismos”* (Cirsp et al., 1997). Y según la Organización Mundial de la Salud (OMS), *“Un disruptor endocrino es una sustancia o mezcla exógena que altera las funciones del sistema endocrino y, en consecuencia, causa efectos adversos para la salud en un organismo intacto, o su progenie, o (sub) poblaciones* (Kidd et al., 2012).

### **Mecanismos y modos de acción de los EDC´s.**

Los principales mecanismos de alteración de la homeostasis hormonal inducidos por los EDC que han sido elucidados en las últimas décadas son los siguientes:

- Modo agonista, se caracteriza por cómo una sustancia mimetiza la acción de las hormonas. Esta sustancia puede imitar la actividad biológica de una hormona al unirse a un receptor celular, produciendo una respuesta hormonal de la célula similar a la producida por la hormona natural, pero en un momento incorrecto o bien en concentraciones excesivas.
- Modo antagonista, se caracteriza por la unión de una sustancia química a un receptor celular sin activarlo, evitando así la disponibilidad del receptor celular para unirse a una hormona natural.
- Alteración del patrón de síntesis y metabolismo de las hormonas endógenas.
- Interrumpir la modulación de los niveles de receptores hormonales (Sonnenschein & Soto, 1998).

Entre los mecanismos de acción de los EDC más estudiados se encuentran estrogénicidad/ anti-estrogénicidad, androgénicidad/anti-androgénicidad, alteración tiroidea, alteración de receptores hormonales (receptor de estrógeno RE, RE asociado a membrana mRE, receptor androgénico RA, receptor de progesterona RP, receptor aril hidrocarburo RAH (Andreas Kortenkamp 1997, Gore *et al.*, 2015).

### **Sustancias con efectos disruptores en el sistema endocrino.**

El catálogo de sustancias consideradas EDCs aumenta todos los años. La UE ha identificado 680 sustancias con esta descripción (Arias *et al.*, 2020). A continuación, se nombran las familias de EDCs más estudiadas en función del grado de exposición a estos agentes y de sus efectos más conocidos sobre el sistema endocrino.

#### **Dioxinas.**

Estos productos químicos se generan de forma no intencional por la combustión incompleta en procesos que incluyen la fabricación de productos fitosanitarios, de productos plásticos, y de cloro. La principal vía de exposición a las dioxinas suelen ser los alimentos contaminados durante los procesos de fabricación, o en los envases que los contienen en cuya fabricación hayan otros procesos intermedios con productos que estén asociados a la producción de dioxinas. Las dioxinas han demostrado tener una elevada toxicidad, produciendo problemas de reproducción, en el desarrollo, afectar el sistema inmunitario, interferir con hormonas y de esa forma causar cáncer (OMS, 2022).

#### **Bifenilos policlorinados (PCBs) y Difenil éteres polibromados (PBDE).**

Los bifenilos policlorados son una clase de productos químicos industriales con anillos fenólicos apareados y de grado variable de cloración. Se sintetizaron exponiendo la molécula de bisfenilo al gas de cloro en presencia de un catalizador obteniendo 209 congéneres (Boucher *et al.*, 2014; Doi *et al.*, 2013). Fueron producidos masivamente y utilizados en todo el mundo en resinas, adhesivos, pinturas, tintas para el cabello, y retardantes de llamas en plásticos, entre otros usos. Los PCB fueron clasificados como Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) y prohibidos en EEUU en 1979 debido a su capacidad de bioacumulación y biomagnificación que generan efectos adversos para la salud humana y el medio ambiente (Lauby-Secretan *et al.*, 2013). Algunos PCB se clasifican como EDC por sus acciones tiroidogénicas, estrogénicas y antiandrogénicas (Portigal *et al.*, 2002).

Los PBDE se comenzaron a producir a fines de la década de 1970 luego de la prohibición de los PCB. Estos compuestos fueron utilizados como retardantes de llama en plásticos, tapizados, colchones y ropa. Los PBDE comprenden tres congéneres: pentaPBDE, octaPBDE y decaPBDE, los dos primeros han sido

prohibidos en Europa y Asia, pero las mezclas del decaPBDE continúan utilizándose en todo el mundo (Kim et al., 2009).

### Plaguicidas.

Los plaguicidas son productos químicos elaborados para el control de plagas, en la agricultura y también en situaciones de salud pública. Si bien tienen aspectos positivos desde el punto de vista sanitario ya que contribuyen a la conservación de alimentos o el control de enfermedades transmitidas por insectos, los plaguicidas pueden constituir también un problema para la salud pública y del ambiente.

Existen antecedentes de los efectos relacionados con los EDC producidos por los plaguicidas ya sea en los humanos como en la vida silvestre. Por ejemplo, el diclorodifeniltricloroetano (DDT) y sus metabolitos (o,p'-DDT, o,p'-DDD, p'-DDE) fueron utilizados como insecticidas luego de 1945. Sin embargo, el DDT

fue prohibido por su capacidad de bioacumulación en el ambiente, y fue declarado un Contaminante Orgánico Persistente. Si bien el DDT fue prohibido en EEUU en 1972, en otros países como Uruguay fue utilizado hasta el 2000. El DDT y sus metabolitos también fueron clasificados como un EDC's con efectos estrogénicos en ratas (Gore et al., 2015b).

Son varias las categorías de plaguicidas declarados EDC. Entre ellos se destacan los organofosforados que también interfirieron en el sistema endocrino con efectos estrogénicos. Un ejemplo de los organofosforados es el Clorpirifos que es usado para el control de insectos en frutas, hortalizas y cereales y que tiene efectos disruptores endocrinos mediados por la fosforilación del REalfa (Cocca et al., 2015).

### Ftalatos.

Los ftalatos y ésteres de ftalatos son un gran grupo de compuestos que han sido (y que en algunos países continúan siendo) utilizados como plastificantes líquidos. Algunos de los ftalatos más comunes son DEHP (di (2-etilhexil) ftalato), DBP (dibutil ftalato), BBP (bencilbutil ftalato), DiNP (diisononil ftalato) y DiDP (diisodecil ftalato). A título de ejemplo, el BBzP (butil bencil ftalato) se utiliza en la fabricación de plásticos, en los envases PET (tereftalato de polietileno), plásticos PVC, el DEHP y DiDP es empleado en productos de aseo y el DMP (dimetil ftalato), DEP (dietil ftalato) o el DBP (dibutil ftalato) en cosméticos (de Prada, 2016). Debido a sus propiedades plastificantes y conservantes, los ftalatos han sido utilizados para fabricar bolsas, empaques de comida, perfumes, jabones, detergentes, tintas, y lacas, así como en ingredientes inertes de plaguicidas, para repelentes de insectos (Bustamante-Montes et al., 2001; Olea Serrano et al., 2001). Se ha demostrado que algunos ftalatos tienen efectos sobre la prevalencia de patologías como malformaciones genitales congénitas (criptorquidias, hipospasias), deterioro de la calidad seminal, menor fertilidad,

feminización, desarrollo prematuro de las mamas en hembras, efectos tiroideos, resistencia a la insulina y alteraciones a la respuesta inmune (*de Prada, 2016*). La exposición diaria estimada a uno de los principales ftalatos como el DEHP (di-2-etilhexil-ftalato) varía de 3 a 30 µg/kg/día (*Koch & Calafat, 2009*).

## Parabenos.

Si bien los parabenos pueden ser sintetizados por organismos como bacterias e incluso plantas, aquellos producidos por la industria química son los que despiertan mayor preocupación, debido a que sus distintos usos determinan su ubicuidad en el ambiente (*Nowak et al., 2018*). Los parabenos son producidos por la esterilización de PHBA (ácido hidróxido benzoico) con alcohol en presencia de un catalizador como el ácido sulfurico (*Liao et al., 2013*). Los compuestos más conocidos son el metilparabeno, butilparabeno (MeP), etilparabeno (EtP), butilparabeno (BuP), benzylparabeno (BzP) y heptil parabeno (HepP). Debido a su eficiencia, bajos costos, propiedades antibacterianas y antifúngicas han llevado al uso generalizado de los parabenos en la industria para la fabricación de envases para alimentos, productos de cuidado personal y productos farmacéuticos (*Nowak et al., 2018*).

Se ha demostrado que el BuP contribuye a la expresión reducida de CYP19a1 en ratas, lo que induce alteraciones de los niveles de andrógenos y estrógenos (*Boberg et al., 2016*). Altos niveles de estradiol, progesterona y la concentración urinaria de parabenos (MeP, PrP y BuP) en mujeres embarazadas están asociados a la disminución del estradiol y la disminución de la relación estradiol/progesterona al aumento de las concentraciones BuP (*Aker et al., 2016*). En otros estudios se ha demostrado que el MeP, EtP, PrP y BuP son capaces de unirse competitivamente a los RE y poseer comportamientos similares a estrógenos en lo que respecta a inducir la expresión génica dependiente de los RE (*Lillo et al., 2017; Vo et al., 2011*).

La Organización Conjunta de Agricultura y Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) y el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la OMS determinaron en 1974 que la ingesta diaria admisible de MeP, EtP y PrP en conjunto debería ser como máximo 10 mg/kg/día. Sin embargo en 2007, en respuesta a frecuentes problemas de alta toxicidad, la OMS recomendó retirar del mercado al PrP. A su vez, la Sociedad Científica sobre Seguridad del Consumidor de la UE recomendó en 2010 que la concentración de PrP y BuP en cosméticos no debe superar el 0,19%. Las concentraciones permitidas pueden variar según los países en la UE, pero claro está que estos productos están restringidos como aditivos en cosméticos, fármacos, y en envases de alimentos entre otros usos (*Nowak et al., 2018*).

## Bisfenol-A.

Sintetizado por primera vez en 1891, el BPA ha sido el producto orgánico producido con mayor volumen en el mundo, llegando a producirse 15 millones de libras en 2013 (Gore *et al.*, 2015a). El BPA ha sido utilizado (y en algunos países es aún utilizado) para la fabricación de productos plásticos, revestimientos de envases de bebidas y alimentos enlatados (Gore *et al.*, 2015b; Juan-García *et al.*, 2015; Vandenberg *et al.*, 2009). Cuando es utilizado como revestimiento de envases que contienen bebidas y alimentos, el BPA puede transferirse por la vía digestiva, pudiendo afectar la salud de las personas a nivel hormonal (Vandenberg *et al.*, 2006). Diversos trabajos han demostrado que el BPA tiene la capacidad de provocar alteraciones en la fisiología ovárica, actuando en el ovocito como en las células foliculares. También se ha demostrado que el BPA es capaz de afectar la estructura de la granulosa, generando edemas, degeneración, fragmentación y picnosis nuclear (Marconetto *et al.*, 2022).

En EEUU el BPA está regulado por la EPA, y establece como límite de dosis 50 µg/kg/día, mientras que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria redujo la dosis 4 µg/kg/día (Gore *et al.*, 2015a).

## Detección de sustancias estrogénicas.

En las últimas décadas se han realizado grandes esfuerzos en el desarrollo de métodos para la determinación de si una sustancia funciona como un disruptor endócrino. La idea es que los ensayos deben estar en un contexto reglamentario, y basados en efectos con el objetivo de identificar las vías de interacción dado los criterios que definen los EDC (Gonz & Di, 2019; M<sup>a</sup> *et al.*, 2018).

En 1998 EEUU comenzó su política de detección de EDC a través de la US EPA mediante la creación del Programa de Detección de Disruptores Endócrinos (US EPA, 2011). Un programa similar comenzó en la UE en 1999 (UE-COM., 2020). Uno de los objetivos centrales de ambos programas fue determinar cuáles sustancias eran motivo de preocupación para la salud humana. Como resultado del esfuerzo realizado por estos programas se dio a conocer las primeras listas de sustancias con potencial de alterar el sistema endócrino. La diferencia entre ambos programas es que la US EPA aplica un sistema de ensayos validados de dos niveles: primero una sustancia es sometida a una batería de ensayos (llamados de nivel 1), y dependiendo de los resultados, ésta será sometida a una batería de ensayos de nivel 2 (US EPA, 2021). En contraste, la UE a través de la ECHA, la evaluación de una sustancia se realiza por revisión científica (ECHA, 2021), donde se asigna una sustancia a una institución de referencia de unos de los países miembros para que evalúe la sustancia y emita un veredicto.

La tabla 2 muestra una compilación de ensayos realizados por la US EPA para evaluar la alteración endócrina entre una sustancia (o mezclas de ellas) y un organismo. Estos ensayos además conforman o bien son parte del conjunto de ensayos validados por la OCDE (Organización para la cooperación económica y el desarrollo) para evaluar sustancias disruptoras endócrinas en mamíferos y no mamíferos. En el caso de la OCDE los ensayos están clasificados en cinco niveles, el criterio es el grado de información que estos brindan (OECD, 2018).

Tabla 2: Pruebas realizadas por el EDSP de la US EPA.

Directrices de prueba nivel 1	Directrices de Prueba nivel 2
Metamorfosis de anfibios (rana)	Prueba de toxicidad aviar de dos generaciones en la codorniz japonesa
Unión al receptor de andrógenos (próstata de rata)	
Aromatasa (recombinante humana)	
Unión al receptor de estrógeno	Medaka Extended One Generation Reproduction Test
Activación transcripcional del receptor de estrógeno (línea celular humana HeLa-9903)	
Reproducción de peces a corto plazo	
Hombre puberal (rata)	Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)
Esteroidogénesis (línea celular humana - H295R)	
Uterótrofo (rata)	

Para información detallada de cada prueba seguir link <https://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances/series-890-endocrine-disruptor-screening-program> donde se podrán descargar los protocolos de la US EPA.

### Bioensayo *in vitro* Yeast Estrogen Screen

Entre los métodos recomendados para la detección de sustancias estrogénicas se encuentra la técnica YES (Yeast Estrogen Screen). Este ensayo utiliza levaduras *Saccharomyces cerevisiae* que fueron modificadas por Routledge & Sumpter (1996) insertando un gen receptor de estrógeno humano (REh) en su cromosoma y un activador transcripcional o elemento de respuesta a estrógeno (ERE) ligado a un gen promotor Lac Z que expresa la enzima beta-galactosidasa.

En la figura 2 se muestra como en presencia de un agente con potencial estrogénico (xenoestrogeno) es detectado por la levadura mediante 1) la unión al REh que activa el receptor, 2) la formación del complejo ligando-RE que se une al ERE (Elemento de Respuesta a Estrógeno) en el plásmido, 3) la síntesis de la enzima beta-galactosidasa por el operón lacZ, 4) la medición de la actividad enzimática mediante una reacción colorimétrica. La medición está determinada por la producción de la enzima beta-galactosidasa que metaboliza sustrato cromogénico rojo de clorofenol-beta-D-galactopiranesida (CPRG) presente en el medio. Este último es un producto cuyo color va de amarillo a rojo y que se mide

mediante espectrofotómetro a una absorbancia de 540 nm. La cinética del nuevo compuesto está directamente relacionada con la cantidad de enzima producida, y ésta a la concentración de xenoestrogénos (*Routledge & Sumpter, 1996*).

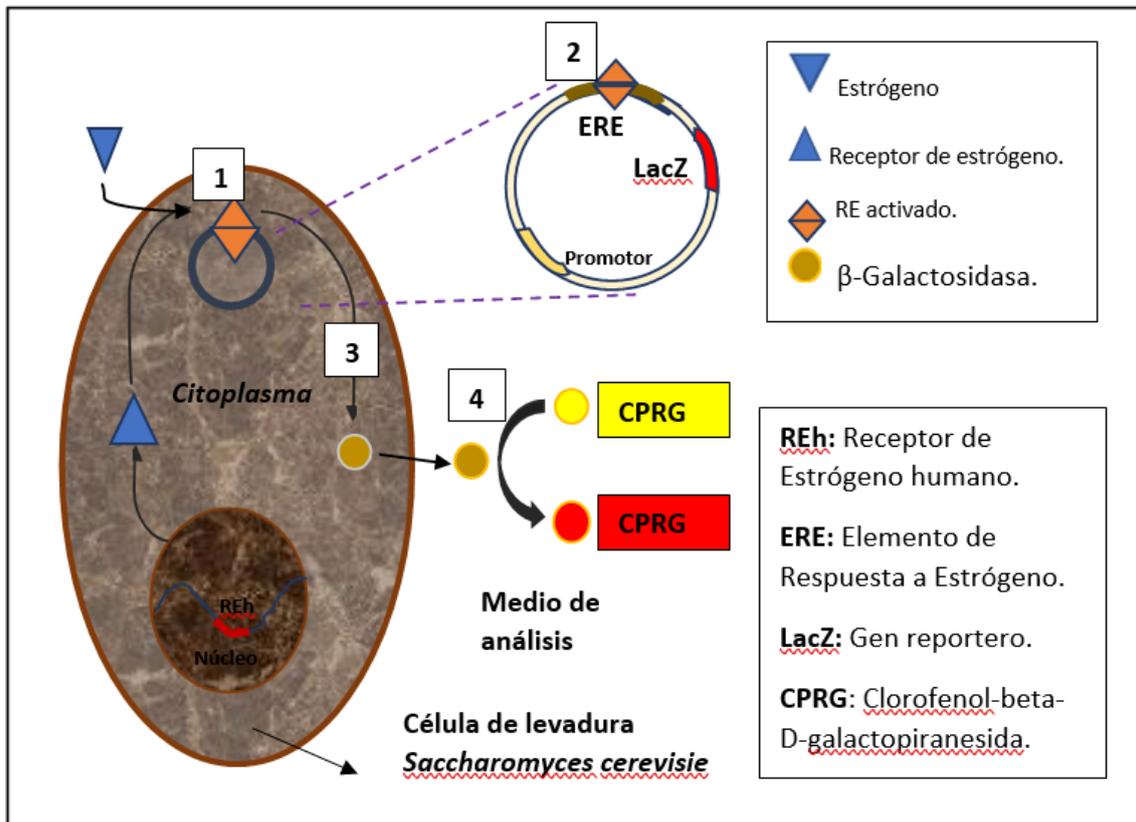


Figura 2: Esquema de las etapas de expresión de enzima Beta-galactosidasa, comienza con la activación del receptor de estrógeno (1), seguido de la unión a los ERE (2) para expresar la enzima Beta-galactosidasa al medio (3), donde hay CPRG.

Una de las ventajas de esta técnica es que la levadura naturalmente no posee un receptor de estrógeno, lo que evita la compleja interacción que existe entre el RE y otros receptores esteroides, hormonas peptídicas y factores de crecimiento que pueden estar asociados con estos mecanismos. Otro aspecto importante a resaltar es que el proceso de post traducción y el plegamiento de proteínas en células de vertebrados es muy similar al mecanismo de la levadura (*Noguero et al., 2006*). Además, esta técnica arroja resultados cuali y cuantitativos, es altamente específica, reproducible, y de bajo costo.

### Antecedentes en Uruguay.

Una de las primeras detecciones de EDC en Uruguay fue realizada por investigadores del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) donde se puso a punto la técnica YES en muestras extraídas de un afluyente cloacal y un efluente de una planta de pulpa de celulosa. Si bien se optimizó el ensayo con éxito, no se detectó actividad estrogénica para las muestras que se analizaron

(Keel et al., 2010). Posteriormente la Dra. Diana Míguez realizó una investigación con el objetivo de evaluar los riesgos de la exposición a EDC's en un segmento de la cuenca el Río Uruguay. Si bien se concluyó que el estado del agua presentaba condiciones aceptables, se determinaron niveles detectables de sustancias consideradas EDC's, resultados que demuestran que la exposición de la fauna acuática a estos agentes químicos son una realidad, principalmente aguas abajo de efluentes municipales, o segmentos del río donde se realizan actividades agrícolas en la cuenca (Míguez, 2013). También se destaca un trabajo realizado en la cuenca del Río Santa Lucía, donde se evaluó la distribución de la actividad estrogénica en sedimentos de la cuenca relacionada a los principales usos del suelo mediante el ensayo YES, (Griffero, 2015). Este estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Bioensayos en el Centro Universitario Regional Este (CURE-Maldonado) utilizando la cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

### **Objetivo General.**

Detectar y cuantificar sustancias con actividad estrogénica en productos de uso diario en el trabajo y en el hogar utilizando la técnica Yeast Estrogen Screen (YES).

### **Objetivos específicos.**

1. Ejecutar con éxito la técnica YES.
2. Cuantificar los niveles de estrogénicidad con el ensayo YES en muestras de productos disponibles en el mercado y que se utilizan a diario.

### **Hipótesis.**

Existe la presencia de sustancias y compuestos con actividad estrogénica en diversos productos que utilizamos a diario como productos de limpieza del hogar y personal y otros asociados al ambiente laboral.

### **Metodología.**

#### **Productos a testear.**

Las muestras evaluadas provienen de diferentes productos, de uso generalizado por su disponibilidad en el mercado, disponibilidad asociada a precio y conocimiento de las marcas, entre ellos se encuentran productos de limpieza, cosméticos y otros productos utilizados en el ambiente laboral, como las resinas epoxi, productos fitosanitarios, pinturas, entre otros. También se realizaron extracciones a partir del papel de ticket (impresiones térmicas) que son utilizados en los supermercados, kioscos, entre otro tipo de comercio, envases de yogures bebibles, envases de cartón de yogur, y bandejas de espumilla de estireno que son ampliamente utilizadas en los supermercados para fraccionar alimentos.

Es importante aclarar que, debido al gran universo de sustancias y formulaciones presentes en los productos disponibles en el mercado, se empleó un enfoque

basado en criterios toxicológicos para la selección de los productos a evaluar. Para esto hay que tener en cuenta los siguientes factores; el grado de exposición; la susceptibilidad potencial del individuo, que se traduce en que categorías de esa población es la más vulnerable; la duración y frecuencia de la exposición, que se traduce en que actividades o conjunto de actividades determina que ciertas categorías de la población puedan adquirir dosis peligrosas, pudiendo ocasionar efectos agudos o crónicos. El producto de estos factores establece aquellos productos que son prioritarios para evaluar en función de su riesgo y las poblaciones vulnerables ver la tabla 3.

Una vez adquiridas las muestras de los productos, éstas fueron clasificadas en sólidas y líquidas, donde las sólidas incluían las impresiones térmicas, los envases de yogur, ya sea tipo cartón o nylon y bandeja de espumilla de estireno. Para este tipo de muestras sólidas se empleó la metodología de extracción utilizada por (*Liao & Kannan, 2011*). Para las muestras clasificadas como líquidas se procedió a realizar diluciones con etanol absoluto.

#### *Agrupación de las muestras.*

Con el objeto de realizar observaciones que puedan atribuirse a los diferentes ingredientes de los productos evaluados, se clasificaron las muestras en función del uso previsto en las siguientes categorías:

- Aseo personal; shampoo para bebés, shampoo para adultos, acondicionador y jabón líquido para niños.
- Protección personal; protectores solares para adultos, niños y loción para mosquitos.
- Fitosanitarios; Herbicidas e insecticidas disponibles en el mercado sin restricciones, si bien pueden ser usados en ámbitos laborales, su uso no se limita solo a ese ambiente, quedando comprendidos a usos del hogar también.
- Laboral: Resinas epoxi, masillas epóxicas, combustibles, anclajes para hormigón.
- Aseo del hogar: Detergentes, entre ellos los considerados industriales, aromatizantes y desengrasantes concentrados en pasta.
- Alimentos: Envases de yogurt de cartón y de nylon, manteca y bebidas saborizadas.

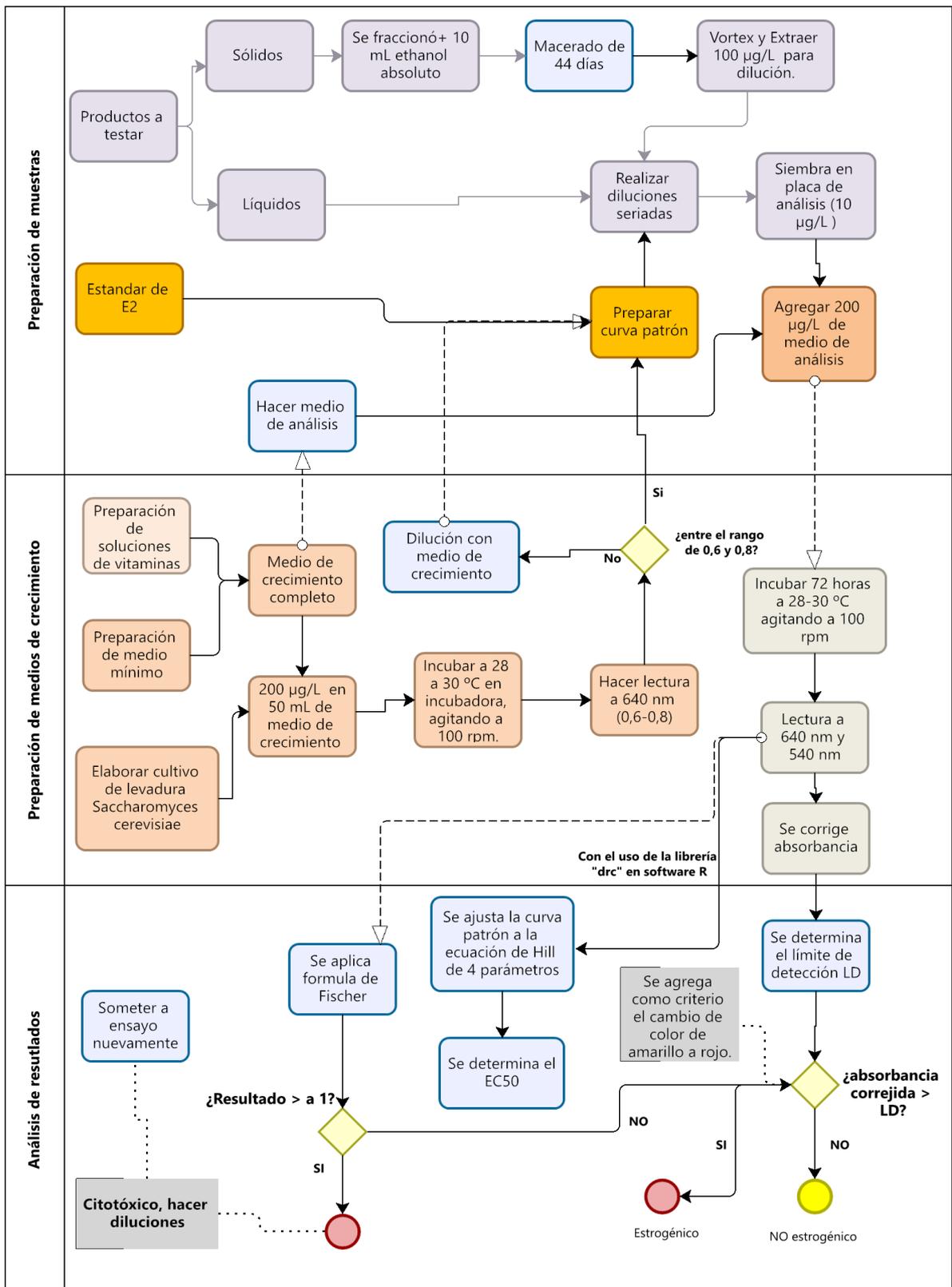


Figura 3: Diagrama de flujo esquematizando la metodología empleada para someter los productos seleccionados al ensayo YES, está organizado en etapas, preparación de los productos a testear, preparación de medios de crecimiento y el análisis de los resultados.

Tabla 3: Muestras seleccionadas para ser evaluadas con el ensayo YES. numeradas, detallando su uso y se le asignó un código con el fin de no exponer las marcas. Además, se detallan los criterios tenidos en cuenta para la selección de los productos, criterios basados en la toxicología, peligrosidad **PT\*** (potencial estrogénico), exposición, susceptibilidad del individuo (población vulnerable), la combinación de estos factores define el riesgo potencial de que un producto tenga efectos adversos y con eso la prioridad para ser evaluado.

ID	Uso	Código	PT*	Exposición		Población vulnerable			Riesgo	Prioridad
				Doméstica	Laboral	Ciclo de vida	Sexo			
							M	F		
1	Detergente doméstico	DDAL	XX	X	X	Niños y adultos	X	X	Alto	Alta
2	Limpiador cremoso	LCrFN	X	X	-	Adultos	X	X	Moderado	
3	Detergente doméstico	DDCG	X	X	X	Niños y adultos	X	X	Alto	Alta
4	Detergente doméstico	DDNC	X	X	X	Niños y adultos	X	X	Alto	Alta
5	Limpiador multiuso antibacterial	LMED	X	X	-	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
6	Jabón líquido ropa	JLR	X	X	-	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
9	Insecticida	IYPF	XX	-	X	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
10	Insecticida	Icip	X	-	X	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
14	Hormiguicida	HAr	X	-	X	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
16	Herbicida	HD48	X	-	X	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
15	Herbicida	HWMMax	X	-	X	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
17	Detergente Cristal	DCFV	X	X	-	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
18	Fabuloso Limón	FLC	X	X	-	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
19	Líquido Lavamanos	LLG	X	X	-	Niños y adultos	X	X	Moderado	Moderado
20	Gel ducha	GDB	X	X	-	Niños y adultos	X	X	Moderado	Moderado
21	Papel de ticket	Pticket	XXX	-	X	Adultos	X	X	Alto	Alta
22	Envase de yogur	EYoCdy	X	X	-	Niños y adultos	X	X	Moderado	Moderado
23	Bandeja de estireno	Best	X	X	-	Niños y adultos	X	X	Moderado	Moderado

24	Envase de cartón jugos	EcJuAs	X	X	-	Niños y adultos	X	X	Moderado	Moderado
25	Shampoo para bebe	SpB	X	X	-	Niños	X	X	Moderado	Moderado
26	Shampoo para adultos	SpA	XX	X	-	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
29	Shampoo	SHC	XX	X	-	Niños y adultos	X	X	Moderado	Moderado
30	Shampoo	SEL	XX	X	-	Niños y adultos	X	X	Moderado	Moderado
31	Shampoo para niños	SpnS	XX	X	-	Niños	X	X	Moderado	Moderado
32	Protector solar	PSC50	XX	X	X	Niños y adultos	X	X	Moderado	Moderado
33	Loción Piopel-Piojicida	LPHA	XX	X	-	Niños	X	X	Moderado	Moderado
34	Mascarilla facial	MFc	X	X	-	Adultos	-	X	Moderado	Moderado
35	Resina epoxi	Repox	XXX	-	X	Adultos	X	X	Alto	Alta
38	Catalizador epoxi	Cepox	XXX	-	X	Adultos	X	X	Alto	Alta
39	Detergente	DAL	X	X	-	Niños y adultos	X	X	Alto	Alta
40	Pintura	PRW	XX	-	X	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
41	Herbicida	HG	XXX	-	X	Adultos	X	-	Alto	
42	Shampoo para niños	SpnJ	XX	X	-	Niños	X	X	Moderado	Moderado
43	Protector solar SFP 50 para niños	SFPSC	XX	X	-	Niños	X	X	Moderado	Moderado
44	Losión antimosquitos	LJ	XX	X	-	Niños	X	X	Moderado	Moderado
46	Veneno en Polvo de hormiga	VPFM	XXX	X	X	Adultos	X	X	Alto	Alta
47	Shampoo bebe	SJ	X	X	-	Niños	X	X	Moderado	Moderado
48	Acondicionador bebe	AJ	X	X	-	Niños	X	X	Moderado	Moderado
49	Protector Solar 50	PSD	X	X	X	Niños y Adultos	X	X	Moderado	Moderado
50	Protector solar bebe	PE	X	X	-	Niños	X	X	Moderado	Moderado
51	Shampoo antidaño	STC	X	X	-	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
52	Shampoo control caída	SH&S	X	X	-	Adultos	X	X	Moderado	Moderado

53	Shampoo Hidra Liso	SHLD	X	X	-	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
54	Acondicionador hidra-liso	AHLD	X	X	-	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
55	Protector Solar 30 FPS	PSN	X	X	X	Niños y Adultos	X	X	Moderado	Moderado
56	Jabón líquido beby	JLpnD	X	X	-	Niños	X	X	Moderado	Moderado
57	Detergente Verde	DB	X	X	X	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
58	Detergente concentrado	DC	X	-	X	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
59	Protector solar 30 FPS	PSC	X	X	-	Niños y Adultos	X	X	Moderado	Moderado
60	Silicona Antihongos para construcción	SanthSi kC	X	-	X	Adultos	X	-	Moderado	Moderado
61	Adhesivo para anclajes parte A	AdhSikF ix-2	X	-	X	Adultos	X	-	Alto	Alta
62	Adhesivo para anclajes parte B	AdhSikF ix-2	X	-	X	Adultos	X	-	Alto	Alta
63	Gasoil	GA	X	-	X	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
64	Bebida-Frutté Naranja	BFNS	X	X	X	Niños y Adultos	X	X	Moderado	Moderado
65	Fragancia Lavanda	FLS	X	X	X	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
66	Limpiador Multiuso	LMR	X	X	X	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
67	Fragancia Concentrada	FCF	X	X	X	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
68	Limpiador desodorante fragancia pino	FPL	X	X	X	Adultos	X	X	Moderado	Moderado
69	Envase de cartón yogur frutilla	EYoCe	X	X	-	Niños y adultos	X	X	Moderado	Moderado
70	Envase de manteca	EMaCe	X	X	-	Niños y adultos	X	X	Moderado	Moderado

## Ajuste de concentración de las muestras.

Cuando la elevada viscosidad de alguna muestra dificultó el uso de las micropipetas, se hicieron diluciones con etanol absoluto (Figura 3- Preparación de muestras). Para ello, se pesó el contenido de las muestras y luego se agregó etanol, el rango de lo agregado de etanol a las muestras de productos abarco 400 a 1000  $\mu$ L. Seguidamente se determinó la masa de 1000  $\mu$ L de etanol a fin de convertir este volumen a mg y así expresar las concentraciones de las muestras en % de dilución masa/masa. Con este porcentaje de dilución masa/masa (%m/m) se realizaron los gráficos para la actividad estrogénica y la toxicidad de cada muestra.

### *Extractos de envases de alimentos y papel de ticket.*

Para evaluar la actividad estrogénica en matrices de envases de cartón y de papel de ticket se comenzó por limpiar el material con abundante agua caliente y esponja, y posteriormente a cortar los materiales en pequeños trozos (cuadrados de 1cm x 1cm), empleando una tijera previamente esterilizada. Luego se pesaron los trozos de papel con balanza de precisión (sartorius-CP2245) y se le agregó etanol absoluto (marca DORWIL) para análisis hasta realizar los ensayos. La cantidad de etanol agregado vario dependiendo del volumen ocupado por los materiales evaluados ver tabla 4, el tiempo que las muestras estuvieron en etanol fue de 44 días.

*Tabla 4: Cantidades utilizadas para las muestras sólidas, con sus respectivos agregados de etanol absoluto.*

Producto	Peso (g)	Etanol (g)	Ejemplo
Envase de cartón de jugos Ades	2,3	5,83	
Espumilla de estireno	0,2	8,07	
Envase de cartón Yogur Frutilla	2,3	7,46	
Impresión térmica (ticket) de supermercado	0,5	6,93	
Envase de nylon yogur Claldy	0,5	4,76	
Envase de manteca Conaprole	0,9	9,68	

## Ensayo YES

Reconstrucción de la cepa.

*Preparación de soluciones y medios de análisis.*

En la fase inicial se elaboró el medio de crecimiento esencial (medio mínimo), utilizando metodología de Roughtledge y Samper (1996) con modificaciones de (Griffero, 2015). Para ello, se pesaron los insumos detallados en el anexo II con balanza de precisión Sartorius modelo CP224S y se diluyeron en un 1 litro de agua ultrapura en botella de vidrio Schott estéril. Posteriormente se extrajeron alícuotas del medio mínimo en tubos Falcón de 50 mL previamente esterilizados en autoclave a 121°C por 20 minutos para reducir los riesgos de contaminación del medio (Fig. 3).

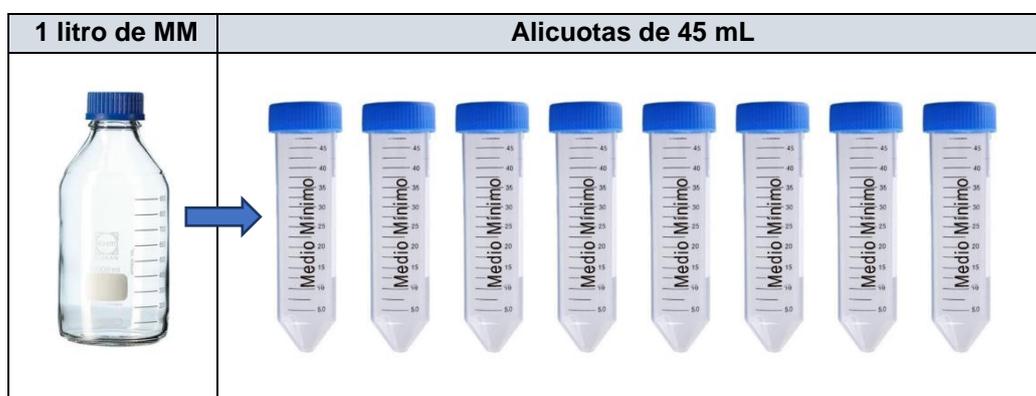


Figura 4: Esquema de elaboración de las alícuotas.

Posteriormente se agregaron al medio mínimo estéril L-treonina, L-ácido aspártico, solución de vitaminas, solución de glucosa, sulfato de cobre II, (las cantidades están detalladas en el anexo I), con estos agregados se obtiene el medio de crecimiento (Medio Completo) (fig. 4)

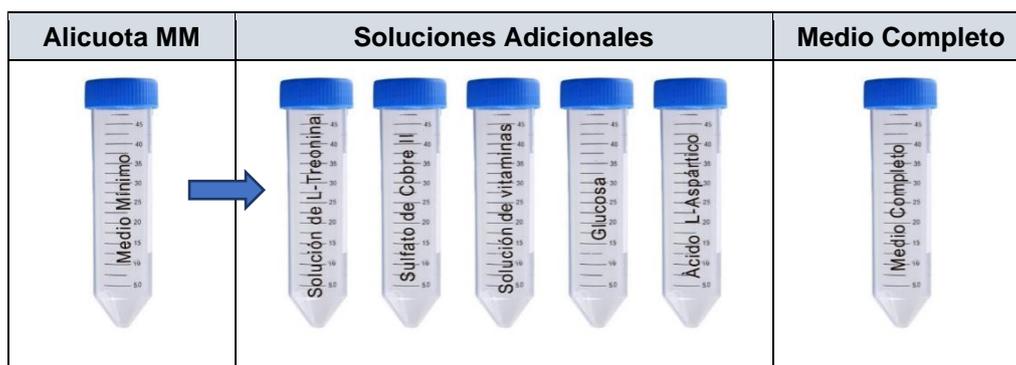


Figura 5: Tubos Falcon de 50 mL empleados para las alícuotas de medio mínimo, y para las soluciones que se agregan para formar el medio completo, las cantidades de cada solución se detallan en el anexo I.

### *Elaboración del cultivo.*

Partiendo de un banco de levadura almacenada a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se extrajo con micropipeta  $200\text{ }\mu\text{L}$  de levadura, y se agregaron a  $50\text{ mL}$  de medio de crecimiento completo en un matraz Erlenmeyer de  $250\text{ mL}$ . El cultivo de levadura se llevó a incubadora DAIHAN Scientific por 48 horas en un rango de temperatura de  $28\text{-}30^{\circ}\text{C}$  con agitación a  $100\text{ rpm}$  usando el agitador Orbital Shaker modelo OS-20 (Figura 6).



*Figura 6: Agitador orbital Shaker modelo OS-20 (izquierda), incubadora DAIHAN Scientific (derecha).*

El procedimiento de cultivo se realizó en cámara de flujo laminar marca Dwyer (modelo: MARK II), previamente esterilizada con 15 minutos de luz ultravioleta y alcohol antes de comenzar cada cultivo. Tanto los matraces Erlenmeyer como los tips de las micropipetas fueron autoclavados antes a  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos.

### *Viabilidad de la cepa*

Se hicieron tres cultivos para estabilizar la levadura. La verificación del desempeño de la levadura se realizó con un estándar con una solución patrón 17 Beta- Estradiol de concentración  $28\text{ }\mu\text{g/L}$ . El montaje del ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos estériles donde se hicieron diluciones seriadas con un factor 1:2, obteniendo el siguiente rango de concentraciones  $0,0136$ ;  $0,0273$ ;  $0,0546$ ;  $0,1093$ ;  $0,2187$ ;  $0,4375$ ;  $0,875$ ;  $1,75$ ;  $3,5$ ;  $7$ ;  $14$  y  $28\text{ }\mu\text{g/L}$  de sustrato). Posteriormente se procedió con el ensayo según el protocolo elaborado para el ensayo Anexo III.

El objetivo de esta fase fue de obtener un gradiente de sustrato que empieza a visualizarse a las 48 horas y debiendo hacer las lecturas antes de las 72 horas. Para verificar si el ensayo fue exitoso, se procedió al análisis estadístico de los datos ajustándose una curva de forma sigmoide debido al tipo de interacción

cooperativa entre moléculas de enzima y el sustrato (Weiss, 1997). Al ajustar la curva se verifica que la levadura tuvo un buen desempeño y el ensayo no se contaminó. Para este trabajo se emplearon tres ensayos exitosos consecutivos antes de la evaluación de las muestras de estudio.

### Ensayo YES.

Para el montaje de la prueba se adoptó el protocolo desarrollado por Roughtledge y Sumpter (1996) con modificaciones de (Bila, 2005). Antes de realizar el ensayo, se procedió a limpiar con alcohol la superficie de trabajo, las pipetas y los contenedores de los tips. Todos los materiales para las soluciones fueron debidamente esterilizados y se emplearon placas de análisis de 96 pocillos estériles (marca Axygen).

En primer lugar, se hicieron las diluciones de las muestras en placas de 96 pocillos, donde se añadieron 100  $\mu$ L de etanol absoluto desde la segunda columna hasta la columna 12. Luego de los 100  $\mu$ L de etanol se agregó 100  $\mu$ L de la muestra a analizar al primer pocillo, procediendo con diluciones seriadas con un factor 1:2. El rango de concentraciones se representó en % solución m/m, obteniendo rangos 100 hasta 0,05 (para aquellas no diluidas) y de 83 hasta 0,04 (para aquellas diluidas). En el protocolo se puede ver más en detalle el esquema de dilución Anexo I. Hechas las diluciones, se transfieren a la fila correspondiente 10  $\mu$ L a la placa de análisis. Todas las muestras se hicieron por duplicado.

Para obtener la curva estándar se utilizó una solución patrón de 28  $\mu$ g/L de 17beta estradiol (E2, que se preparó a partir de estándares de E2 (marca **Steraloids**) en etanol absoluto. Al igual que las muestras, las diluciones seriadas se hicieron con un factor de dilución 1:2 de manera que el gradiente abarcase un rango de concentraciones de 0,0136; 0,0273; 0,0546; 0,1093; 0,2187; 0,4375; 0,875; 1,75; 3,5; 7; 14 y 28  $\mu$ g/L (Fig. 7).

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

Figura 7: Esquema de una placa de dilución, por cada fila una muestra con un gradiente de mayor a menor A1 hasta A12. Los colores representan cada muestra, las diluciones se realizaron de izquierda a derecha (de mayor a menor concentración) con un factor de dilución 1:2.

De esta forma en la placa que contenía la curva estándar también se agregó:

-Una fila de control negativo, se utilizó 10 µL de etanol y medio de análisis.

-Una fila de blanco, se utilizó el medio de análisis (CPRG con cultivo de no más de 48 horas).

Luego de transferir los 10 µl a la placa de análisis, se la dejó reposar unos 10 a 15 minutos en cámara de flujo laminar hasta verificar el secado de las gotas en el fondo de los pocillos. Luego se agregaron 200 uL de solución medio de análisis provenientes de un tubo Falcon de 50 mL que fue elaborada en el momento. Esta solución contiene el reactivo (CPRG) y medio de cultivo de levadura que fue preparada con no más de 48 horas de antelación. Se tomaron medidas para reducir el efecto de la luz sobre el CPRG durante la elaboración del medio de análisis.

En el primer pocillo de la placa se agregaron 100 µL de cada muestra (diluida y resuspendida) con concentraciones en (% m/m) y se realizaron diluciones con el mismo factor de dilución 1:2 siguiendo los mismos pasos detallados en el párrafo anterior. La siembra se hizo transfiriendo 10µL de qué cada muestra (pocillo) y se le agregó el medio de análisis, se agitó a 100rpm por 2 minutos y se cultiva a 30°C en incubadora por 72 horas para permitir que las levaduras proliferen. Luego, se retiran las placas de la incubadora y se realizan las lecturas en un lector de placas.

Se realiza lectura a dos longitudes de onda distintas, permitiendo determinar si existe citototoxicidad (a 600 nm) a determinada concentración del analito y luego estrogenicidad a 540nm.

#### Análisis de datos.

Luego de 72 horas de incubación, se procedió a realizar lectura en lector de placas FLUOstarOPTIMA a 540 nm para reacción colorimétrica y 640 nm para corregir el efecto de la turbidez por el crecimiento de la levadura. Esta corrección fue realizada con el método propuesto por (*Fent et al.*, 2006).

$$\text{Absorbancia Corregida} = \text{Abs. Muestra 540nm} - (\text{Abs. Muestra 640} - \text{Abs. Blanco 640})$$

## Ecuación 1

Una vez obtenida la absorbancia corregida, se procedió a realizar la estimación de los parámetros de la curva dosis-respuesta que permite relacionar la absorbancia corregida con la dilución realizada de las muestras.

*Criterios de selección del modelo matemático.*

El ajuste de la curva dosis-respuesta se realizó empleando el software estadístico R y la interfase RStudio versión 4.1.1 (Core Team, 2020), con el paquete “drc”. Se utilizó la función de Hill de cuatro parámetros;

## Ecuación 2.

$$AbsC = c + \frac{(d - c)}{1 + 10^{\log\left(\frac{x}{e}\right)^b}}$$

Donde *AbsC*, es la absorbancia corregida, obtenida de la ecuación 1.

*c*, corresponde a la mínima inducción de la actividad estrogénica.

*d*, corresponde a la máxima inducción de la actividad estrogénica,

*b*, es la pendiente de la curva,

*x*, es la concentración de la actividad estrogénica,

*e*, corresponde al EC50.

Esta función de Hill se seleccionó en base a bibliografía (Fent et al., 2006) ya que las condiciones de cooperatividad en la interacción ligando-receptor se manifiesta en la forma sigmoidea de la curva (Weiss, 1997). La función “drc” es parte del paquete “drc” y permite analizar y ajustar datos de ensayos dosis respuestas a modelos no lineales empleando el método de estimación de máxima verosimilitud (Ritz et al., 2015).

Como era esperable, en algunas lecturas se observó ocurrencia de toxicidad (manifestada por la inhibición del crecimiento de la levadura), antes de comenzar cada ensayo se hizo lectura a 5 pocillos con 100 uL de cultivo, el valor esperado es 0.6-0.8). Este valor permite conocer la población mínima necesaria de levadura para garantizar una respuesta estrogénica en caso de que exista la presencia de un agonista del REh en las muestras, y de esta forma forzaría a la reacción colorimétrica de amarillo a rojo, que será traducida en valores de absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm y 640 nm. Pero pueden presentarse muestras que produzcan la lisis de la levadura o bien inhiban el crecimiento, de esta forma la lectura sirve como línea base, para determinar el

enmascaramiento tóxico que pueden tener ciertas formulaciones, pudiendo provocar interpretaciones de falsos negativos (*Frische et al.*, 2009). Para cuantificar la inhibición del crecimiento de la levadura se utilizó la expresión planteada por (*Frische et al.*, 2009).

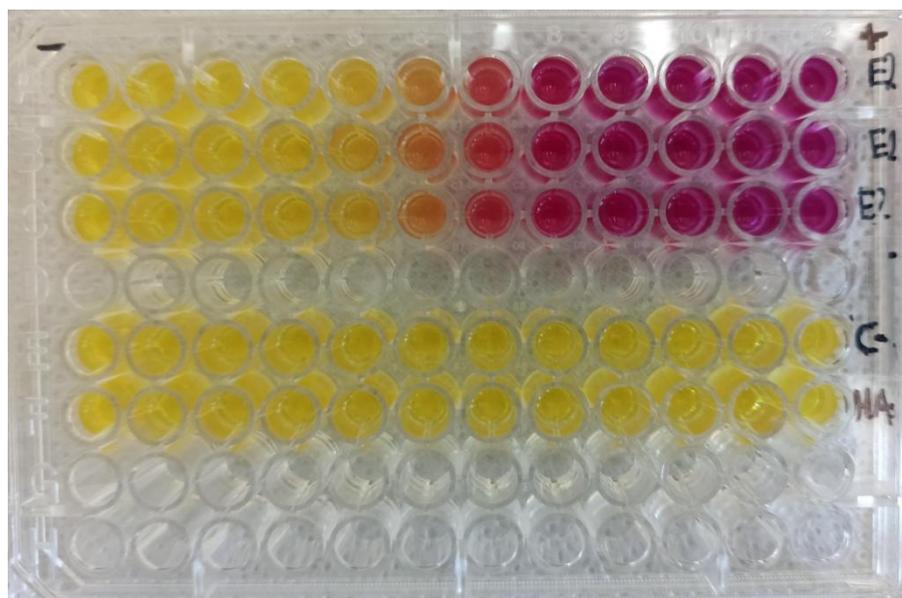
### **Ecuación 3.**

$$Toxicidad = 1 - \frac{Absorbancia_{muestra640nm}}{Absorbancia_{blanco640nm}}$$

Posteriormente se graficó la absorbancia con los valores de toxicidad respecto a la concentración de las muestras %m/m. También se determinó el límite de detección (LD) a partir de la siguiente ecuación (límite de detección de un método analítico) como  $LD = 3,3SD_B$ , donde  $SD_B$  corresponde a la desviación estándar del blanco del ensayo (etanol + medio de análisis) (*Boqué*, 2004).

## Resultados.

Se evaluaron 59 muestras, realizándose 5 ensayos, cada uno de ellos con la curva de estradiol (E2) correspondiente, un control negativo y un control para el medio de análisis. La curva de E2 se hizo por triplicado, mientras que las muestras se hicieron por duplicado. A continuación se ilustra cómo se ven los resultados a las 72 horas de una placa con el estándar de E2 y los blancos de incubación a 30 °C (Figura 8).



*Figura 8: Ensayo a las 72 horas en placa de análisis, triplicado de E2, control negativo y blanco. La coloración roja representa respuesta estrogénica debido a la producción de enzima beta-galactosidasa que al reaccionar con el CPRG (el reactivo) produce cambio de color, la coloración varía en función de la concentración de la enzima la cual está asociada a la concentración de Estradiol. El color varía de amarillo a rojo en función de la presencia de enzima beta-galactosidasa, si es amarillo es de esperar que no haya respuesta estrogénica.*

La curva de concentración-respuesta estrogénica se realizó con un rango (1,37 ng/L a 2800 ng/L) para todas las muestras evaluadas y tiene una forma sigmoideal, con un valor promedio mínimo de absorbancia de 1,37 y un máximo de 3,45, expresado en 53 µg EQ-E2/L y 226 µg EQ-E2/L respectivamente. Para cada ensayo se calculó el EC50 (o cantidad de sustrato que genera una respuesta equivalente a la mitad de la respuesta máxima) a partir del estándar de estradiol elaborado para cada ensayo. El EC50 resulta de la estimación del parámetro ( $e$ ) ajustado para la función de Hill de 4 parámetros, los parámetros estimados se muestran en la (tabla 5). El EC50 promedio tomando los 5 ensayos fue de 146 µg/L con un error estándar de 20,8 µg/L. El límite de detección fue en promedio considerando los 5 ensayos de 50,5 µg/L E2.

### **Ajuste de las curvas de calibración de E2 a la ecuación de Hill.**

El ajuste matemático para la ecuación de Hill para los cinco estándares de E2 fue estadísticamente significativo para sus cuatro parámetros.

	Parámetros	Parámetros estimados	SE*	p-valor
Y1	b	-3,85	0,145	3,92e-08
	c	1,31	0,008	2,48e-14
	d	3,33	0,012	4,65e-16
	e	226,6	3,88	8,21e-12
Y2	b	-3,23	0,354	1,67e-05
	c	1,39	0,029	4,28e-11
	d	3,58	0,038	1,88e-13
	e	150,33	6,22	9,26e-09
Y3	b	-2,85	0,172	1,81e-07
	c	1,42	0,017	5,54e-13
	d	3,56	0,021	1,85e-15
	e	116,88	3,028	2,24e-10
Y4	b	-3,03	0,403	6,76e-05
	c	1,35	0,031	8,88e-11
	d	3,33	0,038	3,90e-13
	e	123,9	5,935	2,91e-08
Y5	b	-3,68	0,119	1,35e-09
	c	1	0,007	6,16e-15
	d	3	0,009	<2,2e-16
	e	116,42	1,34	3,43e-13

Tabla 5: En la siguiente tabla se presentan los 4 parámetros estimados para la ecuación de Hill, las estimaciones se hicieron para cada ensayo, Y1 corresponde a la curva de calibración del ensayo 1, y así hasta el Y4. El parámetro (e) corresponde al EC50 µg/L.

Para la selección del modelo estadístico se realizó una comparación entre la ecuación de Hill de 4 parámetros y la de 3 parámetros, dichos ajustes fueron comparados en base a sus residuales, presentando un mejor ajuste la de 4 parámetros. En los gráficos debajo en la (figura 9), se muestra los ajustes realizados para cada curva de E2, la línea negra punteada representa los valores de absorbancia corregida obtenidas con el espectrofotómetro a 540 nm y 640 nm. Mientras que la línea verde representa la calidad del ajuste utilizando la ecuación de Hill de 4 parámetros, la línea negra con los asteriscos representa los blancos de cada muestra (etanol y medio de análisis).

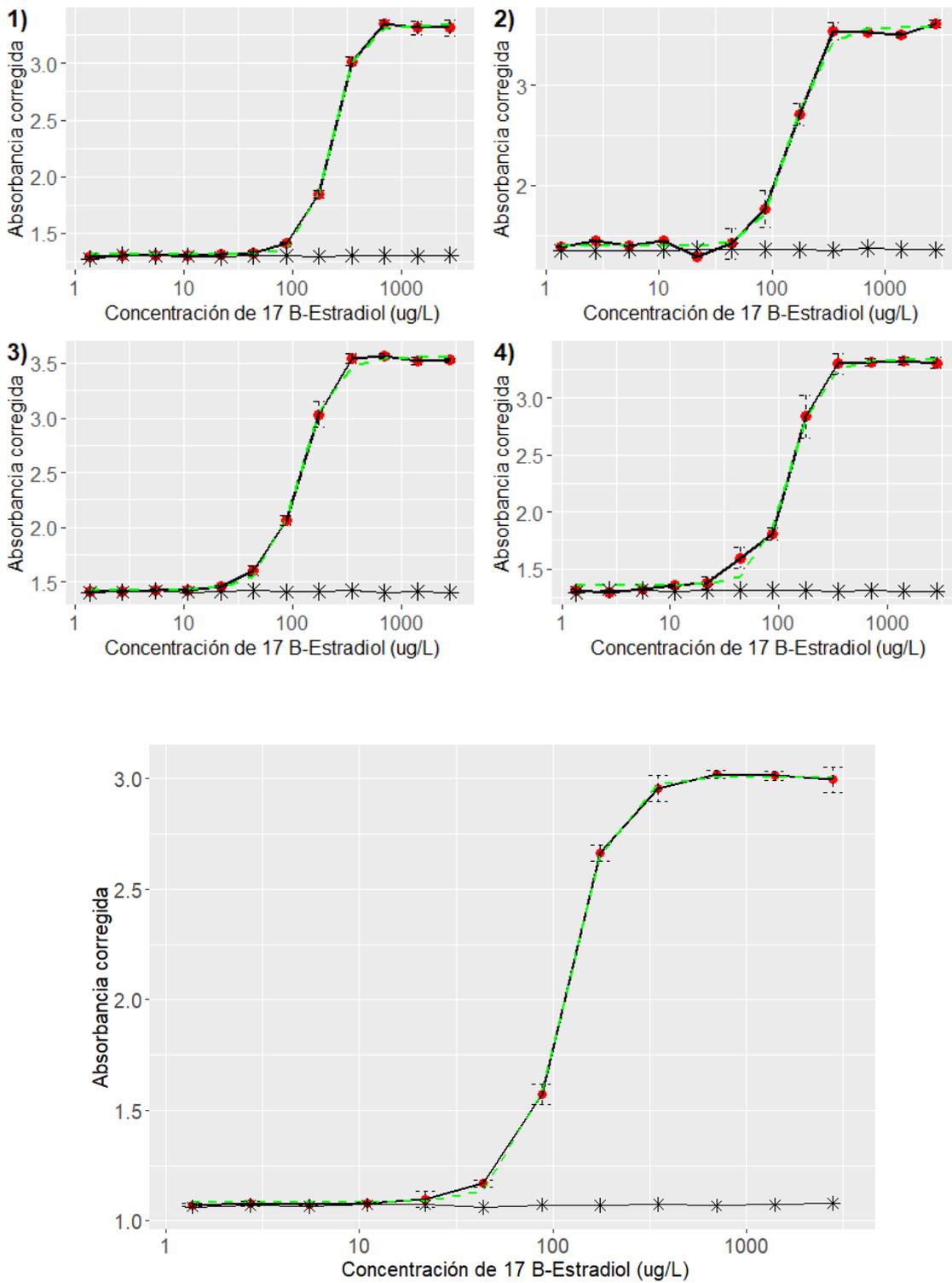


Figura 9: Ajustes estadísticos realizados para cada curva de calibración. La línea negra con estrella corresponde a los blancos, la línea negra con puntos rojos corresponde al promedio del triplicado de E2, con su error estándar, y la línea verde punteada corresponde al ajuste de la ecuación de Hill de 4 parámetros.

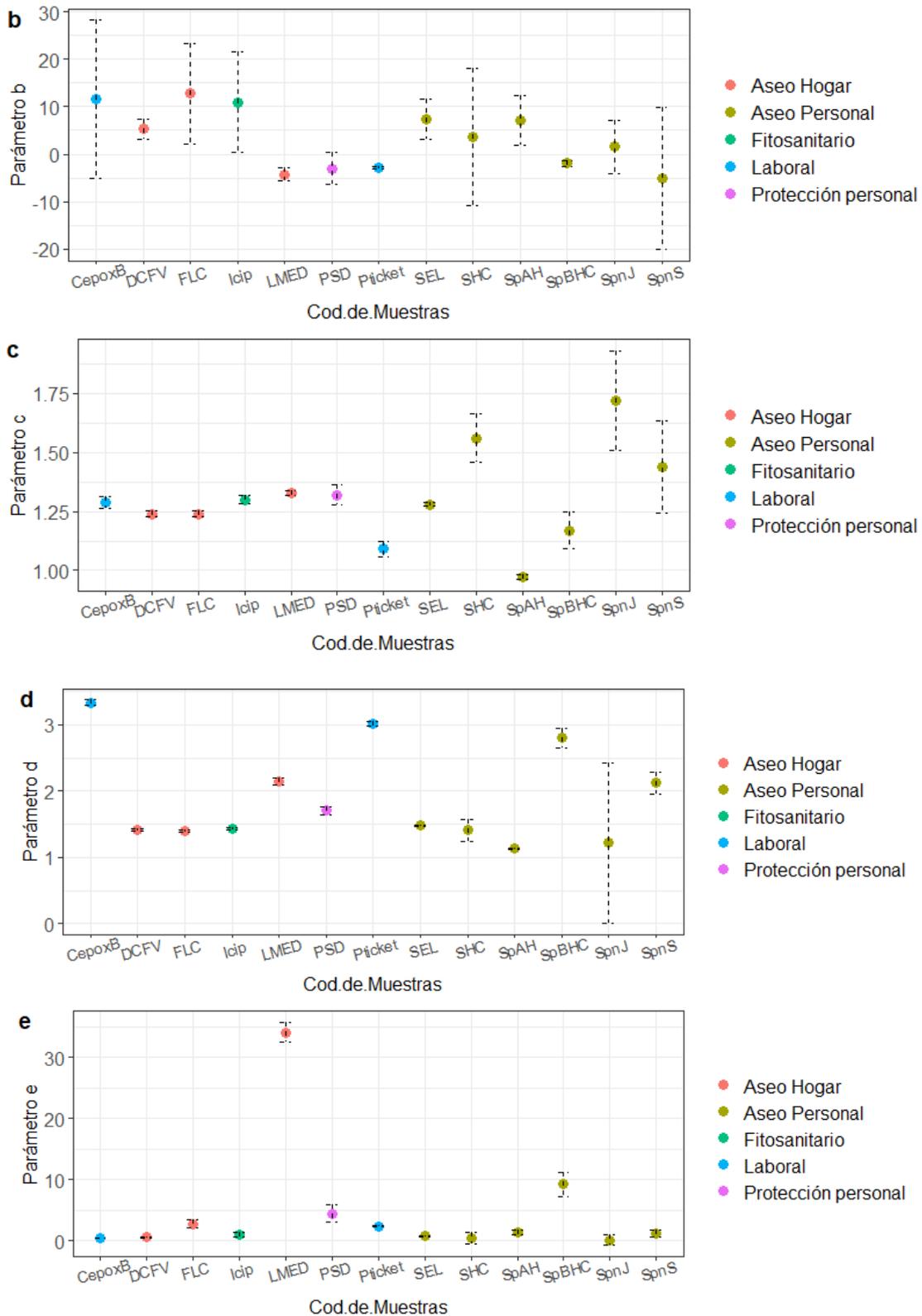


Figura 10: En esta imagen se presenta los ajustes para la estimación de los 4 parámetros (b,c,d y e) de la función de Hill, se realizaron para cada muestra con reacción colorimétrica, cuatro muestras no presentaron buenos ajustes al modelo de Hill de 4 parámetros, no pudiendo estimar los parámetros para realizar los gráficos.

De los 59 productos evaluados, 17 presentaron actividad estrogénica a las 72 horas. Entre ellos, 5 corresponden a productos utilizados en el aseo del hogar, 7 productos utilizados para el aseo personal, 2 productos utilizados con fines de control de plagas (fitosanitarios), 2 utilizados en ambientes laborales una resina epoxi y un extracto de papel de impresión térmica (ticket de supermercado) y 1 producto dentro de la categoría de protección personal (tabla 6). Los extractos de envases de alimentos con la extracción realizada, no presentaron actividad estrogénica para el rango de detección del ensayo (Figura 10).

Entre las muestras categorizadas como aseo personal con actividad estrogénica, se encuentran shampoo y acondicionadores para adultos y niños y un jabón líquido para niños. Entre los productos de aseo del hogar presentaron actividad estrogénica detergentes, limpiadores multiuso, aromatizantes, jabón líquido para ropa y un aromatizante con fragancia de limón. En los categorizados como de exposición laboral, el extracto de papel de impresión térmica (ticket de supermercado) y un catalizador de resina epoxi tuvieron actividad estrogénica. En la categoría de fitosanitarios, presentaron actividad estrogénica 1 herbicidas y 1 insecticidas (tabla 6). En la categoría de productos de protección personal presentó actividad estrogénica un protector solar. Las restantes muestras de productos no presentaron actividad estrogénica para el rango de detección de los ensayos.

*Tabla 6: Resumen de resultados de los datos positivos a actividad estrogénica.*

<b>Categoría</b>	<b>Muestras</b>	<b>Positivos</b>	<b>%</b>
Aseo Hogar	13	5	38,5
Aseo Personal	17	7	41,2
Fitosanitario	7	2	28,6
Laboral	7	2	28,6
Protección Personal	9	1	11,1
Alimentos	6	0	0,0
<b>Total</b>	<b>59</b>	<b>17</b>	<b>28,8</b>

A modo de ejemplo, en la (figura 11) se puede apreciar la coloración roja, característica de un resultado con actividad estrogénica, debido a la presencia de la enzima beta-galactosidasa expresada por la levadura, la enzima reacciona de amarillo a rojo por la presencia del reactivo CPRG en el medio donde crece la levadura. Los colores amarillos corresponden a que no hay presencia de beta-galactosidasa, si bien el cambio de color es un buen indicador de respuesta estrogénica, esto se confirmó comparando las absorbancias corregidas con el límite de detección. Todas las muestras con reacción colorimétrica que presentaron valores de absorbancia corregida mayores al límite de detección, el cual fue de 0,44 fueron consideradas con actividad estrogénica. También se

aprecia el gradiente de color que presentaron algunas de las muestras evaluadas. Si bien el gradiente de coloración (rojo suave a rojo fuerte) se corta a medida que aumenta la concentración de las muestras, puede ser producto de la inhibición de crecimiento de la levadura. La inhibición de crecimiento es esperable para ciertas concentraciones de las muestras evaluadas, ya que los ingredientes activos de muestras como los shampoo y los detergentes están formulados con alguna base de tensoactivos, y éstos pueden romper la membrana de la levadura inhibiendo su crecimiento, lo que afecta negativamente el desempeño de la levadura en los ensayos, a este efecto se le denomina enmascaramiento tóxico (*Frische et al.*, 2009).

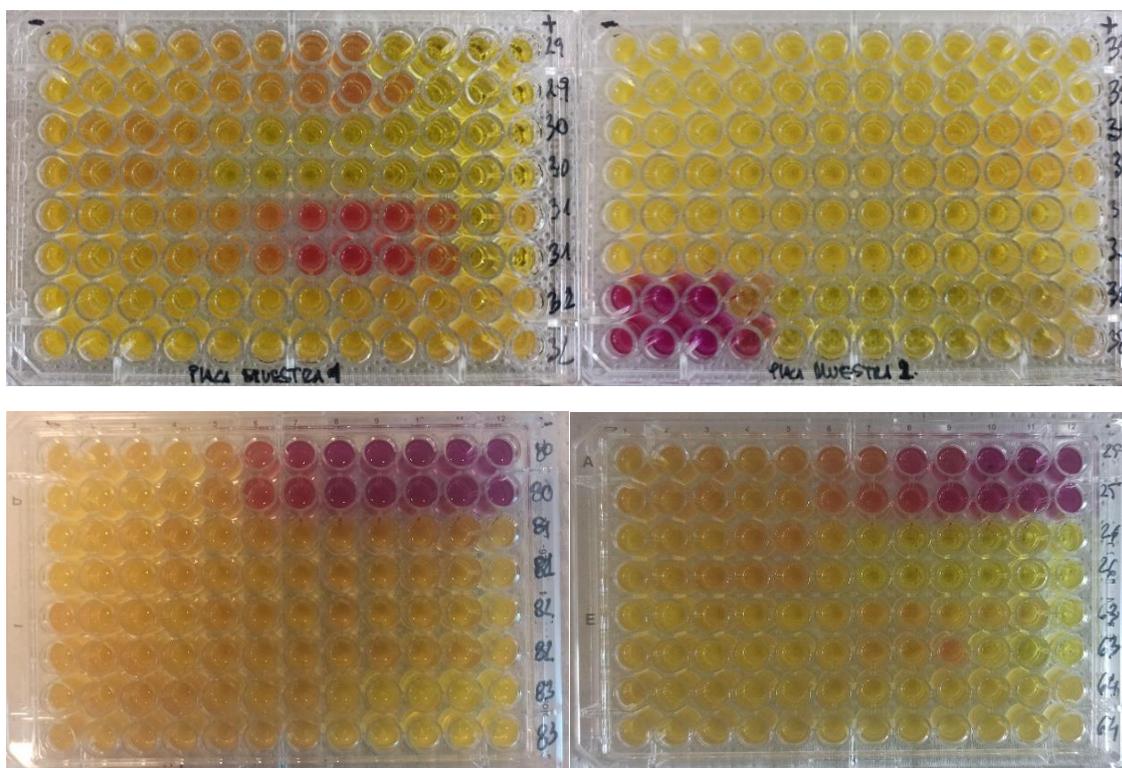


Figura 11: Apariencia de una respuesta con actividad estrogénica de las muestras evaluadas, ver la similitud de los duplicados para validar el resultado positivo. Arriba a la izquierda se presentan tres muestras con reacción colorimétrica (29, 30 y 31), arriba a la derecha la muestra 38 (catalizador resina epoxi), debajo a la izquierda muestra 80 (ticket de supermercado) y debajo a la derecha muestra 25 (shampoo para bebe), la validación de la actividad estrogénica se asigna si pasa el límite de detección (absorbancia corregida 0,44)

En las muestras que presentaron actividad estrogénica (tabla 7) se presentan los rangos de EQ-E2 en  $\mu\text{g/L}$ , entre las muestras con mayor actividad se encuentran; un catalizador de resina epoxi, un insecticida y un protector solar para niños si tenemos en cuenta su concentración vs respuesta estrogénica.

Tabla 7: Resultados en EQ-E2 con su respectivo rango de concentración en % masa/masa, en esta tabla también podemos comparar los resultados de las muestras con EC50 del estándar de estradiol. Para el caso de las extracciones de productos líquidos se expresaron en % masa/masa y para las extracciones de matrices sólidas (i.e. papel de impresión térmica peso/volumen).

Categoría	Producto	EQ-E2 (ng/L)	Dilución (%)	Estrogenicidad
AP	Shampoo 1	121,3	2,44	4,97 µg EQ-E2/L
AP	Shampoo 2	66	18,5	0,357 µg EQ-
AP	Shampoo 3	62,3	1,14	5,46 µg EQ-E2/L
AP	Shampoo 4	215,8*	83	0,26 µg EQ-E2/L
AP	Shampoo para niños	164*	18,5	0,89 µg EQ-E2/L
AP	Gel de ducha	165*	25	0,66 µg EQ-E2/L
AP	Shampoo para niños	56	4,75	1,18 µg EQ-E2/L
L	Catalizador de resina epoxi	332*	11,75	2,82 µg EQ-E2/L
L	Papel impresión térmica	259*	100	518 µg EQ-E2/g
F	Insecticida	76,6	0,73	10,5 µg EQ-E2/L
F	Hormigicida	145	25	0,58 µg EQ-E2/L
PP	Protector solar	97,3	4,75	2,05 µg EQ-E2/L
AH	Detergente doméstico	177*	74	0,24 µg EQ-E2/L
AH	Limpiador multiuso	206*	70	0,29 µg EQ-E2/L
AH	Fragancia de limpieza	118,5	1,5	7,9 µg EQ-E2/L
AH	Líquido lavamanos	117	3,12	3,75 µg EQ-E2/L
AH	Detergente	116	0,39	29,7 µg EQ-E2/L

\*Valores de estrogenicidad por encima del EC50 del estándar de estradiol, 146 ng/L.

Para las muestras con actividad estrogénica se realizó una agrupación de las categorías asignadas, a las cuales se les calculo los EQ-E2 a partir de la ecuación 2. Calculados los EQ-E2 se realizaron 5 gráficos, uno para cada categoría, absorbancia corregida en función de los valores de EQ-E2 obtenidos (Figuras 12 y 13). Estos gráficos permiten ver si los productos (representados con códigos) tienen una actividad estrogénica creciente o decreciente dentro de la misma categoría o si hay diferencias de respuesta estrogénica entre las categorías, pudiendo brindar información para crear subcategorías en función de su composición.

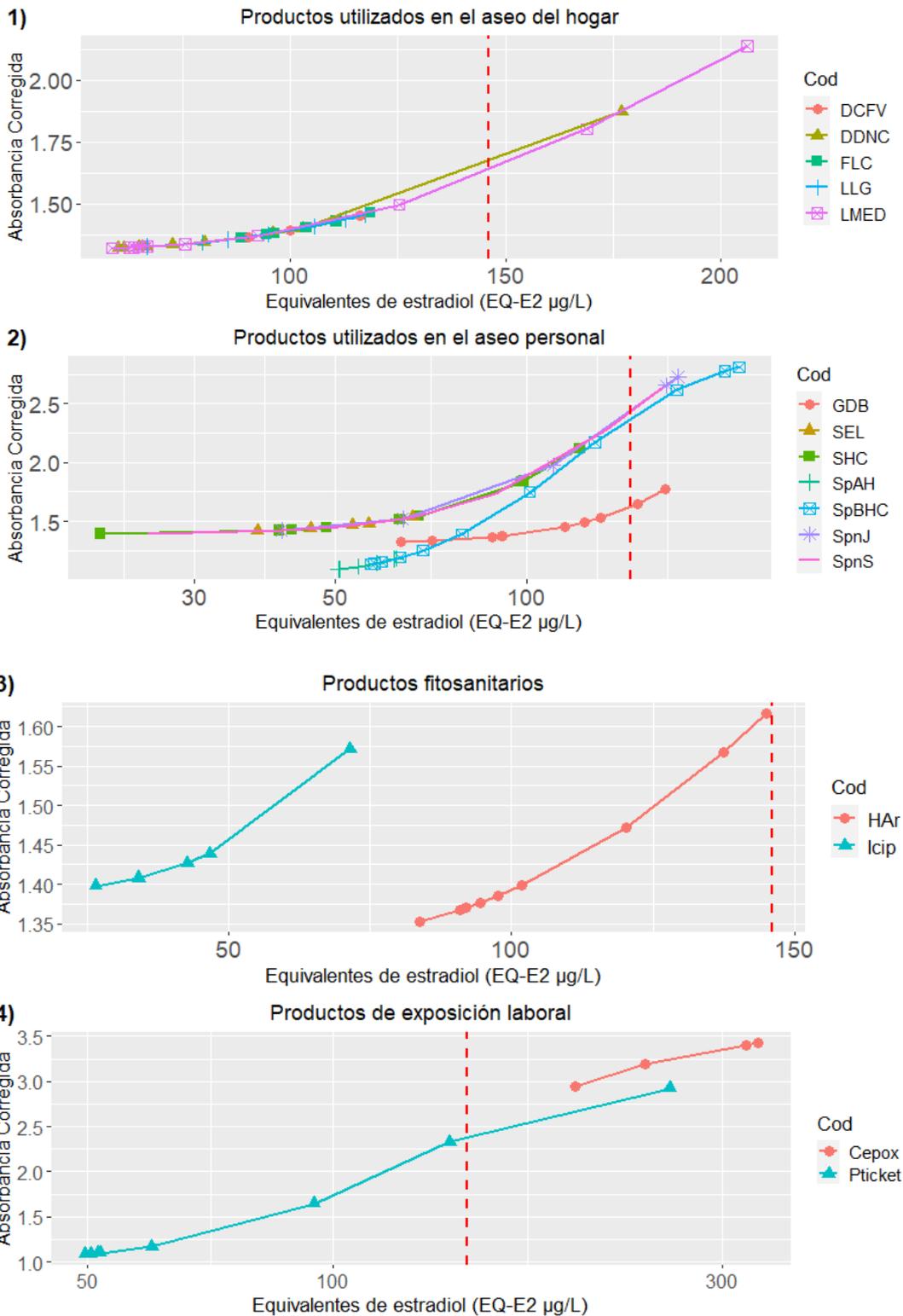


Figura 12: Se muestra un conjunto de gráficos de los resultados de las muestras con actividad agonistas de estrógenos en función de su porcentaje de dilución masa-masa. Los gráficos están presentados por las categorías asignadas. También se puede apreciar los resultados por encima del EC50 promedio del estándar de E2 tomando los 5 ensayos, representada por línea vertical roja punteada.

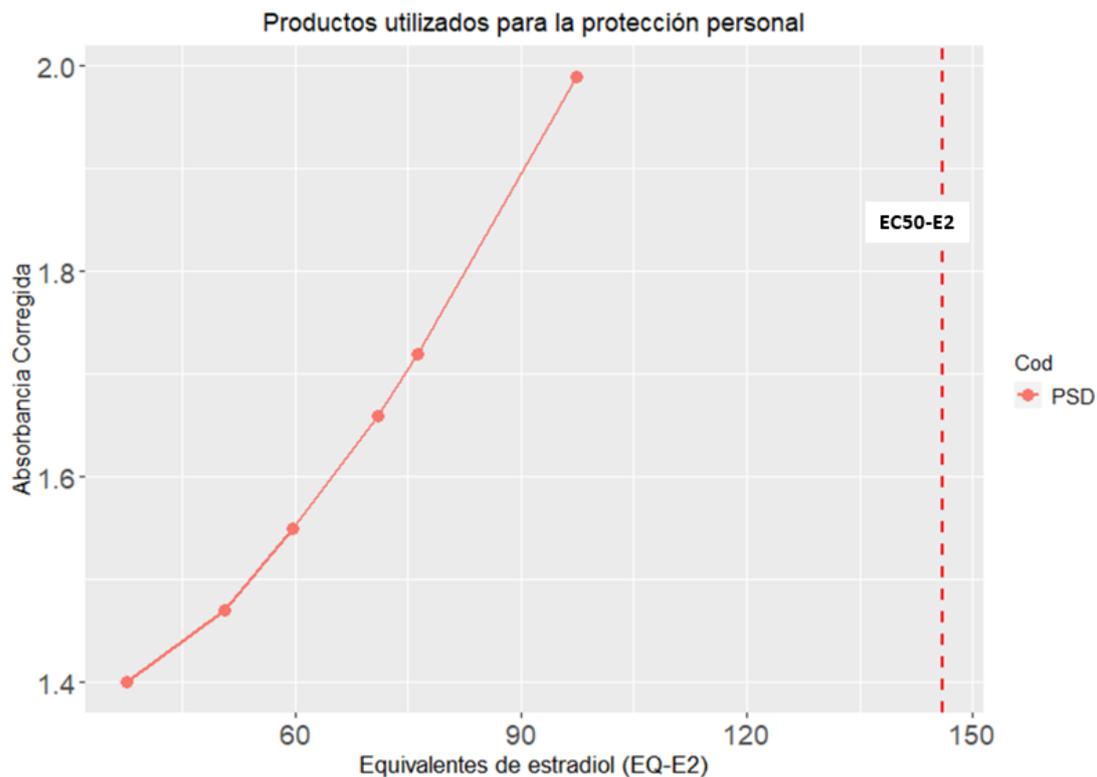


Figura 13: Corresponde al mismo conjunto de gráficos anterior, esta categoría presentó una sola muestra con actividad estrogénica, dicha muestra corresponde a un protector solar.

La inhibición del crecimiento de la levadura se tomó como citotoxicidad, que se determinó en base a la ecuación 3. Es importante contar con esta determinación para tener en cuenta el efecto del enmascaramiento tóxico que pueden ejercer determinadas sustancias como parte de una formulación (cóctel) que se pretende evaluar.

De las 59 muestras evaluadas, solo 4 presentaron valores de absorbancia corregida mayores a 1 utilizando la ecuación planteada por Frische 2009. Entre los cuatro productos se encuentran un detergente concentrado de grado industrial, una loción repelente de mosquito para niños, un protector solar para adulto y un veneno para hormiga en polvo. Estos resultados se dan por la inhibición de crecimiento en función del aumento de la concentración del porcentaje masa/masa, como se muestra en la (Figura 14), la línea roja intercepto en eje y representa el límite en donde los valores comienzan a tomarse como citotóxicos, que es cuando los valores de la ecuación de Frische toma valores mayores a 1.

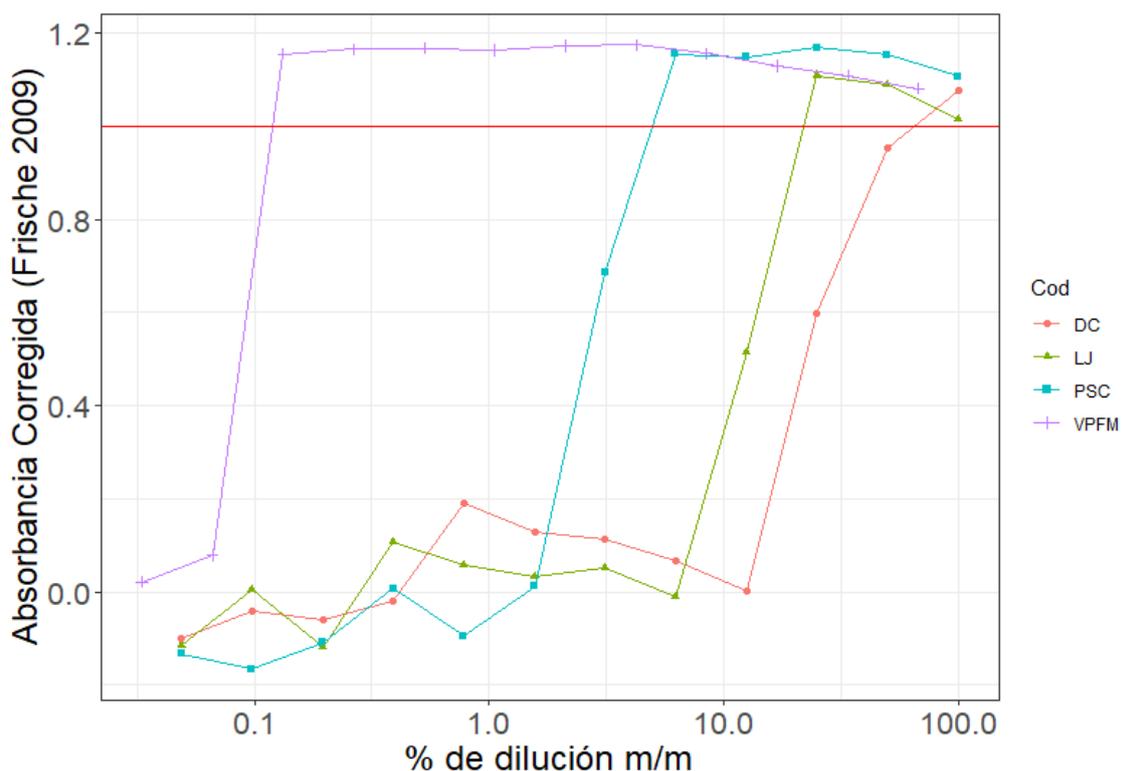


Figura 14: Citotoxicidad en función del porcentaje de dilución m/m. Para la determinación de la citotoxicidad se utilizó la función de Frische 2009. Los valores que están por encima de la línea roja (cuando toman valores mayores a 1), se consideran citotóxicos.

## Discusión.

Con los resultados obtenidos se observa que es frecuente la presencia de formulaciones que presentaron actividad estrogénica. En todos los ensayos realizados se detectó alguna sustancia agonista al E2. Si bien la cantidad de muestras para las diferentes categorías no eran iguales, si tomamos sus porcentajes (Figura 15), los productos utilizados para el aseo personal y aseo del hogar presentaron mayor porcentaje respecto a las demás categorías, 41,2%, 38,5% respectivamente. En menor medida los productos utilizados en el ambiente laboral, productos fitosanitarios y los de protección personal presentaron una frecuencia relativa de 28,6%, 28,6% y 11% respectivamente, mientras que en la categoría alimentos no se detectó actividad estrogénica.

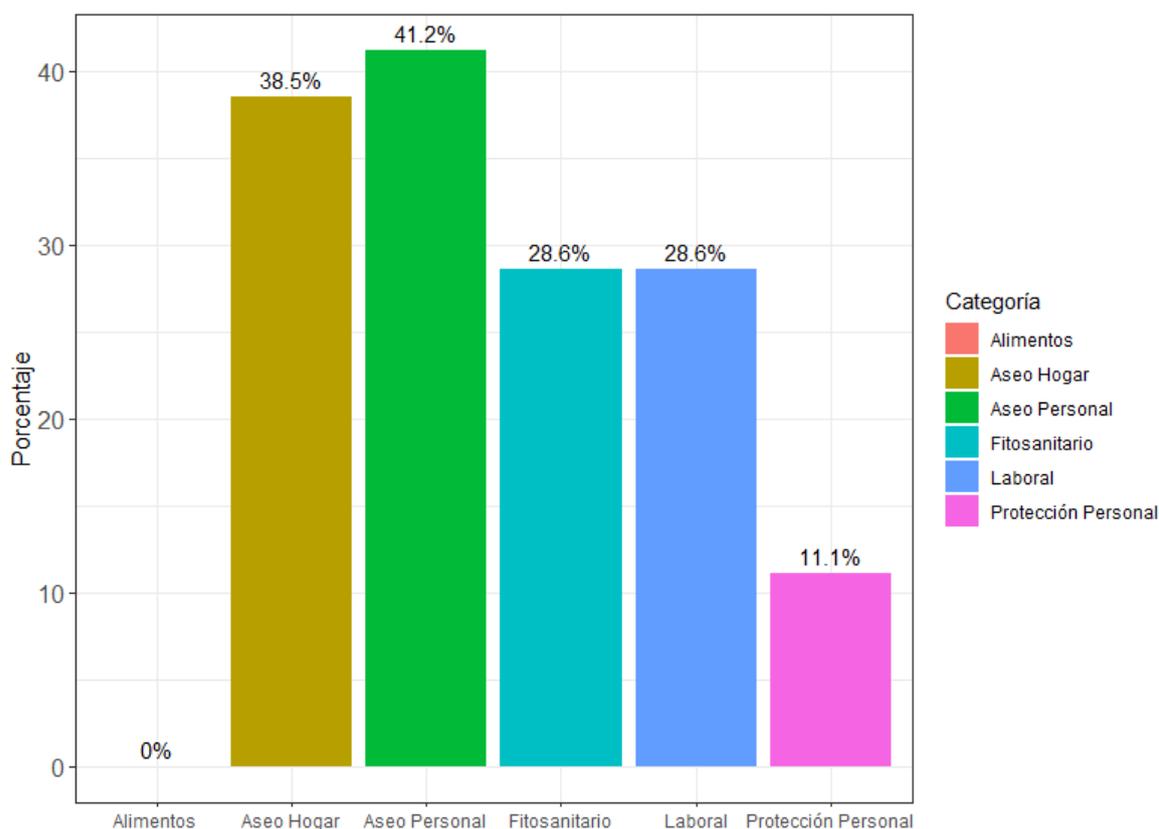


Figura 15: Este gráfico representa los porcentajes de las muestras con respuesta estrogénica entre las distintas categorías asignadas. Se puede apreciar que el aseo personal y aseo del hogar presentan los mayores porcentajes.

La actividad estrogénica detectada en las muestras evaluadas con el ensayo YES está en concordancia con el marco teórico, que si bien no es abundante la bibliografía, hay antecedentes sobre la identificación de sustancias con actividad estrogénica en cosméticos (Chebbi et al., 2022; L. Myers et al., 2011), protectores solares (Kunz & Fent, 2006; Morohoshi et al., 2005), y también en impresiones térmicas (Liao & Kannan, 2011; Molina-Molina et al., 2018).

En la categoría de Protectores Personales se cuantificó actividad estrogénica en un protector solar con una concentración de 2,05  $\mu\text{g}$  EQ-E2/L, dicha actividad puede asociarse a la presencia de parabenos (Kunz & Fent, 2006; Morohoshi et al., 2005; Schlumpf et al., 2001), también se la puede asociar a los alquifenoles que pueden ser utilizados en las formulaciones y ya han demostrado tener actividad estrogénica (Routledge & Sumpter, 1996). En lo que respecta a los resultados de la categoría Aseo Personal se detectó actividad estrogénica en 6 marcas de shampoo y un gel de ducha, alcanzando concentraciones de 5,46  $\mu\text{g}$  EQ-E2/L, lo que puede estar explicado por la utilización de benzofenonas y parabenos, siendo los más utilizados el metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, isobutilparabeno, isopropilparabeno y bencilparabeno (Golden et al., 2005), o bien a la presencia de ftalatos (ftalado de

butilo y ftalato de benceno), para los cuales que se ha identificado actividad estrogénica por (Chebbi et al., 2022).

En la categoría Laboral se cuantificó actividad estrogénica en el papel de ticket (impresión térmica) y en un catalizador de resina epoxi. El papel de ticket presentó una concentración de 518  $\mu\text{g EQ-E2/g}$ , es posible que sea debido a las concentraciones de BPA (Liao & Kannan, 2011; Molina-Molina et al., 2018) o de algún sustituto como el Bisfenol (BPS o BPF), los contenidos dependerán de las reglamentaciones de cada país sobre el tema (Molina-Molina et al., 2018). La concentración detectada en la resina epoxi fue de 2,82  $\mu\text{g EQ-E2/L}$ , y se debe a que en su formulación se utiliza BPA (ficha de seguridad).

En la categoría de Fitosanitarios, se cuantificó actividad estrogénica en 2 productos, ambos insecticidas, la concentración más alta corresponde a 10,5  $\mu\text{g EQ-E2/L}$ , el principio activo declarado de este producto es cipermetrina, para el cual ya hay menciones de la sobre su peligrosidad. Con los resultados obtenidos sería interesante someter las muestras a métodos analíticos basados en cromatografía (GC-MS, GC-MSMS, HPLC-MS o HPLC-MS-MS), estos métodos permitirían identificar y cuantificar que compuestos de las formulaciones están más asociados a la respuesta estrogénica (e.g. bifenoles, ftalatos, alquilfenoles, parabenos, entre otros grupos de sustancias químicas que han sido mencionadas en el marco teórico y asociadas a la actividad estrogénica).

En lo que respecta a la frecuencia de la actividad estrogénica encontrada en las muestras evaluadas, un factor posible es el vacío de reglamentación sobre el control de sustancias EDC's en Uruguay. Esto hace que en Uruguay se puedan utilizar productos o cantidades de productos que han demostrado ser agonistas de estrógenos sin restricciones, o bien cuando existen restricciones los controles no son eficaces. En países como EEUU y miembros de la UE ya poseen reglamentación que restringe o ha eliminado el uso de principios activos declarados EDC's en productos destinados al público. Por citar un ejemplo, Francia ha prohibido el empleo de BPA en la producción de papel de impresión térmica, también en el uso de biberones para niños.

Si hacemos una comparación entre las categorías asignadas, se observa que las concentraciones más altas se dan en el ambiente laboral (figura 15), en este caso pertenece a un papel de impresión térmica con 518  $\mu\text{g EQ-E2/g}$ . También se resalta un detergente de uso doméstico con 29,7  $\mu\text{g EQ-E2/L}$ , lo que se destaca de estos productos es que poseen peligrosidad preocupante debido al tipo de exposición frecuente y a individuos que son considerados "población vulnerable".

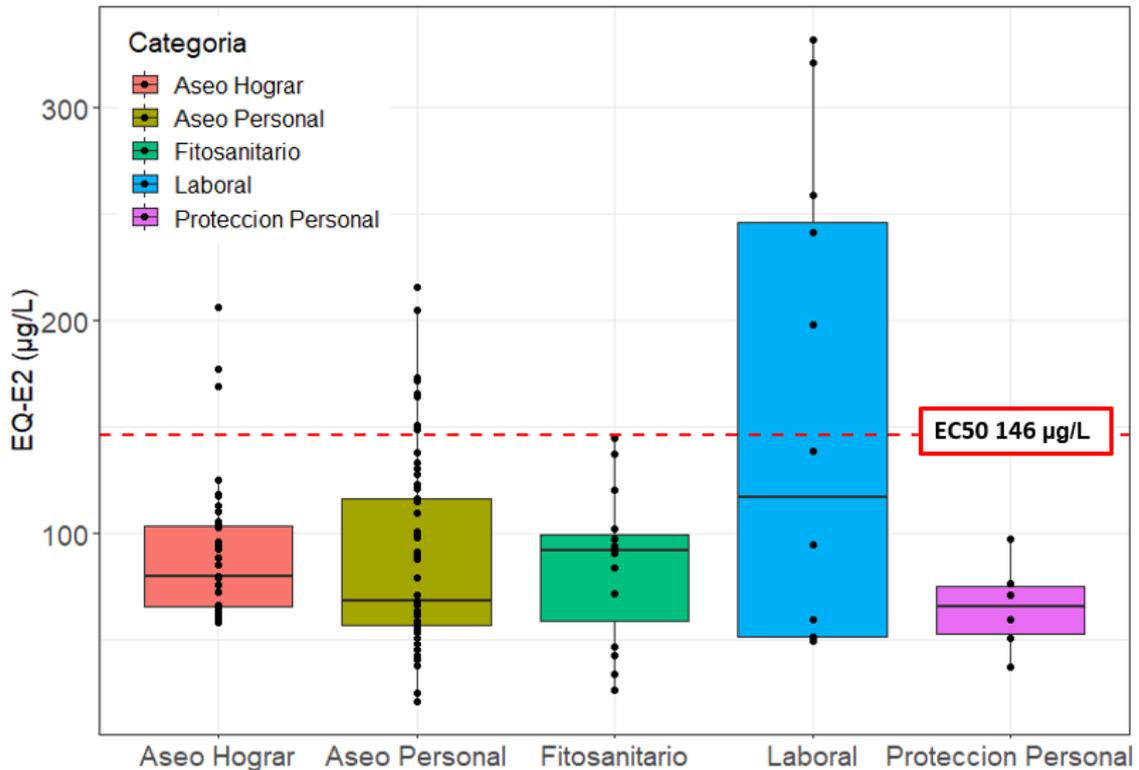


Figura 16: Comparación de los EQ-E2 obtenidos por categoría con el EC50 del estándar de E2 en ng/L.

En las categorías aseo del hogar y personal se detectó con frecuencia actividad estrogénica, incluso con concentraciones elevadas si las comparamos con el EC50 del estándar E2. La idea de comparar los EQ-E2 obtenidos de las muestras, es que nos permite conocer a que concentración las muestras generan una respuesta similar a la generada por el estándar de E2, lo que determina la afinidad que poseen las muestras con actividad estrogénica a acoplarse y activar el RE-h inserto en el plásmido de la levadura. Comparar con el EC50 del estándar de E2 puede ser un indicador de peligrosidad, y de los riesgos que posee una sustancia de afectar el sistema endocrino de un organismo.

## Conclusiones.

Se detectó actividad estrogénica en 17 productos de los 59 evaluados con el bioensayo YES. Una vez puesta a punto la técnica, ésta brinda información útil respecto a la interacción de las sustancias/formulaciones con el REh, de esta forma permite seleccionar las muestras evaluadas para ensayos más costos en lo que respecta a tiempo y tecnología, como lo pueden ser la prueba de reproducción extendida de una generación de Medaka.

Los resultados confirman que la exposición a compuestos con actividad estrogénica resultado de nuestras actividades diarias es una realidad. Dicha exposición está presente en el ambiente laboral y doméstico. Se identificó y cuantificó la presencia de actividad estrogénica en productos de aseo personal, aseo del hogar y productos utilizados en el ambiente laboral. Los resultados muestran que hay formulaciones que tienen niveles estrogénicos elevados principalmente en el ambiente laboral y también en algunos tipos de shampoo para adultos.

## Recomendaciones.

En base a los resultados obtenidos se hacen las siguientes recomendaciones:

- Evaluar los productos dispuestos en el mercado mediante técnicas basadas en efectos, la utilización de la técnica YES es una herramienta útil y de bajo costo que permite la selección de muestras para realizar o someter muestras de interés a baterías de ensayos que brindan un mayor nivel de información y determinar si son EDC`s.
- Continuar con la evaluación de productos a los que estamos expuestos a diario, con énfasis en aquellos que se utilizan con frecuencia, como productos de limpieza o de aseo personal.
- Incorporar en el seguimiento a la salud de los trabajadores la exposición a EDC`s, con énfasis en tareas que se utilizan resinas epóxicas y la utilización de productos fitosanitarios.
- Someter productos estrogénicos a cromatografía, para asociar respuesta estrogénica a principios activos y determinar su restricción o prohibición a nivel nacional como ya se viene realizando en otros países.
- Revisar los procedimientos normativos que rigen para la aprobación de la importación de productos químicos, esto implica al MSP, MGAP, Dirección Nacional de Aduanas y Ministerio de Ambiente. Estas instituciones de control deberían incluir este tipo de ensayos para determinar la peligrosidad de los productos que ingresan al país.

## Bibliografía.

- Aker, A. M., Watkins, D. J., Johns, L. E., Ferguson, K. K., Soldin, O. P., Anzalota Del Toro, L. V., Alshawabkeh, A. N., Cordero, J. F., & Meeker, J. D. (2016). Phenols and parabens in relation to reproductive and thyroid hormones in pregnant women. *Environmental Research*, *151*, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.07.002>
- Anderson, E. (2002). The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Research*, *4*(5), 197–201. <https://doi.org/10.1186/bcr452>
- Arias, M. P., Castro-Feijóo, L., Conde, J. B., & Cabanas Rodríguez, P. (2020). Una revisión sobre los disruptores endocrinos y su posible impacto sobre la salud de los humanos. *Rev Esp Endocrinol Pediatr*, *11*(2), 1–21.
- Bila, D. M. (2005). *DEGRADACIÓN Y ELIMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTROGÉNICA DESREGULADOR ENDOCRINO 17 $\beta$ -ESTRADIOL MEDIANTE EL PROCESO DE OZONIZACIÓN.*
- Boberg, J., Axelstad, M., Svingen, T., Mandrup, K., Christiansen, S., Vinggaard, A. M., & Hass, U. (2016). Multiple endocrine disrupting effects in rats perinatally exposed to butylparaben. *Toxicological Sciences*, *152*(1), 244–256. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw079>
- Boqué, R. (2004). El límite de detección de un método analítico. *Universitat Rovira i Virgili*, *9*. <http://www.quimica.urv.cat/quimio/general/lod.pdf>
- Boucher, O., Muckle, G., Jacobson, J. L., Carter, R. C., Kaplan-Estrin, M., Ayotte, P., Dewailly, É., & Jacobson, S. W. (2014). Domain-specific effects of prenatal exposure to PCBs, mercury, and lead on infant cognition: Results from the environmental contaminants and child development study in nunavik. *Environmental Health Perspectives*, *122*(3), 310–316. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206323>
- Bustamante-Montes, P., Lizama-Soberanis, B., Olaíz-Fernández, G., & Vázquez-Moreno, F. (2001). Ftalatos y efectos en la salud. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, *17*(4), 205–215.
- Chebbi, M., Beltifa, A., Alibi, S., Di Bella, G., Loturco, V., Sire, O., Ben Mansour, H., & Le Tilly, V. (2022). Estrogenic hazards of short chain phthalates and bisphenols found in cosmetic products. *International Journal of Environmental Health Research*, *32*(2), 252–263. <https://doi.org/10.1080/09603123.2020.1749573>
- Cocca, C., Ventura, C., Nunez, M., Randi, A., & Venturino, A. (2015). El organofosforado clorpirifos como disruptor estrogénico y factor de riesgo para el cáncer de mama. *Acta Toxicológica Argentina*, *23*(3), 142–152.
- Colborn, T., Dumanoski, D., & Myers, P. (1997). *Nuestro futuro robado.*

- Cóppola, F., Nader, J., & Aguirre, R. (2005). Metabolismo de los estrógenos endógenos y cáncer de mama. *Revista Médica Del Uruguay*, 21(1), 15–22.
- Couse, J. F. (1999). Estrogen Receptor Null Mice: What Have We Learned and Where Will They Lead Us? *Endocrine Reviews*, 20(3), 358–417.  
<https://doi.org/10.1210/er.20.3.358>
- de Prada, C. (2016). *Los ftalatos*. 1, 214.  
<https://www.hogarsintoxicos.org/sites/hogarsintoxicos.org/files/archivos/ftalatos.pdf>
- Doi, H., Nishitani, S., Fujisawa, T. X., Nagai, T., Takeyama, M., Maeda, T., & Shinohara, K. (2013). Prenatal Exposure to a Polychlorinated Biphenyl (PCB) Congener Influences Fixation Duration on Biological Motion at 4-Months-Old: A Preliminary Study. *PLoS ONE*, 8(3).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059196>
- ECHA. (2021). *Grupo de expertos en sustancias que alteran la función endocrina - ECHA*. <https://echa.europa.eu/es/endocrine-disruptor-expert-group>
- Fent, K., Escher, C., & Caminada, D. (2006). Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. *Reproductive Toxicology*, 22(2), 175–185.  
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.04.010>
- Frische, T., Faust, M., Meyer, W., & Backhaus, T. (2009). Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). *Environmental Science and Pollution Research*, 16(5), 593–603. <https://doi.org/10.1007/s11356-009-0184-7>
- Golden, R., Gandy, J., & Vollmer, G. (2005). A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *Critical Reviews in Toxicology*, 35(5), 435–458.  
<https://doi.org/10.1080/10408440490920104>
- Gonz, L., & Di, C. C. (2019). Alteradores endocrinos: estado de la cuestión en el marco regulatorio de la Unión Europea. *Revista de Salud Ambiental*, 19(1), 86–94.
- Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., Toppari, J., & Zoeller, R. T. (2015a). *EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals*. 1–150.  
<https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>
- Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., Toppari, J., & Zoeller, R. T. (2015b). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. In *Endocrine Reviews* (Vol. 36, Issue 6, pp. 1–150). Endocrine Society.  
<https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>

- Griffero, L. (2015). *Estrogenicidad en la cuenca del río santa lucía*.
- Hlisníková, H., Petrovičová, I., Kolena, B., Šidlovská, M., & Sirotkin, A. (2021). Effects and mechanisms of phthalates' action on neurological processes and neural health: a literature review. In *Pharmacological Reports* (Vol. 73, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00215-5>
- Juan-García, A., Gallego, C., & Font, G. (2015). Toxicidad del Bisfenol A: Revisión. *Revista de Toxicología*, 32(2), 144–160.
- Katzenellenbogen, B. S., Choi, I., Delage-Mourroux, R., Ediger, T. R., Martini, P. G. V., Montano, M., Sun, J., Weis, K., & Katzenellenbogen, J. A. (2000). Molecular mechanisms of estrogen action: Selective ligands and receptor pharmacology. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 74(5), 279–285. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(00\)00104-7](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(00)00104-7)
- Keel, K., Miguez, D., Soarea, A., & Parodi, A. (2010). Optimización de una técnica de medida de disrupción endocrina por medio de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes. *Innotec*, 5(5), 34–38. <https://doi.org/10.26461/05.05>
- Kidd, K. A., Zoeller, R. T., Jobling, S., Bergman, A., & Heidel, J. (2012). *Estado de la Ciencia de los Disruptores Endocrinos*. 40.
- Kim, T. H., Lee, Y. J., Lee, E., Patra, N., Lee, J., Kwack, S. J., Kim, K. B., Chung, K. K., Han, S. Y., Han, J. Y., Lee, B. M., & Kim, H. S. (2009). Exposure assessment of polybrominated diphenyl ethers (PBDE) in umbilical cord blood of Korean infants. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 72(21–22), 1318–1326. <https://doi.org/10.1080/15287390903212436>
- Kiyama, R., & Wada-Kiyama, Y. (2015). Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environment International*, 83, 11–40. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.05.012>
- Koch, H. M., & Calafat, A. M. (2009). Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2063–2078. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0208>
- Korach, K. S. (1994). Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science*, 266(5190), 1524–1527. <https://doi.org/10.1126/science.7985022>
- Kuiper, G. G. J. M., & Gustafsson, J. Å. (1997). The novel estrogen receptor- $\beta$  subtype: Potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Letters*, 410(1), 87–90. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00413-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00413-4)
- Kunz, P. Y., & Fent, K. (2006). Estrogenic activity of UV filter mixtures.

*Toxicology and Applied Pharmacology*, 217(1), 86–99.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.07.014>

- L. Myers, S., Z. Yang, C., D. Bittner, G., L. Witt, K., R. Tice, R., & D. Baird, D. (2011). Estrogenic and anti-estrogenic activity of off-the-shelf hair and skin care products. *Physiology & Behavior*, 176(10), 139–148.  
<https://doi.org/10.1038/jes.2014.32>.
- Lauby-Secretan, B., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Baan, R., Mattock, H., & Straif, K. (2013). Carcinogenicity of polychlorinated biphenyls and polybrominated biphenyls. *The Lancet Oncology*, 14(4), 287–288. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70104-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70104-9)
- Liao, C., Chen, L., & Kannan, K. (2013). Occurrence of parabens in foodstuffs from China and its implications for human dietary exposure. *Environment International*, 57–58, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.04.001>
- Liao, C., & Kannan, K. (2011). Widespread occurrence of bisphenol A in paper and paper products: Implications for human exposure. *Environmental Science and Technology*, 45(21), 9372–9379.  
<https://doi.org/10.1021/es202507f>
- Lillo, M. A., Nichols, C., Perry, C., Runke, S., Krutilina, R., Seagroves, T. N., Miranda-Carboni, G. A., & Krum, S. A. (2017). Methylparaben stimulates tumor initiating cells in ER+ breast cancer models. *Journal of Applied Toxicology*, 37(4), 417–425. <https://doi.org/10.1002/jat.3374>
- Ma, J., Iriarte, O., Luisa, M., Márquez, G., Ramón, S. B., & Sánchez, R. F. (2018). La política de la Unión Europea en materia de sustancias y mezclas químicas . ¿ Estamos bien protegidos ? A política da União Europeia sobre substâncias e misturas químicas . Estamos bem protegidos ? The European Union ' s Policy on Chemicals Substances a. 18(2), 196–200.
- Marconetto, A., Babini, A. N. A., Ñañez, M., Moreno, L., Rosato, O., & Otta, C. F. U. X. (2022). ARTÍCULO ESPECIAL - REVISIÓN PRINCIPALES DISRUPTORES ENDOCRINOS VINCULADOS CON SALUD REPRODUCTIVA FEMENINA : BASES BIOLÓGICAS DE SU ASOCIACIÓN Estructura química Los DEs son sustancias químicamente diversas , lo cual Persistencia y bioacumulación La prese. 428–438.
- Míguez, D. M. (2013). *Integrated risk assessment of endocrine disruptors in the Uruguay River. March*, 1–360.
- Molina-Molina, J. M., Jiménez-Díaz, I., Fernández, M. F., Rodríguez-Carrillo, A., Peinado, F. M., Mustieles, V., Barouki, R., Piccoli, C., Olea, N., & Freire, C. (2018). Determination of bisphenol A and bisphenol S concentrations and assessment of estrogen- and anti-androgen-like activities in thermal paper receipts from Brazil, France, and Spain. *Environmental Research*, 170,

406–415. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.12.046>

Morohoshi, K., Yamamoto, H., Kamata, R., Shiraishi, F., Koda, T., & Morita, M. (2005). Estrogenic activity of 37 components of commercial sunscreen lotions evaluated by in vitro assays. *Toxicology in Vitro*, 19(4), 457–469. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.01.004>

Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., & Gustafsson, J. Å. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews*, 81(4), 1535–1565. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.4.1535>

Noguerol, T. N., Boronat, S., Jarque, S., Barceló, D., & Piña, B. (2006). Detection of hormone receptor ligands in yeast by fluorogenic methods. *Talanta*, 69(2 SPEC. ISS.), 351–358. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.09.044>

Noriega Reyes, Y., & Langley McCarron, E. (2008). Correguladores del Receptor de Estrógenos y su Implicación en el Cáncer Mamario. *Cancerología*, 3, 29–40.

Norris, D., & Carr, J. (2013). Vertebrate Endocrinology: Fifth Edition. In *Vertebrate Endocrinology: Fifth Edition*. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-05167-0>

Nowak, K., Ratajczak-Wrona, W., Górska, M., & Jabłońska, E. (2018). Parabens and their effects on the endocrine system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 474, 238–251. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.03.014>

OECD. (2018). OECD Series on Testing and Assessment. In *OECD Publishing* (Issue 286). <https://doi.org/10.1787/9789264304796-en>

Olea Serrano, N., Fernández Cabrera, M. F., & Martín Olmedo, P. (2001). Disruptores Endocrinos. El Caso Particular De Los Xenobióticos Estrogénicos. Ii Estrógenos Sintéticos. *Rev. Salud Ambient*, 1(2), 64–72.

OMS. (2022). *Las dioxinas y sus efectos en la salud humana*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dioxins-and-their-effects-on-human-health>

Portigal, C. L., Cowell, S. P., Fedoruk, M. N., Butler, C. M., Rennie, P. S., & Nelson, C. C. (2002). Polychlorinated biphenyls interfere with androgen-induced transcriptional activation and hormone binding. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 179(3), 185–194. <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9371>

Prossnitz, E. R., Oprea, T. I., Sklar, L. A., & Arterburn, J. B. (2008). The ins and outs of GPR30: A transmembrane estrogen receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109(3–5), 350–353. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.03.006>

- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C., & Gerhard, D. (2015). Dose-response analysis using R. *PLoS ONE*, *10*(12), 1–13.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Routledge, E. J., & Sumpter, J. P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *15*(3), 241–248.  
[https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1996\)015<0241:EAOSAS>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1996)015<0241:EAOSAS>2.3.CO;2)
- Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., & Lichtensteiger, W. (2001). In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environmental Health Perspectives*, *109*(3), 239–244.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.01109239>
- Simpson, E. R., Misso, M., Hewitt, K. N., Hill, R. A., Boon, W. C., Jones, M. E., Kovacic, A., Zhou, J., & Clyne, C. D. (2005). Estrogen - The good, the bad, and the unexpected. *Endocrine Reviews*, *26*(3), 322–330.  
<https://doi.org/10.1210/er.2004-0020>
- Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *65*(1–6), 143–150.  
[https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(98\)00027-2](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(98)00027-2)
- Teppa Garrán, A. D., & Terán Dávila, J. (2005). Nuevos aspectos bioquímicos y moleculares de la acción de los estrógenos. *Ginecología y Obstetricia de Mexico*, *73*(8), 436–442.
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2010). *Anatomía Fisiología Anatomía y Fisiología*.
- UE-COM. (2020). *Alteradores endocrinos - Productos químicos - Medio ambiente - Comisión Europea*.  
[https://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/index\\_en.htm](https://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/index_en.htm)
- US EPA. (2011). Cronograma the Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP). In *Environment Protection Agency* (Vol. 63, Issue 154, pp. 42853–42855).
- US EPA. (2021). *Batería de ensayos de nivel 1 del programa de detección de disruptores endocrinos | EPA de EE. UU.* <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-program-tier-1-battery-assays>
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Wade, V. (2006). Human exposure to BPA. *Reproductive Toxicology*, 1–86.
- Vandenberg, L. N., Maffini, M. V., Sonnenschein, C., Rubin, B. S., & Soto, A. M. (2009). Bisphenol-a and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine Reviews*, *30*(1), 75–95.  
<https://doi.org/10.1210/er.2008-0021>

- Vo, T. T. B., Jung, E. M., Choi, K. C., Yu, F. H., & Jeung, E. B. (2011). Estrogen receptor  $\alpha$  is involved in the induction of Calbindin-D 9k and progesterone receptor by parabens in GH3 cells: A biomarker gene for screening xenoestrogens. *Steroids*, 76(7), 675–681. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.03.006>
- Warner, M., Wang, L., Weihua, Z., Cheng, G., Sakaguchi, H., Saji, S., Nilsson, S., Kiesselbach, T., & Gustafsson, J. Å. (2003). Analysis of Estrogen Receptor Expression in Tissues. *Methods in Enzymology*, 364(Dic), 448–463. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)64025-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)64025-5)
- Weiss, J. N. (1997). The Hill equation revisited: uses and misuses. *The FASEB Journal*, 7(C), 135–149.

## Anexo I.

Elaborado por:	Winston Aparicio Sosa	Versión 02
Protocolo de ensayo YES	Fecha:	

### Preparación de soluciones- medios de cultivo y análisis.

Esta metodología fue desarrollada por Routledge y Samper 1996 (*Routledge & Sumpter, 1996*), para determinar la actividad estrogénica por células de levadura *Saccharomyces cerevisiae*, e implementada con éxito en Uruguay por (*Griffero, 2015*) y Alejandra Bertone.

### Parte I.

#### Medio mínimo (Solución I).

A 1 litro de agua ultrapura se le agregan las siguientes sustancias:

Sustancia	Cantidad	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.61 g	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.98 g	
KOH	4.2 g	
MgSO <sub>4</sub>	0.2 g	
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> )	1mL (40mg/50mL de agua ultrapura)	
L-leucina	50 mg	
L-histidina	50 mg	
Adenina	50 mg	
L-arginina	20 mg	
L-metionina	20 mg	
L-tirosina	30 mg	
L-isoleucina	30 mg	
L-lisina-HCl	30 mg	
L-fenilalanina	25 mg	
Ácido glutámico	100 mg	
L-valina	150 mg	
L-serina	375 mg	

La solución debe ser autoclavada a 121 °C durante 20 minutos y almacenada a temperatura ambiente en frasco de vidrio.

### Solución de vitaminas.

En 180 mL de agua ultrapura:		
Tiamina	8 mg	
Piridoxina	8 mg	
Pantetonato de calcio	8 mg	
Inositol	40 mg	
Solución de Biotina ( 2mg/100 mL de Agua Ultrapura)	20 mL	

La solución se esteriliza y filtra usando un kit de filtración estéril con membrana de 0.2 micras y almacenar a 4 °C (en alícuotas).

### Solución de Glucosa.

La solución de glucosa se prepara al 20% w/v (disolver 20g de glucosa en 100 mL de agua ultrapura).

Autoclavar a 121 °C durante 10 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

### Solución de L-Aspártico.

Se prepara en una concentración de 4mg/mL con agua ultrapura, y se autoclava a 121 °C durante 10 minutos.

Se almacena a temperatura ambiente.

### Solución de L-Treonina.

Se prepara en una concentración de 24 mg/ mL con agua ultrapura y se autoclava a 121°C durante 10 minutos. Se almacena a e4 °C.

### Solución de Sulfato de Cobre.

En una concentración de 20mM (0.5g/100mL) con agua ultrapura. Se esteriliza con kit de filtración estéril con membrana de 0.2 micras y se almacena a temperatura ambiente.

### Medio completo o medio de crecimiento (Solución II).

- Lavar bien las manos.
- Colocar guantes.
- Limpiar con alcohol las superficies de la cámara de flujo laminar.

Tabla 5: Elaboración de Medio Completo (MM + Sustancias en tabla).

En tubo falcón 50 mL*			En 20 mL	
Sustancia	Cantidad	✓		✓
Solución de Glucosa	5 ml		2 ml	
Ácido L-aspártico	1.25 ml		0.5 ml	
Solución de Vitaminas	0.5 ml		0.2 ml	
Solución de L-Treonina	0.4 ml		0.16 ml	
Sulfato de cobre II	125 µL		0.5 µL	
Medio mínimo	45 ml		18 ml	
Total				

### Cultivo de la cepa.

\*Para el cultivo de 50 ml, se vierten 50 ml de medio de Cultivo Completo (tabla1) en matraz ERLLENMEYER 250 ml, y agregamos 200 µL de cultivo YES activado (*cultivo elaborado con poco días*).

\*\* Para el cultivo de 20 ml, se vierten los 20 ml en matraz ERLLENMEYER 25 ml y agregamos 80 µL de cultivo YES activado.

**Se deja 48 horas a 28 °C, con agitación de 100 rpm en incubadora.**

Fecha y Hora de inicio:	
Fecha y Hora de extracción:	

### Parte II- Sembrado

Tabla 6: Ajuste previo de las concentraciones.

N°	Descripción	Muestra ajustada: m <sub>j</sub>

## Estándar y diluciones de muestras.

1. Se hace la concentración de estradiol E2, en este caso con una concentración (28 µg/L).
2. Tomamos 1 placa para hacer las diluciones.
3. En la **placa 1** se coloca en cada pocillo 100 µl de etanol (Etoh) ppa, **menos en el primer pocillo donde ira concentración pura.**
4. Posteriormente se coloca 100 µl de E2 (28 µg/L) realizando diluciones seriadas 1:2.
5. Posteriormente giramos la placa y transferimos 10 µl para placa de análisis.

Tabla 7: Elaboración del Medio de Análisis (MA).

En un tubo falcón de 50 mL		
Medio de cultivo completo (solución I + solución II)	25 mL	50 mL
CPRG*	250 µL	500 µL
Cultivo de levadura (crecimiento no mayor a 48hs y una concentración de 10 <sup>6</sup> /ml)	25 µL	50 µL

Nota: Un CPRG permite hacer 100 mL de medio de análisis, lo que nos permite sembrar 6 placas de 96 pocillos.

**\*CPRG:** Se prepara en el día, en botella ámbar lavadas con acetona, con una concentración de 60 mg/L (**Se pasan 0,0101 g en Eppendorf de 1.5 mL y se le agrega 1000 µL de agua ultrapura**), también puede prepararse en un tubo falcón y se cubre con papel de aluminio para evitar fotorreacciones.

**Cultivo YES:** Se mide absorbancia a 640 nm y el valor debe estar entre 0,6 y 0,8 ( en caso de pasar los parámetros establecidos hay que hacer diluciones).

**IMPORTANTE: ¡¡Él tubo falcón y él Eppendorf debe cubrirse con papel de aluminio!! u otro material que evite el pasaje de luz, debido a la sensibilidad del reactivo CPRG al contacto con la luz.**

Tabla 8: Detalle de los insumos utilizados.

Insumos, materiales y equipos	Marca	Serie o lote
Solución de medio completo	Elaborado en laboratorio	
Agua MQ	Se extrae en máquina	
Etanol absoluto		
Guates estériles		
Film de membrana para placa de análisis		
Placas de análisis estériles		
Alcohol 75 %		

## Diluciones.

N°		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	<b>A</b>	<b>E<sub>2</sub></b>	100 µl Etoh + 100 µl E2	100 µl Etoh + E2									
	<b>B</b>	28 µl/L	14 µl/L	7 µl/L	3,5 µl/L	1,75 µl/L	0,875 µl/L	0,438 µl/L	0,219 µl/L	0,109 µl/L	0,055 µl/L	0,027 µl/L	0,014 µl/L
	...												
	...												
	<b>G</b>												
	<b>H</b>												

Giramos y tomamos 10 µl de cada pocillo de la placa 1 hacia la placa de análisis . Se transfieren 10 µl a cada pocillo, menos el últimos el cual se coloca solo 10 µl de E2 28 µg/L, y 10 µl de la muestra sin diluir. Una vez hecho esto se lleva cámara de flujo para que seque y se prosigue con incorporar 200 µl de medio de análisis (MA) a cada pocillo.

## Esquema del sembrado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	10 µl E2 + 200µl MA	10 µl E2 + 200 µl MA										
<b>B</b>	10 µl E2 + 200µl MA	10 µl E2 + 200 µl MA										
<b>C</b>	10 µl E2 + 200µl MA	10 µl E2 + 200 µl MA										
<b>D</b>	10µl m <sub>i</sub> + 200 µl MA											
<b>E</b>	10µl m <sub>i</sub> + 200 µl MA											
<b>F</b>	10µl m <sub>i</sub> + 200 µl MA											
<b>G</b>	10µl m <sub>i</sub> + 200 µl MA											
<b>H</b>	V+ 200 µl MA											

V: Vehículo (Etoh) , m<sub>i</sub> ajustada: Muestra<sub>i=1,2,3,,n</sub> .

Luego de incorporar el MA se agita a 100 rpm por 2 min, se coloca film membrana. Y se pone en incubadora a 30°C por 72 ho

## Anexo II.

Nº	Descripción	Cod de Muestras	Categoría	Estado	¿Estrogénica?
1	Detergente doméstico	DDAL	Aseo Hogar	Evaluado	No
2	Limpiador cremoso	LCrFN	Aseo Hogar	Evaluado	No
3	Detergente doméstico	DDCG	Aseo Hogar	Evaluado	No
4	Detergente doméstico	DDNC	Aseo Hogar	Evaluado	Si
5	Limpiador multiuso antibacterial	LMED	Aseo Hogar	Evaluado	Si
6	Jabón líquido ropa	JLR	Aseo Hogar	Evaluado	No
9	Insecticida	IYPF	Fitosanitario	Evaluado	No
10	Insecticida	Icip	Fitosanitario	Evaluado	Si
14	Hormiguicida	HAr	Fitosanitario	Evaluado	Si
16	Herbicida	HD48	Fitosanitario	Evaluado	No
15	Herbicida	HWMMax	Fitosanitario	Evaluado	No
17	Detergente cristal	DCFV	Aseo Hogar	Evaluado	Si
18	Fabuloso limón	FLC	Aseo Hogar	Evaluado	Si
19	Líquido Lavamanos	LLG	Aseo Hogar	Evaluado	Si
20	Gel ducha	GDB	Aseo Personal	Evaluado	Si
21	Papel de ticket	Pticket	Laboral	Evaluado	Si
22	Envase de Yogurt	EYoCdy	Alimentos	Evaluado	No
23	Bandeja de espumilla de estireno	Best	Alimentos	Evaluado	No
24	Envase de cartón Jugos	EcJuAs	Alimentos	Evaluado	No
25	Shampoo para bebe	SpBHC	Aseo Personal	Evaluado	Si
26	Shampoo para adultos	SpAH	Aseo Personal	Evaluado	Si
29	Shampoo	SHC	Aseo Personal	Evaluado	Si
30	Shampoo	SEL	Aseo Personal	Evaluado	Si
31	Shampoo para niños	SpnS	Aseo Personal	Evaluado	Si
32	Protector solar	PSC50	Protección personal	Evaluado	No
33	Losión Piopel-Piojicida	LPHA	Protección personal	Evaluado	No

34	Mascarilla facial	MFC	Protección personal	Evaluated	No
35	Resina epoxi	Repox	Laboral	Evaluated	No
38	Catalizador epoxi	Cepox	Laboral	Evaluated	Si
39	Detergente	DAL	Aseo Personal	Evaluated	No
40	Pintura	PRW	Laboral	Evaluated	No
41	Herbicida	HG	Fitosanitario	Evaluated	No
42	Shampoo para niños	SpnJ	Aseo Personal	Evaluated	Si
43	Protector solar SFP 50 para niños	SFPSC	Protección personal	Evaluated	No
44	Losión para antimosquitos	LJ	Protección personal	Evaluated	No
46	Veneno en Polvo de hormiga	VPFM	Fitosanitario	Evaluated	No
47	Shampoo bebe	SJ	Aseo personal	Evaluated	No
48	Acondicionador bebe	AJ	Aseo personal	Evaluated	No
49	Protector Solar 50	PSD	Protección personal	Evaluated	Si
50	Protector solar bebe	PE	Protección personal	Evaluated	No
51	Shampoo antidaño	STC	Aseo Personal	Evaluated	No
52	Shampoo control caída	SH&S	Aseo Personal	Evaluated	No
53	Shampoo Hidra liso	SHLD	Aseo Personal	Evaluated	No
54	Acondicionador hidra-liso	AHLD	Aseo Personal	Evaluated	No
55	Protector Solar 30 FPS	PSN	Protección personal	Evaluated	No
56	Jabón Líquido bebe	JLpnD	Aseo Personal	Evaluated	No
57	Detergente Verde	DVB	Aseo Personal	Evaluated	No
58	Detergente concentrado	DC	Aseo Personal	Evaluated	No
59	Protector solar 30 FPS	PSC	Protección personal	Evaluated	No
61	Adhesivo para anclajes de altas prestaciones	AdhSikFix-2	Laboral	Evaluated	No
62	Adhesivo para anclajes de altas prestaciones	AdhSikFix-2	Laboral	Evaluated	No
63	Gasoil	GA	Laboral	Evaluated	No
64	Bebida-Frutte Naranja	BFNS	Alimentos	Evaluated	No
65	Fragancia Labanda	FLS	Aseo Hogar	Evaluated	No
66	Limpiador Multiuso	LMR	Aseo Hogar	Evaluated	No

67	Fragancia Concentrada	FCF	Aseo Hogar	Evaluable	No
68	Limpiador desodorante fragancia pino	FPL	Aseo Hogar	Evaluable	No
69	Envase de Yogurt Frutilla	EYoCe	Alimentos	Evaluable	No
70	Envase de manteca	EMaCe	Alimentos	Evaluable	No