

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



REVISIÓN TOXICOLÓGICA Y VALIDACIÓN DE
METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA COLORANTES AZUL 1
Y AZUL 2 EN ALIMENTOS.

Trabajo de Graduación en modalidad de Tesis presentado por
Maureen Anaité García Sánchez
para optar al grado académico de Licenciada en Química Farmacéutica

Guatemala

2016

**REVISIÓN TOXICOLÓGICA Y VALIDACIÓN DE
METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA COLORANTES AZUL 1
Y AZUL 2 EN ALIMENTOS.**

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



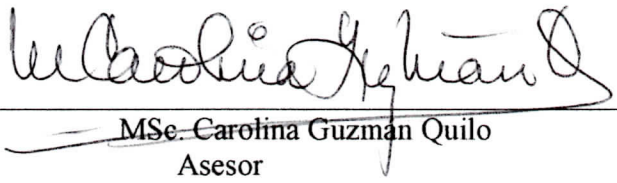
REVISIÓN TOXICOLÓGICA Y VALIDACIÓN DE
METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA COLORANTES AZUL 1
Y AZUL 2 EN ALIMENTOS.

Trabajo de Graduación en modalidad de Tesis presentado por
Maureen Anaité García Sánchez
para optar al grado académico de Licenciada en Química Farmacéutica

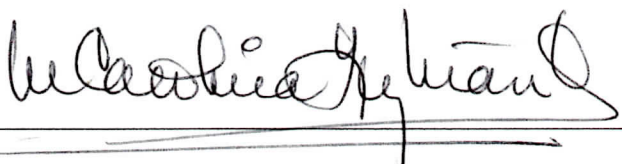
Guatemala


2016

Vo. Bo. :

(f) 
MSc. Carolina Guzmán Quilo
Asesor

Tribunal Examinador:

(f) 
MSc. Carolina Guzmán Quilo
Asesor

(f) 
Licda. Ana Luisa Mendizábal de Montenegro

(f) 
Dr. Elfego Rolando López García

Fecha de aprobación: Guatemala, 10 de octubre de 2016.

ÍNDICE

	Página
Prefacio	ix
Lista de cuadros	xiii
Lista de figuras	xv
Lista de gráficas	xvi
Resumen	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. Marco conceptual	3
A. Antecedentes	3
B. Justificación	7
C. Planteamiento del problema	8
D. Alcances y límites	8
III. Marco teórico	11
A. Aditivo alimentario	11
B. Colorante	11
1. Colorantes naturales	12
2. Colorantes sintéticos	15
C. Regulaciones internacionales	20
D. Regulación nacional	21
E. Monografía colorante Azul 1	23
F. Monografía colorante Azul 2	25
IV. Marco metodológico	29
A. Objetivos	29
B. Hipótesis	30
C. Variables	30
D. Población	30
E. Muestra	30
F. Procedimientos	30
G. Diseño de la investigación	33
H. Análisis estadístico	34
V. Marco operativo	35
A. Recabación y tratamiento de datos	35
B. Recursos	35
C. Lugar de investigación	36

VI.	Resultados	37
VII.	Discusión de resultados	43
VIII.	Conclusiones	53
IX.	Recomendaciones	55
X.	Bibliografía	57
XI.	Anexos	63

LISTA DE CUADROS

	Página
1. Cuadro 1. Algunos colorantes naturales aceptados en FDA y la clasificación de EFSA de los colorantes naturales según su clase química.	13
2. Cuadro 2. Colorantes sintéticos permitidos en alimentos por Agencia de Medicamentos y Alimentos FDA, y la Autoridad Europea de seguridad alimentaria EFSA.	17
3. Cuadro 3. Dosis de uso máximo permitidos para Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) en algunos alimentos, el Codex alimentarius, el RTCA 67.04.54.10 y EFSA.	22
4. Cuadro 4. Valores relacionados a la pureza del colorante.	23
5. Cuadro 5. Resultados de los estudios toxicológicos para toxicidad aguda estudios especiales, de corto plazo, largo plazo, comentarios y evaluación de uso para Azul 1 (E133).	24
6. Cuadro 6: Valores relacionados a la pureza del colorante.	25
7. Cuadro 7. Datos sobre toxicidad aguda, y resultados de estudios especiales, de corto plazo, largo plazo, comentarios y evaluación de uso para Azul 2 (E132).	27
8. Cuadro 8. Resumen de la marca preferida para cada tipo de alimento en tres distintas tiendas.	37
9. Cuadro 9. Resumen de los resultados obtenidos en parámetros de validación indicados por ICH, para los colorantes Azul 1(E133) y Azul 2 (E132).	40
10. Cuadro 10. Concentración de colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) en distintos tipos de alimentos. Se incluyen los valores de dosis de uso permitida indicada por RTCA, Codex alimentarius, EFSA. Se hace referencia a la dosis de ingesta diaria permitida sugerida por FDA, EFSA, JECFA.	41
11. Cuadro 11. Resumen de porcentaje de recuperación promedio en estándares de concentración y pureza conocida de Azul 1 (E133) como determinación de exactitud, utilizando estándares entre concentración 50 a 250 $\mu\text{g/mL}$.	69

12. Cuadro 12. Resumen de porcentaje de recuperación promedio en estándares de concentración y pureza conocida de Azul 1 (E133) como determinación de exactitud, utilizando estándares entre concentración 1000 a 1E04 $\eta\text{g/mL}$.	69
13. Cuadro 13. Resumen de Linealidad en curvas de concentración 50 a 250 $\eta\text{g/mL}$ de Azul 1 (E133).	70
14. Cuadro 14. Resumen de Linealidad en curvas de concentración 1000 a 1E04 $\eta\text{g/mL}$ de Azul 1 (E133).	70
15. Cuadro 15. Resumen de Repetibilidad en curvas de concentración 50 a 250 $\eta\text{g/mL}$ de Azul 1 (E133).	71
16. Cuadro 16. Resumen de Repetibilidad en curvas de concentración 1000 a 1E04 $\eta\text{g/mL}$ de Azul 1 (E133).	71
17. Cuadro 17. Límite de detección LOD y Límite de cuantificación LOQ de Azul 1 (E133).	71
18. Cuadro 18. Resumen de porcentaje de recuperación promedio en estándares de concentración y pureza conocida de Azul 2 (E132) como determinación de exactitud, utilizando estándares entre concentración 1000 a 1E04 $\eta\text{g/mL}$.	72
19. Cuadro 19. Resumen de Linealidad en curvas de concentración 1000 a 1E04 $\eta\text{g/mL}$ de Azul 2 (E132)	72
20. Cuadro 20. Resumen de Repetibilidad en curvas de concentración 1000 a 1E04 $\eta\text{g/mL}$ de Azul 2 (E132).	73
21. Cuadro 21. Límite de detección LOD y Límite de cuantificación LOQ de Azul 2 (E132).	73
22. Cuadro 22. Criterio de %RSD calculado para la concentración de cada estándar utilizado en la validación de los colorantes azul 1(E133) y azul 2 (E132), utilizando la función de la trompeta de Horwitz.	74

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Ilustración 1. Cromatograma de Azul 1 para estándar de 1000 ng/ml.	38
2. Ilustración 2. Cromatograma en 3D de Azul 1 (E133) para estándar de 1000 ng/ml, como justificación en la elección de la longitud de onda 630nm y tiempo de retención 7.4 min.	38
3. Ilustración 3. Cromatograma de Azul 2 para estándar de 1000 ng/ml.	39
4. Ilustración 4. Cromatograma en 3D de Azul 2 (E132) para estándar de 1000 ng/ml, como justificación en la elección de la longitud de onda 630nm y tiempo de retención 3. min.	39

LISTA DE GRÁFICAS

	Página
1. Gráfica 1. Curva de calibración promedio de las seis curvas obtenidas de los estándares de Azul 1 (E133) a concentraciones de 50 η g/mL a 250 η g/mL.	75
2. Gráfica 2. Curva de calibración promedio de las seis curvas obtenidas de los estándares de Azul 1 (E133) a concentraciones de 1000 η g/mL a 1E04 η g/mL.	75
3. Gráfica 3. Curva de calibración promedio de las seis curvas obtenidas de los estándares de Azul 2 (E132) a concentraciones de 1000 η g/mL a 1E04 η g/mL.	76
4. Gráfica 4. Cromatograma de Azul 1 para estándar de 1 ng/ml, utilizado para el límite de detección.	76
5. Gráfica 5. Cromatograma de Azul 2 para estándar de 15 ng/ml, utilizado para el límite de detección.	77
6. Gráfica 6. Cromatograma de Azul 1 para estándar de 5 ng/ml, utilizado para el límite de cuantificación.	77
7. Gráfica 7. Cromatograma de Azul 2 para estándar de 20 ng/ml, utilizado para el límite de cuantificación.	78

RESUMEN

En el presente trabajo se efectuó una revisión toxicológica de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132), la cual tuvo como propósito generar información actual respecto a la condición regulatoria de dichos aditivos alimenticios y sus posibles riesgos asociados al consumo.

Derivado de la importancia del análisis de alimentos se estandarizó y se validó un método analítico que puede ser de utilidad para la cuantificación de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132), en distintos tipos de alimentos.

Los parámetros evaluados en la validación de la metodología fueron exactitud, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad. Todos cumplieron con los criterios de aceptación sugeridos por la Oficina de Acreditación Guatemalteca OGA.

Para el análisis de muestras se seleccionaron alimentos que consumen mayoritariamente infantes, considerando marcas altamente comercializadas. Para determinar la preferencia de marca se encuestó a una muestra de 151 personas dentro del departamento de Guatemala.

Los resultados de la concentración de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) en las muestras fueron contextualizadas en los límites indicados en el Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.54.10 y otras normativas internacionales referidas a la dosis de uso y el valor de ingesta admisible.

Se acepta la hipótesis nula ya que las muestras analizadas cumplen con la dosis de uso y los valores de ingesta admisible establecidos por la regulación nacional como internacional, excepto en la muestra de refresco en polvo en donde se excede el valor de dosis de uso establecidas por el Reglamento Técnico Centroamericano y el Codex Alimentarius.

I. INTRODUCCIÓN

En la industria de alimentos la utilización de colorantes como aditivos, ya sean de origen natural o sintético, es una práctica común para presentar un producto que satisfaga las expectativas del consumidor. El color para alimentos presenta un atractivo sensorial que puede ser determinante para la oportunidad de venta. La consistencia en la presentación de los productos alimenticios genera confianza en el consumidor, debido a esto la industria tiende a inclinarse por el uso de colorantes sintéticos que proveen esta característica y el hecho de que son de bajo costo resulta mucho más ventajoso.

Sin embargo, el uso de colorantes ha sido controversial desde sus inicios y muchos de estos han sido prohibidos, por sus efectos tóxicos, como los conocidos colorantes Sudan I, II, III y IV, todos ellos han sido declarados carcinógenos. (Food Standards Agency UK , 2012).

En el caso de Sudan I está asociado a genotoxicidad y carcinogenicidad y se encuentra en categoría 3 por la Agencia internacional para la investigación del cáncer IARC. El Sudan II tiene una alta incidencia carcinomas de vejiga. (Ertaş, Özer, & Alasalvar, 2007). El Sudan III y Sudan IV son considerados potencialmente genotóxicos y carcinógenos. (Larsen, 2008). Pero aún existen otros tipos de colorantes sintéticos que son utilizados en la industria, aunque su uso está regulado por instituciones enfocadas en garantizar la seguridad de los mismos.

Se han hecho esfuerzos para determinar si su implementación es segura, y recientemente se ha desarrollado un debate por la comunidad científica que indica una posible asociación entre el consumo de alimentos con colorantes sintéticos y el déficit de atención en niños. (Nigg, Lewis, Edinger, & Falk, 2012). Este y otros estudios toxicológicos recientes sugieren el posible riesgo al consumir alimentos con colorantes sintéticos.

La presente investigación incluye una revisión documental toxicológica y cuantificación analítica de dos colorantes: Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132), debido a que la gama de colores que se deriva de ellos tiene alta presencia en alimentos comercializados para infantes.

Para esto se realizó un análisis de mercado para seleccionar muestras de refrescos, refrescos en polvo y confiterías que contienen los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) preferidas por el consumidor guatemalteco, donde se buscó confirmar que estas cumplen con la regulación nacional e internacional.

El método validado mediante el que se analizaron las muestras corresponde a cromatografía líquida de alta definición HPLC con detector con arreglo de diodos.

Por último, se generó un documento con información de datos toxicológicos que incluye estudios relacionados a temas de carcinogenicidad, genotoxicidad, neurotoxicidad, y teratogenicidad de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132).

II. MARCO CONCEPTUAL

A. Antecedentes

La industria alimenticia en función de presentar un producto atractivo a la vista del consumidor, ha recurrido al uso de colorantes naturales y sintéticos en la producción de alimentos. La utilización de los colorantes sintéticos presenta ventajas para el productor pues son de bajo costo y presentan alta resistencia a la degradación. Por lo que son convenientes en el almacenamiento y su utilización en el producto terminado. (Vlase, Muntean, Cobzac, & Filip, 2014)

Es de conocimiento que el consumo en exceso de los colorantes sintéticos, puede tener efectos tóxicos por lo que se encuentran regulados.

Sin embargo, es más importante asegurar que estos aditivos se emplean de acuerdo a la *dosis de uso máxima* que se ha acordado como inocua. Esta *dosis máxima de uso* difiere con la *dosis de uso óptima, recomendada o normal*, la cual está más relacionada con el uso técnico previsto para cada tipo de alimento, se espera que la *dosis de uso máximo* no sea superada por el valor de *ingesta diaria admisible* IDA. Un tema que aún no ha sido abordado por la comunidad científica es la dosis segura por exposición a largo plazo. (Codex General Standard for Food Additives (GSFA) Online Database, 2015)

Requieren especial atención los productos que están dirigidos a infantes, debido a que recientes estudios respecto al trastorno de déficit de atención e hiperactividad ADHD concluyen que merece la pena renovar la investigación del efecto en la dieta tanto para colorantes como aditivos. (Nigg, Lewis, Edinger, & Falk, 2012)

Esta y otras investigaciones son la base para que organizaciones sin fines de lucro como el Centro para la Ciencia en el interés Público (Center For Science in The Public Interest), tengan la opinión que existe un posible vínculo entre colorantes alimenticios un impacto en el comportamiento de los niños. (Center for Science in The Public Interest, 2016)

Los resultados de estos estudios clínicos concuerdan con las conclusiones en los estudios preclínicos que son las primeras alarmas indicando un riesgo. Un estudio realizado en Arabia Saudita con una población de ratas expuestas a jugos de color concluyó que existe un incremento tanto en creatinina como albumina en sangre, una disminución en la enzima antioxidante GSH, y un incremento en los glóbulos blancos que puede estar relacionado a un proceso inflamatorio. (Soltan & Shehata, 2012)

Debido a la similitud estructural entre el colorante Azul 1 (E133) con el receptor antagonista purinérgico azul brillante G (BBG), se ha estudiado la posible interacción del colorante con la actividad del receptor endógeno.

El receptor antagonista purinérgico azul brillante G (BBG) tiene un efecto inhibitorio del receptor ionotrópico P2X7 que está relacionado a la actividad de la corriente del canal de Panx1 y este último sirve como canal de liberación de ATP. Wang *et al* concluye que el colorante Azul 1 inhibe la corriente del canal Panx1 con IC₅₀ de 0.27μM, aunque no se observa alteración en el receptor ionotrópico P2X7 si el colorante se encuentra arriba de 100μM. (Wang, Jackson, & Dahl, 2013)

En el caso del Azul 2 (E132) existe un estudio que evalúa la toxicidad reproductiva de 3 grupos de ratones expuestos por 42 días a distintas dosis del colorante. La dosis baja fue de 0.017g/Kg peso corporal, la alta 0.039 g/Kg peso corporal y 0.00g/Kg peso corporal para el grupo control.

Entre los parámetros evaluados está el peso corporal y peso de los órganos, en los que se encontró un aumento significativo. Esto se atribuye a un desbalance hormonal. Se conoce que la disminución en la testosterona incrementa el peso corporal y que un exceso de producción de cortisol causado por cualquier tipo de estrés, son posibles razones del aumento de peso corporal. Otros resultados son los histopatológicos en donde se observó la reducción de elementos espermatogénicos y una reducción en la densidad de espermatozoides. Este tipo de estudios han desencadenado una seria preocupación en países europeos, que han vetado el uso de este y otros colorantes sintéticos incluso después del establecimiento de la Unión Europea. (Dixit & Goyal, 2013)

Los países que han prohibido el uso del Azul 1 (E133) son Bélgica, Francia, Alemania, Suiza, Suecia, Australia y Noruega. (Vachirapatama, Majaharoensiri, & Vissessanguan, 2008). El Azul 2 (E132) está vetado en Noruega. (International Food Information Service, 2009). Esto a pesar de que la Autoridad de seguridad alimentaria Europea (EFSA) permita su uso.

La Unión Europea UE por medio de EFSA realiza la evaluación y manejo de riesgos como ayuda a su sistema de seguridad alimentaria. La EFSA publica comunicados sobre los últimos hallazgos científicos relacionados a la seguridad alimentaria. Así EFSA permite el uso del Azul 1 (E 133) re-evaluado en el año 2010, e indica que el valor *ingesta diaria admisible* IDA es de 6 mg/kg peso corporal/día. (EFSA, 2010). En el caso del Azul 2 (E 132) establece que el valor IDA es de 5 mg/kg peso corporal/día, re-evaluada en el año 2014. (European Food Safety Authority, 2014)

Tal como se observa luego de evaluar el colorante, EFSA le adjudica un código al colorante, el cual inicia con “E” haciendo noción a que ha sido evaluado y su uso es permitido, es así como se declara en la etiqueta de los alimentos que lo contengan. (European Food Information Council, 2015)

El proceso de regulación para el uso de colorantes alimenticios en Estados Unidos está a cargo de la Agencia de Alimentos y Medicamentos FDA. Los colorantes sintéticos son certificados por la entidad y esta asegura que la pureza se mantiene dentro de las especificaciones.

Actualmente se encuentran aprobados 9 colorantes sintéticos en los que se encuentran el Azul 1(E133) denominado FD&C Blue No.1 y el Azul 2 (E132) FD&C Blue No.2. La nomenclatura utilizada en Estados Unidos hace referencia a las tres categorías certificables para aditivos de color que se describen a continuación. (Fortin, 2009)

Food, Drug and Cosmetics FD&C:	Aditivos de color con aplicación para alimentos, medicamentos o cosméticos.
Drug and Cosmetics D&C:	Aditivos de color con aplicación para medicamentos o cosméticos.
External Drug and Cosmetics:	Aditivos de color con aplicación externa en medicamentos o cosméticos.

Respecto a los valores de ingesta diaria permisible establecidos por FDA son de 12 mg/kg peso corporal/día para el Azul 1 (E133) aprobado desde 1969, y de 2.5mg/kg peso corporal/día para el Azul 2 (E132) aprobado desde 1987. (Food Advisory Committee, 2011)

Por medio del Comité Asesor de Alimentos la FDA concluye que el déficit de atención es una condición que puede ser exacerbada por la exposición a una serie de sustancias encontradas en alimentos. Sin embargo no se puede establecer la relación causal entre la exposición de aditivos de color y el déficit de atención en niños. (Food Advisory Committee, 2011)

Aunque los entes reguladores tienen como objetivo asegurar la salud del consumidor, se observa una diferencia de opiniones sobre valores de ingesta diaria permisibles. Tal es el caso entre los valores permitidos entre FDA y EFSA siendo más estricta esta última. Probablemente por su reevaluación en aditivos alimenticios recientemente.

Existen distintas maneras de determinar los colorantes presentes en los alimentos, que van desde técnicas de cromatografía de capa fina TLC, voltimetría, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC y cromatografía iónica. En cuanto a la cuantificación, la tendencia se ha enfocado en el uso de HPLC, pues es efectiva para varios tipos de alimentos y puede encontrarse acoplada a distintos detectores como UV/VIS, arreglo de diodos DAD o a un espectrómetro de masas. (European Commission Joint Research Centre, 2013)

En la presente investigación se realizó el análisis de muestras con el método de HPLC y detector con arreglo de diodos DAD con base al estudio realizado por Vlase *et al* y el tratamiento de las muestras según el método de JECFA. (Vlase, Muntean, Cobzac, & Filip, 2014) (JECFA, 2011) (JECFA, 2010) (JECFA, 2006)

B. Justificación

Según estudios recientes respecto al consumo de colorantes presentes en alimentos, existe un posible riesgo en la salud asociado a la ingesta de Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132). Debido a que los colorantes tienden a estar presentes en alimentos atractivos para infantes, se debe asegurar que estos cumplen con las regulaciones sobre los valores de uso permitido.

Con el presente estudio se analizó por medio de cromatografía HPLC los productos dirigidos a infantes que contienen colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) para determinar si estos cumplen con la regulación aplicable en Guatemala y realizar una comparación con las regulaciones internacionales de la dosis de uso máxima e ingesta diaria admisible IDA.

Así mismo se efectuó una revisión toxicológica sobre Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132), para generar un documento confiable en el que se compilan los resultados de estudios de carcinogenicidad, genotoxicidad, neurotoxicidad, y teratogenicidad. Esto con el fin de resaltar el posible riesgo asociado por el consumo de alimentos que contienen Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) en poblaciones vulnerables como los infantes.

C. Planteamiento del problema

¿Existe riesgo para la salud por el consumo de alimentos que contienen colorantes sobre Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132)?

¿Cumplen con la *dosis de uso máximo permitido* los alimentos dirigidos a infantes que contienen Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132)?

D. Alcances y límites

1. Alcances: Basándose en una revisión toxicológica de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) se elaboró un documento que compila algunos estudios relevantes en temas de carcinogenicidad, genotoxicidad, neurotoxicidad y teratogenicidad asociada al consumo de estos aditivos.

Por medio de un análisis de alimentos comercializados en Guatemala que contienen Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) se evaluó el cumplimiento de regulaciones locales e internacionales sobre valores de *dosis de uso máxima* permitidos del colorante en los productos.

Con los resultados de la revisión toxicológica como el análisis de los alimentos que contienen Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132), se genera información que oriente a las personas en una elección más consciente de sus alimentos.

2. Límites: En cuanto a la revisión toxicológica la recabación de datos se enfoca en sitios reconocidos en temas de toxicología como IARC, TOXNET, LIVERTOX, además en base de datos de HINARI y EBSCO para estudios entre los años 2006-2016.

En cuanto al análisis de muestras se desarrolló un estudio de mercado para seleccionar tres muestras que sean preferidas por el consumidor para refrescos, preparados en polvo y confitería que presentan Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) disponibles al público guatemalteco, previa validación conforme al grupo meta escogido.

III. MARCO TEÓRICO

A. Aditivo alimentario

De acuerdo con el Codex Alimentarius, se acepta como aditivo alimentario a la sustancia que otorga mejoras organolépticas a un alimento y su utilización es de propósito tecnológico. También hace énfasis en que no tiene ningún aporte nutricional. (Codex General Standard for Food Additives (GSFA) Online Database, 2015). Según el Codex Alimentarius la justificación de su uso es válido si la ventaja que aporta no deriva en riesgos a la salud y si este cumple con ciertas funciones, como:

1. Conserva la calidad del alimento.
2. Proporciona ingredientes necesarios para el público con necesidades dietéticas especiales.
3. Aumenta la conservación y estabilidad mejorando las propiedades organolépticas sin alterar la naturaleza del alimento que pueda engañar al consumidor.
4. Provee ayuda en todas las etapas de la elaboración transporte y almacenamiento, pero no encubriendo defectos en la materia prima o posibles malas prácticas de manufactura. (Codex General Standard for Food Additives (GSFA) Online Database, 2015)

B. Colorante

Se define como colorante el aditivo al que tiene la facultad de proveer o restituir el color a un alimento. (Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.54.10,2012)

Es así como la utilización de aditivos alimenticios, como los colorantes, es una práctica común en la industria de alimentos. Esto con el objeto de restituir el color afectado durante el proceso de manufactura y almacenamiento, así como captar la atención y preferencia del consumidor. Los científicos en la industria de alimentos consideran tres factores que inciden en la percepción de los alimentos en los que se encuentran el sabor, la textura y el color. (Martins, Lobo, Morales, & Barros, 2016) (Burrows, 2009)

En diferentes investigaciones se reporta que en sus inicios el ser humano utilizaba el color de los alimentos como una pista para evadir los alimentos potencialmente tóxicos. Es así como un color vivo llega a tener una asociación con un alimento fresco y apetecible. Aunque se ha demostrado que los alimentos azules son los menos apetecibles, la paleta que se deriva de estos, es utilizada con mayor énfasis en alimentos como dulces, cereales para niños, y bebidas deportivas. (Burrows, 2009)

Existen dos tipos de colorantes utilizados en los alimentos que se diferencian en su origen, así se tienen los Colorantes naturales y los Colorantes sintéticos descritos continuación.

1. Colorantes naturales: Son pigmentos de un origen natural, como vegetal, mineral animal y tienden a ser bioactivos. En estos es necesario utilizar niveles más altos que los sintéticos y pueden causar cambios en la textura, olor y sabor de los alimentos. (Griffiths, 2005)

Algunas de las características son que tiñen de forma más tenue, y pueden ser afectados varios factores inherentes al alimento como pH, sales, vitaminas, sabores. Debido a su origen son más susceptibles a ser contaminados con insecticidas, herbicidas, bacterias y trazas de metales.

La ventaja de utilizar colorantes naturales es que presentan menos peligro para la salud. (Griffiths, 2005)

Los colorantes de origen natural tienden a ser utilizados con un doble beneficio pues algunos funcionan como antioxidantes, como los licopenos antocianinas, betacarotenos, luteína y astaxantina. (Griffiths, 2005)

En términos de referencia los organismos regulatorios que trabajan con aditivos en alimentos son la Agencia de Medicamentos y Alimentos FDA, y la Autoridad Europea de seguridad alimentaria EFSA. En el Cuadro1 se exponen algunos colorantes naturales permitidos en FDA y EFSA (Martins, Lobo, Morales, & Barros, 2016).

Bajo la regulación de FDA, los colorantes de origen natural no necesitan certificación, por lo que se conocen como colorantes aditivos exentos de certificación. Los colorantes de origen natural pasan por estándares de calidad en su proceso de extracción, lo que permite considerarlos seguros para su utilización como aditivos (Fortin, 2009)

Cuadro 1. Algunos colorantes naturales aceptados en FDA y la clasificación de EFSA de los colorantes naturales según su clase química.

Agente regulador	Nombre
FDA	Annatto extract
	B-Apo-8' - carotenal
	Betacaroteno
	Polvo de remolacha
	Cantaxantina
	Color caramelo
	Aceite de zanahoria
	Extracto de cochinilla
	Jugo de fruta
	Extracto color uva
	Extracto de cascara de uva (enocianina)
	Paprika
	Jugos vegetales
	Curcuminina (E100)
	Rivoflavinas (E101 i-ii)
	Colchicina incluyendo ácido camínico (E120)
Clorofilas incluyendo clorofilas y análogos de cobre (E140-141)	
Caramelos- clases I –IV (E150 a-d)	
Carotenoides- (E160 a-f, E 161 b, E161 g)	
Rojo remolacha betanina (E162)	
Antocianinas (E163)	
Otros: Carbón vegetal (E153), Carbonato de calcio (E170), Dióxido de titanio (E171), óxidos e hidróxidos de hierro (E172)	

(Fuente: FDA, 2015; JOINT RESEARCH CENTRE JRC, EFSA, 2013)

2. Colorantes sintéticos: Se conoce que el primer colorante artificial fue la metilanilina descubierta en 1856 por William Perkin. A partir de esa fecha hasta la actualidad los colorantes sintéticos se identifican de varias formas, siendo más conocidos por sus nombres comunes.

Las entidades que tienen su propia nomenclatura se encuentran la Comunidad Económica Europea EEC, quienes por medio de EFSA, identifican a sus colorantes autorizados con la letra E seguido de su número de asignación. En el caso de FDA, se asigna al inicio las siglas FD&C a los colorantes permitidos para alimentos. (Nollet & Toldrá, 2015)

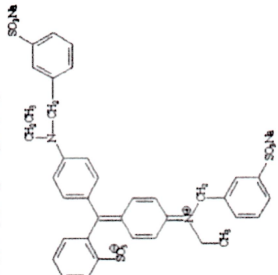
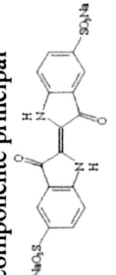
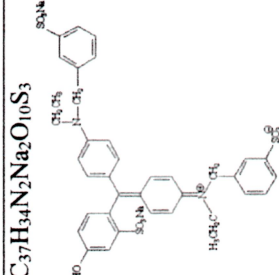
Los colorantes sintéticos también son conocidos como certificables bajo la dirección de la FDA, esto debido a que los productores de los colorantes deben de enviar muestras de los lotes, los cuales son analizados por científicos de la institución. Ellos al certificar los lotes aseguran el cumplimiento de especificaciones dentro de los mínimos permitidos para contaminantes residuales, pesticidas, metales pesados. (Griffiths, 2005)

Otras nomenclaturas son el Sistema de Numeración Internacional para aditivos alimentarios INS, bajo la dirección del Comité del Codex sobre aditivos de alimentos y contaminantes CCFAC, la Sociedad Americana de Química por medio de su división Chemical Abstracts Service adjudica un número CAS y el Color Index CI. (Nollet & Toldrá, 2015)

La razón por la que la industria de alimentos tiende a inclinarse por el uso de colorantes sintéticos, es debido a que tienen un alto poder de tinción, consistencia en la intensidad del color, variedad en el espectro del color, son estables, de fácil aplicación y de bajo costo. Entre los factores a los que son sensibles se encuentran el pH, exposición a la luz y al calor, la catálisis, el oxígeno y los iones de metales. (Nollet & Toldrá, 2015)

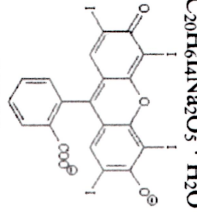
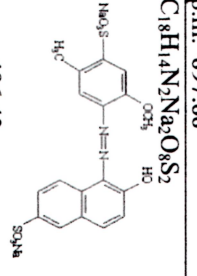
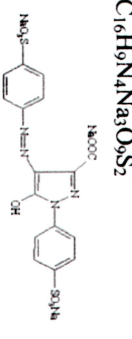
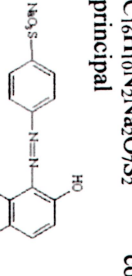
Los colorantes sintéticos permitidos para alimentos en FDA y EFSA se presentan en la Cuadro 2.

Cuadro 2. Colorantes sintéticos permitidos en alimentos por la Agencia de Medicamentos y Alimentos FDA, y la Autoridad Europea de seguridad alimentaria EFSA.

Fórmula química ¹ Estructura química ¹ Peso molecular g/mol ¹	Nombre común ¹	CI ¹	CAS ¹	INS ¹	FDA ⁵ mg/Kg bw/day ⁶	EFSA ^{7,8} mg/Kg bw/day ^{7,8}	ADI mg/Kg bw/day ^{7,8}	JECFA ¹	ADI mg/Kg bw ^{2,3}
$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_3$  p.m. 792.86	Brilliant blue FCF	Food Blue 2 (1975) No. 42900	3844-45-9	No.133	FD&C Blue No. 1	E133	6	Brilliant blue FCF	0-12.5
$C_{16}H_8N_2Na_2O_8S_2$ componente principal  p.m. 466.36 componente principal	Indigo Carmin	Food Blue 1 (1975) No. 73015	860-22-0	No. 132	FD&C Blue No. 2	E132	5	Indigotine	0-5.0
$C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$  p.m. 808.86	Fast Green FCF	Food Green 3 (1975) No. 42053	2353-43-9	No. 143	FD&C Green No. 3	NA	NA	Fast Green FCF	0-25

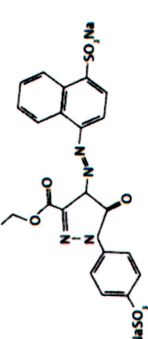
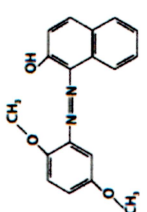
(Fuente: 1. JECFA, s.f.; 2. Scotter, 2015 ; 3. JECFA, 2014; 5. FDA, 2015; 6. Food Advisory Committee, 2011; 7. EFSA, 2015; 8. EFSA, 2011)

Continuación del Cuadro 2

Fórmula química ¹ Estructura química ¹ Peso molecular g/mol ¹	Nombre común ¹	CI ¹	CAS ¹	INS ¹	FDA ⁵	ADI mg/Kg bw/day ⁶	EFSA ^{7,8}	ADI mg/Kg bw/day	JECFA ¹	ADI mg/Kg bw ²
<chem>C20H6I4Na2O5 · H2O</chem> 	Erythrosine	Food Red 14 (1975) No. 45430	16423-68-0	No.127	FD&C Red No. 3	2.5	E127	0-0.1 ⁸	Erythrosine	0-0.1
p.m. 897.88 <chem>C18H14N2Na2O8S2</chem> 	Allura Red AC	Food Red 17 (1975) No.16035	25956-17-6	No.129	FD&C Red No. 40	7.0	E129	7.0 ⁷	Allura Red AC	0-7.0
p.m. 496.43 <chem>C16H9N4Na3O5S2</chem> 	Tartrazine	Food Yellow 4 (1975) No. 19140	1934-21-0	No.102	FD&C Yellow No.5	5.0	E102	7.5 ⁹	Tartrazine	0-0.75
p.m. 534.37 <chem>C16H10N2Na2O7S2</chem> 	Sunset Yellow FCF	Food Yellow 3 (1975) No. 15985	2783-94-0	No.110	FD&C Yellow No. 6	3.75	E110	4.0 ¹⁰	Sunset Yellow FCF	0-4.0

p.m. 452.38 componente principal
(Fuente: 1. JECFA, s.f.; 2. Scotter, 2015; 3. JECFA, 2014; 5. FDA, 2015; 6. Food Advisory Committee, 2011; 7. EFSA, 2015; 8. EFSA, 2011; 9. EFSA, 2010; 10. EFSA, 2014)

Continuación del Cuadro 2

Fórmula química ^{3.6} Estructura química ^{3.6} Peso molecular g/mol ^{3.6}	Nombre común	CI ³	CAS ^{4,6}	INS ⁵	FDA ⁷	ADI mg/Kg bw/day	EFSA mg/Kg bw/day	ADI mg/Kg bw/day	JECFA ¹	ADI mg/Kg bw ²
$C_{22}H_{16}N_4Na_2O_9S_2$  p.m. 590.493379	NA	Acid Orange 137	53060-70-1	NA	Orange B	NE*	NA	NA	NA	NA
$C_{18}H_{16}N_2O_3$  p.m. 308.33124	NA	C.I. Solvent Red 80	6358-53-8	No. 121	Citrus Red	NE*	NA	NA	NA	NA

(Fuente: 1. JECFA, s.f.; 2. Scotter ; 3.PubChem, 2016; 4. Burdock, 1997; 5. CCFAC, 2012; 6. Pubchem, 2016; 7. FDA, 2015)

NE* No establecido. Orange B ≤150 ppm por peso del alimento; Citrus Red No. 2 ≤2.0 ppm peso del alimento

NA No aplica

C. Regulaciones internacionales

La autorización para el uso de los colorantes sintéticos varía según la regulación que rige al país de donde se contextualice. Es por eso que existen diferencias entre los colorantes permitidos por FDA en comparación de los aprobados por EFSA. También se encuentran diferencias en los valores de IDA en los colorantes que tienen en común. Estas diferencias son de preocupación para los alimentos importados, pues se han dado casos en los que se encuentra la presencia de colorantes que no son permitidos en el país importador. Tal es el caso de la presencia de Sudan I en productos congelados, preparados para carne, mezcla de especias con chilli detectados en el Reino Unido. (Nollet & Toldrá, 2015) (Ertaş, Özer, & Alasalvar, 2007)

La industria de alimentos tiene prohibido el uso de los colorantes Sudan I, II, III, IV por su alta toxicidad. Por mencionar algunos de los efectos tóxicos asociados a este tipo de colorantes sintéticos, se conoce que el Sudan I está asociado a genotoxicidad y es carcinógeno en categoría 3 por IARC. En el caso del Sudan II está vinculado a una alta incidencia carcinomas de vejiga. (Ertaş, Özer, & Alasalvar, 2007). Por lo que es necesario contar con métodos de análisis confiables que sean utilizados en los alimentos que ingresan en los países. (Nollet & Toldrá, 2015)

La organización Mundial de la Salud OMS junto a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, han elaborado una serie de normas aplicadas a los alimentos conocidas como Codex alimentarius. En el Codex alimentarius se realiza una armonización de normas con el fin de asegurar la calidad e inocuidad de los alimentos para la humanidad. Sus normativas y códigos de práctica alimentaria no obligatorias, se encuentran abiertas al público de forma gratuita y se elaboran basándose en la mejor información científica disponible.

Otro objetivo del Codex alimentarius es facilitar la comercialización de alimentos, pues por medio de su Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias se esclarecen las diferencias comerciales. (Codex alimentarius Normas internacionales de los alimentos, 2016)

El Codex alimentarius en su Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios GSFA, Codex STAN 192-1995, contempla las directrices de aplicación de aditivos alimentarios, indicando las dosis de uso máximo para cada tipo de alimento. De esta se extraen los valores para preparados en polvo, refrescos y confitería presentados en el Cuadro 3. (GSFA, 2015)

D. Regulación nacional

En Guatemala en el tema de aditivos alimenticios se consideran dos normativas, el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.54:10 y la norma COGUANOR NGO 34 192 Aditivos alimentarios permitidos para consumo humano 92-06-15. Actualmente ya no se encuentra vigente y ha sido sustituida por el RTCA 67.04.54:10. (Comisión Guatemalteca de Normas COGUANOR, s.f.)

El RTCA 67.04.54:10 de Alimentos y Bebidas Procesadas, Aditivos Alimentarios, es una adaptación del Codex Stan 192-1995. (Rev. 6-2005). El cual es elaborado por ministerios como MINECO, MIFIC, MEIC, el Organismo Salvadoreño de Reglamentación Técnica OSARTEC y la Secretaría de Industria y Comercio SIC. En él se encuentran los límites máximos permitidos en las diferentes categorías de alimentos para toda el área centroamericana. Tal como se observa en el Cuadro 3 existen diferencias entre los valores aceptados de uso para los colorantes azul 1 (133) y azul 2 (E132), en las distintas categorías de alimentos por el RTCA, el Codex Alimentarius y la EFSA. Se puede observar que en las categorías que tienen en común, el Codex Alimentarius es quien presenta el valor mínimo.

Cuadro 3. Dosis de uso máximo permitidos para Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) en algunos alimentos, el Codex alimentarius, el RTCA 67.04.54.10 y EFSA.

Tipo de alimento	Azul 1 (E133)			Azul 2 (E132)		
	Codex alimentarius	RTCA	EFSA	Codex alimentarius	RTCA	EFSA
Bebidas saborizadas no alcohólicas	NA	NA	100 mg/l	NA	NA	*100 mg/l
Bebidas a base de agua aromatizadas, incluidas las bebidas para deportistas, bebidas energéticas o bebidas electrolíticas y bebidas con partículas añadidas	100 mg/Kg ***	150 mg/Kg ***	NA	100 mg/Kg	300 mg/kg	NA
Cereales para el desayuno, incluidos los copos de avena	200 mg/kg	200 mg/Kg	NA	NA	300 mg/Kg	**100 mg/Kg
Confitería	NA	NA	300 mg/Kg	NA	NA	NA
Confituras, jaleas, mermeladas	100 mg/Kg	500 mg/Kg	NA	300 mg/Kg	500 mg/kg	NA
Decoraciones (p. ej., para productos de pastelería fina), revestimientos (que no sean de fruta) y salsas dulces	500 mg/kg	500 mg/Kg	500 mg/Kg	300 mg/Kg	500 mg/kg	500 mg/kg
Dulces, incluidos los caramelos duros y blandos, los turrone, etc., distintos de los indicados en las categorías de alimentos 05.1, 05.3 y 05.4	300 mg/Kg	300 mg/Kg	NA	300 mg/Kg	450 mg/Kg	NA
Goma de mascar	300 mg/Kg	300 mg/Kg	NA	300 mg/Kg	300 mg/Kg	300 mg/Kg
Hielados	NA	NA	150 mg/Kg			150 mg/Kg
Hielos comestibles, incluidos los sorbetes	150mg/Kg	150 mg/Kg	NA	150 mg/Kg	300 mg/Kg	NA
Postres lácteos (como pudines, yogur aromatizado o con fruta)	150 mg/Kg	150 mg/Kg	150 mg/Kg	150 mg/Kg	300 mg/Kg	NA
Productos lácteos fermentados saborizados, incluyendo productos tratados con calor	NA	NA	NA	NA	NA	150 mg/Kg
Postres a base de grasas, excluidos los postres lácteos de la categoría de alimentos 01.7	150 mg/Kg	150 mg/Kg	NA	150 mg/Kg	300 mg/Kg	
Productos de pastelería fina	NA	NA	200 mg/Kg	NA	NA	200 mg/Kg

mg/Kg mg del aditivo por Kg del alimento: NA No aplica; * Excluyendo leche chocolatada y productos con malta.; ** Excepto los productos de aperitivo salado extruidos o expandidos; *** Excepto la leche chocolatada.:

(Fuente: Codex General Standard for Food Additives (GSFA) Online Database, 2015; Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.54.10, 2012; European Food Safety Authority, 2010; European Food Safety Authority, 2014)

E. Monografía colorante Azul 1 (E133)

1. Sinónimos: CI Food Blue 2, FD&C Blue No.1, CI (1975) No. 42900, INS No. 133. (JECFA, 2006)

2. Descripción: Polvo de color azul o gránulos de color azul. (JECFA, 2006)

3. Usos: Colorante. (JECFA, 2006)

4. Pureza: No menor a 85% (EFSA, 2010)

5. Características químicas

Cuadro 4. Valores relacionados a la pureza del colorante.

Característica de pureza	Valor
Materia insoluble en agua	≤ 0.2%
Colores subsidiarios	≤ 6.0%
Suma de 2-,3 y 4-ácido sulfónico formil benceno	≤ 1.5%
Ácido sulfónico metilbenceno. 3((etil)(4-sulfonil)amino)	≤ 0.3%
Leuco base	≤ 5.0%
Aminas aromáticas primarias no sulfonadas	≤ 0.01% (calculadas como anilinas)
Material extraído con éter	≤ 0.2%
Arsénico	≤ 3 mg/kg
Plomo	≤ 2 mg/kg
Cromo	≤ 50 mg/kg

(Fuente: EFSA, 2010)

6. Método de ensayo: Contenido total por titulación con cloruro de titanio volumen 4 de los métodos analíticos de JECFA. (JECFA, 2006)

7. Monografía toxicológica: Se presentan los estudios contenidos en la monografía de toxicológica por JECFA. (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1969)

Cuadro 5. Resultados de los estudios toxicológicos para toxicidad aguda estudios especiales, de corto plazo, largo plazo, comentarios y evaluación de uso para Azul 1 (E133).

Tipo de estudio	Año	Organismo	Ruta	Conclusión	*Comentario final	*Evaluación
ECP	1953	Rata	PO	Se observó manchas y depósitos granulares luego de la alimentación del colorante por 600 días al 4%.	No constituye evidencia de carcinogenicidad la administración oral del colorante.	Nivel sin causar efectos tóxicos en ratas: 2500mg/Kg Dosis de ingesta permitida en humanos: 0-12.5 mg/Kg bw/day
ECP	1961	Ratón	PO	Los ratones no mostraron daño al ser alimentado por 19 días. Se observó inflamación en hígado y bazo en algunos de la administración de 4mg.	La producción de sarcoma en el lugar de inyección conduce a la discusión sobre la realización de estudios extensos sobre el colorante. Se considera que para formación de sarcomas se relaciona con las propiedades fisicoquímicas del colorante	
ECP	1962	Ratón	SC	No se encontró presencia de tumores luego de la administración subcutánea, en 10 dosis de 4mg seguido de 50 dosis de 6mg.		
ECP	1965	Gato	SC	No se observó producción de methemaglobina o cuerpos de Heinz, luego de la inyección de 1g el primer día y 0.1g a partir de día 9 al 18.		
ECP	1966	Perro	PO	No se observaron cambios microscópicos luego de alimentar beagles a concentración de 1 % y 2% por un año.		
ECP	1966	Rata	SC	Se observó cambios histológicos por la formación de sarcomas no asociados al potencial carcinogénico, luego de la administración subcutánea semanal de 1 ml al 8%.		
EE	1966	Rata	NI	El componente O-sulfobenzaldehído fue administrado a ratas (10 machos y 10 hembras) por 13 semanas a concentración de 0,0.25,0.5, 1 y 2%. Luego se realizó un examen histopatológico, en donde se concluye que el nivel sin efecto para O-sulfobenzaldehído es 2 %		
Datos relacionados a Toxicidad Aguda						
LD ₅₀ mg/ Kg bw	año	Organismo		conclusión		
4600	1961	Ratón	SC	NA		
>2000	1964	Rata	PO	NA		

Tipo de estudio: ECP Estudio a Corto Plazo; EE Estudio Especial. Ruta: PO Oral; SC Subcutánea, NI No Indica.

* Comentario y Evaluación final de JECFA en 1969. (Fuente: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1969)

F. Monografía colorante Azul 2 (E132)

1. Sinónimos: CI Food Blue 1, FD&C Blue No. 2, Indigo Carmine, CI (1975) No. 73015, INS No. 132. (JECFA, 2010)

2. Descripción: Gránulos o polvo de color azul. (JECFA, 2010)

3. Usos: Colorante. (JECFA, 2010)

4. Pureza: No menor al 85%. (EFSA, 2014)

5. Características Químicas

Cuadro 6: Valores relacionados a la pureza del colorante.

Característica de pureza	Valor
Materia insoluble en agua	≤ 0.2%
Colores subsidiarios	≤ 1.0% excepto disodio 3,3'-dioxo-[delta-2,2''-biindolina]- 5,7'-disulfonato
Compuestos orgánicos distintos de los colores	
Isatina-5-ácido sulfónico	≤ 0.5%
5-ácido sulfónoantranílico	≤ 0.5%
Ácido antranílico	≤ 0.5%
Aminas aromáticas primarias no sulfonadas	≤ 0.01% (calculadas como anilinas)
Material extraído con éter	≤ 0.2%
Plomo	≤ 2 mg/kg

(Fuente: EFSA, 2014)

6. Método de Ensayo: Contenido total por titulación con cloruro de titanio volumen 4 de los métodos analíticos de JECFA. (JECFA, 2010)

7. Test de pureza: Cromatografía líquida de alta definición con detector UV/VIS o Arreglo de diodos. (JECFA, 2010)

8. Monografía Toxicológica JECFA: Se presentan los estudios contenidos en la monografía de toxicología por JECFA.

Cuadro 7. Datos sobre toxicidad aguda, y resultados de estudios especiales, de corto plazo, largo plazo, comentarios y evaluación de uso para Azul 2 (E132).

Tipo de estudio	Año	Organismo	Ruta	Conclusión	*Comentario final	*Evaluación
EE	1960	E. Coli	NA	No se observó efecto mutagénico, en concentraciones de 0.5g/1ml y 0.5g/ml.	No constituye evidencia de carcinogenicidad la administración oral del colorante.	Nivel sin causar efectos tóxicos en ratas: 500mg/Kg bw/day.
ECP	1965	Rata	SC	No se observaron tumores locales solo un tumor auxiliar en uno de los grupos de estudio administrando soluciones subcutáneas de 1ml al 2% inicialmente y luego 0.5ml al 0.5% por 7 meses.	La producción de sarcoma en el lugar de inyección conduce a la discusión sobre la realización de estudios extensos sobre el colorante.	Dosis de ingesta permitida en humanos: 0-2.5 mg/Kg bw/day
ELP	1965	Rata	NI	No se observaron efectos adversos en el crecimiento, reproducción, sobrevivencia, ni patologías en microscopio. No se observó diferencia en la incidencia de tumores entre los grupos. Todas las ratas fueron expuestas a una solución del colorante al 2% por 2 años.		
ELP	1966	Ratón	SC	Se observó la presencia de tumores incluyendo el grupo control, a los cuales se les administro semanalmente 2.5mg al 1% del colorante por 104 semanas.		
ELP	1966	Rata	PO	No se observó cambios en la mortalidad, peso en órganos, hematología, o patologías microscópicas al ser alimentadas con el colorante al 0.5, 1.0, 2.0, 5.0% por 2 años, Ni se observó diferencia de supervivencia entre los grupos El crecimiento en machos se vio inhibido por un 2% y 5%. Se observó fibrosarcomas en 14 de las 80 ratas observadas y en 1 del grupo control.		
ECP	1966	Perro	PO	Del grupo de Beagles expuesto a un nivel alto 2 fallecieron de 19. Del grupo expuesto al nivel bajo fallecieron 3, 2 a las 40 semanas y 1 a las 34 semanas. Las muertes se atribuyen a infecciones virales. No se observó patologías microscópicas.		
EE	1969	Rata	PO	Se administró el colorante por 13 semanas a ratas de 3 semanas de vida, a concentraciones de 0,0.25, 0.5 1 y2 %. El nivel de no efecto se observó a la concentración de 2%.		
Datos relacionados a Toxicidad Aguda						
LD ₅₀ mg/Kg bw	año	Organismo	Ruta	Conclusión		
405	1949	Ratón	SC	NA		
2 000	1964	Rata	PO	NA		
>2 500	1969	Ratón	PO	NA		
93	1969	Rata	IV	NA		

Tipo de estudio: ECP Estudio a Corto Plazo; ELP Estudio Largo Plazo; EE Estudio Especial. Ruta: PO Oral; SC Subcutánea, NI No Indica.

* Comentario y Evaluación final de JECFA en 1969. (Fuente: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1969)

IV. MARCO METODOLÓGICO

A. Objetivos

1. Generales:

a. Generar información confiable respecto al tema toxicológico respecto al consumo de alimentos que contienen Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132).

b. Evaluar por HPLC la cuantificación de colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) en bebidas preparadas, preparados en polvo para refresco y confitería a la venta en supermercados de Guatemala.

2. Específicos:

a. Determinar la preferencia de bebidas preparadas, polvo para refresco y confitería que declaran en la etiqueta la presencia de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) en el mercado guatemalteco.

b. Comprobar la validación del método entre una muestra determinada evaluando los parámetros del desempeño de: exactitud, repetibilidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, del método de cuantificación de colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) utilizando HPLC con DAD.

c. Medir la concentración de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) en tres marcas de tres tipos de alimentos bebidas preparadas, preparados en polvo para refresco y confitería para determinar si cumplen con regulaciones nacional e internacionales.

d. Revisar la condición regulatoria actual de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132).

e. Diseñar un documento referente a la toxicidad los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) basado en estudios recientes que sirva de apoyo para el sistema de regulación local.

B. Hipótesis

1. Hipótesis nula: Las muestras de bebidas preparadas, preparados en polvo para refresco y confiterías cumplen con los valores de uso para colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) establecidos por la regulación nacional e internacional.

C. Variables

1. Independientes: Valores aceptados de uso para los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132), según RTCA y Codex alimentarius para cada tipo de alimento.

2. Dependientes: Las concentraciones de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) en bebidas preparadas, preparados en polvo para refresco y confitería analizadas.

D. Población

Alimentos comercializados en Guatemala que contienen colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) dirigidos a niños.

E. Muestra

Una bebida preparada y un preparado en polvo para refresco que declaran la presencia de color Azul 1 (E133), y una confitería que declara la presencia de color Azul 2 (E132), dirigidos a niños, de la marca de preferencia del consumidor guatemalteco.

F. Procedimientos

1. Se recabó información bibliográfica sobre la toxicidad, análisis y regulación de los colorantes Azul 1 (E133) Azul 2 (E132) utilizados como aditivos alimenticios.

2. Se elaboró el protocolo en base a la información recabada para colorantes Azul 1 (E133) Azul 2 (E132) utilizados como aditivos alimenticios.

3. Selección de muestras

a. Se determinó los refrescos y preparados en polvo que declaran en su etiqueta la presencia de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) y que se comercializan en una cadena de supermercados dentro de la ciudad de Guatemala.

b. Se validó la comprensión del instrumento a utilizar, por medio de 5 entrevistas, seleccionando a las personas de la manera siguiente: 4 mujeres y un hombre de distinta profesión con hijos en etapa escolar, escogidos al azar.

c. Se realizó un sondeo de marca de consumo en tres tiendas de una cadena de supermercados en distintas zonas de la ciudad de Guatemala para determinar la marca preferida por el consumidor para refrescos, preparado en polvo, y confitería que contengan Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132).

4. Identificación y cuantificación

a. Estándares y soluciones

- 1) Estándar Azul 1 (FD&C Blue No.1).
- 2) Estándar Azul 2 (FD&C Blue No.2).
- 3) Acetonitrilo grado HPLC.
- 4) Acetato de amonio grado reactivo.
- 5) Agua deionizada HPLC.

b. Equipo: Se utilizó un sistema de HPLC marca Agilent con detector de DAD.

Las condiciones para la separación son fase reversa utilizando una columna C18, en condiciones de temperatura ambiente y flujo es de 1ml/min. El volumen de inyección para la muestra fue de 20 μ l.

La fase móvil consiste en una mezcla de: (A) 100mM de acetato de amonio/ (B) Acetonitrilo en gradiente (de 4% a 35% en los primeros 7min, de 35% a 4% hasta los 8.21minutos). La longitud de onda utilizada fue de 630 nm para ambos azules.

c. Preparación de la curva de calibración: En el caso del Azul 1 (E133) se preparó una solución madre a concentración de 1mg/ml con agua. Se realizaron 5 soluciones a partir de la solución hija de 1E4 ng/ml en concentraciones 50,100,150,200 y 250 ng/ml y 4 soluciones entre las concentraciones de 1000 a 7500 ng/ml. Para el Azul 2 (E132) se preparó una solución madre de concentración de 1mg/ml y a partir de esta se preparó una solución hija de 1E4 ng/ml 4 soluciones entre las concentraciones de 1000 a 7500 ng/ml.

d. Preparación de las muestras: Todas las muestras se trabajaron en triplicado y seleccionando tres distintos lotes. (Vlase, Muntean, Cobzac, & Filip, 2014)

1) Refresco en polvo: Se pesó 0.3125 g de la muestra y se disolvió en 25ml de agua. Se filtró 2ml de la solución se inyectó 20 μ l en HPLC.

2) Refrescos: Se tomó 5ml de refresco aforados en 10ml con agua. Se filtró 2ml de la solución y se inyectó 20 μ l en HPLC.

3) Confitería: Se pesó 2 g de confitería y se disolvió en 25ml de agua deionizada. Se filtró 2ml de la solución y se inyectó 20 μ l en HPLC.

G. Diseño de investigación

Para la preferencia de marca, se elaboró un listado con las marcas presentes para cada tipo de alimento a analizar: bebida preparada, polvo para refresco y confitería, disponible en el supermercado. Se tomaron 4 marcas representantes para cada tipo de alimento de interés, las cuales se incluyeron en la encuesta, en el caso de la confitería únicamente se tomaron 3 marcas.

1. Tamaño de muestra en el sondeo de preferencia de marca: La muestra elegida para el sondeo de marca se calculó a través de la estimación de una proporción poblacional, en el software de distribución libre Epidat 3.1, desarrollado por la Xunta de Galicia y la Organización Panamericana de la Salud.

La encuesta consta de preguntas que evalúan la frecuencia de respuesta. No se conoce el tamaño poblacional, entiéndase personas adultas que poseen hijos y que asisten a cada uno de los supermercados elegidos, ni se prevee la frecuencia de cada respuesta. Por lo que se utiliza la máxima variación para una proporción del 50%, y así se considera la muestra más grande posible.

Con un nivel de confianza del 95% y la precisión del 8%, de acuerdo a la posible frecuencia de las respuestas moderadamente o bastante frecuentes, se determinó que el tamaño de muestra corresponde a 151 personas.

2. Método de Muestreo: Por conveniencia se seleccionó tres tiendas de una cadena de supermercado en las que se encuestó a las 151 personas (la muestra se dividió proporcionalmente entre las tres tiendas).

Los datos recabados se analizaron con estadística descriptiva para determinar la marca más preferida en cada tipo de alimento para su posterior análisis químico, utilizando muestras de tres lotes diferentes para cada alimento.

H. Análisis estadístico

En el caso de la validación de la encuesta utilizando una escala se evaluó la comprensión de cada pregunta, las puntuaciones se analizaron con estadística descriptiva.

En el caso de la validación del método analítico se determinaron los siguientes parámetros: (Oficina de Acreditación OGA, 2007)

1. Exactitud
2. Repetibilidad
3. Especificidad
4. Límite de cuantificación
5. Límite de detección
6. Linealidad
7. Rango

V. MARCO OPERATIVO

A. Recabación y tratamiento de datos

Los datos obtenidos en la encuesta se trataron con Excel. La recabación de datos en el análisis químico se realizó el software chemstationacoplado al equipo de cromatografía HPLC. Los datos obtenidos por el equipo se analizaron con Excel.

B. Recursos

1. Recursos humanos

- a. Autora: Maureen Anaité García Sánchez.
- b. Asesora: Licenciada. MSc. Carolina Guzmán Quilo.
- c. Supervisora de laboratorio: Licda. Ana Luisa Mendizábal.

2. Recursos materiales

a. Equipo

- 1) Balanza analítica Ohaus modelo analitical plus Ai2550.
- 2) Cromatografía líquida de alta definición HPLC marca Agilent con detector DAD
- 3) Micropipeta automática de 10-100 μ l marca Brand modelo Transferpette.
- 4) Micropipeta automática 100-1000 μ l, marca Brand modelo Transferpette.
- 5) Micropipeta automática 0.5-5ml, marca Brand modelo transferpette S variable.

b. Materiales y cristalería

1) Materiales

- | | |
|-------------------------------------|---|
| a) Estándar Azul 1 (FD&C Blue No.1) | e) Agua deionizada HPLC |
| b) Estándar Azul 2 (FD&C Blue No.2) | f) Espátula |
| c) Acetonitrilo grado HPLC | g) Masking tape |
| d) Acetato de amonio grado reactivo | h) Guantes |
| | i) Filtros acuosos y orgánicos para fases móviles |
| | j) Filtros de 0.22 μ m para HPLC usados en las muestras |

2) Cristalería

- a) 01 Balón volumétrico 500 ml
- b) 04 Balón volumétrico 25 ml
- c) 15 Balón volumétrico 10 ml
- d) 04 Beaker 100 ml
- e) 04 Beaker 50 ml
- f) 02 Beaker 10 ml

C. Lugar de investigación

1. Laboratorio de Instrumentación Química avanzada, de la Facultad de Ciencias y Humanidades del departamento de Química en Universidad de Valle de Guatemala.

2. Laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Ciencias y Humanidades del departamento de Química Farmacéutica en Universidad de Valle de Guatemala.

VI. RESULTADOS

A. Resultados obtenidos durante la preferencia de marca en distintos tipos de alimentos que contienen los colorantes Azul 1(E133) y Azul 2 (E132), realizada en tres tiendas de una cadena de supermercados ubicadas en el departamento de Guatemala. La marca preferida fue utilizada en la selección de las muestras analizadas.

Cuadro 8. Resumen de la marca preferida para cada tipo de alimento en tres distintas tiendas.

Alimento	Maraca	Tienda 1	Tienda 2	Tienda 3	No consume	Marca elegida
REP	A	27	17	10	75	A
	B	7	6	9		
	C	0	0	0		
	D	0	0	0		
RE	A	14	16	17	53	A
	B	11	8	3		
	C	9	8	9		
	D	1	0	2		
CON	A	1	2	1	77	C
	B	17	6	7		
	C	14	16	10		

- Muestras para Azul 1 REP= refresco en polvo, RE= refresco (adelante se identifica como RE1).
- Muestras para azul 2: CON= confitería
- El instrumento fue previamente validado por 5 padres (2 padres y 3 madres) de distinta profesión.
- El tamaño de la muestra fue n=151 dividido en tienda 1 n=50; tienda 2 n=51; tienda 3 n=50.
- Las marcas presentadas como elección en el instrumento, fueron seleccionadas considerando que el grupo de mercado fueran niños en etapa escolar. Anexo A
- La muestra de REP marca A tiene un 35.76% de preferencia. La muestra RE marca A obtuvo un 31.13% de preferencia. En la muestra de confitería CON marca C presentó un 26.49% de preferencia.

B. Espectros de absorción de los colorantes Azul 1(E133) y Azul 2 (E132)

Ilustración 1. Cromatograma de Azul 1 para estándar de 1000 ng/ml.

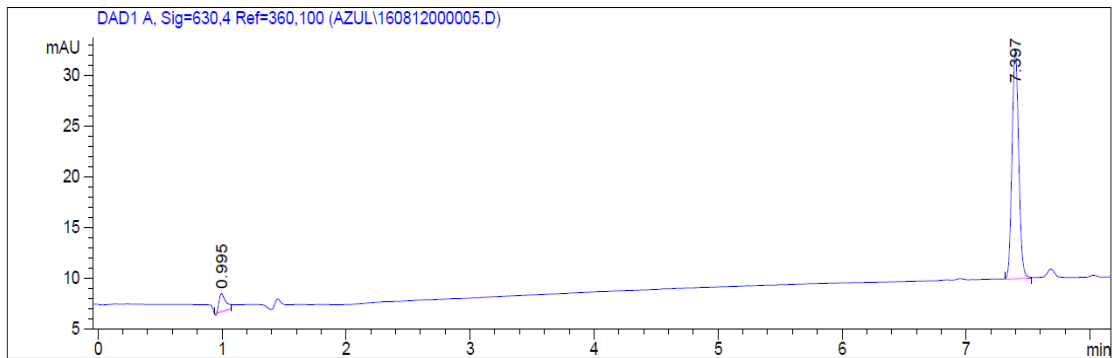
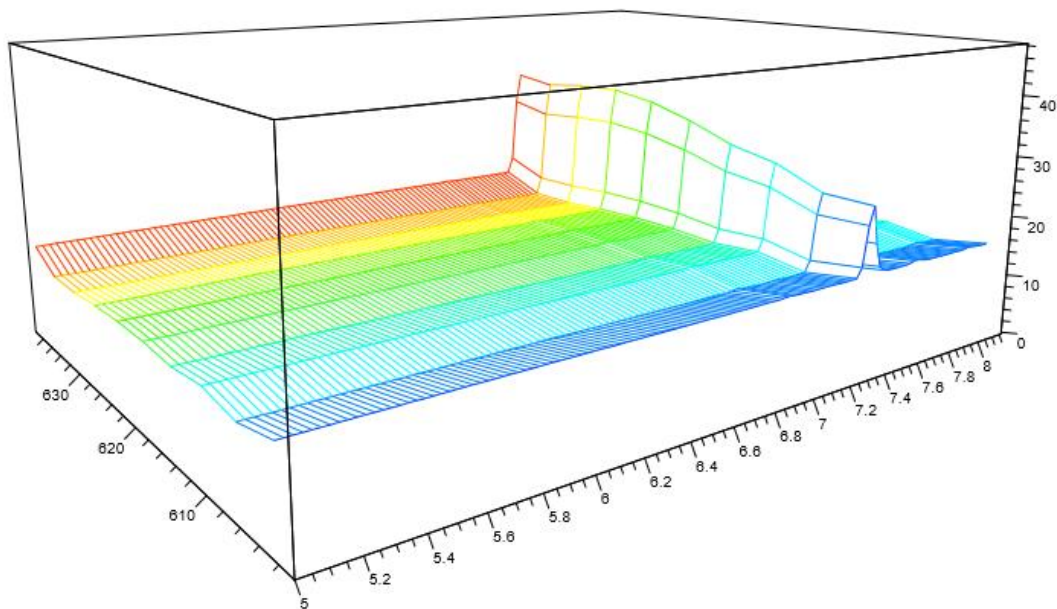


Ilustración 2. Cromatograma en 3D de Azul 1 (E133) para estándar de 1000 ng/ml, como justificación en la elección de la longitud de onda 630nm y tiempo de retención 7.4 min.



•Eje x= Tiempo de retención (min); eje y= Longitud de onda (nm); eje z= Áreas (mAU*s).

Ilustración 3. Cromatograma de Azul 2 para estándar de 1000 ng/ml.

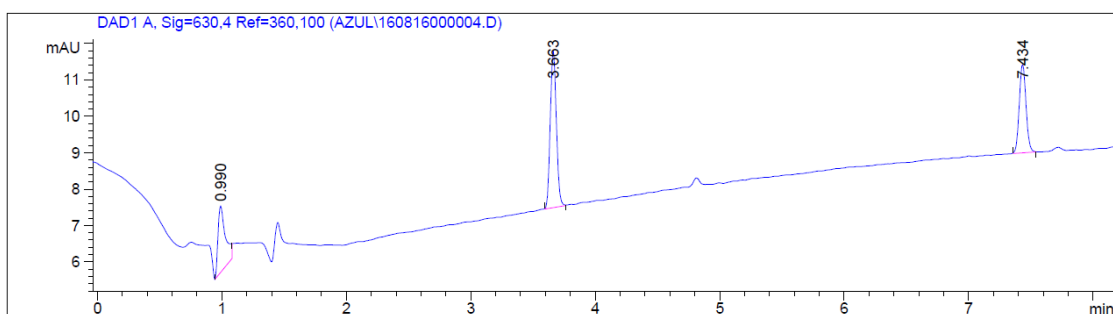
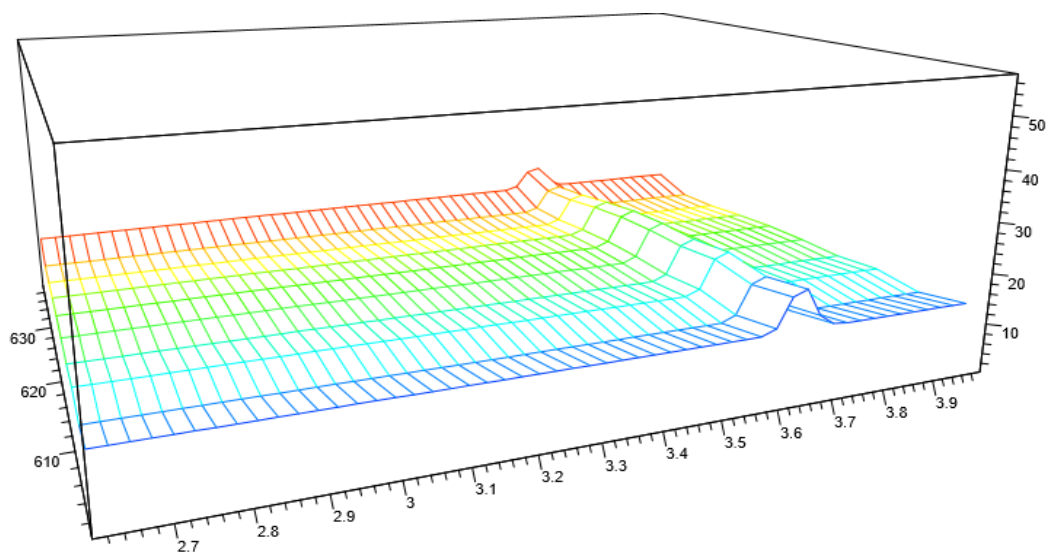


Ilustración 4. Cromatograma en 3D de Azul 2 (E132) para estándar de 1000 ng/ml, como justificación en la elección de la longitud de onda 630nm y tiempo de retención 3.663 min.



•Eje x= Tiempo de retención (min); eje y= Longitud de onda (nm); eje z= Área (mAU*s).

C. Desempeño de los parámetros analíticos durante la validación del colorante Azul 1(E133)

Se determinó el desempeño los parámetros típicos sugeridos por ICH y se tomaron los criterios de aceptación la Oficina de Acreditación OGA la cual se encuentra en armonización con ICH. Otras guías consultadas fueron USP 39 y Eurachem.

En el caso del colorante Azul 1 (E133) se realizaron dos curvas de calibración para asegurar dos rangos de trabajo debido al desconocimiento teórico de la concentración de las muestras.

Cuadro 9. Resumen de los resultados obtenidos en parámetros de validación indicados por ICH, para los colorantes Azul 1(E133) y Azul 2 (E132).

Parámetro	Parámetro estadístico	Criterio	Resultados		
			Azul 1 (E133)		Azul 2 (E132)
			Baja	Alta	Alta
Exactitud	% de Recuperación	50-150% ^a	Cumple	Cumple	Cumple
Repetibilidad	RSD	3-10% ^b	Cumple	Cumple	Cumple
LOD ^c	NA	NA	1 [ng/mL]	1 [ng/mL]	15 [ng/mL]
LOQ ^c	NA	NA	5 [ng/mL]	5 [ng/mL]	20 [ng/mL]
	RSD	>10% ^b	Cumple	Cumple	Cumple
Linealidad	R ²	0.98 ^a	Cumple	Cumple	Cumple
Rango	NA	NA	50-250 [ng/mL]	1000-1E4 [ng/mL]	1000-1E4 [ng/mL]

^a Criterios tomados de OGA para exactitud y linealidad.

^b Criterio de RSD fue calculado con la función de la trompeta de Horwitz. Ver Anexo C Cuadro 23.

^c El criterio para LOD y LOQ fue detección visual como indica ICH.

Cuadro 10. Concentración de colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) en distintos tipos de alimentos. Se incluyen los valores de dosis de uso permitida indicada por RTCA, Codex alimentarius, EFSA. Se hace referencia a la dosis de ingesta diaria permitida sugerida por FDA, EFSA, JECFA.

Muestra	Colorante	Lotes	Concentración del colorante en mg ±Desv. Est.	Dosis de uso calculado para la masa total de la muestra			Ingesta diaria admisible ADI		
				^d Codex alimentarius mg de colorante / Kg del producto	^d RTCA mg de colorante / Kg del producto	^e EFSA mg de colorante / Kg del producto	FDA mg/kg bw/day	EFSA mg/kg bw/day	JECFA mg/kg bw/day
REP ^a	Azul 1	3	6.59 ±0.43	2.50	3.75	100	12	6	0-12.5
RE1 ^a	Azul 1	3	12.34 ±0.45	60.09	90.13	60.00	12	6	0-12.5
RE2 ^a	Azul 1	3	7.13 ±0.43	61.28	91.93	61.00	12	6	0-12.5
CON ^{a,b}	Azul 2	2	0.09 ±0.02	4.78	7.16	NA	2.5	5	0-5.0

^a Muestras para Azul 1: REP= refresco en polvo (mora) RE1= refresco 1 (preferido en encuesta) RE2= refresco 2. Muestras para azul 2: CON= confitería.

^b Se analizaron tres lotes de cada muestra en triplicado excepto para confitería, pues solo existían dos en el mercado.

^c La concentración [mg/Kg] se calculó en base a la masa indicada en el empaque para cada tipo de alimento.

^d El alimento REP se categoriza como bebidas a base de agua aromatizadas. La muestra REG y REPW se categoriza como bebidas para deportistas. La muestra CON se encuentra en la categoría de dulces. Todo lo anterior tanto para el Codex alimentarius como en el RTCA.

^e Las muestras REP, RE1, RE2 se encuentran en la categoría de bebidas no alcohólicas por EFSA. En la muestra CON se describe como confitería por la misma entidad.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El propósito primordial de la presente investigación fue evaluar la condición actual de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) partiendo de la recabación de información toxicológica oportuna que informe sobre el riesgo asociado al consumo de dichos aditivos alimenticios.

Con esta finalidad se buscan distintos tipos de documentos como regulaciones, informes toxicológicos, artículos sobre efectos asociados al consumo y artículos con metodologías de análisis en la cuantificación de colorantes en alimentos. Todos estos fueron consultados con el propósito de generar la propuesta de un método de análisis para la cuantificación de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132), disponible para el uso de entes reguladores en Guatemala, como en el análisis de productos terminados en la industria de alimentos. Así mismo generar conciencia sobre la importancia del análisis de los alimentos con colorantes a los que está expuesta la sociedad guatemalteca, y los posibles riesgos asociados al consumo con mayor importancia poblaciones vulnerables como los infantes.

A continuación, se detallan las distintas etapas comprendidas en el presente estudio.

A. Sondeo de marca y selección de muestras de gabinete.

Luego de elaborar un listado de alimentos que declararan la presencia de Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) en un supermercado del departamento de Guatemala, se seleccionaron cuatro marcas que presentaran alimentos dirigidos a infantes en categorías de refrescos en polvo, refrescos y confitería.

En el caso de la confitería se seleccionaron tres marcas de barras a base de cereal que fueron incluidas en la encuesta y luego sustituida por dulces durante el análisis de muestras.

El instrumento utilizado para el sondeo de preferencia de marca fue previamente validado por cinco padres de familia de distinta ocupación (ama de casa, profesional de la salud, otro tipo de profesional, maestro) y género. Ellos evaluaron cada pregunta con una escala de 1 a 5 la cual buscó evaluar el nivel de comprensión de cada pregunta.

El criterio para un cambio en la pregunta fue un valor de comprensión menor a 3, haciendo uso de las sugerencias descritas en la sección de comentarios para cada pregunta. En todos los ítems evaluados se obtuvo un valor arriba de 4 por lo que no se realizaron cambios en el instrumento.

Como se observa en el Cuadro 8 la marca de preferencia en las cuatro marcas presentadas en las tres tiendas en cada tipo de alimento de refresco en polvo REP fue la A. Es importante notar que la mitad de la población evaluada indicó que no consume este tipo de alimento. En el alimento de refresco RE se observó que la marca de preferencia fue la A y es el tipo de alimento con mayor confirmación de consumo. Por último, en la categoría de confitería CON se observa que la marca preferida fue la C, este tipo de alimento tiene una menor preferencia de consumo por la población, aunque se encuentra muy cercana a la media.

Tanto las muestras de REP y RE declaran la presencia de Azul 1 (E133). En el caso de las barras de cereal, categorizadas como confitería CON por contener mermelada, declaran la presencia de ambos azules.

Como se indicó anteriormente esta muestra fue sustituida por dulces duros con presencia únicamente de Azul 2 (E132).

B. Análisis y validación de metodología para la cuantificación de los colorantes azul 1 (E133) y azul 2 (E132).

Los colorantes son un aditivo alimenticio por lo que se decidió utilizar como guía la norma ICH Q2(R1) referente a la validación de procedimientos analíticos, en conjunto con la Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo propuesta por la Oficina de Acreditación de Guatemala OGA. Esta política se encuentra en armonización con la norma ICH Q2(R1) y otras más, así que no existe conflicto en el fundamento.

Se trabajó con estándares secundarios durante la validación del método, los certificados de análisis para los materiales se adjuntan en el Anexo D.

A causa del desconocimiento de la concentración teórica de las muestras de alimentos analizadas se propuso dos curvas de calibración para el colorante Azul 1(E133), esto debido a que se contaba mayor variedad de tipos de alimentos en las muestras analizadas (REP y RE). Los rangos de trabajo para el Azul 1 (E133) fueron de 50 a 250 ng/mL y 1000 a 1E04 ng/mL. En el caso del Azul 2 se trabajó con una sola curva en el rango de 1000 a 1E04 ng/mL pues solo se analizó un tipo de alimento.

Todos los estándares utilizados para los distintos propósitos en ambos azules fueron preparados cada día al igual que la fase móvil.

Se realizaron dos inyecciones iniciales de 1000 ng/mL tanto para Azul 1 (E133) y para Azul 2 (E132) para confirmar la longitud de onda de máxima absorbancia y tiempo de retención de ambos colorantes. Como se observa en la Ilustración 1 el tiempo de retención fue de 7.397 min en el Azul 1 (E133), y de 3.663 min para el Azul 2 (E132).

Como en el cromatograma de Azul 2 (E132) se tiene la presencia de un pico cercano al tiempo de retención del Azul 1 (E133), se aseguró que las muestras de alimentos analizadas únicamente tuvieran presencia de uno de los azules. La longitud de onda de máxima absorción fue de 630 nm para ambos azules.

Los parámetros de desempeño de se encuentra resumidos en el Cuadro 9, pero se puede observar con mayor detalle en el Anexo C.

En la sección de criterios de aceptación para cada parámetro se utilizaron los descritos por OGA para los parámetros de exactitud y linealidad.

El criterio de aceptación de la repetibilidad se calculó el porcentaje de desviación estándar relativa %RSD para cada concentración de estándar utilizado durante el estudio, aplicando la función de la trompeta de Horwitz que ha sido desarrollada con base en varios métodos analíticos conducidos en el sector de análisis de alimentos. (Burgess, 2000)

Como se observa en Cuadro 9 todos los estándares cumplen en el criterio de %RSD respectivos para cada concentración.

Debido a que ICH indica que no es necesario determinar la precisión intermedia cuando se ha realizado la repetibilidad, no se reporta precisión intermedia. (ICH International Council for Harmonisation, 2005)

El límite de detección LOD y de cuantificación LOQ se determinó realizando la prueba de forma visual, que se encuentra contemplada en la ICH. Para esto se realizaron diluciones a concentraciones conocidas para Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132). Se obtuvo detección en el estándar de concentración 1 ng/mL en el colorante Azul 1 (E133) y en el colorante Azul 2 (E132) la detección se obtuvo con el estándar de con la concentración de 15 ng/mL.

En el caso de límite de cuantificación en el colorantes Azul 1 (E133) fue en el estándar de de 5 ng/mL y en el estándar de 20 ng/mL para el Azul 2 (E132).

En la Gráfica 1, Gráfica 2, Gráfica 3 del Anexo C se observa que el coeficiente de correlación R^2 se encuentra arriba del 0.98% para todas las curvas de calibración. Por lo que las curvas de Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) cumplen con el criterio de aceptación.

C. Análisis de muestras de alimentos que declaran presencia de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132).

En el resumen presentado en el Cuadro 10 se observa la concentración en mg del colorante Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132), obtenidos en cada tipo de muestra. La concentración en mg del colorante permitidos en la dosis de uso, fueron calculados para masa de la presentación del producto analizado.

También en el Cuadro 10 se presenta el valor de ingesta diaria admisible por kilogramo de peso corporal al día mg/kg bw/day aceptado por FDA, EFSA y JECFA.

Las muestras que declaran Azul 1 (E133) son REP, RE1y RE2. La única muestra analizada con Azul 2 (E132) es la de confitería CON. Se utilizaron tres distintos lotes para REP, RE1 y RE2, excepto para la CON donde solo se analizaron 2 lotes. Cada lote de las distintas muestras fue trabajado en triplicado.

Respecto a los resultados obtenidos en el análisis del refresco en polvo REP, se encontró que la concentración promedio en tres lotes distintos fue de 6.59 \pm 0.43 mg de Azul 1 (E133) en un sobre de refresco.

Al observar la dosis de uso permitido de Azul 1 (E133) calculada para el peso en un sobre de refresco (24 g), bajo la regulación del Codex de alimentos fue de 2.50 mg de Azul 1 (E133), y bajo el reglamento local RTCA fue de 3.75 mg de Azul 1 (E133). En ambos casos la muestra no cumple con la dosis de uso.

Debido a que las instrucciones del REP indican la disolución de un sobre en 1L de agua, se observa que en regulación de EFSA el valor permitido en la dosis de uso es de 100 mg de Azul 1 (E133), y la muestra cumple bajo esta regulación.

Referente al valor de ingesta diaria admisible en la muestra REP cumple con las tres regulaciones consideradas (FDA, EFSA, JECFA).

Para el análisis de la muestra descrita como refresco RE1 que refiere al refresco elegido en las encuestas, inicialmente presentaba dos lotes en el mercado, por lo que se decidió trabajar con un refresco RE2 que fuera equivalente al elegido en la encuesta. Posteriormente el análisis fue completado con el tercer lote, por lo que se reportan dos marcas de refrescos.

RE1 refiere a la marca elegida por el público. En esta muestra se obtuvo un valor de 12.34 ± 0.45 mg de Azul 1(E133) por botella, en el promedio de los tres lotes evaluados.

El refresco RE1 cumple con las distintas regulaciones para los valores permitidos de Azul 1 (E133), en la dosis de uso considerando la masa de la muestra por botella. Así mismo cumple con el valor de ingesta diaria admisible para el colorante Azul 1 (E133) en las distintas regulaciones consideradas. Ver Cuadro 10.

La muestra RE2 se reporta una concentración de 7.13 ± 0.43 mg de Azul 1 (E133) por botella, en promedio de tres lotes. La muestra RE2 cumple con los valores tanto de dosis de uso y el indicado como permitido de ingesta al día.

Para el colorante Azul 2 (E132) se analizó una muestra considerada como confitería en las distintas regulaciones. La muestra que se propuso inicialmente en el sondeo de marca fueron barras de cereal, también consideradas como confitería pues la mermelada que contienen dichas barras de cereal era el objeto del estudio. Debido a que la barra de cereal tenía presencia de ambos azules y como se expuso en la discusión sobre la validación del método se observó en el cromatograma del colorante Azul 2 (E132) un pico cercano al tiempo de retención del Azul 1 (E133), y se decidió analizar una muestra que tuviera presencia únicamente del Azul 2 (E132). Ver Ilustración 3.

Por conveniencia se analizó una muestra de dulce duro, pues está en la categoría de confitería. En esta muestra se analizaron únicamente 2 lotes que estaban disponibles en el mercado. La concentración de Azul 2 (E132) encontrada en la muestra CON fue de 0.09 ± 0.02 mg del colorante por dulce. Por lo que se concluye que la muestra cumple con la dosis de uso permitida y el valor de ingesta diaria en las distintas regulaciones consideraras. En el caso de EFSA no se encontró un valor teórico de dosis de uso específico para este tipo de alimento.

D. Comentarios respecto a normativas y estudios relacionados a los riesgos asociados por el consumo de colorantes Azul 1 (E 133) y Azul 2 (E132).

Existe una larga base de datos relacionados a estudios que evalúan la seguridad del consumo y exposición a los colorantes Azul 1 (E 133) y Azul 2 (E132).

En esta investigación se contemplaron estudios respecto al proceso de regulación de los aditivos alimenticios por entes reguladoras de referencia para nuestra región, y se investigó sobre el proceso empleado en la determinación de valores de tolerancia segura para los alimentos de consumo humano.

La Organización mundial de la salud OMS, por medio del Codex alimentarius, presenta un compendio de normas relacionada a los alimentos de uso humano. En este compendio de normas se clasifican los alimentos y se sugieren dosis de uso para los distintos tipos de aditivos alimentarios según el tipo de alimento. El valor de ingesta diaria admisible está determinada por la Junta del comité experto en aditivos alimentarios JECFA, que es administrado tanto por la Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura FAO como por OMS.

Tanto la normativa del Codex de alimentos como las monografías publicadas por JECFA sobre seguridad y riesgos en aditivos alimenticios deberían ser tomadas en cuenta en el desarrollo de las normativas que rigen a la región.

En Guatemala la normativa referente a aditivos en alimentos es el RTCA 67.04.54:10 Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios, el cual es una armonización del Codex de alimentos del año 2005. El Codex de Alimentos tiene una publicación anual con nuevos valores de dosis de uso permitidos en los aditivos con base a la información científica más reciente.

Debido a que el RTCA es aplicado en toda la región centroamericana esta debería actualizarse con mayor frecuencia, para cumplir no solo con el objetivo de estipular límites máximos permitidos sino el de garantizar alimentos seguros para el consumo.

Más allá del desarrollo de normativas, su aplicación y la verificación de su cumplimiento, aún existe el debate sobre si es justificable en el uso de los aditivos alimenticios, sabiendo que no aportan un valor nutricional o terapéutico en la dieta y que su uso es de tipo tecnológico. Lo que nos lleva a la pregunta, ¿vale la pena la exposición deliberada a potenciales carcinógenos? (Burrows, 2009)

Para abordar esta pregunta se consultaron varios documentos que evidenciaran la carcinogenicidad, genotoxicidad, teratogenicidad y neurotoxicidad en los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132).

En el documento desarrollado por el centro para la ciencia en el interés público, se concluye que para el Azul 1 (E133), este puede causar reacciones por hipersensibilidad y que estudios cuestionan ser una causa del desarrollo de tumores en ratas y sobre posibles efectos en células nerviosas, aunque no se puede confirmar como causa de cáncer. Y con respecto al colorante Azul 2 (E132) que no se puede considerar del todo seguro por la evidencia en la incidencia estadísticamente significativa en el desarrollo de gliomas en ratas. (Center for Science in the Public Interest, 2010).

Otros consultados fueron las opiniones científicas de EFSA en la reevaluación de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132), la cual presenta las conclusiones de varios estudios en animales como en humanos. Concluyen que el colorante Azul 1 (E133) no es carcinogénico o genotóxico. En el caso del Azul 2 (E132) concluye que no debe de ser de preocupación para genotoxicidad o carcinogenicidad.

VIII. CONCLUSIONES

1. La marca comercial preferida para refresco en polvo con base al sondeo de marca efectuado es la marca A con un 35.76% de preferencia. En el caso del refresco la marca de mayor preferencia fue la A con un 31.12% de preferencia. Para la confitería la marca C con un 26.49% de preferencia.
2. El método de cuantificación con HPLC con detector de arreglo de diodos para los colorantes Azul 1 (133) y Azul 2 (132) cumple con los parámetros de exactitud, repetibilidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación. Se acepta la hipótesis nula propuesta en la investigación.
3. La concentración obtenida en el análisis de muestras de Azul 1 (E133) fue de 6.59 ± 0.43 mg en un sobre del refresco en polvo, 12.34 ± 0.45 mg de colorante por botella en el refresco RE1 y 7.13 ± 0.43 mg por botella en el refresco RE2. La concentración de Azul 2 (E132) en la muestra de confitería fue de 0.09 ± 0.02 mg por dulce.
4. La muestra de refresco en polvo (REP) cumple con el valor de ingesta diaria, pero no con el valor de dosis de uso dictado por la regulación local.
5. Las muestras de refresco (RE) y confitería (CON) cumplen con el límite de la dosis de uso y valor de ingesta diaria admisible local.
6. En Guatemala la normativa que se aplica para los colorantes es el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.54.10 Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios, en armonía con el Codex Alimentarius edición 2005 y no se ha actualizado desde entonces.

7. En Europa los aditivos alimenticios se encuentran regulados por la Autoridad Europea de Seguridad alimentaria EFSA donde bajo la opinión de su panel/comité científico se indican los valores de dosis de uso y valores de ingesta diaria permitidos de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) reevaluadas entre 2010 y 2014.
8. Los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) se encuentran regulados por la Administración de Medicamentos y Alimentos FDA en U.S, la cual indica valores de ingesta diaria permitidos, pero no el valor de dosis de uso permitido.
9. En el Anexo F y Anexo G se incluye el documento que contempla la revisión toxicológica de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) basado en la evidencia de estudios recientes.

IX. RECOMENDACIONES

- A. Desarrollar de revisiones periódicas en los valores de dosis de uso y de ingesta diaria admisible de los colorantes Azul 1(E133) y Azul 2 (E132) a fin de estar en armonía con las regulaciones internacionales recientes.
- B. Ampliar el estudio para que se evalúe una mayor variedad de alimentos que contengan en su formulación Azul 1(E133) o Azul 2 (E132).
- C. Verificar el método que se presenta en esta investigación en otros laboratorios para determinar la robustez y reproducibilidad del mismo y generar discusión en la propuesta de un método oficial para la cuantificación de colorantes alimenticios en Guatemala.
- D. Implementar etiquetas de alerta en alimentos enfocados a niños por ejemplo bebidas, cereales, confiterías, gelatinas y helados como prevención de trastornos ligados al consumo de Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) tales como déficit de atención y alergias por sensibilidad a los colorantes.
- E. Evaluar el tratamiento de muestras con presencia de ambos colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) para lograr la separación de uno de ellos a fin de implementar el mismo método analítico propuesto.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Burdock, G. (1997). *Encyclopedia of Food and Color Additives, Volumen 1* (Vol. I). New York, U.S.: CRC Press.
2. Burrows, A. (22 de abril de 2009). *Pallete of our plates: A brief history of food coloring and its regulations*. *Comprehensive Reviews in food science and food safety*, 8(4), 394-408.
3. Center for Science in the Public Interest. (junio de 2010). *Center for Science in the Public Interest*. Washington, DC. Obtenido de CSPI:
<https://cspinet.org/new/pdf/food-dyes-rainbow-of-risks.pdf>
4. Center for Science in The Public Interest. (14 de enero de 2016). *The Science Linking Food Dyes with Impacts on Children's Behavior*. Recuperado el 8 de Marzo de 2016, de Center for Science in The Public Interest:
<https://www.cspinet.org/fooddyes/Food-Dyes-Fact-Sheet.pdf>
5. Codex alimentarius Normas internacionales de los alimentos. (1 de febrero de 2016). *Acerca del Codex alimentarius*. Obtenido de Codex alimentarius FAO:
<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/es/>
6. Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC). (28 de marzo de 2012). *Class names and the international numbering system for food additives* FAO. Obtenido de FAO:
ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCFAC/ccfac31/INS_e.pdf
7. Codex General Standard for Food Additives (GSFA) Online Database. (2015). *Norma general para los aditivos alimentarios CODEX STAN 192-1995*. Recuperado el 6 de abril de 2016, de Codex alimentarius FAO WHO:
<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/normas-oficiales/base-de-datos-en-linea-de-la-norma-general-del-codex-para-los-aditivos-alimentarios-gsfa/es/>

8. Comisión Guatemalteca de Normas COGUANOR. (s.f.). *Normas vigentes COGUANOR*. Recuperado el 22 de abril de 2016, de COGUANOR: <http://coguanor.gob.gt/index.php?id=26>
9. Dixit, A., & Goyal, R. (2013). Evaluation of Reproductive toxicity caused by Indigo Carmine on male swiss albino mice. *pharmacologyonline*, 1, 218-224.
10. EFSA. (7 de octubre de 2010). *EFSA Journal*. Obtenido de EFSA: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1778>
11. EFSA. (2010). Scientific Opinion on the re-evaluation of Brilliant Blue FCF (E 133) as a food additive. *EFSA Journal*, 8(11), 1-36. doi:10.2903/j.efsa.2010.1853
12. EFSA. (enero de 27 de 2011). *EFSA Journal*. Obtenido de EFSA: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1854>
13. EFSA. (15 de julio de 2014). *Journal EFSA*. Obtenido de EFSA: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3765>
14. EFSA. (2014). Scientific Opinion on the re-evaluation of Indigo Carmine (E 132) as a food additive. *EFSA Journal*, 1-51.
15. EFSA. (27 de enero de 2015). *EFSA Journal*. Obtenido de EFSA: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/4007.pdf
16. Ertaş, E., Özer, H., & Alasalvar, C. (2007). A rapid HPLC method for determination of Sudan dyes. *Food Chemistry*, 756-760.
17. European Commission Joint Research Centre. (2013). *Analysis of needs in post market monitoring of food additives and preparatory work for future projects in this field*. European Food Safety Authority EFSA.

18. European Commission.European Food Information Council. (diciembre de 2015). *EUFIC*. Obtenido de EUFIC: <http://www.eufic.org/article/en/expid/basics-food-additives/>
19. European Food Safety Authority. (2010). Scientific Opinion on the re-evaluation of Brilliant Blue FCF (E 133) as a food additive. *EFSA Journal*, 8(11), 1-36. doi:10.2903/j.efsa.2010.1853
20. European Food Safety Authority. (2014). Scientific Opinion on the re-evaluation of Indigo Carmine (E 132) as a food additive. *EFSA Journal*, 12(7), 1-51. doi:10.2903/j.efsa.2014.3768
21. FDA. (mayo de 2015). *Summary of Color Additives for Use in the United States in Foods, Drugs, Cosmetics, and Medical Devices FDA*. Obtenido de FDA: <http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/ColorAdditiveInventories/ucm115641.htm#table1B>
22. Food Advisory Committee. (30 de marzo de 2011). *Food Advisory Committee*. Obtenido de FDA: <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/FoodAdvisoryCommittee/UCM248549.pdf>
23. Food Advisory Committee. (31 de marzo de 2011). *Food and Drug Administration*. Obtenido de Food and Drug Administration: <http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/FoodAdvisoryCommittee/UCM248549.pdf>
24. Food Standards Agency UK . (8 de octubre de 2012). *Chemicals in food: safety controls GOV.UK*. Obtenido de GOV.UK: <https://www.gov.uk/guidance/chemicals-in-food-safety-controls>
25. Fortin, N. (2009). *Food Regulation Law, Science, Policy and Practice* (Primera ed.). New Jersey, United States: John Wiley & Sons.

26. Griffiths, J. (mayo de 2005). Coloring Foods & Beverages. *Food Technology*, 59(5), 38-44.
27. GSFA. (2015). *Base de datos en línea de la norma general del Codex para los aditivos alimentarios (GSFA)*. Obtenido de GSFA online:
<http://www.fao.org/gsfaonline/index.html?lang=es>
28. ICH International Council for Harmonisation. (2005). *Validation of analytical procedures text and methodology Q2 (R1)*. Obtenido de ICH harmonization for better health :

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
29. International Food Information Service. (2009). *IFIS Dictionary of Food Science and Technology* (Segunda ed.). Shinfield , United Kingdom: Chichester, U.K.; Ames, Iowa : Wiley-Blackwell ; Reading, UK ; IFIS,.
30. JECFA. (2006). *Combined Compendium of Food Additive Specifications*. Obtenido de FAO: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/en/>
31. JECFA. (2010). *Combined Compendium of Food Additive Specifications*. Obtenido de FAO: <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/jecfa-additives/en/>
32. JECFA. (agosto de 2011). *Total colouring matters content tentative method (VOLUME 4)*. Obtenido de Combined compendium of food additive specifications : <http://www.fao.org/docrep/009/a0691e/A0691E00.HTM>
33. JECFA. (junio de 2014). *List of chemicals in functional class COLOUR*. Obtenido de JECFA evaluation: <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/search.aspx?fc=31>

34. JECFA. (s.f.). *índice aditivos alimentarios JECFA*. Obtenido de Compendio de especificaciones para aditivos alimentarios: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/index.html?lang=en>
35. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (4 de junio de 1969). *Toxicological evaluation of some food colours, emulsifiers, stabilizers, anti-caking agents and certain others substances*. Obtenido de INCHEM: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v46aje08.htm>
36. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (4 de junio de 1969). *Toxicological evaluation of some food colours, emulsifiers, stabilizers, anti-caking agents and certain others substances*. Obtenido de INCHEM: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v46aje14.htm>
37. JOINT RESEARCH CENTRE JRC, EFSA. (2013). *Analysis of needs in post-market monitoring of food additives and preparatory work for future projects in this field*. Obtenido de EFSA: http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/419e.pdf
38. Larsen, J. (2008). Legal and Illegal colours . 19.
39. Martins, N., *et al.* (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agroindustries. *Trends in Food Science & Technology*, 52, 1-15.
40. Nigg, J., *et al.* (2012). Meta-Analysis of Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder or Attention-Deficit/ Hyperactivity Disorder Symptoms, Restriction Diet, and Synthetic Food Color Additives. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* , 86-97.e8.

41. Nollet, L., & Toldrá, F. (2015). *Handbook of Food Analysis* (Tercera ed.). CRC Press.
42. Oficina de Acreditación OGA. (2007). *OGA-GEC-016 Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo*.
43. *Pubchem*. (21 de abril de 2016). Obtenido de National Center for Biotechnology Information : <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/9570225#section=Top>
44. PubChem. (21 de abril de 2016). *National Center for Biotechnology Information*. Obtenido de PubChem Compound Database: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5362511>
45. Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.54.10. (2012). *Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios*. Consejo de Ministros de Integración Económica COMEICO.
46. Scotter, M. (2015). *Colour Additives for Foods and Beverages*. Elsevier.
47. Soltan, S., & Shehata, M. (2012). The effects of using color foods of children on immunity properties and liver, kidney on rats. *Food and Nutrition Sciences*, 3, 897-904.
48. Vachirapatama, N., Majaharoensiri, J., & Vissessanguan, W. (2008). Identification and Determination of Seven Synthetic Dyes in Foodstuffs and Soft Drinks On Monolithic C18 Column by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of food and drug Analysis*, 16(5), 77-82.
49. Vlase, L., *et al.* (2014). Development and Validation of HPLC-UV Method for determination of synthetic food colorants. *Revue Roumaine de Chimie*, 9(59), 719-725.
50. Wang, J., Jackson, D., & Dahl, G. (15 de abril de 2013). The food dye FD&C Blue No.1 is a selective inhibitor of the ATP release Channel Panx1. *The Journal of General Physiology*, 141(5), 649-656.

XI. ANEXOS

Anexo A. Instrumento utilizado en el sondeo de preferencia de marca en alimentos que contienen los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132). En el instrumento fueron empleadas imágenes para facilitar la respuesta del encuestado, las cuales fueron codificadas como protección de las marcas utilizadas durante el estudio. En las siglas utilizadas REP refiere a refresco en polvo, RE refresco, CON confitería.



En el Departamento de Química Farmacéutica de la Universidad del Valle de Guatemala, se efectúa el trabajo de investigación titulado *Revisión toxicológica y validación de metodología analítica para colorantes Azul 1 y Azul 2 en alimentos*. Por ello se solicita su valiosa colaboración para responder la presente encuesta con preguntas referentes a su preferencia del tipo y marca de alimentos en la dieta de sus hijos.

La información obtenida mediante este instrumento será totalmente confidencial y servirá para seleccionar las muestras para ser analizadas en gabinete.

Lugar:

Fecha:

1. Indique su género.

Femenino

Masculino

2. ¿Tiene usted hijos en etapa escolar?

Sí

No

3. ¿Consume usted refrescos en polvo?

Sí

No

4. Seleccione la marca refresco en polvo que prefiere para consumo.

REP A REP B REP C REP D

5. ¿Consume usted refrescos?

Sí

No

6. Seleccione la marca refresco que prefiere para su consumo

RE A RE B RE C RE D

7. ¿Consume usted barras energéticas?

Sí

No

8. Seleccione la marca barra energética que prefiere para consumo.

CON A CON B CON C

Agradecemos su valiosa colaboración.



Anexo B. Glosario

Todas las definiciones son descritas como en el Reglamento Técnico Centroamericano para Alimentos y Bebidas Procesadas. Aditivos Alimentarios. (Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.54.10, 2012)

1. Aditivo alimentario: sustancia que no se consume normalmente como alimento por sí misma ni se usa normalmente como ingrediente típico del alimento, tenga o no valor nutritivo, cuya adición intencional al alimento para un fin tecnológico (inclusive organoléptico) en la fabricación, elaboración, tratamiento, envasado, empaque, transporte o almacenamiento provoque, o pueda esperarse razonablemente que provoque directa o indirectamente, el que ella misma o sus subproductos lleguen a ser un complemento del alimento o afecten sus características. Esta definición no incluye los contaminantes, ni las sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales.
2. Alimento: toda sustancia procesada, semiprocada o no procesada, que se destina para la ingesta humana, incluidas las bebidas, la goma de mascar y cualesquiera otras sustancias que se utilicen en la elaboración, preparación o tratamiento de “alimentos”, pero no incluye los cosméticos, el tabaco ni los productos que se utilizan como medicamentos.
3. Dosis máxima de uso de un aditivo: es la concentración más alta de éste respecto de la cual la Comisión del Codex Alimentarius ha determinado que es funcionalmente eficaz en un alimento o categoría de alimentos y ha acordado que es inocua. Por lo general se expresa como mg de aditivo por kg de alimento. La dosis de uso máxima no suele corresponder a la dosis de uso óptima, recomendada o normal. De conformidad con las buenas prácticas de manufactura la dosis de uso óptima, recomendada o normal, difiere para cada aplicación de un aditivo y depende del efecto técnico previsto y del alimento específico en el cual se utilizaría dicho aditivo, teniendo en cuenta el tipo de materia prima, la elaboración de los alimentos y su almacenamiento, transporte y manipulación posteriores por los distribuidores, los vendedores al por menor y los consumidores.

4. Ingesta diaria admisible (IDA) es una estimación efectuada por el JECFA de la cantidad de aditivo alimentario, expresada en relación con el peso corporal, que una persona puede ingerir diariamente durante toda la vida sin riesgo apreciable para su salud (se refiere normalmente a una persona estándar de 60 kg).

Anexo C. Lista de abreviaciones

IARC	Agencia internacional para investigación del cáncer
ADHD	Trastorno de déficit de atención e hiperactividad
ATP	Adenosín trifosfato
BBG	Azul brillante G
CAS	Chemical Abstracts Service
CCFAC	Comité del Codex sobre aditivos de alimentos y contaminantes
CI	Color Index
COGUANOR	Comisión Guatemalteca de Normas
D&C	Medicamentos y cosméticos
DAD	Detector de arreglo de diodos
EEC	Comunidad Económica Europea
EFSA	Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FD&C	Alimentos, Medicamentos y cosméticos
FDA	Agencia de Alimentos y Medicamentos
GSFA	Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios
GSH	Glutación
HPLC	Cromatografía líquida de alta definición
IDA	Ingesta diaria admisible
INS	Sistema de Numeración Internacional para aditivos alimentarios
JECFA	Comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios
MEIC	Ministerio de Economía Industria y Comercio
MIFIC	Ministerio de Fomento, Industria y Comercio
MINECO	Ministerio de Economía
OMS	Organización Mundial de la Salud
OGA	Oficina de Acreditación Guatemalteca
OSARTEC	Organismo Salvadoreño de Reglamentación Técnica

RTCA	Reglamento Técnico Centroamericano
TLC	Cromatografía de capa fina
TOXNET	Toxicology data network
UE	Unión Europea
UV/VIS	Ultravioleta/visible

Anexo D. Cuadros relacionados a los resultados obtenidos en el proceso de la validación del método de análisis para los colorantes azul 1 (E133) y azul 2 (E132).

Cuadro 11. Resumen de porcentaje de recuperación promedio en estándares de concentración y pureza conocida de Azul 1 (E133) como determinación de exactitud, utilizando estándares entre concentración 50 a 250 $\eta\text{g/mL}$.

Colorante	Concentración [$\eta\text{g/mL}$]	% de Recuperación promedio	Desv.Est	Límite inferior	Límite superior
Azul 1	50	124.79	7.46	118.82	130.75
	100	105.61	4.21	102.24	108.98
	150	95.62	5.04	91.59	99.65
	200	95.72	2.44	93.77	97.67
	250	102.43	2.27	100.61	104.25

•El porcentaje de recuperación se determinó para 5 concentraciones con 6 réplicas para cada concentración.

•Se reporta el porcentaje de recuperación promedio de 6 réplicas.

Cuadro 12. Resumen de porcentaje de recuperación promedio en estándares de concentración y pureza conocida de Azul 1 (E133) como determinación de exactitud, utilizando estándares entre concentración 1000 a 1E04 $\eta\text{g/mL}$.

Colorante	Concentración [$\eta\text{g/mL}$]	% de Recuperación promedio	Desv.Est	Límite inferior	Límite superior
Azul 1	1000	105.76	2.41	103.83	107.69
	2500	103.24	2.80	100.99	105.48
	5000	100.25	0.48	99.87	100.64
	7500	100.76	0.26	100.55	100.96
	1E-04	98.69	0.10	98.61	98.77

•El porcentaje de recuperación se determinó para 5 concentraciones con 6 réplicas para cada concentración.

•Se reporta el porcentaje de recuperación promedio de 6 réplicas.

Cuadro 13. Resumen de Linealidad en curvas de concentración 50 a 250 $\eta\text{g/mL}$ de Azul 1 (E133).

Colorante	Longitud de onda (nm)	Curva	Tiempo de retención	Ecuación de la curva	Coefficiente de correlación
Azul 1	630	1	7.376	$y = 9.84\text{E-}02 \pm 2.36\text{E-}03 x$	0.99886
		2	7.374	$y = 9.62\text{E-}02 \pm 3.07\text{E-}03 x$	0.99797
		3	7.380	$y = 9.58\text{E-}02 \pm 2.33\text{E-}03 x$	0.99882
		4	7.375	$y = 9.84\text{E-}02 \pm 2.66\text{E-}03 x$	0.99854
		5	7.372	$y = 9.99\text{E-}02 \pm 3.77\text{E-}03 x$	0.99716
		6	7.365	$y = 9.92\text{E-}02 \pm 2.56\text{E-}03 x$	0.99867
		promedio	7.367	$y = 9.81\text{E-}02 \pm 2.40\text{E-}03 x$	0.99880

•El criterio de aceptación de R2 es de 0.98, según OGA.

Cuadro 14. Resumen de Linealidad en curvas de concentración 1000 a 1E04 $\eta\text{g/mL}$ de Azul 1 (E133).

Colorante	Longitud de onda (nm)	Curva	Tiempo de retención	Ecuación de la curva	Coefficiente de correlación
Azul 1	630	1	7.395	$y = 7.71\text{E-}02 \pm 4.08\text{E-}04 x$	0.99994
		2	7.401	$y = 7.65\text{E-}02 \pm 3.21\text{E-}04 x$	0.99996
		3	7.396	$y = 7.69\text{E-}02 \pm 1.04\text{E-}01 x$	0.99987
		4	7.398	$y = 7.65\text{E-}02 \pm 4.93\text{E-}04 x$	0.99992
		5	7.398	$y = 7.66\text{E-}02 \pm 3.43\text{E-}04 x$	0.99996
		6	7.402	$y = 7.64\text{E-}02 \pm 3.57\text{E-}04 x$	0.99996
		promedio	7.401	$y = 7.67\text{E-}02 \pm 3.83\text{E-}04 x$	0.99995

•El criterio de aceptación de R2 es de 0.98, según OGA.

Cuadro 15. Resumen de Repetibilidad en curvas de concentración 50 a 250 $\eta\text{g/mL}$ de Azul 1 (E133).

Colorante	Concentración [$\eta\text{g/mL}$]	Área [$\text{mAU}\cdot\text{s}$]	Desv.Est del	%RSD	%RSD
		Promedio de 6 replicas	Área [$\text{mAU}\cdot\text{s}$]	experimental	teórico
Azul 1	50	6.53	0.38	5.80	10.42
	100	11.08	0.41	3.73	8.96
	150	15.03	0.81	5.41	8.21
	200	20.10	0.61	3.02	7.71
	250	26.34	0.55	2.10	7.35

- El criterio de aceptación para %RSD teórico determinado según la trompeta de Horwitz (Burgess, 2000)
- El %RSD experimental fue calculado con el promedio y desviación estandar de 6 replicas de cada concentración.

Cuadro 16. Resumen de Repetibilidad en curvas de concentración 1000 a 1E04 $\eta\text{g/mL}$ de Azul 1 (E133).

Colorante	Concentración [$\eta\text{g/mL}$]	Área [$\text{mAU}\cdot\text{s}$]	Desv.Est del	%RSD	%RSD
		Promedio de 6 replicas	Área [$\text{mAU}\cdot\text{s}$]	experimental	teórico
Azul 1	1000	86.80	2.05	2.36	5.44
	2500	211.79	6.05	2.86	4.46
	5000	411.20	1.31	0.32	3.83
	7500	620.64	3.39	0.55	3.51
	1E04	814.96	2.98	0.37	3.30

- El criterio de aceptación para %RSD teórico determinado según la trompeta de Horwitz (Burgess, 2000)
- El %RSD experimental fue calculado con el promedio y desviación estandar de 6 replicas de cada concentración.

Cuadro 17. Límite de detección LOD y Límite de cuantificación LOQ de Azul 1 (E133).

Colorante	LOD [$\eta\text{g/mL}$]	LOQ [$\eta\text{g/mL}$]	Media del Área [$\text{mAU}\cdot\text{s}$]	Desv.Est del Área [$\text{mAU}\cdot\text{s}$]	%RSD
Azul 1	1	5	10.87	1.51	13.88

- LOD y LOQ se determinaron bajo evaluación visual como sugiere ICH.
- El criterio para la concentración de 20 [$\eta\text{g/mL}$] es de %RSD= 17.18%. Ver Cuadro 22.

Cuadro 18. Resumen de porcentaje de recuperación promedio en estándares de concentración y pureza conocida de Azul 2 (E132) como determinación de exactitud, utilizando estándares entre concentración 1000 a 1E04 $\eta\text{g/mL}$.

Colorante	Concentración [$\eta\text{g/mL}$]	% de Recuperación promedio	Desv.Est	Límite inferior	Límite superior
Azul 2	1000	104.19	2.91	101.87	106.52
	2500	101.54	1.93	100.00	103.08
	5000	102.47	1.82	101.01	103.92
	7500	99.70	0.51	99.29	100.11
	1E-04	99.41	0.30	99.17	99.65

- El porcentaje de recuperación se determinó para 5 concentraciones y 6 réplicas para cada concentración.
- Se reporta el porcentaje de recuperación promedio de 6 réplicas.

Cuadro 19. Resumen de Linealidad en curvas de concentración 1000 a 1E04 $\eta\text{g/mL}$ de Azul 2 (E132)

Colorante	Longitud de onda (nm)	Curva	Tiempo de retención	Ecuación de la curva	Coefficiente de correlación
Azul 2	630	1	3.623	$y = 1.20\text{E-}02 \pm 8.39\text{E-}05 x$	0.99990
		2	3.626	$y = 1.18\text{E-}02 \pm 4.45\text{E-}05 x$	0.99997
		3	3.631	$y = 1.19\text{E-}02 \pm 1.38\text{E-}04 x$	0.99973
		4	3.613	$y = 1.18\text{E-}02 \pm 8.12\text{E-}05 x$	0.99991
		5	3.622	$y = 1.18\text{E-}02 \pm 4.38\text{E-}05 x$	0.99997
		6	3.620	$y = 1.18\text{E-}02 \pm 4.00\text{E-}05 x$	0.99998
		promedio	3.620	$y = 1.18\text{E-}02 \pm 6.47\text{E-}05 x$	0.99994

- El criterio de aceptación de R2 es de 0.98, según OGA.

Cuadro 20. Resumen de Repetibilidad en curvas de concentración 1000 a 1E04 $\eta\text{g/mL}$ de Azul 2 (E132).

Colorante	Concentración [$\eta\text{g/mL}$]	Área [mAU*s] Promedio de 6 réplicas	Desv.Est del Área [mAU*s]	%RSD experimental	%RSD teórico
Azul 1	1000	14.15	0.45	3.21	5.44
	2500	34.50	0.65	1.89	4.46
	5000	69.63	1.53	2.20	3.83
	7500	101.64	0.84	0.83	3.51
	1E04	135.15	0.49	0.37	3.30

- El criterio de aceptación para %RSD teórico determinado según la trompeta de Horwitz (Burgess, 2000)
- El %RSD experimental fue calculado con el promedio y desviación estándar de 6 réplicas de cada concentración.

Cuadro 21. Límite de detección LOD y Límite de cuantificación LOQ de Azul 2 (E132).

Colorante	LOD [$\eta\text{g/mL}$]	LOQ [$\eta\text{g/mL}$]	Media del Área [mAU*s]	Desv.Est del Área [mAU*s]	%RSD
Azul 1	15	20	0.37	0.04	10.57

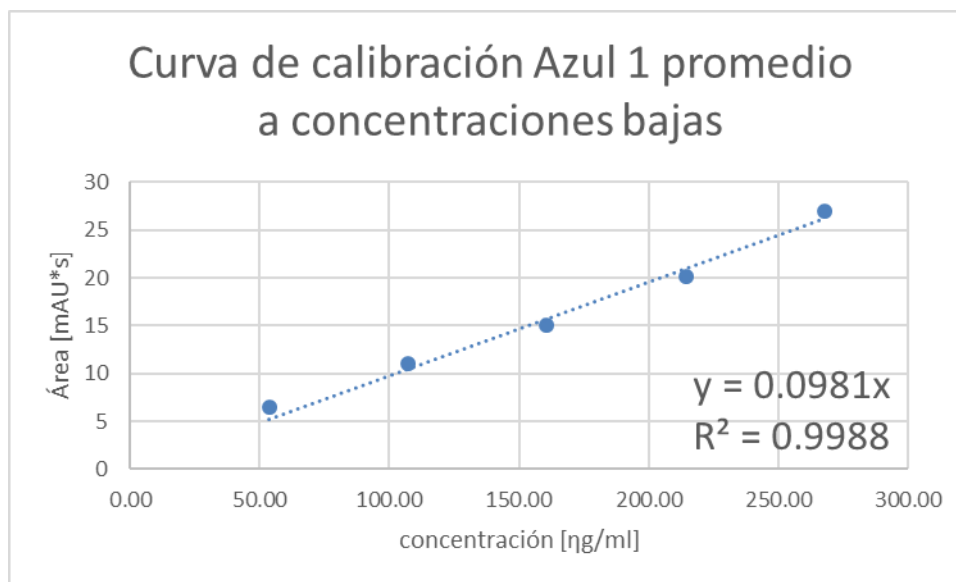
- LOD y LOQ se determinaron bajo evaluación visual como sugiere ICH.
- El criterio para la concentración de 20 [$\eta\text{g/mL}$] es de %RSD= 12.71%. Ver Cuadro 22.

Cuadro 22. Criterio de %RSD calculado para la concentración de cada estándar utilizado en la validación de los colorantes Azul 1(E133) y Azul 2 (E132), utilizando la función de la trompeta de Horwitz.

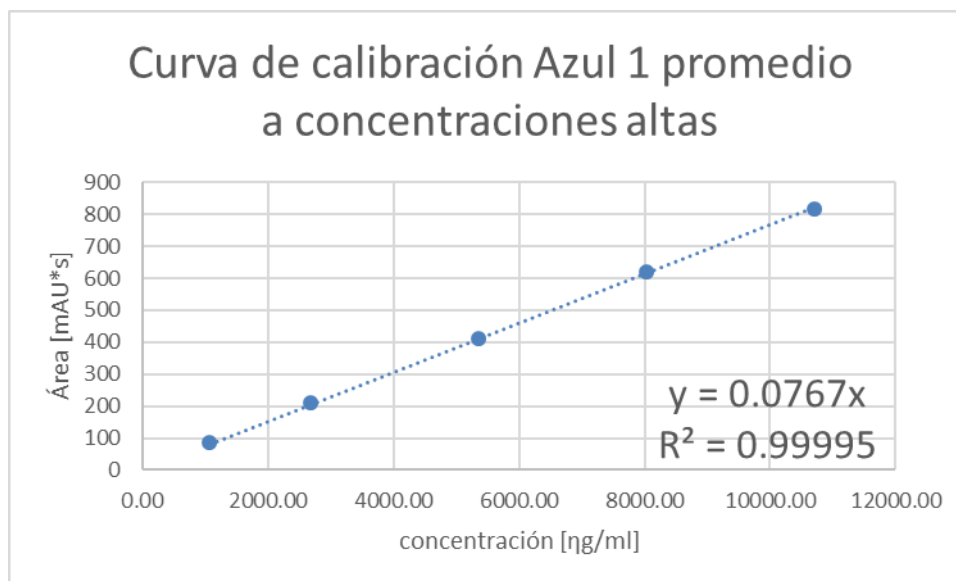
Colorante	Parámetro	Concentración [ng/mL]	Concentración [ppm]	1- 0.5 log C	%RSD
Azul 1/ Azul 2	Repetibilidad	10000	10.000	0.50	3.30
Azul 1/ Azul 2	Repetibilidad	7500	7.500	0.56	3.51
Azul 1/ Azul 2	Repetibilidad	5000	5.000	0.65	3.83
Azul 1/ Azul 2	Repetibilidad	2500	2.500	0.80	4.46
Azul 1/ Azul 2	Repetibilidad	1000	1.000	1.00	5.44
Azul 1	Repetibilidad	250	0.250	1.30	7.35
Azul 1	Repetibilidad	200	0.200	1.35	7.71
Azul 1	Repetibilidad	150	0.150	1.41	8.21
Azul 1	Repetibilidad	100	0.100	1.50	8.96
Azul 1	Repetibilidad	50	0.050	1.65	10.42
Azul 1/ Azul 2	LOQ	20	0.020	1.85	12.71
Azul 1/ Azul 2	LOQ	5	0.005	2.15	17.18

•Criterio calculado con la función de la trompeta de Horwitz $RSD = \pm 2^{1-0.5 \log C}$. (Burgess, 2000).

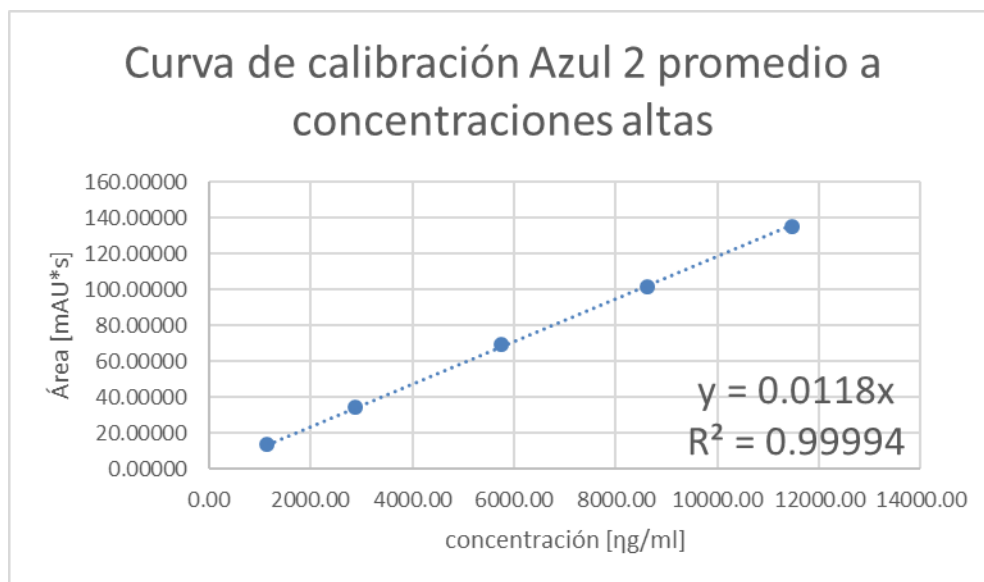
Gráfica 1. Curva de calibración promedio de las seis curvas obtenidas de los estándares de Azul 1 (E133) a concentraciones de 50 $\eta\text{g/mL}$ a 250 $\eta\text{g/mL}$.



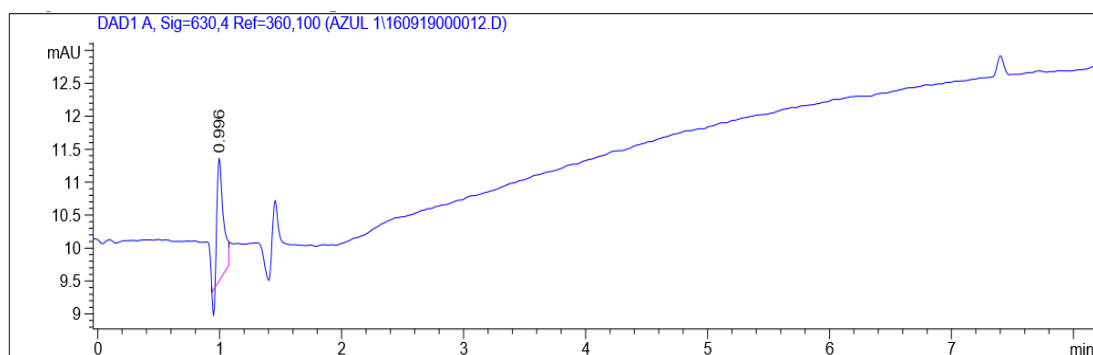
Gráfica 2. Curva de calibración promedio de las seis curvas obtenidas de los estándares de Azul 1 (E133) a concentraciones de 1000 $\eta\text{g/mL}$ a 1E04 $\eta\text{g/mL}$.



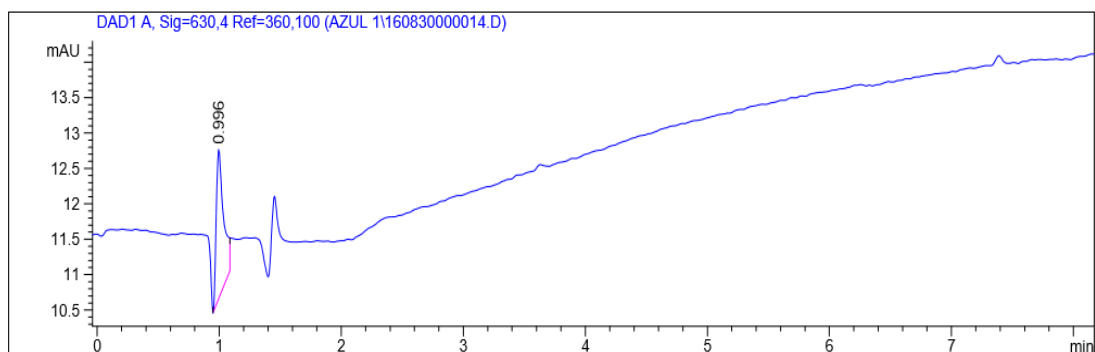
Gráfica 3. Curva de calibración promedio de las seis curvas obtenidas de los estándares de Azul 2 (E132) a concentraciones de 1000 $\eta\text{g/mL}$ a $1\text{E}04 \eta\text{g/mL}$.



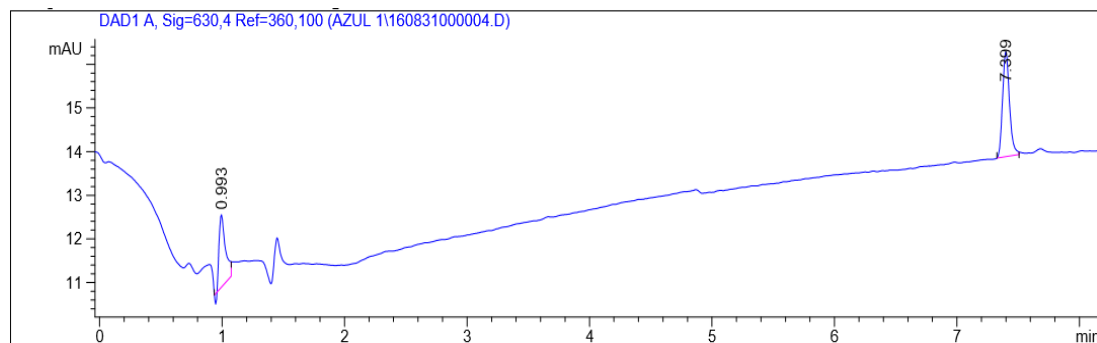
Gráfica 4. Cromatograma de Azul 1 para estándar de 1 ng/ml, utilizado para el límite de detección.



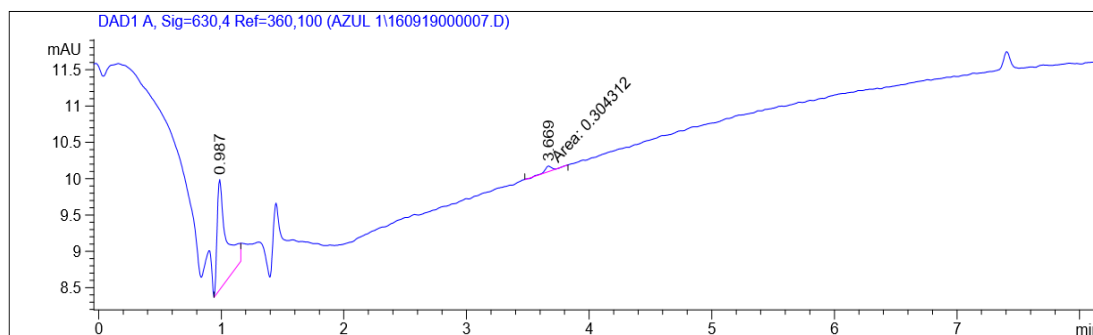
Gráfica 5. Cromatograma de Azul 2 para estándar de 15 ng/ml, utilizado para el límite de detección.



Gráfica 6. Cromatograma de Azul 1 para estándar de 5 ng/ml, utilizado para el límite de cuantificación.



Gráfica 7. Cromatograma de Azul 2 para estándar de 20 ng/ml, utilizado para el límite de cuantificación.



Anexo E. Certificados de calidad de los estándares utilizados durante la validación del método.

Sensient Colors LLC

Page 1 of 1

800-325-8110

Name SENSIENT COLORS, S.A. DE C.V.
Address C/O Interamerica Forwarding Co. Inc.
14420 Maquila Loop
Laredo, TX 78045
USA

Customer PO# A036474
Customer Order 15003015 PD% 90

Item 056491020 BRILLIANT BLUE POWDER
20KG

Customer Item 056490020
Lot/SN 5288073
Manufacture Date 02/25/15 Manufactured St. Louis, MO
Lot Expiration Date 02/23/21

We hereby certify that the batch of color listed above meets all FDA specifications as outlined in 21.CFR parts 74 and 82. However, since the product was sold to you prior to FDA certification, it is not permitted for use in Foods, Drugs, or Cosmetics in the USA until such certification is obtained by you.

Water Insoluble Matter--<0.2%
Lead--NMT 2 ppm
Arsenic--NMT 3 ppm
Mercury--NMT 1 ppm
Cadmium--NMT 1 ppm
Chromium--NMT 50 ppm
Ether extractable material--NMT 0.2%
Unsulfonylated Primary aromatic amines--NMT 0.01%

Test Identification	Description	Min Value	Max Value	Test Value	Status	Date
INSOLUBL	INSOLUBLES	0	20	0	On-Spec	02/26/15
LEUCO	LEUCO BASE (%)	0	5.00	.80	On-Spec	02/27/15
MOISTURE	% MOISTURE	0	8.00	2.82	On-Spec	02/26/15
MOLD	MOLD (CFU/G)	0	100	0	On-Spec	03/02/15
NA2SO4	% NA2SO4	0	5.00	2.10	On-Spec	02/27/15
NACL	% NACL	0	8.00	2.27	On-Spec	02/27/15
PDSPEC	% PURE DYE (SPECTRO)	88.00	100.00	93.35	On-Spec	02/26/15
SUBCOLORS	% SUBSIDIARY COLORS (FDA)	0	6.00	2.55	On-Spec	02/27/15
SYNINTERM	% SYN INTERMEDIATES	0	1.80	.72	On-Spec	02/27/15
TPC	TOTAL PLATE CT (CFU/G)	0	1000	0	On-Spec	03/02/15
YEAST	YEAST (CFU/G)	0	100	0	On-Spec	03/02/15

Greg Bone
Greg Bone, Quality Control Manager

Sensient Colors LLC

Page 1 of 1

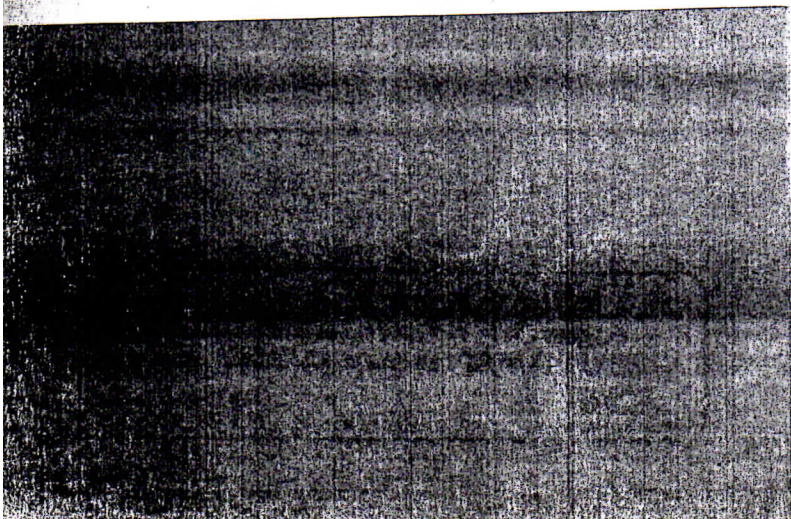
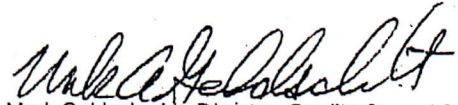
800-325-8110

Name SENSIENT COLORS, S.A. DE C.V.
Address C/O Interamerica Forwarding Co. Inc.
14420 Maquila Loop
Laredo, TX 78045
USCustomer PO# A026219
Customer Order 12014918 PD% 87
Item 056581020 INDIGO CARMINE POWDER
20KG
Customer Item 056580020
Lot/SN 5132191
Manufacture Date 08/12/11 Manufactured St. Louis, MO
Lot Expiration Date 08/10/17

We hereby certify that the batch of color listed above complies with E124, EC Directive 95/45EC and FAO52/1 or 52/2 of the WHO/FAO. This product is not approved by the Food and Drug Administration for use in Foods, Drugs, Cosmetics in the USA.

Water Insoluble Matter--<0.2%
Lead--<2 ppm
Arsenic--<3 ppm
Mercury--<1 ppm

Test Identification	Description	Min Value	Max Value	Test Value	Status	Date
INSOLUBL	INSOLUBLES		0.20	.08	On-Spec	08/18/11
ISOMDYE	% ISOMERIC DYE	0	18.00	14.80	On-Spec	08/16/11
PDSPEC	% PURE DYE (SPECTRO)	85.00	100.00	87.41	On-Spec	08/13/11
SUBCOLORS	% SUBSIDIARY COLORS (FDA)	0	3.00	.32	On-Spec	08/16/11
SYNINTERM	% SYN INTERMEDIATES	0	.60	.07	On-Spec	08/16/11



Mark Goldschmidt, Director, Quality Control & Product Safety

Anexo F. Revisión toxicológica de Azul 1 (E133).

AZUL1 (E133)

REVISIÓN TOXICOLÓGICA

EDICIÓN 1

SEP 2016

Generalidades

Usos: Colorante alimenticio. [1]

Sinónimos: FD&C Blue No.1, CI Food Blue 2, CI (1975) No. 42900, INS No. 133. [1]

Condición regulatoria

Países en donde se encuentra vetado [2]



Alemania
Australia
Bélgica
Francia
Noruega
Suiza
Suecia

Autoridades que permiten su uso

Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA).

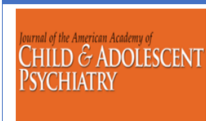
Autoridad de seguridad alimentaria Europea (EFSA).

Junta del comité experto en aditivos alimentarios (JECFA) bajo la dirección de FAO/OMS.

Estudios sobre toxicidad

Algunos estudios relevantes. [3,4,5,6]

Comportamiento



- Meta-analysis of attention deficit / hyperactivity disorder or attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms, restriction diet, and synthetic food color additives.
- Año de publicación 2012
- Realizado para aditivos de color.
- Investiga la posible relación con el trastorno del déficit de atención e hiperactividad (ADHD)
- Concluyen que merece la pena renovar la investigación del efecto en la dieta tanto para colorantes y aditivos.

Inmunidad



- The Effects of Using Color Foods of Children on Immunity Properties and Liver, Kidney on Rats.
- Año de publicación 2012
- Realizado para aditivos de color.
- Concluye que se observa incremento en creatinina y albumina en sangre. Así mismo una disminución en la enzima antioxidante GSH e Incremento en glóbulos blancos.

Biología celular



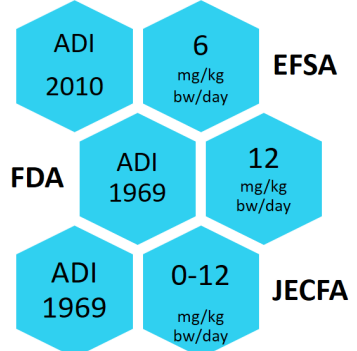
- The food dye FD&C Blue No. 1 is a selective inhibitor of the ATP release channel Panx1.
- Año de publicación 2013.
- Concluye que debido a la similitud estructural entre el colorante Azul 1 (E133) y el receptor antagonista purinérgico azul brillante G (BBG), el colorante azul 1 (E133) inhibe la corriente del canal Panx1 canal de liberación de ATP.

Toxicidad



- Food Dyes: A Rainbow of Risks
- Año de publicación 2010
- Recaba y analiza estudios sobre la toxicidad de los aditivos de color en temas de carcinogenicidad, genotoxicidad, y neurotoxicidad.
- Concluye para Azul 1 que es necesario realizar estudios confirmatorios sobre cáncer pues algunos estudios en animales sugieren relación con tumores en riñón y efectos en células nerviosas.

Valores de ingesta diaria permitidos [3,4,5]



Valores de dosis de uso

Consultar para cada tipo de alimento en

- Reglamento técnico centroamericano RTCA 67.04.54.10 Alimentos y Bebidas Procesadas, Aditivos Alimentarios
- Codex de Alimentarius CODEX STAN 192-1995 Norma general para los aditivos alimenticios .

Referencias

[1]. JECFA. (2006). Combined Compendium of Food Additive Specifications. Obtenido de FAO: www.fao.org

[2]. Vachirapatama, N., et al. (2008). Identification and Determination of Seven Synthetic Dyes in Foodstuffs and Soft Drinks On Monolithic C18 Column by High Performance Liquid Chromatography. Journal of food and drug Analysis, 16(5), 77-82.

[3]. Nigg, J, et al (2012). Meta-Analysis of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder or Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder Symptoms, Restriction Diet, and Synthetic Food Color Additives. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, 86-97.e8.

[4]. Soltan, S, et al. (2012). The effects of using color foods of children on immunity properties and liver, kidney on rats. Food and Nutrition Sciences, 3, 897-904.

[5]. Wang, J, et al. (2013). The food dye FD&C Blue No.1 is a selective inhibitor of the ATP release Channel Panx1. The Journal of General Physiology, 141(5), 649-656.

[6]. Center for Science in The Public Interest. (2016). The Science Linking Food Dyes with Impacts on Children's Behavior. www.cspinet.org/fooddyes/Food-Dyes-Fact-Sheet.pdf

[7]. IARC www.iarc.fr

[8]. García, M. (2016). Revisión toxicológica y validación de metodología analítica para colorantes azul 1 y azul 2 en alimentos. Guatemala.

Conclusión: Aún no se encuentra documentado en las monografías de Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. [7]

Anexo G. Revisión toxicológica de Azul 2 (E132)

AZUL 2 (E132)

REVISIÓN TOXICOLÓGICA

EDICIÓN 1

SEP 2016

Generalidades

Usos: Colorante alimenticio. [1]

Sinónimos: FD&C Blue No. 2, Indigo Carmine, CI Food Blue 1, CI(1975) No. 73015, INS No. 132

Condición regulatoria

Países en donde se encuentra vetado^[2]



Noruega

Autoridades que permiten su uso

Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA).

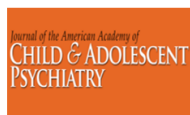
Autoridad de seguridad alimentaria Europea (EFSA).

Junta del comité experto en aditivos alimentarios (JECFA) bajo la dirección de FAO/OMS.

Estudios sobre toxicidad

Algunos estudios relevantes. [3,4,5,6]

Comportamiento



- Meta-analysis of attention deficit / hyperactivity disorder or attention-deficit/hyperactivity disorder symptoms, restriction diet, and synthetic food color additives.
- Año de publicación 2012
- Realizado para aditivos de color.
- Investiga la posible relación con el trastorno del déficit de atención e hiperactividad (ADHD)
- Concluyen que merece la pena renovar la investigación del efecto en la dieta tanto para colorantes y aditivos.

Inmunidad



- The Effects of Using Color Foods of Children on Immunity Properties and Liver, Kidney on Rats.
- Año de publicación 2012
- Realizado para aditivos de color.
- Concluye que se observa incremento en creatinina y albumina en sangre. Así mismo una disminución en la enzima antioxidante GSH y Incremento en glóbulos blancos.

Reproducción



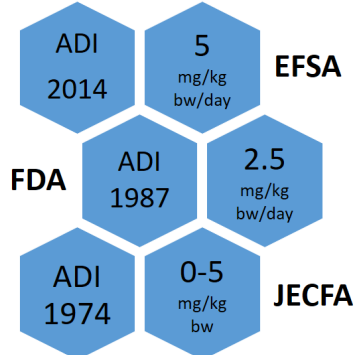
- Evaluation of Reproductive toxicity caused by Indigo carmine on male swiss albino mice.
- Año de publicación 2013.
- Concluye que se observó un aumento significativo en peso corporal y peso de los órganos y la reducción de elementos espermatozoides y en la densidad de espermias.

Toxicidad



- Food Dyes: A Rainbow of Risks
- Año de publicación 2010
- Recaba y analiza estudios sobre la toxicidad de los aditivos de color en temas de carcinogenicidad, genotoxicidad, y neurotoxicidad.
- Concluye para Azul 2 que de acuerdo a estudios en animales existe una incidencia de gliomas estadísticamente significativos. Por lo que el consumo de azul 2 no es considerado no seguro.

Valores de ingesta diaria permitidos [3,4,5]



Valores de dosis de uso

Consultar para cada tipo de alimento en

- Reglamento técnico centroamericano RTCA 67.04.54.10 Alimentos y Bebidas Procesadas, Aditivos Alimentarios
- Codex de Alimentarius CODEX STAN 192-1995 Norma general para los aditivos alimenticios.

Referencias

- [1]. JECFA. (2006). Combined Compendium of Food Additive Specifications. Obtenido de FAO: www.fao.org
- [2]. International Food Information Service. (2009). IFIS Dictionary of Food Science and Technology (Segunda ed.). Shinfield, United Kingdom: Chichester, U.K.; Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; Reading, UK; IFIS.
- [3]. Nigg, J, et al (2012). Meta-Analysis of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder or Attention-Deficit / Hyperactivity Disorder Symptoms, Restriction Diet, and Synthetic Food Color Additives. Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry, 86-97.e8.
- [4]. Soltan, S, et al. (2012). The effects of using color foods of children on immunity properties and liver, kidney on rats. Food and Nutrition Sciences, 3, 897-904.
- [5]. Dixit, A., & Goyal, R. (2013). Evaluation of Reproductive toxicity caused by Indigo Carmine on male swiss albino mice. pharmacologyonline, 1, 218-224
- [6]. Center for Science in The Public Interest. (2016). The Science Linking Food Dyes with Impacts on Children's Behavior. www.cspinet.org/fooddyes/Food-Dyes-Fact-Sheet.pdf
- [7]. IARC www.iarc.fr
- [8]. García, M. (2016). Revisión toxicológica y validación de metodología analítica para colorantes azul 1 y azul 2 en alimentos. Guatemala.

Conclusión: Aún no se encuentra documentado en las monografías de Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer. [7]