

## Revisión toxicológica y validación de metodología analítica para colorantes Azul 1 y Azul 2 en alimentos

Maureen García Sánchez<sup>1</sup>, Ana Luisa Mendizábal Sole<sup>2</sup> y Carolina Guzmán Quilo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Egresada del Departamento de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias y Humanidades; <sup>2</sup>Centro de Ingeniería Bioquímica, Instituto de Investigaciones, Universidad del Valle de Guatemala; <sup>3</sup>Centro de Información y Asesoría Toxicológica, Universidad San Carlos de Guatemala  
anaitegs@gmail.com

**RESUMEN:** Los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132), tienen una alta presencia en productos dirigidos a infantes, se pueden encontrar en confiterías, bebidas y cereales. Debido al debate sobre los posibles efectos en la salud, por el consumo de aditivos de color, se realizó una revisión documental de estudios toxicológicos, regulaciones y análisis químico. Se encontró en relación a riesgos asociados al consumo de los colorantes en el caso del Azul 1 (E133), la asociación a la producción de tumores en riñón y en Azul 2 (E132), una incidencia estadísticamente significativa de gliomas, en estudios realizados en animales. Se incluyó un reporte de valores de dosis de uso máximo y dosis de ingestión diaria, IDA, permitidos. La normativa que rige los valores de dosis de uso en la región es el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.54:10 que se encuentra desactualizada. En la propuesta de análisis para la determinación de los colorantes azules en las muestras ensayadas, se utilizó un método de cromatografía líquida de alta definición con detección de arreglo de diodos HPLC-DAD, mismo que se validó bajo parámetros de la Oficina Guatemalteca de acreditación OGA, evaluando la exactitud, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango. Los rangos de trabajo fueron de 1000 a 10 000 ng/mL para ambos azules. La muestra de REP presentó  $06.59 \pm 0.43$  mg, RE1  $12.34 \pm 0.45$  mg, RE2  $07.13 \pm 0.43$  mg de colorante Azul 1 (E133) y CON  $00.09 \pm 0.02$  mg de colorante Azul 2 (E132).

**PALABRAS CLAVE:** Azul 1 (E133), Azul 2 (E132), colorantes alimenticios, toxicología.

### Toxicological review and validation of analytical methodology for blue 1 and blue 2 in food dyes

**ABSTRACT:** Food dyes Blue 1 (E133) and Blue 2 (E132) have a high presence in products aimed for infants, they can be found in confectioneries, beverages and cereals. Due to the debate on the possible effects in health of food dyes consumption, a documented review of toxicological studies, regulations and analysis was performed. The findings in relation to the risks associated with the consumption of dyes in the case of Blue 1 (E133) the association with the production of kidney tumors and Blue 2 (E132) a statistically significant incidence of gliomas, in studies performed in animals. A report of maximum permitted dose values and daily intake dose permitted IDA was included.

The normative that regulates the dose usage values in the region Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.54:10 is outdated. In the proposal of analysis for the determination of the blue dyes samples, a method utilizing high performance liquid chromatography with detection of diode array HPLC-DAD was performed, that was validated under the parameters of the Oficina Guatemalteca de Acreditación OGA evaluating accuracy, repeatability, limit of detection, limit of quantification, linearity and range. The work ranges were between 1000 to 10 000ng/mL for the two blues. The sample REP obtain  $06.59 \pm 0.43$  mg, RE1  $12.34 \pm 0.45$  mg, RE2  $07.13 \pm 0.43$  mg of Blue 1 (E133) and CON  $00.09 \pm 0.02$  mg for Blue 2 (E132).

**KEYWORDS:** Blue 1 (E133), Blue 2 (E132), food dye, toxicology.

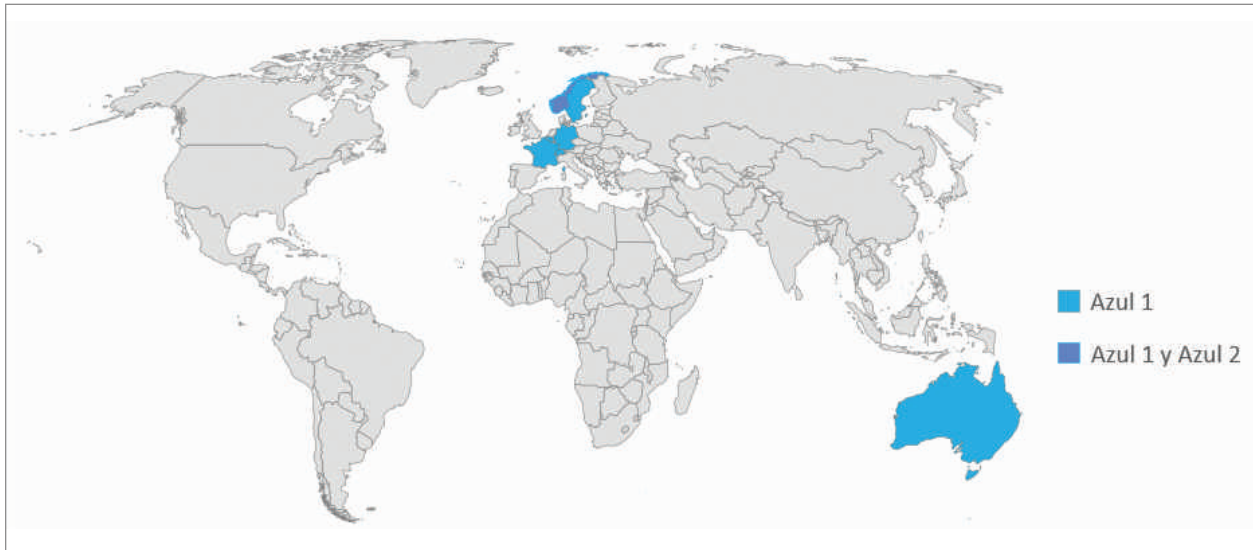


Figura 1. Países en donde se encuentra vetado el uso de colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132).

## Introducción

El color en los alimentos presenta un atractivo sensorial que puede ser determinante para la oportunidad de venta en productos alimenticios. La industria de alimentos tiene como práctica común la utilización de colorantes como aditivos, ya sean de origen natural o sintético, pues aportan consistencia en la presentación de los productos alimenticios y generan confianza en el consumidor (Griffiths, 2005).

Los productores tienden a inclinarse por el uso de colorantes sintéticos debido a que tienen un alto poder de tinción, consistencia en la intensidad del color, variedad en el espectro del color, son estables y de fácil aplicación. Estas características los hace convenientes en el almacenamiento del producto terminado y el hecho que los colorantes sintéticos son de bajo costo resulta mucho más ventajoso (Vlase et al. 2014).

Sin embargo, es de conocimiento que el consumo en exceso de los colorantes sintéticos puede tener efectos tóxicos por lo que se encuentran regulados. (Vlase et al. 2014).

Existen tres valores importantes que regulan la utilización de los aditivos de color que deben ser cumplidos por los productores y verificados por los entes reguladores. De acuerdo con la Norma General del Codex para los Aditivos Alimentarios, la *dosis de uso máxima (mg/Kg alimento)* es la cantidad de aditivo acordada como inocua. La norma indica que el valor de *ingestión diaria admisible (mg/kg peso corporal/día)*, es la cantidad que una persona puede ingerir diariamente durante toda la vida sin riesgo apreciable para su salud. En el uso técnico de las buenas prácticas de fabricación se utiliza la *dosis de uso óptima*, recomendada o normal, prevista para cada tipo de alimento.

La dosis de uso óptima tiende a no corresponder con la dosis de uso máxima, y se espera que la dosis de uso máxima no sea superada por el valor de 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), 2016).

Algunos estudios que han expuesto cierta alerta sobre el consumo de aditivos de color, son los relacionados a productos dirigidos a infantes ligados al trastorno de déficit de atención e hiperactividad ADHD, de acuerdo con Nigg y colaboradores, concluyen que merece la pena renovar la investigación del efecto en la dieta tanto para colorantes como aditivos (Nigg et al. 2012). El Centro para la Ciencia en el Interés Público opina que existe un posible vínculo entre colorantes alimenticios y el comportamiento en niños (Center for Science in the Public Interest, 2010). Estudios como el realizado por Soltan y Shehata en ratas expuestas a jugos de color, reporta que se observó un aumento de creatinina y albumina en sangre, un aumento de glóbulos blancos el cual puede relacionarse a un proceso inflamatorio, y disminución de la enzima antioxidante GSH (Soltan & Shehata, 2012).

Respecto al estudio de biología celular se resalta la posible interacción del colorante Azul 1 (E133) con la actividad del receptor endógeno azul brillante G. Wang et al. (2013) concluyen que el colorante Azul 1 inhibe la corriente del canal Panx1 que está relacionado a la liberación de ATP. Dixit y Goyal (2013) en su estudio enfocado a ratones expuestos a Azul 2 (E132), evaluó el peso corporal y peso de los órganos, en los que se encontró un aumento significativo. También observó la reducción de elementos espermatozoides y una reducción en la densidad de espermias (Dixit & Goyal, 2013).

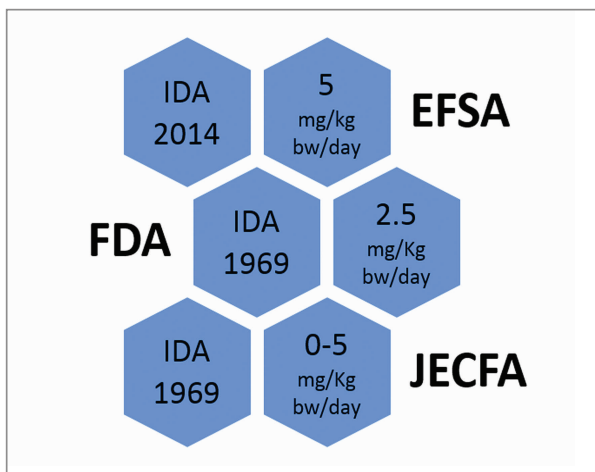


Figura 2. Valor de ingestión diaria permitido para Azul 1 (E133) según EFSA, FDA y JECFA.

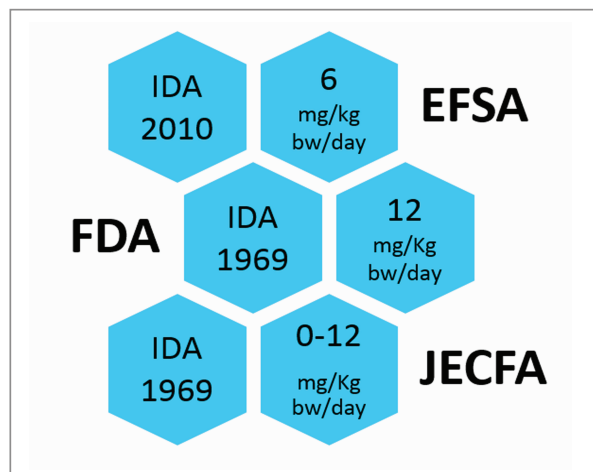


Figura 3. Valor de ingestión diaria permitido para Azul 2 (E132) según EFSA, FDA y JECFA.

Entre las normativas que tienen injerencia en el tema de aditivos de color, se encuentran Comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios JECFA, Codex alimentarius FAO/OMS, regionalmente se aplica la normativa del RTCA 67.04.54:10 Alimentos y Bebidas procesadas. Aditivos Alimentarios (MINECO, 2012).

A nivel internacional son referencia las directrices de la Autoridad de Seguridad Alimentaria Europea EFSA y la Agencia de Alimentos y Medicamentos FDA.

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). Debido a esto, el estudio fue enfocado a los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) evaluando documentos relacionados a su toxicidad, su condición en muestras alimenticias en el mercado guatemalteco mediante una propuesta de método para su análisis, y realizando una comparación con los valores en normativas para IDA y dosis de uso máximo.

## Materiales y métodos

### Revisión documental

Se realizó una revisión documental sobre temas de toxicidad, análisis y regulación de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132). Se consideraron en la revisión toxicológica estudios realizados entre los años 2006-2016 respecto a la evidencia de los posibles efectos asociados por consumo de Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) y las posturas de instituciones regulatorias.

### Validación de método

Las muestras se analizaron por la técnica de cromatografía líquida de alta definición HPLC con detector de arreglo de diodos DAD, y el método, se validó utilizando como referencia a Vlase et al. (2014). Las condiciones para la separación fueron fase reversa utilizando una columna C18, a temperatura ambiente y flujo de la fase móvil de 1ml/min. El volumen de inyección para la muestra fue de 20µl.

Cuadro 1. Dosis de uso máximo permitidos para Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) en los tipos de alimentos analizados como muestras de acuerdo a el Codex alimentarius, RTCA, y EFSA. EFSA no considera un valor para confiterías con Azul 2 (E132)

Tipo de alimento	Azul 1			Azul 2		
	Codex Alimentarius	RTCA	EFSA	Codex Alimentarius	RTCA	EFSA
<i>Bebidas saborizadas no alcohólicas</i>	NA	NA	100 mg/L	NA	NA	100 mg/L
<i>Bebidas a base de agua aromatizadas incluidas las bebidas para deportistas, bebidas energéticas y bebidas electrolíticas</i>	100 mg/Kg	150 mg/Kg	NA	100 mg/Kg	300 mg/Kg	NA
<i>Confiterías</i>	NA	NA	300 mg/Kg	NA	NA	NI
<i>Dulces incluidos caramelos duros y blandos</i>	300 mg/Kg	300 mg/Kg	NA	300 mg/Kg	450 mg/Kg	NA

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

Para la preparación de la curva de calibración se trabajó con soluciones entre 1000 a 10 000 ng/mL para ambos colorantes, evaluando los parámetros estipulados por la OGA: Exactitud, Repetibilidad, Límite de detección LOD, Límite de cuantificación LOQ, Linealidad y Rango.

## Análisis de muestras alimenticias

Las muestras analizadas corresponden a tres tipos de alimentos, refrescos en polvo REP, refrescos RE y confitería CON, trabajando con tres lotes distintos y analizadas en triplicado, excepto para confitería donde solo se trabajó con 2 lotes disponibles en el mercado.

La preparación de la muestra de REP corresponde a la disolución de 0.3125 g en 25ml de agua. En el caso del RE se tomaron 5ml de refresco diluidos en 10ml de agua, para la muestra CON se pesó 2 g disueltos en 25ml de agua desionizada. Se tomaron 2ml de las muestras la cuales fueron filtradas previamente a la inyección de 20µl en el HPLC.

## Resultados y discusión

### Revisión toxicológica

Como referencia a los valores de dosis de uso máximo permitidos para el tipo de alimento al que pertenecen las muestras alimenticias analizadas, que contienen los azules, se describen en el Cuadro 1, los miligramos de colorante autorizados en cada kilogramo de alimento según el Codex Alimentarius, el RTCA y EFSA.

La Figura 2 y Figura 3, reportan los valores vigentes de ingestión diaria permitida para ambos azules, por entes reguladores EFSA, FDA y JECFA que son referencia en temas de aditivos alimenticios.

En la Figura 4 se presenta un resumen de los documentos relevantes sobre la evidencia de posibles riesgos por el consumo de aditivos de color y algunos específicos para Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132). Además, se exponen las posturas de las instituciones EFSA y FDA sobre la toxicidad de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) como justificación en la permisión de su uso como aditivos alimenticios, y en contraste la opinión del Centro para la Ciencia en el interés Público.










Comportamiento	Inmunidad	Biología Celular	Reproducción	Toxicidad
 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Meta-analysis of attention deficit / hyperactivity disorder symptoms, restriction diet, and synthetic food color additives</li> <li>• Año de publicación 2012</li> <li>• Realizado para aditivos de color, investiga la posible relación con el trastorno de déficit de atención e hiperactividad ADHD</li> <li>• Concluyen que merece la pena renovar la investigación del efecto en la dieta tanto para colorantes como para aditivos</li> </ul>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• The effects of using color foods of children on immunity, properties and liver, kidney on rats</li> <li>• Año de publicación 2012</li> <li>• Realizado para aditivos de color, concluye que se observa incremento en creatinina y albúmina en sangre, así mismo una disminución de la enzima antioxidante GSH y un incremento de glóbulos blancos</li> </ul>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• The food dye FD&amp;C Blue No. 1 is a selective inhibitor of the ATP release channel Panx1</li> <li>• Año de publicación 2013</li> <li>• 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 la liberación de ATP</li> </ul>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluation of reproductive toxicity caused by Indigo Carmine on male swiss albino mice.</li> <li>• Año de publicación 2013.</li> <li>• Concluye que se observó un aumento significativo en peso corporal y de órganos y una reducción de elementos espermatozoides y en la densidad de espermias.</li> </ul>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Food dyes: A Rainbow of Risks</li> <li>• Año de publicación 2010</li> <li>• Recaba y analiza estudios sobre toxicidad de los aditivos de color.</li> <li>• Concluye para Azul 1 (E133) la necesidad de realizar estudios confirmatorios sobre cáncer debido a que investigaciones en animales sugieren la relación con tumores en riñón y efectos en células nerviosas. En el caso del Azul 2 concluye que existe una incidencia estadísticamente significativa de gliomas, en estudios realizados a animales</li> </ul>
 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Azul 1 ( E1339 y Azul 2 (E132) Aún no se encuentra documentado en las monografías de la Agencia Internacional para la investigación del Cancer.</li> </ul>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Food Advisory Committee.</li> <li>• Año de publicación 2011.</li> <li>• 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.</li> </ul>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Re-evaluation of Brilliant Blue FCF (E 133) as a food additive.</li> <li>• Año de publicación 2010.</li> <li>• Estudios de toxicidad subcrónica no presentan suficiente documentación para considerar la evaluación de riesgo. En estudios de toxicidad crónica demuestran que azul 1 (E133) no es carcinógeno.</li> </ul>	 <ul style="list-style-type: none"> <li>• Scientific Opinion on the re-evaluation of Indigo Carmine (E 132) as a food additive</li> <li>• Año de publicación 2014.</li> <li>• Según observaciones del panel de expertos el Azul 2 (E132) es pobremente absorbido lo que no aumenta la preocupación de efectos de genotoxicidad.</li> </ul>	

Figura 4. Resumen de la revisión toxicológica de estudios realizados entre los años 2006-2016, junto a la opinión de entes regulatorios FDA y EFSA

**Cuadro 2.** Resumen de resultados en la validación de la metodología analítica bajo parámetros de ICH. Nota: a. Criterios de aceptación tomados de OGA para exactitud y linealidad. B. RSD fue calculado con la función de la trompeta de Horwitz.

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

**Cuadro 3.** Concentración de colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) en muestras. Nota: REP refresco en polvo sobre de 0.025Kg, RE1 refresco 1 botella de 0.600 Kg, RE 2 refresco 2 botella de 0.612 Kg, CON confitería. bombón 15.9x10<sup>03</sup>Kg

Muestra	Colorante	Lotes	Concentración del colorante en mg ± Desv. Est/ presentación del producto
REP	Azul 1 (E133)	3	06.59 ± 0.43
RE1	Azul 1 (E133)	3	12.34 ± 0.45
RE2	Azul 1 (E133)	3	07.13 ± 0.43
CON	Azul 2 (E132)	2	00.09 ± 0.02

**Cuadro 4.** Dosis de uso máxima calculada de acuerdo a la masa de las muestras analizadas, permitidas por RTCA, Codex alimentarius, EFSA. La dosis de uso para CON no está indicada en EFSA por lo que no fue calculada, y el valor de \*REP está dada en mg del colorante/L

Muestra	Colorante	Codex alimentarius mg del colorante/Kg del producto	RTCA mg del colorante/Kg del producto	EFSA mg del colorante/Kg del producto
REP	Azul 1 (E133)	02.50	03.75	100*
RE1	Azul 1 (E133)	60.09	90.13	60.00
RE2	Azul 1 (E133)	61.28	91.93	61.00
CON	Azul 2 (E132)	04.78	07.16	NA

## Validación de método

El desempeño de los parámetros analíticos durante la validación del método para los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) se describen en el Cuadro 2. Se consideraron los parámetros típicos sugeridos por el International Council for Harmonisation ICH y tomando criterios de aceptación de la OGA, la cual se encuentra en armonización con ICH (Oficina de Acreditación OGA, 2007).

El criterio de aceptación del parámetro de repetibilidad se calculó con el porcentaje de desviación estándar relativa %RSD para cada concentración de estándar, aplicando la función de la trompeta de Horwitz. Fueron preparados cuatro estándares en

las concentraciones de 1000, 2500, 5000, 7500, 10 000 ng/ml. Esta función ha sido aplicada con base en varios métodos analíticos conducidos en el sector de análisis de alimentos (Burgess, 2000).

## Análisis de muestras alimenticias

Los resultados de la cuantificación de los colorantes en las muestras alimenticias se resumen en el Cuadro 3. Se observa la descripción de refrescos en polvo REP y dos tipos de refrescos de color R1 y R2 que corresponden a las muestras con presencia de colorante Azul 1 (E133). La muestra analizada con presencia de colorante Azul 2 (E132) fue de tipo confitura o dulce duro, analizándose únicamente dos lotes disponibles en el mercado.

El Cuadro 4 presenta la cantidad de colorante máximo a utilizar considerando la masa de la muestra, basándose en la dosis de uso permitida por RTCA, Codex alimentarius y EFSA. Este permite la comparación entre los resultados obtenidos en el Cuadro 3, notándose que la muestra de REP no cumple con RTCA y el Codex alimentarius.

Las dosis de uso máxima permitidas de Azul 1 (E133), expuestas en el Cuadro 4 fueron calculadas para la masa contenida en la presentación de la muestra analizada de REP, RE y CON. A continuación, se ejemplifica el cálculo para la muestra REP en la presentación de un sobre de 0.025 kg.

Dosis de uso máximo permitida en un sobre de REP de 0.025Kg, según Codex Alimentarius.

$$0.025\text{Kg REP} \times \left[ \frac{100\text{mg de colorante}}{\text{Kg}} \right] = 2.50 \text{ mg de colorante Azul 1 (E133) permitidos en un sobre de REP}$$

Dosis de uso máximo permitida en un sobre de REP de 0.025Kg, según RTCA.

$$0.025\text{Kg REP} \times \left[ \frac{150\text{mg de colorante}}{\text{Kg}} \right] = 3.75 \text{ mg de colorante Azul 1 (E133) permitidos en un sobre de REP}$$

Dosis de uso máximo permitida en un sobre de REP de 0.025Kg, según EFSA.

$$1 \text{ L REP} \times \left[ \frac{100\text{mg de colorante}}{\text{L}} \right] = 100 \text{ mg de colorante Azul 1 (E133) permitidos en un sobre de REP}$$

## Discusión

### Revisión toxicológica

En el documento desarrollado por el centro para la ciencia en el interés público, se concluye que el Azul 1 (E133) puede causar reacciones de hipersensibilidad y 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) opinan que este no se puede considerar del todo seguro, por la evidencia de ser estadísticamente significativo en el desarrollo de gliomas en ratas (Center for Science in the Public Interest, 2010).

Otro documento de opinión científica fue el de EFSA en la re-evaluación de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132), el cual presenta las conclusiones de varios estudios, tanto en animales como en humanos, concluyendo que el colorante Azul 1 (E133) no es carcinogénico o genotóxico en su re-evaluación del año 2010. En el caso del Azul 2 (E132) indican que no debe de ser de preocupación para genotoxicidad o carcinogenicidad re-evaluado en el 2014 (EFSA, 2014).

Por su lado FDA únicamente opina 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, considerando seguro el uso de colorantes basándose en los reportes y la permisión de la JECFA. (Food Advisory Committee FDA/CFSAN, 2011). Los estudios toxicológicos de JECFA corresponden al año 1969 para Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 1969).

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

### Validación de método

Considerando que los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) son de clasificación aditivos alimenticios, 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 OGA, utilizando sus criterios de aceptación en los parámetros de exactitud y linealidad. Esta política se encuentra en armonización con la norma ICH Q2(R1) y otras más, así que no existe conflicto en el fundamento (Oficina de Acreditación OGA, 2007).

El criterio de aceptación de la repetibilidad fue calculado determinando el porcentaje de desviación estándar relativa %RSD para cada estándar, de las dos curvas de calibración de los azules, aplicando la función de la trompeta de Horwitz. Las concentraciones de los estándares utilizados fueron 1000, 2500, 5000, 7500, 10 000 ng/ml.

Se trabajó con estándares secundarios durante la validación del método. Todos los estándares utilizados para los distintos propósitos en ambos azules fueron preparados cada día al igual que la fase móvil.

De acuerdo con la normativa ICH, no es necesario determinar la precisión intermedia cuando se ha realizado la repetibilidad, por lo que no se reporta (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 concentración de 15 ng/mL.

En el caso del límite de cuantificación en el colorante Azul 1 (E133) la concentración mínima cuantificable fue de 5 ng/mL y de 20 ng/mL para el Azul 2 (E132).

Se observó que el coeficiente de correlación  $R^2$  estaba arriba del 0.98% para todas las curvas de calibración. El parámetro de linealidad se trabajó inyectando la curva seis veces.

Una limitación del método propuesto es su aplicación para el análisis de muestras alimenticias con presencia de los dos azules.

Esto debido a que ambos absorben en la misma longitud y el tiempo de retención de uno de los picos del colorante Azul 2 (E132) (pico 1: 3.6 min, pico 2: 7.4 min) se encuentra cercano al tiempo de retención para el Azul 1 (E133) (pico 1: 7.3 minutos).

Luego de verificar la funcionalidad del método propuesto se procedió al análisis de muestras alimenticias tomando en cuenta que estas presentarían uno de los dos azules evaluados.

### Análisis de muestras alimenticias

Los resultados obtenidos en el análisis del REP en el Cuadro 3, 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 máxima permitida de Azul 1 (E133) calculada para el peso en un sobre de refresco (0.025 Kg), bajo la regulación del Codex de alimentos es de 2.50 mg de Azul 1 (E133), y bajo el reglamento local RTCA de 3.75 mg de Azul 1 (E133), reportados en el Cuadro 4. Por lo que el valor de  $6.59 \pm 0.43$  mg de colorante en un sobre, está arriba de lo permitido por estas normativas. En la evaluación del cumplimiento con la normativa de EFSA esta permite 100 mg de colorante en 1 litro, y suponiendo la preparación del refresco según las instrucciones del empaque (0.025Kg de producto en un litro), el valor de  $6.59 \pm 0.43$  mg cumple con la normativa.

La muestra RE1 obtuvo un valor de  $12.34 \pm 0.45$  mg de Azul 1 (E133) por botella, promedio de los tres lotes evaluados. El refresco RE1 cumple con las distintas regulaciones presentadas en el Cuadro 4 de dosis de uso máximo de Azul 1 (E133), considerando la masa de la muestra por botella. La muestra RE2 se reporta una concentración promedio de tres lotes, de  $7.13 \pm 0.43$  mg de Azul 1 (E133) por botella. La muestra RE2 también cumple con los valores tanto de dosis de uso máximos permitidos.

La concentración de Azul 2 (E132) encontrada en la muestra CON fue de  $0.09 \pm 0.02$  mg del colorante por dulce. Por lo que se concluye que la muestra cumple con la dosis de uso permitida.

En sincronía con la opinión de Burrows respecto a que los aditivos alimenticios no aportan un valor nutricional o terapéutico en la dieta, se cuestiona si es suficiente la justificación de su uso, basándose en la utilidad tecnológica, como reconstituidores del color de productos alimenticios. Y en el caso particular de los colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2 (E132) con mayor presencia en alimentos dirigidos a la población de infantes, volviéndolos más vulnerables a un posible riesgo de salud a largo plazo.

### Conclusiones

De acuerdo a la revisión toxicológica se expuso la falta de actualización en la normativa RTCA 67.04.54:10 Alimentos y Bebidas Procesadas, basada en los valores de dosis de uso máximo permitidos del Codex alimentarius del año 2005, siendo esta última actualizada anualmente. Además, se constató la inexistencia de una norma que contemple límites de ingestión diaria admisible. La validación de la metodología analítica, es una herramienta que se propone para el control de calidad de alimentos, que contienen colorantes Azul 1 (E133) y Azul 2

(E132), aplicable por la industria de alimentos y entes reguladores. Según las muestras analizadas el Refresco en polvo, no cumple con la dosis de uso máximo permitido por el RTCA, exponiendo a la población a posibles daños a la salud.

### Bibliografía

- Burgess, C. (2000). *Valid analytical methods and procedures*. Cambridge: Royal Society of chemistry.
- Burrows, A. (2009, Abril 22). Palette of our palates: A brief history of food coloring and its regulation. *Comprehensive Reviews in food science and food safety*, 8 (4), 394-408 .
- Center for Science in the Public Interest. (2010, Junio). *Center for Science in the Public Interest*. Washington, DC. Retrieved from CSPI: <https://cspinet.org/new/pdf/food-dyes-rainbow-of-risks.pdf>
- Codex General Standard for Food Additives (GSFA) Online Database. (2016). *Norma general para los aditivos alimentarios CODEX STAN 192-1995*. Retrieved Julio 7, 2017, from 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/>
- Dixit, A., & Goyal, R. (2013, Abril). Evaluation of Reproductive toxicity caused by Indigo Carmine on male swiss albino mice. *pharmacologyonline*, 1, 218-224.
- 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
- EFSA. (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
- Food Advisory Committee FDA/CFSAN. (2011, Marzo 30). Certified Color Additives in Food and Possible Association with. Retrieved 2016, from <https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMateria%20s/FoodAdvisoryCommittee/UCM248549.pdf>
- Griffiths, J. (2005, Mayo). Coloring Foods & Beverages. *Food Technology*, 59(5), 38-44.
- ICH International Council for Harmonisation. (2005). *Validation of analytical procedures text and methodology Q2 (R1)*. Retrieved from ICH harmonization for better health : [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. (1969, Junio 4). *Toxicological evaluation of some food colours, emulsifiers, stabilizers, anti-caking agents and certain others substances*. Retrieved from INCHEM: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v46aaje14.htm>
- MINECO. (2012). Reglamento técnico centroamericano 67.04.54:10. *Procedimiento de Nuevo Registro por reconocimiento centroamericano*. Guatemala, Guatemala, Guatemala.
- Nigg, J., Lewis, K., Edinger, T., & Falk, M. (2012, Enero). 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*, 51(1), 86-97.
- Oficina de Acreditación OGA. (2007). *OGA-GEC-016 Política de Selección y Validación de Métodos de Ensayo*.
- 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.
- Vachirapatama, N., Majaharansiri, 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.
- Vlase, L., Muntean, D., Cobzac, S., & Filip, L. (2014). Development and Validation of an HPLC-UV method for determination of synthetic food colorants. *Revue Roumaine de Chimie*, 59(9), 719-725.
- Wang, J., Jackson, D., & Dahl, G. (2013, Abril 15). 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.