

EVALUACIÓN GENOTÓXICA Y CITOTÓXICA DE DOS ADITIVOS
COLORANTES ALIMENTARIOS (TARTRAZINA Y DIÓXIDO DE TITANIO) EN
LINFOCITOS HUMANOS

Durlei Andrea Calderón Villamizar

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para obtener el título de
BIÓLOGA

Programa de Biología
Facultad de Ciencias Básicas
Universidad de Pamplona
Pamplona
2024

EVALUACIÓN GENOTÓXICA Y CITOTÓXICA DE DOS ADITIVOS
COLORANTES ALIMENTARIOS (TARTRAZINA Y DIÓXIDO DE TITANIO) EN
LINFOCITOS HUMANOS

Durlei Andrea Calderón Villamizar

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito para obtener el título de
BIÓLOGA

Director: MSc. Luis Fabián Yáñez Urbina

Grupo de Investigación en Biología Molecular y Genética (BIOMOGEN)

Programa de Biología

Facultad de Ciencias Básicas

Universidad de Pamplona

Pamplona

2024

*A mi abuela,
por regalarme su amor, su sabiduría
y ser un apoyo incondicional.
A Camilo, a Britney y a mi sobrina Isel,
por brindarme
su apoyo, amor, comprensión y ternura*

Agradecimientos

Agradezco sinceramente a mis tutores, Fabian Yáñez y Yanis Espinosa, por compartir sus conocimientos, asesorarme y guiarme en este trayecto. La realización de esta tesis no hubiera sido posible sin su experiencia y colaboración.

Expreso mi gratitud a todo el equipo de los laboratorios BIOMOGEN y CEDIMOL por poner a nuestra disposición las instalaciones, materiales y equipos, y por su disposición constante para brindar ayuda en todo momento. Su colaboración permitió realizar de manera eficiente las actividades pertinentes para culminar este proyecto. Quiero reconocer a la profesora Lizeth Bolívar por su acompañamiento, disposición y por facilitarnos algunos reactivos.

A mis compañeros y profesores por brindarme sus conocimientos en cada etapa de mi formación académica. Especialmente, a mis compañeras de laboratorio, Maritza y Betty, por sus ideas, comentarios e intercambio de conocimientos, los cuales enriquecieron mi experiencia académica y fueron una motivación constante.

A mis amigos, Kevin, Jeniffer y Yessica, por su comprensión, apoyo incondicional, consejos y motivación constante en los momentos de dificultad. A Camilo, le estoy profundamente agradecida por su asesoría y acompañamiento en la realización de los análisis estadísticos, su apoyo constante, su disposición para escucharme y su capacidad para motivarme en los momentos más difíciles.

Finalmente, quiero expresar mi profundo agradecimiento a mis padres, Stella y Arturo, por su paciencia y constante apoyo. Sin su respaldo, no hubiera sido posible llegar hasta aquí.

A cada una de las personas que me acompañó en esta fase de mi vida, agradezco las vivencias y experiencias compartidas.

DURLEI ANDREA CALDERÓN VILLAMIZAR

Título académico	Identificación	Correo electrónico	Teléfono	Institución	Grupo de Investigación
Estudiante de pregrado	1094281432	durleyandrea12@gmail.com	3017518427	Universidad de Pamplona	BIOMOGEN

LUIS FABIÁN YÁÑEZ URBINA

Título académico	Identificación	Correo electrónico	Teléfono	Institución	Grupo de Investigación
Biólogo, Msc.	1094243797	luisfa888@hotmail.com	3177376892	Universidad de Pamplona	BIOMOGEN

YANIS RICARDO ESPINOSA SILVA

Título académico	Identificación	Correo electrónico	Teléfono	Institución	Grupo de Investigación
Biólogo, PhD.	13279449	yanis.espinosa@unipamplona.edu.co	3229051748	Universidad de Pamplona	BIOMOGEN

Información general del proyecto

Línea de Investigación: Mutagénesis y genotoxicidad	
Lugar de ejecución del proyecto: Universidad de Pamplona	
Duración del proyecto (en meses): 6 meses	
Valor total del proyecto:	\$12.801.300 (en pesos)
Área: Mutagénesis y Biología molecular	
Línea estratégica: Mutagénesis y genotoxicidad	
Descriptores/Palabras claves: Citotoxicidad, genotoxicidad, linfocitos humanos, colorantes alimentarios.	
Universidad de Pamplona, Pamplona marzo de 2024	

Índice

	Pág.
Resumen.....	14
Capítulo I.....	16
Título.....	16
<i>Introducción</i>	16
<i>Justificación</i>	18
<i>Pregunta de investigación</i>	19
<i>Objetivos</i>	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Específicos.....	20
Capítulo II.....	21
Marco Teórico.....	21
<i>Generalidades</i>	21
<i>Tartrazina</i>	23
<i>Dióxido de titanio</i>	24
<i>Antecedentes y usos de los colorantes</i>	25
<i>Citotoxicidad</i>	30
<i>Métodos para determinar Citotoxicidad</i>	30
Captación al Rojo Neutro.....	30
Ensayo de Reducción del Bromuro (MTT).....	31
Ensayo Azul de Kenacid.....	32
Ensayo Azul de Tripano.....	32

Cámara Neubauer y conteo celular	32
<i>Genotoxicidad</i>	34
<i>Métodos para determinar Genotoxicidad</i>	35
Test de Ames	35
Ensayo Cometa	36
Prueba de Micronúcleos	37
 Capítulo III	 38
Diseño metodológico	38
<i>Obtención y preparación de los extractos</i>	38
<i>Extracción de linfocitos</i>	38
<i>Evaluación de citotoxicidad con exclusión de azul de tripano</i>	38
<i>Identificación del daño en el ADN mediante el Ensayo Cometa</i>	39
Tartrazina	39
Dióxido de Titanio	40
Jugo comercial 1	40
Jugo comercial 2	40
<i>Preparación de soluciones de trabajo</i>	41
<i>Procesamiento y análisis de datos</i>	43
 Capítulo IV	 45
Presentación e interpretación de resultados	45
Resultados	45
<i>Evaluación de citotoxicidad con exclusión de azul de tripano</i>	45
<i>Identificación del daño en el ADN mediante el Ensayo Cometa</i>	48

Tartrazina	49
Dióxido de titanio	53
Jugo 1	57
Jugo 2	61
Correlaciones	65
Nivel de daño	66
Discusión.....	67
Conclusiones	75
Recomendaciones.....	76
Referencias	77
Anexos	88

Índice de figuras

<i>Figura 1. Estructura del grupo azo y dos ejemplos de colorantes que contienen el grupo azo en su estructura.</i>	<i>15</i>
<i>Figura 2. Estructura química y color de la Tartrazina</i>	<i>21</i>
<i>Figura 3. Hemocitómetro y procedimiento general para recuento celular.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 4. Porcentaje de viabilidad celular en linfocitos antes y después del tratamiento con las diferentes concentraciones de la tartrazina.....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 5. Porcentaje de viabilidad celular en linfocitos antes y después del tratamiento con las diferentes concentraciones del TiO₂.....</i>	<i>46</i>
<i>Figura 6. Genotoxicidad del colorante tartrazina para las concentraciones de 3µg, 5µg y 7µg (Longitud del Cometa)</i>	<i>47</i>
<i>Figura 7. Genotoxicidad del colorante tartrazina para las concentraciones de 3µg, 5µg y 7µg (Porcentaje de ADN en cabeza).....</i>	<i>49</i>
<i>Figura 8. Genotoxicidad del colorante tartrazina para las concentraciones de 3µg, 5µg y 7µg (Porcentaje de ADN en cola).....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 9. Genotoxicidad del colorante TiO₂ para las concentraciones de 100µg, 200µg y 300µg (Longitud del cometa).....</i>	<i>5</i>
<i>Figura 10. Genotoxicidad del colorante TiO₂ para las concentraciones de 100µg, 200µg y 300µg (Porcentaje de ADN en cabeza).....</i>	<i>53</i>
<i>Figura 11. Genotoxicidad del colorante TiO₂ para las concentraciones de 100µg, 200µg y 300µg (Porcentaje de ADN en cola).....</i>	<i>54</i>

<i>Figura 12. Genotoxicidad del jugo 1, para las concentraciones de 100µg, 200µg y 300µg (Longitud del cometa).....</i>	<i>56</i>
<i>Figura 13. Genotoxicidad del jugo 1, para las concentraciones de 100µg, 200µg y 300µg (Porcentaje de ADN en cabeza).....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 14. Genotoxicidad del jugo 1, para las concentraciones de 100%, 50% y 25% (Porcentaje de ADN en cola).....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 15. Genotoxicidad del jugo 2, para las concentraciones de 100%, 50% y 25% (Longitud del cometa).....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 16. Genotoxicidad del jugo 2, para las concentraciones de 100%, 50% y 25% (Porcentaje de ADN en cabeza).....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 17. Genotoxicidad del jugo 2, para las concentraciones de 100%, 50% y 25% (Porcentaje de ADN en cola).....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 18. Matriz de correlación de Pearson de las variables: Longitud del cometa, % de ADN en cabeza y % de ADN en cola</i>	<i>64</i>
<i>Figura 19. Imágenes del daño inducido por los tratamientos en linfocitos humanos.....</i>	<i>65</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Porcentaje de viabilidad de los linfocitos antes y después de cada tratamiento</i>	<i>45</i>
<i>Tabla 2. Promedio del daño inducido en el ADN de los linfocitos por diferentes concentraciones de Tartrazina, juntos con el control negativo (PBS) y el control positivo (H₂O₂ al 5mg/ml)</i>	<i>87</i>
<i>Tabla 3. Promedio del daño inducido en el ADN de los linfocitos por diferentes concentraciones de TiO₂, junto con el control negativo (PBS) y el control positivo (H₂O₂ al 5mg/ml)</i>	<i>87</i>
<i>Tabla 4. Promedio del daño inducido en el ADN de los linfocitos por diferentes concentraciones de jugo 1, junto con el control negativo (PBS) y el control positivo (H₂O₂ al 5mg/ml).....</i>	<i>88</i>
<i>Tabla 5. Promedio del daño inducido en el ADN de los linfocitos por diferentes concentraciones de jugo 2, junto con el control negativo (PBS) y el control positivo (H₂O₂ al 5mg/ml).....</i>	<i>88</i>
<i>Tabla 6. Prueba de Shapiro-Wilk para el tratamiento tartrazina y los controles positivo y negativo en las variables: Longitud del cometa, % de ADN en cabeza y % de ADN en cola</i>	<i>89</i>
<i>Tabla 7. Comparación del daño en los linfocitos humanos, de las diferentes concentraciones de Tartrazina con respecto a los controles</i>	<i>90</i>
<i>Tabla 8. Prueba de Shapiro-Wilk para el tratamiento TiO₂ y los controles positivo y negativo en las variables: Longitud del cometa, % de ADN en cabeza y % de ADN en cola.....</i>	<i>92</i>
<i>Tabla 9. Comparación del daño en linfocitos humanos, de las diferentes concentraciones de TiO₂, respecto al control negativo y el control positivo (Prueba de Turkey).....</i>	<i>93</i>
<i>Tabla 10. Prueba de Shapiro-Wilk para el jugo 1 y los controles positivo y negativo en las variables: Longitud del cometa, % de ADN en cabeza y % de ADN en cola</i>	<i>94</i>

<i>Tabla 11. Comparación del daño en los linfocitos humanos, de las diferentes concentraciones de jugo 1, con respecto a los controles (Prueba de Mann-Whitney U)</i>	<i>95</i>
<i>Tabla 12. Prueba de Shapiro-Wilk para el jugo 2 y los controles positivo y negativo en las variables: Longitud del cometa, % de ADN en cabeza y % de ADN en cola</i>	<i>96</i>
<i>Tabla 13. Comparación del daño en los linfocitos humanos, de las diferentes concentraciones del jugo 2, con respecto a los controles</i>	<i>98</i>

Resumen

Los colorantes alimentarios, como la Tartrazina ($C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$) y el Dióxido de titanio (TiO_2), son aditivos utilizados para dar color a los alimentos. Estos colorantes son controvertidos debido a sus posibles efectos perjudiciales para la salud, y sus efectos secundarios no se han estudiado adecuadamente. Se evaluaron los efectos citotóxicos y genotóxicos de estos colorantes en linfocitos humanos, en tres concentraciones: $3\mu g$, $5\mu g$ y $7\mu g$ para la Tartrazina, y $100\mu g$, $200\mu g$ y $300\mu g$ para el TiO_2 . Los análisis se realizaron mediante el ensayo cometa y el ensayo de exclusión de viabilidad celular con azul de tripán. Los resultados mostraron que ambos colorantes inducen daño significativo en el ADN de los linfocitos humanos, con una relación dosis-respuesta. Las concentraciones de $200\mu g$ de TiO_2 y $7\mu g$ de Tartrazina causaron mayor daño en el ADN, con un aumento significativo en la longitud de la cola de $180\mu m$ y $101\mu m$, respectivamente, en comparación con el control negativo ($73\mu m$). Además, se evaluaron dos jugos comerciales que contienen estos colorantes. Los jugos 1 y 2 mostraron incrementos en la longitud de la cola del cometa de $192\mu m$ y $272\mu m$, respectivamente, en sus concentraciones más altas (100%). Se observó una sinergia entre los ingredientes de los jugos, aumentando el daño en comparación con los controles y los colorantes por separado. Estos hallazgos destacan la necesidad de realizar estudios adicionales sobre los efectos a largo plazo de estos colorantes en la salud humana.

Palabras Clave: Tartrazina, dióxido de titanio, genotoxicidad, ensayo cometa

Abstract

Food colorants, such as tartrazine ($C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$) and titanium dioxide (TiO_2), are additives used to color foods. These colorants are controversial because of their possible detrimental effects on health, and their side effects have not been adequately studied. The cytotoxic and genotoxic effects of these dyes were evaluated in human lymphocytes at three concentrations: $3\mu g$, $5\mu g$ and $7\mu g$ for Tartrazine, and $100\mu g$, $200\mu g$ and $300\mu g$ for TiO_2 . Analyses were performed by comet assay and trypan blue cell viability exclusion assay. The results showed that both dyes induced significant DNA damage in human lymphocytes, with a dose-response relationship. Concentrations of $200\mu g$ TiO_2 and $7\mu g$ Tartrazine caused more DNA damage, with a significant increase in tail length of $180\mu m$ and $101\mu m$, respectively, compared to the negative control ($73\mu m$). In addition, two commercial juices containing these dyes were evaluated. Juices 1 and 2 showed increases in comet tail length of $192\mu m$ and $272\mu m$, respectively, at their highest concentrations (100%). Synergy was observed between the ingredients of the juices, increasing damage compared to controls and dyes separately. These findings highlight the need for further studies on the long-term effects of these dyes on human health.

Keywords: tartrazine, titanium dioxide, genotoxicity, comet test

Capítulo I

Título

Evaluación genotóxica y citotóxica de dos aditivos colorantes alimentarios (Tartrazina y Dióxido de Titanio) en linfocitos humanos.

Introducción

El color es un atributo fundamental al elegir un alimento o producto, ya que puede indicar el posible sabor y la calidad del producto, teniendo relevancia en el ámbito industrial, económico y cultural (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014). Debido a esto, en la industria alimentaria, se utilizan colorantes que realzan, recuperan o confieren color a los alimentos durante su procesamiento y/o después de su almacenamiento (Vega-Cabanillas et al., 2021).

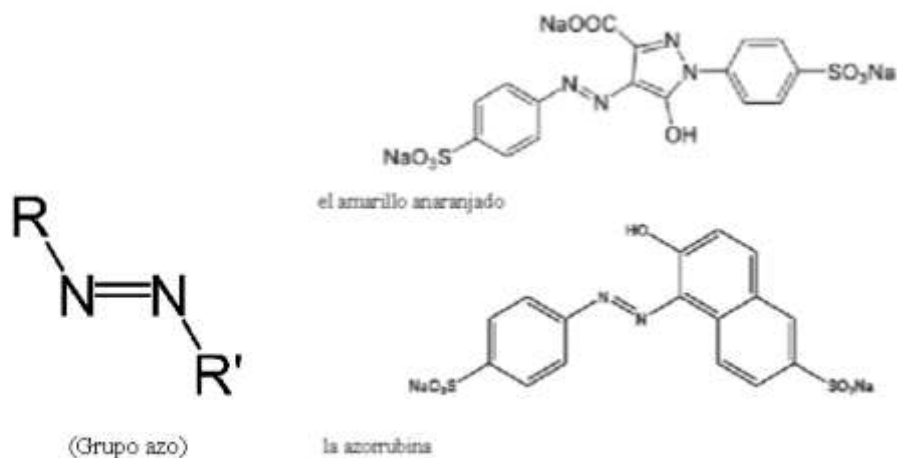
Principalmente constituidos por compuestos orgánicos, estos pigmentos pueden ser de origen natural o sintético, contribuyendo así a mejorar la apariencia estética de los productos alimenticios (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014).

Los colorantes pueden dividirse en dos grupos: colorantes artificiales y naturales. Los colorantes artificiales se clasifican en dos tipos: azoicos y no azoicos; los primeros son los de mayor variedad, debido a que en su estructura aromática se encuentra el grupo azo- (ver Figura 1), de modo que es posible obtener una amplia variedad de colores, dentro de estos se encuentra la tartrazina (Hidalgo Olmedo, 2022).

Los colorantes sintéticos se caracterizan porque son producidos a través de procesos químicos y no existen por sí solos en la naturaleza, además, presentar mayor estabilidad, dan un tono más uniforme e intenso con poca cantidad, se mezclan fácilmente y no confieren sabor a los alimentos, son poco absorbidos por el intestino y descartados a través de las vías urinarias o biliares (Parra, 2004).

Figura 1

Estructura del grupo azo y dos ejemplos de colorantes que contienen el grupo azo en su estructura.



Nota: Tomado de: Colorantes azoicos, por: (Gallegos, 2023), Studocu.

Por otro lado, los colorantes naturales son derivados o extraídos de plantas, hongos, líquenes, animales, o algunos minerales, estos no presentan tantas limitaciones en cuanto a su uso, aunque sí, un mayor costo de producción (Hidalgo Olmedo, 2022). Dentro de sus desventajas se destaca que confieren sabor, muchas veces indeseado, a los alimentos; menor nivel de pureza, por consiguiente, se necesita una mayor cantidad de producto para lograr un tono uniforme, son de uso específico (Parra, 2004).

También existen los colorantes inorgánicos, son compuestos de origen mineral que se extraen de manera natural o por procesos químicos, dentro de estos se encuentra el Dióxido de titanio (TiO_2) (Ministerio de Salud, 1985).

La venta de colorantes azoicos a nivel mundial es de 31%, mientras que de otro tipo como las antraquinonas representa un 22%, esto se debe a que los colorantes azoicos tienen

menor costo y con ellos se puede generar cualquier color (Belmonte et al., 2016). Sin embargo, se ha observado que la ingesta prolongada de estos aditivos puede generar consecuencias negativas en la salud, a tal grado que muchos colorantes sintéticos han sido prohibidos por “la Unión Europea (UE) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)” (Belmonte et al., 2016; Parra, 2004).

Justificación

Los colorantes alimentarios son sustancias usadas como aditivo para potenciar, recuperar o dar color a los alimentos durante y después de su almacenamiento (Vega-Cabanillas et al., 2021). Actúan como un recubrimiento que protege sustancias fotosensibles como algunas vitaminas de la luz solar (Medina Arias, 2016). Estos se pueden dividir en naturales y sintéticos, siendo los colorantes sintéticos mayormente usados, debido a que presentan mayor durabilidad y resistencia a la pérdida de color, además de un bajo costo (Hidalgo Olmedo, 2022).

Debido a su uso generalizado, las consecuencias negativas en la salud de los consumidores son desconocidos o muchas veces ignorados pese a la normatividad existente para controlar su consumo y distribución; ya que, hay variaciones entre un país y otro, de modo que los colorantes permitidos en un país pueden presentar restricciones en otros (Arroyave Rojas et al., 2008; Ibañez et al., 2003).

Sin embargo, algunos de estos han sido clasificados como altamente tóxicos, ya que pueden generar afectaciones en la salud como la tartrazina, e incluso causando aberraciones cromosómicas, como es el caso del TiO_2 ; los cuáles siguen siendo ampliamente utilizados en países como Japón, Estados Unidos y algunos de Latinoamérica; mientras que han sido prohibidos en países como Noruega y Austria (Vega-Cabanillas et al., 2021; C. Vergara et al., 2022) .

En Colombia, el uso de estos colorantes se encuentra aprobado mediante en la Resolución 10593 de 1985 Ministerio de Salud (1985), la cual establece que, para el caso de la tartrazina, la dosis máxima permitida es de 100mg/Kg y en el caso de ser usado, debe declararse en negrita en la etiqueta del producto. Mientras que para el TiO_2 se establece que la cantidad utilizada no debe exceder la mínima requerida para lograr el propósito que se precisa (Ministerio de Salud, 1985).

En este sentido, se ha generado un creciente interés por parte de la comunidad científica a realizar investigaciones que evalúen los efectos genotóxicos y citotóxicos para la salud (Restrepo, 2007), ya que estos colorantes se encuentran en una amplia variedad de alimentos, productos cosméticos y farmacéuticos, de tal modo que los consumidores se enfrentan a varias vías de exposición (Cargnoni & Fonovich, 2015).

Pregunta de investigación

En Colombia, el uso de los colorantes alimentarios es permitido y se encuentra regulado por la Resolución número 10593 de 1985, en la que se especifica la cantidad máxima que puede ser adicionada a un producto para consumo humano (Ministerio de Salud, 1985), sin embargo, la investigación sobre los efectos de estos colorantes en la salud es limitada o está desactualizada. Dado lo anterior es preciso preguntar: ¿Los aditivos colorantes alimentarios Tartrazina y TiO_2 , actualmente permitidos en el país, tienen efectos secundarios que generan genotoxicidad y citotoxicidad sobre los linfocitos humanos?

Objetivos

Objetivo General.

Determinar el efecto citotóxico y genotóxico de la Tartrazina y el Dióxido de titanio en linfocitos humanos.

Objetivos Específicos

Determinar la actividad citotóxica inducida por los colorantes Tartrazina y Dióxido de titanio bajo diferentes concentraciones sobre linfocitos humanos.

Determinar la actividad genotóxica inducida por los colorantes Tartrazina y Dióxido de titanio sobre linfocitos humanos bajo diferentes concentraciones.

Determinar la medida más adecuada para cuantificar el daño genotóxico mediante el ensayo cometa.

Capítulo II

Marco Teórico

La resolución 10593 del 16 de julio de 1985 emitida por el Ministerio de Salud, define a los colorantes como compuestos o mezcla de compuestos que tienen la capacidad de conferir o intensificar el color de los alimentos (Ministerio de Salud, 1985). Estas sustancias se adhieren a otras para proporcionarles coloraciones estables frente a factores físicos y químicos, al mismo tiempo que resaltan o restauran los colores originales de los alimentos, haciéndolos visualmente más atractivos (Juan, 2013; Orozco-Cerros et al., 2010).

Generalidades

Un colorante se encuentra formado por dos grupos químicos, los cuales son: el cromóforo que es el encargado de dar el color; y el auxocromo que le facilita la fijación a la superficie (Ayala et al., 2018). Su uso no se limita solamente a la industria alimentaria, sino que también se extiende a otras industrias como la cosmética y la textil (Juan, 2013). Dentro de la amplia gama de colorantes existentes, pueden ser categorizados en dos principales grupos según su procedencia o fuente de extracción, de este modo, hay colorantes naturales y sintéticos; asimismo, los colorantes sintéticos fueron desarrollados al finalizar el siglo XIX reemplazando casi en totalidad a los naturales (Ayala et al., 2018), siendo de estos los de mayor uso son nitrados, azoicos, índigos, azufrados, fosforados y de antraquinona (Orozco-Cerros et al., 2010). Otra forma de clasificarlos es teniendo en cuenta criterios tales como la solubilidad en agua y habilidad de cobertura, siendo la segunda una de las más usadas (Ayala et al., 2018).

Entre los colorantes sintéticos es posible distinguir dos grupos: colorantes azoicos y no azoicos, para el caso de los azoicos el color proviene del grupo azo $-N=N-$, el cual está conjugado con anillos aromáticos en ambos extremos como se muestra en la Figura 1. Estos

fueron descubiertos a partir de la década de 1950, con la característica de poseer tintes luminosos, inicialmente se utilizaron en la industria textil, pero más tarde también en la industria alimentaria. Fueron muy apetecidos ya que otorgaban un aspecto más agradable a los alimentos, sin embargo, también permitía que se vendieran alimentos en mal estado, engañando a los compradores (Juan, 2013).

A causa de esto, en la actualidad, la utilización de colorantes está sujeta a regulaciones a nivel global por parte de la (FAO), la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y la Comunidad Económica Europea (CEE). Estas entidades son responsables de establecer los catálogos de aditivos colorantes alimentarios autorizados, los cuales están etiquetados según la UE con la letra E seguida de un código numérico de 3 o 4 dígitos para su identificación, función y nomenclatura química, facilitando así su comercio internacional; el primer dígito indica la función del aditivo, como, por ejemplo, (E1) para colorantes (Juan, 2013; Restrepo, 2007)

Del mismo modo, su uso en los alimentos debe estar señalado en la etiqueta del producto según normatividad; es importante resaltar estas sustancias cuentan con un valor de Ingesta Diaria Aceptada (IDA), de este modo se indica la dosis diaria tolerable para una persona, es decir, la cantidad diaria permitida para evitar algún perjuicio a la salud, estas cantidades están expresadas en miligramos (mg) por kilogramo (kg) de peso corporal al día (Juan, 2013). Sin embargo, para el caso de los lactantes, la legislación es más estricta debido a que presentan una capacidad débil de desintoxicación.

Dentro de los colorantes sintéticos azoicos se encuentra la Tartrazina (E102).

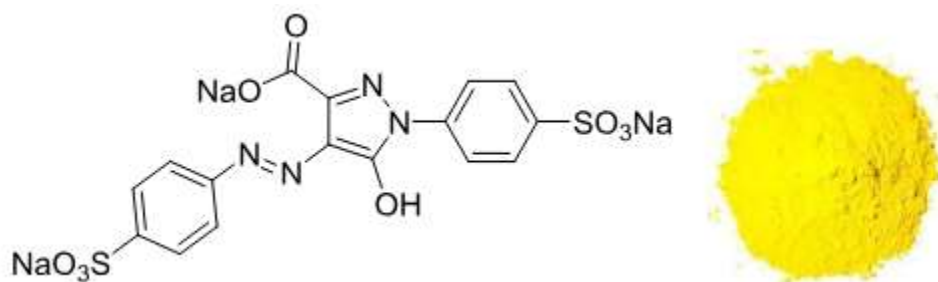
Tartrazina

El colorante tartrazina, también conocido como E-102, es la sal trisódica de una sustancia con una compleja estructura química que aporta un tono amarillo a una amplia gama de productos alimenticios, incluyendo postres, snacks, cereales, salsas y bebidas energéticas y deportivas, y está disponible para compra por parte del consumidor general (Villaño et al., 2015).

Su composición molecular se representa como $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$, con una masa molar de 534,4 g/mol. Este colorante pertenece a los azoicos, los cuales se caracterizan por la presencia de grupos azo en anillos aromáticos como se observa en la Figura 1 y 2. Presenta una forma de polvo brillante, inodoro, higroscópico, se disuelve en agua y presenta poca solubilidad en alcohol. Aunque es de color amarillo brillante, en medios alcalinos puede tornarse rojizo. “La ingesta diaria admisible es de 7,5 mg/kg de peso corporal” (Restrepo, 2007).

Figura 2

Estructura química y color de la Tartrazina



Nota: Tomado de: Colorantes artificiales en alimentos (p. 30), por: (Belmonte et al., 2016), Revista Naturaleza y Tecnología.

Se han observado posibles efectos adversos asociados a su consumo, tales como: “aberraciones cromosómicas en mamíferos, formación de micronúcleos en células sanguíneas

humanas, potencial mutagénico en cultivos de células del estómago humano” y se ha documentado carcinogenicidad en estudios con roedores (Vega-Cabanillas et al., 2021).

Dióxido de titanio

El dióxido de titanio, E-171, con la fórmula molecular TiO_2 y un peso molecular de 79,866 g/mol, es un metal que se encuentra de forma impura en minas y arena (Gutiérrez Antezana & Lizárraga Hurtado, 2016). No se especifica un valor de IDA, sino que, se establece que debe usarse solo en la cantidad necesaria para lograr el efecto deseado. Naturalmente, el titanio se une al oxígeno para generar compuestos conocidos como óxidos de titanio, siendo el TiO_2 el pigmento más comúnmente utilizado, representando más del 98% de la producción total (American Chemistry Council, 2024).

Una de las características principales de este pigmento es su excelente capacidad para dispersar la luz, lo que lo hace ideal para aplicaciones que necesitan tanto brillo como opacidad blanca. Aunque insoluble en agua, es soluble en glicerina natural, ácido sulfúrico (H_2SO_4) y ácido fluorhídrico (HF). Se emplea ampliamente en diversas áreas como pinturas, tratamiento de aguas residuales, cosméticos, aditivos alimentarios, protectores solares, cerámica biomédica y biomateriales para implantes, y como fotocatalizadores (Márquez-Ramírez et al., 2012).

Se ha observado que estos colorantes pueden afectar la barrera hematoencefálica mediante diferentes vías de administración, incluidas la intravenosa, intraperitoneal o intracerebral, aunque los efectos a nivel celular son poco conocidos (Márquez-Ramírez et al., 2012).

Algunos colorantes, como el TiO_2 , el carbonato de calcio (CaCO_3) y los óxidos de hierro, son aceptados por la UE, pero no por la FDA, mientras que otros, como el gluconato ferroso

($C_{12}H_{24}FeO_{14}$) y el lactato ferroso ($C_6H_{10}FeO_6$), son aceptados por la FDA, pero no por la UE. Sin embargo, ambas organizaciones permiten ciertos colorantes azoicos bajo regulaciones que establecen concentraciones permitidas y patrones de consumo (Villaño et al., 2015).

Debido a que los colorantes azoicos son metabolizados por la microflora intestinal o las enzimas hepáticas mediante escisión hepática, pueden provocar estrés oxidativo y formación de radicales libres, lo que puede afectar órganos como el hígado y el sistema urinario (Ayala et al., 2018).

Según informes del Centro para la Ciencia en el Interés Público (CSPI), estos colorantes pueden ser cancerígenos, causar reacciones de hipersensibilidad y problemas de conducta, o no haber sido adecuadamente probados (Potera, 2010). Esto se debe a que, por ejemplo, los estudios genotóxicos y citotóxicos se realizan en ratones hasta el segundo año de vida, y los efectos cancerígenos no se manifiestan hasta el tercer año, coincidiendo con la edad en la que suelen aparecer en humanos. Además, se emplea un número reducido de animales en estos estudios, lo que limita la capacidad de detectar efectos genotóxicos. Esta situación es preocupante debido a que estos compuestos están presentes en una amplia gama de productos destinados al consumo humano, desde cereales y bebidas hasta vitaminas y otros productos dirigidos especialmente a niños (Potera, 2010).

Antecedentes y usos de los colorantes

Según Fonovich et al. (2015), se ha encontrado que los colorantes Tartrazina y TiO_2 son extensamente utilizados en cosmética, farmacéutica, alimentos y productos de higiene personal, lo que resultaría en una doble exposición y, dado que, no solo resaltan el color de los productos mejorando su estética, sino que también contribuyen con la estabilización de formulaciones, en

muchos casos son determinantes al momento de adquirir un producto. De modo que, aunque las concentraciones a las que se encuentran estos productos pueden ser bajas, el consumo diario y prolongado de estos colorantes, a través de diferentes productos puede estar relacionado con irritaciones, alergias, alteraciones en órganos específicos, cáncer.

Tartrazina

En un estudio realizado en la Universidad Nacional de Trujillo por Ulloa et al. (2015), los autores observaron que al exponer “células meristemáticas de *Allium cepa* a diferentes concentraciones de tartrazina (0 mg/mL, 0.1 mg/mL, 1mg/mL y 5mg/mL)”, se produce una reducción del índice mitótico junto con una actividad antiproliferativa de las células, concluyendo que la Tartrazina causa efectos citotóxicos sobre las células meristemáticas de la cebolla.

Soares et al. (2015) realizaron ensayos citotóxicos en cultivos celulares y determinaron que no produce citotoxicidad en ninguna concentración probada (0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0 y 32.0mM). Sin embargo, sí indujo genotoxicidad en todas las concentraciones al unirse fuertemente al ADN de doble cadena y causar su degradación, desencadenando trastornos celulares, como inestabilidad genética, mutaciones y muerte celular. En síntesis, el uso indiscriminado de la tartrazina puede causar carcinogénesis en las células del epitelio gastrointestinal, debido a la acumulación de errores en el ADN.

Khayyat et al. (2017), trataron ratas albinas Wistar macho adultas con una solución de tartrazina (7,5 mg/kg p.v.) vía oral por 30 días, para estudiar los efectos del colorante en linfocitos y células del hígado y riñón. Se evidenció distorsión de la arquitectura hepática (núcleos necróticos y vacuolización citoplasmática, degeneración de la estructura glomerular y la

pérdida de la integridad de los túbulos renales), además, el ensayo cometa evidenció genotoxicidad en leucocitos; concluyendo que el uso de tartrazina debe ser regulado debido a los efectos adversos que causa a la salud.

Elwan & Ibrahim (2019), analizaron el efecto de este colorante sobre las células de la mucosa gástrica en ratas albinas por vía oral y observaron en los cortes histológicos que se produjo daño severo en la estructura de la mucosa gástrica y un déficit de permeabilidad posterior, del mismo modo, inflamación en vasos sanguíneos dilatados y congestionados como mecanismo subyacente de la lesión gástrica.

Pacheco (2018), evaluó el efecto citotóxico de la tartrazina en bebidas cítricas utilizando ensayos de viabilidad y concluyó que, después de 24 horas de exposición ocurre una disminución de la viabilidad celular en función del aumento de la concentración de tartrazina.

Silva (2020), realizó ensayos multigeneracionales para determinar la ecotoxicología del colorante tartrazina en diferentes concentraciones y encontró que al estudiar el comportamiento reproductivo, las condiciones de supervivencia y la “capacidad de recuperación biológica” de los organismos, este colorante produjo alteraciones metabólicas y bioquímicas, afectó la viabilidad y producción de huevos y embriones, asimismo, provocó deformaciones morfológicas impactando significativamente su ciclo de vida y su desarrollo y reproducción incluso en diferentes generaciones; por ello, al ser liberado sin tratamiento alguno a los cuerpos hídricos puede causar ecotoxicidad en la biota de dichos ecosistemas.

Según Vega-Cabanillas et al. (2021), al tratar las muestras de linfocitos con tres concentraciones de tartrazina (“0,75, 7,5 y 75,0 mg/kg pc”) se observó una inducción de micronúcleos significativa, lo cual evidencia genotoxicidad, concluyendo que la tartrazina causa

lesiones en el ADN medidos por la formación de micronúcleos, incluso en dosis reglamentadas dentro de la IDA (“de 0 a 10 mg/kg pc”).

Dióxido de titanio

El TiO_2 es uno de los tintes más utilizados en el mercado, con varias aplicaciones como material tecnológico, destacando su utilidad en la generación de nanopartículas en fotocatalizadores, células solares, sensores de gas y baterías, también como material energético y en el tratamiento de aguas contaminadas y efluentes (Cuoto, 2015).

Siqueira (2016), encontró que al exponer células humanas a concentraciones altas de TiO_2 (100 $\mu\text{g/ml}$) se forman grandes aglomerados impidiendo su asimilación por las células, de modo que estas no se ven afectadas por el pigmento, esto puede dar como resultado un falso positivo o negativo para estudios de toxicidad; mientras que en concentraciones bajas (25 $\mu\text{g/ml}$) hay fragmentación significativa del ADN y formación de micronúcleos.

Melo (2016), analizó los efectos de las nanopartículas de TiO_2 en plantas de soya y encontró que estas pueden ser absorbidas, transportadas y acumuladas en diferentes órganos de la planta, afectando los procesos fisiológicos incluyendo las etapas de crecimiento y desarrollo, del mismo modo, alteran el metabolismo antioxidante de las plantas.

En una revisión publicada en el 2018, se encontró que las nanopartículas de TiO_2 generan una acción pro-inflamatoria en las células orales, asimismo, en ensayos de citotoxicidad se ha encontrado que en dosis específicas la viabilidad celular presenta una disminución significativa, por tal motivo se sugiere realizar estudios in vivo (Argueta-Figueroa et al., 2018).

Al-Doaiss et al. (2019), observó que la exposición aguda a material nanoparticulado de este pigmento causa alteraciones histológicas renales en ratas albinas Wistar (*Rattus norvegicus*)

expuestas a diferentes concentraciones, dichas alteraciones pueden ser: alteraciones y congestiones glomerulares, congestión de vasos sanguíneos, inflamación y fibrosis.

Garcia-Diosa & Camargo-Amado (2021), describen las diversas aplicaciones del TiO_2 en terapia fotodinámica como fotosensibilizador, debido a las ventajas que presenta (“alta actividad fotocatalítica, absorción de radiación y biocompatibilidad”), asimismo, se encontró que presenta efectos citotóxicos sobre células cancerosas a los 20 minutos de exposición y muerte celular cuando hay más de 20 minutos de exposición.

Amaral (2021), encontró que estas nanopartículas y el pigmento causan daño en el ADN de *Dendropsophus minutus* incluso en concentraciones bajas, esto debido a su potencial oxidativo y su capacidad para causar alteraciones genéticas; estos cambios genotóxicos afectan el estado físico y la supervivencia de individuo, llegando incluso a causar desequilibrio ecológico.

Cobo López-Páez (2022), describe tres líneas de exposición al pigmento: inhalación, ingestión y penetración cutánea, de modo que puede causar lesiones tisulares fácilmente, asimismo, en estado de embarazo, las nanopartículas del colorante pueden atravesar la placenta y causar disfunción placentaria y neurotoxicidad fetal que conlleva a enfermedades neuro-comportamentales.

Denti et al. (2022), detalla el uso de este pigmento en semiconductores para mejorar procesos de fotocatálisis heterogéneas en el tratamiento de efluentes con colorantes, debido a las ventajas en costos, toxicidad y eficiencia respecto a otros semiconductores; asimismo, también presenta estabilidad por largos periodos, excelente actividad fotocatalítica y alta fotoreactividad.

Citotoxicidad

Se describe como un posible cambio en las funciones celulares que causa afectación y daño, causado por compuestos químicos o xenobióticos (Arencibia et al., 2009). Estas afectaciones se deben a que se produce una interferencia en los procesos y mecanismos celulares, ya sea estructural, funcional y/o en la división celular; asimismo, la definición de citotoxicidad puede cambiar de acuerdo al interés de la investigación a realizar, ya sea que las células mueran o que se modifique su metabolismo (Arencibia et al., 2009; Gallegos-Hernandez, 2018).

Puede ser detectado y medido por medio de diferentes técnicas *in vitro*, principalmente de colorimetría; las cuáles se fundamentan en la viabilidad y/o la proliferación celular, teniendo en cuenta la relación dosis-respuesta, en la cual se espera que al aumentar la dosis sea mayor el número de individuos afectados por la misma (Gallegos-Hernandez, 2018).

Métodos para determinar Citotoxicidad

Dentro de los métodos más comunes para medir citotoxicidad *in vitro* encontramos: Captación del Rojo Neutro, Ensayo Azul de Tripano, Ensayo de Reducción del Bromuro (MTT) y Ensayo Azul de Kenacid. Estas pruebas se caracterizan por ser simples, rápidas, eficientes, confiables y económicas (Gallegos-Hernandez, 2018). Pueden detectar efectos adversos en la estructura, la proliferación, funciones y supervivencia celular mediante diferentes mecanismos celulares (Ávalos-Soto et al., 2014).

Captación al Rojo Neutro

Está fundamentado en la pérdida del pigmento rojo neutro debido a la reducción de la viabilidad celular, permite detectar daño a corto y largo plazo, debido a que los compuestos citotóxicos causan interferencia en la división celular y por tanto, será visible como una disminución en el cultivo en la cantidad de células (Arencibia et al., 2009).

El colorante entra a los lisosomas y endosomas por difusión pasiva, de modo que, únicamente las células vivas pueden retener el colorante, así, al medir la cantidad de colorante retenido es posible estimar el número de células viables. La pérdida de colorante es medida por medio de espectrofotometría con lecturas de absorbancia de 540nm (Gallegos-Hernandez, 2018).

Para los controles negativos, se asume que no hay salida del colorante. Para calcular el porcentaje (%) de inhibición del crecimiento se utiliza la Ecuación 1.

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \left(\frac{D.O. (t)}{D.O. (c)} * 100 \right) \quad (1)$$

Donde:

D.O. (t) = Densidad óptica del cultivo después de la exposición a los tratamientos.

D.O (c) = Densidad óptica del cultivo control (no debe haber salida de Rojo Neutro).

Es importante realizar ensayos de control de medio, de solvente y control positivo, de modo que al analizar los resultados se puedan comparar con el control de medio (Arencibia et al., 2009).

Ensayo de Reducción del Bromuro (MTT)

Mide cambios y alteraciones en la actividad mitocondrial, usando el reactivo de tetrazolio bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el cual se reduce de amarillo a azul por la actividad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, es decir, hay una reducción del reactivo bromuro a formazán que es liberado por solubilización del cultivo; esta actividad representa la viabilidad de la mitocondrias y por tanto de las células vivas, la cantidad de células viables va a ser “proporcional a la cantidad de formazán producido” (Arencibia et al., 2009; Gallegos-Hernandez, 2018). Para calcular el porcentaje (%) de las células viables se utiliza la Ecuación 2 (Arencibia et al., 2009).

$$\% \text{ Células viables} = \frac{D.O \text{ células tratadas}}{D.O \text{ células control}} * 100 \quad (2)$$

Donde:

D.O = Densidad óptica

Ensayo Azul de Kenacid

Determina la proliferación celular al estimar la proteína celular total, las células son expuestas entre 72hr y 24hr al compuesto a evaluar, pasado ese tiempo, se retira el compuesto y se agrega el colorante azul de kenacid, este es absorbido y retenido al enlazarse a las proteínas celulares, así, al cuantificar la cantidad de colorante retenido, con una absorbancia de 577nm, es posible determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento. Para calcular el porcentaje (%) de inhibición del crecimiento se utiliza la Ecuación 1 (Arencibia et al., 2009).

Ensayo Azul de Tripano

Toma en cuenta el contenido celular que al verse afectado por agentes citotóxicos causa apoptosis, por tanto, las células apoptóticas absorben y retienen el colorante azul de tripano, por el contrario, las células vivas no. Para contabilizar y medir el daño se utiliza un hemocitómetro o cámara de Neubauer y se observa al microscopio, mezclando el mismo volumen de células tratadas con la solución de azul de tripano (0.4%) (Gallegos-Hernandez, 2018), la cuantificación de la proliferación celular se hace en porcentaje (%) de células viables como se muestra en la Ecuación 3 (Strober, 2001).

$$\% \text{ Células viables} = \frac{\text{Número total de células viables por ml de alícuota}}{\text{Número total de células por ml de alícuota}} * 100 \quad (3)$$

Cámara Neubauer y conteo celular

El conteo celular, es uno de los métodos más usados debido a la eficiencia en la obtención de los resultados y a que es un ensayo económico, depende de varios factores como el estado estructural y funcional de las células, fases de desarrollo y factores ambientales a las que han sido expuestas las células. Una de las técnicas más usada por la rapidez, reproducibilidad de

resultados y el bajo costo es la cámara de Neubauer o hemocitómetro (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007).

Es un portaobjetos especial que permite realizar conteo celular, mide aproximadamente 3mm x 3mm y 0.25mm entre cada línea de la rejilla (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007; Gallego & Pérez, 2021), en el centro se encuentra una placa cuadrada grabada en láser, cuenta con dos bandas de conteo con 4 cuadrantes y 16 cuadrados cada uno, se usa para el conteo de organismo de un tamaño menor a 25 μ (Cornejo, 2023).

De acuerdo a la investigación que se quiera realizar, el conteo se realiza tanto en el cuadrado grande como en los de las esquinas, por ejemplo, cuando se realiza recuento de linfocitos, se cuentan los cuadrantes de las esquinas como se observa en la Figura 2; mientras que el cuadro central es empleado en el recuento de glóbulos rojos y plaquetas; es importante tener en cuenta en cada cuadrante: las células viables, células no viables y células totales (Gallego & Pérez, 2021; Standard Operating Procedures, 2013).

Los cálculos para el recuento celular, si se tomaron los cuadrantes de las esquinas, se realizan con la Ecuación 3 (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007).

$$C = \frac{\text{Número de células viables}}{\text{Número de cuadrantes}} * D * Fc \quad (4)$$

Donde

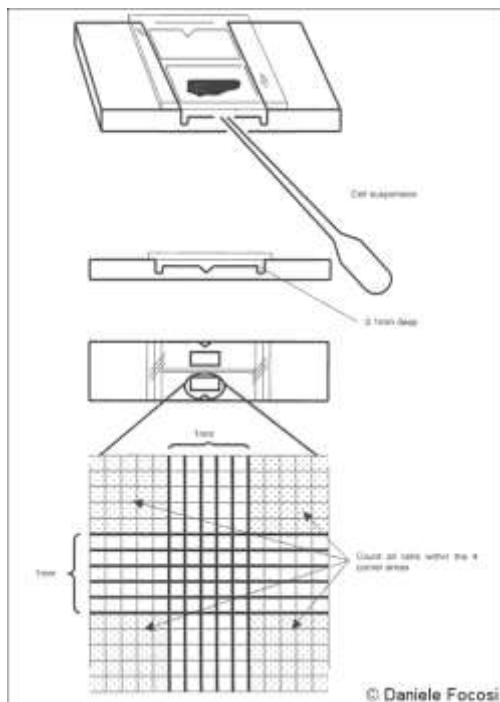
C: concentración celular cel/mL

D: factor de dilución, dado por la fórmula: (D: Vf / Vi) (Vf: volumen final, Vi: volumen inicial)

Fc: factor de conversión de 0.1 μ L a 1 mL = 10⁴

Figura 3

Hemocitómetro y procedimiento general para recuento celular



Nota: Tomado de: Counting chambers under light microscopy, por (Focosi, 2014), Cell Cultures (https://www.ufrgs.br/imunovet/molecular_immunology/cellculture.html)

Genotoxicidad

Hace referencia las lesiones o daño al material genético causado por agentes físicos o químicos, ya sea rompimientos, entrecruzamientos, defectos, errores o cualquier tipo de modificación en el ADN que desencadene una afectación en las funciones normales o incluso la muerte celular, de modo que se manifiestan en la reproducción celular, los tejidos y el individuo (Ruiz de Arcaute et al., 2021; Vergara, 2010).

Causan modificaciones o lesiones en las bases del ADN y la estructura genética, que pueden ser reversibles o irreparables, como las mutaciones y las aberraciones cromosómicas, de modo que, los agentes genotóxicos pueden ser: mutagénicos (mutaciones en el material

hereditario), carcinógenos (pueden causar cáncer) y teratogénicos (anomalías anatómicas y/o funcionales durante el desarrollo embrionario) (Ruiz de Arcaute et al., 2021).

Métodos para determinar Genotoxicidad

Existen diferentes métodos para medir genotoxicidad, de acuerdo al tipo de daño o modificación en el ADN que pueden identificar, dentro de estos encontramos: Test de Ames, Ensayo Cometa y Prueba de Micronúcleos (MNs) (Bailon-Moscoso & Romero-Benavides, 2016).

Debido al tipo de daño, se pueden describir 4 grados de valoración del daño: Nivel primario o molecular, localiza alteraciones específicas en el ADN, para lo cual se hacen ensayos en organismos procariotas (Test de Ames); Nivel secundario o celular, evalúa daño en líneas celulares empleando cultivos celulares (Ensayo MNs); Nivel terciario u orgánico, daño por exposición accidental u ocupacional en plantas, animales y humanos; Nivel cuaternario o epidemiológico, genotoxicidad en poblaciones expuestas (Ruiz de Arcaute et al., 2021).

Test de Ames

Permite detectar sustituciones, deleciones o inserciones en los pares de bases en organismos procariotas, fue desarrollado por Bruce Ames y colaboradores en 1970 (Ames et al., 1973).

Permite evaluar la mutagenicidad de un compuesto químico o fármaco, usando cepas de “*Salmonella typhimurium*” que presentan cambios en la secuencia de varios genes del operón de la histidina, de modo que tienen una deficiencia en la síntesis del aminoácido histidina, y que debido al tratamiento inducido presentan una reversión His⁺ (Pélissier et al., 1996). Estas cepas se conocen como auxótrofas, es decir, incapaces de sintetizar un nutriente, posteriormente, sufren

reversión a un estado protótrofo (sin requerimientos nutricionales), a estas células se les conoce como revertantes (Tejs, 2008).

Para evaluar un compuesto, la cepa bacteriana se hace crecer en un cultivo con el compuesto a estudiar y trazas de histidina, dado que la histidina se agota después de varias generaciones, la cepa dejará de crecer, a menos que haya sufrido una reversión que le permita sintetizar histidina y que le permita seguir creciendo hasta formar colonias visibles, indicando así un resultado positivo. De este modo, cuantos más revertantes se observen en las proximidades de la sustancia ensayada, con respecto a los controles experimentales, mayor será la mutagenicidad del compuesto (Pélissier et al., 1996; Tejs, 2008)

Ensayo Cometa

Desarrollado por Rydberg & Johanson (1978), quienes fueron los primeros en medir el daño celular en el ADN utilizando electroforesis alcalina, al lisar las células e incrustarlas en gel de agarosa, para posteriormente teñirlas con naranja de acridina, que al ser observado en microscopio permite cuantificar el daño, midiendo la proporción de la fluorescencia verde.

Posteriormente, fue modificada por Ostling & Johanson (1984), los cuales utilizaron microgel de agarosa para identificar lesiones en el ADN en células individuales tratadas y lisadas con detergentes, para posteriormente, ser sometidas a electroforesis neutra y a tinción con bromuro de etidio ($C_{21}H_{20}BrN_3$), esto les permitió observar roturas solo en ADN de doble hélice.

Singh et al. (1988), modificaron y presentaron la técnica con una electroforesis alcalina ($pH > 13$), se conoce como “single cell gel electrophoresis (SCGE) technique” o “Comet assay”, este detecta daño en una sola cadena de ADN y sitios de reparación retardada, por lo que se considera más sensible; en este ensayo, las células son introducidas en gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMA), para luego ser lisadas con detergente y un alto contenido de sal ($pH 10$),

seguidamente son sometidas a una electroforesis alcalina donde el ADN comienza a desenrollarse en los sitios de rotura de la cadena, posteriormente, son teñidas con bromuro de etidio y se cuantifica el desplazamiento del ADN, de modo que a mayor daño, mayor será la migración de este hacia el ánodo, observándose como una cola de cometa, mientras que la “cabeza” va a constituir el material genético intacto (Rojas et al., 1999; Singh et al., 1988).

Ha sido usada en diferentes estudios tanto ambientales como para evaluar productos químicos, entre sus ventajas destacan su alta sensibilidad, rapidez, bajo costo y su sencillez, se puede aplicar en sangre total o diferentes tipos de células sanguíneas por separado; para obtener buenos resultados es importante tener control de diferentes factores durante el procedimiento como: la agarosa, pH de las diferentes soluciones, temperatura, tiempo de lisis y electroforesis, voltaje y amperaje (Vergara, 2010).

Prueba de Micronúcleos

Permite evaluar daño clastogénico o Aneugénico a nivel cromosómico, ya sea *in vivo* o *in vitro* en diferentes tipos de células. Fue desarrollado por Evans et al. (1959), donde se evalúa el daño en el ADN debido a que las lesiones causan un desprendimiento del material genético, el cual forma micronúcleos que pueden ser observados con ayuda de un microscopio.

Se dice que hay daño clastogénico cuando hay formación de fragmentos cromosómicos acéntricos, durante la mitosis, por otro lado, el daño aneugénico es cuando ocurre daño en el aparato mitótico que impide la migración de las cromátidas o el cromosoma en la anafase-telofase de la mitosis (Ruiz de Arcaute et al., 2021).

Para su observación las células son teñidas con Giemsa, es fundamental considerar los criterios de selección de las células para el conteo, se ha establecido que las células deben estar intactas incluyendo las membranas celulares y nucleares, no deben haber más de 6 micronúcleos

por célula, estos deben ser uniformes en cuanto a la condensación de la cromatina, el tamaño, patrón de tinción y la forma, y, ninguno debe estar en apoptosis (Zalacain et al., 2005).

Capítulo III

Diseño metodológico

Obtención y preparación de los extractos

La solución de trabajo de tartrazina se realizó mezclando 0,0012g de tartrazina con 10ml de agua destilada.

La solución de trabajo de TiO_2 se realizó mezclando 0,1g con 10ml ácido sulfúrico al 96% caliente, se tomó 1ml de solución y se diluyó en 10ml de agua destilada, el pH se ajustó a 6,67 con NaOH.

Extracción de linfocitos

Para los ensayos citotóxicos y genotóxicos, se emplearon linfocitos de sangre periférica, extraídos por venopunción de una persona joven y sana, entre 20 y 30 años, que no consume alcohol, no fuma, no usa drogas y no ha tenido enfermedades infecciosas recientes. Para aislar los linfocitos de sangre total, se usó el método de centrifugación sobre un gradiente de densidad con solución lisis de glóbulos rojos. Luego, se aplicó el ensayo de citotoxicidad mediante la técnica de exclusión con azul de tripano (0.4%), y se determinó el porcentaje de viabilidad celular antes de cada tratamiento, para evidenciar el posible daño.

Evaluación de citotoxicidad con exclusión de azul de tripano

Tanto para la tartrazina como para el TiO_2 , se siguió el ensayo propuesto por (Strober, 2001) con algunos cambios:

Se evaluó la viabilidad antes y después de cada tratamiento. Se trataron 80.000 linfocitos con tres (3) concentraciones de los colorantes tartrazina (7µg, 5µg y 3µg) y TiO₂ (100µg, 200µg y 300µg), para los controles negativos se usó PBS, cada ensayo se realizó por duplicado, los tratamientos se incubaron a 37°C durante una hora. Posteriormente, se tomaron 50µL de células tratadas y se depositaron en un tubo Eppendorf, se agregó 50µL de azul tripano 0.4%, se esperó a que actuara el colorante entre 5-10 minutos, se tomaron 20 µL y se depositaron en un hemocitómetro para realizar el conteo en un microscopio óptico binocular. Finalmente, se determinó el porcentaje de viabilidad celular y el número total de células con las Ecuación 3 y la Ecuación 4 respectivamente. Para la viabilidad celular, los datos se presentan como el valor medio obtenido y el error estándar de la media.

Identificación del daño en el ADN mediante el Ensayo Cometa

Para detectar lesiones o la ruptura del ADN, se empleó el ensayo cometa en microgel de agarosa o electroforesis alcalina de células individuales (SCGE). Para esto se usó la técnica propuesta por (Singh et al., 1988) y modificada por (Pandurangi et al., 1995).

Tartrazina

Se trataron aproximadamente de 40.000 linfocitos con tres concentraciones (7µg, 5µg y 3µg) de tartrazina, se llevaron a incubar durante 1 hora a 37°C, seguidamente se tomaron 25µL de suspensión celular y se resuspendió en 75µL de LMA (Sigma) 0,5% a 37°C; se depositó sobre un portaobjetos previamente revestido con de agarosa de punto de fusión normal (NMA) (Sigma) al 1%. Se realizaron 2 placas por cada concentración.

Dióxido de Titanio

Se trataron aproximadamente de 40.000 linfocitos con tres concentraciones (100µg, 200µg y 300µg) de TiO₂, se llevaron a incubar durante 1 hora a 37°C, seguidamente se tomaron 25µL de suspensión celular y se resuspendió en 75µL de LMA (Sigma) 0,5% a 37°C; se depositó sobre un portaobjetos previamente revestido con de agarosa de punto de fusión normal (NMA) (Sigma) al 1%. Se realizaron 2 placas por cada concentración.

También se realizaron pruebas genotóxicas a 2 alimentos que contienen los colorantes tartrazina y TiO₂:

Jugo comercial 1

Se preparó el jugo diluyendo en agua destilada como indica la etiqueta. Se trataron aproximadamente de 40.000 linfocitos con tres concentraciones (100%, 50% y 25%) del jugo, se llevaron a incubar durante 1 hora a 37°C, seguidamente se tomaron 25µL de suspensión celular y se resuspendió en 75µL de LMA (Sigma) 0,5% a 37°C; se depositó sobre un portaobjetos previamente revestido con de agarosa de punto de fusión normal (NMA) (Sigma) al 1%. Se realizaron 2 placas por cada concentración.

Jugo comercial 2

Se trataron aproximadamente de 40.000 linfocitos con tres concentraciones (100%, 50% y 25%) del jugo, se llevaron a incubar durante 1 hora a 37°C, seguidamente se tomaron 25µL de suspensión celular y se resuspendió en 75µL de LMA (Sigma) 0,5% a 37°C; se depositó sobre un portaobjetos previamente revestido con de agarosa de punto de fusión normal (NMA) (Sigma) al 1%. Se realizaron 2 placas por cada concentración.

Los portaobjetos se cubrieron con un cubreobjetos y se llevaron a refrigeración a 4°C por aproximadamente 6 minutos. Seguidamente, se retiró el cubreobjetos para adicionar una segunda capa de LMA, nuevamente se cubrió con el cubreobjetos para refrigerar a 4°C por otros 8 minutos. Una vez solidificadas las placas, se sumergieron en una cubeta de tinción con solución lisis, durante una 1h, luego, las placas se lavaron con PBS y se depositaron en una cámara de electroforesis horizontal con buffer de electroforesis con pH>13, se dejó incubar por 20 minutos a 4°C, posteriormente, se corrió la electroforesis a 25V y 300mA durante 30 minutos.

Después de la electroforesis, las placas se lavaron con buffer neutralizante de pH 7.5, para luego ser teñidas con 50µl de Bromuro de etidio (0.02mg/mL). Las placas que no se observaron el mismo día se deshidrataron sumergiéndose en metanol durante 5 minutos y se almacenaron hasta su posterior observación en la nevera en cámara húmeda.

Las placas fueron observadas en un microscopio de fluorescencia (Olympus Cx41) con filtro de 515-560nm y un filtro de barrera de 590 nm. Para cada tratamiento se realizaron 2 placas y en cada una se contaron aproximadamente 100 células. En los controles negativos se utilizó PBS, siendo este el solvente en el que se diluyeron las muestras. Para evaluar la ocurrencia de daño en el ADN se usó del software (Tritek Comet Score TM freeware v1.5), y se tuvieron en cuenta las siguientes mediciones: longitud total del cometa, %DNA en cabeza, y %DNA en cola.

Preparación de soluciones de trabajo

PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+}

Se pesaron 4g de Cloruro de Sodio (NaCl), 0.1g de Cloruro de Potasio (KCl), 0.1g de Fosfato de potasio (KH_2PO_4), y 0.61g de Fosfato de Sodio (Na_2HPO_4); se disolvieron en ese mismo orden en 500ml de agua destilada.

Solución lisis stock

Se pesaron 29.22g de Cloruro de sodio (NaCl) al 2.5M, 7.44g de EDTA al 100mM y 0.24g de Tris y se diluyeron en 100ml de agua destilada, luego se agregó 2.4g de lentejas de NaOH y 2g de Lauril sarcosianato de sodio, se agitó hasta disolver, se agregaron 100ml más de agua destilada para un volumen final de 200ml y se ajustó el pH a 10.

Para la solución lisis de trabajo (cont), se tomaron 89ml de solución stock, se agregó 10ml de Dimetilsulfóxido (DMSO) y 1ml de Tritón X-100, para un volumen final de 100ml.

Buffer Neutralizante

Se pesaron 4.844g de Tris, se disolvieron en agua destilada hasta completar un volumen final de 100ml. Se ajustó pH a 7.5

Buffer de electroforesis

Primeramente, se prepararon dos soluciones: NaOH al 10N (40g para 100ml de agua destilada) y EDTA a 200mM (7.445g para 100ml de agua destilada).

Posteriormente, se tomaron 30ml de NaOH al 10N y 5ml de EDTA a 200mM, se mezclaron con agua destilada con ayuda de un agitador magnético, hasta completar un volumen final de 1000ml, se ajustó el pH a 13

Colorante – Bromuro de Etidio

Se hizo una solución stock disolviendo 10mg de Bromuro de etidio en 50ml de agua destilada, para obtener una concentración de 0.2mg/ml.

Para la solución de trabajo se tomó 1ml de solución stock y se mezcló con 9ml de agua destilada, con una concentración final de 0.02mg/ml. Se guardó en un recipiente hermético y oscuro.

Agarosa de punto de fusión normal (NMA)

Se pesaron 0.3g de NMA y se adicionaron en 30ml de PBS, se llevó a una plancha de calentamiento, hasta que se disolvió uniformemente con ayuda de un agitador magnético.

Agarosa de bajo punto de fusión (LMA)

Se mezcló 0.05g de LMA en 10ml de PBS, se disolvió en plancha de calentamiento con ayuda de un agitador magnético.

Procesamiento y análisis de datos

Para determinar la genotoxicidad de las diferentes concentraciones de los colorantes y los jugos que los contienen, primeramente, se realizó una prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos.

Para los datos que presentan una distribución normal, se realizó un ANOVA de un factor, con las variables dependientes: Longitud del cometa, % de ADN en cabeza y % de ADN en cola. El factor son los colorantes con las tres diferentes concentraciones: Tartrazina (3µg, 5µg y 7µg), TiO₂ (100µg, 200µg y 300µg), Jugo 1 (25%, 50% y 100%), Jugo 2 (25%, 50% y 100%), el control negativo PBS y el control positivo H₂O₂ (5mg/ml). Seguidamente, se realizó una prueba

Turkey para verificar las diferencias significativas de cada una de las concentraciones con respecto a los controles.

Para los datos que no siguen distribución normal, se realizó una prueba primeramente una prueba Kruskal-Wallis para determinar si hay diferencias significativas entre los grupos, seguidamente se realizó una prueba no paramétrica Mann-Whitney que permite comparar la mediana de las concentraciones con los controles, sin tener en cuenta su distribución. Para estos análisis se usaron los softwares Python y Excel, se fijó un nivel de significancia de 5% y un nivel de confianza de 95%.

El nivel del daño en el ADN se determinó siguiendo la clasificación propuesta por (Anderson et al., 1994) que los clasifica por el nivel de daño que presenta el cometa, así: ninguno (0-5% de daño en el ADN), bajo (5-10%), medio (10-40%), alto (40-95%) y total (95-100%).

Capítulo IV

Presentación e interpretación de resultados

En primer lugar, se presentan los resultados del ensayo de citotoxicidad por medio de exclusión con el colorante azul de tripano al 0.4% como se observa en la Tabla 1, la viabilidad se evaluó antes y después del tratamiento en cada uno de los colorantes utilizados.

Posteriormente, se presentan los resultados en tablas y gráficas de los análisis estadísticos del ensayo cometa o electroforesis alcalina de células individuales, de cada uno de los tratamientos y los alimentos que contienen los colorantes.

Resultados

Evaluación de citotoxicidad con exclusión de azul de tripano

El ensayo de exclusión con el colorante azul de tripano se basa en la selectividad de la membrana en células intactas, la cual no permite la entrada de este colorante y, por tanto, permanecen incoloras o refringentes, mientras que las células que presentan daño o células muertas se tiñen de azul, ya que, el colorante penetra fácilmente la membrana (Schuster et al., 2014). Para observar y cuantificar el daño en los linfocitos ocasionado por los colorantes tartrazina y TiO_2 , se midió la viabilidad antes de cada tratamiento y se tuvo en cuenta que fuera igual o superior al 90%. En la Tabla 1 se presentan los porcentajes de viabilidad celular antes y después de cada tratamiento, juntos con los porcentajes para los correspondientes controles negativos.

Tabla 1

Porcentaje de viabilidad de los linfocitos antes y después de cada tratamiento

Colorantes y	% de viabilidad antes	% de viabilidad
--------------	-----------------------	-----------------

Concentraciones	del tratamiento	después del tratamiento
Tartrazina		
3µg	98,7	95,85
5µg	98,4	95,2
7µg	98,5	85,7
Control negativo	98,3	98
Dióxido de titanio		
100µg	98,7	95,2
200µg	99	93,86
300µg	99,37	98,5
Control negativo	99,9	99,8

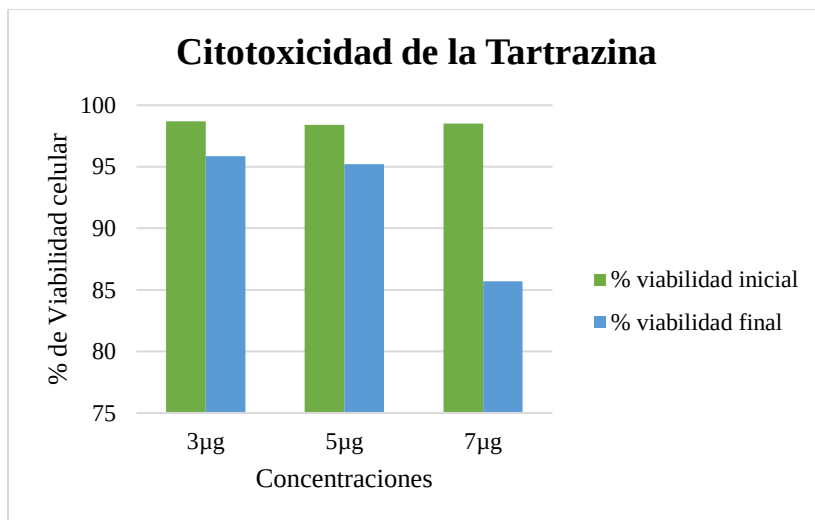
Como se observa en la Tabla 1, el porcentaje de viabilidad inicial para todas las concentraciones de los tratamientos, incluyendo el control negativo, se encuentra por encima del 90%.

En la Figura 4, se observa que hay una disminución en el porcentaje de viabilidad celular a medida que aumenta la concentración de la tartrazina, de modo que la menor viabilidad se observa en la concentración de 7µg con un valor de 85,7%, disminuyendo 12,8% respecto a su control, siendo esta la mayor concentración evaluada del colorante. Mientras que para las concentraciones de 3µg y 5µg la viabilidad se mantiene sobre 95% (95,85% y 95,2% respectivamente), con una disminución de 2,85% para la concentración de 3µg y 3,2% para la concentración de 5µg, respecto a su control; y no se observa una disminución significativa entre

estas dos concentraciones. Sin embargo, el porcentaje de viabilidad para la tartrazina se mantiene sobre el 80%.

Figura 4

Porcentaje de viabilidad celular en linfocitos antes y después del tratamiento con las diferentes concentraciones de la tartrazina



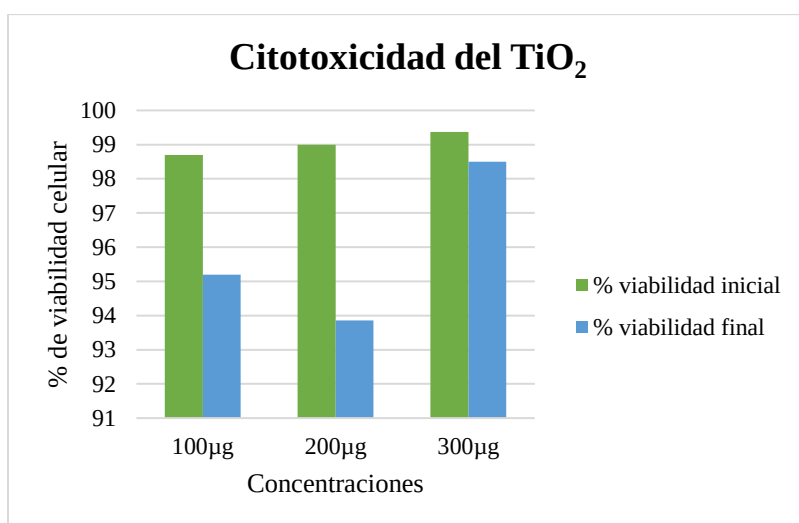
Nota: En el eje x, se encuentran las concentraciones del colorante Tartrazina; en el eje y, el porcentaje de viabilidad celular.

En la Figura 5 se observan los porcentajes de viabilidad celular para el TiO_2 , a diferencia de la tartrazina, los porcentajes de viabilidad celular no disminuye al aumentar la concentración de TiO_2 ; sino que se observa un menor porcentaje en la concentración dos (200µg) con 93,86%, seguida de la concentración uno (100µg) con 95,2% y la concentración tres (300µg) es donde se observa mayor viabilidad con 98,5%. Cabe mencionar que, los porcentajes de viabilidad después de aplicar los tratamientos de TiO_2 se encuentran sobre el 90%. Se encontró una disminución de la viabilidad de 3,5% para la concentración de 100µg, 5,14% para la concentración de 200µg; y 0,87% para la concentración de 300µg; siendo la concentración mayor del colorante en la que se observó un mayor porcentaje de viabilidad.

Para las concentraciones evaluadas de los dos colorantes, la viabilidad se mantuvo por encima del 80%, siendo la concentración de 7µg de tartrazina, en la que se notó una mayor disminución del porcentaje de viabilidad después del tratamiento (85,7%); y el mayor porcentaje de viabilidad después del tratamiento se observó en la concentración de 300µg de TiO₂ (98,5%).

Figura 5

Porcentaje de viabilidad celular en linfocitos antes y después del tratamiento con las diferentes concentraciones del TiO₂



Nota: En el eje x, se encuentran las concentraciones del colorante TiO₂; en el eje y, el porcentaje de viabilidad celular.

Identificación del daño en el ADN mediante el Ensayo Cometa

En las tablas 2, 3, 4 y 5 (ver Anexos: Apéndice A) se encuentran los promedios del daño ocasionado por los colorantes tartrazina, TiO₂ y los alimentos jugo 1 y jugo 2, analizados mediante ensayo cometa. Se tomaron en cuenta las variables dependientes: longitud total del cometa (µm), %ADN en cabeza, %ADN en cola; ya que son las mediciones que mejor explican el daño.

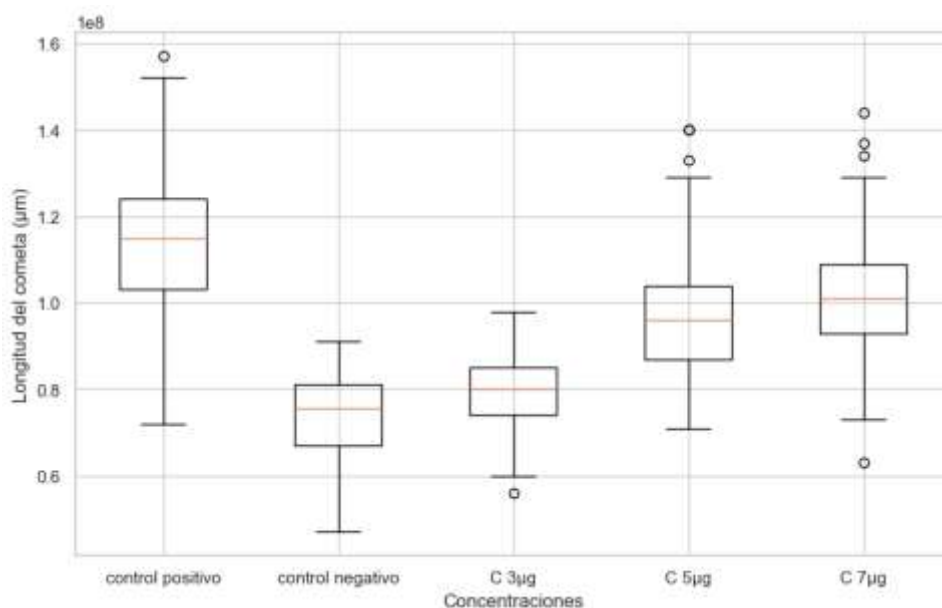
Asimismo, para cada tratamiento se evaluaron tres concentraciones, un control negativo con PBS y un control positivo con H_2O_2 (5mg/ml). Los resultados indicaron efectos dosis-respuesta evidentes en los tratamientos con Tartrazina, jugo comercial 1 y jugo comercial 2; sin embargo, no se observó el mismo efecto en el tratamiento con TiO_2 .

Tartrazina

Como se puede observar en la Figura 6 y en la Tabla 2 (ver Anexos: Apéndice A), la longitud del cometa en las concentraciones de 3 μg , 5 μg y 7 μg es mayor que en el control negativo, pero menor que en el control positivo. La mediana de la longitud del cometa aumenta ligeramente con la concentración, alcanzando su valor máximo en la concentración de 7 μg . La concentración de 3 μg presenta valores similares a los del control negativo. Además, se observan variaciones en la dispersión de los datos y la presencia de valores atípicos en las concentraciones de 5 μg , 7 μg y en el control positivo, lo cual indica una mayor variabilidad en estas condiciones.

Figura 6

Genotoxicidad del colorante tartrazina para las concentraciones de 3 μg , 5 μg y 7 μg con respecto a los controles (Longitud del Cometa)



En la Tabla 6 (ver Anexos, Apéndice A), se muestran los resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para el tratamiento Tartrazina. Se encontró que en la variable longitud del cometa, las concentraciones 3 µg y 7 µg junto con el control positivo, presentan una distribución normal, con p-valores >0.005. Mientras que la concentración 5 µg y el control negativo no siguen una distribución normal, con p-valores <0.005. Debido a que la mayoría de los datos tienen una distribución normal, se realizó un ANOVA, los resultados se observan en la Tabla 6.

En el ANOVA, se observó que hay diferencias significativas entre las medias de los controles y las tres concentraciones del colorante, en relación a la longitud del cometa, con un valor F obtenido de 263.218, indicando una variabilidad entre las medias de los grupos comparados. Además, el valor p fue extremadamente inferior al umbral 0.005 (1.035×10^{-116}). Estos resultados indican que las diferentes concentraciones del colorante tartrazina (3µg, 5µg y 7µg) tienen un efecto significativo sobre la variable Longitud del cometa.

Asimismo, en la prueba Turkey (ver Tabla 8, Anexos, Apéndice A), se observó que, para la Longitud del cometa, todas las concentraciones estudiadas en comparación con los controles presentan cambios altamente significativos.

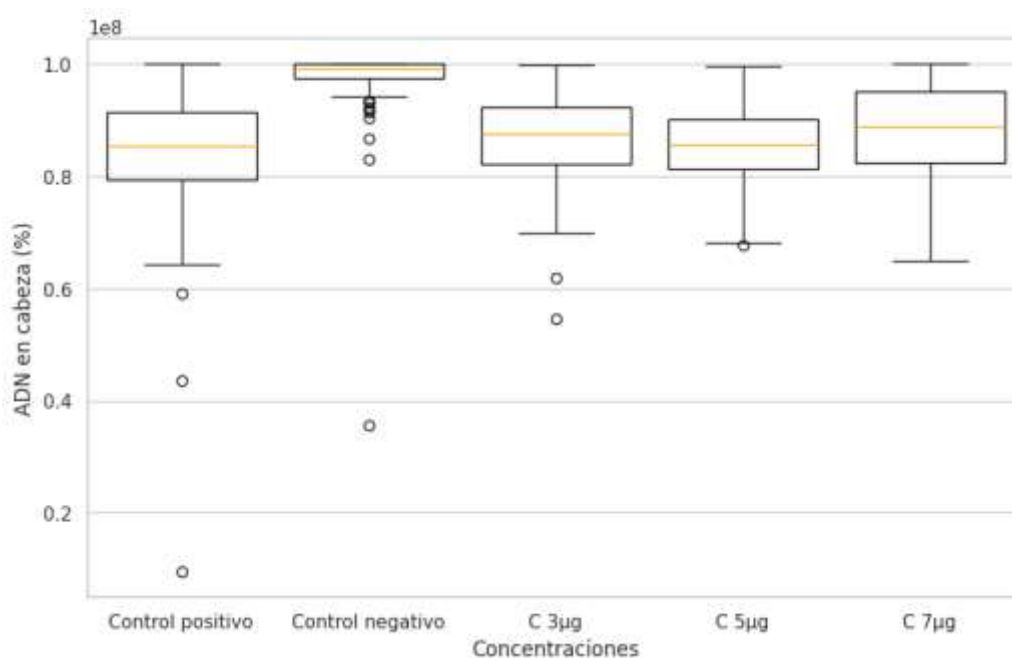
Debido a que las variables % de ADN en cola y % de ADN en cabeza, no presentan una distribución normal y no hay homogeneidad, como se observa en los resultados obtenidos en la prueba Shapiro-Wilk (ver Tabla 6, Anexos, Apéndice A), no fue posible realizar un ANOVA. Por ello, se realizaron pruebas Kruskal-Wallis y Mann-Whitney para comparar las medianas de los grupos y establecer si existen diferencias significativas, ya que son más robustas y no requieren que los datos sigan una distribución específica.

Este enfoque asegura que los análisis sean válidos y robustos, proporcionando una evaluación precisa de las diferencias significativas entre los grupos de tratamiento.

El porcentaje (%) de ADN en cabeza (ver Figura 7), para la concentración de $7\mu\text{g}$ es inferior a los controles positivo y negativo. Y las concentraciones de $3\mu\text{g}$ y $5\mu\text{g}$ presentan mayor % de ADN respecto al control positivo, pero menor que el control negativo. En la concentración de $3\mu\text{g}$ fue donde se observó mayor % de ADN en cabeza. En la concentración $3\mu\text{g}$ se observaron valores atípicos que indican mayor variabilidad en respuesta a esta concentración.

Figura 7

Genotoxicidad del colorante tartrazina para las concentraciones de $3\mu\text{g}$, $5\mu\text{g}$ y $7\mu\text{g}$
(Porcentaje de ADN en cabeza)



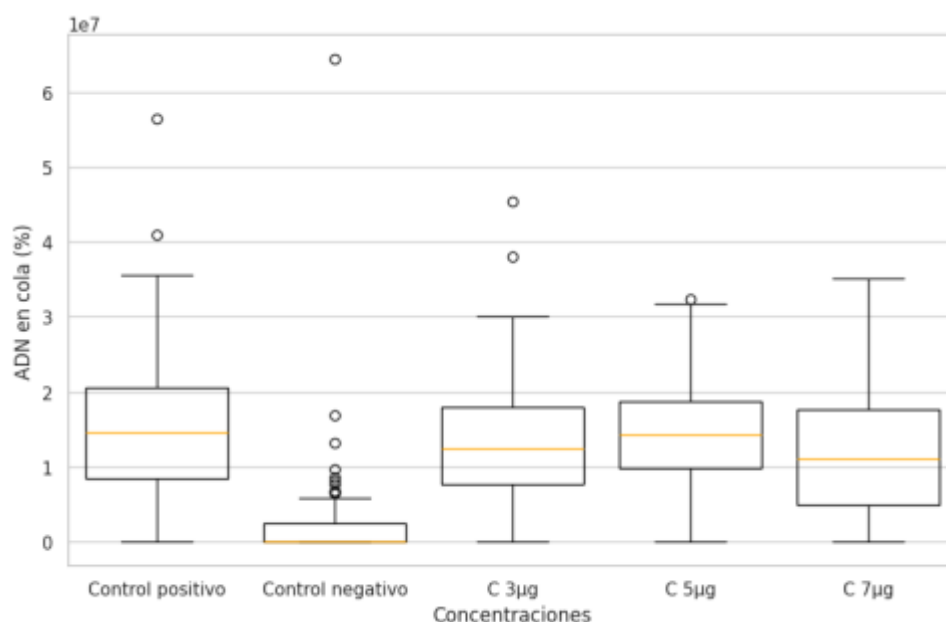
La prueba de Shapiro-Wilk para los datos del % de ADN en cabeza (ver Tabla 6, Anexos, Apéndice A), se encontró que únicamente la concentración de 5 c presenta una distribución normal con $p\text{-valor} > 0.005$. Como se muestra en la Tabla 6 (ver Anexos, Apéndice A), en la prueba Kruskal-Wallis se observaron diferencias significativas en los grupos con respecto a los controles. En la Tabla 7 (ver Anexos, Apéndice A) se muestran los resultados de la prueba Mann-Whitney U, todas las concentraciones comparadas con el control negativo presentan

diferencias altamente significativas. Con respecto al control positivo, se encontró que sólo la concentración 5 μg no presenta diferencias significativas.

En la Figura 8, se observa el % de ADN en cola; las tres concentraciones (3 μg , 5 μg y 7 μg) presentan un % de ADN en cola superior al control negativo, pero inferior al control positivo. De las tres concentraciones, la de 7 μg presenta mayor % de ADN en cola, y el menor % se encontró en la concentración de 3 μg . Se encontraron valores atípicos para la concentración 3 μg , indicando variabilidad en esta respuesta.

Figura 8

Genotoxicidad del colorante tartrazina para las concentraciones de 3 μg , 5 μg y 7 μg (Porcentaje de ADN en cola)



La prueba de Shapiro-Wilk para los datos del % de ADN en cola (ver Tabla 6, Anexos, Apéndice A), se observó que únicamente la concentración de 5 μg presenta una distribución normal con $p\text{-valor} > 0.005$. Como se muestra en la Tabla 6 (ver Anexos, Apéndice A), en la prueba Kruskal-Wallis se observaron diferencias significativas en todos los grupos con respecto

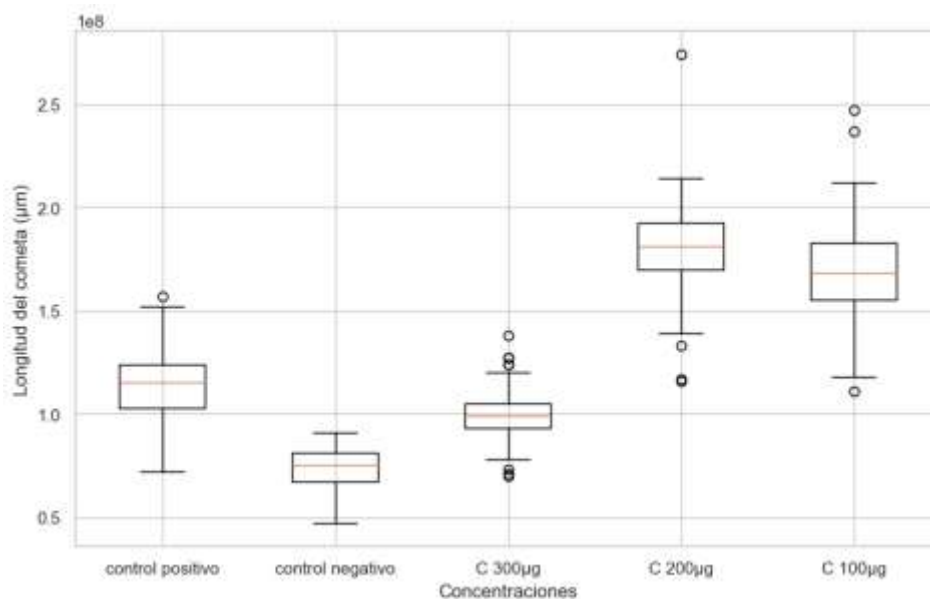
a los controles. En la Tabla 7 (ver Anexos, Apéndice A) se muestran los resultados de la prueba Mann-Whitney U, todas las concentraciones comparadas con el control negativo presentan diferencias altamente significativas. Sin embargo, la concentración de 5 μg no tiene diferencias significativas con el control positivo.

Dióxido de titanio

Como se observa en la Figura 9, la longitud del cometa, en la concentración de 300 μg es mayor al control negativo, pero menor al control positivo. Mientras que para las concentraciones de 100 μg y 200 μg , la longitud del cometa es superior con respecto a los controles negativo y positivo. Se encontró una mayor longitud del cometa para la concentración de 200 μg . Mientras que la menor longitud se observó en la concentración de 300 μg , con numerosos valores atípicos que indican una mayor variabilidad en la respuesta a esta concentración.

Figura 9

Genotoxicidad del colorante TiO_2 para las concentraciones de 100 μg , 200 μg y 300 μg (Longitud del cometa)



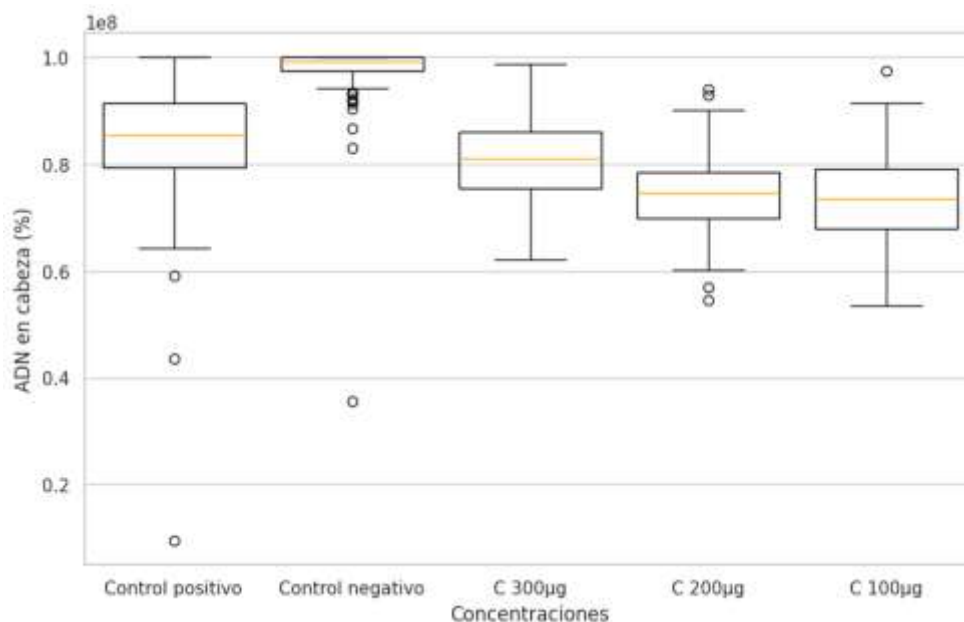
La prueba Shapiro-Wilk para la Longitud del cometa, mostró distribución normal en los datos de las concentraciones 300 μg , 100 μg y el control positivo. Mientras que la concentración de 200 μg y el control negativo no siguen una distribución normal (ver Tabla 8, Anexos, Apéndice A).

El ANOVA indicó que existen diferencias altamente notables entre los grupos con respecto a los controles con un p valor muy inferior al umbral (ver Tabla 8, Anexos, Apéndice A). La prueba Turkey también indicó que existen diferencias altamente significativas entre cada una de las concentraciones en comparación con los controles (ver Tabla 9, Anexos, Apéndice A). Estos resultados sugieren que las diferentes concentraciones del colorante tienen un efecto importante en la longitud del cometa.

El % de ADN en cabeza se muestra en la Figura 10 y en la Tabla 3 (ver Anexos, Apéndice A). En las tres concentraciones se observó que el % de ADN en cabeza es inferior con respecto a los controles negativo y positivo. El mayor porcentaje se observó en la concentración de 300 μg y el porcentaje más bajo se encontró en la concentración de 200 μg , siendo este último cercano al de la concentración de 100 μg . Los valores atípicos observados en la concentración de 200 μg muestran la variabilidad que existe en la respuesta a esta concentración.

Figura 10

*Genotoxicidad del colorante TiO_2 para las concentraciones de 100 μg , 200 μg y 300 μg
(Porcentaje de ADN en cabeza)*



En la tabla 8 (ver Anexos, Apéndice A), se muestran los resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para el % de ADN en cabeza. Las tres concentraciones (300 µg, 200 µg y 100 µg) presentan una distribución normal con p-valores superiores al umbral 0.005. Mientras que los controles positivo y negativo no siguen los supuestos de normalidad. El ANOVA indicó que existen diferencias altamente importantes entre las concentraciones y los controles, con un p-valor muy inferior a 0.005 (ver Tabla 8, Anexos, Apéndice A).

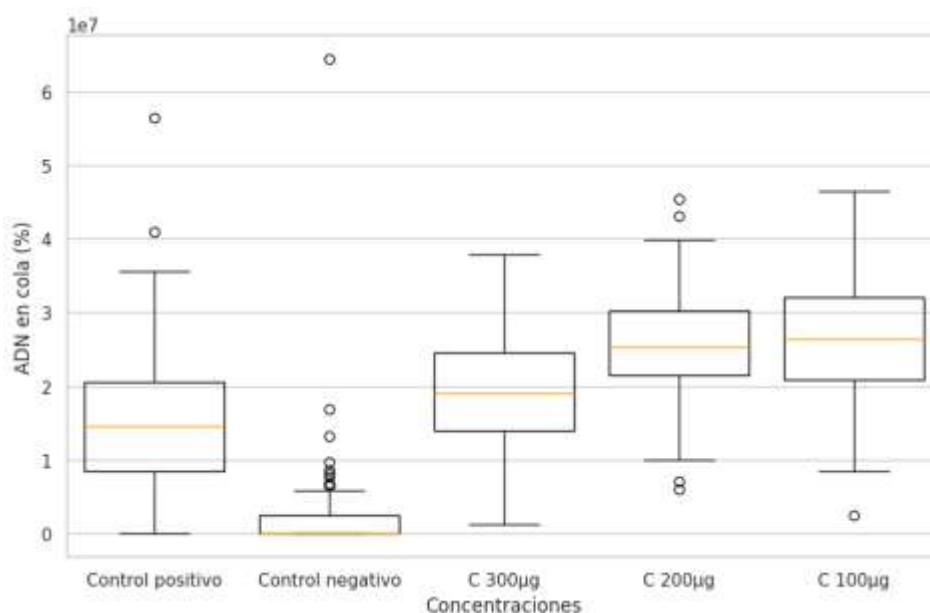
La prueba Turkey (ver Tabla 9, Anexos, Apéndice A), ratificó las diferencias altamente significativas entre las tres concentraciones de TiO₂ y el control negativo. Por otro lado, en comparación con el control positivo, la concentración 200 µg no mostró diferencias (p-valor muy cercano a 1).

El porcentaje de ADN en cola, es mayor en las tres concentraciones (300 µg, 200 µg y 100 µg) en comparación a los controles negativos y positivos (ver Figura 11), indicando un daño importante en el ADN de las células. El mayor porcentaje de ADN en cola se encontró en la concentración de 100µg, seguido por la concentración de 200µg, siendo estos dos porcentajes

muy cercanos entre sí. Asimismo, se observaron valores atípicos en la concentración de 200 μg , debido a la variabilidad de la respuesta de los linfocitos en esta concentración.

Figura 11

*Genotoxicidad del colorante TiO_2 para las concentraciones de 100 μg , 200 μg y 300 μg
(Porcentaje de ADN en cola)*



La prueba de normalidad Shapiro-Wilk para el % de ADN en cola reportó los siguientes resultados: Las concentraciones 300 μg , 200 μg y 100 μg siguen una distribución normal. Los controles positivo y negativo presentaron valores <0.005 y alta significancia, lo que sugiere que no presentan distribución normal. Por otro lado, el ANOVA mostró diferencias significativas en las medias de las concentraciones y los controles (ver Tabla 8, Anexos, Apéndice A).

La prueba Turkey también evidenció las diferencias entre cada una de las tres concentraciones y el control negativo. En la comparación con el control positivo hay notables

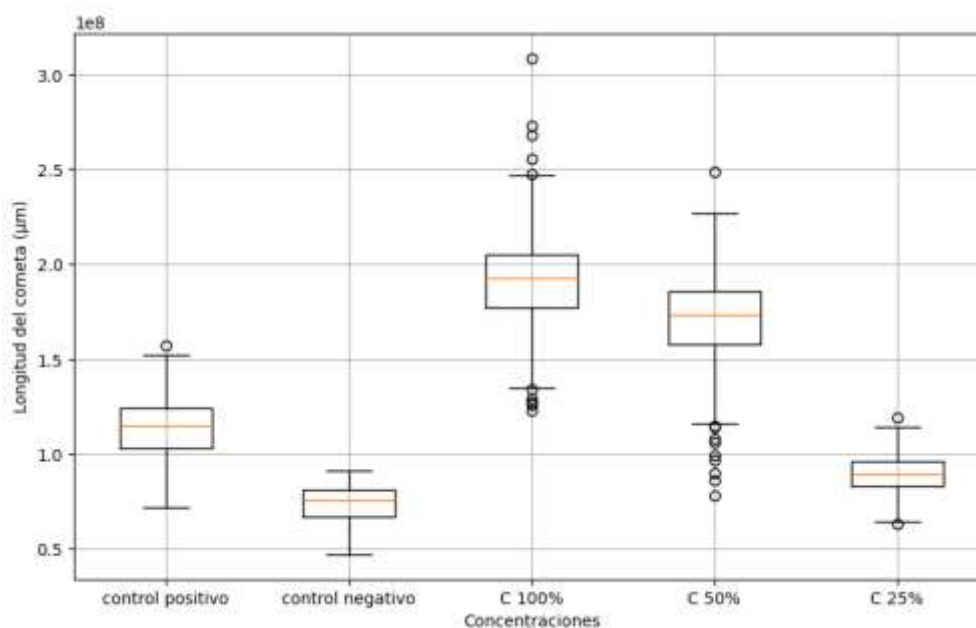
diferencias en las concentraciones de 300 μg y 100 μg , pero no se observaron diferencias en la concentración de 200 μg , con un p-valor muy cercano a 1 (ver Tabla 9, Anexos, Apéndice A).

Jugo 1

Como se muestra en la Figura 12, la longitud del cometa en la concentración de 25% es superior al control negativo pero inferior al control positivo (ver Tabla 4, Anexos: Apéndice A). Por otra parte, en las concentraciones de 50% y 100%, la longitud del cometa es superior a los controles tanto el negativo como el positivo. La concentración de 100% presenta la mayor longitud del cometa, mientras que en la concentración de 25% se observa menor longitud. Asimismo, la presencia de numerosos valores atípicos juntos con la variabilidad en la dispersión de los datos, observada en la concentración de 100% y 50%, sugiere variabilidad en la respuesta de las células a estas concentraciones del jugo

Figura 12

Genotoxicidad del jugo 1, para las concentraciones de 100 μg , 200 μg y 300 μg (Longitud del cometa)

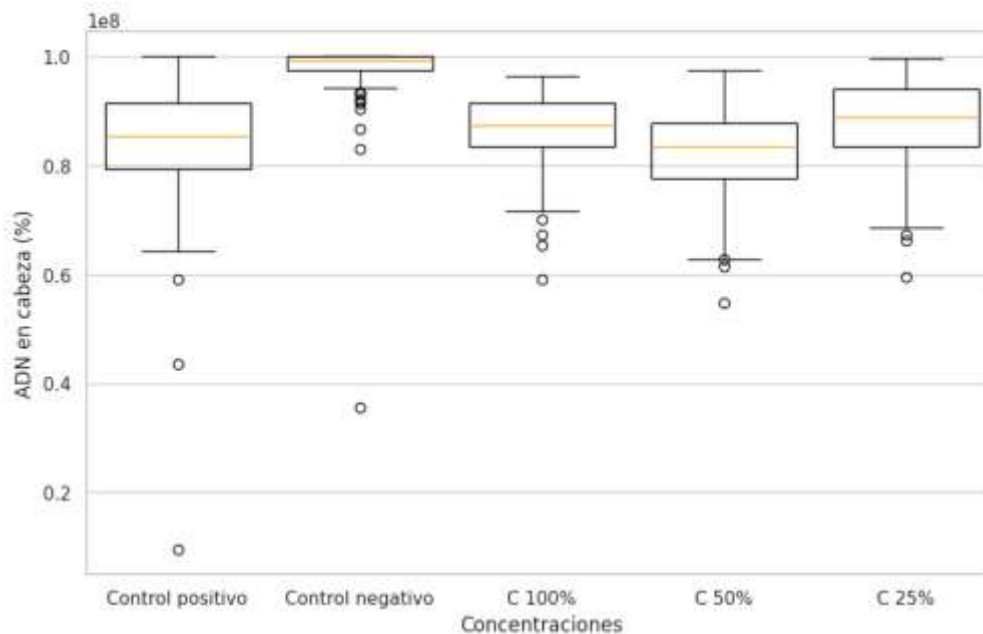


En la prueba de Shapiro-Wilk para los datos de la Longitud del cometa (ver Tabla 10, Anexos, Apéndice A), únicamente la concentración de 25% y el control positivo presenta una distribución normal con p-valor >0.005 . Como se muestra en la Tabla 10 (ver Anexos, Apéndice A), en la prueba Kruskal-Wallis se observaron diferencias significativas en los grupos con respecto a los controles. En la Tabla 11 (ver Anexos, Apéndice A) se muestran los resultados de la prueba Mann-Whitney U, todas las concentraciones comparadas con el control negativo y el control negativo presentan diferencias altamente significativas.

El porcentaje de ADN en cabeza se encuentra muy cercano entre las tres concentraciones, se observó una disminución con respecto al control negativo. Por otro lado, en relación al control positivo, las concentraciones de 50% y 100% tienen % inferiores de ADN en cabeza. Mientras que la concentración de 25% es superior al control positivo (ver Tabla 4, Anexos: Apéndice A). El % de ADN en cabeza más bajo se observó en la concentración de 100%. La concentración de 25% es la que presenta mayor porcentaje (ver Figura 21). Se observó variabilidad en la respuesta de las tres concentraciones, con numerosos valores atípicos.

Figura 13

*Genotoxicidad del jugo 1, para las concentraciones de 100 μ g, 200 μ g y 300 μ g
(Porcentaje de ADN en cabeza)*



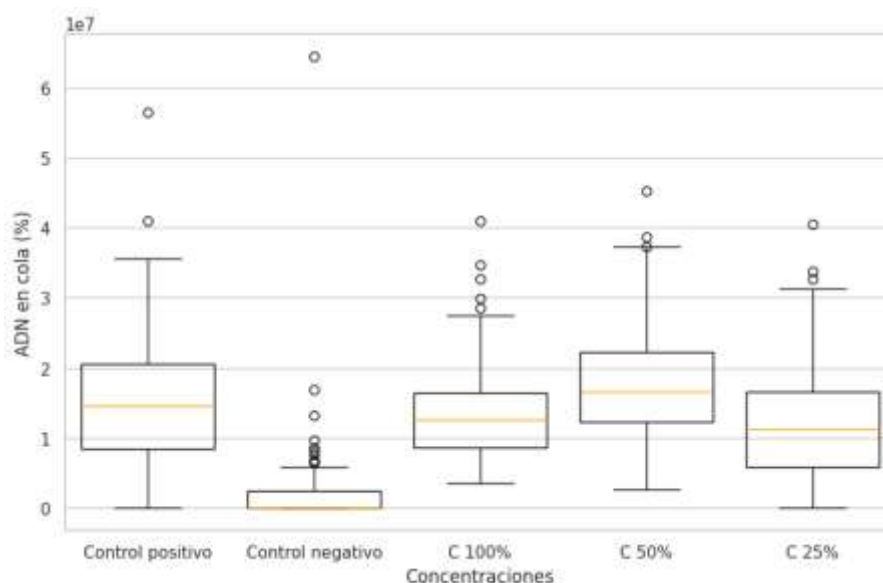
La prueba de Shapiro-Wilk para los datos de la Longitud del cometa (ver Tabla 10, Anexos, Apéndice A), se encontró que todas las concentraciones presentan p-valores <0.005 indicando que no siguen una distribución normal. Como se muestra en la Tabla 10 (ver Anexos, Apéndice A), en la prueba Kruskal-Wallis se observaron diferencias significativas en los grupos con respecto a los controles. En la Tabla 11 (ver Anexos, Apéndice A) se muestran los resultados de la prueba Mann-Whitney U, todas las concentraciones comparadas con el control negativo y el control negativo presentan diferencias altamente significativas.

El porcentaje de ADN en cola (ver Figura 14) en las concentraciones de 100% y 25% es superior al control negativo e inferiores al control positivo, pero su porcentaje es cercano entre estas dos concentraciones. Mientras que para la concentración de 50%, el porcentaje de ADN en cola es superior a los controles, y, al de las otras dos concentraciones (ver Tabla 4, Anexos: Apéndice A). La concentración de 50% es la que presenta el mayor porcentaje de ADN en cola, y, la concentración de 25% es la que presenta menor porcentaje. Se encontraron valores atípicos

y variabilidad en la dispersión de los datos para las tres concentraciones, de modo que hay variaciones en la respuesta de estas concentraciones.

Figura 14

Genotoxicidad del jugo 1, para las concentraciones de 100%, 50% y 25% (Porcentaje de ADN en cola)



En la tabla 10 (ver Anexos, Apéndice A) se presentan los resultados de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk para la variable % de ADN en cola, la cual indicó que todas las concentraciones y los controles, tienen p-valores <0.005 , por tanto, no presentan una distribución normal. Asimismo, la prueba Kruskal-Wallis reportó diferencias entre los grupos y los controles.

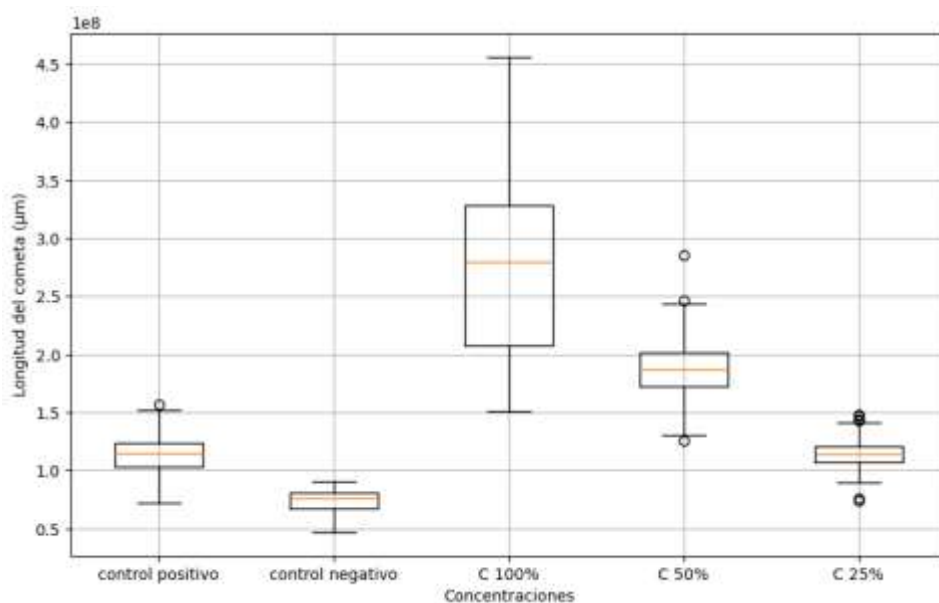
La prueba Mann-Whitney U reveló que todas las concentraciones en comparación con los controles difieren enormemente, con p-valores muy inferiores al umbral 0.005 (ver Tabla 11, Anexos, Apéndice A). Estos datos sugieren que las diferentes concentraciones de jugo tienen un efecto perjudicial en el % de ADN en cola en el ensayo del cometa.

Jugo 2

En la longitud del cometa, como se observa en la Figura 15, todas las concentraciones (100%, 50%, 25%) presentan un valor superior a los controles negativos, siendo la concentración de 25% la que presenta una longitud más cercana a los controles, y la concentración de 100% la más alejada respecto a los controles. Se observó mucha variabilidad en la dispersión de los datos de la concentración de 100% y numerosos valores atípicos en las concentraciones de 50% y 25%, evidenciando que hay variaciones en la respuesta de estas concentraciones.

Figura 15

Genotoxicidad del jugo 2, para las concentraciones de 100%, 50% y 25% (Longitud del cometa)



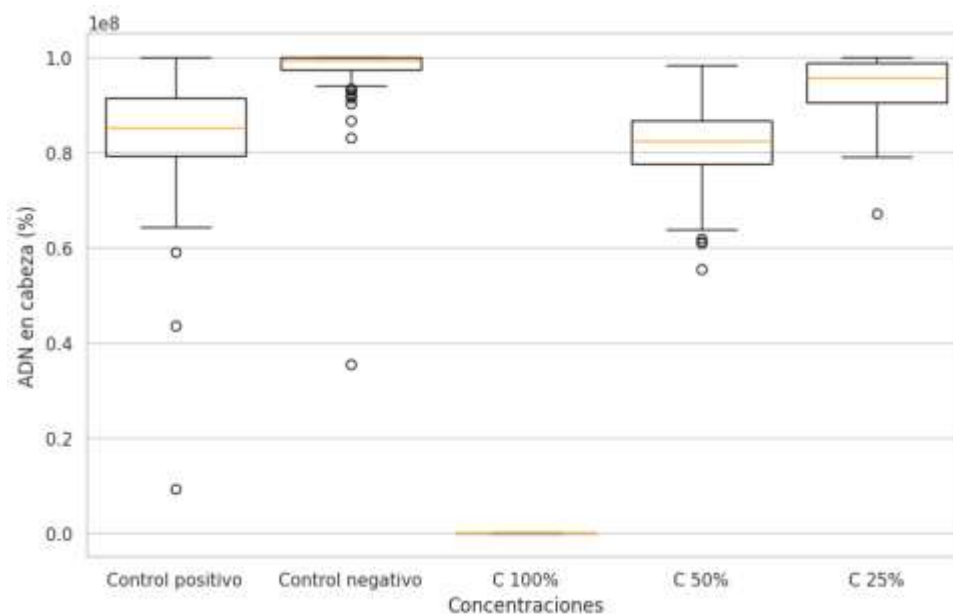
Los resultados del ANOVA para la longitud del cometa indicaron que hay diferencias significativas en los grupos (control negativo y las tres concentraciones del jugo comercial 2), ya que el p-valor (5.37079×10^{-228}) fue muy inferior al umbral (0.05), la variación dentro de los grupos fue considerable según el valor F (929.80320). Estos resultados sugieren que las

diferentes concentraciones del jugo comercial 2 producen alteraciones en la longitud del cometa, por lo que los cambios observados en la Figura 23 son destacados respecto al control negativo.

Para la variable del porcentaje de ADN en cabeza, como se observa en la Figura 16, la concentración de 25% presenta un porcentaje superior de ADN en la cabeza con respecto al control positivo, pero inferior al control negativo. En la concentración de 50% se observó un porcentaje inferior con respecto a los controles. Mientras que en la concentración de 100% el porcentaje de ADN en cabeza es inferior a los controles y a las demás concentraciones del jugo. Los valores atípicos indican variaciones en la respuesta de las concentraciones de 50% y 25%.

Figura 16

Genotoxicidad del jugo 2, para las concentraciones de 100%, 50% y 25% (Porcentaje de ADN en cabeza)



La prueba Shapiro-Wilk (ver Tabla 12, Anexos, Apéndice A) para el % de ADN en cabeza encontró que únicamente la concentración de 100% presenta una distribución normal, con un p-valor (0.1750) superior al umbral. La prueba Kruskal-Wallis indicó que las concentraciones y los controles difieren significativamente.

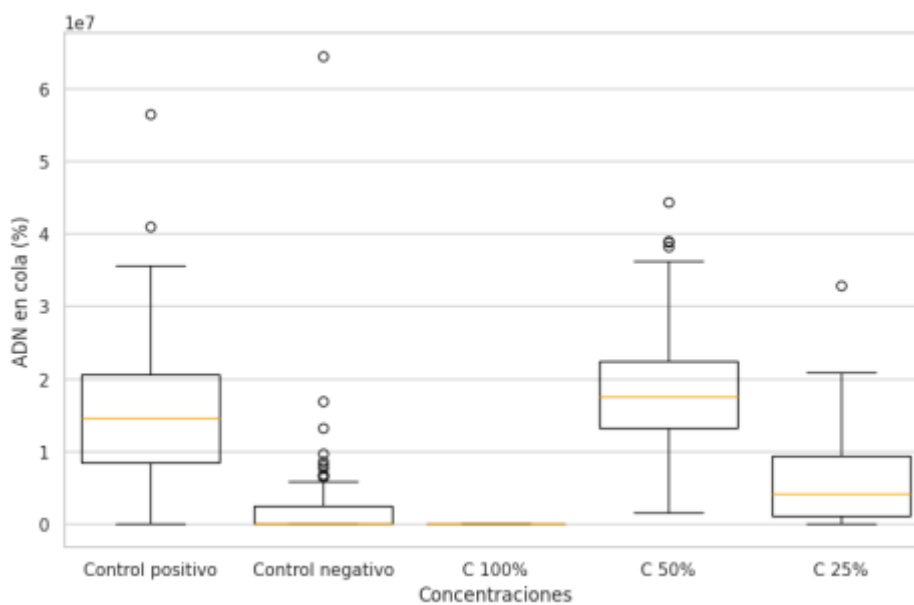
En la Tabla 13 (ver Anexos, Apéndice A) se presentan los resultados de la prueba Mann-Whitney U. Estos sugieren que para el % de ADN en cabeza, cada una de las concentraciones, comparada con los controles, presenta diferencias altamente significativas. Es decir, las concentraciones del jugo ejercen un efecto notable en el % de ADN en cabeza.

En la figura 17, se observan los resultados para el Porcentaje de ADN en cola, se encontró que la concentración de 25% es la que se encuentra con porcentaje de ADN en cola dentro de los controles, es decir, el porcentaje para esta concentración es superior al control negativo, pero inferior al control positivo. Por otro lado, las concentraciones de 50% y 100% presentan porcentajes superiores con respecto a los controles (positivo y negativo).

La relación es proporcional, ya que, a medida que aumenta la concentración, el porcentaje de ADN en cabeza disminuye, demostrando el daño en la célula. Por tal razón, el porcentaje de ADN en cola aumenta significativamente al disminuir el porcentaje de ADN en cabeza.

Figura 17

Genotoxicidad del jugo 2, para las concentraciones de 100%, 50% y 25% (Porcentaje de ADN en cola)



La prueba Shapiro-Wilk para el % de ADN en cola se observa en la Tabla 12 (ver Anexos, Apéndice A). Se encontró que la distribución de los datos de la concentración de 100% es normal, con un p-valor superior al umbral (0.05). Las demás concentraciones (50% y 25%), no siguen los supuestos de normalidad, ya que sus p-valor son <0.005 . Los valores del Kruskal-Wallis mostraron que hay diferencias notables entre las concentraciones del colorante y los controles.

La Prueba no paramétrica Mann-Whitney U para el % de ADN en cola (ver Tabla 13, Anexos, Apéndice A); mostró que la concentración de 100% del jugo 2 en comparación con el control negativo presentan p-valores superiores al umbral, no existen diferencias significativas entre los grupos comparados, como se muestra en la 13 (ver Anexos: Apéndice A). Las concentraciones de 50% y 25% si presentan diferencias significativas en comparación con el control negativo. Por otro lado, cada una de las concentraciones tiene diferencias altamente significativas con respecto al control positivo.

La similitud entre el control negativo y la concentración del 100% para esta variable se debe a que los valores de la concentración son muy pequeños respecto a los controles y a las demás concentraciones.

Correlaciones

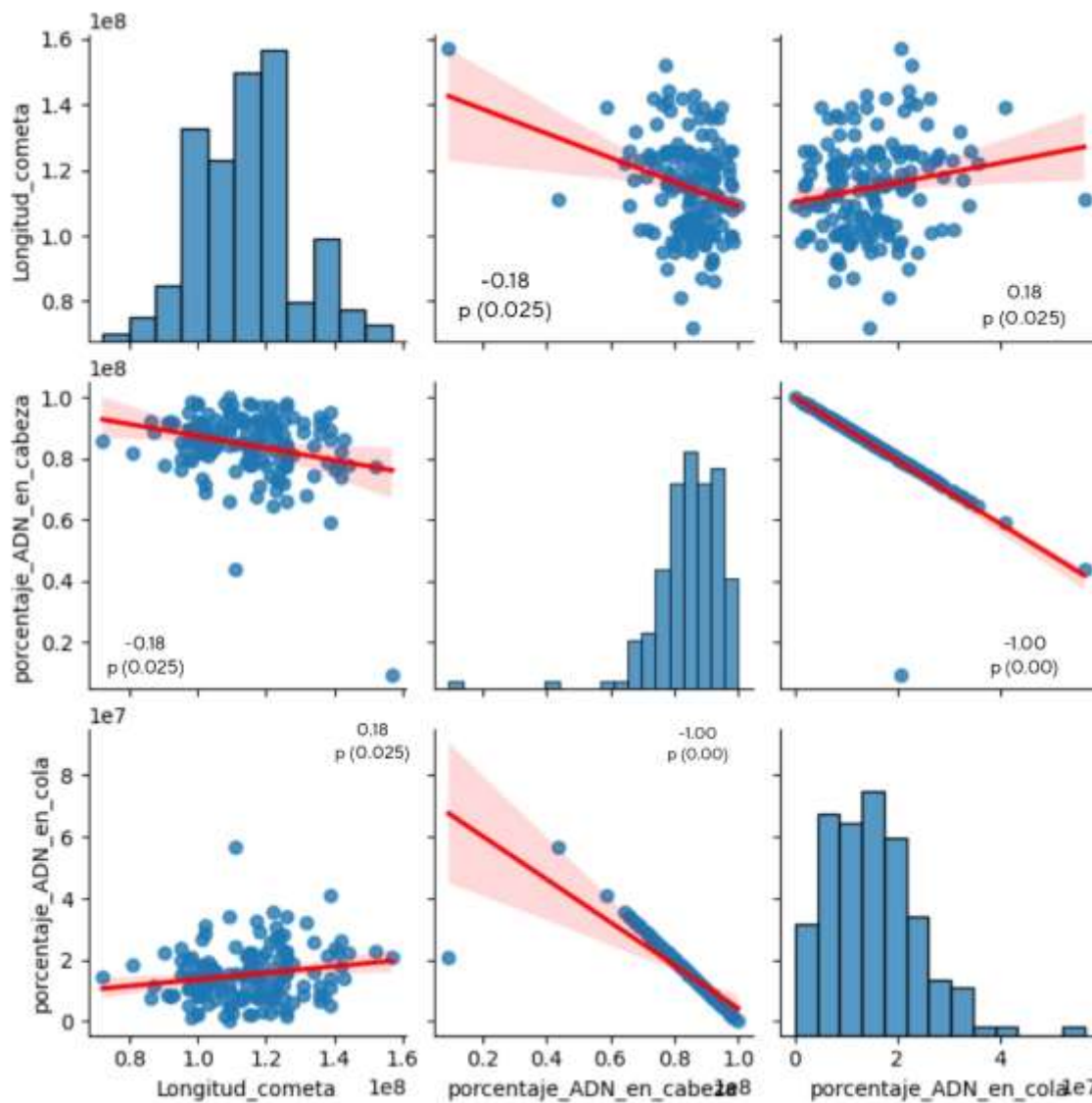
En la figura 18 se observa la matriz de correlación de Pearson. Para las tres concentraciones de los cuatro tratamientos existe una correlación entre la variable % de ADN en cabeza y el % de ADN en cola, siendo inversamente proporcional, de modo que al aumentar el % de ADN en cola, ocasionado por la exposición a diferentes concentraciones de los colorantes, el % de ADN en cabeza disminuye.

Del mismo modo, existe una correlación entre las variables Longitud del cometa y % de ADN en cabeza, con un comportamiento inversamente proporcional, de modo que cuando la longitud del cometa aumenta, el porcentaje de ADN en la cabeza disminuye, indicando así el daño ocasionado por las diferentes concentraciones de los tratamientos.

Por otro lado, se encontró una correlación directamente proporcional entre las variables Longitud del cometa y % de ADN en cola, es decir, al aumentar la longitud del cometa también aumenta el % de ADN en cola.

Figura 18

Matriz de correlación de Pearson de las variables: Longitud del cometa, % de ADN en cabeza y % de ADN en cola

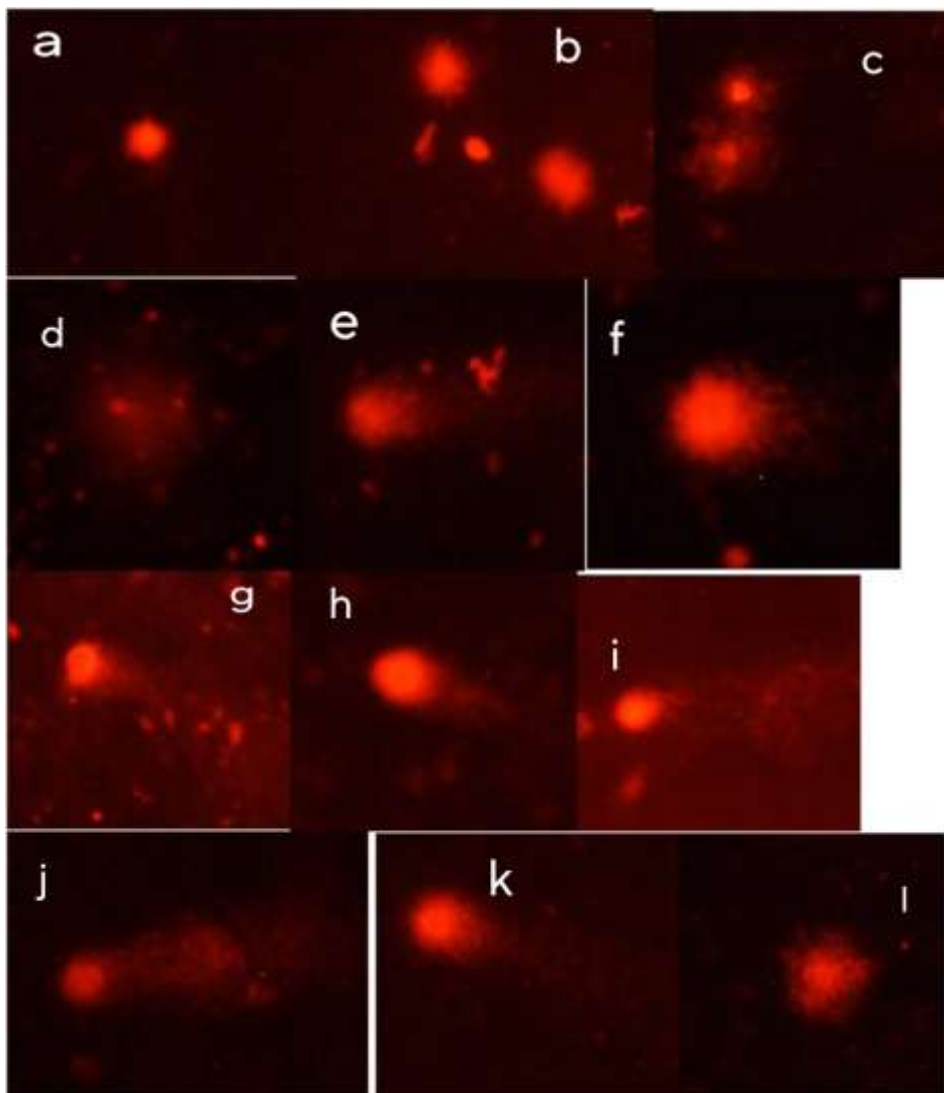


Nivel de daño

Siguiendo la clasificación propuesta por (Anderson et al., 1994), se determinó el nivel de daño promedio para cada una de las concentraciones de cada uno de los tratamientos, como se muestra en la Figura 19.

Figura 19

Imágenes del daño inducido por los tratamientos en linfocitos humanos



Nota: Daño inducido por los tratamientos. Tartrazina: a) 3 μ g, nivel de daño bajo; b) 5 μ g, daño moderado; c) 7 μ g, daño moderado. Dióxido de titanio: d) 300 μ g, daño total; e) 200 μ g, daño alto; f) 100 μ g, daño medio. Jugo comercial 1: g) 100%, daño alto; h) 50% daño alto; i) 25% daño medio. Jugo comercial 2: j) 100%, daño alto; k) 50% daño alto; l) 25%, daño moderado.

Discusión

En el ensayo de citotoxicidad para los dos colorantes (Tartrazina, TiO₂), se encontró una disminución en el porcentaje de viabilidad celular después de aplicar los tratamientos. Según la norma ISO 10993-5 (2009) el umbral para evaluar la citotoxicidad en ensayos de viabilidad

celular se establece en 70%; y en ninguna de las tres concentraciones evaluadas para los dos colorantes (Tartrazina, TiO_2) se observó una disminución menor a 80%, de modo que no fue significativa (Standardization, 2009).

En concordancia con los resultados obtenidos en el ensayo cometa, se encontró que hubo una disminución de la viabilidad celular a medida que se aumentó la concentración del colorante tartrazina, indicando efectos dosis-respuesta.

Sin embargo, en los resultados obtenidos tanto del ensayo cometa como de citotoxicidad, para el colorante TiO_2 , no se observó un efecto dosis-respuesta, es decir, al aumentar la concentración del colorante, no aumentó el daño, siendo la concentración de 300 μg la que presenta mayor porcentaje de viabilidad celular (98,5%) y la concentración de 200 μg la que presenta menor porcentaje de viabilidad (93,6%).

La falta de distribución normal en la mayoría de los grupos de datos justificó el uso de pruebas no paramétricas para evaluar las variaciones entre las diferentes concentraciones de los tratamientos y el control negativo, y así determinar específicamente qué concentraciones difieren considerablemente del control negativo y en qué variables.

Los resultados y análisis estadísticos para el ensayo cometa muestra que hay diferencias significativas en todas las medianas de las variables analizadas (Longitud del cometa, % de ADN en cabeza, % de ADN en cola) para todas las concentraciones de los tratamientos Tartrazina (3 μg , 5 μg y 7 μg), TiO_2 (100 μg , 200 μg y 300 μg), Jugo 1 (100%, 50% y 25%) y Jugo 2 (100%, 50% y 25%), en contraste con el Control negativo (PBS).

Para la Tartrazina, se observó que hay una correspondencia entre los resultados del ensayo cometa y el % de viabilidad celular, ya que a medida que aumenta la concentración del tratamiento también aumenta el daño en el ADN y, por tanto, disminuye la viabilidad celular.

Esto respalda la hipótesis de que hay un comportamiento dosis-dependiente en el tratamiento Tartrazina.

Los resultados indican que el colorante ejerce efectos genotóxicos sobre las células, observados en las variables analizadas, los cuáles son estadísticamente significativos y reflejan una mayor susceptibilidad del ADN al daño en la concentración de 7µg, bajo las condiciones experimentales. Estos hallazgos subrayan la importancia de monitorear y regular las concentraciones de ciertos compuestos, que pueden causar daños incluso a niveles que podrían considerarse seguros en otros contextos.

Los resultados concuerdan con Khayyat et al. (2017), quienes, por medio de ensayo cometa, también informaron efectos genotóxicos en glóbulos blancos de ratas tratadas por vía oral con una concentración de 7.5 mg/kg de peso corporal, con un incremento notable (10%) en el porcentaje de ADN de la cola, en comparación con el control (4% de ADN en cola); y, concluyeron que la Tartrazina tiene la capacidad de generar ROS acelerando el estrés oxidativo, alterando la estructura bioquímica del tejido hepático-renal, debido a esto, es de vital importancia controlar y limitar su consumo sobre todo en los alimentos de los niños.

Asimismo, (Vega-Cabanillas et al., 2021), reportaron efectos genotóxicos dosis-dependiente para la tartrazina en linfocitos de *Mus musculus* BALB/c, por medio del ensayo de micronúcleos, para dosis de 0,75 mg/kg pc; 7,5 mg/kg pc y 75 mg/kg pc, las cuáles presentaron diferencias significativas respecto al control. Del mismo modo, (Rodrigues et al., 2022), evaluaron concentraciones de 100, 200, y 400 µg/mL de tartrazina, en *Allium cepa* y *Saccharomyces cerevisiae*, y observando un efecto tóxico-dependiente en los organismos de prueba; también encontraron que este colorante ejerció citotoxicidad en fibroblastos y células

gástricas humanas, además de mostrar efectos mutagénicos en *A. cepa* y concluyeron que la exposición prolongada a la tartrazina puede ocasionar carcinogénesis.

Estudios adicionales realizados en *Allium cepa* confirman daño celular dosis-dependiente en diferentes concentraciones del colorante tartrazina (0.5%, 1%, y 2%), el cuál causó anomalías durante la división celular y un aumento significativo en la tasa de aberraciones cromosómicas (6%) con respecto al control (0.5%) (Nassar, 2022).

En otros estudios realizados con dosis de 10 y 20mg /Kg pc de tartrazina, administradas por 60 días en ratas, se encontró daño significativo en el ADN observado en el aumento de la longitud de la cola (8µm en la dosis de 10mg; 12µm en la dosis de 20mg), el porcentaje de ADN de la cola (10% en la dosis de 10mg; 15% en la dosis de 20mg) y el momento de la cola (0.8 en la dosis de 10mg; 1.3 en la dosis de 20mg), en relación con el control (6µm en Longitud de la cola, 5% de ADN en cola, 0.3 en momento de la cola), además de una reducción significativa en el peso del hígado, riñones y testículos, y, aumento del peso corporal, en comparación al grupo de control (Ibrahim et al. 2024).

Por otro lado, se ha observado neurotoxicidad en concentraciones de 50mg/L, ya que, induce significativamente estrés oxidativo, respuesta antioxidante alterada (SOD, CAT y GSH), daño celular desencadenado (MDA y LDH), alteraciones en genes asociados con la defensa antioxidante y cambios neurobioquímicos en el desarrollo de embriones de pez cebra (Haridevamuthu et al, 2024).

El colorante TiO₂, ampliamente utilizado en productos de grado alimenticio, medicamentos y productos de higiene personal, ha sido evaluado en este estudio para determinar sus efectos genotóxicos mediante el ensayo cometa. Los resultados mostraron efectos

genotóxicos significativos en diferentes concentraciones del colorante (100µg, 200µg y 300µg) en comparación con el control negativo.

El daño causado al ADN fue estadísticamente significativo en todas las variables evaluadas: longitud del cometa, porcentaje de ADN en la cabeza y porcentaje de ADN en la cola. Los valores obtenidos indicaron un aumento notable del daño genético, con resultados que mostraron hasta el doble de los valores observados en el control negativo.

Particularmente, la concentración de 200µg de TiO₂ evidenció el mayor grado de daño en el ADN. Este hallazgo sugiere que, a esta concentración, el TiO₂ tiene un impacto considerablemente mayor en la integridad del ADN, lo cual es preocupante dado su uso extendido en diversos productos de consumo diario.

En estudios similares, realizados con concentraciones de (5, 50 y 100 µg/ml) de TiO₂, se observó un aumento significativo de la cantidad de roturas en las cadenas del ADN, a través del aumento del 16% de ADN en cola, en comparación con los controles negativos (10% de ADN en cola). Asimismo, se reportó una translocación en la mucosa oral de porcinos, induciendo estrés oxidativo (Vignard et al., 2023).

En estudios de partículas presentes en el aditivo alimentario E-171 (TiO₂), se ha reportado que inducen la formación de ROS y daños en el ADN en líneas celulares Caco-2 y HCT116 derivadas de colon, asimismo, estos efectos dependen del tamaño de las partículas; las nanopartículas inducen la formación de ROS en el entorno celular, mientras que todas las partículas inducen daño en el ADN (>8% intensidad mediana de la cola) en comparación con el control (4% intensidad mediana de la cola). Este colorante es citotóxico en las células Caco-2 pero no tiene efectos tóxicos en cultivos celulares (Proquin et al., 2017)

En estudios recientes se ha informado que en concentraciones de 0.01, 0.1 y 0.7 mg/mL de partículas de TiO₂ de grado alimenticio, se presenta una resistencia a la disolución en el tracto gastrointestinal, de modo que llegan al intestino delgado sin cambios y, si son absorbidas por las células, no se degradan en condiciones lisosomales simuladas y hay biopersistencia del colorante en el líquido lisosomal, lo que confirma que existe un potencial de bioacumulación del TiO₂; por esta razón, la captación celular de este colorante por el epitelio intestinal depende del tamaño y del grado de aglomeración de estas partículas (Ferraris et al., 2023).

Sin embargo, (Liang et al., 2024) evaluaron los efectos genotóxicos del TiO₂ de grado alimenticio en tres concentraciones (250, 500, y 1000 mg/kg pc) y no encontraron aumento en las frecuencias de micronúcleos de médula ósea, ni aberraciones cromosómica en ratones, ni roturas de la cadena de ADN en células de hígado de rata, concluyendo que el colorante TiO₂ no tiene potencial genotóxico.

De igual modo, en investigaciones realizadas con *Lens culinaris* L. and *Allium cepa* L., se probaron tres concentraciones de TiO₂ (0.05, 0.1, 0.5, 1 and 2 g/L) y no se encontraron efectos genotóxicos ni citotóxicos estadísticamente significativos, por el contrario, se reportaron efectos positivos sobre la germinación (*L. culinaris*: entre 60-80%; *A. cepa*: >96%), el crecimiento de las plántulas, el desarrollo de las plantas y el rendimiento (*L. culinaris*: entre 60-80%; *A. cepa*: >96%; control: >80%) (Bellani et al., 2020).

El potencial de bioacumulación y la resistencia a la degradación del TiO₂ demostrados en estudios anteriores podrían explicar por qué no se observó un incremento en el daño al ADN en la concentración más alta (300µg) evaluada en el presente trabajo y en otros estudios que evaluaron dosis altas.

Otro punto a tener en cuenta es que se ha evidenciado que, en las mediciones con software de análisis de imagen, en dosis altas de exposición a agentes genotóxicos, no hay aumento en la longitud de la cola, pero sí una saturación del ADN (Rueda, 2017).

La evaluación del jugo comercial 1, que contiene Tartrazina y TiO_2 entre otros compuestos, reveló una actividad genotóxica dosis-respuesta. Los análisis mostraron cambios estadísticamente significativos en las variables indicadoras de daño en el ADN, incluso en concentraciones bajas en comparación con el control negativo. Estas alteraciones en el ADN pueden atribuirse a la sinergia entre los diferentes ingredientes del jugo, ya que contiene otros colorantes además de los mencionados.

En particular, la presencia de Tartrazina y TiO_2 , que como se mostró en este trabajo causan efectos genotóxicos, podría interactuar con otros aditivos del jugo para potenciar el daño al ADN. Este fenómeno de sinergia puede explicar por qué se observó una actividad genotóxica significativa incluso a bajas concentraciones. Los resultados sugieren que no solo los componentes individuales, sino también sus combinaciones, juegan un papel crucial en la genotoxicidad del producto.

El jugo comercial 2, que contiene Tartrazina, mostró un efecto genotóxico dosis-respuesta más pronunciado que los demás tratamientos, incluyendo los colorantes evaluados por separado. Los resultados indicaron que este jugo presentó valores de daño en el ADN significativamente mayores, reportando hasta el doble o el triple en las variables estudiadas en comparación con el control negativo.

La notable actividad genotóxica observada en el jugo comercial 2 sugiere que la combinación de Tartrazina con otros ingredientes en el jugo podría potenciar los efectos dañinos sobre el ADN. Este efecto sinérgico puede ser responsable del aumento significativo en el daño

genético, subrayando la importancia de estudiar las combinaciones de ingredientes en los productos comerciales.

Los resultados de este estudio destacan la necesidad de una evaluación rigurosa de los aditivos alimentarios en sus formas combinadas, no solo como componentes aislados. Los hallazgos sugieren que la Tartrazina y el TiO_2 , en conjunto con otros ingredientes del jugo, podría tener un impacto mucho mayor en la genotoxicidad de lo que se había anticipado basándose únicamente en estudios de sus componentes individuales.

Estos hallazgos son relevantes para la regulación y control de la seguridad alimentaria, subrayando la necesidad de una vigilancia más rigurosa y estudios adicionales sobre la interacción entre diferentes compuestos en productos consumidos ampliamente.

Conclusiones

La citotoxicidad de los dos colorantes no fue concluyente, ya que, en las concentraciones evaluadas, la viabilidad celular se mantuvo por encima del 80%.

Los parámetros usados para medir el daño, proporcionan resultados concisos y claros de las lesiones en el ADN causadas por agentes genotóxicos.

Los resultados obtenidos proporcionan evidencia sólida de que ambos colorantes (Tartrazina y TiO_2), y los jugos comerciales que los contienen, pueden inducir daño significativo al ADN en las concentraciones evaluadas que se encuentran dentro del rango de ingesta diaria aprobado para los mismos. Asimismo, se determinó que las concentraciones de $7\mu\text{g}$ (Tartrazina) y $200\mu\text{g}$ (TiO_2) causaron el mayor daño en el ADN.

En términos de biología y toxicología, estos hallazgos son importantes porque indican que los colorantes Tartrazina y TiO_2 , incluso en concentraciones relativamente bajas, pueden inducir daño al ADN. La magnitud del daño parece ser proporcional a la concentración del colorante, con concentraciones más altas produciendo un mayor efecto. Asimismo, se puede producir sinergia entre los diferentes ingredientes de los productos, aumentando el daño en el ADN.

Los colorantes evaluados están prohibidos en la Unión Europea por riesgos para la salud. Sin embargo, en Colombia se usan ampliamente en alimentos, medicamentos, y productos de higiene, lo que supone múltiples vías de exposición y un preocupante impacto en la salud pública.

Es esencial para los consumidores estar informados sobre los ingredientes contenidos en los productos que utilizan regularmente. La investigación continua y la regulación efectiva son

fundamentales para garantizar que estos compuestos se utilicen de manera segura y responsable en la fabricación de alimentos y productos de consumo personal.

Recomendaciones

Dada la evidencia de daño genotóxico, es importante que se reevalúe el uso de los colorantes Tartrazina y TiO_2 en productos alimenticios, farmacéuticos y de higiene personal, ya que, las concentraciones actualmente permitidas podrían no ser seguras para los consumidores.

Es necesario realizar estudios adicionales para comprender los mecanismos por los cuales la Tartrazina y TiO_2 causan daño al ADN. Los resultados indican que los productos que combinan múltiples colorantes, como los jugos comerciales evaluados, pueden tener efectos sinérgicos que aumentan el daño genotóxico. Se recomienda evaluar y regular estos productos combinados de manera más rigurosa.

Realizar investigaciones adicionales que incluyan estudios a largo plazo y con diferentes modelos biológicos para evaluar los efectos crónicos de la exposición, así como la ecotoxicología de estos colorantes.

Fomentar la investigación y desarrollo de colorantes alternativos que no presenten riesgos genotóxicos. Las empresas deberían explorar el uso de colorantes naturales que sean seguros para la salud humana.

Se debe exigir un etiquetado más claro y completo de los productos que contienen estos colorantes. Los consumidores tienen derecho a conocer los ingredientes y sus posibles efectos para tomar decisiones informadas sobre su consumo.

Referencias

- Al-Doaiss, A. A., Ali, D., Ali, B. A., & Jarrar, B. M. (2019). Renal histological alterations induced by acute exposure of titanium dioxide nanoparticles. *International Journal of Morphology*, 37(3), 1049–1057. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022019000301049>
- Amaral, D. F. Do. (2021). Efeitos genotóxicos, mutagênicos e comportamentais de nanopartículas de dióxido de titânio em girinos de *Dendropsophus minutus* (Hylidae, Anura). *Universidade Federal de Goiás*.
<http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/11774>
- American Chemistry Council. (2024). *Dióxido de titanio*. Chemical Safety Facts.
<https://es.chemicalsafetyfacts.org/chemicals/titanium-dioxide/>
- Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E., & Lee, F. D. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(8), 2281–2285. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.8.2281>
- Anderson, D., Yu, T. W., Phillips, B. J., & Schmezer, P. (1994). The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 307(1), 261–271. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90300-X](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90300-X)
- Arencibia, D. F., Rosario, L. A., & Curveco, D. L. (2009). Principal assays that to determine the cytotoxicity of a substance , some considerations and their utility. *Retel: Revista de Toxicología En Linea*, 39–52. <https://www.researchgate.net/publication/26844511>
- Argueta-Figueroa, L., Torres-Gómez, N., Scougall-Vilchis, R. J., & García-Contreras, R. (2018).

Biocompatibilidad y toxicidad de nanopartículas de dióxido de titanio en la cavidad oral: Revisión sistemática. *Investigación Clínica*, 59(4), 352–368.

<https://doi.org/10.22209/ic.v59n4a06>

Arredondo-Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa Microalgal*, July. <https://www.researchgate.net/publication/253237563>

Arroyave Rojas, J. A., Garcés Giraldo, L. F., Arango Ruiz, Á. de J., & Agudelo López, C. M. (2008). Tartrazine, a dye from the agro alimentary industry, degraded by advanced oxidation processes. *Revista Lasallista de Investigación*, 5(1), 20–27.

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-44492008000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=es

Ávalos-Soto, J., Treviño-Neávez, J. F., Verde-Star, M. J., Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, A., Moran-Martínez, J., Serrano-Gallardo, L. B., & Morales-Rubio, M. E. (2014). Cytotoxic evaluation of *Azadirachta indica* (A. Juss) ethanolic extracts against different cells lines. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 45(3), 39–44.

<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84975486264&partnerID=40&md5=d0ffbc02970704d24b56e12a09819b13>

Ayala, K. B., Pineda, J. A., Duarte, A. S., Soto, C. P., & Pineda, C. A. (2018). Toxicidad de los colorantes sintéticos: de lo global al Ecuador. *Biorrefinería*, 1(1), 40–48.

<https://www.ceba.org.ec/wp-content/uploads/2021/03/Biorrefinería-1-40-48.pdf>

Bailon-Moscoso, N., & Romero-Benavides, J. C. (2016). Genotoxicidad de los nanomateriales, grandes discrepancias y desafíos. *Revista de Toxicología*, 33(1), 8–15.

<https://www.redalyc.org/pdf/919/91946517002.pdf>

- Bellani, L., Muccifora, S., Barbieri, F., Tassi, E., Ruffini Castiglione, M., & Giorgetti, L. (2020). Genotoxicity of the food additive E171, titanium dioxide, in the plants *Lens culinaris* L. and *Allium cepa* L. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 849(August 2019), 503142.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2020.503142>
- Belmonte, J., Arroyo, I., Vázquez, M., Cruz, D., & Peña, E. (2016). Colorantes artificiales en alimentos. *Revista Naturaleza y Tecnología No. 10, 10*, 24–38.
- Cargnoni, G. I., & Fonovich, T. M. (2015). Colorantes utilizados en cosméticos y productos de higiene personal: análisis de productos y de la legislación vigente. *Bifase*, 25(1), 53–63.
https://www.researchgate.net/profile/Teresa_Fonovich/publication/275101036_Colorantes_utilizados_en_cosmeticos_y_productos_de_higiene_personal_analisis_de_productos_y_de_la_legislacion_vigente/links/5533382d0cf2f2a588b06b7d.pdf
- Cobo López-Páez, M. (2022). *Posibles efectos del dióxido de titanio sobre el desarrollo del sistema nervioso fetal*. <http://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/160217>
- Cornejo, M. (2023). *Procedimiento para determinar la concentración fitocelular de un cultivo mediante la utilización del instrumento biológico cámara de neubauer*.
- Cuoto, A. H. M. F. (2015). *Dióxido De Titânio: Estrutura, Propriedades E Aplicações*.
https://www.quimicatecnologica.bh.cefetmg.br/wp-content/uploads/sites/198/2022/07/TCC_Allyson_Couto_2014.pdf
- Denti, A. F., Bruel, G. M., Dallago, R. M., & Steffens, J. (2022). *Uso Da Fotocatálise Heterogênea Com Semicondutores Baseados Em Hidrotalcita E Dióxido De Titânio Para O Tratamento De Efluentes Com Corantes Use of Heterogeneous Photocatalysis With Semiconductors Based on Hydrotalcite and Titanium Dioxide for the Treatme.*

- Revista CIATEC-UPF*, 14(3), 75–92. <https://doi.org/10.5335/ciatec.v14i3.13838>
- Elwan, W. M., & Ibrahim, M. A. A. (2019). Effect of tartrazine on gastric mucosa and the possible role of recovery with or without riboflavin in adult male albino rat. *Egyptian Journal of Histology*, 42(2), 297–311. <https://doi.org/10.21608/EJH.2019.6312.1043>
- Evans, H. J., Neary, G. J., & Williamson, F. S. (1959). The Relative Biological Efficiency of Single Doses of Fast Neutrons and Gamma-rays on Vicia Faba Roots and the Effect of Oxygen: Part II. Chromosome Damage: The Production of Micronuclei. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine*, 1(3), 216–229. <https://doi.org/10.1080/09553005914550311>
- Ferraris, F., Raggi, A., Ponti, J., Mehn, D., Gilliland, D., Savini, S., Iacoponi, F., Aureli, F., Calzolari, L., & Cubadda, F. (2023). Agglomeration Behavior and Fate of Food-Grade Titanium Dioxide in Human Gastrointestinal Digestion and in the Lysosomal Environment. *Nanomaterials*, 13(13). <https://doi.org/10.3390/nano13131908>
- Focosi, D. (2014). *Counting chambers under light microscopy*. Cell Cultures. https://www.ufrgs.br/imunovet/molecular_immunology/cellculture.html
- Fonovich, T. M., Torres, M. G., Dario, S., Cargnoni, G. I., & Moschini, G. (2015). Exposición de seres humanos a alimentos y cosméticos que contienen colorantes: un estudio de encuestas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 49(3). http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572015000300010&lng=es&tlng=pt
- Gallego, A. (2023). Colorantes azoicos. Studocu. <https://www.studocu.com/ec/document/universidad-central-del-ecuador/quimica-organica-ii/colorantes-azoicos/93352284>

- Gallego, V., & Pérez, M. (2021). Estimación de la densidad celular mediante el uso de cámaras de recuento. *Universidad Politécnica de Valencia*, 9.
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/169378/GallegoPerez - Estimacion de la Densidad Celular.pdf>
- Gallegos-Hernandez, G. F. (2018). Ensayos colorimétricos para la detección de citotoxicidad. In *Vidsupra* (Vol. 10, Issue 1).
- Garcia-Diosa, J. A., & Camargo-Amado, R. J. (2021). Láminas de vidrio recubiertas con TiO₂-m y su efecto citotóxico sobre células leucémicas Molt4. *Ciencia En Desarrollo*, 12(1), 91–97. <https://doi.org/10.19053/01217488.v12.n1.2021.12819>
- Gutiérrez Antezana, A. F., & Lizárraga Hurtado, T. L. (2016). Efectos Sobre La Salud En Los Trabajadores Expuestos Al Dióxido de Titanio. *Medicina y Seguridad Del Trabajo*, 62(242), 79–95. <https://scielo.isciii.es/pdf/mesetra/v62n242/revision2.pdf>
- Haridevamuthu, B., Murugan, R., Seenivasan, B., Meenatchi, R., Pachaiappan, R., Almutairi, B. O., Arokiyaraj, S., K, K. M., & Arockiaraj, J. (2024). Synthetic azo-dye, Tartrazine induces neurodevelopmental toxicity via mitochondria-mediated apoptosis in zebrafish embryos. *Journal Of Hazardous Materials*, 461(132524).
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132524>
- Hidalgo Olmedo, B. G. (2022). Uso de colorantes alimentarios (artificiales y naturales) y su impacto en la salud: revisión literaria. *Repositorio Digital UNACH*.
<http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/9714>
- Ibañez, C., Torre, P., & Irigoyen, A. (2003). Ditivos alimentarios. *Universidad Pública Navarra*, 1–10. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/34481720/aditivos_1-libre.pdf?1408438698=&response-content-

disposition=inline%3B+filename%3DADITIVOS_ALIMENTARIOS.pdf&Expires=1685923442&Signature=Tqua7Ad0l5NndDdtkBO3xwlq7jnBSASOQtdCa44WLqZZoqvKbonPxJcBZ4OXz9YFxAePN3

Ibrahim, L., Diab, M., & Mohamed, S. (2024). Prophylactic Effect of Curcumin Against Long-Term and High-Dose Tartrazine-Induced Structural, Biochemical, and Genetic Alteration in Male Rats. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. C, Physiology and Molecular Biology*, 16(1), 365–386.

<https://doi.org/10.21608/eajbsc.2024.354812>

Juan, R. S. (2013). La química de los colorantes en los alimentos. *Química Viva*, 12, 234–246.

<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86329278005>

Khayyat, L., Essawy, A., Sorour, J., & Soffar, A. (2017). Tartrazine induces structural and functional aberrations and genotoxic effects in vivo. *PeerJ*, 2017(2), 1–14.

<https://doi.org/10.7717/peerj.3041>

Liang, C., Zhang, X., Fang, J., Sun, N., Liu, H., Feng, Y., Wang, H., Yu, Z., & Jia, X. (2024). Genotoxicity evaluation of food additive titanium dioxide using a battery of standard in vivo tests. *Regulatory Toxicology And Pharmacology*, 148(105586).

<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2024.105586>

Márquez-Ramírez, S. G., Delgado-Buenrostro, N. L., Chirino, Y. I., Iglesias, G. G., & López-Marure, R. (2012). Titanium dioxide nanoparticles inhibit proliferation and induce morphological changes and apoptosis in glial cells. *Toxicology*, 302(2–3), 146–156.

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.005>

Mathias-Rettig, K., & Ah-Hen, K. (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible. *Agro Sur*, 42(2), 57–66. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2014.v42n2-07>

Medina Arias, A. I. (2016). *Implicaciones sanitarias de los aditivos alimentarios*.

<http://hdl.handle.net/20.500.14352/66469>

Melo, G. S. R. de. (2016). Efeitos de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) sobre o crescimento e metabolismo antioxidante em plantas de soja (*Glycine max* L.).

Universidade Estadual de Maringá.

Ministerio de Salud. (1985). Resolución 10593 De 1985. *Resolucion 10593 de 1985*, 13.

<https://docs.supersalud.gov.co/PortalWeb/Juridica/OtraNormativa/R1059385.pdf>

Nassar, M. (2022). Cytological and chromosomal damages induced by tartrazine and two classes (III and IV) of caramel food dyes. *European Journal of Biological Research Research Article European Journal of Biological Research*, 12(1), 11–21.

<http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.5831912>

Orozco-Cerros, S. L., Barrera-Andrade, J. ., Valverde-Aguilar, G., & García-Macedo, J. A. (2010). Colorantes Azoicos. *Tecnología, Ciencia, Educación*, 1–10.

Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123(1), 291–298.

Pacheco, T. G. (2018). “DETERMINACION DE TARTRAZINA EN BEBIDAS CITRICAS ARTIFICIALES POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) Y SU EFECTO CITOTOXICO MEDIANTE ENSAYOS DE VIABILIDAD SOBRE LINEAS CELULARES DE CANCER.” Tesis presentada por la bachiller.

Repositorio UCSM. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/8169>

Pandrangi, R., Petras, M., Ralph, S., & Vrzoc, M. (1995). Alkaline single cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using bulheads and carp. *Environmental and Molecular*

Mutagenesis, 26, 345–356.

Parra, V. (2004). Estudio comparativo en el uso de colorantes naturales y sintéticos en alimentos, desde el punto de vista fuincional y toxicológico. *Repositorio Universidad Austral de Chile*.

Pélissier, A. L., Duffaut, F., De Méo, M. P., & Botta, A. (1996). Le test d'Ames: Application aux urines de fumeurs. *Revue de Medecine Interne*, 17(8), 635–639.

[https://doi.org/10.1016/0248-8663\(96\)87149-9](https://doi.org/10.1016/0248-8663(96)87149-9)

Potera, C. (2010). Forum The Artificial Food Dye Blues Invasion of the Bedbugs. *Environmental Health Perspectives*, 108(10), 428–431. <https://doi.org/10.1289/ehp.10716.6>.

Proquin, H., Rodríguez-Ibarra, C., Moonen, C. G. J., Urrutia Ortega, I. M., Briedé, J. J., de Kok, T. M., van Loveren, H., & Chirino, Y. I. (2017). Titanium dioxide food additive (E171) induces ROS formation and genotoxicity: contribution of micro and nano-sized fractions. *Mutagenesis*, 32(1), 139–149. <https://doi.org/10.1093/MUTAGE/GEW051>

Restrepo, M. (2007). Sustitución de colorantes en alimentos. *Lasallista de Investigación*, 4(1), 35–39.

Rodrigues, dos S. J., de Sousa Soares, L., Soares, B. M., de Gomes Farias, M., de Oliveira, V. A., de Sousa, N. A. B., Negreiros, H. A., da Silva, F. C. C., Peron, A. P., Pacheco, A. C. L., Marques, M. M. M., Gonçalves, J. C. R., Montenegro, R. C., Islam, M. T., Sharifi-Rad, J., Mubarak, M. S., de Melo Cavalcante, A. A. C., & de Castro e Sousa, J. M. (2022). Cytotoxic and mutagenic effects of the food additive tartrazine on eukaryotic cells. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 23(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40360-022-00638-7>

Rojas, E., Lopez, M. C., & Valverde, M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay:

- Methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 722(1–2), 225–254. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(98\)00313-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(98)00313-2)
- Rueda, T. L. V. (2017). Correlación de los parámetros del Ensayo Cometa y dosis de radiación ionizante en células mononucleares sanguíneas humanas expuestas in vitro en la evaluación del daño al ADN , Lima 2016. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.
- Ruiz de Arcaute, C., Laborde, M., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2021). Genotoxicidad y carcinogénesis. *Libros de Cátedra Principios de Ecotoxicología*.
<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/131176>
- Rydberg, B., & Johanson, K. J. (1978). Estimation of Dna Strand Breaks in Single Mammalian Cells. In *DNA Repair Mechanisms*. ACADEMIC PRESS, INC.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-322650-1.50090-4>
- Schuster, J. M., Laczeski, M. E., Rosenberger, M. R., & Schvezov, C. E. (2014). *Estudio in vitro de la citotoxicidad de nanopartículas de TiO 2*. October, 1–5.
<https://www.researchgate.net/publication/268147066>
- Silva, J. da. (2020). Análises ecotoxicológicas do azocorante alimentar amarelo tartrazina em ensaios de multigerações de Danio rerio (Piscis, Cyprinidae) E Daphnia similis (Crustacea, Cladocera). *UNESP*.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Siqueira, P. R. de. (2016). EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À NANOPARTÍCULA DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM HEPATÓCITOS DE PEIXE ZEBRA (Danio rerio, Hamilton, 1822). UMA ABORDAGEM IN VITRO. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11),

- 951–952., 5–24. [http://repo.iain-tulungagung.ac.id/5510/5/BAB 2.pdf](http://repo.iain-tulungagung.ac.id/5510/5/BAB%202.pdf)
- Soares, B. M., Araújo, T. M. T., Ramos, J. A. B., Pinto, L. C., Khayat, B. M., De Oliveira Bahia, M., Montenegro, R. C., Burbano, R. M. R. G., & Khayat, A. S. (2015). Effects on DNA repair in human lymphocytes exposed to the food dye tartrazine yellow. *Anticancer Research*, 35(3), 1465–1474. <https://ar.iiarjournals.org/content/35/3/1465>
- Standard Operating Procedures. (2013). Conteo celular y evaluación de viabilidad. *Laboratorio de Genómica Viral y Humana*, 1–5.
- http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_SPA.pdf
- Standardization, I. O. for. (2009). ISO 10993-5:2009(E) Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. *International Standard*, 3, 1–42.
- Strober, W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology / Edited by John E. Coligan ... [et Al.]*, Appendix 3, 2–3.
- <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>
- Tejs, S. (2008). The Ames test: a methodological short review. *Environmental Biotechnology*, 4(1), 7–14.
- Ulloa, C. L., Zavala De La Cruz, F., & Sisniegas, M. (2015). Efecto citotóxico de Tartrazina en el índice mitótico de células meristemáticas de *Allium cepa* Cytotoxic effect of Tartrazine in the mitotic index of meristematic cells of *Allium cepa*. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Biológicas*, 35(1), 43–48.
- <https://revistas.unitru.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/874/803>
- Vega-Cabanillas, R., Sisniegas, M., & Zavala De La Cruz, F. (2021). TARTRAZINE INDUCES GENOTOXICITY IN LYMPHOCYTES OF BALB/c *Mus musculus*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 38(4), 587–594.

<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2021.384.9356>

Vergara, C., Pino, M., Zamora, O., & Sandoval, A. M. (2022). Colorantes naturales en la industria de alimentos. *Boletín INIA*, 455, 27–49.

Vergara, G. A. P. (2010). Estandarización del ensayo cometa alcalino en células de sangre periférica. *Repositorio Pontificia Universidad Javeriana*.

Vignard, J., Pettes-Duler, A., Gaultier, E., Cartier, C., Weingarten, L., Biesemeier, A., Taubitz, T., Pinton, P., Bebeacua, C., Devoille, L., Dupuy, J., Boutet-Robinet, E., Feltin, N., Oswald, I. P., Pierre, F. H., Lamas, B., Mirey, G., & Houdeau, E. (2023). Food-grade titanium dioxide translocates across the buccal mucosa in pigs and induces genotoxicity in an in vitro model of human oral epithelium. *Nanotoxicology*, 17(4), 289–309.
<https://doi.org/10.1080/17435390.2023.2210664>

Villaño, D., García-Viguera, C., & Mena, P. (2015). Colors: Health Effects. *Encyclopedia of Food and Health*, 265–272. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00190-2>

Zalacain, M., Sierrasesúмага, L., & Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 227–236. <https://doi.org/10.4321/s1137-66272005000300007>

Anexos

Apéndice A

Tablas con los resultados del ensayo cometa de los tratamientos

Tabla 2

Promedio del daño inducido en el ADN de los linfocitos por diferentes concentraciones de Tartrazina, juntos con el control negativo (PBS) y el control positivo (H₂O₂ (5mg/ml))

Concentraciones	Comet Length (μm)	%DNA in Head	%DNA in Tail
Control negativo	73.43	97.723	4.632
Control positivo	114.73	84.841	15.256
Tartrazina 3 μg	79.56	86.879	13.434
Tartrazina 5 μg	96.58	85.406	14.879
Tartrazina 7 μg	101.80	82.315	15.191

Tabla 3

Promedio del daño inducido en el ADN de los linfocitos por diferentes concentraciones de TiO₂, junto con el control negativo (PBS) y el control positivo (H₂O₂ (5mg/ml))

Concentraciones	Comet Length (μm)	%DNA in Head	%DNA in Tail
Control negativo	73.43	97.723	4.632
Control positivo	114.73	84.841	15.256
TiO ₂ al 300μg	99.42	81.019	18.980
TiO ₂ al 200μg	180.61	70.298	25.701
TiO ₂ al 100μg	169.29	73.762	26.237

Tabla 4

Promedio del daño inducido en el ADN de los linfocitos por diferentes concentraciones de jugo 1, junto con el control negativo (PBS) y el control positivo (H₂O₂ (5mg/ml))

Concentraciones	Comet Length (μm)	%DNA in Head	%DNA in Tail
Control negativo	73.43	97.723	4.632
Control positivo	114.73	84.841	15.256
C1 25%	89.60	88.387	11.913
C2 50%	170.26	82.470	17.529
C3 100%	192.09	80.464	13.535

Tabla 5

Promedio del daño inducido en el ADN de los linfocitos por diferentes concentraciones de jugo 2, junto con el control negativo (PBS) y el control positivo (H_2O_2 (5mg/ml))

Concentraciones	Comet Length (μm)	%DNA in Head	%DNA in Tail
Control negativo	73.43	97.723	4.632
Control positivo	114.73	84.841	15.256
C1 25%	114.59	94.266	7.421
C2 50%	186.20	81.914	18.085
C3 100%	272.89	76.501	23.498

Apéndice B

Análisis estadísticos de la tartrazina

Código en Python:

<https://drive.google.com/file/d/1uAnUtOUW3v9qxuBQnnTlKEEBv81w2Cyp/view?usp=sharing>

Tabla 6

Prueba de Shapiro-Wilk para el tratamiento tartrazina y los controles positivo y negativo en las variables: Longitud del cometa, % de ADN en cabeza y % de ADN en cola

Factor	Concentraciones	P-valor	Estadístico de la prueba	Significancia
Longitud del cometa	3µg	0.5567	0.9939	No significativo
	5µg	0.0007	0.9732	Altamente significativo
	7µg	0.8484	0.9958	No significativo
	Control positivo	0.42857	0.99100	No significativo
	Control negativo	3.1859e-05	0.94718	Altamente significativo
	ANOVA	4.2838e-175	329.855	Altamente significativo
% de ADN en cabeza	3µg	0.00011	0.96814	Altamente significativo
	5µg	0.1565	0.98951	No significativo
	7µg	3.9845e-05	0.96380	Altamente significativo
	Control positivo	8.8468e-13	0.81478	Altamente significativo
	Control negativo	1.0841e-22	0.33228	Altamente significativo

	Kruskal-Wallis	4.7330-62	292.394	Altamente significativa
% de ADN en cola	3µg	0.00014	0.96904	Altamente significativo
	5µg	0.22611	0.99062	No significativo
	7µg	8.994e-05	0.96680	Altamente significativo
	Control positivo	1.3434e-05	0.94724	Altamente significativo
	Control negativo	1.0599e-22	0.33161	Altamente significativo
	Kruskal-Wallis	5.0707e-62	292.256	Altamente significativo

Tabla 7

Comparación del daño en los linfocitos humanos, de las diferentes concentraciones de Tartrazina con respecto a los controles

Prueba	Factor	Comparación	Concentraciones	P-valor	Significancia
Turkey	Longitud del cometa	Control negativo	3µg	0.0000	Altamente significativo
			5µg	0.0000	Altamente significativo
			7µg	0.0000	Altamente significativo
			3µg	0.0000	Altamente significativo
			Control positivo		

Mann-Whitney U	% de ADN en cabeza	Control negativo	5µg	0.0000	Altamente significativo
			7µg	0.0000	Altamente significativo
			3µg	5.1482e-43	Altamente significativo
		Control positivo	5µg	6.2725e-47	Altamente significativo
			7µg	1.2175e-38	Altamente significativo
			3µg	0.03264	Significativo
	% de ADN en cola	Control negativo	5µg	0.93371	No significativo
			7µg	0.0002	Altamente significativo
			3µg	5.1486e-43	Altamente significativo
		Control positivo	5µg	6.2730e-47	Altamente significativo
			7µg	1.2263e-38	Altamente significativo
			3µg	0.03543	Significativo

Control	5µg	0.96203	No significativo
positivo	7µg	0.00022	Altamente significativo

Apéndice C

Análisis estadísticos del TiO₂

Código en Python: <https://drive.google.com/file/d/1X1m2wA0xfaMD6yBOI-4DzKPTlpAHzXNH/view?usp=sharing>

Tabla 8

Prueba de Shapiro-Wilk para el tratamiento TiO₂ y los controles positivo y negativo en las variables: Longitud del cometa, % de ADN en cabeza y % de ADN en cola

Factor	Concentraciones	P-valor	Estadístico de la prueba	Significancia
Longitud del cometa	300µg	0.5567	0.9939	No significativo
	200µg	0.0007	0.9732	Altamente significativo
	100µg	0.8484	0.9958	No significativo
	Control positivo	0.42857	0.9910	No significativo
	Control negativo	3.1859e-05	0.9471	Altamente significativo
	ANOVA	4.2838e-175	329.85	Altamente significativo
% de ADN en cabeza	300µg	0.43177	0.9930	No significativo
	200µg	0.94612	0.99653	No significativo
	100µg	0.58904	0.99424	No significativo
	Control positivo	8.8468e-13	0.8147	Altamente significativo
	Control negativo	1.0841e-22	0.3322	Altamente significativo

	ANOVA	1.9747e-141	242.10	Altamente significativo
% de ADN en cola	300µg	0.43180	0.99307	No significativo
	200µg	0.94613	0.99653	No significativo
	100µg	0.58909	0.99424	No significativo
	Control positivo	1.3434e-05	0.94724	Altamente significativo
	Control negativo	1.0599e-22	0.33161	Altamente significativo
	ANOVA	1.9704e-153	272.17	Altamente significativo

Tabla 9

Comparación del daño en linfocitos humanos, de las diferentes concentraciones de TiO₂, respecto al control negativo y el control positivo (Prueba de Turkey)

Factor	Comparación	Concentraciones	P-valor	Significancia
Longitud del cometa	Control negativo	300µg	0.0000	Altamente significativo
		200µg	0.0000	Altamente significativo
		100µg	0.0000	Altamente significativo
	Control positivo	300µg	0.0006	Altamente significativo
		200µg	0.0000	Altamente significativo
		100µg	0.0000	Altamente significativo
	Control negativo	300µg	5.1482e-43	Altamente significativo
		200µg	6.2725e-47	Altamente significativo

% de		100µg	1.2175e-38	Altamente significativo
ADN en	Control	300µg	0.03264	Significativo
cabeza	positivo	200µg	0.93371	No significativo
		100µg	0.0002	Altamente significativo
	Control	300µg	5.1486e-43	Altamente significativo
% de	negativo	200µg	6.2730e-47	Altamente significativo
ADN en		100µg	1.2263e-38	Altamente significativo
cola	Control	300µg	0.03543	Significativo
	positivo	200µg	0.96203	No significativo
		100µg	0.00022	Altamente significativo

Apéndice D

Análisis estadísticos del Jugo 1

Código en Python: https://drive.google.com/file/d/18TOvm7s-NNOOKv93PNFQ-Bbz48_PYd6i/view?usp=sharing

Tabla 10

Prueba de Shapiro-Wilk para el tratamiento jugo 1 y los controles positivo y negativo en las variables: Longitud del cometa, % de ADN en cabeza y % de ADN en cola

Factor	Concentraciones	P-valor	Estadístico de la prueba	Significancia
Longitud del cometa	100%	0.0004	0.9752	Altamente significativo
	50%	8.4678e-06	0.9721	Altamente significativo
	25%	0.5958	0.9961	No significativo
	Control positivo	0.42857	0.9910	No significativo
	Control negativo	3.1859e-05	0.9471	Altamente significativo
	Kruskal-Wallis	3.6081e-213	990.74	Altamente significativo
% de ADN en cabeza	100%	1.3530e-08	0.9357	Altamente significativo
	50%	9.0806e-05	0.9780	Altamente significativo
	25%	2.8985e-07	0.9647	Altamente significativo
	Control positivo	8.8468e-13	0.8147	Altamente significativo
	Control negativo	1.0841e-22	0.3322	Altamente significativo

	Kruskal-Wallis	8.0102e-84	393.24	Altamente significativo
% de ADN en cola	100%	1.0714e-08	0.9346	Altamente significativo
	50%	9.0789e-05	0.9780	Altamente significativo
	25%	9.6033e-07	0.9680	Altamente significativo
	Control positivo	1.3434e-05	0.9472	Altamente significativo
	Control negativo	1.0599e-22	0.3316	Altamente significativo
	Kruskal-Wallis	7.0057e-84	393.51	Altamente significativo

Tabla 11

Comparación del daño en los linfocitos humanos, de las diferentes concentraciones de jugo 1, con respecto a los controles (Prueba de Mann-Whitney U)

Factor	Comparación	Concentraciones	P-valor	Significancia
Longitud del cometa	Control negativo	100%	2.289e-59	Altamente significativo
		50%	2.346e-65	Altamente significativo
		25%	4.746e-37	Altamente significativo
	Control positivo	100%	1.566e-61	Altamente significativo
		50%	7.079e-60	Altamente significativo
		25%	9.445e-53	Altamente significativo
	Control negativo	100%	8.861e-53	Altamente significativo
		50%	1.646e-60	Altamente significativo

% de		25%	2.345e-48	Altamente significativo
ADN en	Control	100%	0.04147	Significativo
cabeza	positivo	50%	0.00147	Muy significativo
		25%	2.0371e-05	Altamente significativo
	Control	100%	8.9967e-53	Altamente significativo
% de	negativo	50%	1.6465e-60	Altamente significativo
ADN en		25%	2.3452e-48	Altamente significativo
cola	Control	100%	0.04029	Significativo
	positivo	50%	0.00114	Muy significativo
		25%	2.2522e-05	Altamente significativo

Apéndice E

Análisis estadísticos del Jugo 2

Código en Python: <https://drive.google.com/file/d/1fz6y1PgsGnfrBqt9dXqu4p-GszSiYkQS/view?usp=sharing>

Tabla 12

Prueba de Shapiro-Wilk para el tratamiento jugo 2 y los controles positivo y negativo en las variables: Longitud del cometa, % de ADN en cabeza y % de ADN en cola

Factor	Concentraciones	P-valor	Estadístico de la prueba	Significancia
Longitud del cometa	100%	0.3671	0.9609	No significativo
	50%	0.0505	0.9890	Marginalmente
	25%	0.0109	0.9812	Significativo
	Control positivo	0.42857	0.9910	No significativo
	Control negativo	3.1859e-05	0.9471	Altamente significativo
	ANOVA	3.3479e-280	847.00	Altamente significativo
% de ADN en cabeza	100%	0.1750	0.9478	No significativo
	50%	0.0024	0.9819	Muy significativo
	25%	3.0680e-11	0.8807	Altamente significativo
	Control positivo	8.8468e-13	0.8147	Altamente significativo
	Control negativo	1.0841e-22	0.3322	Altamente significativo

	Kruskal-Wallis	6.1585e-103	481.67	Altamente significativo
% de ADN en cola	100%	0.1750	0.9478	No significativo
	50%	0.0022	0.9817	Muy significativo
	25%	3.2184e-11	0.8811	Altamente significativo
	Control positivo	1.3434e-05	0.9472	Altamente significativo
	Control negativo	1.0599e-22	0.3316	Altamente significativo
	Kruskal-Wallis	1.9655e-99	465.46	Altamente significativo

Tabla 13

Comparación del daño en los linfocitos humanos, de las diferentes concentraciones del jugo 2, con respecto a los controles

Prueba	Factor	Comparación	Concentraciones	P-valor	Significancia
Turkey	Longitud del cometa	Control negativo	100%	0.0000	Altamente significativo
			50%	0.0000	Altamente significativo
			25%	0.0000	Altamente significativo
			100%	1.0000	No significativo
			50%	0.0000	Altamente significativo
			positivo		

Mann-Whitney U	% de ADN en cabeza	Control negativo	25%	0.0000	Altamente significativo
			100%	6.8356e-17	Altamente significativo
			50%	3.7076e-57	Altamente significativo
			25%	1.2460e-14	Altamente significativo
			100%	3.9533e-17	Altamente significativo
			50%	4.5332e-05	Altamente significativo
			25%	5.4832e-27	Altamente significativo
			100%	0.6394	No significativo
			50%	3.0333e-57	Altamente significativo
			25%	1.2405e-14	Altamente significativo
	% de ADN en cola	Control positivo	100%	9.8671e-17	Altamente significativo

	50%	3.1707e-05	Altamente significativo
	25%	5.6770e-27	Altamente significativo

Apéndice F

Matriz de correlación de Pearson

Código en Python: <https://drive.google.com/file/d/1nnBq8seCiK7fovFvAoepytsU-KOOtp85l/view?usp=sharing>