

## Universidad Católica de Santa María

### Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**“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:

**Pacheco Torreblanca, Georgia Janette**

para optar el Título Profesional de:

**Química Farmacéutica**

**Asesor de tesis:**

Jeaneth Medina Pérez M.Sc.

**Arequipa – Perú**

**2018**

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA  
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas  
y Biotecnológicas  
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20180000020148

N° Trámite en Fac. 1747-2018

Fecha 20-04-2018

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: **PACHECO TORREBLANCA, Georgia Janette**

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

**"DETERMINACION DE TARTRAZINA EN BEBIDAS CITRICAS ARTIFICIALES POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) Y SU EFECTO CITOTXICO MEDIANTE ENSAYOS DE VIABILIDAD SOBRE LINEAS CELULARES DE CANCER"**

DICTAMINADORES: 1) **Dr. José Villanueva Salas** 2) **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad  
Atentamente

Firmas :



(Devolver antes de 8 días hábiles)

Fecha 25 de abril del 2018

ASESOR: **Mgter. Jeaneth Medina Perez**

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como Asesora en el presente Trabajo de Investigación, cumpro con informar que este se ha desarrollado de acuerdo a los objetivos trazados y se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.  
Atentamente

Firma



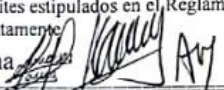
Fecha 03 de Julio del 2018

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Dr. José Villanueva Salas**
- 2) **Mgter. Angélica Corzo Salas**
- 3) **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por los recurrente, y luego de haber verificado el cumplimiento de los objetivos, la redacción del informe, de los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.  
Atentamente

Firma



(Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha 29/08/2018

JURADOS: Presidente

**Dr. José Villanueva Salas**

Vocal

**Mgter. Angélica Corzo Salas**

Secretario

**Mgter. Julitza Paredes Fuentes**

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 11/09/18 Hora: 19.00 Local: C- 402 (SUM)



DECANO

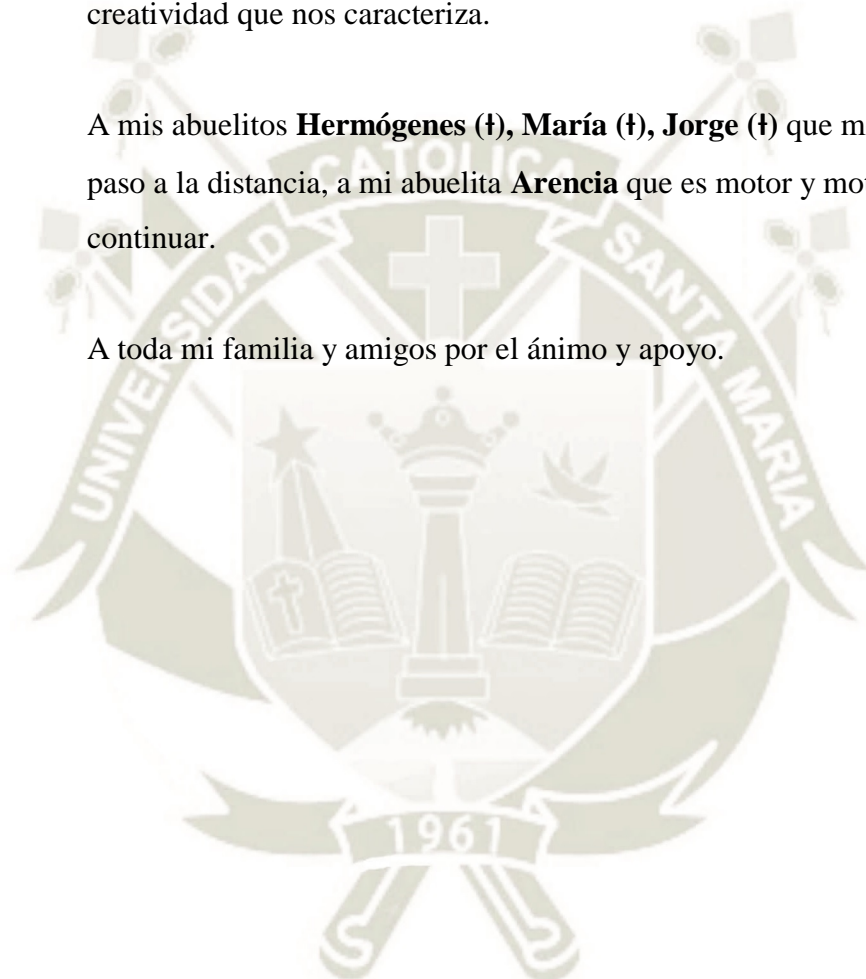
## DEDICATORIA

A mis padres **Hermes (†)** y **Gaby**, por todo, porque sin su ayuda y paciencia no sería lo que soy.

A mis Hermanos **Noelia** y **Moisés**, por tanto compartido, y por el ingenio y creatividad que nos caracteriza.

A mis abuelitos **Hermógenes (†)**, **María (†)**, **Jorge (†)** que me guían cada paso a la distancia, a mi abuelita **Arencia** que es motor y motivo para continuar.

A toda mi familia y amigos por el ánimo y apoyo.



## AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por la oportunidad de vida que a diario recibo.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas y al Massachusetts College of Pharmacy and Health Sciences (MCPHS University) porque gracias a su convenio se pudo desarrollar parte del presente trabajo de investigación.

Agradecer de manera especial al Dr. Timothy Maher, por el gran apoyo que me brindó, al Dr. Alejandro Pino por compartir su experiencia y conocimiento, y al Master Alejandro Rondón por la colaboración y ánimos, gracias.

Al Laboratorio “Proyecto Mercurio” de la Universidad Católica de Santa María, por ser el centro de desarrollo de ésta tesis, en especial al Dr. José Villanueva Salas por la paciencia, confianza, enseñanzas dadas en todo este tiempo, muchas gracias.

A la Dra. Angélica Corzo Salas, porque gracias a su tenacidad, perseverancia y apoyo, pude aprovechar de diversas oportunidades durante mi formación académica.

A la Master Julitza Paredes Fuentes y la Master Jeaneth Medina Pérez, muchas gracias por el apoyo incondicional, paciencia, enseñanza y amistad.

**Muchas Gracias**

**INTRODUCCION**

**RESUMEN**

**ABSTRACT**

**HIPOTESIS**

**OBJETIVOS**

**INDICE GENERAL**

**CAPITULO I**

<b>MARCO TEORICO</b> .....	1
1. Aditivos de color alimentario	
1.1. Colorantes naturales .....	2
1.2. Colorantes artificiales	
1.2.1. Colorantes Azoicos	
A. Tartrazina .....	4
A.1. Síndrome de Hiperactividad y Déficit de Atención	
A.2. Toxicidad .....	6
A.3. Reglamentación para Tartrazina .....	7
2. Estudio en Línea Celulares .....	8
2.1. Cultivo Celular	
2.2. Línea Celular .....	9
2.3. Viabilidad Celular	
3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) .....	10
3.1. Partes del HPLC .....	11
3.2. Tipos de Cromatografía .....	13
3.2.1. Cromatografía de Fase Normal	
3.2.2. Cromatografía de Fase Reversa	
3.2.3. Cromatografía de Par Iónico .....	14

**CAPITULO II**

<b>PLANTEAMIENTO OPERACIONAL</b> .....	15
1. Campo de Verificación	
1.1. Ubicación Espacial	

1.2. Unidades de Estudio	
1.3. Unidades Biológicas	
2. Técnicas, Instrumentos y Materiales de Verificación .....	16
2.1. Materiales y Reactivos	
2.2. Metodología y Análisis .....	18
2.2.1. Recolección de Muestras	
2.2.2. Desarrollo del Método Cromatográfico para la determinación de Tartrazina ..	
2.2.3. Validación del Método Cromatográfico para la determinación de Tartrazina	
A. Validación	
2.2.4. Determinación de Tartrazina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución .....	21
A. Preparación de la solución estándar	
2.2.5. Ensayos de Viabilidad Celular .....	22
A. Preparación del estándar de Tartrazina para ensayos celulares	
B. Preparación de los Medios de Cultivo	
2.2.6. Cultivo Celular	
2.2.7. Conteo de Células Viables .....	24
2.2.8. Efecto de la Tartrazina sobre la viabilidad celular ...	
2.2.9. Determinación de la viabilidad celular por MTS .....	25
3. Estrategia de recolección de Datos	
3.1. Análisis Estadístico .....	26

### CAPITULO III

<b>RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>27</b>
1. Recolección de Muestras	
2. Desarrollo del Método Cromatográfico para la determinación De Tartrazina	
2.1. Preparación de la Solución Estándar .....	28
2.2. Preparación de la Fase Móvil .....	29
2.3. Condiciones Óptimas para la determinación de Tartrazina	

por HPLC .....	30
2.4. Validación del Método para la determinación de Tartrazina	
por HPLC .....	32
2.4.1. Linealidad	
2.4.2. Precisión .....	33
2.4.3. Exactitud .....	35
2.4.4. Límite de Detección y Límite de Cuantificación .....	36
2.5. Tratamiento de Muestras .....	38
3. Determinación de Tartrazina en Bebidas Cítricas Artificiales	
4. Ensayos de Viabilidad Celular .....	43
4.1. Preparación del estándar de Tartrazina para ensayos celulares .....	
4.2. Cultivo Celular .....	44
4.3. Líneas Celulares .....	46
4.4. Viabilidad Celular	
4.4.1. Conteo de Células Viables	
4.5. Efecto de la Tartrazina sobre la viabilidad celular .....	47
<b>CONCLUSIONES</b> .....	50
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	52
<b>ANEXOS</b> .....	58

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura química de la Tartrazina.....	4
Figura 1.2. Estructura del tetrazolio MTS y su producto Formazan.....	9
Figura 1.3. Esquema del sistema de HPLC.....	13
Figura 3.1. Picos de Tartrazina con diferentes columnas.....	28
Figura 3.2. Posible mecanismo de unión entre RP-18e y CTAB.....	30
Figura 3.3. Cromatograma de muestra y estándar.....	31
Figura 3.4. Tiempo de retención de la Tartrazina.....	32
Figura 3.5. Curva de calibración para la linealidad.....	33
Figura 3.6. Área versus Concentración.....	37
Figura 3.7. Desviación estándar versus Concentración	
Figura 3.8. Determinación de Tartrazina en bebidas cítricas artificiales del Lote N°1.....	39
Figura 3.9 Determinación de Tartrazina en bebidas cítricas artificiales del Lote N°2	
Figura 3.10. Determinación de Tartrazina en bebidas cítricas artificiales del Lote N°3.....	40
Figura 3.11. Comparación de lotes de la Marca N°1.....	41
Figura 3.12. Comparación de lotes de la Marca N°2	
Figura 3.13. Comparación de lotes de la Marca N°3.....	42
Figura 3.14. Línea Celular HT1376 (ATCC® CRL-1472™).....	45
Figura 3.15. Línea Celular PC3 (ATCC® CRL-1435™)	
Figura 3.16. Línea Celular Hep G2 [HEPG2](ATCC® HB-8065™)	
Figura 3.17. Pellet de Células luego de centrifugado en.....	46
Figura 3.20. Efecto de la Tartrazina sobre la viabilidad celular en células HT1376 (ATCC® CRL-1472™).....	47
Figura 3.21. Efecto de la Tartrazina sobre la viabilidad celular en células PC3 (ATCC® CRL-1435™).....	48
Figura 3.22. Efecto de la Tartrazina sobre la viabilidad celular en células Hep G2 [HEPG2](ATCC® HB-8065™)	

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Relación de Colorantes Azoico .....	3
Tabla 2.1 Líneas Celulares y su medio de crecimiento .....	23
Tabla 3.1. Columnas utilizadas para la identificación de Tartrazina .....	28
Tabla 3.2 .Datos para determinar la linealidad .....	33
Tabla 3.3. Datos para determinar la precisión .....	34
Tabla 3.4.Datos para determinar la Precisión Intermedia	
Tabla 3.5. Precisión esperada (repetibilidad) como una función de concentración de analito .....	35
Tabla 3.6. Método de recuperación	
Tabla 3.7.La recuperación prevista como una función de la concentración de analito .....	36
Tabla 3.8.Niveles mínimos y máximos de Tartrazina en las concentraciones de Marcas de Bebidas Cítricas Artificiales .....	43
Tabla 3.9. Concentraciones de Tartrazina para ensayos celulares .....	44
Tabla 4.1. Análisis de Varianza entre Marcas .....	58
Tabla 4.2. Análisis de Varianza entre Lotes de la Marca N°1	
Tabla 4.3. Análisis de Varianza entre Lotes de la Marca N°2 .....	59
Tabla 4.4. Análisis de Varianza entre Lotes de la Marca N°3	
Tabla 4.5. Reporte del Análisis de Varianza y Dunnett de la línea celular HT1376 (ATCC® CRL-1472™) .....	60
Tabla 4.6. Reporte del Análisis de Varianza y Dunnett de la línea celular PC3 (ATCC® CRL-1435™) .....	61
Tabla 4.7. Reporte del Análisis de Varianza y Dunnett de la línea celular Hep G2 [HEPG2](ATCC® HB-8065™) .....	62
Tabla 4.8. Data de todas las determinaciones de muestras por HPLC .....	63

## INTRODUCCION

El color de los alimentos ha sido un punto clave de la evaluación de la calidad sensorial a lo largo de la historia de la humanidad. Con la llegada de los alimentos procesados, la coloración de alimentos ha ganado aún más valor. Los consumidores creen que la coloración de alimentos debe ser lo más natural posible y "natural" no necesariamente significa "comestible"<sup>(1)</sup>.

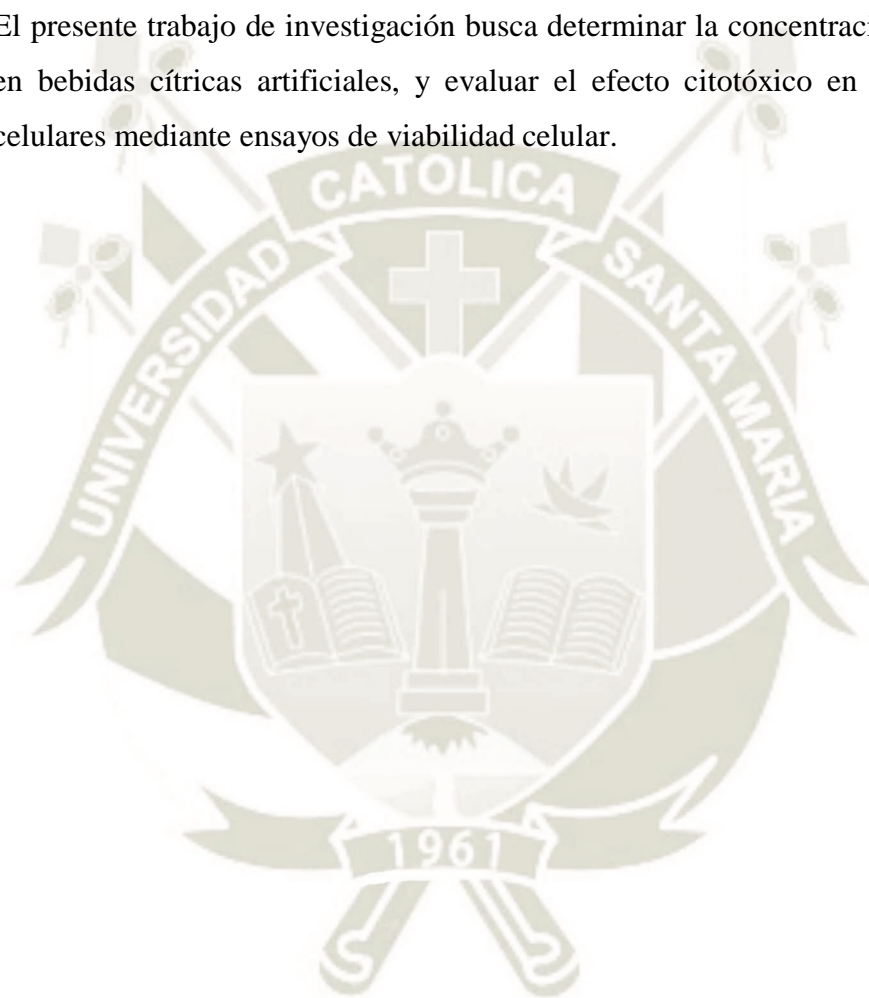
El rápido avance de la industria alimentaria lleva a un número cada vez mayor de productos específicos con cierta forma, color, sabor, olor, textura, etc. Con el objetivo de mejorar la organoléptica y propiedades de la comida. Los colorantes desempeñan un papel importante, ya que la calidad de los alimentos y el sabor a menudo se asocian con su color<sup>(2)</sup>.

La Tartrazina (E 102, FD y C Yellow) es un polvo de color naranja, que es aplicado a los productos para producir un color amarillo limón, en cuanto a sus efectos secundarios, se ha encontrado que diferentes dosis de Tartrazina causan efectos adversos que conducen a daño hepatocelular, alteraciones reproductivas, genotoxicidad de los linfocitos e inflamación del revestimiento del estómago

Además, una serie de efectos indeseables en el sistema nervioso, incluyendo ansiedad, migrañas, depresión clínica, visión borrosa y trastornos del sueño, y sobretodo podría causar déficit de aprendizaje y memoria<sup>(3)</sup>.

La exposición dietética a Tartrazina a partir de los niveles máximos permitidos (MPL) de uso, se calculó una exposición diaria máxima teórica de 8.1 mg / kg pc / día para adultos, y 13.1 mg / kg pc / día para un niño típico de 3 años, sabiendo que la IDA es de 7.5 mg/ kg pc/ día y que el nivel máximo permisible es de 100 mg/L<sup>(4)</sup>.

El presente trabajo de investigación busca determinar la concentración de Tartrazina en bebidas cítricas artificiales, y evaluar el efecto citotóxico en diferentes líneas celulares mediante ensayos de viabilidad celular.



## RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo principal determinar la concentración de Tartrazina en bebidas cítricas artificiales por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y su efecto citotóxico mediante ensayos de viabilidad sobre líneas celulares de cáncer, con tal fin se desarrolló una nueva metodología para determinar la concentración de Tartrazina en bebidas cítricas artificiales promoviendo la formación de pares iónicos entre la Tartrazina y el N-Cetil-N,N,N-trimetilamonio bromuro (CTAB). Se validó el método presentando linealidad con un  $R^2 = 0.9995$ , una precisión con C.V% que oscilan entre 0.21 – 3.25 %, la exactitud obtuvo una recuperación de 97.82 %, datos aceptables por la AOAC y un LDD de 0.51 y un LDC de 0.62 mg/L.

Se determinó la concentración de Tartrazina en bebidas cítricas artificiales en 27 muestras, 3 muestras por lote, 3 lotes por cada marca, siendo 3 marcas analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), teniendo un tiempo de retención de 3.14 minutos y un rango de concentraciones que oscilan entre 99.99 mg/L – 178.47 mg/L, estando resultados por encima de los niveles permisibles de la Directiva 94/36/CE del Parlamento Europeo y del Consejo que es de 100 mg/L a excepción de una muestra que fue de 99.99 mg/L.

En cuanto a la evaluación del efecto citotóxico de la Tartrazina mediante ensayos de viabilidad sobre líneas celulares, se evaluaron los efectos en las líneas celulares HT1376, PC3 y Hep G2, evidenciándose que existe una disminución de la viabilidad

celular estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) comparada entre el control y las concentraciones 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM y 1 mM de Tartrazina, a excepción de la comparación entre el control y la concentración de 0.001 mM en la línea celular Hep G2 que no mostró una diferencia estadística significativa.

***PALABRAS CLAVE:*** Tartrazina, HPLC, Bebidas Cítricas Artificiales, Colorantes Azo, Viabilidad Celular.



### ABSTRACT

The main objective of the present study was to determine the concentration of Tartrazine in artificial citrus beverages by high performance liquid chromatography (HPLC) and the cytotoxic effect by viability assays on cancer cell lines, for this purpose a new methodology was developed to determine the concentration of Tartrazine in artificial citrus beverages promoting the formation of ion pairs between Tartrazine and N-Cetyl-N, N, N-trimethylammonium bromide (CTAB). The method was validated presenting linearity with a  $R^2 = 0.9995$ , an accuracy with CV% ranging between 0.21 - 3.25%, the accuracy obtained a recovery of 97.82%, data acceptable by the AOAC and an LDD of 0.51 and a LDC of 0.62 mg / L.

The concentration of Tartrazine in artificial citrus drinks was determined in 27 samples, 3 samples per batch, 3 batch per brand, with 3 brands analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), having a retention time of 3.14 minutes and a range of concentrations ranging between 99.99 mg / L - 178.47 mg / L, with results above the permissible levels of Directive 94/36 / EC of the European Parliament and of the Council which is 100 mg / L a exception of a sample that was 99.99 mg / L.

Concerning the evaluation of the cytotoxic effect of Tartrazine by viability assay on cell lines, the effects on the cell lines HT1376, PC3 and Hep G2 were evaluated, evidencing that there is a statistically significant decrease in cell viability ( $p < 0.05$ )

compared between the control and the concentrations 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM and 1 mM of Tartrazine, except for the comparison between the control and the concentration of 0.001 mM in the Hep G2 cell line that did not show a significant statistical difference.

**KEY WORDS:** *Tartrazine, HPLC, Artificial Citrus Drinks, Azo Dyes, Cell Viability.*



### **HIPOTESIS**

Dado que la Tartrazina “Trisodium (4E)-5-oxo-1-(4-sulfonatophenyl)-4-[(4-sulfonatophenyl)hydrazono]-3-pyrazolecarboxylate” es ampliamente utilizada en bebidas cítricas artificiales con la finalidad de mejorar sus características de consumo y apariencia y produce efectos dañinos para la salud, es probable que la Tartrazina añadida a bebidas cítricas artificiales supere los niveles de ingesta admisibles autorizados además de presentar efectos citotóxicos in vitro en diferentes líneas celulares.

## OBJETIVOS

- Desarrollar una nueva metodología para determinar la concentración de Tartrazina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en bebidas cítricas artificiales.
- Validar el método para determinar la cantidad de Tartrazina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Determinar la concentración de Tartrazina en bebidas cítricas artificiales mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- Evaluar el efecto citotóxico mediante ensayos de viabilidad sobre líneas celulares.
- Comparar y analizar los resultados obtenidos con los parámetros establecidos.

## CAPITULO I MARCO TEORICO

### 1. ADITIVOS DE COLOR ALIMENTARIOS

Los aditivos de color han sido por mucho tiempo una parte de la cultura humana. Los arqueólogos datan colores cosméticos hasta 5000 a. C. Las escrituras egipcias antiguas refieren el uso de colorantes de drogas y los historiadores estiman que los colores de los alimentos probablemente surgieron alrededor de 1500 a. C. El color es un criterio esencial para la elección de alimentos. Los pigmentos que colorean los alimentos habitualmente son inestables y se transforman durante el procesamiento. Para mantener la uniformidad del color del producto, los colorantes, se agregan intencionalmente a los productos alimenticios. La industria alimentaria usa colorantes sintéticos para mejorar la calidad estética de un producto alimenticio. El mercado de aditivos alimentarios naturales ha estado creciendo de manera extensa desde el siglo pasado, la producción mundial total de colorantes se estima en 80 000 000 toneladas por año.

Los colores alimentarios sintéticos se producen por síntesis química completa o por modificación química de varios compuestos precursores y, por lo tanto, están en contraste con los colores alimentarios naturales, que generalmente se purifican. Los colorantes sintéticos se dividen en cinco clases: los compuestos azoicos (como el amaranto y la Tartrazina), los derivados de chinophthalon de Quinoline Yellow, el grupo triarilmetano, xantenos (como la eritrosina) y los colorantes añil<sup>(5, 6)</sup>.

Como todos estos colores están autorizados como aditivos alimentarios en la UE, se ha estimado su seguridad para el consumo humano. Se han asignado ingestas diarias admisibles (IDA) para todos los colores, y se discute la base toxicológica para el establecimiento de las IDA correspondientes para todos los colores de alimentos sintéticos<sup>(7)</sup>.

### 1.1. COLORANTES NATURALES

Los alimentos, en particular las frutas y las verduras, están coloreados de forma natural especialmente por cuatro grupos de pigmentos: las clorofilas verdes, los carotenoides amarillo-naranja-rojo, las antocianinas rojo púrpura y la betanina roja. Los colorantes naturales son habitualmente menos estables, más costosos, no se utilizan tan fácilmente como los colores artificiales, demandan más material para obtener un color equivalente y poseen una gama limitada de tonalidades. Estos compuestos han fascinado una atención considerable en los últimos años, no por sus propiedades colorantes, sino por sus posibles efectos promotores de la salud<sup>(8)</sup>. En la actualidad, el uso del colorante natural está prosperando en todo el mundo como una alternativa al colorante sintético o artificial como un método ecológico<sup>(9)</sup>.

### 1.2. COLORANTES ARTIFICIALES

Los colorantes artificiales son como los colorantes naturales, y la única diferencia entre los dos es que se originan por síntesis química, por lo tanto no pueden encontrarse de forma natural. Originalmente fueron elaborados a partir de alquitrán de hulla y ahora se consiguen a partir de productos de petróleo altamente purificados. El grupo de colorantes orgánicos sintéticos está compuesto por colorantes azo-tintes, xantano, chinilina y antraquinón, que generalmente tienen un color más intenso y permanente que las sustancias naturales, no dan ningún sabor a los productos y son más estables<sup>(10)</sup>.

#### 1.2.1. COLORANTES AZOICOS

Peter Griess, químico alemán, en 1858, sintetizó el primer colorante azoico, el p-aminoazobenceno, que se conoce como amarillo de anilina, los

colorantes azoicos son sintetizados en el laboratorio desde hace varios años por la industrias, la clase de compuestos azo representa el 60-70 % de todos los colorantes, poseen nitrógeno en anillos aromáticos, contienen un grupo azo,  $-N = N-$ , un grupo cromóforo. Dos compuestos orgánicos son necesarios para la fórmula general de un colorante azoico. Uno de ellos es el componente vinculante y el otro es el componente diazo, la mayoría de los colorantes azo contienen solo un grupo azo, pero algunos contienen dos (disazo), tres (trisazo) o más.

Los colorantes azoicos pueden sintetizarse debido a la disponibilidad y al bajo costo de las moléculas de partida. El requerimiento de energía para las reacciones es bajo, por lo que puede ocurrir un amplio rango de reacciones químicas a temperatura ambiente. Estos colorantes se usan en textiles y alimentos y contienen todo los colores del arco iris prácticamente. Los autorizados son pocos respecto a los naturales y paulatinamente han perdido vigencia por considerárseles dañinos para la salud<sup>(11-13)</sup>.

**Tabla N° 1.1 Relación de Colorantes Azoicos.**  
**COLORANTES SINTETICOS AZOICOS**

---

Tartrazina (E102)
Rojo allura AC (E129)
Amarillo anaranjado S o amarillo sol FCF (E110)
Negro brillante BN (E151)
Azorrubina, carmoisina (E122)
Marrón FK (E154)*
Amaranto (E123)
Marrón HT (E155)*
Rojo cochinilla A o rojo Ponceau 4R (E124)
Litol Rubina BK (E180)**
Rojo 2G (E128)*

---

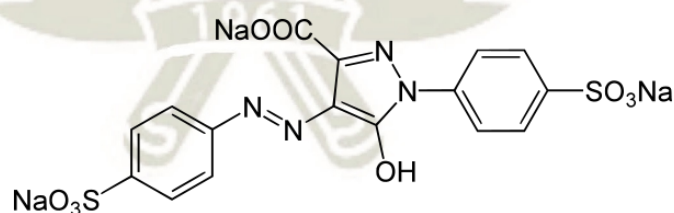
*Fuente: Tabla adecuada según Sánchez<sup>(14)</sup>.*

Los colorantes azoicos sintéticos más utilizados los podemos observar en la tabla N° 1.1, donde el colorante que encabeza es e la Tartrazina, \*El “Rojo 2G”, “Marrón FK” y “Marrón HT” se utilizan, entre los países desarrollados, prácticamente sólo en el Reino Unido. \*\* “Litol Rubina BK” se utiliza exclusivamente para teñir la corteza de algunos quesos.

### A. TARTRAZINA

Tartrazina (nombre químico: sal trisódica del ácido 4,5-dihidro-5-oxo1-(4-sulfofenil) -4- [4-sulfofenil-azo] -1H-pirazol-3-carboxílico) , es el derivado del alquitrán de carbón<sup>(15)</sup>, es un aditivo de color permitido para su uso en alimentos y bebidas, suplementos dietéticos, productos farmacéuticos y otros productos de consumo en todo el mundo<sup>(16)</sup>.

Se sabe que la Tartrazina induce ataques de asma y urticaria en niños (la FDA de los EE. UU. Estima 1 / 10.000). Además, está relacionado con tumores tiroideos, daño cromosómico e hiperactividad<sup>(17)</sup>, trastornos del sueño<sup>(18)</sup>, también la Tartrazina puede causar agregación de proteínas (una característica de varias enfermedades neurodegenerativas) en cualquier proteína cuando la proteína es de naturaleza catiónica (ejemplo: mioglobina catiónica)<sup>(19)</sup>.



*Figura 1.1. Estructura química de la Tartrazina.*

#### A.1. SINDROME DE HIPERACTIVIDAD Y DEFICIT DE ATENCION

Una de las controversias más actuales en el campo de los colorantes artificiales en comida se refiere a su efecto sobre el comportamiento

de los niños. Aunque la idea de que las alergias alimentarias o hipersensibilidades conducen a problemas de comportamiento y aprendizaje se remonta a la década de 1920, una hipótesis específica con respecto a esta relación no se desarrolló hasta la década de 1970. En 1973, el Dr. Benjamin Feingold presentó un artículo en la reunión anual de la Asociación Médica Estadounidense, planteando que la hiperactividad pediátrica y los problemas de aprendizaje se debían a algunos alimentos y aditivos alimentarios. Con base en sus propias observaciones clínicas, opinaba que sus pacientes a menudo eran sensibles a los alimentos que contienen salicilatos naturales, colorantes artificiales y sabores, y diseñó una dieta (la dieta “Kaiser Permanente” o “KP”) libre de estas sustancias. En 1977, Feingold también eliminó 2 conservantes (butilhidroxitolueno e hidroxianisol butilado, que también pensó que conducían a la hiperactividad y aseveró que del 60 al 70 % de los niños que trató mejoraron. Son varios los estudios realizados donde se muestran los efectos de síndrome de hiperactividad y déficit de atención<sup>(20-22)</sup>.

La preocupación por sus efectos en la salud humana, especialmente en los niños, es un problema comprometido cuando se consumen productos alimenticios visiblemente atrayentes como algodón de azúcar, refrescos, chips con sabor, cereales (copos de maíz, muesli, etc.), mezclas de tortas, sopas y salsas, algo de arroz, helado, goma de mascar, mermelada y jalea es más alta en la población más joven.

En 1984, el International Clinical Nutrition Review publicó un artículo que resume varios estudios pequeños realizados entre escolares de Estados Unidos durante los años 1970 y 1980, en los que se proponía un vínculo causal entre los colorantes alimentarios artificiales y los trastornos del comportamiento. En 2004, Bateman et al., advirtieron efectos adversos generales de comportamiento y psicológicos con colorantes alimentarios artificiales en niños en edad

preescolar en un estudio establecido en la población. Del mismo modo, hay informes sobre la hiperactividad relacionada con la Tartrazina en los niños<sup>(23)</sup>.

## **A.2. TOXICIDAD**

Sisley y Porscher llevaron a cabo los primeros estudios sobre el metabolismo de compuestos azoicos en mamíferos en 1911, y hallaron ácido sulfanílico en la orina de perros alimentados con Naranja I, demostrando por primera vez que los compuestos azoicos podrían metabolizarse por escisión reductora del azo grupo. Los efectos mutagénicos, carcinogénicos y tóxicos de los tintes azo pueden ser el resultado de la acción directa del propio compuesto o la formación de radicales libres y derivados de aril amina formados durante la biotransformación reductiva del enlace o incluso causado por productos obtenidos después de la oxidación a través del citocromo P450. Uno de los discernimientos utilizados para clasificar un tinte como nocivo para los humanos es su capacidad para escindirse de manera reductiva, y como consecuencia generar aminas aromáticas cuando entran en contacto con el sudor, la saliva o los jugos gástricos. Algunas de tales aminas aromáticas son carcinogénicas y pueden acumularse en las cadenas alimenticias, por ejemplo, las bifenilaminas como la bencidina y la 4-bifenilamina, que están presentes en el medio ambiente y forman una amenaza para la salud humana y los ecosistemas en general. Posteriormente de que un colorante azo se ingiere por vía oral, puede reducirse a aminas aromáticas libres por microflora intestinal anaeróbica y posiblemente por azo reductasa de mamífero en la pared intestinal o el hígado<sup>(24)</sup>.

Tras la exposición oral o cutánea a colorantes azoicos, las personas pueden posteriormente exponerse a productos de biotransformación obtenidos por la acción de microorganismos intestinales o de otros presentes en la piel, o debido a reacciones en el hígado. Por lo tanto,

es enormemente importante estudiar las vías metabólicas de los colorantes azoicos que pueden contaminar el medio ambiente, a fin de comprender el espectro general de los efectos tóxicos. Las vías metabólicas que realmente alcanzan los tintes azo dependen de varios factores, tales como, el modo de administración; el grado de absorción del tracto gastrointestinal después de la ingestión oral; la extensión de la excreción biliar, particularmente después de la exposición a rutas diferentes a la oral; diferencias genéticas en la aparición y actividad de los sistemas de enzimas reductoras hepáticas; diferencias en la flora intestinal; y la actividad relativa y la especificidad de los sistemas hepático e intestinal, especialmente los responsables de reducir el enlace azo, y todos estos factores están interrelacionados<sup>(25)</sup>.

Los colorantes azoicos se comportan como xenobióticos y, por lo tanto, inmediatamente de la absorción, se distribuyen por todo el cuerpo, donde ejercen algún tipo de acción o están sujetos al metabolismo. La biotransformación puede originar compuestos menos nocivos, pero también puede crear xenobióticos bioactivos. Las principales vías involucradas en la biotransformación de los colorantes son la oxidación, reducción, hidrólisis y conjugación, que son catalizadas por enzimas, pero en humanos, las reducciones biológicas y las oxidaciones de los colorantes azoicos son responsables de la posible presencia de aminos tóxicos en el organismo<sup>(24, 25)</sup>.

### **A.3. REGLAMENTACION DE TARTRAZINA**

En los Estados Unidos, está aprobado como un aditivo colorante “FD & C” (Food, Drug and Cosmetic) listado con el nombre FD & C Yellow No. 5 en el Código de Regulaciones Federales (21 CFR 74.705) y está sujeto a la certificación de lotes. En la Unión Europea (UE), está aprobado como aditivo de color con E número 102 (E102) e internacionalmente es un color de alimento aprobado enumerado en

el Codex Alimentarius con sistema de numeración internacional (INS) número 102 (SIN 102). La Tartrazina fue evaluada actualmente por su seguridad como aditivo alimentario por el Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) en su reunión de 2016 (JECFA, 2016). Fue evaluado previamente por organismos europeos, incluido el Comité Científico de la Alimentación de la UE (SCF) en 1975 y 1984 y por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en 2009 y 2013 (EFSA, 2009; Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, 2013). Hasta hace poco, JECFA y SCF habían establecido una Ingesta Diaria Admisible (IDA) de 7.5 mg / kg de peso corporal (pv) / día para Tartrazina, basada en una dosis NOAEL equivalente a 7.50 mg / kg pc / día derivada de un estudio de toxicidad crónica en ratas, sin embargo el valor en Estados Unidos bajo a 5 mg/Kg, además la Directiva 94/36/CE del Parlamento Europeo y del Consejo normó que para bebidas sin alcohol el nivel máximo permisible es 100mg/ L<sup>(16, 26)</sup>.

Al Congreso de la República del Perú se presentó el Proyecto de ley N° 165/2011-CR, “Ley que Prohíbe el uso de la sustancia química Tartrazina en productos alimenticios destinados al consumo humano” , proyecto que no fue aceptado, sin embargo DIGESA emitió un comunicado especificando claramente que todo producto que contenga la mencionada sustancia química, consignan en el rotulado en forma clara, específica, destacada, visible e indubitable, con letra mayúscula y negrita la frase siguiente: **CONTIENE TARTRAZINA**<sup>(27, 28)</sup>.

## 2. ESTUDIOS EN LINEAS CELULARES

### 2.1. CULTIVO CELULAR

El cultivo celular se refiere a la eliminación de células de un animal o planta y su posterior crecimiento en un entorno artificial propicio. Las células pueden eliminarse del tejido directamente y desagregarse por medios enzimáticos o mecánicos antes del cultivo, o pueden derivarse de una línea celular o cepa

celular que ya se ha establecido. El cultivo primario se refiere a la etapa del cultivo después de que las células se aíslan del tejido y proliferan en las condiciones apropiadas hasta que ocupan todo el sustrato disponible. En esta etapa, las células tienen que subcultivarse (es decir, pasarse) transfiriéndolas a un nuevo recipiente con medio de crecimiento fresco para proporcionar más espacio para el crecimiento continuo. Se pueden derivar de una línea celular o cepa celular que ya se ha establecido<sup>(29)</sup>.

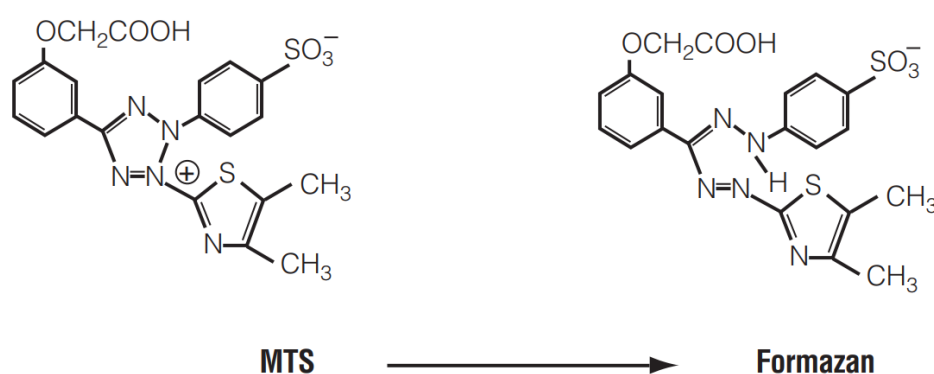
## 2.2. LINEAS CELULARES

Una línea celular es un cultivo celular establecido permanentemente que proliferará indefinidamente dado el medio fresco y el espacio adecuados. Las líneas difieren de las cepas celulares en que se immortalizan.

El cultivo celular y las líneas celulares han ocupado un papel importante en el estudio de los procesos fisiológicos, fisiopatológicos y de diferenciación de células específicas. Permite el examen de alteraciones graduales en la estructura, biología y composición genética de la célula en ambientes controlados<sup>(30)</sup>.

## 2.3. VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular es la proporción de células que sobreviven a alguna situación particular, es decir, la viabilidad celular puede ser juzgada por cambios morfológicos o por cambios en la permeabilidad de la membrana y / o estado fisiológico inferido a partir de la exclusión de ciertos colorantes o la captación y retención de otros<sup>(31)</sup>.



*Figura 1.2 Estructuras del tetrazolio MTS y su producto formazan.*<sup>(32)</sup>

El ensayo de proliferación celular es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad. El reactivo contiene un nuevo compuesto de tetrazolio [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) -2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolio, sal interna; MTS]. El compuesto de tetrazolio MTS (reactivo de Owen) se bioreduce mediante células en un producto de formazan coloreado que es soluble en medio de cultivo tisular. Los ensayos se realizan adicionando una pequeña cantidad directamente a los pocillos de cultivo, incubando durante 1-4 horas y luego registrando la absorbancia a 490 nm con un lector de placas de 96 pocillos. La cantidad de producto de formazan, medida por absorbancia a 490 nm, es directamente proporcional al número de células vivas en cultivo<sup>(32)</sup>.

### 3. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

La cromatografía se puede especificar como la separación de mezclas por distribución entre dos o más fases inmiscibles. La invención de la cromatografía está acreditada al botánico Mikhail Tswett en 1902 por su estudio detallado de la adsorción selectiva de pigmentos de hojas en diversos adsorbentes. Las primeras separaciones basadas en columnas realizadas en un entorno industrial verdadero se pueden expresar mejor mediante la purificación de petróleo en la tierra de Fuller en la década de 1920. La década de 1950 marcó el desarrollo de la cromatografía en lecho móvil simulado (SMB) para la separación de sacarosa y fructosa en la industria azucarera. La primera separación cromatográfica preparativa verdadera a alta presión no llegó hasta la década de 1980 después de la invención de columnas basadas en compresión axial dinámica (DAC). El aumento en la escala de HPLC preparativa, incitada principalmente por la invención de DAC, dio como resultado una demanda proporcional de fases estacionarias de alta calidad, dando como resultado un desplazamiento de los medios basados en sílice irregulares crudos hacia las partículas esféricas. Los cromatografistas, como Gregor Mann, Henri Colin, Geoff Cox y Roger Nicoud han sido implacables en la arena del modelado de procesos y la optimización para separaciones preparativas. En las compañías farmacéuticas, biotecnológicas y agroquímicas hay una fuerza impulsada por el mercado para llevar los productos más rápido que ha permitido que el HPLC preparativo encuentre su propio nicho<sup>(33)</sup>.

La cromatografía líquida (LC), que es una de las formas de cromatografía, es una técnica analítica que se manipula para separar una mezcla en una solución en sus componentes individuales. LC se emplea para describir cualquier procedimiento cromatográfico en el que la fase móvil es un líquido.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es el término utilizado para describir LC en el que la fase móvil líquida se bombea mecánicamente a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Un instrumento de HPLC, por lo tanto, consiste en un inyector, una bomba, una columna y un detector<sup>(34)</sup>.

Se ha avanzado una variedad de modos cromatográficos sobre la base de los mecanismos de retención y operación. Los modos cromatográficos clave son fase normal, fase inversa, intercambio iónico, exclusión por tamaño y cromatografía de afinidad. Hay una variedad de aplicaciones de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)<sup>(35)</sup>.

Un instrumento de cromatografía líquida de alto rendimiento consiste en contenedores de eluyente, bomba, dispositivo de inyección, columna, detector, contenedor de desechos y estación de datos<sup>(36)</sup>.

### 3.1. PARTES DEL HPLC

**Depósito de fase móvil:** Se trata de un reservorio o varios reservorios para los disolventes. Sirve para des gasificar y eliminar partículas en suspensión de los disolventes que interfieren formando burbujas en los sistemas de detección<sup>(37)</sup>.

**Bomba:** Se usan bombas para impulsar a la fase móvil y deben cumplir los siguientes requisitos: Deben vencer altas presiones, proporcionar caudales estables, deben estar libres de pulsaciones y tener volúmenes muertos pequeños, deben estar construidas de materiales resistentes a la presión y a las agresiones químicas, fácil manejo y mantenimiento<sup>(37)</sup>.

**Inyector:** Un inyector de HPLC permite la introducción de un volumen de muestra preciso en la columna. Se inyecta una solución de muestra en el bucle usando una jeringa de punta roma en la posición de *carga*. La muestra se inyecta en la columna al cambiar la válvula a *inyectar*. El tamaño típico del bucle de muestra externo oscila entre 6  $\mu\text{L}$  y 2 mL<sup>(38)</sup>.

**Columna:** Es en donde se da la separación de los analitos. Los aspectos generales relacionados con la construcción de la columna HPLC incluyen una discusión sobre el cuerpo externo de la columna, las dimensiones de la columna, los tipos de fase estacionaria (partículas, monolito) y las características físicas y químicas de la fase estacionaria (sílice frente a materiales de embalaje poliméricos)<sup>(39)</sup>.

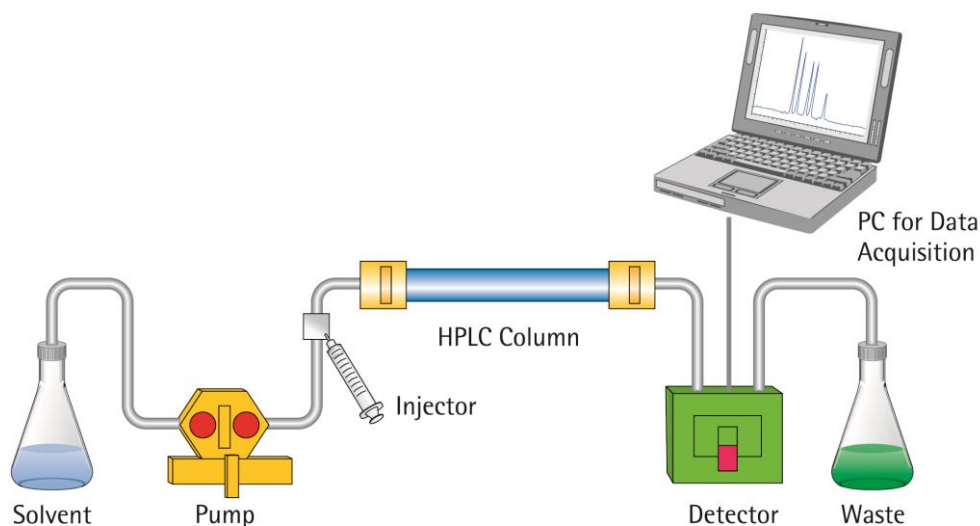
**Detector:** Un detector de HPLC es a menudo un espectrofotómetro modificado equipado con una pequeña celda de flujo, que monitorea la concentración (o masa) de analitos eluidos. Al pasar el efluente de la columna a través del detector, algunas propiedades químicas o físicas del analito se traducen a una señal eléctrica, y los solutos se controlan a medida que se eluyen de la columna.

El detector de absorbancia UV / Vis controla la absorción de luces UV o visibles por analitos en el eluyente de HPLC. Son frecuentes porque la mayoría de los productos tienen absorbancia en esta región<sup>(38, 40)</sup>.

**Recopilación y salida de datos:** Los dispositivos de manejo de datos cromatográficos comprenden desde un registrador de gráficos en banda, un integrador, una estación de trabajo basada en PC hasta un sistema de red cliente-servidor. La mayoría de las estaciones de trabajo de manejo de datos basadas en PC también incorporan control total e instrumental del sistema HPLC, incluidos los de otros fabricantes.

Un dispositivo de recolección y salida de datos está conectado a la salida electrónica del detector. El dispositivo de recogida de datos toma la señal

electrónica producida por el detector y emite un gráfico de respuesta en función del tiempo. Este cromatograma resultante puede evaluarse para información tanto cualitativa como cuantitativa<sup>(38, 40)</sup>.



*Figura 1.3 Esquema general del Sistema de HPLC<sup>(41)</sup>.*

## 3.2. TIPOS DE CROMATOGRAFIA

### 3.2.1. CROMATOGRAFIA DE FASE NORMAL

La cromatografía de fase normal se puede realizar sobre sílice no modificada que separa los analitos de acuerdo a su polaridad intrínseca, también se puede operar en gradiente isocrático, escalonado o modo de elución en gradiente, donde la fase de retención móvil contiene disolventes orgánicos menos polares y la fase de elución móvil radica en disolventes orgánicos más polares<sup>(42)</sup>.

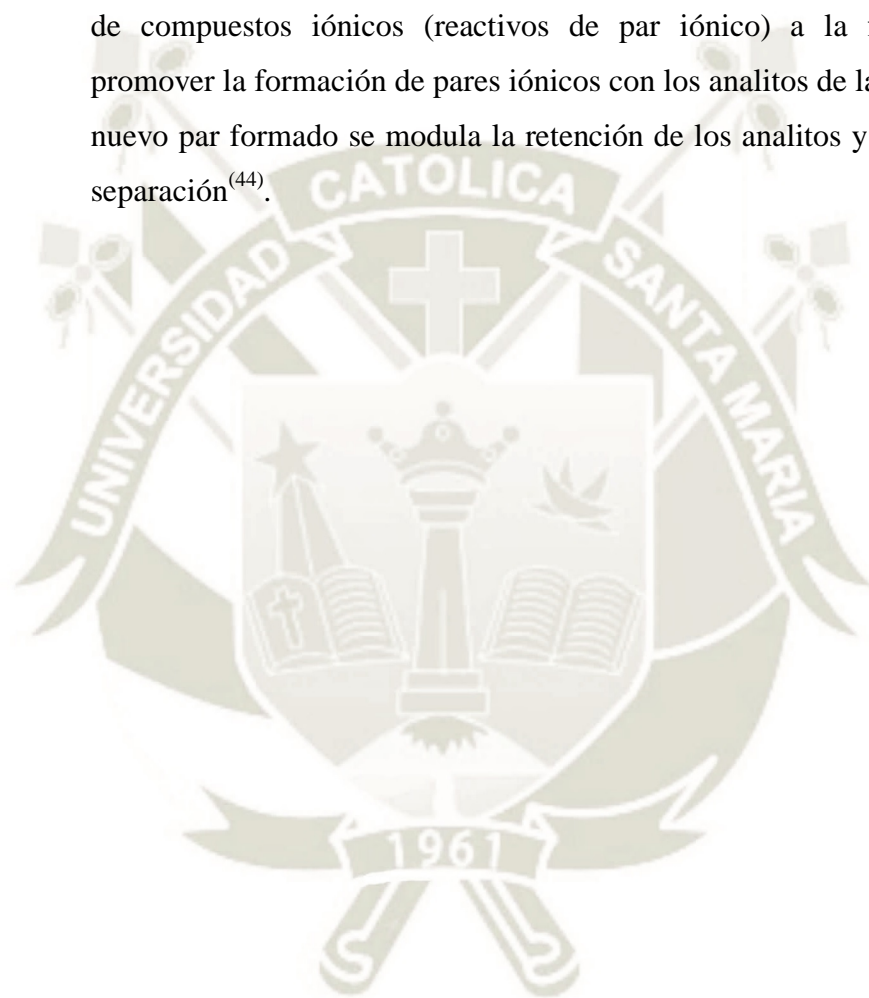
### 3.2.2. CROMATOGRAFIA DE FASE REVERSA

Todas las formas de cromatografía de líquidos son métodos de migración diferencial, donde los componentes de la muestra son selectivamente retenidos por una fase estacionaria y eluidos secuencialmente mediante el cambio de polaridad de la fase móvil. En la cromatografía de fase reversa

(RPC) se utiliza un empaque hidrofóbico, comúnmente un grupo funcional octadecilo u octilo y una fase móvil polar<sup>(43)</sup>.

### 3.2.3. CROMATOGRAFIA DE PAR IONICO

La Cromatografía de Par Iónico se utiliza para separar analitos iónicos en HPLC con columna de fase inversa. Esta cromatografía se basa en la adición de compuestos iónicos (reactivos de par iónico) a la fase móvil para promover la formación de pares iónicos con los analitos de la muestra. Con el nuevo par formado se modula la retención de los analitos y así se mejora su separación<sup>(44)</sup>.



## CAPITULO II PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

### 1. CAMPO DE VERIFICACION

#### 1.1. UBICACION ESPACIAL

En el presente trabajo, los ensayos viabilidad celular de investigación se realizaron en los laboratorios de post-grado de *School of Pharmaceutical Sciences de Massachusetts College of Pharmacy and Health Science - University* (MCPHS University), Boston, USA.

El desarrollo del método cromatográfico se llevó a cabo en las instalaciones de la Universidad Católica de Santa María, pabellón H-202 Laboratorio de Investigación Docente “Proyecto Mercurio” en el departamento de Arequipa, Perú.

#### 1.2. UNIDADES DE ESTUDIO

Para la investigación se utilizaron bebidas cítricas artificiales escogidos de supermercados de la ciudad de Arequipa.

#### 1.3. UNIDADES BIOLÓGICAS

Se utilizó 3 líneas de células humanas de:

- Cáncer de vejiga HT1376 (ATCC® CRL-1472™)
- Cáncer de próstata PC3 (ATCC® CRL-1435™)

- Cáncer de hígado Hep G2 [HEPG2](ATCC® HB-8065™)

Dichas células estuvieron almacenadas en una cámara de nitrógeno líquido a una temperatura de  $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$  en los laboratorios de investigación del Massachusetts College of Pharmacy and Health Science – University, Boston USA.

Las líneas celulares se reconstituyeron y se mantuvieron por incubación en medio de cultivo necesarios para su crecimiento y proliferación a condiciones apropiadas.

## 2. TECNICAS, INSTRUMENTOS Y MATERIALES DE VERIFICACION

La técnica analítica que se utilizó para la determinación de Tartrazina en bebidas cítricas artificiales fue la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)<sup>(17, 45)</sup>.

### 2.1. MATERIAL Y REACTIVOS

#### *EQUIPOS*

- Cámara de flujo laminar de presión positiva (Esco®, Class II Type A2)
- Microscopio invertido (Olympus®, CKX31)
- Celulómetro o contador de células (Nexcelum bioscience®, autot4 )
- Espectrofotómetro con lector de 96 celdas (Biotek Synergy HT)
- Equipo de centrifugación (Fisherscientific®, Marathon 16KM)
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) LaChrom, con una bomba L-7100, Interfase D-7000, inyector manual de  $20\text{ }\mu\text{L}$  (loop) y detector UV L-7400 Merck HITACHI®.
- Balanza Pionner™ 0.1 mg – 210 g (OHAUS®)
- Balanza Sartorius Basic<sup>lite</sup> 0.01 mg – 220 g
- Equipo EASYPURE II®
- pH metro (Methrom®)
- Equipo de desgasificación (Merck®)

#### *REACTIVOS*

- Estándar de Tartrazina  $\geq 99\%$  HPLC (Fluka)

- Solución de trypan blue (Sigma Aldrich)
- Buffer Fosfato Salino – PBS
- Eagle Modified Essential Medium - EMEM (ATCC®)
- Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium -F12K® (ATCC®)
- Medio Dulbecco Modified Eagle – DMEM (ATCC®)
- Tripsina-EDTA - Trypsin-EDTA Solution, 1X (ATCC®\_30-2101™)
- Suero fetal de bovino – Fetal Bovine Serum (FBS)(ATCC® 30-2020™)
- Penicilina-estreptomicina
- [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt - MTS-assay (ATCC®)
- Acetonitrilo de grado HPLC (Tedia ®)
- N-Cetil-N,N,N-trimetilamonio bromuro - CTAB (Merck®)

#### ***MATERIAL DE VIDRIO***

- Probeta de 500 mL, 250 mL.
- Pipetas de 1mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL
- Fiolas de 5 mL, 100 mL, 250 mL
- Vasos precipitados de 50 mL, 100 mL
- Pesa filtros
- Tubos de ensayo
- Reservorios de 500 mL

#### ***OTROS***

- Columna Chromolith RPe-18, 10 cm
- Micropipeta de 5 uL, 10 uL, 100 uL, 200 uL, 1000 uL
- Propipeta
- Frascos para cultivo celular descartables de 70 mL
- Tubos cónicos descartables
- Filtros anotop PTFE modificado para filtración de solventes orgánicos
- Viales
- Tips o punteras blancas y amarillas

- Jeringa de tuberculina
- Guantes de nitrilo
- Barbijo, gorro y mandil de laboratorio

## 2.2. METODOLOGIA Y ANALISIS

### 2.2.1. RECOLECCION DE MUESTRAS

Se realizó un muestreo de 3 marcas comerciales en los diferentes supermercados de la ciudad de Arequipa, por cada marca 3 lotes diferentes y por cada lote se recolectaron 3 muestras.

### 2.2.2. DESARROLLO DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA LA DETERMINACION DE TARTRAZINA

Antes de validar el método cromatográfico, se hicieron pruebas con tres tipos de columna y diferentes fases móviles para la identificación de Tartrazina, una vez elegido la columna y la fase móvil adecuada se procedió a la validación respectiva.

### 2.2.3. VALIDACION DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA LA DETERMINACION DE TARTRAZINA

La Validación es el factor clave para controlar la fiabilidad de un método, justificar que el método es confiable.

Para evaluar los parámetros de la validación del método analítico se utilizó estándar de Tartrazina con pureza  $\geq 99$  % HPLC (Sigma).

#### A. VALIDACION

**Linealidad:** La linealidad es un parámetro que permite comprobar si el método es idóneo para detectar solamente el principio activo en una mezcla determinada. Luego de preparar la curva de calibración con los datos obtenidos, se establece la ecuación lineal:

$$Y = a + bx$$

Y el coeficiente de regresión lineal R. Posteriormente se grafica la curva de calibración de la concentración versus el área, utilizando estos datos se calcula la pendiente (b); el intercepto (a) y el coeficiente de regresión lineal, se plantea un criterio de aceptación mínimo de 0.995 para r y de 0.990 para  $r^2$ ; así mismo el valor de  $r=1$  muestra una curva perfectamente línea, una  $r=1$  indica una curva perfecta con pendiente negativa, y una  $r=0$  la no correlación entre X y Y<sup>(46, 47)</sup>.

**Exactitud:** Mide el grado de constancia entre los valores obtenidos y el valor verdadero. La exactitud del método también conocida como error sistemático o tendencia corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero obtenido matemáticamente, también puede denominarse recuperación

$$\text{Recuperación} = \frac{\bar{X}}{\hat{X}} \cdot 100$$

Dónde:

$\bar{X}$  = Valor obtenido

$\hat{X}$  = Valor verdadero

Se toma en cuenta valores adecuados aquellos que estén entre el 70 % y 90 %.

Puede utilizarse uno t de student para determinar si el valor medio no difiere mucho del aceptado, calculando la t experimental para varias determinaciones de muestras conocidas, lo cual se compara con la t de tablas para n-1 grados de libertad y generalmente  $p=0.05$ , la ecuación es:

$$t_{exp} = \frac{[100 - R]\sqrt{n}}{RSD}$$

Dónde:

R= Recuperación porcentual

n= número de análisis

RSD= desviación estándar relativa

Si el  $t_{exp}$  es menor que el  $t$  de tablas, no existe diferencia significativa y la exactitud es apropiada<sup>(48, 49)</sup>.

**Precisión:** Está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio y concierne al grado de concordancia de los resultados de la prueba, cuando el método se emplea repetidamente a múltiples alícuotas de una muestra homogénea.

La precisión se midió en condiciones repetitivas (mismo analista y mismo día) como también en condiciones reproducibles (diferente analista, diferente día). Éste método se expresa matemáticamente como la desviación estimada o estándar (RSD) o el coeficiente de variación (CV).

El estimado de la desviación estándar (S) se calcula:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Dónde:

n = número de medidas

$X_i$  = valor medido en el ensayo  $i$

$\bar{X}$  = estimador de la medida poblacional

La RSD se calcula con la siguiente ecuación:

$$RSD = \frac{S \times 100}{\bar{X}} \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

La desviación estándar relativa permite calcular el error aleatorio correspondiente a la dispersión de datos en torno de la media. La UPS

señala una RSD del sistema de no más del 2 %, inyectando 5 veces la solución estándar.

**Límite de Detección y Límite de Cuantificación:** Los límites pueden ser estimados a partir de la curva de regresión, por la extrapolación a concentración cero, para lo cual se determina la pendiente (b) en la curva de calibración.

Se extrapola la respuesta a concentración cero, obteniéndose un estimado de la respuesta del blanco ( $Y_{bi}$ ). Se determina la desviación estándar correspondiente a cada concentración, se calcula la recta entre la concentración versus S y se extrapola nuevamente a concentración cero, obteniéndose la desviación estándar del blanco ( $S_{bi}$ ).

Se determina el límite de detección, 3 desviaciones estándar para el blanco y el límite de cuantificación, 10 desviaciones estándar para el blanco; para  $n'$  medidas individuales.

Para ello se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$\text{Límite de detección} = \frac{Y_{bi} + 3S_{bi}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{Y_{bi} + 10S_{bi}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n'}}$$

#### 2.2.4. DETERMINACION DE TARTRAZINA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

##### A. PREPARACION DE LA SOLUCION ESTANDAR

Para preparar la solución stock se pesó 5 mg de estándar de Tartrazina 99 % HPLC y se transfirió a una fiola de 5 mL completada a volumen con agua ultra pura para lograr una concentración madre de 1000 mg/L, luego de esta solución madre se tomó una alícuota de 500  $\mu$ L llevando a una

fiola de 5 mL con agua ultra pura obteniendo una solución stock de concentración final de 100 mg/L de Tartrazina.

### 2.2.5. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

#### A. PREPARACION DEL ESTANDAR DE TARTRAZINA PARA ENSAYOS CELULARES

Se disolvió 25 mg de estándar de Tartrazina en PBS hasta completar la disolución del estándar, luego se adicionó el mismo diluyente para obtener un volumen de 4.67 mL de solución para una concentración de 10 mM. A partir de dicha concentración se hicieron diluciones con concentraciones finales de 1 mM, 0.1 mM y 0.01 mM.

$$\frac{25 \text{ mg}}{4.67 \text{ mL}} \times \frac{1 \text{ mmol}}{534.36 \text{ mg}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 10 \text{ mM}$$

#### B. PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

La preparación de los medios de cultivo para las líneas celulares se realizó en una cámara de flujo laminar estrictamente esterilizada, todos los medios de cultivo utilizados fueron de la casa ATCC®, en presentación de 500 mL, de los frascos se retiró 50 mL del medio y se agregó 50 mL de FBS para enriquecer los medios, además se añadió 5 mL de antibiótico (penicilina/estreptomycin) para mantener los medios estériles.

### 2.2.6. CULTIVO CELULAR

Los ensayos de cultivos celulares se llevaron a cabo con todas las condiciones estériles recomendadas utilizando una cámara de flujo laminar, alcohol al 70 % y solución de hipoclorito de sodio al 5 % para prevenir la proliferación microbiana.

Las líneas de celulares en estudio fueron cáncer de vejiga HT 1376, cáncer de próstata PC3 y cáncer de hígado Hep G2 [HEPG2], dichas células estuvieron almacenadas en nitrógeno líquido a -200 °C en viales pequeños. Para

conseguir la temperatura ambiente se colocaron en baño de agua a 37 °C con agitación suave, el descongelamiento no tardó más de 2 minutos, se retiró el vial del baño de agua lo más rápido posible y desinfectó con alcohol al 70 %, luego transferir el contenido del vial en un tubo de 15 mL y completar con medio DMEM, centrifugar a 1250 rpm por 7 minutos.

**Tabla N° 2.1 Líneas Celulares y su medio de crecimiento**

TIPOS DE CELULAS DE CANCER	LINEA CELULAR	MEDIO DE CRECIMIENTO
Cáncer de vejiga	HT- 1376	Eagle Modified Essential Medium (EMEM)
Cáncer de próstata	PC3	Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium (F12K)
Cáncer de hígado	Hep G2 [HEPG2]	Eagle Modified Essential Medium (EMEM)

*Fuente: Elaboración propia*

Luego de centrifugar, reconstituir con el medio respectivo para cada línea celular mencionados en la tabla N° 2.1 y colocar 1 mL en frascos para cultivo celular, adicionar 15 mL del medio, en el microscopio invertido revisar cada frasco y observar que las células no estén aglutinadas, luego llevar a incubar a 37 °C en una atmósfera húmeda que contiene 5 % CO<sub>2</sub>.

Cada línea celular tiene su tiempo de incubación respectivo, las células estarán listas para el primer pasaje cuando la confluencia se encuentre entre un 80 % a 90 %

La nueva generación de células a partir del primer pasaje se realizó de la siguiente manera:

Se eliminó el medio de los frascos y se adicionó 2 mL de Tripsina-EDTA, se enjuagó y se desechó, se volvió a adicionar Tripsina-EDTA pero esta vez 5 mL, y se llevó a incubar por 10 minutos, este procedimiento es para desprender la película de células formadas en el frasco y poder realizar el pasaje. Pasado ese tiempo se vació el contenido del frasco en un tubo falcón de 30 mL y se adicionó 10 mL del medio correspondiente a cada línea celular.

Luego se llevó a centrifugar a 1000 rpm por 5 minutos, después del centrifugado se desechó el sobrenadante y se reconstituyó el pellet de células con medio teniendo así una suspensión celular que se utilizó para los pasajes siguientes y ensayos posteriores.

#### **2.2.7. CONTEO DE CELULAS VIABLES**

Se extrajo 20  $\mu$ L de la suspensión celular en un tubo eppendorf mezclando con 20  $\mu$ L de solución de Tripán blue. Se colocó 20  $\mu$ L de la mezcla en una celda para conteo. Se utilizó un contador de células (Celulómetro) y fue configurado para el conteo de cada línea celular, se insertó la celda para conteo dentro del Celulómetro. Posteriormente, se determinó el número de células por mL de medio y el porcentaje de viabilidad.

Para poder realizar ensayos de viabilidad es necesario obtener un total óptimo de células, esa cantidad es de  $1 \times 10^6$  células/mL con una viabilidad mayor del 95 %.

#### **2.2.8. EFECTO DE TARTRAZINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR**

Para evaluar el efecto de la Tartrazina sobre la viabilidad celular se utilizó well plates de 96 pozos y se sembraron  $2 \times 10^4$  células/pozo en medio de cultivo correspondiente a cada línea celular y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> por un periodo de 1 hora. Pasado este tiempo a los cultivos se les

adicionó 10  $\mu\text{L}$  de tartrazina con distintas concentraciones (0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM y 1 mM) para finalizar se llevó a incubar por 24 horas.

Se realizaron repeticiones por triplicado por cada línea celular, además se manejó un grupo control al cual se le adicionó 10  $\mu\text{L}$  de PBS con el respectivo medio, con la objetivo de comprobar si las concentraciones utilizadas afectan la viabilidad de las líneas celulares.

### **2.2.9. DETERMINACION DE LA VIABILIDAD CELULAR POR MTS**

Se utilizó el ensayo de MTS ([3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium) para la viabilidad celular de cáncer de vejiga HT 1376, cáncer de próstata PC3 y cáncer de hígado Hep G2 [HEPG2]. La viabilidad celular es proporcional al color ocasionado por el ensayo de MTS, es decir a la cantidad de formazan producido<sup>(50)</sup>.

Luego del proceso de intoxicación con Tartrazina en los well plates de 96 pozos y de haber estado por 24 horas en incubación, se realizó un lavado para evitar que la coloración de la Tartrazina interfiera con el MTS, se agregó 10  $\mu\text{L}$  de solución de MTS y se incubó por 3 horas más. En seguida pasado el tiempo de incubación se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm.

## **3. ESTRATEGIA DE RECOLECCION DE DATOS**

En una primera parte de la investigación se procedió a la implementación de la técnica analítica de determinación de Tartrazina por el método de cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Luego se trabajó con las muestras determinando la concentración de Tartrazina por el método de cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

Después se efectuó las pruebas de viabilidad en las líneas celulares de cáncer ya mencionadas y por último se desarrolló la comparación y el análisis estadístico de los resultados obtenidos.

### 3.1. ANALISIS ESTADISTICO

Se determinó promedio, desviación estándar, coeficiente de variación, análisis de varianza para el análisis estadístico, además de prueba (one way) ANOVA para la determinación de Tartrazina.

En cuanto a los resultados de viabilidad celular fueron expresados como promedio del porcentaje de la viabilidad celular  $\pm$  SEM. Asimismo, se realizó un análisis de varianza de una vía (one-way ANOVA) con post-hoc test de Dunnett con un nivel de confianza de 95 %, utilizando el software SigmaPlot 12.0

### **CAPITULO III**

#### **RESULTADOS Y DISCUSION**

##### **1. RECOLECCION DE MUESTRAS**

En la recolección de muestras se adquirieron tres marcas de bebidas cítricas artificiales, por cada marca se obtuvo tres lotes y por cada lote tres muestras. Todas las muestras se recolectaron en la ciudad de Arequipa, Perú.

##### **2. DESARROLLO DEL METODO CROMATOGRAFICO PARA LA DETERMINACION DE TARTRAZINA**

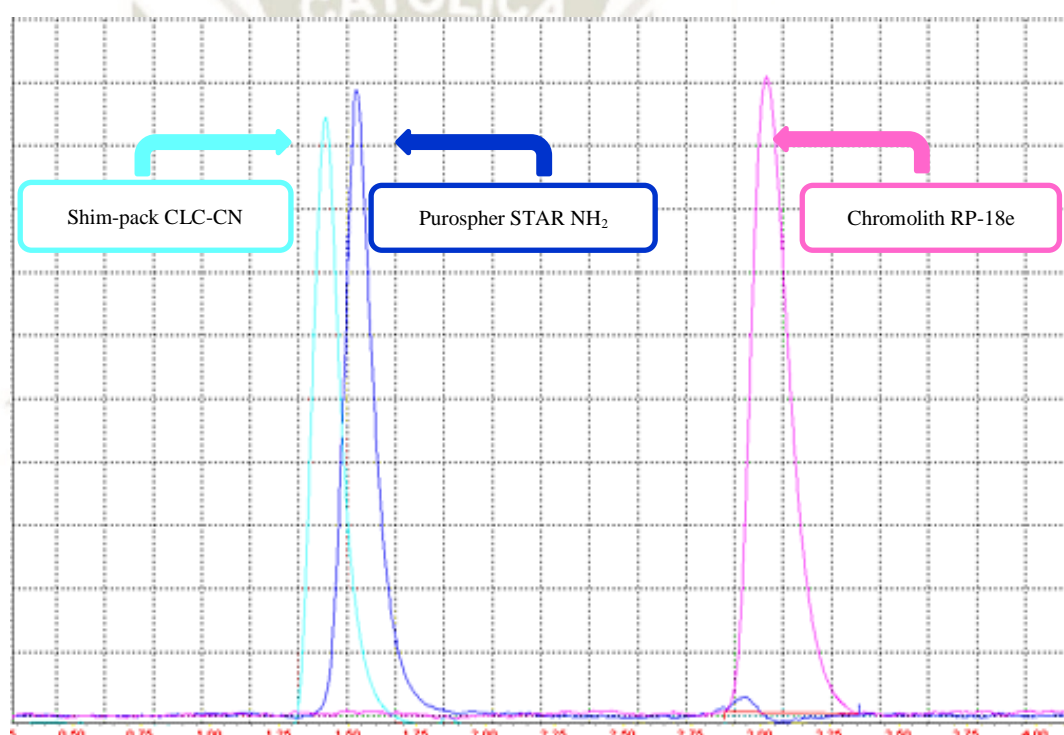
Previamente a la validación del método cromatográfico, se utilizaron tres columnas para la identificación de Tartrazina, la primera fue una Purospher®STAR NH<sub>2</sub> (5 µm) 150-4.6 mm, la segunda fue una Shim-pack CLC-CN 150-6 mm y la tercera una Chromolith RP-18e de 100-4.6 mm, luego de múltiples pruebas resumimos lo que se muestra en la tabla N°3.1, en la cual se observa que los tiempos de retención de las dos primeras columnas es muy corto a comparación de la tercera columna además en la figura N° 3.1 se ve reflejado dichas comparaciones.

Con estos resultados obtenidos se procedió a elegir la tercera columna, una Chromolith RP-18e de 100-4.6 mm, siendo la columna que se utilizó posteriormente para la validación del método y para la determinación de Tartrazina en bebidas cítricas artificiales.

**Tabla N° 3.1 Columnas utilizadas para la identificación de Tartrazina**

COLUMNA	FASE MOVIL	TIEMPO DE RETENCION
Purospher STAR NH <sub>2</sub> (5 µm) 150-4.6 mm	THF: Metanol (70:30)	1.43 min.
Shim-pack CLC-CN 150-6 mm	THF: Metanol (70:30)	1.30 min
Chromolith RP-18e 100-4.6 mm	Acetonitrilo: CTAB (70:30)	3.14 min

*Fuente: Elaboración propia*



**Figura N° 3.1 Picos de Tartrazina con diferentes columnas**

Maidel Vidal<sup>(51)</sup>, Waleska de Araujo<sup>(52)</sup>, y Simone Pereira<sup>(53)</sup> reportan en sus trabajos de investigación la utilización de columnas RP-18e, respaldando éste estudio, además de los resultados obtenidos

### 2.1. PREPARACION DE LA SOLUCION ESTANDAR

Para la solución stock se pesó 5 mg de estándar de Tartrazina 99 % HPLC adquirido de Sigma Aldrich y se transfirió a una fiola de 5 mL completada a

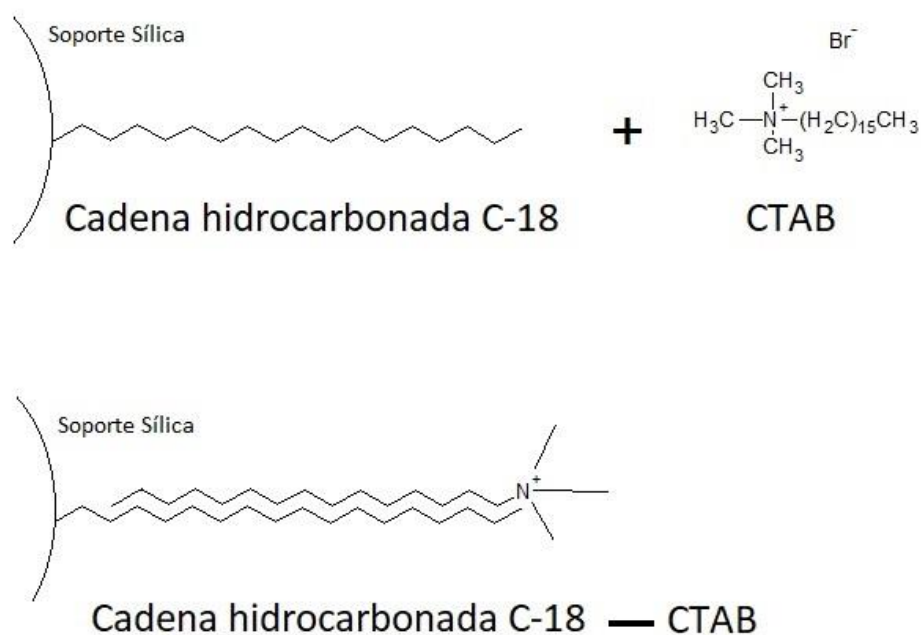
volumen con agua ultra pura para lograr una concentración madre de 1000 mg/L, luego de esta solución madre se transfirió una alícuota de 2.5 mL llevando a una fiola de 25 mL con agua ultra pura obteniendo una solución stock de concentración final de 100 mg/L de Tartrazina.

## 2.2. PREPARACION DE LA FASE MOVIL

En una balanza pesar 0.45 g de CTAB para preparar un volumen de 250 mL a una concentración 5 mM y enrazar con agua ultra pura, luego en una probeta de 500 mL se agregó 150 mL de Acetonitrilo grado HPLC y luego se completó el volumen de la probeta con la solución de CTAB, este procedimiento es para evitar las burbujas que el CTAB produce, así obtenemos la proporción CTAB : Acetonitrilo (70:30), en seguida la fase móvil se desgasificó en el equipo de desgasificación, una vez desgasificada la fase móvil se transfirió a un frasco de vidrio para realizar las corridas en el HPLC.

La propuesta de realizar una determinación de Tartrazina con CTAB se apoya en el trabajo denominado “Desarrollo de nuevos sensores potenciométricos para la determinación de la concentración de colorante de Tartrazina en productos alimenticios, mediante un nuevo electrodo modificado de pasta de carbono, sensor codificado A, y un electrodo recubierto de alambre de plata, sensor codificado B, basado en Tartrazina – CTAB”. Dando una propuesta de mecanismo de reacción entre dichos compuestos, dicho electrodo tuvo buenos resultados y es por tal motivo que se consideró la reacción propuesta obteniendo en éste trabajo de investigación resultados igualmente satisfactorios<sup>(17)</sup>.

Al acondicionar la columna con la fase móvil, es posible que exista el mecanismo de unión entre la columna RP-18e y el CTAB tal como muestra la figura N° 3.2

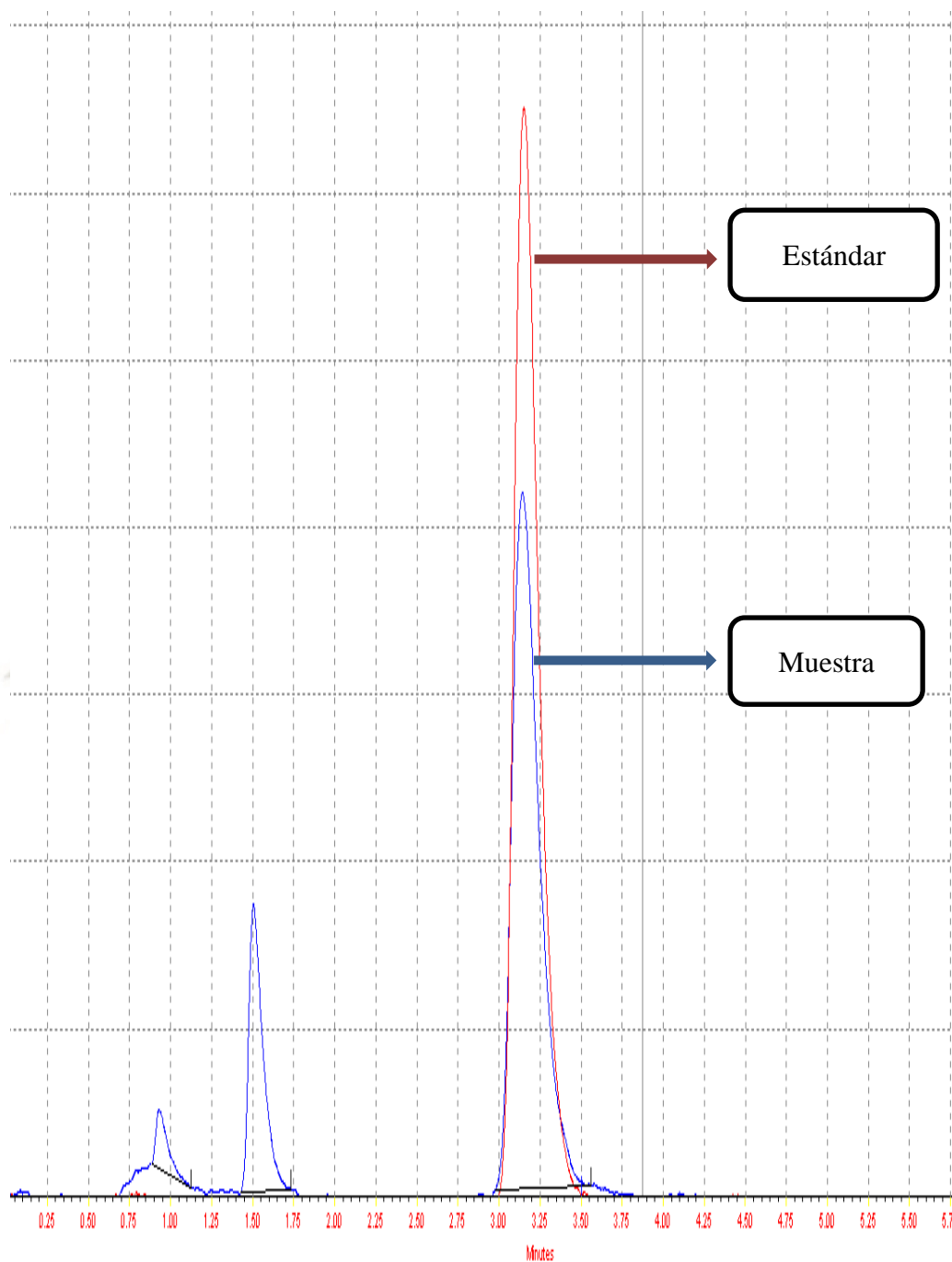


*Figura N° 3.2 Posible interacción entre RP-18e y CTAB. (Fuente: Elaboración propia, ACD/ChemSketch)*

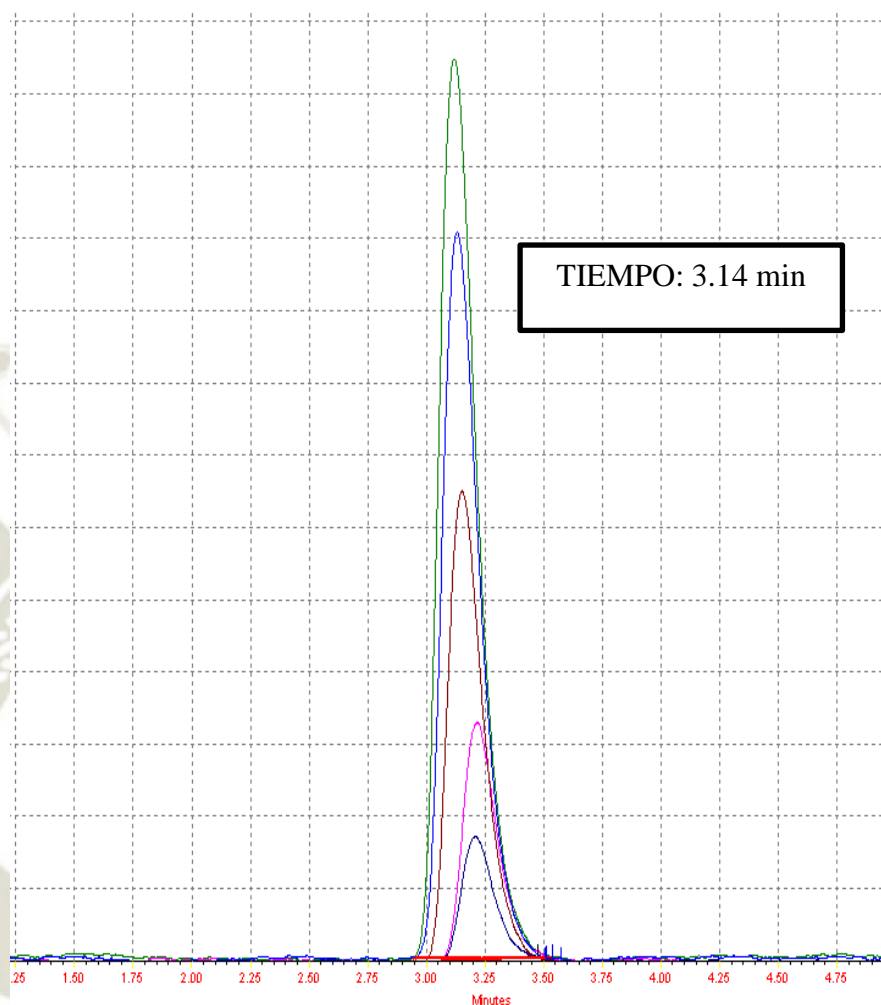
### 2.3. CONDICIONES OPTIMAS PARA LA DETERMINACION DE TARTRAZINA POR HPLC

Las condiciones cromatográficas que se tomaron en cuenta para la determinación de Tartrazina fueron las siguientes:

- Fase Móvil: CTAB-Acetonitrilo (70:30)
- Flujo:  $2 \text{ mL min}^{-1}$
- Longitud de onda: 255 nm
- Tiempo de retención: 3.14 min.
- Volumen de Inyección:  $20 \mu\text{L}$



*Figura N° 3.3 Cromatograma de muestra y estándar.*



*Figura N° 3.4 Tiempo de retención de Tartrazina*

## 2.4. VALIDACION DEL METODO PARA LA DETERMINACION DE TARTRAZINA POR HPLC

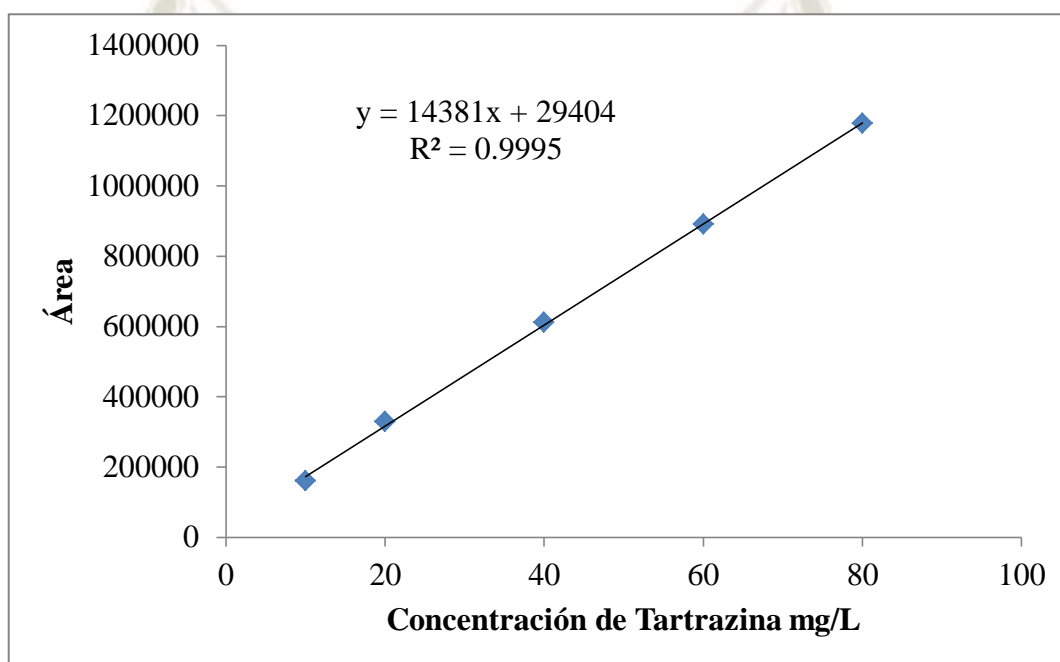
### 2.4.1. LINEALIDAD

A partir de la solución stock de 100 mg/L ya preparada se tomaron alícuotas de 500, 1000, 2000, 3000 y 4000  $\mu$ L, llevando a cada una de ellas a fioles de 5 mL, enrasándolas con fase móvil, obteniendo concentraciones de 10, 20, 40, 60 y 80 mg/L de Tartrazina. Las soluciones se filtraron en filtros anotop (0.45  $\mu$ m) y se procedió a inyectar al HPLC por triplicado. Con los datos obtenidos para determinar la linealidad, se construyó la curva de calibración, obteniendo un  $r^2 = 0.9995$ , como se observa en la figura N°3.5 lo cual indica que está dentro del parámetro.

**Tabla N° 3.2 Datos para determinar la Linealidad**

Concentraciones mg/L	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio Áreas	Desviación Estándar
10	160951	160289	160566	160602	332.5
20	317039	338212	329973	328408	10672.9
40	614860	603408	613912	610727	6355.9
60	884524	896502	889486	890171	6018.3
80	1150582	1179336	1201666	1177195	25609.2

*Fuente Elaboración propia*



**Figura N° 3.5 Curva de Calibración para la linealidad**

#### 2.4.2. PRECISION

Una vez obtenida la linealidad, se determinó la precisión, con las condiciones establecidas en el capítulo II de éste trabajo. La AOAC estableció el valor de coeficiente de variación (C.V. %) de aceptación dependiendo el nivel de concentración, los datos podemos apreciarlos en la tabla N°3.3 donde se observa que los valores de C.V % oscilan entre 0.207 – 3.250 % datos aceptables ya que el límite para ésta ocasión fluctúan entre 5.3% - 7.3 % tal como se observa en la tabla N°3.5.

**Tabla N° 3.3 Datos para determinar la Precisión**

Concentraciones mg/L	Área 1	Área 2	Área 3	Promedio Áreas	Desviación Estándar	C.V %
10	160951	160289	160566	160602	332.5	0.207
20	317039	338212	329973	328408	10672.9	3.250
40	614860	603408	613912	610727	6355.9	1.041
60	884524	896502	889486	890171	6018.3	0.676
80	1150582	1179336	1201666	1177195	25609.2	2.175

*Fuente: Elaboración propia*

**PRECISION INTERMEDIA:** Para la determinación de la precisión intermedia se midió en condiciones reproducibles (diferente analista, diferente día), obteniendo como resultado la tabla N° 3.4.

Como vemos el coeficiente de variación porcentual no debe exceder al doble del coeficiente de variación porcentual de la repetibilidad (precisión), así podemos afirmar que el método es preciso.

Los datos fueron comparados con la tabla N° 3.5, tabla obtenida de la AOAC International<sup>(54)</sup>.

**Tabla N° 3.4 Datos para determinar la Precisión Intermedia**

Concentraciones mg/L	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Promedio Áreas	Desviación Estándar	C.V %
10	160951	160289	160566	160566	160593	272.1	0.169
20	317039	338212	329973	329973	328799	8749.5	2.661
40	614860	603408	613912	613912	611523	5428.4	0.888
60	884524	896502	889486	889486	890000	4925.8	0.553
80	1150582	1179336	1201666	1201666	1183313	24226.7	2.047

*Fuente: Elaboración propia*

**Tabla N° 3.5 Precisión esperada (repetibilidad) como una función de concentración de analito**

<b>Unidad</b>	<b>1RSDr %</b>
100 %	1.3
10 %	1.9
1 %	2.7
0.1 %	3.7
100 ppm (mg/kg)	5.3
10 ppm (mg/kg)	7.3
1 ppm (mg/kg)	11
100 ppb (µg/kg)	15
10 ppb (µg/kg)	21
1 ppb (µg/kg)	30

*Fuente: AOAC International<sup>(54)</sup>*

### 2.4.3. EXACTITUD

**Tabla N° 3.6 Método de Recuperación**

	<b>Muestra (mg /L)</b>	<b>Muestra + Estándar (mg/ L)</b>	<b>Estándar (mg /L)</b>
<b>Repetición 1</b>	32.104	43.802	14.115
<b>Repetición 2</b>	31.936	43.917	14.173
<b>Repetición 3</b>	31.952	43.767	14.131
<b>Promedio</b>	31.997	43.829	14.140
<b>Desviación Estándar</b>	0.093	0.078	0.030
<b>Recuperación</b>	97.82 %		

*Fuente: Elaboración propia*

Para obtener la exactitud, se utilizó el método de porcentaje de recuperación. Se preparó 3 fiolas con estándar de Tartrazina a una concentración de 15 mg/L, 3 fiolas con muestra y 3 fiolas con muestras más estándar.

La recuperación fue de 97.82 % siendo un resultado favorable y que se ubica dentro de la norma (90 – 107%) como se observa en la tabla N° 3.7

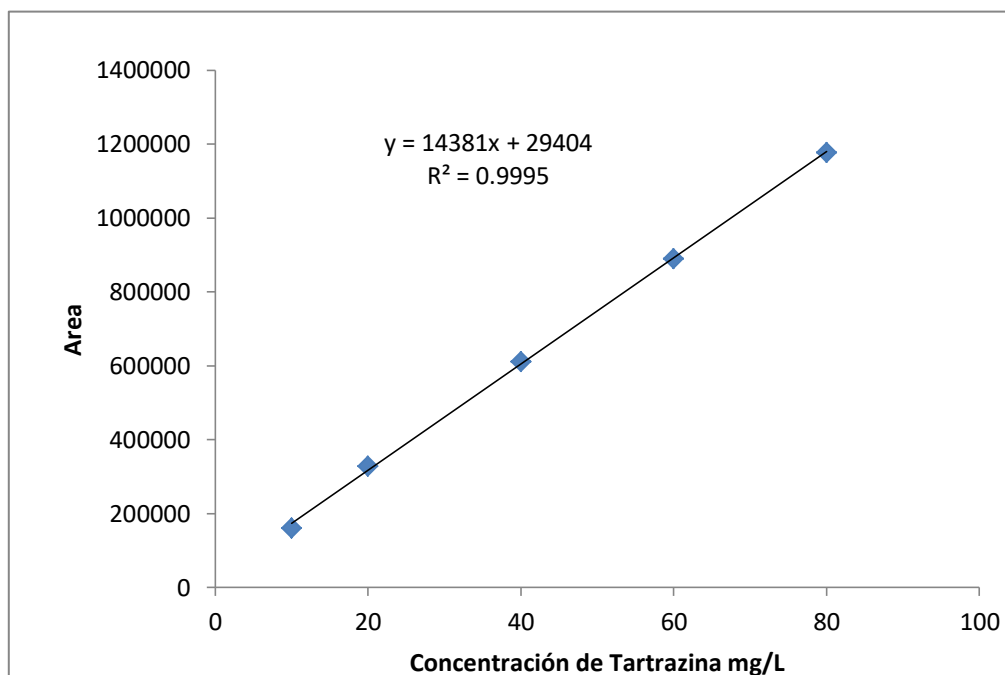
**Tabla N° 3.7 La recuperación prevista como una función de la concentración de analito**

Unidad	Media Recuperación %
100 %	98 – 102
10 %	
1 %	97 – 103
0.1 %	95 – 105
100 ppm (mg/kg)	90 – 107
10 ppm (mg/kg)	
1 ppm (mg/kg)	80 – 110
100 ppb (µg/kg)	
10 ppb (µg/kg)	60 – 115
1 ppb (µg/kg)	40 – 120

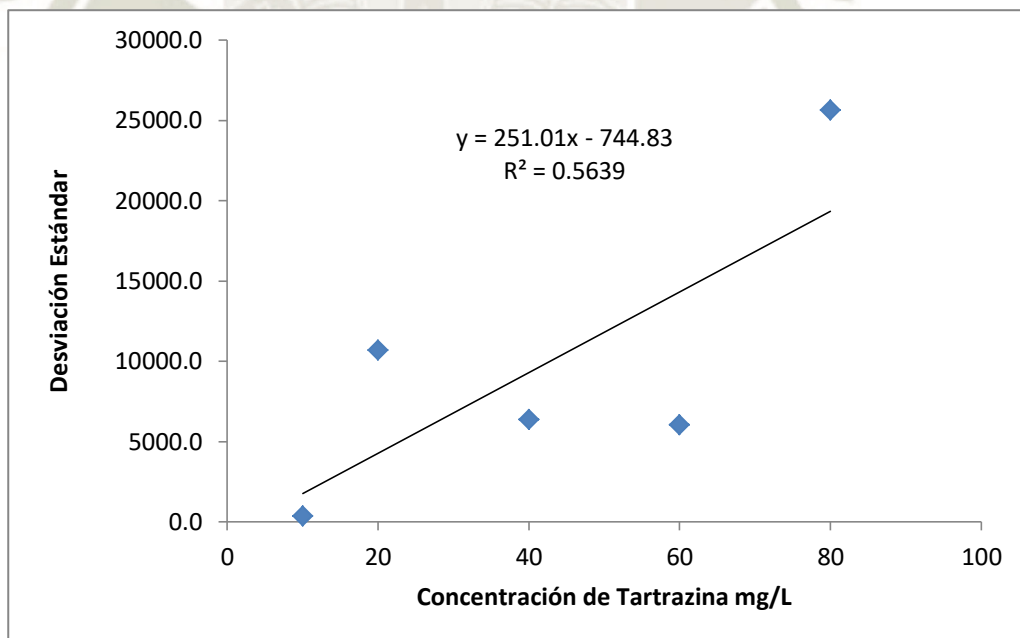
*Fuente: AOAC International<sup>(54)</sup>*

#### 2.4.4. LIMITES DE DETECCION Y LIMITES DE CUANTIFICACION

Los Limites de Detección y Cuantificación necesitan de dos curvas, una fue de Área vs. Concentración (figura N° 3.6) y la segunda de Desviación Estándar vs. Concentración (figura 3.7), dichas curvas nos brindaron  $Y_{bi}$  y  $S_{bi}$  respectivamente. Obteniendo finalmente un LDD: 0.51 mg/L y un LDC: 0.62 mg/L



*Figura N° 3.6 Área versus Concentración*



*Figura N° 3.7 Desviación Estándar versus Concentración*

Frédéric Martin en su trabajo Determinación de 18 colorantes artificiales solubles en agua por LC-MS en matrices seleccionadas, desarrolló un método de residuos múltiples basado en dos procedimientos de extracción diferentes y se comparó con el análisis de espectrometría de masas en tándem por ionización electrospray por cromatografía líquida de dieciocho colores artificiales solubles en agua que incluyen Tartrazina (E102) y otros colorantes más, en dicho trabajo se resalta la validación del método, con buenos resultado para posteriores análisis, en cuanto a sus límites de cuantificación, para la Tartrazina obtuvo 0.5 mg/L a comparación de éste trabajo que obtuvo 0.62 mg/L. En ambos trabajos se obtuvieron buenos resultados<sup>(55)</sup>.

## **2.5. TRATAMIENTO DE MUESTRAS**

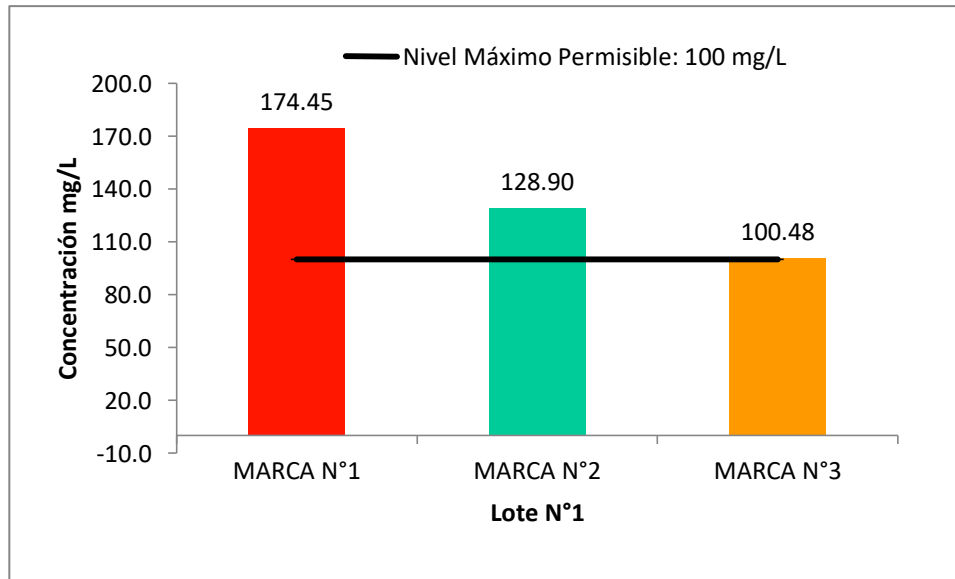
Luego de que las muestras fueron recolectadas, como ya se mencionó en el capítulo II, tres lotes de tres marcas diferentes, se tomó 1 mL de la bebida y se colocó en una fiola de 5 mL aforando con fase móvil y se agitó.

Se filtraron con filtros anotop listas para su inyección en el equipo.

## **3. DETERMINACION DE TARTRAZINA EN BEBIDAS CITRICAS ARTIFICIALES**

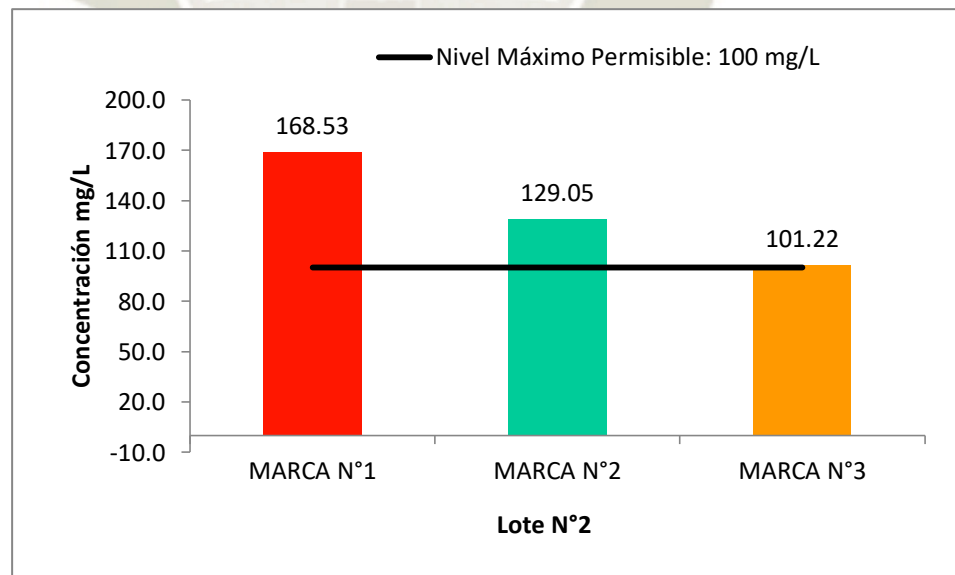
Se analizaron 27 muestras, las cuales provienen de 3 marcas que se expende en el mercado Arequipeño, por cada marca se analizaron 3 lotes distintos y por cada lote 3 muestras. Todas las muestras fueron cuantificables. De las muestras analizadas todas las medias sobrepasan al nivel máximo permisible de 100 mg/L.

En la primera evaluación, mostrada en la figura N°3.8, del primer lote de muestras se obtuvo un valor de media mínima de 100.48 mg/L perteneciente a la Marca N°3, mientras que el valor de media máxima fue de 174.45 mg/L perteneciente a la Marca N° 1.



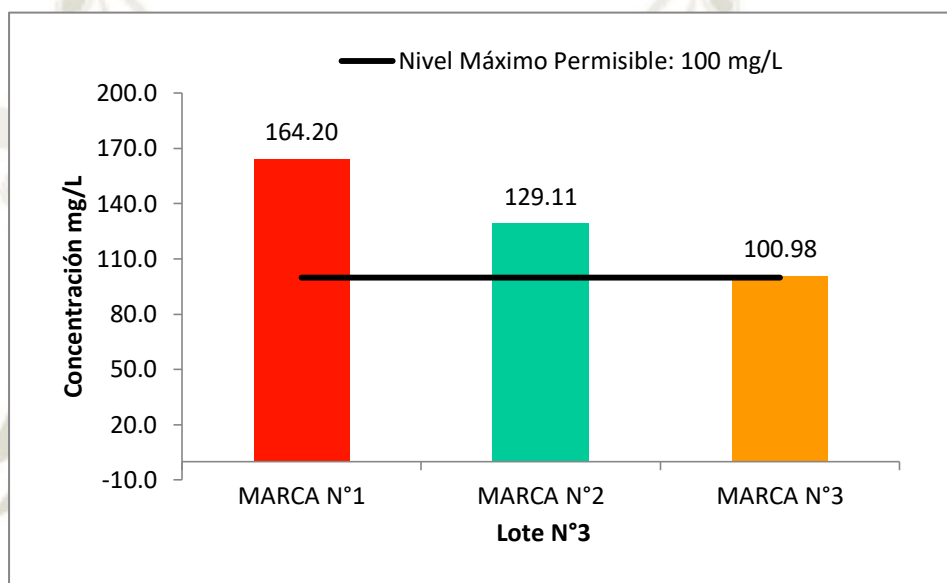
**Figura N° 3.8 Determinación de Tartrazina en bebidas cítricas artificiales del Lote N°1**

La segunda evaluación siendo el lote N°2 analizado, mostrando en la figura N° 3.9 que la concentración de media mínima fue de 101.22 mg/L perteneciente nuevamente a la Marca N°3 y la concentración de media más alta fue de 168.53 mg/L también perteneciente a la Marca N°1.



**Figura N° 3.9 Determinación de Tartrazina en bebidas cítricas artificiales del Lote N°2**

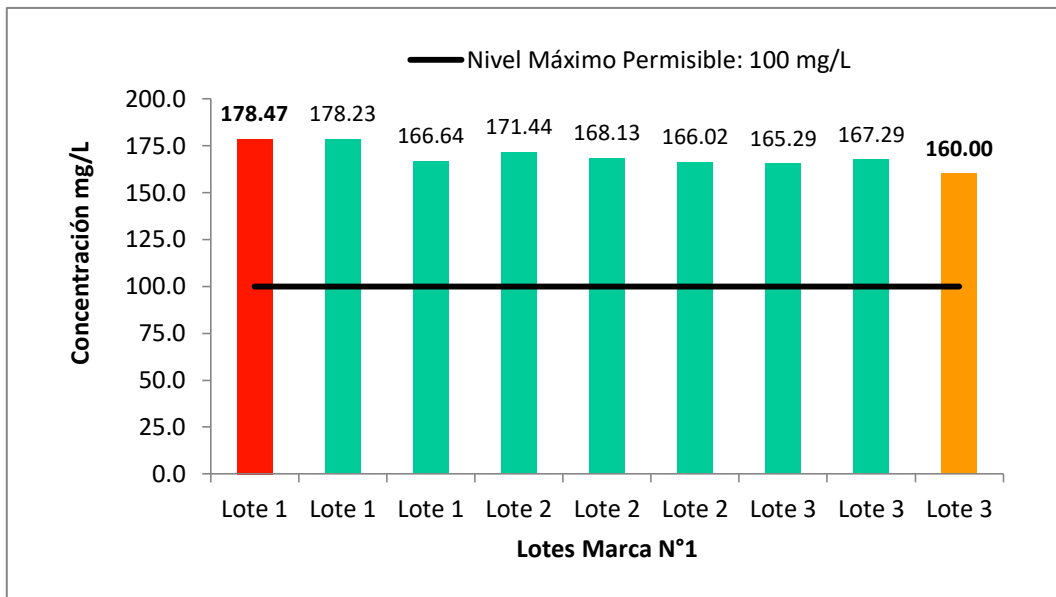
Para la determinación del lote N°3 se muestra que el valor de media mínima es de 100.98 mg/L obtenido de la tercera marca, notando una vez más que la marca N° 3 es de los valores mínimos que se encuentran en el presente trabajo de investigación. El valor de media máxima fue de 164.20 mg/L, dato referente la primera marca analizada. Como notamos la primera marca es la de mayor concentración obtenida, mientras que la tercera marca si bien sobrepasa el nivel máximo permisible, sobrepasa por muy poco como se muestra en la figura N° 3.10



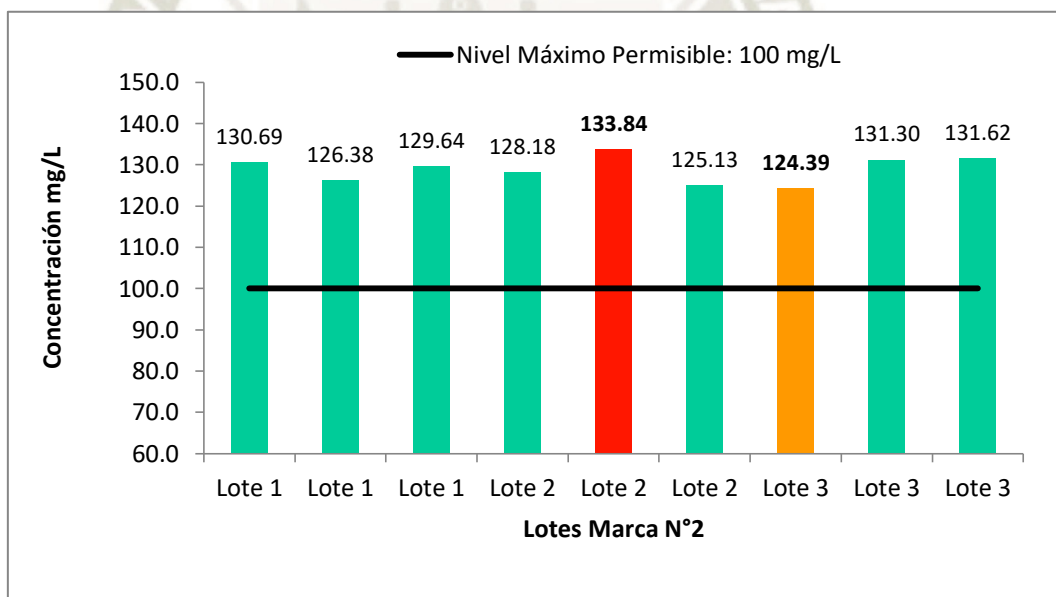
*Figura N° 3.10 Determinación de Tartrazina en bebidas cítricas artificiales del Lote N°3*

También se realizó la comparación entre los tres lotes recolectados por marca, y se determinó el valor más alto y más bajo. En la figura N° 3.11 se muestra la comparación de la primera marca en donde el valor mayor fue de 178.47 mg/L perteneciente al primer lote, y el valor mínimo fue de 160 mg/L del tercer lote.

Para la segunda marca como se observa en la figura N° 3.12 el valor máximo fue de 133.84 mg/L perteneciente al segundo lote y el mínimo fue de 124.39 mg/L perteneciente al tercer lote



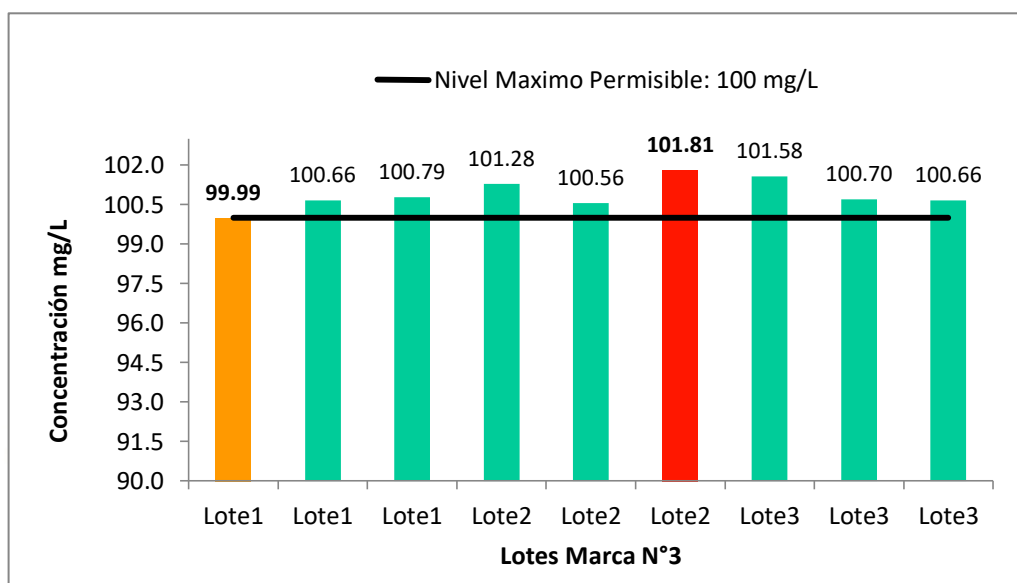
*Figura N° 3.11 Comparación de lotes de la Marca N°1*



*Figura N° 3.12 Comparación de lotes de la Marca N°2*

Por último la tercera marca mostró que los datos obtenidos sobrepasan el nivel máximo permisible por muy poco, teniendo como concentración mínima de 99.99 mg/L y la mayor concentración de 101.81 mg/L, como se observa en la figura N°

3.13, los datos obtenidos de ésta marca son cercanos a los niveles máximos permisibles



**Figura N° 3.13 Comparación de lotes de la Marca N°3**

Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre las marcas de las bebidas cítricas artificiales que se analizaron, teniendo como resultado un  $p < 0.05$ , existiendo diferencia significativa entre las marcas estudiadas, luego de rechazar nuestra hipótesis nula realizamos un Test LSD, el cual nos especificó que marca es distinta a otra, encontrando que entre la Marca N°1 y la Marca N°2 existe diferencia estadística significativa, entre la Marca N°1 y la Marca N°3 también se encontró diferencia estadística significativa y de igual forma entre la Marca N°2 y la Marca N°3.

También se realizó ANOVA entre los lotes de cada marca, obteniendo un resultado que entre cada lote por marca no existen diferencias estadísticas significativas. Aceptando la hipótesis nula.

En la tabla N°3.8 se resumen de todos los resultados analizados. Marcando con rojo el valor más alto y en verde el valor más bajo.

**Tabla N° 3.8 Niveles mínimos y máximos de las determinaciones de Tartrazina en Marcas de bebidas cítricas artificiales**

		<b>Determinación 1 (mg/L)</b>	<b>Determinación 2 (mg/L)</b>	<b>Determinación 3 (mg/L)</b>
<b>MARCA N°1</b>	Mínimo	166.64	166.02	160.00
	Máximo	178.47	171.44	167.29
<b>MARCA N°2</b>	Mínimo	126.38	125.13	124.39
	Máximo	130.69	133.84	131.62
<b>MARCA N°3</b>	Mínimo	99.99	100.56	100.66
	Máximo	100.79	101.81	101.58

*Fuente: Elaboración propia*

Existen diversos trabajos de investigación relacionados a la Tartrazina no solo por la técnica de HPLC, sino por otras técnicas como un electrodo de pasta de carbono (CPE) que se modifica químicamente con nanopartículas de oro (nAu) se fabricó y usó para la determinación de Tartrazina<sup>(56)</sup>, también se propone un método espectrofotométrico directo analizando su data mediante resolución de curva multivariada, con alternancia de mínimos cuadrados (MCR-ALS), permite explotar la denominada "ventaja de segundo orden", la cual como ventaja permitió obtener resultados imparciales incluso en presencia de interferencias<sup>(57)</sup>, también en otro trabajo se desarrolló un novedoso sensor de polipirrol polimérico impreso molecularmente para la determinación de Tartrazina directa rápida<sup>(58)</sup>, no cabe duda que la investigación sobre la Tartrazina está siendo cada vez más ingeniosa.

#### **4. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR**

##### **4.1. PREPARACION DEL ESTANDAR DE TARTRAZINA PARA ENSAYOS CELULARES**

A partir de esta solución madre o stock, mencionada en el capítulo II, se preparó soluciones para ensayos posteriores las cuales tuvieron concentraciones de 0.01 mM, 0.1 mM y 1 mM. Se completó el volumen deseado con PBS tal como se observa en la tabla N° 3.9

**Tabla N° 3.9 Concentraciones de Tartrazina para ensayos celulares**

Concentración inicial	Volumen extraído de la concentración inicial	Volumen de PBS	Volumen final	Concentración final
10 mM	100 $\mu$ L	900 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	1 mM
1 mM	100 $\mu$ L	900 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	0.1 mM
0.1 mM	100 $\mu$ L	900 $\mu$ L	1000 $\mu$ L	0.01 mM

*Fuente: Elaboración propia*

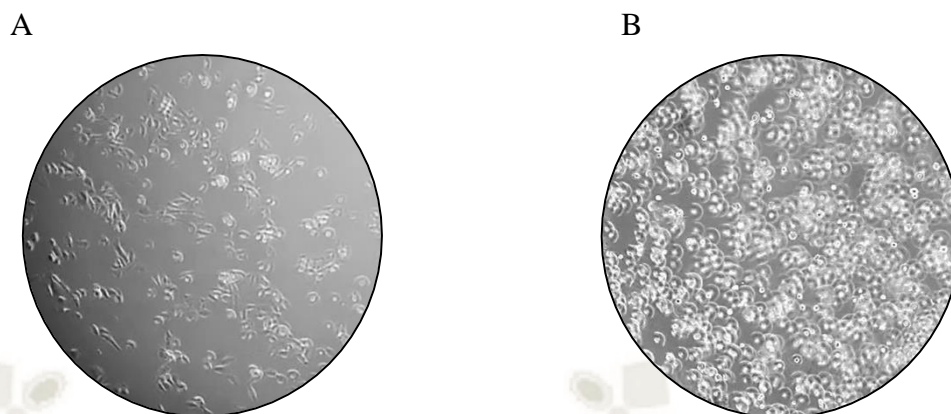
#### 4.2. CULTIVO CELULAR

La proliferación de células es diferente para cada línea celular, para HT-1376 son 4 días de incubación, para la línea celular de PC3 los días de incubación fueron 2 días y para Hep G2 fueron 5 días.

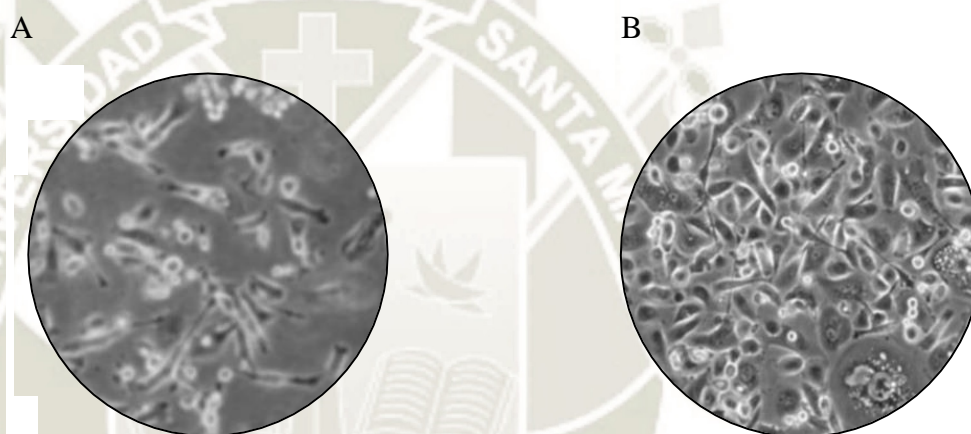
A partir de esos días las células estuvieron listas para realizar el primer pasaje. Todas las líneas celulares tuvieron un crecimiento y desarrollo óptimo en este trabajo de investigación.

Los medios utilizados aportaron los nutrientes y factores de crecimiento necesarios. Este trabajo investigó el efecto que producía la Tartrazina a diferentes concentraciones sobre la viabilidad celular de las distintas líneas celulares en estudio.

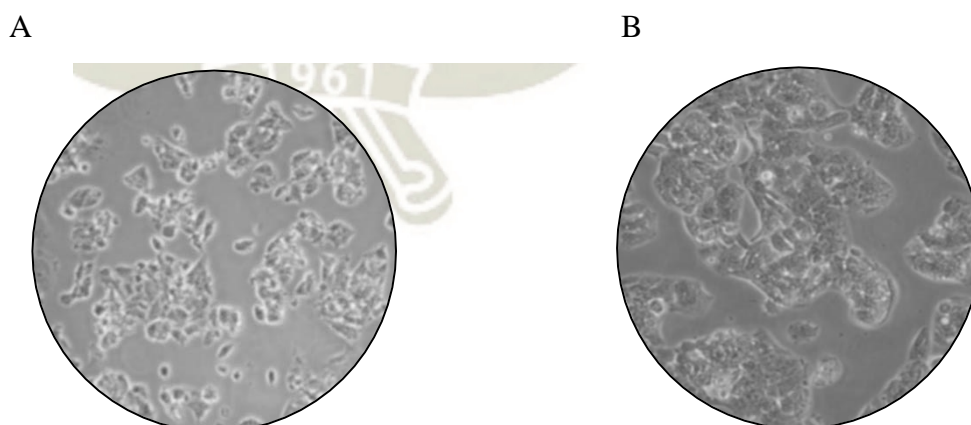
En las figuras N°3.14, N°3.15, N°3.16, se puede observar el crecimiento y desarrollo de las líneas celulares y el aumento de la densidad celular de acuerdo al tiempo de incubación independiente para cada una de ellas.



**Figura N° 3.14 Línea Celular HT1376 (ATCC® CRL-1472™) A: Baja densidad B: Alta densidad, escala 40x, microscopio invertido**



**Figura N° 3.15 Línea Celular PC3 (ATCC® CRL-1435™) A: Baja densidad B: Alta densidad, escala 100x, microscopio invertido**



**Figura N° 3.16 Línea Celular Hep G2 [HEPG2](ATCC® HB-8065™) A: Baja densidad B: Alta densidad, escala 40x, microscopio invertido**

### 4.3. LINEAS CELULARES

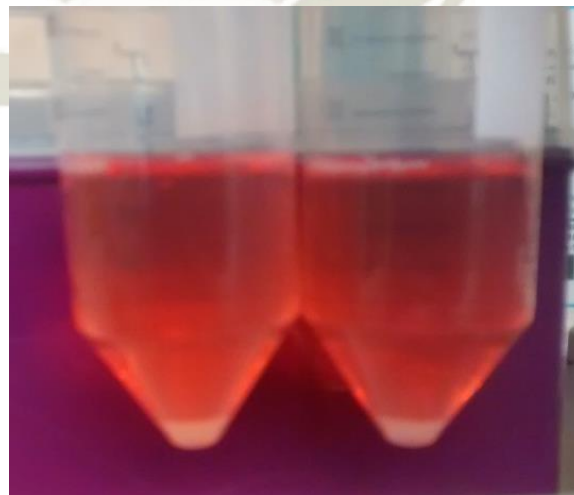
Las líneas celulares provienen de la casa ATCC® teniendo las siguientes características:

- HT1376 (ATCC® CRL-1472™) tejido de vejiga urinaria en enfermedad grado 3, carcinoma de un paciente femenino de edad 58 años<sup>(59)</sup>.
- PC3 (ATCC® CRL-1435™) tejido prostático; derivado del sitio metastásico: hueso de enfermedad grado IV, adenocarcinoma de un paciente masculino de edad 62 años adulto<sup>(60)</sup>.
- Hep G2 [HEPG2](ATCC® HB-8065™) tejido de hígado de enfermedad carcinoma hepatocelular de un paciente masculino de edad 15 años, adolescente<sup>(61)</sup>.

### 4.4. VIABILIDAD CELULAR

#### 4.4.1. CONTEO DE CELULAS VIABLES

Para el conteo de las células viables se utilizó azul de tripan como colorante ya que evalúa la viabilidad celular exclusión de captación, debido a que no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas íntegras<sup>(62)</sup>, el conteo celular se realizó en un contador de células Nexcelum bioscience®, autot4, obteniendo el número de células vivas y muertas en suspensión.

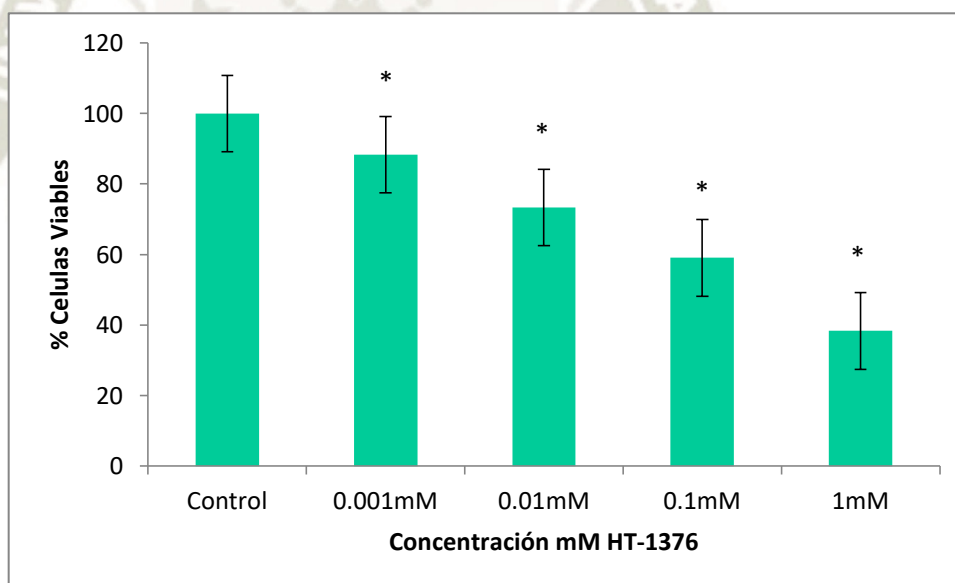


*Figura N°3.17 Pellet de células luego de centrifugado*

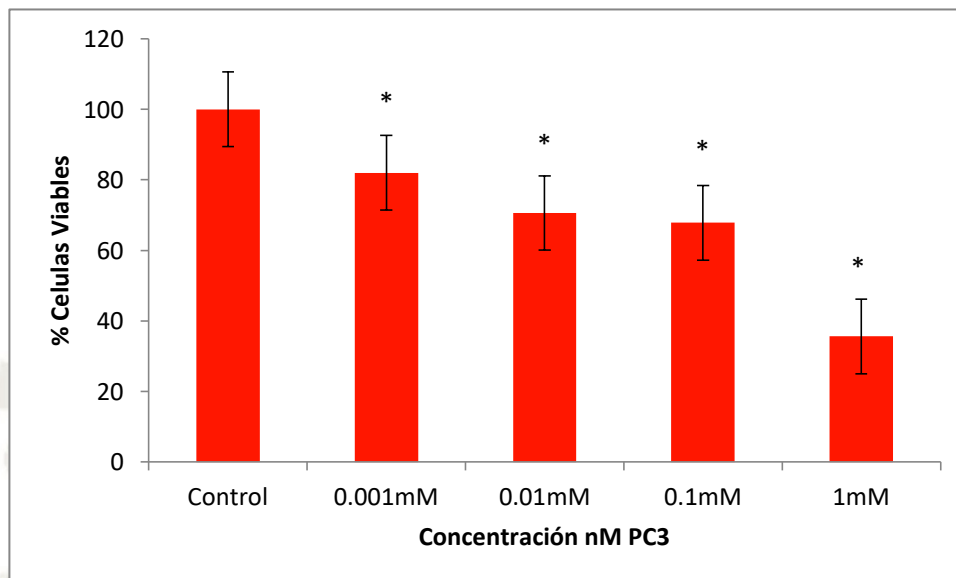
#### 4.5. EFECTO DE LA TARTRAZINA SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR

Se realizó los ensayos de viabilidad celular utilizando el método de MTS, se realizaron 9 repeticiones en total.

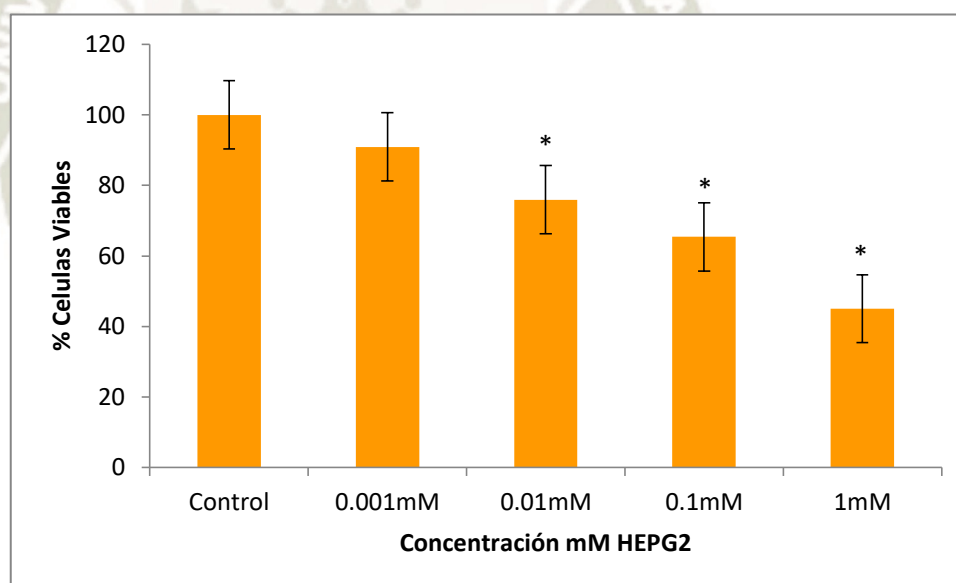
En las figuras N° 3.18, figura N° 3.19 y figura N° 3.20, se nota la disminución de células viables a medida que la concentración de Tartrazina aumenta luego de 24 horas de exposición, los datos experimentales se analizaron mediante una prueba de ANOVA con *post-hoc* test de Dunnett, utilizando el software SigmaPlot 12.0; con el que se evidenció que existe una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) comparada con el control, a excepción de la comparación entre el control y la concentración de 0.001 mM en la línea celular Hep G2 [HEPG2](ATCC® HB-8065™) como se muestra en la tabla N° 4.7 de los anexos.



**Figura N° 3.18 Efecto de la Tartrazina sobre la viabilidad celular en células HT1376 (ATCC® CRL-1472™)**



**Figura N° 3.19 Efecto de la Tartrazina sobre la viabilidad celular en células PC3 (ATCC® CRL-1435™)**



**Figura N° 3.20 Efecto de la Tartrazina sobre la viabilidad celular en células Hep G2 [HEPG2](ATCC® HB-8065™)**

Debido a que la Tartrazina se ha catalogado como un colorante dañino para la salud es que se realizan trabajos tanto en animales de experimentación como en líneas celulares, así tenemos un estudio de toxicidad oral de 90 días de Tartrazina, en ratas Wistars donde realizó un estudio de toxicidad subcrónica oral

de 13 semanas en ratas Wistar de ambos sexos, la Tartrazina indujo un cambio morfológico de la forma discoide a una forma equinocítica en los glóbulos rojos de rata además de presentar datos que mostraron un aumento significativo en GLU, CREA, CHOL, TG, AST y proteína total, los cambios histopatológicos de hígado y riñón estaban de acuerdo con los hallazgos bioquímicos<sup>(63)</sup>. De igual manera Amin KA evaluó el efecto de los alimentos azo tinturas Tartrazina y carmoisina sobre los parámetros bioquímicos relacionados con la función renal, la función hepática y los marcadores biológicos del estrés oxidativo en ratas macho jóvenes donde la Tartrazina y la carmoisina afectan adversamente y alteran los marcadores bioquímicos en órganos vitales, p. hígado y riñón no solo a dosis más altas sino también a dosis bajas<sup>(64)</sup>.

Mpountoukas realizó una evaluación citogenética y estudios de interacción del ADN en células de sangre periférica humana in vitro, para investigar su potencial genotóxico, citotóxico y citostático, donde la Tartrazina mostró citotoxicidad a 1 y 2 mM<sup>(5)</sup>. Cristina Gil evaluó los efectos de cuatro colorantes azoicos en diferentes ensayos toxicológicos en la línea celular adrenocortical humana H295R, demostró que la Tartrazina induce citotoxicidad a una concentración de 1 mM<sup>(65)</sup> al igual que en éste trabajo de investigación donde 1 mM fue la concentración que presentó menor viabilidad celular.

Los trabajos mencionados muestran datos semejantes a los de éste trabajo de investigación, teniendo cada uno su método y análisis de datos respectivos pero llegando al punto de principal de la determinación de Tartrazina y su efecto citotóxico en líneas celulares.

## CAPITULO IV CONCLUSIONES

**PRIMERA:** Se desarrolló una nueva metodología para determinar la concentración de Tartrazina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en bebidas cítricas artificiales promoviendo la formación de pares iónicos entre la Tartrazina y el CTAB.

**SEGUNDA:** Se validó el método para determinar la concentración de Tartrazina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), presentando linealidad con un  $R^2 = 0.9995$ , una precisión con C.V% que oscilan entre 0.21 – 3.25 %, la exactitud obtuvo una recuperación de 97.82 %, datos aceptables por la AOAC y un LDD de 0.51 y un LDC de 0.62 mg/L.

**TERCERA:** Se determinó la concentración de Tartrazina en bebidas cítricas artificiales en 27 muestras, 3muestras por lote, 3 lotes por cada marca, siendo 3 marcas analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), teniendo un tiempo de retención de 3.14 minutos y un rango de concentraciones que oscilan entre 99.99 mg/L – 178.47 mg/L.

**CUARTA:** Se evaluó el efecto citotóxico mediante ensayos de viabilidad sobre líneas celulares evidenciando que existe una disminución de la

viabilidad celular estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) comparada entre el control y las concentraciones 0.001 mM, 0.01 mM, 0.1 mM y 1 mM de Tartrazina, a excepción de la comparación entre el control y la concentración de 0.001 mM en la línea celular Hep G2 [HEPG2](ATCC® HB-8065™) que no mostró una diferencia estadística significativa.

**QUINTA:** Se comparó y analizó los resultados obtenidos entre las 3 marcas y lotes de bebidas cítricas artificiales con los parámetros establecidos. Obteniendo un rango de 99.99 mg/L a 178.47 mg/L, resultados por encima de los niveles permisibles de la Directiva 94/36/CE del Parlamento Europeo y del Consejo que es de 100 mg/L a excepción de una muestra que fue de 99.99 mg/L.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Stich E. 1 - Food Color and Coloring Food: Quality, Differentiation and Regulatory Requirements in the European Union and the United States. Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages: Woodhead Publishing; 2016. p. 3-27.
2. Lipskikh OI, Korotkova EI, Khristunova YP, Barek J, Kratochvil B. Sensors for voltammetric determination of food azo dyes - A critical review. *Electrochimica Acta*. 2018;260:974-85.
3. Rafati A, Nourzei N, Karbalay-Doust S, Noorafshan A. Using vitamin E to prevent the impairment in behavioral test, cell loss and dendrite changes in medial prefrontal cortex induced by tartrazine in rats. *Acta Histochemica*. 2017;119(2):172-80.
4. Scientific Opinion on the re-evaluation Tartrazine (E 102). *EFSA Journal*. 2009;7(11):1331.
5. Mpountoukas P, Pantazaki A, Kostareli E, Christodoulou P, Kareli D, Poliliou S, et al. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(10):2934-44.
6. Solymosi K, Latruffe N, Morant-Manceau A, Schoefs B. 1 - Food colour additives of natural origin A2 - Scotter, Michael J. *Colour Additives for Foods and Beverages*. Oxford: Woodhead Publishing; 2015. p. 3-34.
7. König J. 2 - Food colour additives of synthetic origin A2 - Scotter, Michael J. *Colour Additives for Foods and Beverages*. Oxford: Woodhead Publishing; 2015. p. 35-60.
8. Rodriguez-Amaya DB. Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*. 2016;7:20-6.
9. Velmurugan P, Kim J-I, Kim K, Park J-H, Lee K-J, Chang W-S, et al. Extraction of natural colorant from purple sweet potato and dyeing of fabrics with silver nanoparticles for augmented antibacterial activity against skin pathogens. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2017;173:571-9.
10. Amchova P, Kotolova H, Ruda-Kucerova J. Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2015;73(3):914-22.

11. Chattopadhyay DP. 19 - Azoic dyeing A2 - Clark, M. Handbook of Textile and Industrial Dyeing. 1: Woodhead Publishing; 2011. p. 604-26.
12. Ureta TBDAOCAO. ADITIVOS ALIMENTARIOS 2006.
13. Surucu O, Abaci S, Seferoğlu Z. Electrochemical characterization of azo dye (E)-1-(4-((4-(phenylamino)phenyl)diazenyl)phenyl)ethanone (DPA). *Electrochimica Acta*. 2016;195:175-83.
14. Sánchez Juan R. LA QUIMICA DEL COLOR EN LOS ALIMENTOS. *Química Viva* [Internet]. 2013;12(3):234-246.
15. Sakthivel M, Sivakumar M, Chen S-M, Pandi K. Electrochemical synthesis of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) on terbium hexacyanoferrate for sensitive determination of tartrazine. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2018;256:195-203.
16. Bastaki M, Farrell T, Bhusari S, Pant K, Kulkarni R. Lack of genotoxicity in vivo for food color additive Tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*. 2017;105:278-84.
17. Abu Shawish HM, Ghalwa NA, Saadeh SM, Harazeen HE. Development of novel potentiometric sensors for determination of tartrazine dye concentration in foodstuff products. *Food Chemistry*. 2013;138(1):126-32.
18. S. Rowe K, J. Rowe K. Synthetic food coloring and behavior: A dose response effect in a double-blind, placebo-controlled, repeated-measures study 1994. 691-8 p.
19. Al-Shabib NA, Khan JM, Khan MS, Ali MS, Al-Senaïdy AM, Alsenaidy MA, et al. Synthetic food additive dye "Tartrazine" triggers amorphous aggregation in cationic myoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;98:277-86.
20. Arnold LE, Lofthouse N, Hurt E. Artificial Food Colors and Attention-Deficit/Hyperactivity Symptoms: Conclusions to Dye for. *Neurotherapeutics*. 2012;9(3):599-609.
21. Bloom S, Chiang K, Demehri S, Kreshpanji S, McCaffrey E, Patel K, et al. The Effect of Dietary Tartrazine on Brain Dopamine and the Behavioral Symptoms of Attention Deficit Hyperactivity Disorder: University of Maryland; 2016.

22. Stevens LJ, Burgess JR, Stochelski MA, Kuczek T. Amounts of Artificial Food Colors in Commonly Consumed Beverages and Potential Behavioral Implications for Consumption in Children. *Clinical Pediatrics*. 2013;53(2):133-40.
23. Bhatt D, Vyas K, Singh S, John PJ, Soni I. Tartrazine induced neurobiochemical alterations in rat brain sub-regions. *Food and Chemical Toxicology*. 2018;113:322-7.
24. Chequer FMD, Dorta DJ, Oliveira DPd. Azo Dyes and Their Metabolites: Does the Discharge of the Azo Dye into Water Bodies Represent Human and Ecological Risks? *Advances in Treating Textile Effluent IntechOpen*; 2011.
25. Al-Seeni MN, El Rabey HA, Al-Hamed AM, Zamazami MA. Nigella sativa oil protects against tartrazine toxicity in male rats. *Toxicology Reports*. 2018;5:146-55.
26. 94/36/EC EPaCD. Colours for use in Foodstuffs. Official Journal Directive 94/36/EC. 1994.
27. Republica Cdl. Proyecto de Ley 165/2011-CR "Ley de Prohibición del uso de la susutancia química Tartrazina en productos alimenticios destinados al consum humano". 2014.
28. INDECOPI. Informe 006-2014/DPC-INDECOPI. 2014.
29. Scientific TF. Introduction to Cell Culture [Available from: <https://www.thermofisher.com/us/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>].
30. Ulrich AB, Pour PM. Cell Lines A2 - Brenner, Sydney. In: Miller JH, editor. *Encyclopedia of Genetics*. New York: Academic Press; 2001. p. 310-1.
31. Johnson S, Nguyen V, Coder D. Assessment of Cell Viability. *Current Protocols in Cytometry*. 2013;64(1):9.2.1-9.2.26.
32. Promega. CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. *Tech Bull*. 2012.
33. Wellings DA. 1 - The history and development of preparative HPLC. *A Practical Handbook of Preparative HPLC*. Oxford: Elsevier Science; 2005. p. 1-15.
34. Weston A, Brown PR. Chapter 1 - High-Performance Liquid Chromatography. *HPLC and CE*. San Diego: Academic Press; 1997. p. 1-23.

35. Weston A, Brown PR. Chapter 2 - Separations in High-Performance Liquid Chromatography. HPLC and CE. San Diego: Academic Press; 1997. p. 24-70.
36. Weston A, Brown PR. Chapter 3 - Instrumentation for High-Performance Liquid Chromatography. HPLC and CE. San Diego: Academic Press; 1997. p. 71-133.
37. Mercado Hernández VJ, Vargas Membreño FA. Cuantificación de la masa (mg) de Ivermectina en producto terminado del medicamento Max-Iver, por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en los laboratorios de PANZYMA entre los meses comprendidos de Junio y Octubre del año 2011: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-MANAGUA; 2011.
38. Dong MW. 3 - HPLC Instrumentation in Pharmaceutical Analysis: Status, Advances, and Trends. In: Ahuja S, Dong MW, editors. Separation Science and Technology. 6: Academic Press; 2005. p. 47-75.
39. Moldoveanu SC, David V. Chapter 6 - General Aspects Regarding the HPLC Analytical Column. Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis. Boston: Elsevier; 2017. p. 231-77.
40. LaCourse ME, LaCourse WR. Chapter 17 - General instrumentation in HPLC\* A2 - Fanali, Salvatore. In: Haddad PR, Poole CF, Riekkola M-L, editors. Liquid Chromatography (Second Edition): Elsevier; 2017. p. 417-29.
41. Ms. Katrin Töppner SSBG, Goettingen, Germany, Dr. Dirk Hansen P, Aschaffenburg, Germany, Dr. Elmar Herbig SA, Goettingen, Germany. HPLC Analysis -The Role of Ultrapure Water. Sartorius AG 2014.
42. Boysen RI, Hearn MTW. 9.02 - High Performance Liquid Chromatographic Separation Methods. Comprehensive Natural Products II. Oxford: Elsevier; 2010. p. 5-49.
43. Esquivel Soto EE, Leal Guadarrama LI. Cromatografía de Fase Reversa. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO 2004.
44. Reagnts PRAC-I. Reactivos para Cromatografía de Par Ionico. 2018.
45. de Andrade FI, Florindo Guedes MI, Pinto Vieira ÍG, Pereira Mendes FN, Salmito Rodrigues PA, Costa Maia CS, et al. Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC. Food Chemistry. 2014;157:193-8.

46. Diacu E, Ene CP. Study of analytical parameters of the HPLC method for tartrazine and sunset yellow analysis in soft drinks. *Rev Chim.* 2010;61(12):1177-82.
47. Quattrocchi O, Abelaira S, Felipe Laba R. *Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica* 1992.
48. AOAC. *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals* 2002.
49. Épshtein NA. Validation of HPLC Techniques for Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2004;38(4):212-28.
50. Soman G, Yang X, Jiang H, Giardina S, Vyas V, Mitra G, et al. MTS dye based colorimetric CTLL-2 cell proliferation assay for product release and stability monitoring of Interleukin-15: Assay qualification, standardization and statistical analysis. *Journal of Immunological Methods.* 2009;348(1):83-94.
51. Vidal M, Garcia-Arrona R, Bordagaray A, Ostra M, Albizu G. Simultaneous determination of color additives tartrazine and allura red in food products by digital image analysis. *Talanta.* 2018;184:58-64.
52. de Araújo Siqueira Bento W, Lima BP, Paim APS. Simultaneous determination of synthetic colorants in yogurt by HPLC. *Food Chemistry.* 2015;183:154-60.
53. Alves SP, Brum DM, Branco de Andrade ÉC, Pereira Netto AD. Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection. *Food Chemistry.* 2008;107(1):489-96.
54. Analysis AOMo. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. 2016.
55. Martin F, Oberson J-M, Meschiari M, Munari C. Determination of 18 water-soluble artificial dyes by LC-MS in selected matrices. *Food Chemistry.* 2016;197:1249-55.
56. Ghoreishi SM, Behpour M, Golestaneh M. Simultaneous determination of Sunset yellow and Tartrazine in soft drinks using gold nanoparticles carbon paste electrode. *Food Chemistry.* 2012;132(1):637-41.
57. Llamas NE, Garrido M, Nezio MSD, Band BSF. Second order advantage in the determination of amaranth, sunset yellow FCF and tartrazine by UV-vis and

- multivariate curve resolution-alternating least squares. *Analytica Chimica Acta*. 2009;655(1):38-42.
58. Jiang S, Xu J, Xu P, Liu L, Chen Y, Qiao C, et al. A Novel Molecularly Imprinted Sensor for Direct Tartrazine Detection. *Analytical Letters*. 2014;47(2):323-30.
59. Sheet P. HT1376 (ATCC® CRL1472™).
60. Sheet P. PC3 (ATCC® CRL1435™).
61. Sheet P. Hep G2 [HEPG2] (ATCC® HB8065™).
62. Humana LdGVy. Conteo celular y evaluación de viabilidad 2008.
63. Imane H, Bellahcen S, Souna F, Belmakki F, Aziz M, Bnouham M, et al. A 90-day oral toxicity study of Tartrazine, a synthetic food dye, in Wistar rats 2011. 159-69 p.
64. Amin KA, Abdel Hameid H, Abd Elsttar AH. Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(10):2994-9.
65. Gil C. Toxicological effects of food additives – Azo dyes: Swedish University of Agricultural Sciences; 2014.

## ANEXOS

**Tabla N° 4.1 Análisis de Varianza entre Marcas**

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
MARCA N°1	3	507.171963	169.057321	26.4838619
MARCA N°2	3	387.057808	129.019269	0.01093736
MARCA N°3	3	302.67907	100.893023	0.14245299

ANÁLISIS DE  
VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	7040.5028	2	3520.2514	396.465601	4.2357E-07	5.14325285
Dentro de los grupos	53.2745044	6	8.87908407			
Total	7093.7773	8				

*Fuente: Elaboración propia (Excel)*

**Tabla N° 4.2 Análisis de Varianza entre Lotes de la Marca N°1**

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Lote 1	3	523.341214	174.447071	45.7119369
Lote 2	3	505.588972	168.529657	7.46430833
Lote 3	3	492.585703	164.195234	14.1790907

ANÁLISIS DE  
VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	158.903171	2	79.4515856	3.53876577	0.096577603	5.14325285
Dentro de los grupos	134.710672	6	22.4517786			
Total	293.613843	8				

*Fuente: Elaboración propia (Excel)*

**Tabla N° 4.3 Análisis de Varianza entre Lotes de la Marca N°2**

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Lote 1	3	386.708852	128.902951	5.0576865
Lote 2	3	387.147973	129.049324	19.5410032
Lote 3	3	387.316598	129.105533	16.6801267

ANÁLISIS  
DE  
VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.06562415	2	0.03281208	0.00238467	0.997619119	5.14325285
Dentro de los grupos	82.5576328	6	13.7596055			
Total	82.6232569	8				

*Fuente: Elaboración propia (Excel)*

**Tabla N° 4.4 Análisis de Varianza entre Lotes de la Marca N°3**

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Lote 1	3	301.438008	100.479336	0.18375684
Lote 2	3	303.647869	101.215956	0.39779025
Lote 3	3	302.937209	100.97907	0.26754257

ANÁLISIS  
DE  
VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.84845793	2	0.42422897	1.49888399	0.296516853	5.14325285
Dentro de los grupos	1.69817932	6	0.28302989			
Total	2.54663725	8				

*Fuente: Elaboración propia (Excel)*

**Tabla N° 4.5 Reporte del Análisis de Varianza y Dunnett de la línea celular  
HT1376 (ATCC® CRL-1472™)**

**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** Data 1 in anova ht1376

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Failed ( $P < 0.050$ )

**Equal Variance Test:** Passed ( $P = 0.445$ )

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
CONTROL	3	0	100.000	2.808	1.621
0.001mM	3	0	88.321	9.351	5.399
0.01mM	3	0	73.339	0.396	0.229
0.1mM	3	0	59.062	0.488	0.282
1mM	3	0	44.362	1.210	0.699

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	5934.800	1483.700	76.337	<0.001
Residual	10	194.363	19.436		
Total	14	6129.162			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference ( $P = <0.001$ ).

Power of performed test with  $\alpha = 0.050$ : 1.000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
CONTROL vs. 1mM	55.638	15.457	<0.001	Yes
CONTROL vs. 0.1mM	40.938	11.373	<0.001	Yes
CONTROL vs. 0.01mM	26.661	7.407	<0.001	Yes
CONTROL vs. 0.001mM	11.679	3.245	0.028	Yes

*Fuente: Sigma Plot 12.0*

**Tabla N° 4.6 Reporte del Análisis de Varianza y Dunnett de la línea celular  
PC3 (ATCC® CRL-1435™)**

**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** Data 1 in Notebook4

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Passed (P = 0.953)

**Equal Variance Test:** Failed (P < 0.050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
CONTROL	3	0	100.000	2.150	1.241
0.001mM	3	0	82.006	2.451	1.415
0.01mM	3	0	70.621	1.041	0.601
0.1mM	3	0	67.834	3.822	2.206
1mM	3	0	35.589	5.862	3.384

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	6678.032	1669.508	137.559	<0.001
Residual	10	121.366	12.137		
Total	14	6799.399			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
CONTROL vs. 1mM	64.411	22.644	<0.001	Yes
CONTROL vs. 0.1mM	32.166	11.308	<0.001	Yes
CONTROL vs. 0.01mM	29.379	10.328	<0.001	Yes
CONTROL vs. 0.001mM	17.994	6.326	<0.001	Yes

*Fuente: Sigma Plot 12.0*

**Tabla N° 4.7 Reporte del Análisis de Varianza y Dunnett de la línea celular  
Hep G2 [HEPG2](ATCC® HB-8065™)**

**One Way Analysis of Variance**

**Data source:** Data 1 in Notebook5

**Normality Test (Shapiro-Wilk)** Passed (P = 0.595)

**Equal Variance Test:** Passed (P = 0.410)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
CONTROL	3	0	100.000	1.598	0.923
0.001mM	3	0	90.909	3.301	1.906
0.01mM	3	0	75.932	4.514	2.606
0.1mM	3	0	65.402	9.863	5.695
1mM	3	0	45.062	4.023	2.322

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	5598.894	1399.724	47.516	<0.001
Residual	10	294.579	29.458		
Total	14	5893.474			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0.001).

Power of performed test with alpha = 0.050: 1.000

Multiple Comparisons versus Control Group (Dunnett's Method) :

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	q'	P	P<0.050
CONTROL vs. 1mM	54.938	12.397	<0.001	Yes
CONTROL vs. 0.1mM	34.598	7.807	<0.001	Yes
CONTROL vs. 0.01mM	24.068	5.431	<0.001	Yes
CONTROL vs. 0.001mM	9.091	2.051	0.190	No

*Fuente: Sigma Plot 12.0*

**Tabla N° 4.8 Data de todas las determinaciones de muestras por HPLC**

	MARCA N°1		MARCA N°2		MARCA N°3	
	Área	Concentración (mg/L)	Área	Concentración (mg/L)	Área	Concentración (mg/L)
<b>Determinación N° 1</b>	483925	178.47	405296	130.69	316996	99.99
	483207	178.23	392892	126.38	318916	100.66
	449890	166.64	402276	129.64	319296	100.79
<b>Determinación N° 2</b>	463693	171.44	398085	128.18	320699	101.28
	454165	168.13	414351	133.84	318625	100.56
	448105	166.02	389291	125.13	322240	101.81
<b>Determinación N°3</b>	445994	165.29	387184	124.39	321556	101.58
	451768	167.29	407048	131.30	319051	100.70
	430801	160.00	407980	131.62	318913	100.66

*Fuente: Elaboración propia (Excel)*