



Revista Chilena de Nutrición

ISSN: 0716-1549

sochinut@tie.cl

Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y

Toxicología

Chile

Abbruzzese J., Daniela V.; Gonzalez B., Claudia B.; Pérez M.-Coll, Cristina S.; Fonovich A. de
Schroeder, Teresa M.
UN NUEVO APORTE A LA TOXICOLOGÍA DE COLORANTES ALIMENTARIOS. CONJUGACIÓN
HEPÁTICA DE LA INDIGOTINA CON FOSFOLÍPIDOS
Revista Chilena de Nutrición, vol. 32, núm. 1, abril, 2005
Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología
Santiago, Chile

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46914635005>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

UN NUEVO APORTE A LA TOXICOLOGÍA DE COLORANTES ALIMENTARIOS. CONJUGACIÓN HEPÁTICA DE LA INDIGOTINA CON FOSFOLÍPIDOS.

A NEW APPROACH TO THE TOXICOLOGY OF FOOD COLORANTS. HEPATIC CONJUGATION OF INDIGOTIN WITH PHOSPHOLIPIDS

Daniela V. Abbruzzese J.1, Claudia B. Gonzalez B.1,2, Cristina S. Pérez M.-Coll 1,3, Teresa M. Fonovich A. de Schroeder1,*

1Laboratorio de Análisis Ambiental. Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de General San Martín. Argentina.

2Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Estación Experimental Castelar - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

3Instituto de Ciencias Ambientales y Salud (ICAS) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

RESUMEN

Demostramos anteriormente que la solubilidad del colorante alimentario indigotina se modifica en el hígado de mamíferos, volviéndose totalmente insoluble en solventes acuosos y altamente soluble en solventes orgánicos. En el presente trabajo se estudió la movilidad cromatográfica de la indigotina presente en un extracto lipídico de hígado de rata, 20 minutos después de su administración intravenosa. Se estudió además la presencia de grupos funcionales correspondientes a su probable conjugación con fosfolípidos, en el extracto preparado al raspar la banda del colorante separada mediante cromatografía de fosfolípidos en capa delgada. Se detectaron $0,144 \pm 0,087 \text{ } \mu\text{g}$ de fósforo fosfolipídico y se demostró la presencia de ácidos grasos en dicha fracción, proveniente de un extracto preparado a partir de 2 gramos de hígado. Estos resultados confirman el aumento en la solubilidad del colorante en solventes orgánicos una vez que ha ingresado al hígado y sugieren que el mismo sufre una probable conjugación con fosfolípidos en dicho órgano.

Palabras claves: colorante alimentario; indigotina; metabolismo hepático; lípidos

ABSTRACT

We have demonstrated that the solubility of the food colorant indigotin was modified in mammalian liver, where it becomes totally insoluble in aqueous solvents and highly soluble in organic ones. This work presents the results from the studies on the chromatographic mobility of indigotin present in the lipidic extract obtained from rat liver 20 minutes after its intravenously administration. The presence of functional groups corresponding to its probable conjugation with phospholipids was also studied in the extract prepared from the colorant

spot separated by thin layer chromatography of phospholipids. 0,144 +/- 0,087 μ g of phospholipidic phosphorus were detected and fatty acid presence was demonstrated in this fraction, obtained from liver extract prepared with 2 grams of tissue. These results confirm the increment of the colorant solubility in organic solvents once it is incorporated in the liver and they suggest that it suffers a probably conjugation with phospholipids in this organ.

Key words: food colorant; indigotin; liver metabolism; lipids

INTRODUCCIÓN

Actualmente, los colorantes alimentarios se utilizan en gran número, fundamentalmente para restituir el color perdido en los procesos de elaboración, o para ofrecer al consumidor colores atractivos o diversos. El mayor uso se da en bebidas, helados, dulces, golosinas en general, caramelos, sopas, pastas, platos elaborados, margarinas, entre otros. Estos aditivos se clasifican en tres grandes grupos: naturales, idénticos a los naturales y sintéticos o artificiales. Las exigencias legales que restringen el uso de aditivos, son muy estrictas respecto de los colorantes, y en particular para el caso de los sintéticos. Se exigen criterios rigurosos de pureza, y certificación de aptitud para su uso en la industria alimentaria (1).

Los colorantes artificiales deben reunir una serie de requisitos que aseguren su buen uso, entre los que se encuentran: ser inocuos, hidrosolubles, de fácil incorporación al producto, estables frente a la luz y al calor, indiferentes a cambios en el pH y a la presencia de agentes oxidantes/reductores, económicos, constituir una especie química definida y pura, poseer una buena capacidad de tinción, y no aportar olores ni sabores desagradables,

Muchos de los colorantes artificiales que se utilizan en la actualidad datan de décadas anteriores a la de 1970, y de ese período son también los estudios en los que se basan muchas de las legislaciones que hoy regulan su aprobación. Distintos países desarrollados han realizado revisiones periódicas de algunos de esos estudios, y en muchos casos los resultados han generado controversias tales que llevaron a su prohibición (2).

El objeto del presente trabajo es estudiar la probable conjugación hepática del colorante indigotina (E-132 según la denominación europea ó 132 de acuerdo a International Numbering System INS, Codex Alimentarius) (E-numbers e INS; Indigotina) (3), con fosfolípidos, en ratas de la cepa Wistar, de manera de aportar nuevos conocimientos que permitan revisar la reglamentación vigente para el citado colorante, el cual no presenta en la mayoría de los países, restricción a su uso (4,5).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los estudios de intoxicación aguda se llevaron a cabo mediante una inyección intravenosa a ratas macho Wistar de aproximadamente 200 g de peso corporal (12 mg indigotina / kg peso corporal). El colorante (mezcla de 3,3'-dioxo-2,2'-bi-indolilideno-3,5'-disulfonato disódico y 3,3'-dioxo-2,2'-bi-indolilideno-5,7'-disulfonato disódico, cloruro y/o sulfato de sodio como excipiente) (6) se aplicó en una concentración de 2,375 mg disueltos en 0,2375 mL de una mezcla compuesta por solución fisiológica: etanol (50:50). Al cabo de 10 minutos de aplicada la inyección, los animales fueron sacrificados, y el hígado removido, previa perfusión con solución fisiológica a fin de eliminar posibles restos de colorante en los vasos sanguíneos. El

tejido hepático fue cortado en piezas pequeñas y luego homogeneizado en una solución de cloroformo:metanol (2:1) (7). Se separó la fase clorofórmica y el extracto lipídico obtenido fue lavado 4 veces, evaporado bajo nitrógeno gaseoso y resuspendido en un volumen mínimo de cloroformo:metanol (2:1). El extracto fue dividido en dos porciones, las que fueron utilizadas para separar lípidos neutros y fosfolípidos mediante cromatografía en capa delgada de acuerdo a Fonovich y cols (8) utilizando una mezcla de ácido acético: hexano:dietil éter (2,5:60:40) como solvente de corrida; y mediante cromatografía bidimensional en capa delgada utilizando una mezcla de solventes alcalina (cloroformo:metanol:amoníaco, 65:25:5) para la primera dimensión y una acídica (cloroformo:acetona:metanol:ácido acético:agua, 3:4:1:1:0,5) para la segunda (9), respectivamente.

La banda del cromatograma donde se identificó el colorante, fue extraída de la sílica, por raspado de la placa obtenida durante la separación de fosfolípidos. Luego se separó el colorante de la sílica gel utilizando una solución de cloroformo:metanol (2:1) y este nuevo extracto fue sometido a: a) hidrólisis ácida (10) y separación posterior de glicéridos, b) determinación de su contenido en fósforo fosfolipídico según el método de Rouser (9). En paralelo se determinó la concentración de fósforo en una muestra de sílica gel obtenida de la zona de la placa donde no se reveló presencia de lípidos con yodo (utilizado como control negativo) y la correspondiente a la banda de cardiolipina (control positivo). La banda correspondiente al colorante fue procesada por sextuplicado (bandas presentes en 6 placas). La concentración del colorante en el extracto clorofórmico se midió espectrofotométricamente a 591 nm (λ máxima) utilizando una curva patrón del colorante preparado en la misma mezcla de solventes, (pendiente=0,10509 y $r^2=0,9998$).

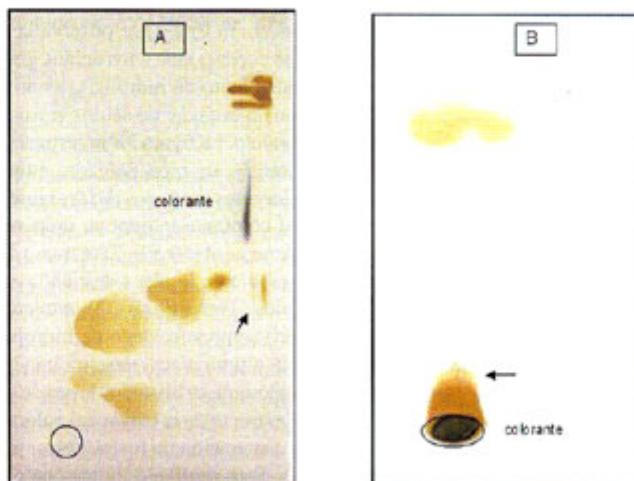
RESULTADOS

Los extractos lipídicos de hígado de rata presentaron hasta 7 μ g de indigotina/g de tejido. No se obtuvieron extractos del hígado en solventes acuosos, dado que estudios previos realizados por este grupo de trabajo indicaron ausencia de colorante en dichos sistemas (11), hallazgos que demostraron, una vez ingresado al hígado, un drástico cambio de solubilidad del colorante en diferentes solventes.

La figura 1 muestra las placas de cromatografía en capa delgada en las que se separaron los glicéridos y los fosfolípidos. En la primera placa (1A) se observa que el colorante contenido en el extracto clorofórmico de hígado no posee movilidad en el sistema de solventes utilizado para separar glicéridos, permaneciendo en el punto de siembra junto con los fosfolípidos. En la figura 1B en cambio, se observa que el colorante, presenta una movilidad similar a la de cardiolipina (identificada por comparación con un estándar corrido en paralelo) en el sistema utilizado para separar fosfolípidos.

FIGURA 1

Separación cromatográfica de fosfolípidos (A) y glicéridos (B) del extracto lipídico de hígado de rata inyectada con indigotina.



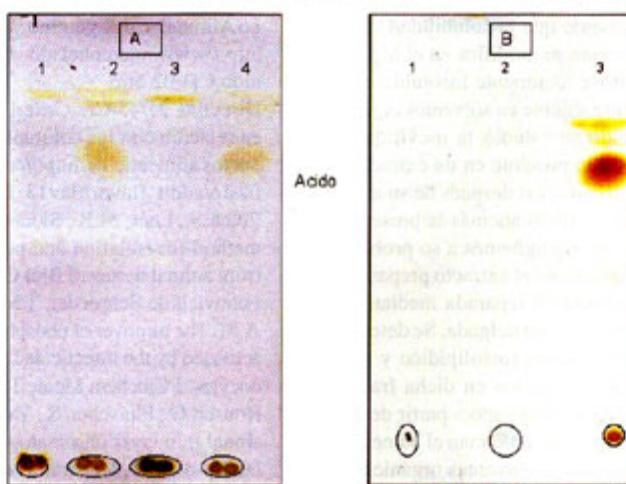
- A: La primera dimensión se desarrolló hacia arriba y la segunda hacia la derecha.
 Los círculos indican los puntos de siembra y la flecha indica la banda correspondiente a cardiolipina.
 B: El colorante quedó en el punto de siembra.
 La flecha indica la posición de los diglicéridos.

La figura 2A muestra los resultados de la cromatografía en capa delgada de los glicéridos presentes en: 1) extracto de hígado de rata control (sin inyección de colorante), 2) extracto de hígado de rata control (sin inyección de colorante) luego de hidrólisis ácida, 3) extracto de hígado de rata inyectada con indigotina, 4) extracto de hígado de rata inyectada con indigotina, luego de hidrólisis ácida. En las líneas del cromatograma asignadas como 2) y 4) se observa la aparición de una banda que corresponde a los ácidos grasos liberados durante el tratamiento de hidrólisis, identificada por comparación con un estándar de ácidos grasos y glicéridos, corrido en paralelo. La figura 2B muestra los resultados de la cromatografía en capa delgada, empleada para separar los glicéridos presentes en las siguientes muestras: 1) patrón del colorante indigotina preparado en solución fisiológica: etanol (50:50), 2) extracto de la banda del colorante presente en la placa destinada a la separación de fosfolípidos (ver fig. 1B), 3) extracto preparado como en 2) pero sembrado luego de hidrólisis ácida. La línea 3 de esta última placa, muestra una banda correspondiente a ácidos grasos liberados luego de someter a hidrólisis ácida el extracto de la banda del colorante obtenida de la placa de separación de fosfolípidos, figura 1B).

Este resultado indica que el colorante no sólo permanece en la fracción de fosfolípidos extraídos del hígado y presenta movilidad cromatográfica similar a cardiolipina, sino que además se habría conjugado con una molécula lipídica que posee ácidos grasos en su estructura, probablemente un fosfolípido.

FIGURA 2

Separación cromatográfica de glicéridos en diferentes muestras, con y sin hidrólisis ácida.



A: 1) extracto de hígado de rata control (sin inyección de colorante), 2) extracto de hígado de rata control (sin inyección de colorante) luego de hidrólisis ácida, 3) extracto de hígado de rata inyectada con indigotina, 4) extracto de hígado de rata inyectada con indigotina, luego de hidrólisis ácida.

B: 1) patrón del colorante indigotina preparado en solución fisiológica:etanol (50:50), 2) extracto de la banda del colorante presente en la placa destinada a la separación de fosfolípidos, 3) extracto preparado como en 2) pero sembrado luego de hidrólisis ácida.

Los círculos indican los puntos de siembra.

En las líneas 2 y 4 de la placa A y 3 de la placa B se evidencia una banda correspondiente a ácidos grasos.

La concentración de fósforo presente en la banda correspondiente al colorante, obtenida de la placa de separación cromatográfica de fosfolípidos se determinó según se indicó en la sección Material y métodos. El contenido de fósforo fosfolipídico en la banda correspondiente al colorante (figura 1B) fue de $0,144 \pm 0,087 \text{ mg}$. Este resultado se obtuvo luego de restar a cada replicado el valor correspondiente a un control negativo, procesado por duplicado como se indica en Material y métodos. Como control positivo del método se cuantificó el fósforo presente en la banda de cardiolipina (la más próxima al colorante).

DISCUSIÓN

El colorante alimentario indigotina es ampliamente utilizado en todo el mundo, dado que se considera un aditivo sin efectos colaterales, ya que se absorbe poco en el intestino y se elimina fácil y rápidamente por orina, además de no haberse demostrado hasta el momento su carácter mutogénico (4). Sin embargo, los resultados de trabajos anteriores de este grupo (11) y los mostrados en el presente trabajo indican que la solubilidad del colorante sufre una modificación importante una vez que ha ingresado al hígado, convirtiéndose en una molécula altamente soluble en solventes orgánicos, modificación que resulta de su probable conjugación con los fosfolípidos del tejido hepático. Esta característica de la indigotina no ha sido demostrada con anterioridad y pone de manifiesto la necesidad de confirmar la formación del conjugado en hígado de mamíferos, mediante técnicas de espectrometría de masas. Dicha confirmación impediría que el colorante cumpla con uno de los requisitos indicados para su buen uso: ser hidrosoluble (ver introducción). Si bien dichos requisitos

hacen referencia a la sustancia pura (12), el incremento de la solubilidad del colorante en lípidos, una vez que ha pasado por el hígado, lo hace tan peligroso como la sustancia pura en cuanto a su acumulación en el tejido graso y a la toxicidad asociada, motivo por el cual este fenómeno debería ser tenido en cuenta.

Uno de los trabajos considerados por la FAO para el establecimiento de la IDA (Ingesta Diaria Aceptable) demostró que 6 horas después de la inyección de indigotina en ratas, el 27% del colorante permanecía aún en el organismo (63% se eliminaba por orina y 10% en la bilis (13). Estos autores demostraron también, que solo el 3% del colorante apareció en la orina tres días después de su ingestión por vía oral, sin embargo, en su trabajo destacaron específicamente la falta de absorción del compuesto en el tracto gastrointestinal. En relación con una probable carcinogénesis, los resultados fueron dispares y dieron lugar a amplias discusiones, ya que si bien se estableció que había un alto porcentaje de sarcomas locales en los sitios donde se inyectó subcutáneamente el colorante (13), no fue posible demostrar el efecto carcinogénico cuando el mismo fue administrado por vía oral. El informe de FAO presentó valores de DL50 de 93 y 2 000 mg/kg de peso para una inyección intravenosa y dosis oral respectivamente y el valor NOEC correspondiente a 500 mg/kg de peso corporal. Teniendo en consideración estos datos y un factor de seguridad apropiado, el organismo internacional estableció la IDA para la indigotina entre 0 y 2,5 mg/kg de peso corporal (13).

Los niños constituyen probablemente, el grupo de la población más expuesto a los colorantes alimentarios, debido principalmente a que consumen grandes cantidades de golosinas (14), las que tienen cada vez colores más intensos; y también a su bajo peso corporal, que contribuye a aumentar la dosis recibida expresada en mg o μ g/kg de peso corporal. Existe además una gran preocupación, en diferentes países entre los que se encuentra la Argentina, por la falta de una política de educación destinada a asegurar una buena alimentación. Si bien se plantea la necesidad de educar a la población para prevenir una enfermedad tan frecuente como la obesidad, no existe en cambio, ese nivel de preocupación en los diferentes ámbitos de la alimentación y la salud, en cuanto al drástico incremento que se ha producido en los últimos años en el consumo de aditivos alimentarios.

La necesidad de estudiar la cantidad y calidad de todos los aditivos que se ingieren a diario, resulta evidente con solo leer los rótulos de algunos alimentos envasados, los cuales casi en su totalidad cumplen con la reglamentación vigente, a través de la declaración de los aditivos que contienen, pero a la vez alertan acerca del incesante incremento en el consumo de los mismos por parte de la población. Este grupo de trabajo está llevando a cabo en la actualidad un análisis del contenido y el tipo de aditivos que se utilizan en diferentes grupos de alimentos, que se exponen a la venta en el partido de Vicente López (provincia de Buenos Aires), a través de un proyecto conjunto la Dirección de Bromatología y Zoonosis de la Municipalidad de dicho partido, financiado por la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de la provincia de Buenos Aires.

La IDA recomendada por la FAO (entre 0 y 2,5 mg/kg de peso corporal) para el colorante, es muy difícil de alcanzar (15) si el mismo es solamente utilizado para dar una baja intensidad de color en los alimentos. Sin embargo, cada vez más frecuentemente salen a la venta golosinas que atraen a los niños por la intensidad de su color, que luego visualizan a través de la permanencia del mismo en sus bocas durante un largo tiempo posterior a su ingestión. Este hecho, sumado al bajísimo control que se ejerce en la actualidad sobre el consumo de golosinas por los niños y a los resultados del presente trabajo nos permiten sugerir la necesidad de revisar la IDA para este colorante y profundizar los estudios tendientes a confirmar su conjugación con lípidos, así como alertar a las autoridades sanitarias acerca de

la necesidad de generar una política de educación destinada a revisar aspectos de la alimentación básica.

Agradecimientos: El presente trabajo fue financiado por la Universidad Nacional de General San Martín.

REFERENCIAS

1. Vettorazzi, G. El impacto toxicológico causado por la exposición a los aditivos alimentarios. Necesidad de establecer criterios de seguridad y definiciones de buenas prácticas de manufacturación y de producción agrícola, con especial referencia a los llamados "Bienes agrícolas huérfanos". *Acta Toxicol Argent* 1996; 4: 2-7.
2. Valle Vega, P., Florentino, B.L. Toxicología de Alimentos. Instituto Nacional de Salud Pública, Centro Nacional de Salud Ambiental, México D.F., 2000.
3. E-numbers e International Numbering System INS del Codex Alimentarius. [http://www.ourfood.com/Ingredients.html#SECTION001301200000000000000000](http://www.ourfood.com/Ingredients.html#SECTION0013012000000000000000)
4. Arámbula, S.L. A primera vista. *Revista Énfasis Alimentación* 2003; 2: 6-18.
5. Resolución MERCOSUR GMC/RES/45/93. Código Alimentario Argentino y Resoluciones Mercosur. <http://www.mundohelado.com/cursos/cursos- contenidoCD-02.htm>
6. Directiva 95/45/CE. Criterios específicos de pureza en relación con los colorantes utilizados en los productos alimenticios. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sfp/addit_flavor/flav13_es.pdf
7. Folch, J., Lees, M.B., Sloane Stanley, G.H. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
8. Fonovich de Schroeder, T.M., Pechén de D'Angelo, A.M. The turnover of phospholipid fatty acyl chains is activated by the insecticide Dieldrin in *Bufo arenarum* oocytes. *J Ciochem Molec Toxicol* 2000; 14: 82-87.
9. Rouser, G., Fleischer, S., Yamamoto, A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1970; 5: 494-496.
10. Yoshimi, O., Ikuya, I., Takashi, H., Masamiki, M. Lipids and fatty acids of a moderately halophilic bacterium, n° 101. *Biochim Biophys Acta* 1976; 424: 337-350.
11. Abbruzzese, D.V., Fonovich de Schroeder, T.M. Estudio de la incorporación de colorantes alimentarios en la fracción lipídica de hígado de rata. *Acta Toxicol Argent* 2003; 11: 59-63.

12. Indigotin: prepared at the 28th JECFA (1984) In FNP 31/1 (1984) and FNP 52 (1992). http://apps3.fao.org/jecfa/additive_specs/docs/0/additive-0227.htm
13. FAO nutrition meetings report series n° 46^a who/food add/70.36. International programme on chemical safety. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v46aje14.htm>
14. León Espinosa de los Monteros, M.T., Rueda Domingo, M.T., Castillo Sánchez, M.D., León Espinosa de los Monteros, M., Ceballos Atienza, R., Fernández Lloret, S. Estudio de los aditivos alimentarios y su repercusión en la población infantil. Medicina de Familia 2000; 1: 25-30.
15. Toledo, M.C., Guerchon, M.S., Ragazzi, S. Potential weekly intake of artificial food colours by 3-14-year-old children in Brazil. Food Addit Contam 1992; 9: 291-301.

Profesora Teresa M. Fonovich A. de Schroeder
Avda. General Paz entre Albarellos y Constituyentes (INTI) Edificio 23,(1650)
San Martín, provincia de Buenos Aires, Argentina.
Fono: 011-4580-7296 ext. 108. Fax: 011-4512-5151 ext. 109, Email:
Teresa.Fonovich@unsam.edu.ar