



# Efecto citotóxico de Tartrazina en el índice mitótico de células meristemáticas de *Allium cepa*

## Cytotoxic effect of Tartrazine in the mitotic index of meristematic cells of *Allium cepa*

Lam Ulloa Carbajal, Fátima Zavala de la Cruz y Manuel Sisniegas

Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú

### RESUMEN

Se determinó el efecto citotóxico de la Tartrazina en el índice mitótico de células meristemáticas de *Allium cepa* expuesta a diferentes tiempos y concentraciones. Para ello, bulbos enraizados de *A. cepa* se expusieron a 0 mg/mL, 0.1 mg/mL, 1mg/mL y 5mg/mL de Tartrazina durante 8 y 24 horas en un diseño jerárquico. Posteriormente, las raicillas fueron aisladas, fijadas y coloreadas para realizar el preparado citológico y su posterior lectura al microscopio. Los resultados mostraron una disminución del índice mitótico (IM) en todos los tratamientos ensayados con respecto al control y testigos, siendo el tratamiento de 5 mg/mL-8 horas el que generó un menor valor del IM (3.3 %). Asimismo, se observó la disminución del índice de fases en todos los tratamientos con respecto al control. Se concluye que la Tartrazina disminuye el Índice mitótico y de fases de células meristemáticas de *A. cepa*.

**Palabras clave:** Citotoxicidad, *Allium cepa*, Tartrazina, índice mitótico.

### ABSTRACT

Tartrazine is one of the most widely used artificial colorings in the Peruvian market, this dye has caused controversy as to its toxic effects, which is why the cytotoxic effect of tartrazine was determined using the *Allium* test. For this, bulbs were exposed Rooted *A. cepa* Tartrazine at 4 concentrations for 2 different times. Subsequently rootlets were isolated, fixed and stained for cytologic preparation and later reading microscope. The results showed a decrease in the mitotic index (MI) in all treatments tested Tartrazine from control and witnesses whose treatment 5 mg / mL-8hrs which genre IM lowest (3.3%), therefore decreases Tartrazine and mitotic phases of meristematic cells of *A. cepa* Index., possibly because the meristematic cells of *A. cepa* respond to foreign agents inhibiting or delaying the division.

**Key words:** Cytotoxicity, *Allium cepa*, Tartrazine, mitotic index.

## INTRODUCCIÓN

La Tartrazina es uno de los colorantes artificiales más utilizados en la industria de alimentos, tales como bebidas gasificadas amarillas y anaranjadas, bocaditos de tipo chizitos, chocolates, entre otros<sup>1,2</sup> que presentan un consumo excesivo e indiferente, por lo que la DIGESA<sup>3</sup> normativizó su uso, solicitando consignar su presencia o ausencia en la etiqueta de los productos, al final de la lista de ingredientes, en forma específica, clara, visible, e indubitable, con letra mayúscula y negrita.

La Tartrazina (E-102, C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>), cuya masa molar es 534,4, pertenece al grupo de los colorantes azoicos<sup>4</sup> caracterizados por la presencia del grupo azo (-N=N-) unido a anillos aromáticos, se presenta en forma de polvo brillante, de color amarillo-naranja, es inoloro, higroscópico, estable en ácidos, soluble en agua y poco soluble en etanol. En condiciones alcalinas adquiere una coloración rojiza<sup>5</sup>, y en condiciones de luz solar y a un pH ácido es químicamente inestable<sup>6</sup>.

En la última década, este colorante ha causado controversia en cuanto a sus efectos tóxicos, y su uso fue prohibido en algunos países como Estados Unidos, Japón, Australia y Alemania, que demostraron inducción de aberraciones cromosómicas y otros efectos genotóxicos en mamíferos<sup>7,8,9</sup>; además, se ha demostrado in vitro el potencial mutagénico en cultivos de células del estómago humano<sup>10</sup>. Sin embargo, en otro estudio realizado en Francia concluyeron que la tartrazina no genera aumento de la frecuencia de células micronucleadas en colon de ratas a las concentraciones de 1000 mg/kg, 200 mg/kg y 20 mg/kg<sup>11,12</sup>.

La citotoxicidad y la genotoxicidad del colorante Tartrazina también fue comprobado en un bioensayo en *Allium cepa* L. cuyo resultado fue la reducción significativa del índice mitótico y la presencia de puentes anafásico, telofásicos y micronúcleos<sup>13</sup>. Debido a esta controversia se propuso una investigación dirigida a determinar el efecto citotóxico de la Tartrazina en células meristemáticas de *Allium cepa* expuesta a diferentes tiempos y concentraciones, mediante la evaluación del índice mitótico e índice de fases.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material biológico y químico, selección y preparación de bulbos de *A. cepa* L.

Se utilizaron bulbos de *Allium cepa* L. variedad roja arequipeña, adquiridos en el Mercado Indoamericano de Santo Domingo de la Ciudad de Trujillo (La Libertad), también se utilizó el colorante industrial amarillo Tartrazina (E-102) en polvo, cantidad 30 g, adquirido en Laboratorios Su Man. Los bulbos se seleccionaron de acuerdo a criterios de inclusión como la homogeneidad en tamaño, forma, color, consistencia dura, peso entre 60 y 70 g. y buenas condiciones sanitarias, seleccionándose aproximadamente 100 bulbos a los que se les aislaron las catáfilas y raicillas secas teniendo cuidado de no dañar el disco radicular.

### Acondicionamiento del material biológico y exposición de raicillas de *A. cepa* a soluciones de Tartrazina

Los bulbos de *A. cepa* L. se colocaron en vasos descartables de 100 mL con agua potable procurando mantener sumergido solo el disco radicular con recambio diario de agua, después de 72 horas (3 días) de crecimiento de raicillas, se seleccionaron 12 bulbos con mayor número de raicillas con 2 a 3 cm. de longitud, a fin de asegurar la presencia de células con una cinética mitótica constante. De los bulbos seleccionados, el grupo control (3 bulbos) se mantuvieron en agua potable y los otros tres grupos cada uno de 3 bulbos fueron expuestos a soluciones de Tartrazina a concentraciones de 0 mg/mL (T2 y T3), 0.1 mg/mL (T4 y T5), 1 mg/mL (T6 y T7) y 5 mg/mL (T8 y T9) durante 8 y 24 horas, respectivamente, siguiendo un diseño Jerárquico o anidado (Tabla 1)

### Fijación, conservación y coloración de raicillas de *A. cepa*.

Después de 8 horas de exposición, se cortaron la mitad del número total de raicillas de cada bulbo y la otra mitad, se cortaron a las 24 horas; finalmente, cada raicilla se fijó en solución de Carnoy's y fueron conservados a 4°C, las raicillas fueron retiradas de la solución fijadora de Carnoy's, y se lavaron 3 veces en agua destilada para retirar los restos del fijador. Luego, se procedió a secarlas con papel toalla para eliminar los restos de agua de la superficie. Posteriormente, siguiendo la técnica de Tijio y Levan (1956), se procedió a colorearlas y a realizar los preparados citológicos

### Identificación, recuento celular y análisis estadístico

Se realizó la identificación de las fases mitóticas y recuento celular de aproximadamente 3000 células meristemáticas de cada tratamiento. Posteriormente, se calcularon los índices mitóticos e índices absolutos de fases. Y también se evaluó la estimación mediante la prueba estadística de ANAVA para un Diseño Anidado. El Diseño anidado permitirá encontrar y reducir las diferencias significativas entre raíces de un mismo bulbo, entre raíces de diferentes bulbos y entre tratamientos.

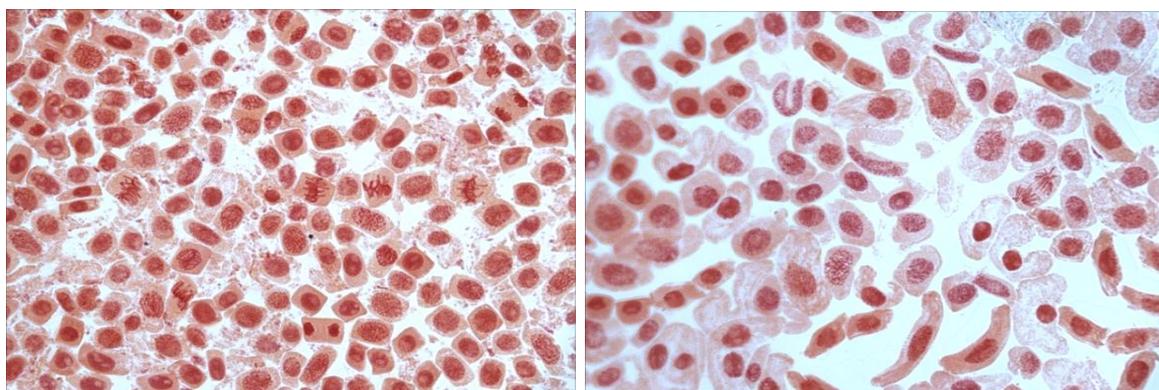
### RESULTADOS

Se encontró que la Tartrazina mostró un efecto citotóxico para las células meristemáticas de ejemplares de *A. cepa* expuestas a diferentes concentraciones y tiempos. Al comparar cada testigo (0 mg/mL-8 horas y 0 mg/mL-24 horas) con su tratamiento respectivo se puede observar una reducción significativa ( $p < 0,055$ ) del índice mitótico, siendo el tratamiento 5 mg/m-8 horas (T8) el que causo el más bajo Índice mitótico en sus bulbos anidados (Tabla 1).

Se observó, asimismo, que el proceso mitótico en las células tratadas con Tartrazina se altera, observándose mayormente células en fases terminales: anafase y telofase (Fig. 1); sin embargo, como corresponde, el óndice profasico es le que prevalece inicialmente y luego decae drásticamente en las células tratadas, a diferencia de las otras fases que no sufren mayores aumentos (Fig. 2).

**Tabla 1.** Promedio y Desviación estándar del Índice mitótico absoluto de células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a diferentes tiempos y concentraciones de Tartrazina

Tratamiento	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
Bulbo	0mg/ml-0h	0mg/ml-8h	0mg/ml-24h	0.1mg/ml-8h	0.1mg/ml-24h	1mg/ml-8h	1mg/ml-24h	5mg/ml-8h	5mg/ml-24h
Bulbo 1	10.0±0.6	9.9±0.5	6.5±1.8	8.8±0.3	7.1±2.1	5.3±0.5	4.0±1.5	3.7±1	4.5±2.6
Bulbo 2	4.1±1.5	10.1±0.2	3.7±1.8	7.3±0.9	5.9±1.3	4.6±1	3.8±0.4	3.3±1.5	4.4±1.2
Bulbo 3	3.0±0.8	10.3±0.3	3.7±0.9	6.7±1.3	5.8±1.8	3.8±0.9	4.2±1.2	3.3±0.4	4.7±1



**Fig. 1.** Microfotografías de células meristemáticas de *Allium cepa* coloreadas siguiendo la técnica de Tijio y Levan (X400): izquierda, sin ningún tratamiento (hay presencia de células en las cuatro fases de la mitosis) y derecha, tratadas con 5 mg/mL de Tartrazina durante 8 horas (T8), nótese la presencia mayoritaria de células en profase y anafase.

## DISCUSIÓN

La población meristemática formada por células expuestas a diferentes dosis de Tartrazina muestra una reducción del índice mitótico; como una validación de esta investigación, hay estudios anteriores tanto en células vegetales como animales que indican que la Tartrazina produce un efecto citotóxico y genotóxico<sup>7,8</sup>, esto se debe a que las células cuando se encuentran en medio con condiciones extracelulares desfavorables, retrasan su progresión e incluso pueden entrar en un estado de reposo especializado, o también puede suceder cuando las células sufren mutaciones por cualquier tipo de agentes, esto provoca la inactivación de los genes encargados del control del ciclo celular o llamados genes *cdc*, deteniendo el ciclo celular en puntos de control específicos principalmente en los dos primeros; en el punto de control de G1 y punto de control de G2<sup>14</sup>, lo significaría que el ciclo celular de varias células se quedarían detenidas en interfase.

Silvia<sup>15</sup> realizó una investigación de la citotoxicidad de la Tartrazina en *A. cepa* y obtuvo una reducción del índice mitótico de 10.5 en su control a 7.6 (0.4 mL - 24 horas); además, pudo observar la presencia de puentes anafásicos, telofásicos y micronúcleos. Esto indicaría que la Tartrazina tiene una actividad antiproliferativa en células meristemáticas de *A. cepa*. Los resultados de la presente investigación también muestran que las raíces del bulbo 2 y bulbo 3 del control (0mg/mL - 0 horas) y del testigo dos (0mg/mL-24 horas) presentan alteraciones en el IM, es interesante ver como células meristemáticas expuestas a agua varían sus IM, probablemente esto se deba a un efecto sinérgico del tiempo prolongado de exposición al Carnoy<sup>16</sup>, la contaminación con pequeñas cantidades de soluciones de Tartrazina que pudo haber sucedido en el sistema de experimentación la heterogeneidad del tamaño de la raíz.

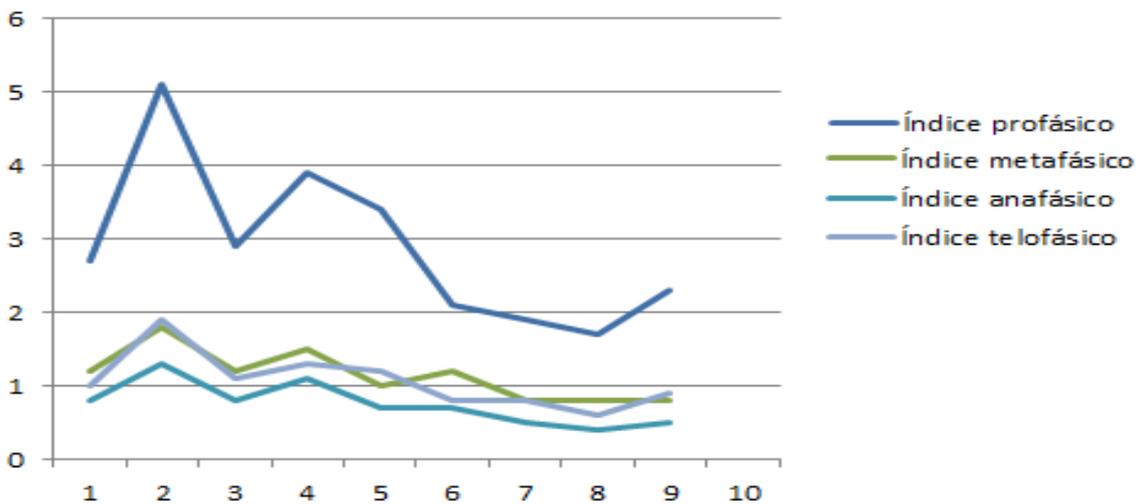


Fig. 2. Promedios de Índice absoluto de fases de células meristemáticas de *Allium cepa* expuestas a diferentes tiempos y concentraciones de Tartrazina

En cuanto a los índices de fases (Fig. 2,) las células meristemáticas de *A. cepa* expuestas a 0.1 mg/mL, 1 mg/mL 5 mg/ml también presentan una disminución de su índice en comparación con los testigos, hay estudios que apoyan a este resultado<sup>7,8</sup>. Cabe destacar, al mismo tiempo, que estos concentraciones están por encima de la IDA de la Tartrazina (0-7,5 mg / kg de peso corporal-día)<sup>17,18</sup>. Asimismo, hay estudios de toxicología genética que mostraron que la Tartrazina no tiene potencial mutagénico<sup>19,20</sup>.

Por tanto parece, tanto en humanos como en animales de laboratorio, que la absorción oral y metabolismo de Tartrazina son extremadamente bajas. Estudios toxicocinéticos publicados en la literatura muestran que menos del 2% de la Tartrazina es ingerido absorbida<sup>21</sup>. La mayor parte de este colorante se metaboliza fácilmente en el colon por la flora intestinal<sup>17,18</sup>. El metabolito urinario es importante ácido sulfanílico que se produce después de la reducción Tartrazina por las bacterias intestinales<sup>22</sup>. Al mismo tiempo, utilizando microsomas de hígado de bovino, que se supone que imitar

microsomos hepáticos humanos como fuentes de enzimas de CYP2A6 y UDP-glucuronosiltransferasa (UGT1A6 y UGT2B7) se encontró que la Tartrazina no es un sustrato para estos enzimas<sup>23</sup>.

En humanos, después de la ingestión de 100 mg, ni rastro de la Tartrazina fue encontrado en la orina de los voluntarios<sup>24</sup>. Un estudio in vitro realizado sobre las bacterias intestinales de cinco sujetos confirmaron la reducción de Tartrazina por el flora intestinal<sup>25</sup>. Estos estudios indican que en humanos y en animales de laboratorio no causa ningún efecto citotóxico debido a su metabolismo, sin embargo no podemos decir que la Tartrazina no tiene ningún efecto adverso, porque debemos tener en cuenta las diferentes respuestas de cada organismo, y los factores extrínsecos que influyen en la experimentación; además el Test *Allium* tiene una mayor validación que las células de animales, asimismo los resultados obtenidos en esta investigación indicarían posiblemente un efecto citotóxico para las células meristemáticas de *A. cepa*.

## CONCLUSIÓN

- La Tartrazina disminuye el Índice mitótico y de fases en células meristemáticas de *Allium cepa* expuesta a diferentes concentraciones y tiempos, a partir de esto resultados se infiere que este colorante presenta efecto citotóxico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Restrepo GM, Acosta EV, Ocampo JC, Morales C. Sustitución de tartrazina por betacaroteno en la elaboración de bebidas no alcohólicas. *Lasallista de investigación*, 2006; 3(3): 7-12.
2. ASPEC. Peligrosa tartrazina en Inka Kola, productos Costa y otros. Con nuestro Perú. 2009: <http://www.aspec.org.pe/> o <http://www.connuestroperu.com/consumidor/20/8367-peligrosa-tartrazina-en-inka-kola-productos-costa-y-otros>
3. DIGESA. Evalúan 300 productos que contienen tartrazina. Con nuestro Peru. 2013. <http://www.connuestroperu.com/consumidor/20/34301-evaluan-300-productos-que-contienen-tartrazina>:
4. Kapor MA, Yamanaka H, Carneiro AP, Zanoni BM. Electroanálisis de colorante alimenticios: determinacao de indigo carmín e tartrazina. *Eclética química*, 2001; 26(1): 13-17.
5. Restrepo M. Sustitución de colorantes en alimentos. *Lasallista de investigación*. 2007; 4(1):23-28
6. Ostroski I, Bariccati RA, Lindino CA. Estabilidad de dos colorantes tartrazina y amarillo crepúsculo en refrigerantes. *Acta Scientiarum Technology*, 2005; 27(2): 101-106
7. Feng J, Cerniglia CE, Chen H. Significancia toxicological del tintes azo metabolism de la microbiota intestinal humana. *Frontiers in Bioscience*, 2012; 1(4): 568-586
8. Patterson RM, Butler JS. Tartrazine-induced chromosomal aberrations in mammalian cells. *Food and Chemical Toxicology*, 1982; 20(4):461-465
9. Moutinho IL, Bertges Lc, Assis RV. El uso prolongado de los alimentos colorante tartrazina (FD & C Amarillo n 5) y sus efectos sobre la mucosa gástrica de ratas Wistar. *Brasileño Diario biología*, 2007; 67(1):141-145.
10. Polonio M, Perez F. Consumo de aditivos alimentario e efeitos á saúde: desafios para a Saúde pública brasileira. *Caderno de Saú publica*, 2009; 25(8):45-51.
11. Martine P, Gérard J, Mostafa OE, Jean MP. Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. *Food and Chemical Toxicology*, 2009; 47(2): 443-448
12. Maekawa A, Matsuoka C, Onodera H, Tanigawa H, Furuta K, Kanno J, et al. Lack of carcinogenicity of tartrazine (fd & c yellow no. 5) in the f344 rat. *Food and Chemical Toxicology*, 1987; 25(12): 891-896
13. Silvia GK, Goncalves de Oliveira MA, Carvalho FR, Carvalho MC, Peron AP. Citotoxicidad de tres colorantes alimentarios amarillo crepúsculo (E-110), Vermelho bordeaux (E.123) y amarillo tartrazina (E-102) en células meristemáticas de *Allium cepa* L. *Aliment Cien y Tecn*, 2013; 33(1):18-23
14. Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología Molecular de la Célula*. 4º ed. Barcelona: Omega S.A. 2002
15. Sanz J, Gimenes-Martin G, De La Torre C. On set off cell proliferation in dormant root of *Allium cepa* L. *Bulbs. Kinetic Analysis Biologie Celulare*, 1990; 32: 95-103
16. Rábago VM, Aguilar PE, García VE. Efecto de la "microdosis" de Carnoy y de la proporción KCI/Carnoy sobre el índice mitótico. *Patología*, 1992; 30(2):83-85

17. JECFA. Specifications for identity and purity and toxicological evaluation of food colours. In: FAO Nutrition Meetings Report Series No. 38B. WHO, Geneva. 1964
18. Khera KS, Munro IC. A review of the specifications and toxicity of synthetic food colors permitted in Canada. *CRC Crit. Rev Toxicol*, 1979; 6: 81-133.
19. Brown J, Roehm G, Brown R. Mutagenicity testing of certified food colors and related azo, xanthene and triphenylmethane dyes with the salmonella/microsome system. *Mutat Res*, 1978; 56: 249-271.
20. Andrioli N, Wulff A, Mudry M. *Allium cepa* como biomonitor de toxicidad y genotoxicidad de metronidazole; *Theoria*, 2006; 15: 9-16
21. Murdoch RD, Pollock I, Naeem S. Tartrazine induced histamine release in vivo in normal subjects. *J. R. Coll. Physicians Lond*, 1987; 21: 257-261.
22. Roxon JJ, Ryan AJ, Wright SE. Reduction of water-soluble azo dyes by intestinal bacteria. *Food Cosmet Toxicol*, 1967; 5(3), 367-369.
23. Kuno N, Mizutani T. Influence of synthetic and natural food dyes on activities of CYP2A6, UGT1A6, and UGT2B7. *J. Toxicol Environ Health*, 2005; A68: 1431-1444.
24. Jones R, Ryan AJ, Wright SE. The metabolism and excretion of tartrazine in the rat, rabbit and man. *Food Cosmet Toxicol*, 1964; 23: 447-452.
25. Watabe T, Ozawa N, Kobayashi F, Kurata H. Reduction of sulphonated water-soluble azo dyes by micro-organisms from human faeces. *Food Cosmet Toxicol*, 1980; 18: 349-352.