



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“REVISIÓN SISTEMÁTICA Y META-ANÁLISIS:
UNA HERRAMIENTA PARA ACLARAR LOS
EFECTOS ADVERSOS DEL PONCEAU 4R
(E124) EN MODELOS EXPERIMENTALES”**

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

GABRIELA ARREOLA AVILA

**DIRECTORA DE TESINA:
DRA. VERÓNICA FREYRE FONSECA**

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO, 2018





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Verónica Freyre Fonseca su incansable dedicación, motivación, paciencia y aliento durante cada paso de la realización de esta Tesina; por creer en mí, además de transmitirme conocimientos, hábitos y actitudes de superación en mi persona.

Al laboratorio de Toxicología y Carcinogénesis y a la Dra. Yolanda Irasema Chirino López, por concederme un agradable espacio de trabajo, y las herramientas necesarias que facilitaron mi estancia durante este proyecto. Así como al proyecto PAPIIT IN218015.

A mis sinodales:

Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro

Dra. Ana María García Bores

Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Por sus valiosos comentarios durante la revisión de esta tesina, que resultaron en el enriquecimiento del contenido. Muchas Gracias Doctores.

Pero en especial, retribuyo con enorme satisfacción a mi amada UNAM, mi alma máter, que por medio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala me brindo la más extraordinaria formación académica, la biología.

DEDICATORIA

A MIS HIJOS Y ESPOSO

Porque ya no sé quién le dio la vida a quien, y es así como vienen las más grandes alegrías, sin antelación, así ustedes tres llegaron y me colmaron de dicha, inspiración, amparo, e innumerables cosas extraordinarias. Gracias por ser, estar y alentar mis ganas de crecer en todos los ámbitos. Les prometo que éste no es más que el primer paso de un camino lleno de éxito y fortuna que estamos por recorrer juntos. Los amo.

A MIS PADRES Y HERMANA

Mis más grandes ejemplos, los pilares que me sostienen incansablemente. Como muestra de amor y enorme agradecimiento, por los valores, educación y esfuerzo que han invertido siempre en mí. Por todo lo que soy, y lo que hemos logrado hoy. Gracias.

A MIS SUEGROS

Quienes se han vuelto personas primordiales en mi vida, a quienes quiero, admiro y estaré infinitamente agradecida por su incondicional cariño y apoyo en todos los aspectos que involucraron la culminación de esta etapa profesional. Este logro también es suyo.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
GLOSARIO	8
ABREVIATURAS	11
RESUMEN	13
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Industria alimentaria	
1.1.1 Clasificación de aditivos	15
1.1.2 Colorantes alimentarios	17
1.1.3 Legislación y organismos reguladores de los colorantes	17 17
1.2 Colorantes azoicos	19
1.2.1 Características	19
1.2.2 Compuestos azoicos de alquilo	20
1.2.3 Compuestos azoicos de arilo	20
1.2.4 Efectos toxicológicos de azoderivados	21
1.3 Ponceau 4R (E124)22	22
1.3.1 Propiedades 22	22
1.3.2 Productos en los que se emplea el E124	22
1.3.3 Regulación de uso y toxicidad del E124	24
1.4 Evidencia científica	26
1.4.1 Escala de jerarquías en la clasificación de datos científicos	26
1.4.2 Introducción y justificación del uso de la Revisión sistemática y Meta-análisis.	27
1.4.3 Métodos de realización	28
a. Definición del problema	28
b. Búsqueda de Información	29

	c. Análisis cualitativo	29
	d. Análisis cuantitativo	29
	e. Interpretación y presentación de los datos	29
	f. Publicación	30
		31
2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	32
	2.1 Objetivo general	32
	2.2 Objetivos particulares	
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
	3.1 Revisión Sistemática	34
	3.2 Meta-análisis	35
4.	RESULTADOS	38
	4.1 Revisión Sistemática	39
	5.1.1 Codificación de estudios pertenecientes a la Revisión Sistemática	41
	4.2 Meta-análisis	44
5.	DISCUSIÓN	49
	5.1 Efectos de la ingesta del ponceau 4R sobre modelos experimentales	50 51
	5.2 Daños del ponceau 4R al ADN	52
	5.3 Recomendaciones	
6.	CONCLUSIONES	55
		57
7.	LITERATURA CITADA	

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Espectro de luz visible.	19
Figura 2. Estructura química del grupo funcional azo.	20
Figura 3. Reacción de acoplamiento diazoico.	21
Figura 4. Estructura química del E124.	22
Figura 5. Productos en México que añaden ponceau 4R (E124) a su composición.	23
Figura 6. Jerarquización de la evidencia científica.	26
Figura 7. Proceso básico de realización de la Revisión Sistemática y el Meta-análisis.	28
Figura 8. Relación de términos establecidos para la búsqueda bibliográfica.	34
Figura 9. Proceso de selección de estudios incluidos en la Revisión Sistemática y Meta análisis.	39
Figura 10. Análisis comparativo entre estudios que reportaron daño al ADN inducido por E124, mediante MA.	45

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Clasificación que otorga la Unión Europea a los aditivos alimentarios.	16
Tabla 2. Productos autorizados en México que añaden E124 a su composición.	25
Tabla 3. Ventajas y Limitaciones de la Revisión sistemática y Meta-análisis.	27
Tabla 4. Relación de términos con el número de resultados encontrados en la búsqueda bibliográfica por las diferentes bases de datos.	40
Tabla 5. Codificación de estudios para el Meta-análisis.	45
Tabla 6. Análisis estadístico para el Meta-análisis.	46
Tabla 7. Datos de referencia para realizar el Forest Plot.	46

GLOSARIO

A

Aditivo: Sustancia que se añade controladamente a un alimento.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

Albúmina: Proteína que se encuentra en gran proporción en el plasma sanguíneo.

Alquilo: Sustituyente, formado por la separación de un átomo de hidrógeno de un hidrocarburo saturado o alcano.

Amina: Compuesto orgánico derivado del amoniaco por sustitución de uno o dos átomos de hidrógeno por radicales hidrocarbonados monovalentes.

Anilina: Amina cíclica que se encuentra como componente del añil; resulta de reemplazar un hidrógeno de la molécula del benceno por el grupo amino (-NH₂).

Anillos aromáticos: Derivados del benceno, que mantienen intacta su estructura cíclica.

Antioxidante: Molécula capaz de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas.

Arilo: Sustituyente derivado de un hidrocarburo aromático al extraérsele un átomo de hidrógeno del anillo aromático.

ARN: Ácido ribonucleico.

Azoderivado: Compuestos que contiene el enlace azo (-N=N-).

B

Bencidina: sólido cristalino de color amarillo grisáceo, blanco o rojo grisáceo. Se usó para producir tinturas para telas, papel y cuero.

C

Carcinogénesis: Conjunto de fenómenos que determinan la aparición y desarrollo de un cáncer.

Codex alimentarius: Organismo Internacional en materia de normas de alimentación, se encarga de compilar normas, códigos de comportamiento, directrices y recomendaciones.

Colorante: Sustancia capaz de teñir y dar un nuevo color a un tejido, alimento, etc.; puede ser de origen natural o sintético.

Compuesto químico: Sustancia formada por la combinación de dos o más elementos distintos.

Conjugación química: Ocurre en compuestos orgánicos donde los átomos unidos mediante enlace covalente producen una región llamada de deslocalización electrónica (los electrones pertenecen a todo el compuesto).

Conservador alimentario: Sustancia que detiene o minimiza el deterioro causado por la presencia de diferentes tipos de microorganismos.

Consumidor: Individuo que compra (o consume) alimentos con la finalidad de satisfacer los deseos o necesidades de sí mismo.

Citocinas: Grupo de proteínas de bajo peso molecular que actúan mediando interacciones complejas entre células de linfoides, células inflamatorias y células hematopoyéticas.

D

Derivado cárnico: Productos elaborados en base a carne, grasa, con o sin despojos, adicionados de condimentos, especias y aditivos.

E

Edulcorante alimentario: Sustancia química que se añade a un alimento o medicamento para darle sabor dulce.

Emulsionante alimentario: Sustancia que ayuda en la mezcla de dos sustancias que normalmente son poco miscibles o difíciles de mezclar.

Enzima: Proteína soluble producida por las células del organismo, que favorece y regula las reacciones químicas en los seres vivos.

Error estándar: Indicador estadístico de la amplitud de una muestra pequeña, mide la dispersión o variabilidad de la media, con un nivel de confianza del 95%.

Espesante alimentario: Sustancia que aumenta la viscosidad de un alimento sin modificar otras propiedades.

Estabilizador alimentario: Sustancia que se utiliza para mantener el aspecto y textura de los alimentos.

F

Fermentador alimentario: Microorganismos (levadura y bacilos) que participan en una reacción anaeróbica para la producción de ácido, alcohol.

G

Grupo funcional: Átomo o conjunto de átomos unidos a una cadena carbonada, responsables de la reactividad y propiedades químicas de los compuestos orgánicos.

H

Histamina: Hormona que actúa como un potente dilatador de los vasos sanguíneos y de los capilares, provocando la contracción de la musculatura lisa.

Hiperactividad: Trastorno de la conducta caracterizado por una actividad constante, comportamientos cambiantes y dificultad de atención, que se observa en personas con cuadros de ansiedad y niños.

Heterogeneidad estadística: Calcula la suma de las desviaciones cuadráticas entre el resultado individual de cada estudio y el resultado global, es decir, mide que tan combinables son los resultados individuales de estudios comparables en un Meta-análisis.

M

Meta-análisis: Análisis estadístico cuantitativo de varios estudios similares pero independientes para la búsqueda de significancia estadística en el conjunto de datos.

Mutación: Cualquier alteración o variación en el código genético.

Mutagénesis: Producción de mutaciones sobre el ADN.

Modelo de efectos aleatorios: Consiste en una jerarquía de diferentes poblaciones cuyas diferencias se refieren a esa jerarquía.

P

Ponceau 4R: Colorante azoderivado rojo de carácter sintético; suele emplearse en la coloración de una gran variedad de productos alimentarios.

Propiedad organoléptica: Descripción de las características físicas que tiene la materia, según las pueden percibir los sentidos.

Proceso inflamatorio: Empieza cuando un compuesto químico es liberado por el tejido dañado. Como respuesta, los glóbulos blancos producen sustancias que hacen que las células se dividan y crezcan.

R

Revisión Sistemática: Herramienta que recopila y sintetiza información científica sobre un tema.

Reacción alérgica: Reacción inmunitaria del organismo frente a una sustancia inocua para un organismo, que se manifiesta por signos y síntomas característicos.

S

Sustancia: Clase particular de materia homogénea cuya composición es fija y químicamente definida.

Síntesis: Proceso del metabolismo que tiene como resultado la formación de componentes celulares a partir de los precursores de baja masa molecular.

T

Toxicología: Ciencia que identifica, estudia y describe la dosis, la naturaleza, la incidencia, la severidad, la reversibilidad y, los mecanismos de los efectos tóxicos de un xenobiótico en un organismo.

Teratogénesis: Alteración funcional, bioquímica o morfológica que se detecta durante la gestación, nacimiento o posteriormente y que es inducida durante el embarazo.

Tamaño del efecto: Medida de la fuerza de un fenómeno, como el cambio en el resultado después de una intervención experimental.

Tendencia: Inclinação o disposición natural que se tiene hacia una cosa determinada.

V

Varianza estadística: Medida de dispersión definida como la esperanza del cuadrado de la desviación de dicha variable respecto a su media.

ABREVIATURAS

- AFCA** - Aditivos Alimentarios Artificiales (siglas en inglés)
- AIBN** - Azobisisobutironitrilo
- BSA** –Suero homólogo de bovino (siglas en inglés)
- CAS** – Servicio de Resúmenes Químicos (siglas en inglés)
- COFEPRIS** –Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
- DL₅₀** – Dosis Letal Media
- E124** –Ponceau-4R (clasificado por la UE)
- EFSA** – Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (siglas en inglés)
- FAO** - Organización para la Alimentación y la Agricultura (siglas en inglés)
- FDA** – Administración de Alimentos y Medicamentos (siglas en inglés)
- FI** – Factor de Impacto de Revistas Indexadas
- GHA** – Agregado Global de Hiperactividad
- GS** – Google Scholar
- HSA** – Suero homólogo de humano
- IDA** – Ingesta Diaria Aceptable
- JEFCA** – Comité Experto en Aditivos Alimentarios (FAO/OMS)
- MA** – Meta-análisis
- MeSH** -Medical Subject Headings (siglas en inglés)
- mg/kg pc/d** –miligramos por kilogramo de peso corporal al día
- MPL** – Nivel Máximo Permitido (siglas en inglés)
- NACHR** - Receptores nicotínicos de acetil-colina
- NMDAR** - N-metil-D-aspartato
- NOAEL** –Nivel mínimo de efectos adversos
- OMS** – Organización Mundial de la Salud
- PB** –Pubmed
- RS** – Revisión Sistemática
- SC** –Scopus
- SCF** - Comité Científico de la Alimentación Humana
- SD** –ScienceDirect
- SSP**- Secretaria de Salud Pública
- UE** – Unión Europea

RESUMEN

El ponceau 4R (E124) es un colorante alimentario rojo, derivado del alquitrán, y a lo largo de su historia se han presentado discordancias sobre el riesgo por su exposición, estableciendo niveles de ingesta diaria aceptable (IDA's) de 0.7-4mg/kg de peso al día, las cuales se fundamentan en una gran diversidad de descubrimientos reportados en modelos experimentales. Esto dió origen a la recomendación de la EFSA, de re-evaluar la seguridad del colorante para el 2020.

Por esta razón, se plantea como objetivo general de ésta tesina hacer una Revisión Sistemática (RS) sobre los resultados publicados y responder si el uso del E124 causa efectos nocivos en la salud utilizando modelos experimentales; complementándolo con un Meta-análisis (MA) enfocado a constatar si existe daño al ADN inducido por E124.

Para cumplir con el objetivo, se hizo una búsqueda en diferentes bases de datos en donde se encontraron hasta 23, 775 estudios relacionados con E124, pero después de considerar los criterios de inclusión: 1. que tuvieran las palabras clave en el título o resumen y 2. que evaluaran la toxicidad del E124 en algún modelo experimental y exclusión: 1. que solo reportaran resultados de caracterización del E124, 2 estudios repetidos, ó 3 no tener acceso al trabajo completo, se incluyeron solo 24 estudios para la revisión. Durante la RS se encontraron 3 aspectos relevantes: 1. el E124 incrementa la hiperactividad en niños, 2. puede unirse a la albúmina humana y 3. causa daños al ADN de modelos experimentales. Partiendo de este último hallazgo se tomaron 5 estudios para hacer un Forest Plot (gráfico representativo del meta-análisis), en donde no se observó una diferencia significativa que indica que existe daño en el ADN.

En este contexto se concluye que la seguridad del E124 no es del todo confiable, y se sugieren pautas para el seguimiento de futuras investigaciones frente a la formación de aminas aromáticas, queden seguimiento, y/o puedan predecir los riesgos a los que se está expuesto. Asimismo, es de importancia mencionar que tanto la RS como el MA son buenas herramientas para determinar si existen efectos adversos por la exposición a E124.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Industria Alimentaria

El término “industria alimentaria” comprende un conjunto de actividades industriales dirigidas al tratamiento, transformación, preparación, conservación y envasado de productos alimenticios, utilizando materias primas de origen vegetal o animal. Estos procesos tienen como finalidad principal satisfacer las necesidades generadas por los hábitos alimentarios de los consumidores y conseguir la máxima prolongación del tiempo de posible consumo, además de potenciar sus cualidades organolépticas, al agregar algún tipo de aditivo alimentario (Berkowitz, 2001).

El hecho de añadir sustancias y/o compuestos a los productos alimenticios, posiblemente tenga su origen en el Paleolítico; cuando la exposición de los alimentos al humo procedente del fuego favorecía su conservación, y se implementó el uso del azafrán y la cochinilla. Más adelante, en el Neolítico, cuando el hombre desarrolló la agricultura y la ganadería, se vió en la necesidad de manipular los alimentos con el propósito de que resultaran más apetecibles y/o que se conservaran en óptimas condiciones, empleando sal y vinagre. Pero debido a la aparición de aditivos creados por la química en el siglo XVIII, surgieron nuevas exigencias por parte de los consumidores, y la industria alimentaria del siglo XX, buscó continuamente nuevos compuestos para incorporar a los alimentos (Multon *et al.* 2000).

1.1.1 Clasificación de aditivos alimentarios

Según el *Codex alimentarius*, la definición de “aditivo” hace referencia a cualquier sustancia que, independientemente de su valor nutricional, se añade intencional y controladamente a un alimento. No obstante, los aditivos deben cumplir varias funciones en los alimentos, que satisfagan o justifiquen su uso imprescindible. Algunas de estas funciones son:

1. Dar textura consistente y lisa (emulsionantes, estabilizadores y espesantes).
2. Mejorar o conservar el valor nutricional (vitaminas, minerales).
3. Conservar la salubridad de los alimentos (conservadores).
4. Controlar su equilibrio ácido-básico (pH) y suministrar fermentación (fermentadores).
5. Dar color y/o mejorar el sabor (colorantes, o potenciadores de sabor).

Para la identificación de los aditivos se sigue la numeración asignada por la Unión Europea (UE), que va precedida por la letra E. Cuando no aparezca ninguna letra antes del número, se referirá a sustancias que, a pesar de estar autorizado su uso, aún no se clasifican en algún grupo establecido (Cubero *et al.* 2002). La cifra de las centenas indica el tipo de función que realiza el aditivo, de acuerdo con la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación que otorga la Unión Europea a los aditivos alimentarios.

Código de asignación	Nombre y/o función
E 1XX	Colorantes.
E 2XX	Conservadores.
E 3XX	Antioxidantes y reguladores de Ph.
E 4XX	Estabilizantes, espesantes, gelificantes y emulsionantes.
E 5XX	Correctores de acidez y sustancias minerales.
E 6XX	Potenciadores del sabor.
E 9XX	Otros aditivos (agentes de recubrimiento, gases de envasado y edulcorantes).
E 11XX	Enzimas.
E 14XX	Almidones modificados.

Fuente: FAO/JEFCA, 2011.

1.1.2 Colorantes alimentarios

El aspecto de los alimentos, enfatiza la importancia de los colorantes alimentarios en la industria. Muchas veces se emplean para resaltar el color natural y otras para devolver el color perdido durante la manipulación para su conservación (Sánchez, 2013). Esto último es lo que ocurre por ejemplo con las conservas de fresa o derivados cárnicos (chorizo) que sin los colorantes rojos resultarían en un feo y poco apetitoso color. Los colorantes pueden ser naturales, si son extraídos de una sustancia vegetal, animal o mineral; o sintéticos, si son productos modificados química o físicamente.

Entre los colorantes artificiales o sintéticos se distinguen los colorantes azoicos (Tartrazina E102, Amaranto E123, Negro Brillante BN E151, Ponceau 4R E124) y no azoicos (Amarillo de Quinoleína E104, Eritrosina E127, Indigotina E132, Azul Brillante FCF E133). Los primeros deben su color al grupo “azo” conjugado con anillos aromáticos por ambos extremos, y en los segundos se engloban a todos aquellos que carecen de este grupo funcional (Eldmalfa *et al.*, 2011).

1.1.3 Legislación y organismos reguladores de los colorantes

El uso generalizado de los colorantes alimentarios exige el establecimiento de algún mecanismo de control que regule su uso y los efectos potenciales a los que está expuesto el ser humano. Para que una sustancia sea admitida como aditivo debe estar bien caracterizada (conocer todas sus propiedades químicas) y debe superar los controles toxicológicos establecidos por parte de los organismos sanitarios (EFSA, FDA, SSP, entre otros). Asimismo, se debe demostrar la necesidad de su uso, de tal modo que suponga algún beneficio para el consumidor (Kobylewski y Jacobson, 2012). Dadas las exigencias de rigurosa seguridad para los aditivos alimentarios, el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios (FAO/OMS) estableció que los aditivos deben someterse a estudios de toxicidad

aguda (ensayos a intervalos de 24 horas), de corta duración (ensayos durante un período de hasta 90 días) y crónica (ensayos durante toda la vida o a varias generaciones de animales de vida corta), así como de teratogénesis, de carcinogénesis y mutagénesis (Golka *et al.* 2004).

Para establecer la cantidad máxima de un compuesto que puede consumirse diariamente durante toda la vida, sin que éste pueda causar un riesgo perjudicial para la salud humana, se ha definido la Ingesta Diaria Aceptable (IDA), expresada en mg/kg de peso corporal al día. Para su cálculo se toma el nivel de dosis sin efecto (NOAEL) en la especie animal más sensible, ya sea en ensayos agudos y/o crónicos, y se divide mediante un factor de seguridad (constante de 10) que nos dará un resultado extrapolable al humano. Los niveles de IDA de los colorantes alimentarios son establecidos por el fabricante mediante pruebas toxicológicas *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo* y sus resultados deben ser comprobados y respaldados por la autoridad correspondiente, y así dictaminar la regulación debida (FAO/JEFCA, 2011).

La normatividad está sustentada por la Comisión del *Códex alimentarius* (FAO/OMS) que es la base de la regulación alimentaria que tienen que ver con la producción, procesamiento y comercio de alimentos que aseguren la protección de la salud de los consumidores a nivel internacional. Pero en México la ejecución de dichas normas (ver subtema 1.3.3) depende de la Comisión Federal (COFEPRIS), vinculada con el Departamento de Regulación y Fomento Sanitario de la Secretaría de Salud Pública (SSP); ambas se complementan para regular y verificar la actividad de las principales industrias del país, entre las que figura primordialmente la alimentaria (COFEPRIS, 2016).

De esta manera también existen organismos internacionales con competencias en materia de aditivos alimentarios, como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) que proporciona métodos científicos para alertar y detectar problemas que afectan la Seguridad alimentaria de los países miembros de la UE (EFSA, 2011); y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) que

protege la salud pública mediante la reglamentación de los mismos, además de proveer al público un medio que indique en la etiqueta, datos sobre el contenido de nutrientes del alimento y permitir al consumidor utilizarlo adecuadamente (FDA, 2017).

1.2 Colorantes azoicos

1.2.1 Características

Los compuestos que contienen el grupo “azo” se denominan azoderivados o colorantes azoicos. Un grupo “azo” es un grupo funcional en donde R y R' son grupos que contienen átomos de carbono y de nitrógeno unidos por un doble enlace (Figura 2). Cuando estos se conjugan con anillos aromáticos, el compuesto que contiene este grupo, absorbe una alta cantidad de radiación electromagnética en el espectro de luz visible (600-700 nm), por lo que llegan a presentar una coloración intensa; que va de tonalidades amarillentas a las rojizas (Figura 1) (IUPAC, 2009).

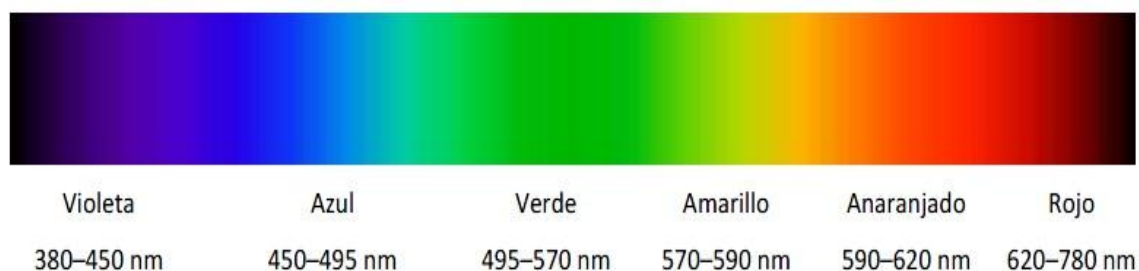


Figura 1. Espectro de luz visible

También, la presencia de otros grupos en el compuesto puede provocar que los azoderivados absorban la luz con mayor o menor intensidad, siendo entonces empleados como colorantes en la industria textil, papelera, cosmética, y alimentaria (Golka *et al.*, 2004). Existen dos grupos de compuestos azoicos. Estos son: 1) compuestos azoicos de alquilo y 2) compuestos azoicos de arilo.

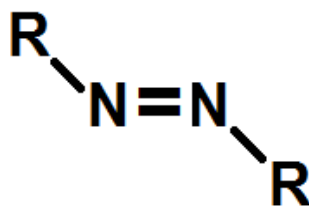


Figura 2. Estructura química del grupo funcional azo

1.2.2 Compuestos azoicos de alquilo

Los compuestos azoicos de alquilo son menos comunes que los compuestos azoicos de arilo. Estos compuestos pueden generar radicales libres a temperaturas elevadas o irradiación, porque los enlaces carbono-nitrógeno se rompen con la pérdida de gas nitrógeno. Por ello, algunos compuestos azoicos alquílicos se utilizan como iniciadores de radicales. Un ejemplo es el Azobisisobutilonitrilo (AIBN), que se usa como precursor para la vía de polimerización del estireno y anhídrido maléico en tolueno, debido a su inestabilidad este propicia procesos de disociación de la luz (fotólisis) (Ohme, 1988).

1.2.3 Compuestos azoicos de arilo

Los compuestos azoicos de arilo son especies cristalinas y más estables que los compuestos azoicos de alquilo. Pueden ser sintetizados mediante la oxidación de las hidrazinas (compuesto químico cuya fórmula química condensada es N_2H_4 , se utiliza como espumante para la preparación de polímeros, catalizadores y fármacos); ó por la reacción de acoplamiento diazoico (Figura 3), que conlleva una reacción aromática donde interviene la sustitución electrofílica. Sin embargo, las sales de estos compuestos, son inestables cuando se encuentran en torno a temperatura ambiente, por lo que las reacciones con ellas se realizan a bajas temperaturas. Por ejemplo, el azobenceno existe como el isómero *trans*, pero a través de la fotólisis a $5^\circ C$, se convierte en el isómero *cis* (Hungeret *al.*, 2005).

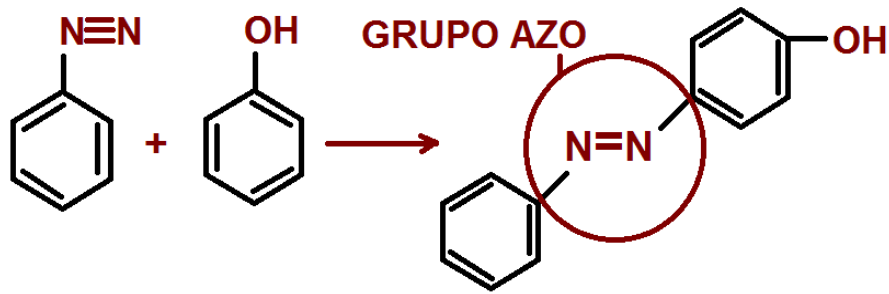


Figura 3. Reacción de acoplamiento diazoico, remarcado en el círculo rojo el grupo azo.

1.2.4 Efectos toxicológicos de azoderivados

La preocupación por la seguridad en el uso de los colorantes azoicos ha hecho que sus efectos sobre la salud hayan sido mucho más estudiados que la mayoría de los colorantes naturales. Pero, al contrario de lo que sucede con otros aditivos, existen grandes variaciones en los límites permisibles de un país a otro, por ejemplo en Estados Unidos se ha prohibido su uso desde 1976 (FAO/JEFCA, 2011).

Los colorantes azoicos suelen ser tóxicos después de la reducción y ruptura del enlace azo, dando lugar a aminas aromáticas (Berkowitz, 2001). Además, estos azoderivados pueden provocar intolerancia en personas alérgicas a salicilatos (aspirina) y también al ser liberadores de histamina, intensifican los síntomas del asma e inducen reacciones alérgicas en los individuos que lo ingieren (Ibero *et al.*, 1981) (Ver subtema 6.1). Además se han reportado mecanismos diferentes para la carcinogenicidad de colorantes azoicos (formación de aminas aromáticas como bencidina y anilina), relacionados con la transformación metabólica a intermediarios electrofílicos reactivos que se unen covalentemente al ADN.

1.3 Ponceau 4R (E124)

1.3.1 Propiedades del colorante

Ponceau 4R (E124) es un compuesto azoico de arilo, de color rojo, sintetizado a partir de alquitrán de hulla, cuyo nombre químico deriva de la sal trisódica del ácido 1- (4-sulfo-1-naftilazo) -2-naftol-6, 8-disulfónico. Su No. CAS es 2611-82-7, y también se conoce en una gama de más de 100 sinónimos, entre los que destacan: New Coccine, Cochineal Red A, Acid red No. 102, entre otros. (FAO/JECFA, 2011). Su fórmula es $C_{20}H_{11}N_2O_{10}S_3Na_3$ (Figura 4) y su peso molecular es 604.5 kD. Su presentación está dada en polvo o gránulos, y es soluble en compuestos polares (H_2O , C_2H_6O) (SGS, 2012).

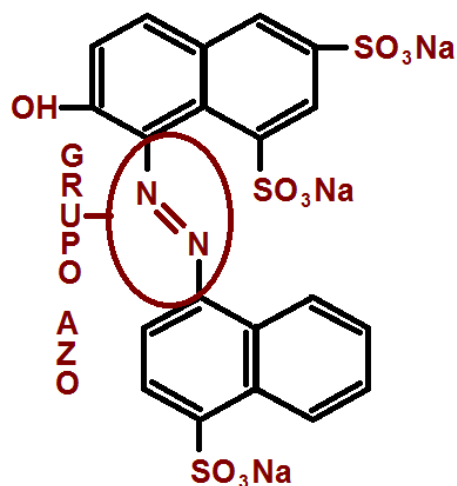


Figura 4. Estructura química del E124.

Cabe señalar que las letras a la derecha del nombre del colorante (S, 2R, 3R y 4R) corresponden al uso final que se le da al colorante en los diferentes tipos de industria como reactivo químico, textil, cosmética y alimentaria, respectivamente.

1.3.2 Productos en los que se emplea el ponceau 4R

El ponceau 4R (E124) se utiliza como colorante alimentario en bebidas, embutidos, derivados cárnicos, gelatinas, sopas, salsas marisqueras, además de

frutas en conserva, algunas golosinas y productos de repostería (EFSA, 2015). En México es utilizado en bebidas gasificadas, congelados, polvos, jarabes, concentrados y productos lácteos condensados según lo dictaminan las Normas Oficiales Mexicanas, para cada producto en específico (Figura 5)(SSP, 2017).



Figura 5. Productos en México que añaden ponceau 4R (E124) a su composición.

1.3.3 Toxicidad y regulación de uso del ponceau 4R (E124)

A lo largo de la historia, el nivel de ingesta diaria aceptable (IDA) del E124 se ha puesto en tela de juicio en dos ocasiones. En 1983 fue evaluado por el Comité Experto en Aditivos Alimentarios (JECFA) y un año más tarde por el Comité Científico de la Alimentación Humana (SCF/UE). Ambos comités establecieron una IDA de 0-4 mg/kg de peso corporal al día. Sin embargo, años más adelante un estudio *in vivo* de Tsuda *et al.*, 2001, informaron sobre los efectos de la migración de ADN nuclear en ratón, administrando el ponceau 4R de un producto comercial de jengibre que contenía 0.65 mg de E124/1 mg de producto. Cabe señalar que en este estudio se sobrepasó la IDA establecida en 1983, pero además, se dictaminó otro riesgo de peligrosidad ante la exposición a grandes cantidades de E124, que se describe a continuación:

Según McCann *et al.*, 2007 la exposición a una mezcla de bebidas gasificadas que incluía E124 dio lugar a un agregado global de hiperactividad (GHA) en niños de

3-9 años. Este trastorno (GHA) se caracteriza por inatención, hiperactividad y comportamiento impulsivo que produce problemas en múltiples áreas de funcionamiento, dificultando el desarrollo social, emocional y cognitivo de la persona que lo padece. Por lo tanto, a raíz de estos hallazgos se solicitó ante la EFSA, la regulación del E124. Ésta autoridad emitió una recomendación sobre los niveles máximos permitidos (MPL, por sus siglas en inglés) de uso y consumo de E124 para adultos. Por consiguiente, la Comisión Europea modificó el anexo II del Reglamento (CE) No. 1333/2008, en donde, los MPL de E124, se disminuyeron en algunos alimentos (conservas, pan de repostería, embutidos, cerveza y jarabes) de acuerdo a las especificaciones necesarias para cada producto dependiendo del país (Italia, Alemania, Francia, Austria, Finlandia, Dinamarca y España) (Durnev *et al.*, 1994)

Así, cuando la EFSA analizó los datos industriales considerando los MPL, ninguno de los cálculos de exposición excedió la IDA establecida entre 0-4mg/kg de peso corporal al día, ya que fue tan solo de 0.7 mg/kg de peso corporal al día (EFSA, 2015). Por su parte, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés), tiene al E124 exento de certificación, ya que es un derivado de fuentes naturales, pero debe cumplir con las especificaciones de identidad, pureza y utilizar las limitaciones descritas en sus reglamentos (Barrows *et al.*, 2003).

Otras Organizaciones como la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) y el Instituto Nacional para la Seguridad y Salud Ocupacional (NIOSH) han clasificado a este colorante como no peligroso o producto de uso limitado (RD. 2001/1995/CEE). Está incluido en la lista de los colorantes alimentarios referidos en el artículo 24 para los que el etiquetado de alimentos incluirá información adicional de precaución (Reglamento 1333/2008; anexo V). “E124: Puede tener efectos negativos sobre la actividad y la atención de los niños” (SGS, 2012).

En México la Ley General de Salud y las Normas Oficiales Mexicanas referentes a los alimentos (NOM-036-SSA1-1993, NOM-086-SSA1-1994, NOM-120-SSA1-

1994, NOM-131-SSA1-1995, NOM-147-SSA1-1996, NOM-185-SSA1-2002, NOM-213-SSA1-2002) establecen las dosis recomendadas de colorantes para su uso en la industria.

Para el E124 se dictaminó una restricción en el uso, y se especifica que deben tener un contenido de color puro inferior al 10% del peso total del producto (NOM-218-SSA1-2011). Además de ser selectos los productos en los que se incorpora el E124, suele ser permitido en productos listos para su consumo, a un límite de concentración por producto que se muestra en la Tabla 2 (NOM-185-SSA1-2002) (SSP, 2017).

Tabla 2. Límites máximos permitidos de E124 en productos mexicanos

Productos autorizados que agregan E124 a su composición	Límite de concentración permitido (mg/kg)
Dulces a base de leche	50
Helados	50
Leche saborizada	80
Producto lácteo combinado saborizado	80
Leche condensada azucarada	150
Fórmula láctea saborizada	80
Leche fermentada acidificada	48
Quesos	48
Carne Fresca	500
Licores	50
Bebidas alcohólicas preparadas y cocteles	50
Bebidas saborizadas no alcohólicas	50
Bebidas saborizadas congeladas	50
Jarabes y concentrados para bebidas	50

saborizadas no alcohólicas	
Concentrados de manufactura para bebidas saborizadas no alcohólicas	50
Alimentos preparados a base de cereal, semillas, harinas, sémolas o sus mezclas	200
Productos de panificación	50
Tortillas de maíz nixtamalizado	320
Tostadas pre envasadas	320
Suplementos alimenticios	300

Fuente: NOM-185-SSA1-2002.

1.4 Evidencia científica

1.4.1 Escala de jerarquías en la clasificación de datos científicos

Existen categorías para clasificar la información científica de manera jerárquica en distintos niveles (Figura 6) (Jovellet *al.*, 1995). En esta tesina se realizará únicamente la revisión sistemática y el meta-análisis complementario (Subtema 1.8.1).



Figura 6. Jerarquización de la información científica.

1.4.2 Introducción y justificación del uso de la Revisión sistemática y Meta-análisis.

Se denomina Revisión Sistemática (RS), a la revisión que tiene como objetivo sintetizar la evidencia, que cumpla con los criterios de inclusión establecidos. Tiene el objetivo de responder una pregunta específica de investigación. La RS utiliza métodos sistemáticos y explícitos, para aportar resultados fiables a partir de los cuales se puedan llegar a conclusiones. Estas pueden influir en la toma de decisiones por las autoridades pertinentes (Halligan, 2005).

Muchas de las revisiones sistemáticas contienen un complemento llamado Meta-análisis (MA). El MA consiste en la aplicación de métodos estadísticos que resumen los resultados de estudios independientes (Bend *et al.*, 2006). Al combinar la información de todos los estudios relevantes, el MA puede obtener estimaciones más precisas de los efectos, que las derivadas de los estudios individuales incluidos en una RS. También permite investigar la consistencia de la evidencia entre estudios y explorar las diferencias entre estudios, aumentando el

“poder estadístico” de la RS en sí (Zohuet *et al.*, 2002); pero como todo método, la RS y el MA también tienen ventajas y limitaciones que se deben de conocer antes de su realización (Tabla 3).

Tabla 3. Ventajas y Limitaciones de la Revisión Sistemática y Meta-análisis.

Ventajas	Limitaciones
<p>Sintetiza e incrementa la validez de las conclusiones</p> <p>Mayor valor metodológico</p> <p>Bajo costo económico</p> <p>Es replicable</p>	<p>No puede corregir o ajustar las discrepancias entre estudios</p> <p>No controla todos los sesgos</p> <p>Es necesaria la participación de varios autores</p>

Dentro de la variabilidad del método, y/o adaptaciones que han descrito diversos autores para llevar a cabo una RS con MA, existe como base fundamental una serie de 6 etapas que obligatoriamente se deben elaborar, aunque cada autor puede modificar a su criterio el desarrollo de este procedimiento según las condiciones y necesidades de su proyecto (Figura 7) (Sánchez-Meca *et al.*, 2010).





Figura 7. Proceso para realizar la Revisión Sistemática y el Meta-análisis.

1.4.3 Métodos de realización

a. Definición del problema

Para plantear el enfoque del proyecto es preciso plantear las preguntas que la revisión quiere responder. Las preguntas bien formuladas serán la guía para el proceso, el cual hace necesario que se puntualicen los criterios de inclusión y exclusión, la búsqueda de información, la codificación de los datos, y la presentación de los resultados (Higgins y Green, 2011).

b. Búsqueda de la información

El recopilado de información se lleva a cabo mediante la búsqueda exhaustiva, amplia, objetiva y reproducible; proveniente de fuentes y estrategias de búsqueda (palabras clave) que identifiquen tantos estudios relacionados como sea posible (dentro del límite de los recursos) (Golder, 2006).

c. Análisis cualitativo

Para el análisis cualitativo se requiere evaluar el enfoque, objetivos, metodología y resultados que determinen la “validez” de los estudios incluidos, ya que estas evaluaciones respaldarán el análisis de datos y las conclusiones. Para ello es

recomendable generar un código (Tabla comparativa) y/o síntesis de los estudios que facilite el proceso de análisis y comparación de resultados (Zohuet *al.* 2002).

d. Análisis cuantitativo

Este es el complemento de la RS, el MA. Generalmente los métodos estadísticos son un promedio de las estimaciones del efecto de diferentes estudios. No obstante se deben tomar en cuenta la heterogeneidad y tamaño del efecto de los estudios individuales incluidos en el MA para asumir que los efectos siguen una distribución normal que evite en la medida de lo posible los sesgos informativos (O'Rourke y Detsky, 1989).

e. Interpretación y presentación de los datos

Las tablas y figuras ayudan a presentar los estudios incluidos y sus resultados en un formato claro. El diagrama de bosque ('Forest-plot') es la manera estándar de ilustrar los resultados de los estudios individuales y los MA, cuya área suele ser proporcional a la contribución de cada estudio al resultado global, a ambos lados de la línea de promedio de resultados. Además, cada estudio está dentro de un segmento que representa los extremos de su intervalo de confianza, el cual suele ser de un 95%. En conjunto esto nos proporciona información clave con respecto a la calidad de las pruebas, la magnitud del efecto de las intervenciones examinadas y el resumen de los datos disponibles (Amchova *et al.*, 2015).

f. Publicación

Según la conferencia *Quality of Reporting of Meta-analysis* (QUOROM) para publicación de MA de estudios, se debe describir detalladamente cada etapa del proceso. El título debe identificar el trabajo como MA o RS con los resultados principales. La introducción debe contextualizar y fundamentar el objetivo. La metodología debe especificar las fuentes y el modo de búsqueda, el período e idioma, los criterios de selección de los estudios, el modo de extracción de los

datos, las características y la manera de evaluación de la heterogeneidad. En la discusión, recalcar los puntos-clave, describir las limitaciones y los potenciales sesgos, para obtener una conclusión global (Martínez *et al.*, 2009).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN

En el pasado se consideró al ponceau 4R (E124) como un aditivo seguro. Sin embargo, algunos estudios muestran efectos nocivos a la salud, y el posible acoplamiento con el ADN, mientras otros los desmienten. Lo cual hace justificable hacer una revisión sistemática y meta-análisis de los resultados publicados y concluir sobre la seguridad del consumo de ponceau 4R (E124).

2.2 OBJETIVOS

2.3 OBJETIVO GENERAL

- ☞ Comparar sistemáticamente los resultados publicados para conocer si el uso del E124, causa efectos nocivos a la salud, a corto (1-72hrs), mediano (3-90días) y/o largo (>90 días) plazo.

2.4 OBJETIVOS PARTICULARES

- ☞ Concluir con la RS sobre los efectos de la ingesta de ponceau 4R (E124).
- ☞ Responder si el ponceau 4R (E124) provoca daños al ADN en modelos experimentales, por medio de un MA.
- ☞ Proponer recomendaciones sobre futuras investigaciones que evalúen la toxicología del ponceau 4R (E124).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Revisión sistemática

La RS se llevó a cabo mediante la búsqueda bibliográfica en bases de datos establecidas (PubMed, Scopus, Science Direct, Google Scholar) para conocer si el uso del E124, causa efectos nocivos a la salud. Se utilizaron como estrategias de búsqueda algunas palabras clave MeSH como: Ponceau 4R, E124, Cochineal Red A, New Coccine, Dye, Toxicity, Hyperactivity, EFSA, FDA y diferentes combinaciones entre ellos (Figura 8).

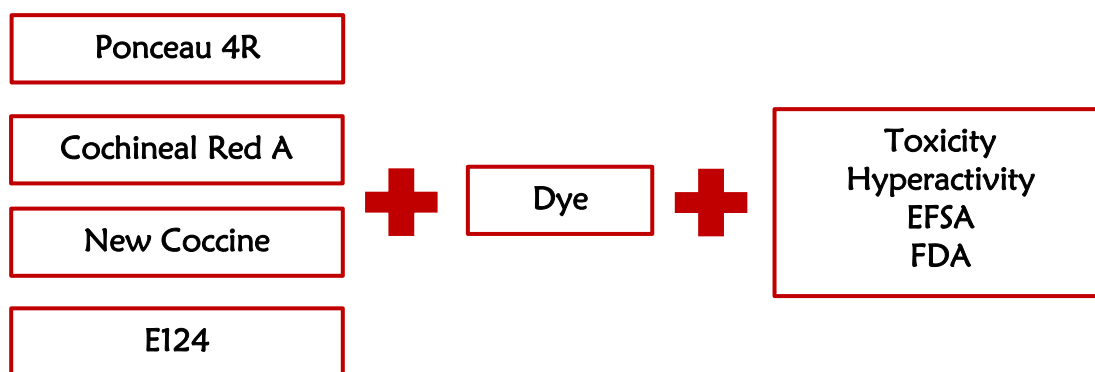


Figura 8. Relación de términos establecidos para la búsqueda bibliográfica.

Para la RS se consideraron estudios reportados en Inglés, que además fueran publicados desde 1950 hasta el presente año. Entre los criterios de selección de estudios figuraron, incluir artículos procedentes de revistas indexadas: 1) que tuvieran alguna de las palabras clave en el título ó resumen del trabajo y 2) que evaluaran los efectos del colorante en algún modelo experimental (*in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*).

En contraste, los criterios de exclusión utilizados fueron: 1) que solo reportaran resultados de identificación o caracterización del ponceau4R (E 124) en alimentos o bebidas, 2) estudios repetidos con las diferentes combinaciones de palabras clave en la misma base de datos, o estudios repetidos entre las bases de datos, 3)

trabajos en los que la palabra clave no fuera objeto del tema de investigación y 4) no tener acceso al trabajo completo.

3.2 Meta-análisis

Después de codificar los estudios incluidos en la RS (Tabla 4), se realizó el MA unificando los datos en un procesador de texto y hojas de cálculo (Office Basic, 2010), mediante el modelo de efectos aleatorios y un intervalo de confianza del 95%. Posteriormente se hizo la evaluación de estudios y se analizaron estadísticamente los datos obtenidos en la previa codificación de los estudios incluidos, siguiendo la técnica de Neyeloff *et al.*, 2012. Brevemente:

- ☞ Tamaño del efecto (ES). Es el producto del número de eventos entre el tamaño de la muestra, es decir la diferencia de medias que nos informa cuántas desviaciones hay entre los resultados de los grupos que se comparan en cada estudio individual. Ec. (1)

$$ES = \sqrt[2]{SE} \quad (1)$$

Error estándar (SE). Representa la incertidumbre de una medida, en función de la desviación estándar y del tamaño de la muestra. Cuanto mayor sea el tamaño muestral, menor será la incertidumbre.

SE es la resultante de la ec. (2).

$$SE = \frac{\sum(x - \mu)^2}{n} \quad (2)$$

- ☞ Varianza (Var). Como es una medida de dispersión aleatoria, se obtiene mediante la ec. (3), representa la media de los residuos al cuadrado.

$$Var = ES^2 \quad (3)$$

- ☞ Pesos de los estudios individuales. Se debe ponderar cada estudio con la inversa de su varianza, por lo que se obtiene la siguiente ec. (4)

$$w = \frac{1}{var} (4)$$

- ☞ Tamaño de efecto ponderado. Esto se calcula multiplicando cada tamaño del efecto por el peso del estudio. Si no se usa ninguna corrección en el peso (es decir, modelo de efecto único) esta ecuación resultará de nuevo en el tamaño del efecto para algunos tipos de estudios. Se calculó utilizando la ec. (5).

$$Tamaño\ ponderado = (w * ES)(5)$$

- ☞ Otras variables. Son indispensables otras dos variables para calcular la estadística Q (Heterogeneidad), mediante la suma de todos los valores de cada variable individual. Obteniendo las siguientes ec. (6).

$$W * ES^2 \quad y \quad W^2(6)$$

- ☞ Cálculo de Q. Esta prueba (Q) mide la heterogeneidad entre los estudios, y se calcula como la suma ponderada de las diferencias al cuadrado entre los efectos individuales del estudio y el efecto combinado entre los estudios, siendo los pesos los utilizados en el método de agrupación.

Q se distribuye como una estadística de chi-cuadrado con k (número de estudios) menos los grados de libertad (*df*). De esta manera la hipótesis nula es que todos los estudios son iguales. Para probarlo, es necesario comparar la heterogeneidad con una tabla de valores críticos. Si el resultado de Q es más bajo que el de la tabla, no debe rechazarse la hipótesis nula (y por lo tanto los estudios son similares). Mediante la ec.(7).

$$Q = \sum (w * ES^2) - \left[\sum (W * ES) \right]^2 / \sum W$$

- ☞ Calculo de I². Otro método que cuantificó la heterogeneidad, y se expresó en porcentaje de la variabilidad total en un conjunto de tamaños de efecto debido a la variabilidad entre estudios, ec. (8).

$$I^2 = (Q - df) * (Q * 100) / (8)$$

- ☞ Modelo de efectos aleatorios. Dado que se asumió que la variabilidad no sólo se debe al error de muestra, sino también a la variabilidad de efectos, este modelo se ajustó al peso de cada estudio con una constante (V) que lo representa, mediante la ec. (9).

$$V = Q - (k - 1) \sum w - \sum w^2 / \sum w \quad (9)$$

Una vez que se tiene la constante, se calculó un nuevo peso para cada estudio usando la ec. (10).

$$wv = 1 * (SE^2 + v) \quad (10)$$

Se repitieron los cálculos de las primeras 5 ecuaciones, con el nuevo valor.

Una vez obtenido esta serie de resultados, se ingresaron los datos necesarios para la realización del “Forest-Plot” (Tabla 6).

- ☞ Para obtener el intervalo, se pasó a porcentaje las tasas, multiplicando el resultado por 100.
- ☞ Mientras que el intervalo de confianza inferior y superior, se obtuvo mediante $I^2 - 100 * Var$.
- ☞ En el intervalo de confianza, se asignaron números ordinales (1-6) a los estudios.

☞ Por último se conjunto en una nueva tabla (Tabla 6) estos datos, dando lugar al grafico correspondiente del MA

Una vez obtenido e interpretado el “Forest-plot”, se concluyó y determinaron las prospectivas de investigación sobre la toxicología del E124.

4. RESULTADOS

4.1 Revisión Sistemática

La búsqueda bibliográfica mostró alrededor de 53,504 estudios, al teclear términos MeSH en las bases de datos. Sin embargo la búsqueda se refinó, con términos complementarios (Tabla 4) y solo se revisaron 23,775 trabajos de los cuales se incluyeron: 24 en la RS (de acuerdo a los criterios de inclusión) y 5 en el MA (aquellos que reportaban daño al ADN, utilizando algún modelo experimental) (Figura 9).

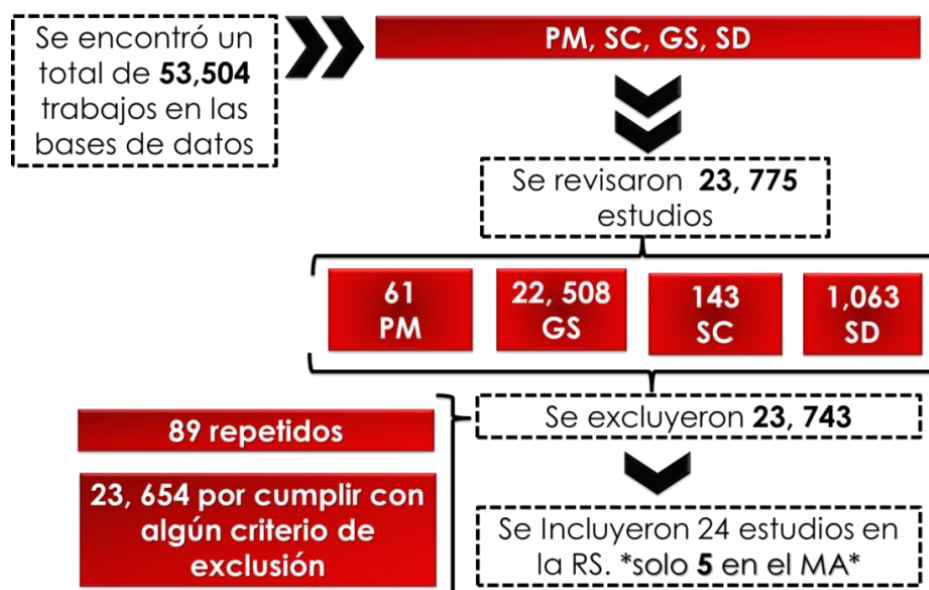


Figura 9. Proceso de selección de estudios incluidos en la Revisión Sistemática y Meta-análisis. PM: Pubmed, GS: Google Scholar, SC: Scopus, SD: Science Direct.

Entre los trabajos incluidos, se encontró discordancia respecto al efecto nocivo de E124 en los distintos modelos experimentales a los que se sometió su evaluación. No obstante se destaca la importancia 3 aspectos clave: 1) el E124 incrementa la hiperactividad en niños, 2) el E124 puede unirse a la albúmina humana y 3) el E124 causa daños al ADN en 3h y >10mg/kg de exposición. Los descubrimientos restantes se resumen a continuación en la codificación de estudios para la RS.

Tabla 4. Relación de términos con el número de resultados encontrados en la búsqueda bibliográfica por las diferentes bases de datos.

Base de datos	Palabras clave	No. de resultados (sin refinar)	No. de resultados refinados (Combinación de términos establecida)
Google Scholar	Ponceau 4R	18 900	Toxicity (12 200); Hyperactivity (1 200); EFSA (272); FDA (1 440).
	E124	2 310	Toxicity (1 440); Hyperactivity (319); EFSA (135); FDA (306).
	Cochineal Red A	10 700	Toxicity (5 570); Hyperactivity (257); EFSA (104); FDA (705).
	New coccine	17 400	Toxicity (17 300); Hyperactivity (17 300); EFSA (174); FDA (5, 100).
	TOTAL	49 310	22,508
Pubmed	Ponceau 4R	96	Toxicity (16); Hyperactivity (1); EFSA (1); FDA (0)
	E124	406	La búsqueda no muestra resultados con ningún término complementario
	Cochineal red A	116	Toxicity (18); Hyperactivity (1); EFSA (1); FDA (0).
	New coccine	135	Toxicity (21); Hyperactivity (1); EFSA (1); FDA (0).
	TOTAL	753	61
Scopus	Ponceau 4R	239	Toxicity (21); Hyperactivity (16); EFSA (21); FDA (13); IARC (6).
	E124	65	Toxicity (9); Hyperactivity (5); EFSA (8); FDA (3)
	Cochineal red A	142	Toxicity (5); Hyperactivity (1); EFSA (1); FDA (3)
	New coccine	114	Toxicity (27); Hyperactivity (1); EFSA (2); FDA (1)
	TOTAL	560	143
ScienceDirect	Ponceau 4R	577	Toxicity (209); Hyperactivity (58); EFSA (43); FDA (82)
	E124	1 207	Toxicity (103); Hyperactivity (45); EFSA (28); FDA (43)
	Cochineal red A	888	Toxicity (200); Hyperactivity (34); EFSA (36); FDA (96)
	New coccine	209	Toxicity (63); Hyperactivity (7); EFSA (5); FDA (11)
	TOTAL	2881	1 063
	TOTAL	53 504	23 775

4.1.1 Codificación de estudios pertenecientes a la Revisión Sistemática

En el siguiente apartado se presentan los 24 trabajos incluidos en la revisión sistemática. Resaltando que todos estos estudios fueron tomados de revistas indexadas con un factor de impacto (F.I.) de 0.36 hasta 48.082; por lo que se presume que son trabajos de alta calidad y previamente evaluados por otros colegas.

	Modelo	Vía de administración	Tiempo de exposición	Dosis	Conclusiones	Referencia
I N V I V O	Ratas	Intraperitoneal	90 días Mediano plazo	0.5, 1 y 2% de E124	NOAEL 500 mg/kg pc/d	Gauntet <i>et al.</i> , 1967. F. I. 3.584
	Ratas	Oral	9 días Mediano plazo	3.7, 7.5, 15 y 22.5 ml de E124/5ml de Vit. A.	Disfunción hepática.	Holdmeberg, 1977. F.I. 2,895
	Rata, ratón y cobayo	Oral	72 h Corto plazo	0.5 y 50 mg de E124/kg de pc/d.	Baja absorción intestinal del colorante	Phillips <i>et al.</i> , 1982. F. I. 3.584
	Ratas	Oral	3 generaciones Largo plazo	50, 500 y 1, 250 mg de E124/kg de pc/d.	NOAEL de 1, 250mg/kg pc/d	Brantom <i>et al.</i> , 1987. F. I. 3.584
	Ratas	Oral	60 días Mediano plazo	50, 500 y 1, 250 mg de E124/kg de pc/d.	NOAEL de 500 mg/kg de pc/d. en ratas	Brantom <i>et al.</i> , 1988. F. I. 3.584
	Ratones hembras	Oral	Única dosis 12 h Corto plazo	2000 mg/kg de E124 pc/d.	Daño al ADN de colon	Tsuda <i>et al.</i> , 2001. F. I. 3.880
	Ratones machos	Oral	Única dosis 3h Corto plazo	0.5xDL ₅₀ de E124	Daño al ADN de colon	Sasaki <i>et al.</i> , 2002. F.I. 2.528
	Ratones	Oral	5 y 9 semanas Mediano plazo	0.2, 0.24, 0.48% de E124 en la dieta.	Efectos nulos en procesos reproductivos y neuronales	Tanaka, 2006. F. I. 3.584
	Ratones albinos machos	Oral	42 días Mediano plazo	2 y 6 g de E124/kg pc/d.	Daños histopatológicos en hígado, riñón y testículos	Sharma <i>et al.</i> , 2008. F. I. 1.975
	Ratones y ratas machos	Sonda intragástrica	3, 6 y 12 h Corto plazo	1 y 10 mg de E124/kg (ratones). 10, 100 y 1000 mg de E124/kg (ratas).	Daño al ADN de colon en ratón	Shimada <i>et al.</i> , 2010. F. I. 1.436
Ratas	Intrauterina	2 generaciones	2000 mg de E124/kg de	Alteración en procesos de	Ceyhan <i>et al.</i> , 2013.	

I N V I V O			Largo plazo	pc/d	memoria y aprendizaje	F. I. 3.584
	Ratas	Prenatal	3 generaciones Largo plazo	2000 mg de E124/kg de pc/d.	Aumento en la motilidad y disminución en la motivación de crías.	Doguc <i>et al.</i> , 2015. F. I. 3.765
	Humanos (niños)	Oral	8. meses Mediano plazo	5 y 6.5 mg de E124/kg de pc/d.	Hiperactividad en niños	Mccann <i>et al.</i> , 2007. F. I. 48.082
	Humanos (niños y adolescentes)	Oral	7 días Mediano plazo	0.7 mg de E124/kg de pc/d.	No relaciona la hiperactividad con la ingesta del E124	Connolly <i>et al.</i> , 2010. F. I. 2.047
	Humanos (niños y adultos)	Oral	Única toma de muestra 24h Corto plazo	100 mg de E124/kg pc/d.	Exceso de IDA en productos alimenticios que contienen E124	Dixit <i>et al.</i> , 2010. F. I. 2.047
	Cerdos	Oral	90 días Mediano plazo	100, 300 y 900 mg/kg de E124 día	NOAEL de 300 mg/kg pc/d	Gaunt <i>et al.</i> , 1969. F. I. 3.584
	<i>D. melanogaster</i>	Directa	9. generaciones Largo plazo	0.5, 1, 1.5 y 2 mg de E124/ml de sol. salina	Propicia mortalidad	Türkoğlu <i>et al.</i> , 2015. F. I. 0.36
	Eritrocitos humanos	Directa	1h	0.5 nmol de E124/L de sol.	E124 como inductor de	Würtzen <i>et al.</i> , 1978.

I N V I T R O			Corto plazo	de fosfatos	hemoglobina. Formación de aminas aromáticas.	F. I. No disponible
	<i>S. cerevisiae</i>	Directa	48 h Corto plazo	5 mg de E124/ ml de sol. salina	Genotoxicidad	Sankaranarayanan y Murthy, 1979. F. I. 2.528
	Hepatocitos de rata	Directa	1h Corto plazo	37,5 µM de E124/L de sol. de fosfatos	Formación de aminas aromáticas	Singh <i>et al.</i> , 1997. F. I. 1.39
	<i>S. Typhimurium</i> y <i>B. subtilis</i>	Directa	14 días Mediano plazo	4 mg de E124/ ml de sol. salina	Mutagenicidad	Ozaki <i>et al.</i> , 1998. F. I. 3.584
	Suero humano (HSA) y bovino (BSA)	Directa	3h Corto plazo	0.5 nmol de E124/tampón acuoso	E124 como inductor de hemoglobina. Formación de aminas aromáticas.	Bolel <i>et al.</i> , 2012. F. I. 3.154
	<i>V. faba</i>	Directa	10 meses Largo plazo	100, 250, 500, 750 y 1000 ppm de E124	Aberraciones cromosómicas	Bhattacharjee, 2014. F. I. 1.899
	<i>A. cepa</i>	Directa	24 y 48 h Corto plazo	0.25, 0.50, y 0.75 g de E124/L de sol. sal.	Citotoxicidad	Santana <i>et al.</i> , 2015. F. I. 0.68

4.3 Meta-análisis

En lo que respecta a los hallazgos en este estudio, En la codificación de los estudios (Tabla 5) se presentan los 5 trabajos que fueron analizados por meta-análisis. Cabe señalar que en este caso, dada la escases de trabajos de ponceau 4R que analicen el efecto sobre el ADN, únicamente se consideraron los tiempos cortos y a mediano plazo. Asimismo, se presenta el número de eventos en cada estudio (columna lado derecho), mismos que fueron considerados para los siguientes pasos en el meta-análisis.

Tabla 5. Codificación de estudios para el Meta-análisis.

Estudio		Métodos						Resultados	
Autor (es)	Año	ME	TM	DE	FA	ED	T	No. de ECE	No. de ESE
Bhattacharjee, M.	2014	<i>Vicia Faba</i>	24 ind.	100, 250, 500, 750, 1000 ppm	Impregnación en semillas	Índice mitótico	4 h	12	12
Sankaranarayana-nan y Murthy	1979	Levadura BZ 34	1000 cél	5 mg / ml	Disolución en caldo de cultivo	AMES	48 h	1	0
Sasaki et al.	2002	Ratones	30 ind.	+ 2000 mg/kg	Oral	Cometa	3 h	11	19
Shimada, et al.	2010	Ratas Ratones	36 Ind.	10 mg/kg	Gavaje	Cometa	3 h	1	35
Tsuda, et al.	2001	Ratones (M)	36 ind.	13 mg/kg	Gavaje	Cometa	3 h	17	19

*ME - Modelo experimental, *TM - Tamaño de la muestra, *DE - Dosis aplicada, *FA - Forma de aplicación, *ED- Ensayos de detección de daño al DNA, *T - Tiempo de efecto, *ECE - Numero de eventos con efecto, *ESE - Número de eventos sin efecto, *ID- Si induce daños al DNA, *NID- No induce daños al DNA, *NR – No

Con los datos obtenidos, en una hoja de cálculo (Excel) se encontró que el valor de Heterogeneidad es $Q=31.17$ y que tamaños los del efecto oscilan en el

intervalo de **0.03-0.14**, así como los valores de referencia para realizar el forest plot (Tablas 6 y 7).

Tabla 6. Análisis estadístico para el Meta-análisis.

Estudio	EV	TM	Resultados	SE	Var	w	w*es	w*(es2)
Sankaranarayanan&Murthy, 1979	1	24	0.0416	0.0416	0.0017	576	24	1
Tsuda, et al. 2001	17	36	0.4722	0.1145	0.0131	76.2352	36	17
Sasaki, et al. 2002	11	30	0.3666	0.1105	0.0122	81.8181	30	11
Shimada, et al. 2010	1	36	0.0277	0.0277	0.0007	1296	36	1
Bhattacharjee, et al. 2014	12	24	0.5	0.1443	0.0208	48	24	12
df		4			Suma	2078.053	150	42
k		5					V	2026202
Q		31.1725						
I2		87.1682						
Modelo de efectos aleatorios	0.0246	es Random		0.3416				
Nuevo peso del estudio	4.94E-07	SEes Random		2.47E-07				
	4.94E-07	CI Random		0.3416	0.3416			
	4.94E-07							
	4.94E-07							
	4.94E-07							

*EV–Numero de eventos*TM - Tamaño de la muestra, *SE – Error estándar, *Var – Varianza, (w - *w*es y w*(es2), otras variables necesarias, ver subtema 4.2.

Tabla 7. Datos de referencia para realizar el Forest Plot

Referencia	Tamaño de la muestra	Resultados	SE	CI bajo	CI alto	Intervalo	CI bajo	CI alto	
Sankaranarayanan&Murthy, 1979	1000	0.0416	0.0416	0.8263	1.1736	5	4.1666	- 78.4722	86.8055
Tsuda, et al. 2001	36	0.4722	0.1145	15.6882	18.3117	4	47.2222	- 1521.6049	1616.0493
Sasaki, et al. 2002	30	0.3666	0.1105	9.7777	12.2222	3	36.6666	- 941.1111	1014.4444
Shimada, et al. 2010	36	0.0277	0.0277	0.9228	1.0771	2	2.7777	- 89.5061	95.0617
Bhattacharjee, et al. 2014	24	0.5	0.1443	9.9166	14.0833	1	50	- 941.6666	1041.6666

*SE –Error estándar, *CI – Intervalo de confianza.

Finalmente, mediante el forest plot, se observó que no hubo diferencia significativa entre los estudios que afirman que el ponceau4R E124 induce cambios en el ADN y los estudios que lo niegan. Además, el valor promedio individual en 3 de 5 estudios analizados, fue mayor al valor global del meta-análisis (>9.24). Por ello, con los estudios analizados hasta el momento no se puede concluir aún si el daño al ADN es contundente. Lo que hace aún más evidente la necesidad de seguir investigando el efecto del ponceau-4R (E124) sobre el ADN (Figura 10).

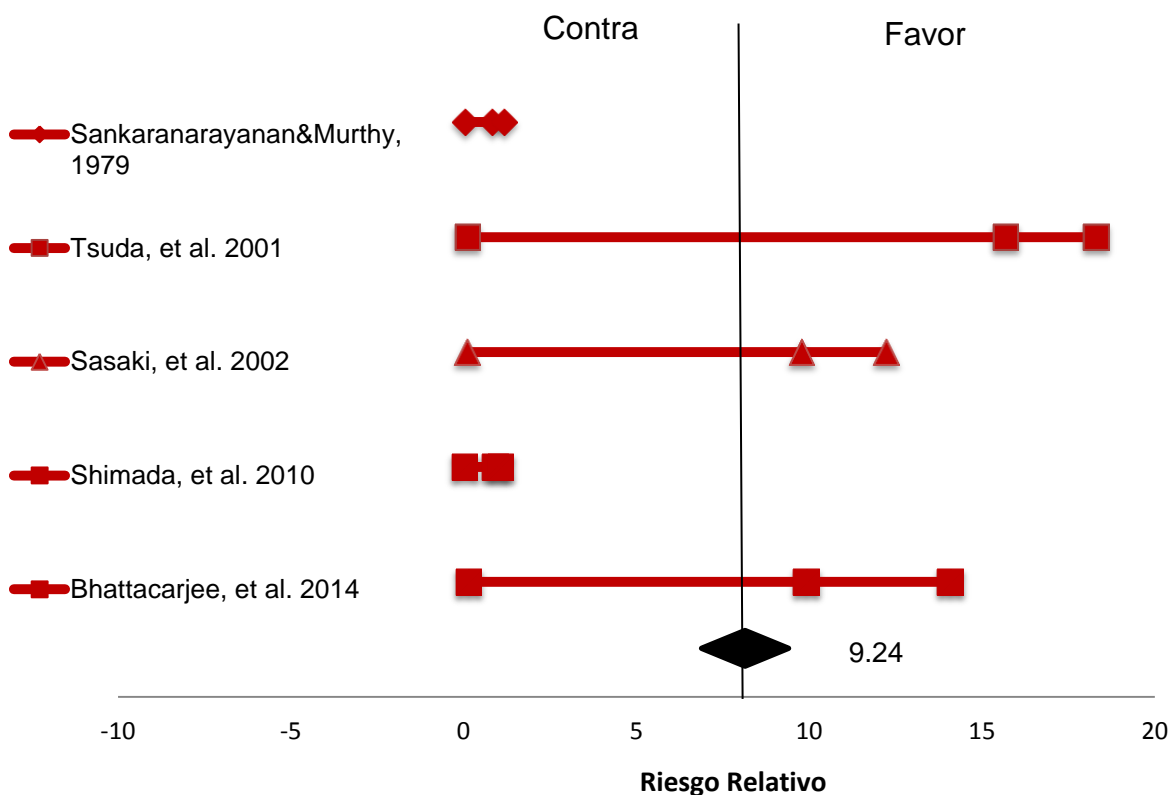



Figura 10. Análisis comparativo entre estudios que reportaron daño al ADN inducido por E124, mediante MA.  Promedio. $P < 0.5$

5. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se consideraron los hallazgos tanto de la RS como del MA, para alcanzar los objetivos establecidos, los cuales se presentan de la siguiente manera:

5.1 Efectos de la ingesta del ponceau 4R sobre modelos experimentales

El ponceau 4R E124 es un compuesto azoico de arilo, y puede inducir reacciones alérgicas en los individuos que lo ingieren (Golka *et al.*, 2004), es posible relacionar el efecto que desencadena la liberación de histamina, con la reducción del E124 a través de bacterias anaerobias intestinales (Singh *et al.*, 1997). Esto puede dar lugar a aminas que proporcionen efectos desfavorables en el organismo. Debido a que aunque la histamina endógena, es un constituyente natural de los tejidos de los seres vivos, alternativamente se pueden formar por la ingesta de algunos alimentos que contengan ponceau 4R E124 debido a la acción de las enzimas descarboxilasas de los microorganismos intestinales, mediante aminoácidos precursores (Puvaneswari *et al.*, 2006).

Con base en los descubrimientos de la RS, se observó que la ingesta de una mezcla de bebidas gasificadas que contenía E124 indujo hiperactividad en niños de 3 y 8-9 años (McCann *et al.*, 2007). Pero por medio de la evaluación metodológica (Ver subtema 1.4.2) de la RS, se deduce que el estudio referenciado, no proporciona pruebas suficientes para hacer dichas afirmaciones, ya que solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas para niños de 3 años, pero no fue así para niños de 8-9 años. Además de que en este estudio se evaluó el efecto de la mezcla de aditivos y no parece ser posible atribuir estos cambios a ninguno de los compuestos por separado (McCann *et al.*, 2007). Por lo que no podría utilizarse como base para alterar la IDA de 0.7 mg/kg pc/d del E124. Del mismo modo existen autores que comprueban la falta de relación de los aditivos alimentarios con la hiperactividad en niños y/o adolescentes, a la IDA

establecida en los 80, es decir a concentraciones de 7, 5, 30 ó 100 mg/kg pc/d (Connolly *et al.*, 2010).

Además, un estudio realizado con E124, reportó que el mismo, se une al sitio I de las albúminas séricas de HSA dando lugar a una modificación conformacional (Bolel *et al.*, 2012). Es importante recordar, que la sero-albúmina es una de las proteínas más importantes del plasma de la sangre que se encarga de transportar sustancias de naturaleza química diversa, (ácidos grasos, aminoácidos, esteroides, metales y fármacos), y que facilita la transferencia de muchas de ellas desde la circulación sanguínea a órganos como el hígado, el riñón, el intestino y el cerebro (Zunzain, 2003).

Debido a lo anterior, en esta tesina se sugiere que independientemente de las aportaciones de Bolel *et al.*, 2012, el descubrimiento de la unión del colorante a la albumina de HSA, es tal vez la puerta de entrada para determinar el efecto nocivo que puede causar la exposición a E124, si llegara al torrente sanguíneo. Lo anterior, se ve representado en el modelo de asociación de la sero-albumina con el E124 (Figura 10), dejando un panorama en el que destaca la necesidad por continuar sobre esta línea de investigación.

5.2 Daños del ponceau 4R en ADN

La afinidad de los compuestos azo para sitios particulares y muy específicos del ADN es diferente, pero pueden dar lugar a alteraciones en el comportamiento de las moléculas. Pese a que la unión del E124 al ADN puede llegar a ser tolerada por la célula sin alterar su metabolismo, la estructura del ARN por otro lado sí podría ser modificada por el E124, dando lugar a defectos funcionales, implicados en la transformación estructural de los ácidos nucleicos por su similitud con el grupo azoico (Dingman y Sporn, 1987).

Esto se traduce en que el riesgo relativo de la exposición al E124 para causar daño al ADN es alto en algunos estudios, pero el intervalo de error es grande (denota poca confiabilidad en los resultados) en comparación con los estudios que se orientan a que el riesgo es bajo, y el porcentaje de heterogeneidad ($Q=31.17$) es alto, por lo tanto se puede decir que existe daño al ADN en las condiciones que experimentaron los respectivos estudios incluidos, pero con algunas restricciones que se enumeran a continuación:

1. No todos los estudios de carcinogenicidad de E124 a largo plazo que utilizan modelos experimentales murinos, presentaron evidencia de cáncer, pero sí demostraron que el colon, suele ser uno de los órganos más sensibles en el ensayo COMETA *in vivo* incluso a concentraciones de 10 mg/kg pc/d (Tsuda *et al.*, 2001).
2. Las pruebas de genotoxicidad con Levadura cepa BZ34 (Sankaranarayanan y Murthy, 1979) y *Vicia Faba* (Bhattacharjee, 2014) que se muestran inconsistentes (uno en contra y otro a favor) deberían continuar con sus investigaciones, pero con pruebas crónicas y utilizando modelos que se asemejen y sean extrapolables al humano.

5.3 Recomendaciones

Sin embargo, surge otra interrogante ¿Qué tiene que ver el daño al ADN con los procesos carcinogénicos?. Es importante asociar ambos puntos debido a que el cáncer se produce cuando las células se dividen de forma descontrolada, ignorando las señales de apoptosis hasta producir un tumor. Este comportamiento es causado por mutaciones acumuladas, y una mutación no es más que cualquier cambio o daño permanente en la secuencia del ADN de las células. Y aunque todo el tiempo ocurren errores de replicación y daños al ADN en las células de nuestro cuerpo, si no se detectan a tiempo, la célula experimentará afecciones irreparables

que conllevan a enfermedades como cáncer colorrectal (ya que se observó en los estudios que es el principal órgano afectado al ADN).

Existe información sobre la carcinogenicidad humana por aminas aromáticas asociadas a otros compuestos específicos (Chlornaphazina, Benzidina, entre otras), sin embargo la formación de éstas a causa del E124 es escasa, por lo que se sugiere realizar ensayos de mutagenicidad a corto, mediano y largo plazo.

Además, no toda la información que se obtiene en modelos experimentales *in vitro* acerca de la formación de aminas aromáticas y sus metabolitos, es comparativa con los modelos *in vivo*, por lo que es necesario estudiar si los mismos efectos debidos a la reducción del grupo azo del E124 observados *in vitro*, ocurren en modelos *in vivo*.

Por otro lado, las reacciones alérgicas causadas por la exposición al E124, involucran la liberación de histamina endógena como precursora de procesos inflamatorios, que podrían volverse crónicos debido a la ingesta prolongada del colorante y desencadenar procesos carcinogénicos. Entonces, producir alguna alteración en el metabolismo de la histamina y no mantener las concentraciones normales en sangre (50-70 mg/l) debido a la ingesta continua y/o excesiva de alimentos que añaden E124 a su composición, ¿Contribuye a la elevación de los niveles de esta proteína en sangre? En caso de ser así, ¿Qué otros efectos se desencadenarán con su incremento? ¿Ocurrirá un mecanismo similar, a la unión de la albúmina sérica con el E124, que con la histamina? Éstas y otras interrogantes surgen de los descubrimientos asociados a la respuesta inmune que genera la liberación de histamina, por exposición a E124, dando pie a sugerir en esta tesina un método experimental que podría contestar las cuestiones dadas. El cual se describe a groso modo en los siguientes puntos:

- Se propone un estudio utilizando ratones como modelo experimental, estableciendo 4 grupos de 5 individuos machos 1) Grupo Control Positivo (con dieta normal), 2) Grupo Control Negativo (induciendo inflamación con

DSS), 3) Grupo al que se le administre una dosis oral crónica de 0.7 mg/kg pc/d, (basada en la IDA establecida actual de E124) por 90 días. 3) Grupo al que se le administre una única dosis de 2000 mg/kg (según se han reportado efectos adversos. Subtema 5.1.1).

- Semanalmente se medirían parámetros como: Peso de los ratones, nivel de histamina en sangre y niveles de excreción del colorante en heces y orina.
- Una vez concluidos los tratamientos, se sacrificaría a los ratones para la obtención de órganos como corazón, colon, hígado y riñón, para su proceso histopatológico. Además se evaluarían los procesos inflamatorios en los ratones, mediante la medición con citómetro de citosinas involucradas como IL-1, IL-12, IL-8 y TNF- α .
- Por último dependiendo de los resultados del estudio, se tendrían bases para inferir si la exposición prolongada al E124, puede ser tomado como un carcinógeno potencial, o no, debido a la inducción de procesos inflamatorios en ratones.

6. CONCLUSIONES

Con el desarrollo de esta Revisión, se encontraron 3 aspectos relevantes:

- 1) El ponceau 4R E124 podría incrementar la hiperactividad en niños.
- 2) El ponceau 4R E124 puede unirse a la albúmina sérica humana
- 3) El ponceau 4RE124 puede causar daños al ADN, en las condiciones y dosis experimentadas en los estudios (Ver subtema 5.2).

Sin embargo el MA no mostró diferencias significativas, pero se debe seguir considerando el posible riesgo a la salud por la exposición al E124.

Tanto la RS como el MA son buenas herramientas para determinar si existen efectos adversos por exposición a E124, y sobre todo para identificar los eslabones faltantes en la cadena de investigación de este colorante, y de esta manera proponer experimentos futuros que nos permitan concluir sobre la seguridad de consumo en nuestro país.

7. LITERATURA CITADA

- Amchova, P., Kotolova, H., y Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 73(3):914-922.
- Barrows, J. N., Lipman, A. L., & Bailey, C. J. (2003). Color additives: FDA's regulatory process and historical perspectives. *Food Safety Magazine*. 1.
- Bend, J., Bolger, M., Knaap, A. G., Kuznesof, P. M., Larsen, J. C., Mattia, A., Vavasour, E. (2006). Evaluation of certain food additives and contaminants. *World Health Organization*. 947:1-225.
- Berkowitz, D. (2001). Industria alimentaria. *Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo*.3(3):1-35.
- Bhattacharjee, M. (2014). Evaluation of Cytotoxic Potential of Ponceau 4r in Vicia faba. *Society for Plant Research*. 27-33.
- Bolel, P., Mahapatra, N., y Halder, M. (2012). Optical spectroscopic exploration of binding of cochineal red A with two homologous serum albumins. *Journal of agricultural and food chemistry*. 60(14):3727-3734.
- Brantom, P. G., Stevenson, B. I., y Ingram, A. J. (1987). A three-generation reproduction study of Ponceau 4R in the rat. *Food and Chemical Toxicology*. 25(12):963-968.
- Brantom, P. G., Stevenson, B. I., y Wright, M. G. (1987). Long-term toxicity study of Ponceau 4R in rats using animals exposed in utero. *Food and Chemical Toxicology*. 25(12):955-962.
- Ceyhan, B. M., Gultekin, F., Doguc, D. K., y Kulac, E. (2013). Effects of maternally exposed coloring food additives on receptor expressions related to learning and memory in rats. *Food and chemical toxicology*. 56:145-148.
- COFEPRIS. (2016). Normas Oficiales Mexicanas. Consultado en Junio de 2017 en: <https://www.gob.mx/cofepris/>.
- Connolly, A., Hearty, A., Nugent, A., Mckevitt, A., Boylan, E., Flynn, A., y Gibney, M. J. (2010). Pattern of intake of food additives associated with hyperactivity in Irish children and teenagers. *Food Additives and Contaminants*. 27(4):447-456.
- Consultado en Junio de 2017 en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/110337/1/Expertox2014.pdf>.
- Cubero, N., Montferrer, A., y Villalta, J. (2002). *Aditivos alimentarios*. Editorial Mundi-Prensa Libros. Madrid, España.
- Dingman, C. W., y Sporn, M. B. (1987). The binding of metabolites of amino azo dyes to rat liver DNA in vivo. *Cancer research*. 27(5):938-944
- Dixit, S., Purshottam, S. K., Gupta, S. K., Khanna, S. K., y Das, M. (2010). Usage pattern and exposure assessment of food colours in different age groups of consumers in the State of Uttar Pradesh, India. *Food Additives and Contaminants*. 27(2):181-189.
- Doguc, D. K., Aylak, F., Ilhan, I., Kulac, E., y Gultekin, F. (2015). Are there any remarkable effects of prenatal exposure to food colourings on neurobehaviour and learning process in rat offspring?. *Nutritional neuroscience*. 18(1):12-21.

- Durnev, A. D., Oreshchenko, A. V., Kulakova, A. V., y Beresten, N. F. (1994). Analysis of cytogenetic activity of food dyes. *Voprosy meditsinskoj khimii*. 41(5):50-53.
- EFSA. (2011). The re-'E'valuation of Europe's food additives. Consultado en Abril de 2017 en: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/120130b>.
- EFSA. (2015). Refined exposure assessment for Ponceau 4R (E124). Parma, Italia. 13(4):4073.
- Elmadfa, I., Muskat, E. y Fritzsche, D. (2011). *Tabla de aditivos. Los números E*. Ed. Hispano Europea.
- FAO/JEFCA. (2011). Combined compendium of Food Additive Specifications, Ponceau 4R (E124). Monograph No. 11.
- FDA. (2017). Consultado en Junio de 2017 en: <https://www.fda.gov/>.
- García, C. M., y Pérez, M. J. S. (2010). Mutagénesis y Carcinogénesis Química.
- Gaunt, I. F., Farmer, M., Grasso, P., Gangolli, S. D. (1967). Acute (mouse and rat) and short-term (rat) toxicity studies on Ponceau 4R. *Food and Chemical Toxicology*. 5(2):187-94.
- Gaunt, I. F., Grasso, P., Creasey, M., & Gangolli, S. D. (1969). Short-term toxicity study on Ponceau 4R in the pig. *Food and Chemical Toxicology*, 7:443-449.
- Golder, S., McIntosh, H. M., Duffy, S., Glanville, J. (2006). Centre for Reviews and Dissemination and UK Cochrane Centre Search Filters Design Group. Developing efficient search strategies to identify reports of adverse effects in medline and embase. *Health Information and Libraries Journal*. 23:3-12.
- Golka, K., Kopps, S., Myslak, Z. W. (2004). Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. *Toxicology Letters*. 151(1): 203-10.
- Halligan S. (2005). Systematic reviews and meta-analysis of diagnostic tests. *Clinical Radiology*. 60(9):977-9
- Higgins, J. y Green, S. (2011). Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions: Version 5.1.0. *The Cochrane Collaboration*. Consultado en Mayo de 2017 en: www.cochrane-handbook.org.
- Holmberg, D. (1977). Effect of amaranth, Ponceau 4R and/or vitamin A on enzyme activities of the rat liver. *Food and cosmetics toxicology*. 16(1):1-5.
- Hunger, K., Mischke, P., Rieper, W., Raue, R., Kunde, K., Engel, A. (2005). Azo Dyes: in Ullmann's. *Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- Ibero, M., Eserverri, J. L., Barroso, C., y Botey, J. (1981). Dyes, preservatives and salicylates in the induction of food intolerance and/or hypersensitivity in children. *Allergologia et immunopathologia*. 10(4):263-268.
- IUPAC. (2009). Azo compounds.. *Compendium of Chemical Terminology*. Consultado en Abril de 2017 en: <https://iupac.org/>.
- Jovell, A. J., y Navarro-Rubio, M. D. (1995). Evaluación de la evidencia científica. *Medicina Clínica*. 105(19): 740-3.
- Kobylewski, S., & Jacobson, M. F. (2012). Toxicology of food dyes. *International Journal of Occupational and Environmental Health*. 18(3):220-246.

- Martínez, F. M., Meca, J. S., y López, J. L. (2009). El meta-análisis en el ámbito de las Ciencias de la Salud: una metodología imprescindible para la eficiente acumulación del conocimiento. *Fisioterapia*. 31(3):107-114.
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Kitchin, E., Lok, K., Porteous, L., Prince, E., Sonuga-Barke, E., Warner, J. O., Stevenson, J. (2007). Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 370(9598):1560-1567.
- Multon, J. L. (2000). Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias (2ª ed.). *Editorial Acribia*, S.A. Zaragoza.
- Neyeloff, J. L., Fuchs, S. C., & Moreira, L. B. (2012). Meta-analyses and Forest plots using a microsoft excel spreadsheet: step-by-step guide focusing on descriptive data analysis. *BMC Research Notes*. 5(52).
- Ohme, R., Preuschhof, H., Heyne, H. U. (1988). "Azoethane". *Organic Synthesis*. 6:(78).
- O'Rourke K, y Detsky A. S. (1989). Meta-analysis in medical research: strong encouragement for higher quality in individual research efforts. *Journal of Clinical Epidemiology*. 42:1021-1026
- Ozaki, A., Kitano, M., Itoh, N., Kuroda, K., Furusawa, N., Masuda, T., y Yamaguchi, H. (1998). Mutagenicity and DNA damaging activity of decomposed products of food colours under UV irradiation. *Food and Chemical Toxicology*. 36(9):811-817.
- Phillips, J. C., Bex, C. S., & Gaunt, I. F. (1982). The metabolic disposition of 14C-labelled Ponceau 4R in the rat, mouse and guinea-pig. *Food and Chemical Toxicology*. 20(5):499-505.
- Puvaneswari, N., Muthukrishnan, J., y Gunasekaran, P. (2006). Toxicity assessment and microbial degradation of azo dyes. *Indian Journal of Experimental Biology*. 44(08):618-626.
- Sánchez, J. R. (2013). La química del color en los alimentos. *Química Viva*. 234-246.
- Sánchez-Meca, J., Botella, J. (2010). Revisiones sistemáticas y Meta-Análisis: Herramientas para la práctica profesional. *Papeles del Psicólogo*. 31(1):7-17.
- Sankaranarayanan, N., y Murthy, M. S. S. (1979). Testing of some permitted food colours for the induction of gene conversion in diploid yeast. *Mutation Research Genetic Toxicology*. 67(4):309-314.
- Santana, M. G., Anjos, S. J., y Peron, A. P. (2015). Action of Ponceau 4R (E-124) food dye on root meristematic cells of *Allium cepa* L. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 37(1).
- Sasaki, Y. F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., y Tsuda, S. (2002). The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 519(1):103-119.
- SGS. (2012). Colorante rojo cochinilla 82% (E124) Ponceau 4R. Ficha de seguridad. Madrid, España. Consultado en Junio de 2017 en: http://manuelriesgo.com/docstecnicas/seguridad/FS_CV002_0100.pdf.

- Sharma, S., Goyal, R. P., Chakravarty, G., & Sharma, A. (2008). Toxicity of tomato red, a popular food dye blend on male albino mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 60(1): 51-57.
- Shimada, C., Kano, K., Sasaki, Y., F., Sato, I., Tsuda, S. (2010). Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice. *The journal of toxicological sciences*. 35(4):547-54.
- Singh, S., Das, M., y Khanna, S. K. (1997). Comparative azo reductase activity of red azo dyes through caecal and hepatic microsomal fraction in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*. 35(9):1016-1018
- SSP. (2017). Normas Oficiales Mexicanas. Consultado en Mayo de 2017 en: <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4643/salud/salud.htm>.
- Tanaka, T. (2006). Reproductive and neurobehavioural toxicity study of tartrazine and Ponceau 4R administered to mice in the diet. *Food and Chemical Toxicology*.44(2):179-187.
- Tsuda, S., Murakami, M., Matsusaka, N., Kano, K., Taniguchi, K., & Sasaki, Y. F. (2001). DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicological Sciences*. 61(1):92-99.
- Türkoğlu, Ş., Benli, D., & Nihan, Ş. (2015). The effects of five food dyes on the longevity of *Drosophila melanogaster*. *Fresenius Environmental Bulletin*. 24(9): 2830-2836.
- Würtzen, G., Larsen, J. C., & Tarding, F. (1978). Hemoglobin formation in vitro induced by azo dyes and their metabolites. *Nutritional and Toxicological Aspects of Food Safety*. 309-311.
- Zohu, A., Obuchowski, N., McClish, D. (2002). Issues in meta-analysis for diagnostic tests. *Statistical methods in diagnostic medicine*. 222-40.
- Zunszain, P. A., Ghuman, J., Komatsu, T., Tsuchida, E., y Curry, S. (2003). Crystal structural analysis of human serum albumin complexed with hemin and fatty acid. *BMC Structural biology*. 3(1):6.