



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”

**CONSUMO DE ALIMENTOS CON EL COLORANTE
ALIMENTICIO ROJO 40 Y SU REMOCIÓN POR
ENTEROBACTERIAS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

REBECA DEY GARCÍA

Director de tesis:
Dra. Edith Chávez Bravo

Octubre 2018



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES



“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”

**CONSUMO DE ALIMENTOS CON EL COLORANTE
ALIMENTICIO ROJO 40 Y SU REMOCIÓN POR
ENTEROBACTERIAS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL**

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

REBECA DEY GARCIA

Comité tutorial:

Director	Dra. Edith Chávez Bravo
Integrante Comité Tutorial	Dra. Gladys Linares Fleites
Integrante Comité Tutorial	Dr. Ricardo Darío Peña Moreno
Integrante Comité Tutorial	Dr. Manuel Huerta Lara
Integrante Comité Tutorial	Dr. Alejandro Isaías A. Alonso Calderón

Octubre 2018



C. REBECA DEY GARCIA

Por este conducto me permito comunicarle que los miembros del jurado integrado por:

<i>Dr. Alejandro I. Augusto Alonso Calderón</i>	<i>Presidente</i>
<i>Dra. Elsa Iracena Castañeda Roldán</i>	<i>Secretario</i>
<i>Dr. José Antonio Rivera Tapia</i>	<i>1er. Vocal</i>
<i>Dra. Gladys Linares Fleites</i>	<i>2do. Vocal</i>
<i>Dr. Manuel Huerta Lara</i>	<i>Suplente</i>

Designado para la defensa de su tesis "Consumo de alimentos con el colorante alimenticio rojo 40 y su remoción por enterobacterias de la microbiota intestinal" han manifestado mediante su voto que ésta cumple con los méritos suficientes para ser defendida como tesis de grado de Maestría en Ciencias Ambientales, por lo que este Posgrado le autoriza la impresión de la misma.

Sin otro asunto en lo particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE

"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"

H. PUEBLA DE Z., OCTUBRE 12 DE 2018

E. Torres R.

DR. EDUARDO TORRES RAMÍREZ
COORDINADOR



ETRapp
c.c.p. Archivo
c.c.p. Minutario

Posgrado en Ciencias Ambientales
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC6,
Ciudad Universitaria,
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 53 00 Ext. 7056

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por otorgarme la beca que me permitió financiar mis estudios de maestría.

“Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla”

Agradecimientos

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla recinto invaluable que me permitió enfrentarme a la realidad con responsabilidad y nacionalismo.

Al Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por el apoyo otorgado para la impresión de esta tesis.

Al Posgrado en Ciencias Ambientales por darme la oportunidad y la confianza para la elaboración de este trabajo de investigación.

Al Cuerpo Académico del Posgrado en Ciencias Ambientales y del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla de quienes siempre he contado con su apoyo incondicional.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa II, Investigación y Posgrado. Aseguramiento de la calidad en el Posgrado. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2013-2017.

A la Dra. Edith Chávez Bravo por el apoyo, consejos, tiempo, paciencia y conocimientos transmitidos en el presente trabajo.

Al honorable Comité tutorial: Dra. Gladys Linares Fleites, Dr. Ricardo Darío Peña Moreno, Dr. Manuel Huerta Lara, Dr. Alejandro Isaías A. Alonso Calderón por sus valiosas aportaciones a este trabajo de investigación.

A los investigadores, maestros y amigos del Laboratorio de Patogenicidad Microbiana CICM-ICUAP con quienes he compartido buena parte de mi formación académica

A mis amigos y compañeros en Ciencias Ambientales muchas gracias por sus consejos y compañía.

Índice

Índice de figuras	1
Índice de tablas	2
I.INTRODUCCIÓN	4
II. JUSTIFICACIÓN.....	5
III. MARCO DE REFERENCIA	6
3.1 Marco teórico.....	6
3.1.1 Salud alimentaria enfoque multidisciplinario.....	6
3.1.2.Industria alimentaria.....	7
3.1.3 Los colorantes sintéticos (Azo).	8
3.1.4 Colorante rojo 40.....	9
3.1.5 Efectos en la salud por el consumo de alimentos con rojo 40.	10
3.1.6 Interacciones bacterianas con colorantes azo.....	11
3.1.7 Microbiota intestinal.....	12
3.1.7.1 Enterobacterias como posibles degradadoras.	13
3.1.1.7.2 Degradación biológica.	14
IV. FORMULACIÓN DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	16
4.1 Pregunta de investigación.	16
V. HIPÓTESIS	16
VI. OBJETIVOS	16
6.1 Objetivo general.....	16
6.2 Objetivos particulares	16
VII. METODOLOGÍA	17
7.1 Tipo de experimento	17
7.2 Elección de la población	17
7.3 Fase de campo.....	17
7.3.1 Recolección de información de los productos alimentarios con rojo 40.	17
7.4 Diseño del constructo.....	18
7.4.1 Aspectos a considerar para el diseño del constructo.	18
7.4.2 Partes del diseño del constructo	18
7.4.3 Evaluación del constructo	19
7.4.3.1 Alfa de Cronbach.....	19
7.4.3.2 Encuesta Piloto.....	20
7.5 Consideraciones para la aplicación del constructo.	20
7.6 Análisis de datos.....	21
7.7 Fase de laboratorio.....	21
7.7.1 Obtención de la muestra de copro.	21
7.7.2 Análisis microbiológico para la obtención de enterobacterias.	21
7.7.3 Aislamiento e identificación de cepas.....	22
7.7.4 Resguardo de cepas	22
7.7.5 Interacción bacteriana con el colorante rojo 40.....	23
7.7.6 Porcentajes de remoción del colorante rojo 40 producidos por las cepas aisladas de infantes.....	24
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25

8.1 Tipo de estudio y población estudiada	25
8.2 Listado de alimentos con el colorante rojo 40	25
8.3 Elaboración del constructo	26
8.4 Validación del constructo	29
8.5 Análisis estadístico descriptivo	30
8.6 Aislamiento e identificación de enterobacterias	33
8.7 Interacción del colorante rojo 40 con las cepas de estudio a 30 ppm	35
8.8 Remoción del colorante rojo 40	37
8.9 Impacto en la salud humana por el consumo de alimentos procesados	42
IX. CONCLUSIONES	43
X. PERSPECTIVAS	44
XI. BIBLIOGRAFÍA además	45
XII. ANEXOS	51

Índice de figuras

Fig.1 Estructura química del colorante rojo 40 A.....	7
Fig.2 Medio Stuart con muestra fecal.....	19
Fig.3 Crecimiento de microorganismos en medios de cultivo	20
Fig.4 Cepas preservadas.....	20
Fig.5 Interacción con las cepas aisladas y el colorante rojo 40.....	21
Fig.6 Toma de muestra tras la interacción del colorante con la bacteria.....	22
Fig.7 Constructo.....	26
Fig.8 Distribución del consumo de alimentos con una alta frecuencia.....	30
Fig.9 Remoción del colorante rojo 40.....	38
Fig.10 Comparación de los porcentajes de remoción del rojo 40 por la diferentes cepas de estudio.....	39

Índice de tablas

Tabla 1. Grupos de población considerados para las estimaciones de exposición de rojo 40	9
Tabla 2. Listado de productos con rojo 40.....	23
Tabla 3. Estadísticos de confiabilidad interna.....	28
Tabla 4. Frecuencia de consumo de alimentos con rojo 40.....	29
Tabla 5. Distribución conjunta de consumo de yogurt y cereales.....	31
Tabla 6. Distribución conjunta de consumo de yogurt y frituras.....	31
Tabla 7. Resultado de las pruebas bioquímicas de las colonias aisladas.....	32
Tabla 8. Ensayos de interacción con el colorante y las cepas aisladas de infantes.....	34
Tabla 9. Absorbancias registradas durante la interacción con el colorante a 30 ppm.....	37
Tabla 10. Absorbancias y porcentajes de remoción más altos de las muestras obtenidas.....	37

RESUMEN

Hoy en día la industria alimentaria utiliza diferentes aditivos, los cuales son sustancias para modificar o estabilizar las características de los alimentos, dentro de estos podemos encontrar a los colorantes que permiten resaltar la apariencia. El rojo 40 es un colorante azo que se utiliza en la elaboración de alimentos procesados, sin embargo, se encuentra asociado con hiperactividad y déficit de atención infantil. Los colorantes azo cuando son degradados pueden generar subproductos secundarios como las aminas aromáticas potencialmente carcinogénicas. En este trabajo se identificaron los alimentos que contienen el colorante rojo 40, se determinó la frecuencia de su consumo en niños de 10 a 13 años de edad y se realizó una interacción de enterobacterias de la microbiota intestinal con el colorante con la finalidad de conocer su capacidad de remoción del colorante rojo 40. En la primera etapa del trabajo se realizó un estudio de campo y se enlistó los productos alimentarios con rojo 40, esto permitió construir, diseñar y validar un instrumento para determinar la frecuencia de consumo. Posteriormente con la aplicación del instrumento se identificaron los niños con una alta ingesta de los alimentos con rojo 40, quienes tras una labor de convencimiento proporcionaron una muestra fecal para aislar enterobacterias. Los resultados del estudio revelaron que los alimentos procesados que están al alcance de los niños y que contienen rojo 40 son: bebidas, lácteos y confitería. Los cereales, yogurts y frituras son los alimentos más ingeridos por los infantes. La frecuencia del consumo se obtuvo a partir del instrumento de evaluación, alcanzando un alfa de Cronbach de 0.85 en su validación y consistencia interna. Las enterobacterias obtenidas de infantes fueron capaces de remover el colorante rojo 40 hasta un 60.57%.

I.INTRODUCCIÓN

La afección del cambio climático en los regímenes hidrológicos y térmicos de los ecosistemas ha repercutido con mayor imprevisibilidad en las cosechas (FAO, 2011) y dada una crisis ambiental que es compleja, global y genera un proceso de degradación de ecosistemas, por su multicausalidad: demográfica, económica, sociológica, tecnológica y cultural (Domínguez y Aledo, 2001), la industria e ingeniería alimentaria ha implementado procesos de producción de alimentos para cubrir necesidades alimentarias.

Sin embargo, el panorama de la seguridad alimentaria nutricional se ha deteriorado por la competencia del libre comercio y el interés el consumismo, provocando el incremento del consumo de alimentos procesados que dañan la salud hasta provocar mal nutrición, sobre peso y obesidad. Algunos productos de la industria alimentaria contienen aditivos complementarios como: conservadores, saborizantes y colorantes que le permiten al alimento ser atractivo para su consumo. El rojo 40 es un colorante azo ampliamente utilizado en México en productos lácteos, cárnicos y confitería, se encuentra asociado a problemas de salud por lo que su uso ha sido restringido o eliminado en países como; Nigeria, Suiza, Canadá y la Unión Europea (Kobylewski y Jacobson, 2010). En las últimas décadas se incrementan los estudios sobre el riesgo que tienen los niños en: reacciones alérgicas, efectos conductuales y neurocognitivos afirman Martins (2016).

La cantidad de alimentos procesados con el rojo 40 se incrementan, hay estudios de su consumo, sin embargo no hay un instrumento de evaluación donde se reporte la frecuencia de consumo de estos alimentos. La ingesta usual y prolongada de alimentos coloreados pone en alerta a la salud humana debido a la frecuente exposición de colorantes en el cuerpo, con posibilidad de ser degradados por los microorganismos de la microbiota intestinal y formar productos carcinogénicos, así mismo se sabe que la microbiota intestinal juega un papel clave en el metabolismo de diversos productos sintéticos, así como en la homeostasis intestinal del ser humano.

Por lo que el interés de este estudio es conocer la distribución y frecuencia del consumo de alimentos con rojo 40 y su posible degradación por enterobacterias de la microbiota intestinal.

II. JUSTIFICACIÓN

El consumo de alimentos procesados tiene un costo ambiental notable por su proceso de elaboración (agua, energía, envase, refrigeración, transporte, cocción, etc.) además un costo de salud por el consumo de aditivos que se ingieren, por ejemplo la ingesta del colorante rojo 40 puede causar alergias, como aditivo sintético, se le ha asociado a la hiperactividad y déficit de atención infantil (Calvillo, 2012).

Algunos países de la Unión Europea han restringido o limitado el uso de dicho colorante, pero en nuestro país existe la libre demanda de su uso hasta llegar a 300 ppm en alimentos; en la ciudad de Puebla no se ha reportado la frecuencia de su consumo y se desconocen los productos que contienen el colorante, y el impacto social que genere.

Por otro lado, se ha demostrado que los colorantes tipo azo pueden ser degradados por bacterias como: *Pseudomonas sp* (Lin et al., 2010), *Enterobacter sp* (Wang et al., 2009), *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli* (Oranusi y Njoku, 2006), entre otras, generan productos secundarios carcinogénicos como las aminas aromáticas. El rojo 40 también es un colorante azo que se utiliza en el procesamiento de una gran cantidad de alimentos, que si son consumidos con frecuencia aumenta la posibilidad de interactuar con la microbiota intestinal y tal vez ser degradado por alguna enterobacteria de la microbiota como: *Enterobacter*, *Citrobacter*, *E. coli*, etc. Debido a ello, en esta investigación se pretende estudiar la interacción del rojo 40 con enterobacterias.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1 Marco teórico

3.1.1 Salud alimentaria enfoque multidisciplinario

El crecimiento demográfico continuará e irá acompañado de tasas de urbanización sin precedentes, el resultado será un rápido crecimiento de la demanda de alimentos, tanto en la cantidad como en calidad. La adaptación del sistema alimentario requerirá ajustes sociales, económicos y biofísicos complejos en relación con la producción, la elaboración y el consumo de alimentos, (HLPE, 2012). El modelo económico lleva al consumo de alimentos procesados para cubrir las necesidades alimentarias de la población, estos alimentos procesados contienen aditivos alimentarios, los cuales tienen un impacto en la aceptabilidad del consumidor, que depende de cada sistema y el modelo económico de cada país, un ejemplo es el color del alimento como un atributo sensorial y cultural de la nutrición (Ahued, 2014).

Los aditivos alimentarios están prácticamente en todos los alimentos y bebidas que ingerimos (Jiménez et al., 2008). Los colorantes alimentarios sintéticos se destacan como uno de los esenciales aditivos, no solo para resaltar la apariencia de los alimentos sino también para restablecer su apariencia original perdida durante el proceso de producción además son de gran importancia para la industria alimentaria en la conquista de mercados (Ashfaq y Masud 2002). Dentro de los 10 colorantes sintéticos más utilizados como aditivos en la industria alimenticia se encuentra el colorante rojo 40.

Recientemente ha sido asociado con efectos en la salud, tales como: numerosos efectos secundarios y toxicidad, tanto a mediano como a largo plazo, reacciones alérgicas, efectos conductuales y neurocognitivos (Martins et al., 2016). Lo más preocupante que es que los colorantes azo se metabolizan principalmente por bacterias a aminas aromáticas incoloras, algunas de las cuales son carcinogénicas (Chen, 2006). En el estado de Puebla, México se reportó un estudio en el cual cepas de la microbiota intestinal, aisladas de un niño, son capaces de degradar el colorante rojo 40 probablemente a través de mecanismos de azo-reductasas, produciendo sustancias que son perjudiciales para la salud. (Chavez, 2016).

Se requiere un enfoque verdaderamente multidisciplinario en la comprensión de la interacción de la salud, los microorganismos y el ambiente que los rodea, es necesario que se establezcan medidas concretas que favorezcan la alimentación saludable con la participación de autoridades federales familias y empresas procesadoras de alimentos.

3.1.2. Industria alimentaria.

El uso generalizado que la industria alimentaria actualmente tiene de sustancias, obliga a establecer unos mecanismos de control que regulen su correcta utilización y que verifiquen sus resultados, dichas sustancias llamadas aditivos deben ser de conocimiento general. El concepto de aditivo alimentario está regulado por el Codex Alimentarius (Organismo Internacional en materia de normas de alimentación), (Alimentarius, 2015), donde se entiende por aditivo alimentario cualquier sustancia que en cuanto tal no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición intencionada al alimento con fines tecnológicos (incluidos los organolépticos) en sus fases de fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, resulte o pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del alimento o un elemento que afecte a sus características. Esta definición no incluye “contaminantes” o sustancias añadidas al alimento para mantener o mejorar las cualidades nutricionales.

Los aditivos utilizados se clasifican en dos grupos: i) naturales donde sus compuestos son aislados de fuentes naturales y ii) productos químicos sintéticos que son los más utilizados en la industria alimentaria debido a su baja contaminación microbiológica y los costos de producción relativamente bajos. Dentro de los aditivos encontramos colorantes, saborizantes, emulsificantes, espesantes, potenciadores de sabor, edulcorantes y gelificantes; los colorantes más utilizados en la industria alimentaria están la tartrazina usado en alimentos como: cereales, bebidas, postres y dulces; el negro brillante usado casi exclusivamente para colorear sucedáneos de caviar; amarillo ocaso, de gran uso en refrescos de naranja, cárnicos, helados, caramelos y el amarillo de quinoleína utilizado en bebidas refrescantes y alcohólicas, y en la elaboración de productos de repostería, conservas vegetales, derivados cárnicos o de pescado (Chertoviski, 2012).

En México a inicios de la década de los noventa, empezaron a detectar la presencia de alimentos industrializados en el sector rural en donde se observaba ya el comienzo de una transición dietética. Hoy en día no es sólo una transición, sino una invasión masiva que está provocando serios problemas en la salud, especialmente de los niños, nuestro país se ha convertido en el paraíso para empresas procesadoras de alimentos de bajo o nulo valor alimenticio como lo reporta Cabada (2010). En las familias más pobres del país el consumo de refrescos se ha incrementado en 60% y en las más ricas en 45%, en los últimos 14 años.

3.1.3 Los colorantes sintéticos (Azo).

Los colorantes han sido utilizados desde tiempos atrás y se emplean de manera muy común en la industria alimentaria para mejorar la apariencia de los alimentos y hacerlos más atractivos al consumidor. Por ejemplo, en la India y en China, en el año 1500 a. C., se utilizaban extractos de especias y vegetales para colorear los platillos, el vino se coloreaba ya en el 400 a.C., y hasta 1850, todos los colorantes añadidos en la alimentación eran de origen natural, vegetales, animales o minerales, en la actualidad se hace uso de colorantes artificiales (Astiasarán, 2003).

Los colorantes artificiales son sustancias obtenidas mediante síntesis química, presentan en su estructura grupos cromóforos que le confieren coloración (Berzas, 2005). Dentro de estos se encuentran los colorantes azoicos, todos ellos presentan en su estructura uno o más enlaces dobles nitrógeno-nitrógeno (grupo azo $N=N$), las coloraciones de estos compuestos son amarillo, naranja, rojo y marrón. Algunos ejemplos de ellos son: Carmoisina, Amaranto, Ponceu 4R, Amarillo anaranjado, Rojo 40, Marron Pn, entre otros. Los colorantes azoicos constituyen la clase más grande y más versátil de los tintes sintéticos utilizados en la industria textil, farmacéutica, cosmética y en la de alimentos como: bebidas, dulces, helados, salsas, embutidos entre otros (Dos Santos et al., 2007).

El estudio de la exposición a estos colorantes alimentarios en niños y/o adolescentes se han realizado en diferentes partes del mundo: en Australia (FSANZ, 2008), Korea (Ha et al., 2013), Japón (Yamada y Ishiwata, 2000) e India (Dixit et al., 2010), Hong Kong (Yuet-Wan Lok et al., 2010), Alemania (Diouf et al., 2014), Kuwait (Husain et al., 2006; Sawaya et al., 2008), Irlanda (Connolly et al., 2010) y Brasil (Toledo et al., 1992), Italia (Fallico et al., 2011), Francia (Elhkim et al., 2007), Estados Unidos (Stevens et al. 2014, 2015)

3.1.4 Colorante rojo 40.

El rojo 40 es la versión aprobada por la FDA del rojo allura que fue producido por primera vez por Allied Chemical Corp en el año de 1980 y fue evaluado en EU por el Comité Científico de Alimentos (SCF) en 1984 y 1989, por el Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), y la European Food Safety Authority (EFSA, 2010). El colorante aniónico rojo 40, es ampliamente utilizado en la industria alimentaria: en bebidas, productos de panadería, cárnicos, polvos de postre, dulces, cereales, medicamentos, cosméticos, y en tintas de tatuajes. Es nombrado FD&C rojo No. 40 por la FDA, también es llamado: rojo allura, rojo alimenticio 17, C.I. 16035, 2 -naphthalenesulfonic acid, 6- hydroxy-5 -((2 -methoxy-5 -methyl-4 -sulfophenyl) azo)-, disodiumsalt, y disodium 6 -hydroxy-5 -((2 -methoxy-5 -methyl-4 -sulfophenyl) azo) 2 naphthalenesulfonate, posee el número E-129 en la lista de aditivos alimenticios en la Unión Europea.

Es un colorante ácido de la clase de los monoazos, con fórmula química $C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$; PM 496.42 g/mol. Tiene propiedades ácidas y una estructura aromática constituida por tres anillos bencénicos Fig. 1.

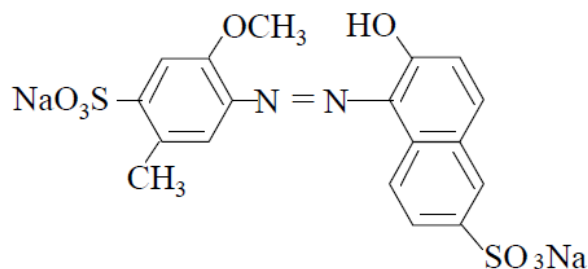


Fig. 1 Estructura química del colorante rojo 40 AC

Este colorante fue emitido por la FDA (Food and Drug Administration) para su uso en la industria alimentaria de los Estados Unidos a mediados de la década de los ochenta para reemplazar el colorante amaranto (E-123, C.I. 16185), ya que este fue prohibido por mostrar efectos nocivos en la salud (Wilson y Bahaa, 2005; Abdullah et al., 2008).

El rojo 40 tiene una IDA (Ingesta Diaria Admisible) de 7 mg /kg por peso/día, señala la FDAf (Federal Drug Agents Foundation), que se traduce en 210 mg para un niño de 30 kg. Se estima

que las empresas producen diariamente alrededor de 25 mg de rojo 40 por persona, pero debido al uso en gran medida, este valor podría incrementarse inclusive varias veces. Este colorante ha sido restringido por algunos países de la unión Europea como: Dinamarca, Bélgica, Francia, Alemania, Suiza, Suecia, Austria y Noruega, debido a que se encuentra implicado en la salud infantil como la hiperactividad, déficit de atención y liberador de histamina intensificando los síntomas de asma (Gupta y Sugas, 2009).

Allura Red AC (E 129) ha sido evaluado previamente por el Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), debido a la exposición en la población, La EFSA estimó la exposición crónica para los siguientes grupos de población: párvulos, niños, adolescentes, adultos y ancianos como se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Grupos de población considerados para las estimaciones de exposición de rojo 40 (EFSA, 2015).

Población	Rango de edad	Países con encuestas de consumo de alimentos que cubren más de un día.
Párvulos	De 12 a 35 meses de edad	Bélgica, Bulgaria, Finlandia, Alemania, Italia, Países Bajos, España
Niños	De 36 meses a 9 años	Bélgica, Bulgaria, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Grecia, Italia, Letonia, Países Bajos, España, Suecia
Adolescentes	De 10 a 17 años de edad	Bélgica, Chipre, República Checa, Dinamarca, Francia, Alemania, Italia, Letonia, España, Suecia
Adultos	De 18 a 64 años de edad	Bélgica, República Checa, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Hungría, Irlanda, Italia, Letonia, Países Bajos, España, Suecia, Reino Unido
Ancianos	De 65 años en adelante	Bélgica, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Hungría, Italia

La EFSA concluyó que, la IDA de 7 mg / kg por día sigue siendo vigente en cualquier población (EFSA,2015).

3.1.5 Efectos en la salud por el consumo de alimentos con rojo 40.

Actualmente, hay una creciente preocupación de que los colorantes alimentarios puedan contribuir al desarrollo del trastorno de hiperactividad y déficit de atención (TDAH) en niños

(Vojdani y Vojdani, 2015). Un estudio de metanálisis examinó la relación entre el TDAH y los colorantes alimentarios; sin embargo, no se proporcionaron pruebas claras de TDAH y el estudio concluyó que solo ciertos grupos de respondedores pueden verse afectados, por lo tanto, no proporciona una recomendación clínica clara para el uso de colorante alimentario, sin embargo, en 2007 se evaluó los efectos de dos bebidas con colorantes alimentarios en niños, encontrando una asociación estadísticamente significativa entre la ingesta de colorantes y el desarrollo de TDAH (McCann et al., 2007).

La toxicidad del colorante rojo 40 ha estado en controversia por las implicaciones con la salud del ser humano, se afirmó que el colorante es seguro con ADI de 7 mg / kg de peso corporal por día. El daño al ADN por diferentes dosis de Rojo 40 en ratones ha encontrado un aumento significativo en la migración del ADN nuclear en varios órganos probablemente no se deba a la citotoxicidad general (Tsuda et al., 2001).

EFSA informó que rojo 40 puede causar reacciones alérgicas (por ejemplo, urticaria, asma), especialmente cuando se administra en mezclas con otros aditivos sintéticos de color (EFSA, 2009, Fallico et al., 2011). La principal preocupación que a menudo limita su uso es la carcinogenicidad potencial que ocurre después de su azoreducción a metabolitos cancerígenos por la microbiota intestinal (Feng et al., 2012). Se sabe que estos metabolitos se producen en el cuerpo humano; sin embargo, la importancia clínica de este fenómeno depende de la cantidad ingerida del colorante (Golka et al., 2004). Recientemente, se han publicado varios estudios sobre el tema de los colorantes sintéticos que se unen a la albúmina sérica humana con rojo 40 (Wang et al., 2014)

3.1.6 Interacciones bacterianas con colorantes azo.

El estudio de la interacción de colorantes y la microbiota intestinal ha sido un tema de interés desde hace años. El primer reporte sobre la reducción de un colorante azo fue publicado por Brohm y Frohwein (1937), cuando estudiaron la reducción de colorantes utilizados en la industria alimentaria por bacterias lácticas aisladas del intestino humano. A partir de entonces, se derivaron múltiples estudios que describen la reducción de colorantes azoicos por diferentes bacterias aisladas del tracto digestivo de mamíferos (McMullan et al., 2001; Stolz, 2001; Rau et al., 2002). Sin embargo, estudios han demostrado que algunas bacterias de la microbiota

intestinal y de la piel pueden degradar ciertos colorantes azoicos a compuestos tóxicos o carcinogénicos (Feng et al., 2012). El papel de los microorganismos en la reducción de colorantes azoicos no solo sea registrado en tintes alimenticios, varios grupos de investigación han demostrado recientemente la posibilidad de utilizar comunidades microbianas para la degradación de colorantes azoicos de las industrias textiles (Hu, 1994).

El estudio de la capacidad de *Lactobacillus paracasei* para modificar colorantes azoicos; Tartrazina, Rojo Allura y Amaranto, aislando bacterias ácido lácticas (BAL) de leche en polvo, estas fueron seleccionadas por su capacidad de modificar el color en la comida, el ensayo se realizó en condiciones anaeróbicas, inoculando en caldo las bacterias acidolácticas, y se incubaron a (0, 4, 24, 72) horas, a diferente pH (5,6, 7). Se concluyó que el colorante con mayor degradación fue el amaranto en comparación de tartrazina y rojo 40, el tiempo óptimo para decolorar fue de 24 h, en condiciones óptimas de pH de 5. 6 y 8 a 37°C de temperatura, Hasan declara que existe una fragmentación reductora del enlace azo, capaz de producir aminas incoloras y señala que el aumento del pH hacia el intervalo alcalino puede ser atribuido a la acumulación de estas aminas aromáticas básicas y/o otros metabolitos (Elbanna et al.,2010).

3.1.7 Microbiota intestinal.

Los millones de bacterias que se encuentran en el tracto gastrointestinal del ser humano se le denomina microbiota intestinal, estas bacterias pueden identificarse con distintas técnicas de biología molecular, dichas técnicas muestran su composición por: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* entre otras bacterias menos frecuentes. La *proteobacteria* es una de las familias bacterianas más importantes, y dentro de ella se encuentran géneros que incluyen microorganismos patógenos para el ser humano como *Escherichia*, *Salmonella*, *Vibrio*, *Helicobacter*, entre otros. Debido al número de las especies que componen la biota intestinal, la actividad metabólica se asemeja a la de un órgano virtual extra en donde los cambios alimentarios del ser humano puede provocar cambios en su organismo como lo reporta Ochoa (2013).

Hoy en día para la comprensión de la microbiota intestinal requiere de conocer algunos conceptos como: microbioma conjunto formado por los microorganismos, sus genes y sus metabolitos; microbioma humano microorganismos, genes y metabolitos del cuerpo humano; disbiosis

alteraciones de la microbiota intestinal; metagenómica es el análisis del material genético de las bacterias; metatranscriptómica estudia al ARN total transcrito; metaproteómica se enfoca en los niveles de proteínas (Icaza-Chávez, 2013).

La función de la microbiota es similar a un "órgano" metabólico, que influye en la adquisición de nutrientes, la homeostasis energética, el control del peso corporal, la regulación de la inmunidad y la inflamación sistémica (Frazier et al., 2011). La microbiota intestinal tiene enzimas que transforman a los polisacáridos complejos de la dieta, que el intestino humano no puede digerir ni absorber, en monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta que pueden ser transportados al hígado para ser usados en la síntesis lipídica; de hecho, se estima que las calorías derivadas de esta digestión bacteriana constituyen alrededor del 10% de toda la energía que absorbemos (Turnbaugh et al., 2006), también las bacterias intestinales están asociadas a la degradación de colorantes alimentarios tipo azo.

3.1.7.1 Enterobacterias como posibles degradadoras.

Aunque el estudio de las bacterias intestinales se vio obstaculizado por el hecho de que la mayoría de las bacterias eran inculturables ex vivo, los recientes métodos de secuenciación molecular y genómica han revelado un vasto y dinámico consorcio de bacterias, con aproximadamente 100 billones de bacterias que habitan en el intestino humano (Hooper y Gordon, 2001; Hooper y Macpherson, 2010).

La familia Enterobacteriaceae constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gramnegativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprofitos en el tracto digestivo del ser humano y animales, aunque se trata de gérmenes ubicuos, también se pueden encontrar en el suelo, el agua y la vegetación (García y Rodríguez, 2010). En el hombre se localizan en las vías aéreas superiores (en pequeña proporción), en la piel (sobre todo en la región perianal), en la uretra anterior y en el intestino. Desde el estómago al intestino grueso, la concentración va aumentando a lo largo del tubo digestivo (Giglio et al., 2013). Son fermentadores, anaerobios facultativos, no esporulados, reducen nitratos a nitritos, oxidasa negativa, catalasa positiva, movilidad variable y son patógenos oportunistas. (Orn et al., 2005), su forma es de bastón, por lo general de 1-3 μm de largo y 0,5 μm de diámetro.

Las bacterias intestinales humanas también juegan un papel en la degradación de varios xenobióticos a metabolitos, algunos de los cuales están implicados en la genotoxicidad y la carcinogénesis. La exposición humana a los xenobióticos, incluidos los colorantes azoicos, se produce por ingestión, contacto con la piel o por inhalación. Cuando los colorantes azo entran en el cuerpo a través de la ingestión, tanto los microorganismos intestinales como las enzimas en el hígado son responsables de la reducción de los colorantes. Algunos estudios demostraron que las reductasas bacterianas intestinales pueden ser más importantes que las enzimas hepáticas en el metabolismo de los colorantes azoicos (Elhkim et al., 2007).

Los colorantes azo se reducen a aminas aromáticas por un tipo de reductasa llamada azoreductasas, que están ampliamente distribuidas en las bacterias intestinales. En algunos casos, los colorantes azoicos pueden degradarse a través de reacciones oxidativas catalizadas por oxidasas y peroxidasas (Chen, 2006). La cepa de *E. coli* que contiene el AzoR sobreexpresado tiene una actividad de decoloración similar en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, lo que significa que la azoreductasa de *E. coli* es tolerante al oxígeno. Methyl Red, Ponceau BS y Orange II pueden reducirse con *E. coli* (Feng et al., 2010).

3.1.1.7.2 Degradación biológica.

Actualmente se conocen varios mecanismos mediante los cuales se reducen los colorantes azo. El mecanismo más estudiado implica la reducción biológica de colorantes azo por una amplia gama de microorganismos anaerobios. Al respecto, se conocen diferentes formas de reducción microbiana; en algunos casos la reducción se lleva a cabo en el citoplasma de las bacterias, mientras que, en otros casos, la reducción de los colorantes está asociada a enzimas de la membrana celular (Dos Santos et al., 2007). Otro mecanismo de reducción de colorantes azo involucra la participación de distintos mediadores redox que canalizan los electrones generados por microorganismos, gracias a la oxidación de diferentes sustratos, hacia los enlaces azo de los colorantes.

Reducción enzimática directa: De acuerdo con los mecanismos de la reducción biológica, la transferencia de equivalentes reductores se origina a partir de la oxidación de sustratos orgánicos,

las enzimas especializadas catalizan la reducción de los enlaces azo. La enzima responsable es llamada azoreductasa encontrada en bacterias tanto aerobias como facultativas que toman al colorante azo como única fuente de carbono y energía. También se han aislado enzimas no específicas que catalizan la reducción, de: *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Bacillus sp* (VanderZee, 2002).

Reducción indirecta: De acuerdo al segundo mecanismo biológico de reducción los colorantes azo son indirectamente reducidos por donadores de electrones enzimáticos como las flavinas (FADH₂, FMNH₂, riboflavina) los cuales pueden reducir directamente a los colorantes dentro de una reacción química no específica. Los compuestos bioquímicos altamente reducidos, tales como NADH, FMN (mononucleótido de flavina) y FAD (Dinucleótido de adenina-flavina), actúan como cofactores para las enzimas azorreductasas. Su presencia en cultivos bacterianos incrementa la tasa de degradación (Chung, 1992).

Los microorganismos que participan en una reducción biológica, se involucran en el rompimiento del grupo funcional de la molécula y en la transformación de los productos metabólicos resultantes (Kandelbaur y Guabitz, 2005). El desarrollo de procesos encaminados hacia la decoloración de efluentes industriales ha permitido conocer hongos y bacterias especializadas para realizar los procesos de remoción de un amplio espectro de colorantes, con un alto porcentaje de degradación. De acuerdo a sus características, las bacterias pueden participar en procesos de degradación aerobia y anaerobia, algunas de ellas son: *Aeromonas sp.*, *Bacillus subtilis*, *Proetus mirabilis* y *Pseudomonas* entre otras (McMullan et al., 2001). El mecanismo por el cual bacterias pueden degradar los colorantes artificiales es mediante la secreción de enzimas azorreductasas (Russ et al., 2000).

Las azorreductasas catalizan el rompimiento reductivo del grupo azo con NADPH (Dinucleótido adenin difosfato nicotinamina) como donador de electrones. Su actividad es afectada por la presencia de oxígeno, por los aceptores finales de electrones y por otros factores, tales como el tipo de colorante, y condiciones de operación del proceso anaerobio (Jirasripongpun et al., 2007)

IV. FORMULACIÓN DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

4.1 Pregunta de investigación.

¿Cuáles son los alimentos que contienen el colorante rojo 40?, ¿Cuáles alimentos son los de mayor frecuencia de consumo en niños 10 a 13 años? y ¿Las enterobacterias de la microbiota intestinal de infantes serán capaces de remover el colorante rojo 40?

V. HIPÓTESIS

Existe gran variedad de productos alimenticios que contienen el colorante rojo 40, su ingesta es frecuente y las enterobacterias de la microbiota intestinal son capaces de remover el colorante.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar la frecuencia del consumo de alimentos procesados con rojo 40 y su posible remoción por enterobacterias de la microbiota intestinal.

6.2 Objetivos particulares

- ✓ Buscar los alimentos procesados que contienen el colorante rojo 40 que están a la disposición de niños de 10 a 13 años de edad.
- ✓ Diseñar y validar un constructo que permita conocer la frecuencia de consumo de alimentos con rojo 40.
- ✓ Determinar la frecuencia de consumo de alimentos procesados con el colorante rojo 40.
- ✓ Aislar e identificar enterobacterias procedentes de la microbiota intestinal de los infantes con una ingesta alta de alimentos procesados.
- ✓ Determinar los porcentajes de remoción del colorante por las enterobacterias aisladas.

VII. METODOLOGÍA

7.1 Tipo de experimento

La presente investigación es un estudio exploratorio transversal descriptivo, también es conocido como encuesta de frecuencia o estudio de prevalencia, en general se realiza para examinar la presencia o ausencia de un resultado de interés, ocurriendo en un tiempo determinado y en una población específica (Álvarez y Delgado, 2015), el presente estudio fue dirigido a niños en un rango de 10 a 13 años, en esta etapa de su vida adquieren hábitos de consumo que forman parte de su dieta, motivo por el cual, fueron de interés para este estudio.

7.2 Elección de la población

La población elegida fue de niños entre 10 y 13 años de edad, que se encuentran en el nivel básico escolar en la Ciudad de Puebla. Las escuelas fueron elegidas por conveniencia, el acceso y consentimiento que se tuvo por las autoridades escolares para la aplicación de la encuesta (Anexo 1).

7.3 Fase de campo.

7.3.1 Recolección de información de los productos alimentarios con rojo 40.

El listado de productos alimentarios con el colorante rojo 40 fue obtenido de supermercados, tiendas de abarrotes y cafeterías de las escuelas donde se aplicó la encuesta, identificando los productos, primero observando su presentación y posteriormente dando lectura a la etiqueta que tenía el colorante rojo 40.

7.4 Diseño del constructo

7.4.1 Aspectos a considerar para el diseño del constructo.

El diseño del constructo tiene como finalidad cuantificar la información y estandarizar el procedimiento de la entrevista, para tal fin se consideraron tres aspectos importantes en el diseño del constructo:

1. Tener un objetivo: determinar la frecuencia de consumo de alimentos procesados con el colorante rojo 40 en niños.
2. Aplicar una encuesta: a madres de familia voluntarias, que tengan niños de 10 a 13 años (personas indicadas para proporcionar la información sobre la ingesta habitual que tienen los menores).
3. Utilizar la lista de alimentos con rojo 40 que se registraron en las tiendas que comprenden el estudio.

7.4.2 Partes del diseño del constructo

Se consideraron 4 partes para el diseño del constructo: introducción sobre la encuesta, apartado de registro para los datos generales del encuestado, cuerpo de preguntas de interés, y finalmente un agradecimiento por la participación.

Las preguntas fueron claras y precisas, en la codificación de las respuestas se utilizó la escala de Likert, es una escala de actitud de intervalos que pertenece a lo que se ha denominado escala ordinal, utiliza series de afirmaciones o ítems sobre los cuales se obtiene una respuesta por parte del sujeto (Ospina, et al., 2005), para este constructo se utilizó una escala de Likert de 4 puntos:

- 1.- Muy frecuente (consumo diario de alimentos)
- 2.- Frecuente (1 a 3 veces a la semana)
- 3.- Ocasionalmente (1 vez a la quincena)
- 4.- Nunca (No lo han probado)

7.4.3 Evaluación del constructo

7.4.3.1 Alfa de Cronbach

Para evaluar la confiabilidad o la homogeneidad de las preguntas o ítems es común emplear el coeficiente alfa de Cronbach, cuando se trata de alternativas de respuestas policotómicas, como las escalas tipo Likert (Corral de Franco, 2009), este coeficiente desarrollado por J. L. Cronbach requiere una sola administración del instrumento de medición y produce valores que oscilan entre 0 y 1. Su ventaja reside en que no es necesario dividir en dos mitades a los ítems del instrumento de medición, simplemente se aplica la medición y se calcula el coeficiente (Hernández, 2006). Un valor del alfa de Cronbach, entre 0.70 y 0.90, indica una buena consistencia interna para una escala unidimensional (Alonso y Santacruz, 2015).

Para el cálculo del alfa de Cronbach se emplearon los siguientes métodos:

- a) Mediante la varianza de los ítems (Cronbach y Shavelson, 2004)

$$\alpha = \frac{k}{k-1} \left[1 - \frac{\sum Vi}{Vt} \right] \quad \text{Ec. 1}$$

α = Alfa de Cronbach

k= Número de ítems

Vi= Varianza de cada ítem

Vt= Varianza del Total

- b) Mediante la matriz de correlación (Cronbach y Shavelson, 2004)

$$\alpha = \frac{np}{1+p(n-1)} \quad \text{Ec. 2}$$

α = Alfa de Cronbach

n=Número de ítems

p=Promedio de las correlaciones lineales de cada uno de los ítem

- c) Con el paquete estadístico SPSS versión 19.

El proceso de construcción y validación de un cuestionario de medida es relativamente complejo y requiere el conocimiento teórico claro del aspecto que queremos medir. Para garantizar que el

diseño del constructo se pueda aplicar a criterios de validez y fiabilidad debe reunir las siguientes características:

1. Ser adecuado para el problema que se pretende medir (teóricamente justificable), validez de contenido e intuitivamente razonable.
2. Ser válido, en el sentido de ser capaz de medir aquellas características que pretenden medir y no otras.
3. Ser fiable, preciso, es decir, con un mínimo de error en la medida.
4. Ser sensible, que sea capaz de medir cambios tanto en los diferentes individuos como en la respuesta de un mismo individuo a través del tiempo.
5. Delimitar claramente sus componentes (dimensiones), de manera que cada uno contribuya al total de la escala de forma independiente. (Arribas, 2004).

7.4.3.2 Encuesta Piloto.

Se realizó una encuesta piloto donde fue necesario verificar: preguntas más adecuadas, si el enunciado es correcto, comprensible y si tiene la extensión adecuada; correcta categorización de las respuestas; resistencias psicológicas o rechazo hacia algunas preguntas; el ordenamiento interno es lógico; si la duración está dentro de lo aceptable por los encuestados.

7.5 Consideraciones para la aplicación del constructo.

Para aplicar el constructo tanto a las instituciones educativas como a los niños y a sus padres, se les informó que la investigación se trataba de un estudio exploratorio sobre la frecuencia de consumo de alimentos procesados con rojo 40 que pueden realizar los niños. A las instituciones educativas y a las mamás se les solicitó el consentimiento correspondiente para aplicar encuestas y responder voluntariamente, con la certeza de darles confidencialidad a los datos recabados.

7.6 Análisis de datos.

Una vez integrada la base de datos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 19 para un análisis descriptivo ayudado con gráficas, tablas de frecuencias y distribución conjunta.

7.7 Fase de laboratorio.

7.7.1 Obtención de la muestra de copro.

Se identificó a los niños con una ingesta alta de alimentos con rojo 40 (consumo diario y de 1 a 3 veces por semana) con ello se hizo labor de convencimiento con sus mamás, para que donaran una muestra de copro de sus hijos.

7.7.2 Análisis microbiológico para la obtención de enterobacterias.

Una vez que se obtuvieron las muestras de copro se siguieron las recomendaciones descritas por Prats (2005), la muestras fueron transportadas en medio Stuart para su preservación y trabajarlas antes de las 24 h. Fig. 2.



Fig.2 Medio Stuart con muestra fecal.

Se sembró por duplicado con hisopo, por estría cruzada en agar Mac Conkey, Verde Brillante, EMB (Eosina-Azul de Metileno) y Lb (Luria Bertani) dejándola incubar a 37°C durante 24 h. Fig. 3.

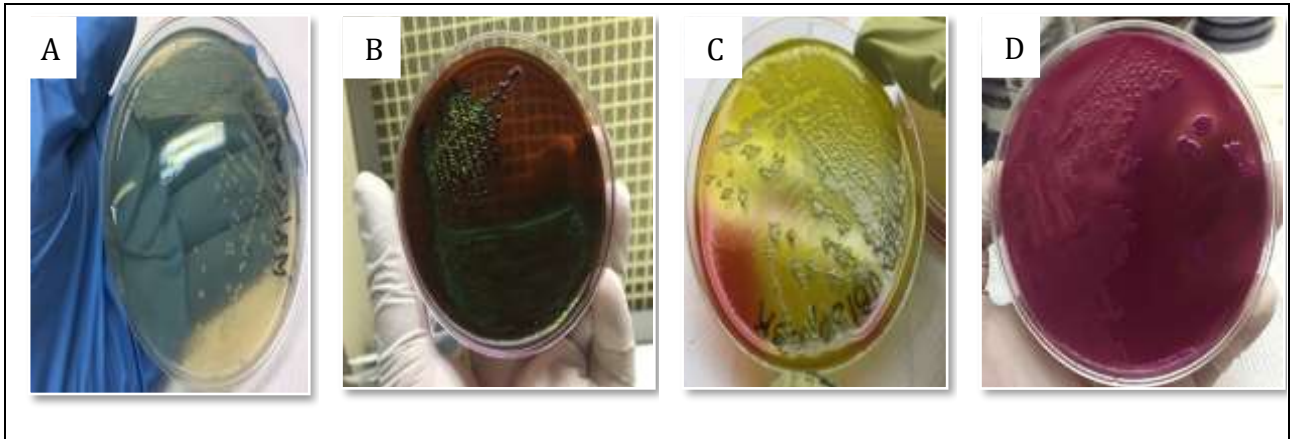


Fig.3 Crecimiento de microorganismos en medios de cultivo

A)Lb, B)EMB, C)Verde Brillante, D)Mac Conkey

7.7.3 Aislamiento e identificación de cepas.

Después de 24 h de incubación, se observó la morfología colonial en cada placa para aislar e identificar las colonias con diferente morfología, desarrollo y propiedades bioquímicas y metabólicas; las colonias se sembraron en medios de cultivo MacConkey y EMB con la finalidad de obtener colonias aisladas e identificarlas mediante pruebas bioquímicas: TSI (Agar-hierro-triple azúcar), LIA (Lisina Hierro Agar), Citrato de Simmons, MIO (Movilidad, Indol, Ornitina), RM-VP (Rojo Metilo- Voges Proskauer), las lecturas e interpretaciones se realizaron de acuerdo a las tablas de identificación proporcionadas en el laboratorio.

7.7.4 Resguardo de cepas

Se resguardaron en condiciones de esterilidad las cepas aislada de coprocultivo utilizando caldo Lb adicionado con glicerol, a una temperatura de -70°C (Arencibia y Gámez, 2008) Fig.4.



Fig.4 Cepas preservadas

7.7.5 Interacción bacteriana con el colorante rojo 40

Cada cepa fue sometida a interacción con el colorante rojo 40 a 30 ppm (por triplicado), para ello se utilizó un cultivo microbiano con crecimiento de 24 h. El cultivo microbiano tuvo una concentración de 1.5×10^9 UFC/ml en solución salina al 0.85%.

Una vez ajustado el cultivo microbiano se depositó un inóculo en un tubo con caldo nutritivo (1 g/l extracto de carne, 2 g/l extracto de levadura y 5 g/l NaCl) (1:9) a un volumen final de 30ml con la preparación previa del colorante azo (Isik y Sponza, 2003) Fig.5.

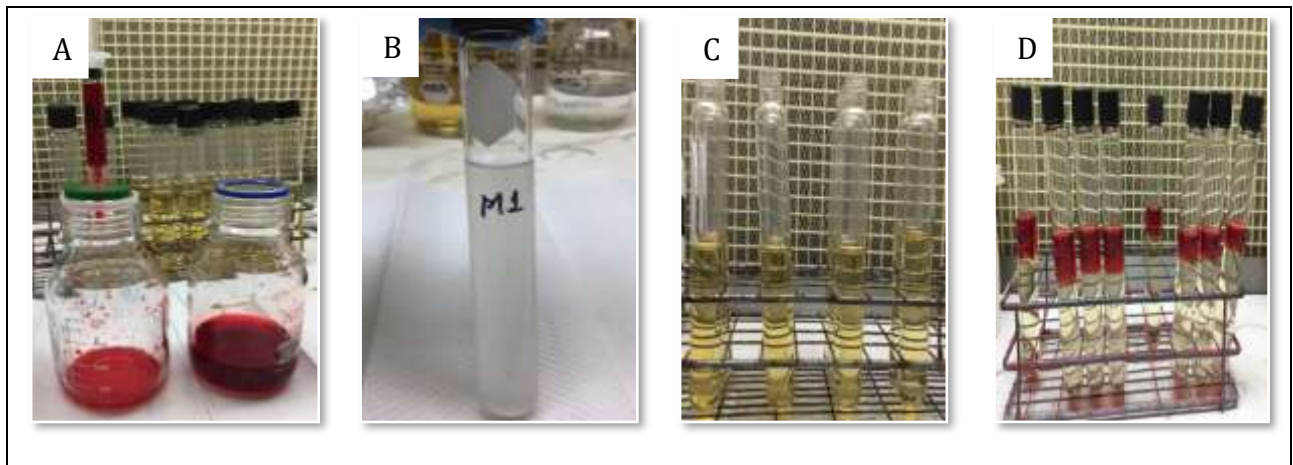


Fig.5 Interacción con las cepas aisladas y el colorante rojo 40

A) Filtración del colorante rojo 40, B) Cultivo bacteriano, C) Caldo nutritivo estéril, D) Tubos con el colorante, cepa y caldo nutritivo.

Cada 24 h se tomó lectura de la absorbancia del colorante a una longitud de onda de 504.3 nm. Durante diez días del ensayo se tomó una alícuota de 3 ml, centrifugando a 8000 rpm /10 min, el sobrenadante (eliminando previamente el cultivo bacteriano) se depositó en viales donde fue centrifugado a 12000 rpm /15 min para las lecturas espectrofotométricas.

Para descartar alguna contaminación en el ensayo fue sembrado en medio Mac Conkey una asada de cada tubo y así garantizar la presencia de la bacteria con la que se comenzó el ensayo Fig. 6.

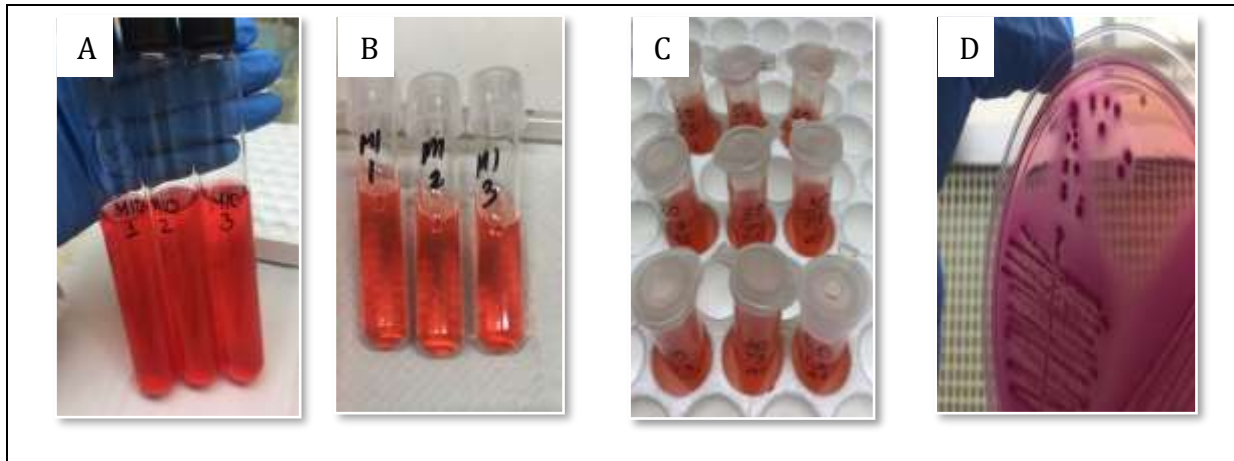


Fig.6 Toma de muestra tras la interacción del colorante con la bacteria

- A) Tubos al inicio del ensayo B) Alícuota después de 24h C) Viales con sobrenadante
D) Crecimiento de la bacteria

7.7.6 Porcentajes de remoción del colorante rojo 40 producidos por las cepas aisladas de infantes.

Las lecturas de las absorbancias registradas, de las interacciones (con sus respectivas repeticiones), se emplearon para determinar los porcentajes de remoción del colorante por la siguiente ecuación (Saratale et al., 2011).

$$DC(\%) = \frac{D_i - D_f}{D_i} \times 100$$

Dónde: D_i es la absorbancia inicial y D_f es la absorbancia final.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Tipo de estudio y población estudiada

Se realizó un estudio exploratorio transversal descriptivo con una población finita, conformada por 197 niños de 10 a 13 años de edad que se encontraban estudiando en el nivel básico, en tres escuelas primarias de la ciudad de Puebla.

8.2 Listado de alimentos con el colorante rojo 40

La gama de productos alimentarios con el colorante rojo 40, se obtuvo de tres tiendas de autoservicios, 4 tiendas de abarrotes y 3 cafeterías de escuelas primarias, identificando los productos con el colorante al observar las etiquetas. Las tiendas a las que se visitaron fueron por la cercanía a las escuelas primarias donde se llevó a cabo la aplicación del constructo.

La lista de productos con el colorante rojo 40 que se encontraron, se clasificaron en 5 secciones, debido a la extensa variedad de productos y las diferentes marcas comerciales. En la tabla 2 se presentan los alimentos, son 29 productos alimentarios a los que la población infantil está expuesta para su consumo.

Tabla 2. Listado de productos con rojo 40

Bebidas	Lácteos	Confitería	Productos para elaborar comida	Otros productos
1.-Refrescos	1.-Leches de	1.-Galletas	1.-Purés de	1-Avenas
2.-Agua mineral	sabor	2.-Cereales infantiles	tomate	instantánea
3.-Agua embotellada	2.-Yogurt	3.-Barras nutritivas	2.-Cubos de	2.-Fécula de maíz
de sabor		4.-Dulces de tamarindo	tomates	
4.-Jugos envasados		5.-Dulces macizos de	3.-Harina para	
5.-Saborizantes en		caramelo	hot cakes	
polvo para preparar		6.-Dulces de grenetina	4.-Salsas	
agua		(gomitas)	5.-Gelatinas	
6.- Concentrados		7.-Dulces presentación en		
7.-Bebidas		polvo		
energizantes		8.-Pan con envoltura		
		9.-Frituras (Botanas)		
		10.-Paletas		
		11.-Cacahuates		
		12.-Goma de mascar		
		13.-Dulces con chocolate		

Desde hace varias décadas se ha incrementado significativamente la ingesta de colorantes alimentarios artificiales lo que conduce al deterioro de la salud ya que se relaciona con el posible desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles, así como reacciones tóxicas en el metabolismo (alergias) y carcinogenicidad, siendo esta última una consecuencia a largo plazo y sin duda la más preocupante (De Omena Messias et al.,2016). Llama la atención que la una gran parte de alimentos procesados industrialmente son dirigidos a menores de edad.

La producción masiva de productos con colorantes alimentarios y el expendio que existe hacen que se creen hábitos de consumo, reportes recientes muestran la cantidad de productos alimentarios que se comercializan a los niños y niñas (población más susceptible), en México uno de los pocos reportes que se tiene de la presencia de colorantes en los productos alimentarios es el de Calvillo (2012), se observó que 6 de cada 10 productos que se venden en las escuelas de los infantes contienen algún tipo de colorante casi el 60% de los productos tienen uno o más colorantes, asimismo, reportan 4 categorías de alimentos con colorantes artificiales bebidas; pastelillos, postres y confites; yogurts y alimentos lácteos; frituras saladas, dicha clasificación se asemeja con lo descrito en la tabla 1 donde se agrupan los alimentos con rojo 40 en bebidas, lácteos, confitería, productos para elaborar comida y otros, para este estudio. Se hace necesario el conocer que productos contienen el colorante rojo 40 para generar una concientización de los alimentos que consumen nuestros niños.

8.3 Elaboración del constructo

El constructo se presenta en la figura 7 tiene como inicio un texto, en el cual expresa el objetivo y el proyecto al que pertenece, esto con el fin de dar a conocer el propósito del mismo, se realizaron preguntas claras, precisas y contundentes, como: número de integrantes de familia y edades, conocimientos de colorantes alimenticios artificiales, y la frecuencia de su consumo. En total fueron 27 preguntas integradas en dos páginas del cuestionario.

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
INSTITUTO DE CIENCIAS-ICUAP



MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES



La siguiente encuesta se realiza solo con el fin de conocer la frecuencia de consumo de alimentos que contienen el colorante Rojo 40. Este estudio pertenece al proyecto de investigación de la Maestría en Ciencias Ambientales. No es con ningún fin de lucro o en perjuicio de nadie.

- 1.-¿Cuántos integran la familia?_____
- 2.-¿Cuántos son menores de edad?_____
- 3.-¿Qué edad tienen los niños?_____
- 4.-¿Sabía usted que los alimentos contienen colorantes artificiales?_____
- 5.-¿Con qué frecuencia consume los siguientes alimentos? Marque la celda que más se acerque a su respuesta:

6.- ¿Con qué frecuencia consumen estas bebidas? Refrescos de color rojo de sabor: tutifruiti, arándano, sangría, uva, fresa, frambuesa.

Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a quincena	Nunca
--------	-----------------------	--------------------	-------

7.- Agua preparada : con extracto de Jamaica o manzana

Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a quincena	Nunca
--------	-----------------------	--------------------	-------

8.- ¿Con qué frecuencia consumen los niños jugos de fresa, uva, manzana, arándano?

Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a quincena	Nunca
--------	-----------------------	--------------------	-------

9.- Bebidas hidratantes sabor uva ,Berry

Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a quincena	Nunca
--------	-----------------------	--------------------	-------

10.- ¿Cuántas veces a la semana preparan en casa aguas de sabor con polvos sabor jamaica y manzana, fresa, uva?

Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a quincena	Nunca
--------	-----------------------	--------------------	-------

11.- ¿Con qué frecuencia consumen los niños los siguientes cereales como hojuelas de maíz, de colores y sabor chocolate?

Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a quincena	Nunca
--------	-----------------------	--------------------	-------

12.- ¿Cuántas veces consumen estas galletas : chocolate, de bombones de colores, tipo wafer con relleno sabor fresa?

Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a quincena	Nunca
--------	-----------------------	--------------------	-------

13.- Barras energéticas: de fresa, ciruela pasa, de cereales.

Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a quincena	Nunca
--------	-----------------------	--------------------	-------

14.- Pastelitos tipo rol, mantecadas, bollito de chocolate.

Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a quincena	Nunca
--------	-----------------------	--------------------	-------

¿Qué tanto consumen los siguientes dulces?

--	--	--	--

	Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a la quincena
15.-Paletas			
16.-Gomitas			
17.-Tamarindo			
18.- Dulces macizos de caramelo			
19.- Dulces con chocolate			

¿Qué tanto consumen las siguientes frituras?

	Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a la quincena
20.- Frituras de maíz, de papa, enchiladas			
21.- Cacahuates enchilados			

22.- ¿Cuántas veces se consumen lácteos como leches de sabor fresa , chocolate, yogures bebibles, estilo griego, cremoso, de fresa, uva, arándanos?

Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a quincena	Nunca
--------	-----------------------	--------------------	-------

¿Qué tanto consumen los siguientes productos en su comida?

23.- Puré de tomate, salsa para espagueti, sazónadores de tomate.

Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a quincena	Nunca
--------	-----------------------	--------------------	-------

24.- ¿Qué tanto diría usted que consumen las siguientes salsas?

Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a quincena	Nunca
--------	-----------------------	--------------------	-------

25.- ¿Con que frecuencia consumen gelatina sabor fresa hecha en casa o comprada?

Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a quincena	Nunca
--------	-----------------------	--------------------	-------

26.- ¿Con que frecuencia consume avena instantánea, harina para hot cakes, y mermelada sabor fresa?

Diario	1-3 veces a la semana	Una vez a quincena	Nunca
--------	-----------------------	--------------------	-------

27.-De los productos antes mencionados ¿Cuál es el que les gusta más?

GRACIAS

Fig. 7. Constructo

La mayoría de las encuesta realizadas en México son muy generales en cuanto al consumo de alimentos procesados, además, relacionan la ingesta con la dieta y la valoración nutricional en niños, actualmente, no existe un estudio específico sobre el consumo de productos alimentarios que contengan el aditivo rojo 40. En otros países como Italia se ha realizado un estudio de la evaluación de la exposición del color rojo 40 en el consumo de refrescos y jugos, (Fallico et al., 2011), en la ciudad de Carolina del norte, E.U. se recopiló información estadística de 810 productos comercializados para niños, 350 (43.2%) productos contenían colorantes alimentarios sintéticos, el más común fue el rojo 40 con 29.8%, la información recopilada para dichos

estudios fué basándose en sitios web, en encuestas ya establecidas INRAN-SCAI 2005-06 así como datos de ventas anuales de tiendas seleccionadas, dados estos reportes es relevante la creación del constructo que se elaboró en esta investigación para la evaluación de la frecuencia de consumo del colorante rojo 40 en infantes.

8.4 Validación del constructo

El constructo cuenta con las siguientes características:

- 1.- Es adecuado, determina la frecuencia de consumo que tienen la población de infantes objetivo de esta investigación.
- 2.- Es válido, la frecuencia de consumo se basó en escala de Linkert que ofrece una graduación de la opinión de las personas encuestadas, evitando algún posible sesgo de la respuesta.
- 3.- Es fiable ya que es preciso el empleo del mismo y los resultados son veraces y constantes.
- 4.- Es sensible, puede ser respondido por otros individuos a través del tiempo.
- 5.- Delimita claramente sus dimensiones de los productos alimentarios.

La encuesta piloto de 28 participantes, dio como resultado que se debían reorganizar algunas de las preguntas o en su caso eliminar ya que se duplicaban, después de estos ajustes se tendría el constructo a aplicar, con este tipo de ajuste el alfa de Cronbach fue de $\alpha = 0.85$ (SPSS) lo cual nos habla de la consistencia y estabilidad del instrumento para el tipo de escala. En la tabla 3 se observa el coeficiente alfa de Cronbach total del instrumento, mediante la varianza de los ítems, la matriz de correlación y con el paquete SPSS, cuyos valores son superiores al 0.80, el número de elementos corresponde al número de preguntas consideradas para el objetivo de la investigación.

Tabla 3. Estadísticos de confiabilidad interna

Alfa de Cronbach (α)			N de elementos
Mediante la varianza de los ítems	Mediante la matriz de correlación	SPSS	21
$\alpha=0.8571$	$\alpha=0.822$	$\alpha=0.857$	

La aplicación efectiva del alfa de Cronbach en escalas de respuesta ordinal o escalas de Likert puede llevarse a cabo en escalas de siete y cinco puntos (Alonso y Santacruz, 2015), en esta investigación se usó una escala de cuatro puntos en donde el alfa de Cronbach fue de 0.85 indicando una buena consistencia interna para la escala, una medida que cuantifica la correlación existente entre las ítems que compone esta.

8.5 Análisis estadístico descriptivo

Los alimentos procesados con colorante rojo 40 que consumen a diario los niños son cereales, yogurt y frituras, siendo las frituras las más consumidas con un 12% de total de los encuestados. Respecto al consumo de 1 a 3 veces a la semana, hay 12 productos alimentarios con rojo 40 que tienen porcentajes más altos del total de productos, sin embargo vuelven hacer: frituras con un 44 %, yogurt con un 39% y cereales con un 33% los que predominan, es importante observar como estos alimentos tienen consumo frecuente en los dos casos, concluyendo que son estos alimentos los que más consumen los infantes como se puede visualizar en la tabla 4.

Tabla 4. Frecuencia de consumo de alimentos con rojo 40

Alimentos	Consumo	
	Diario Porcentaje (Núm. de niños)	1 a 3 veces a la semana
Refrescos	4% (8)	29% (57)
Aguas de sabores	5% (10)	21% (41)
Jugos	5% (10)	30% (59)
Cereales	11% (21)	33% (64)
Galletas	4% (8)	32% (63)
Dulces de grenetina (gomitas)	2% (4)	24% (47)
Frituras	12% (23)	44% (87)
Yogurt	10% (19)	39% (67)
Purés	1% (2)	25% (49)
Salsas	1% (2)	26% (51)
Gelatina	0.5% (1)	26% (51)

En la Fig. 8 podemos observar la distribución de los alimentos que son más consumidos: cereales, yogurt y frituras, destaca sin duda la gráfica de frituras, donde el 12% de los niños mencionaron que consumen este alimento a diario y de 1 a 3 veces por semana un 44 %, por lo tanto un 56% de los niños tienen una ingesta muy frecuente de este tipo de producto alimenticio.

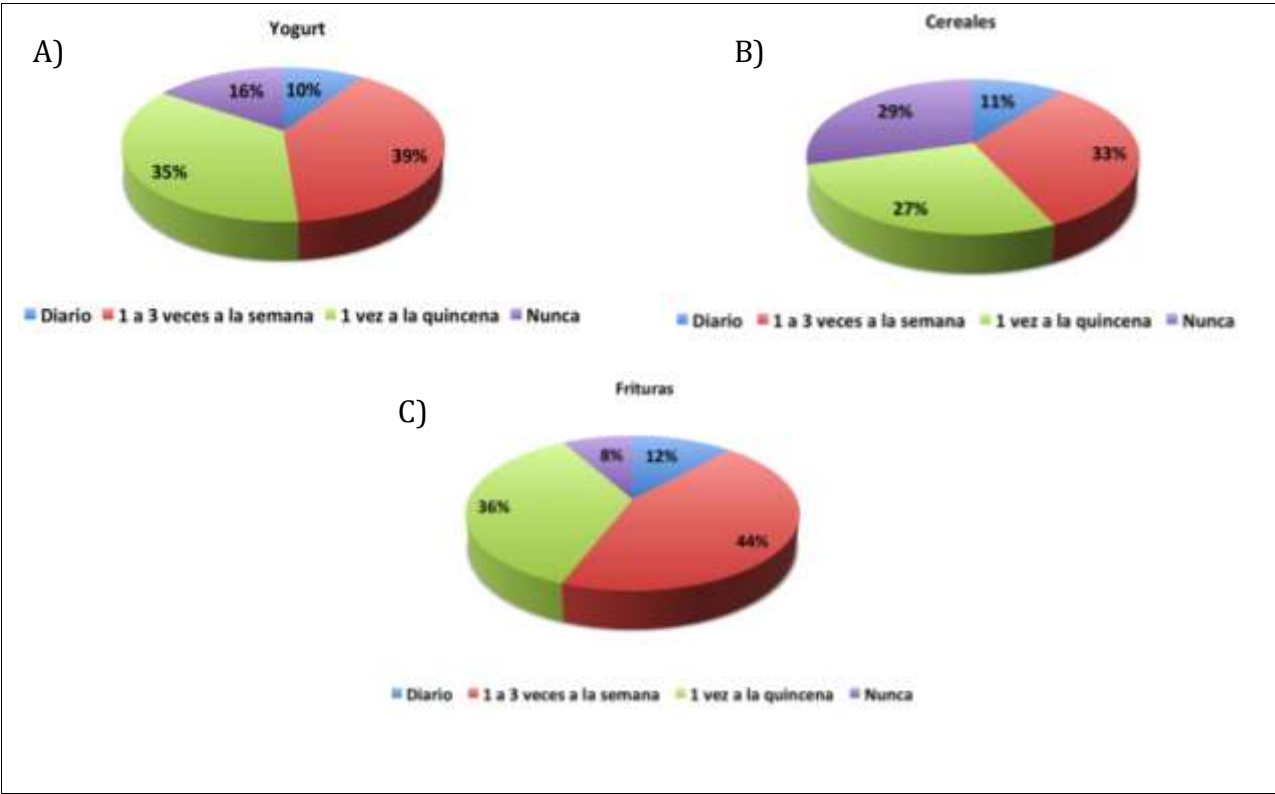


Fig.8 Distribución del consumo de alimentos con una alta frecuencia

A) Cereales, B) Frituras, C)Yogurt.

Resulta interesante el consumo en forma conjunta de los alimentos de cereales, frituras y yogurt, como se observa en la tabla 5, 33 niños consumen de 1 a 3 veces a la semana tanto yogurt como cereales, esto nos refiere un consumo frecuente de dos productos con colorante rojo 40, al igual que en la tabla 6 el consumo de yogurt y frituras de 1 a 3 veces a la semana el cual fue de 32 de los 197 encuestados.

Tabla 5. Distribución conjunta de consumo de yogurt y cereales

		Yogurt				
		Diario	1 a 3 veces a la semana	Una vez a la quincena	Nunca	Totales
Cereales	Diario	6	11	4	0	21
	1 a 3 veces a la semana	7	33	19	5	64
	Una vez a la quincena	2	16	27	9	54
	Nunca	4	17	20	17	58
	Totales	19	77	70	31	197

Tabla 6. Distribución conjunta de consumo de yogurt y frituras

		Yogurt				
		Diario	1 a 3 veces a la semana	Una vez a la quincena	Nunca	Totales
Frituras	Diario	4	11	4	4	23
	1 a 3 veces a la semana	10	32	31	14	87
	Una vez a la quincena	4	30	25	12	71
	Nunca	1	4	10	1	16
	Totales	19	77	70	31	197

La exposición de alimentos, es una parte de las técnicas de venta directa de un establecimiento comercial que expone sus productos para el consumo, en este sentido no se han realizado estimaciones de la exposición completa de todos los alimentos con colorantes alimentarios artificiales, en los Estados Unidos se discutieron los niveles de colorantes en bebidas y en alimentos comúnmente consumidos por niños, siendo las bebidas la más consumidas (Stevens et al., 2013). En Italia se estimó la exposición de el rojo 40 del consumo de refrescos rojos y a base de jugo rojo por varias poblaciones, la exposición más alta se encontró en una bebida a base de jugo de “salud” (Fallico et al., 2011).

Respecto a poblaciones de niños de 2 a 5 años y adolescentes de 13 a 18 años, la exposición de alimentos con rojo 40 como: cereal para el desayuno, jugos, gaseosas y postres lácteos congelados, fueron las principales categorías de alimentos, en un estudio de 600 alimentos analizados en los Estados unidos (Doell et al., 2016). Dichos resultados se asemejan con lo hallado en este estudio donde niños de 10 a 13 años tienen una exposición e ingesta frecuente con un consumo diario de alimentos con colorante rojo 40 como son cereal, yogurt y frituras, siendo importante también el consumo de bebidas como son refresco de 1 a 3 veces a la semana, agua de sabor con porcentajes significativos de 29% y 21%.

8.6 Aislamiento e identificación de enterobacterias

Se aislaron 4 géneros bacterianos en las diversas muestras de coprocultivo proporcionadas, identificadas a partir de pruebas bioquímicas y confirmadas por Api E20: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Pantoea Sp.*, tabla 7.

Tabla 7. Resultado de las pruebas bioquímicas de las colonias aisladas.

Pruebas bioquímicas									
	I	RM	VP	CIT	TSI	LIA	OR	MOV	Genero
Col 1*	+	+	-	-	-	+	+	+	<i>Escherichia coli</i>
Col 2	-	+	-	+	+	+	+	+	<i>Salmonella</i>
Col 3	+	+	-	+	-	-	+	+	<i>Citrobacter</i>
Col 4	-	+	-	+	+	+	+	+	<i>Pantoea sp</i>

* Colonias identificas de las muestras de copro

La microbiota que se encuentra en el intestino del ser humano, alberga al menos 10^{14} microorganismos distribuidos aproximadamente 1,100 especies, éstas difieren en si por la respuesta a la tinción de Gram, la actividad fermentativa, la capacidad de utilizar el oxígeno, la distribución topográfica en el tracto gastrointestinal, y la familia de pertenencia. Los cambios en los estilos dietéticos y alimentarios de cada individuo, provocan cambios profundos en la composición bacteriana de la biota intestinal (Ochoa, 2013). Se producen compuestos específicos que se originan a partir de reacciones de biotransformación o biosíntesis, que pueden afectar la salud del consumidor en esta interacción en la dieta, (Van Hylckama Vlieg et al., 2011).

La ingesta frecuente de alimentos procesados con colorantes azo, predispone a que la microbiota intestinal pueda degradar este compuesto, en la bioreducción de colorantes azo pueden formarse compuestos que son más tóxicos que la molécula del propio colorante, por lo tanto la azoreducción puede aumentar los efectos tóxicos o carcinogénicos de los colorantes azo, después de la ingesta, las azoreductasas de las bacterias del colon rompen los enlaces azo liberando estas moléculas (Chen, 2006).



Hoy en día existen una variedad de bacterias que pueden degradar colorantes azo: *EC3 Enterobacter sp*, (Wang, et al., 2009); *Pseudomonas sp* (Lin et al., 2010); *Serratia sp*, *Yersinias sp*, *Erwinea sp*, *Enterobacter sp*, (Jirasripongpun et al., 2007); *Streptococcus faecalis*, *Eschericia coli* (Oranusi y Njoku, 2006); *E. Coli* (Chang, et al., 2004); *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp*, (Isik y Sponza, 2003). Para nuestro estudio se aislaron bacterias de la microbiota intestinal del género *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Pantoea Sp*.





8.7 Interacción del colorante rojo 40 con las cepas de estudio a 30 ppm.

Las cepas aisladas e identificadas de la microbiota intestinal de los niños se activaron para la interacción con el colorante a 30 ppm. Se presentan 6 ensayos en los que se obtuvo la máxima remoción del colorante, en cada uno se registra el número de muestra y la cepa con la que se realizó la interacción, en general fueron dos cepas por cada muestra de copro excepto con la muestra 1 que solo se pudo aislar e identificar una cepa, además se presenta una foto representativa del ensayo donde se apreció la decoloración en contraste con el tubo control como se presenta en la tabla 8.

El ensayo 1 se trabajó con una cepa de *E. coli* de la muestra biológica del primer niño que proporcionó el copro; el ensayo 2 se trabajó con una cepa de *Salmonella* de la muestra 3 y diferentes cepas de *E. coli* de la muestra 2 y 3; para el ensayo 3 se tomó una cepa *Pantoea* y cepas de *E.coli* de las muestras 4 y 5; el ensayo 4 se tomó de la muestras 6,7 y 8 cepas de *E.coli* y para la muestra 9 se trabaja con una cepa de *Salmonella*; en el caso del ensayo 5 fue una cepa de *Citrobacter* con cepas de *E.coli* respectivamente de las muestras 9,10,11 y 12; y en el ensayo 6 las cepas fueron *Salmonella* y *E.coli* de las muestras 11 y 12.

Tabla 8. Ensayos de interacción con el colorante y las cepas de aisladas de infantes

Ensayos	Muestras	Cepas	Foto representativa de una interacción
1	*M1	<i>E.coli</i>	
2	M2	<i>Salmonella</i>	
		<i>E.coli</i>	
	M3	<i>E.coli A</i>	
		<i>E.coli B</i>	

3	M4	<i>E. coli</i>	
		<i>Pantoea</i>	
	M5	<i>E.coli A</i>	
		<i>E.coli B</i>	
4	M6	<i>E.coli</i>	
	M7	<i>E.coli</i>	
	M8	<i>E.coli</i>	
	M9	<i>Salmonella</i>	
5	M9	<i>E.coli</i>	
	M10	<i>E.coli</i>	
		<i>Citrobacter</i>	
	M11	<i>E.coli</i>	
M12	<i>E.coli</i>		
6	M11	<i>E.coli</i>	
	M12	<i>Salmonella</i>	

*Número de muestra de copro de cada niño.

Actualmente se ha prestado más atención a la toxicidad de los aditivos en alimentos desde enero de 2009, hay una evaluación constante y sobre todo en colorantes alimentarios sintéticos dentro de los cuales está el rojo 40 (Amchova, et al., 2015). La EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) ha reevaluado los tintes sintéticos desde 2008 y ha revisado la IDA (ingesta diaria admitida), en 2010 el panel concluye que es poco probable que el consumo de los colorantes alimentarios bajo consideración, ya sea individualmente o en combinación, provoque reacciones en la salud en humanos, en los niveles actuales de uso (EFSA, 2010) y en 2015 se reporta que 51 categorías de alimentos en las que el rojo 40 se puede utilizar como aditivo alimentario,

nuevamente hay una solicitud de reevaluación de este aditivo (EFSA, 2015), por lo tanto sigue vigente la IDA de 0.7 mg/kg.

El Codex Alimentarius (Normas Alimentarias que tiene por objeto proteger la salud de los consumidores y asegurar practicas equitativas en el comercio de alimentos) también establece como válida esta IDA y las dosis permitidas en la elaboración de alimentos con el colorante rojo 40 que son de 50 a 300 ppm (Alimentarius, 2015), sin embargo, se deben realizar estudios para evaluar la ingesta de colorantes artificiales sintéticos en la dieta total de los niños para reconsiderar estas dosis.

El Codex Alimentarius es la Secretaría de Economía a través de la Dirección General de Normas la COFEPRIS en México, la cual no ha emitido alguna modificación acerca de las dosis permitidas, para este estudio el colorante se utilizó a 30 ppm, es importante observar que en los ensayos existe disminución de color en los tubos.

8.8 Remoción del colorante rojo 40

Para la obtención de los porcentajes de remoción se realizaron las mediciones de las absorbancias, como se indicó en la metodología, en la tabla 9 se muestran las absorbancias promedio de la interacción de las bacterias con el colorante a 30 ppm, cada 24 h durante los 10 días del ensayo, medidas a 504.3 nm de longitud de onda, se presentan las muestras en donde hay alguna diferencia significativa de decremento de absorbancias, no se reportaron las absorbancias que estuvieron por debajo de 0.149.

Las absorbancias iniciales en comparación con las finales, decrecen en 0.149 de absorbancia promedio, siendo evidente que en la muestra 11 con una cepa de *E.coli* su absorbancia inicial fue de 0.475 y la absorbancia final fue de 0.192, obteniendo el mayor decremento 0.283 de absorbancia, inició con 0.475 y después de 24 h solo disminuye un 0.030 quedando con 0.445, el día 5 disminuye en un 0.213, y quedando en 0.262, la mayor disminución con respecto a la absorbancia inicial fue el último día. El resto de las cepas demostraron un comportamiento similar en las absorbancias presentando algunos días un incremento y decremento en las absorbancias como consecuencia de la interacción con el rojo 40.

Tabla 9. Absorbancias registradas durante la interacción con el colorante a 30ppm

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
*M2	0.439	0.421	0.403	0.389	0.377	0.399	0.338	0.344	0.33	0.353
M3	0.458	0.448	0.414	0.423	0.395	0.365	0.37	0.327	0.351	0.347
M5	0.483	0.477	0.436	0.44	0.432	0.422	0.381	0.366	0.331	0.33
M10	0.485	0.48	0.43	0.38	0.36	0.361	0.323	0.363	0.358	0.356
M11	0.475	0.445	0.4	0.356	0.301	0.262	0.199	0.206	0.205	0.192
M12	0.48	0.45	0.373	0.396	0.369	0.353	0.347	0.358	0.347	0.348

*Número de muestra de copro de cada niño.

Se llevó a cabo el cálculo del porcentaje de remoción siguiendo la ecuación recomendada en la metodología, se presentan en la tabla 10 las mediciones de los porcentajes de remoción a 30 ppm más altos con cepas de: *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Citrobacter*, que van desde un 28.08% hasta un 60.57% de remoción, esta última cifra que pertenece a la muestra número once que tuvo el mayor porcentaje de remoción con una cepa *Escherichia coli*, como es apreciable la Fig.9 e) la disminución del color en comparación con las otras muestras, las mediciones de porcentajes del resto de las muestras fueron menores del 28%.

Escherichia coli fue la que obtuvo porcentajes más altos con 60.57 de la muestra 11, 33.01 de la muestra 12, 30.42 de la muestra 3, enseguida *Salmonella* de la muestra dos con 29.78 y por ultimo *Citrobacter* con 28.08.

Tabla 10. Absorbancias y porcentajes de remoción más altos de las muestras obtenidas

Muestra	Enterobacteria	Absorbancia (30 ppm)	% de remoción a 30 ppm
*M2	<i>Salmonella</i>	0.33	29.78%
M3	<i>Escherichia coli</i>	0.327	30.42%
M5	<i>Escherichia coli</i>	0.331	29.57%
M10	Citrobacter	0.356	28.08%
M11	<i>Escherichia coli</i>	0.192	60.57%
M12	<i>Escherichia coli</i>	0.347	33.01%

*Número de muestra de copro de cada niño

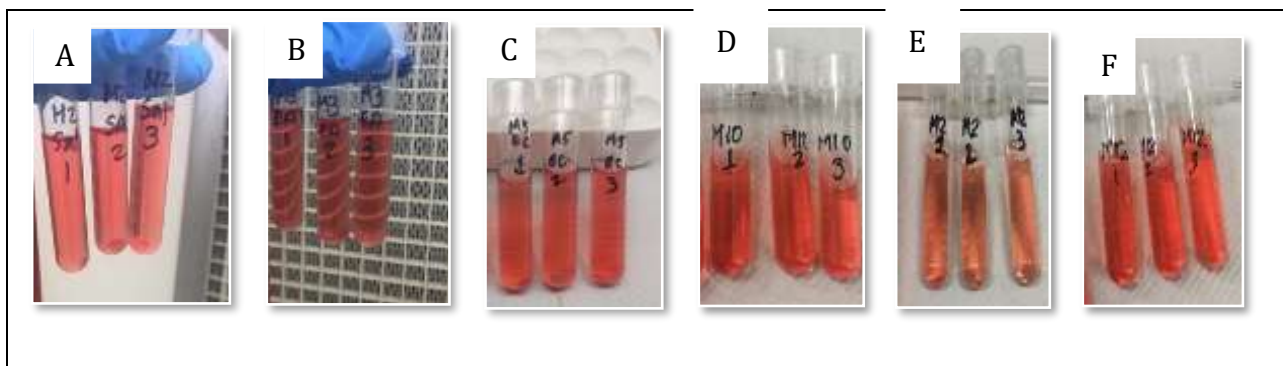


Fig. 9 Remoción del colorante rojo 40 con diferentes cepas bacterianas obtenidas apartir de infantes: A) Muestra 2, B) Muestra 3, C) Muestra 5, D) Muestra 10, E) Muestra 11, F) Muestra 12

Se puede apreciar en la Fig. 10 la comparación de los porcentajes de remoción del rojo 40 a través de los días de interacción con las bacterias del estudio. *Escherichia coli* de la muestra 11 obtuvo su mayor porcentaje de remoción en el día siete alrededor de un 60%, se presentan algunos patrones en el comportamiento de los porcentajes con algunas bacterias como: las muestras 3,5,12 que son cepas de *E.coli* en un inicio hay aumento de porcentajes de remoción hasta el 3er día, en el día 4 decrecen, los días posteriores incrementan el porcentaje de remoción, alcanzados en los días 8 y 9.

Salmonella de la muestra 2 va incrementando la remoción del colorante hasta el día 5 alcanzando alrededor del 20%, en el día 6 tiene una disminución el cual recupera en el 7° día alcanzando su mayor porcentaje el día 9. El caso de la muestra 10 con una cepa de *Citrobacter* el 10° día obtuvo su máximo porcentaje de mejor remoción.

La cepa de *E.coli* de la muestra 11 va incrementando su porcentaje de remoción desde el primer día, al llegar al día 7 alcanza alrededor de un 58% terminando con un 60.57% en el día 10.

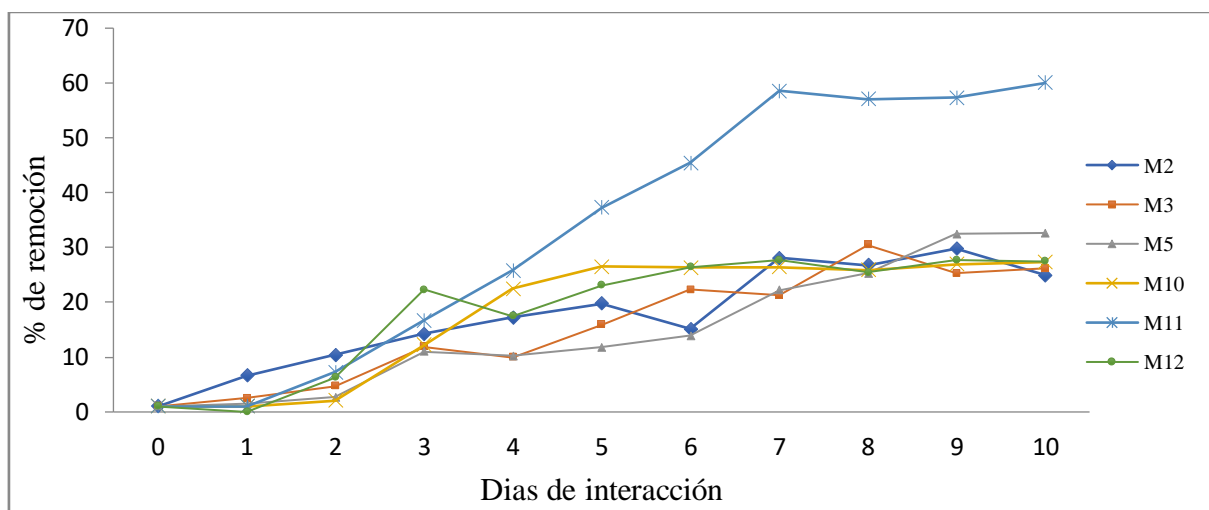


Fig. 10 Comparación de los porcentajes de remoción del rojo 40 por la diferentes cepas de estudio.

Muchos microorganismos pueden decolorar los colorantes azoicos, aeróbica y anaeróbicamente, la degradación del ácido azoico generalmente se da en dos pasos: la decoloración del colorante azoico mediante la reducción de los enlaces azoicos y la degradación de los metabolitos del colorante o aminas aromáticas, las bacterias pueden decolorar el tinte en reducción, ya sea por el transporte de electrones de las vías metabólicas celulares de flavinas o quininas y por azoreductasas, el mecanismo de decoloración de *Enterobacter sp* implicó la adsorción del colorante y la reducción del colorante en C.I: Reactive Red 195, quitando el tinte hasta un 90%, en el plazo de 2 días de incubación como reportó Jirasripongpun et al., (2007)

Uno de los estudios en donde realizaron una biodegradación del colorante rojo 40 a 10 ppm bajo condiciones aeróbicas con la bacteria *Ochrobactrum anthropi* la cual degradó el colorante un 95% (Kale et al, 2014),). El reporte de Oforka y Oranusi (2004) nos habla de la degradación del colorante Ponceau 4R y Carmoisine por *Escherichia coli* aislada de la microbiota intestinal humana, también Oranusi investigó la biotransformación por *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, los resultados se atribuyeron a los organismos sobre el potencial de decoloración después de cinco días de incubación en un 60.38% (Oranusi y Njoku, 2006), Nakanishi (2011) afirma que *E.coli DH5-Alpha* y E234859 enteropatógena decoloró a 75.70% y 84.29% a concentraciones de 30 y 50 ppm es capaz de degradar al rojo 40 indicando la presencia de enzimas azoreductasas, otro estudio reporta que *Escherichia coli* no patógena *DH5-Alpha* sometida a 30 ppm decoloró un 83.40% (Sánchez, 2015). Para nuestro estudio la remoción del colorante alcanzó un 60% con una cepa de *E.coli* a 30 ppm con bacterias de la microbiota intestinal de los infantes.

8.9 Impacto en la salud humana por el consumo de alimentos procesados.

De acuerdo con la información difundida de la Encuesta Nacional de Nutrición (ENN) de 1999 realizada por el Instituto Nacional de Salud Pública, en México los niños de 5 a 11 años tienen problemas de mala nutrición tanto por deficiencia como por exceso de alimentos, dentro de los 20 productos de mayor frecuencia de gasto en hogares, se encuentra en 4º lugar los refrescos y en el 9º lugar el pan dulce (Martínez y Villezca, 2003), esto nos da una perspectiva del tipo de alimentación donde parte del gasto familiar se designa a productos con aditivos alimentarios. En un reporte de inseguridad alimentaria en México en los productos de alta densidad energética (refrescos, jugos industrializados, pastelillos, cereales endulzados y antojitos) aparecen dentro de la frecuencia de compra semanal de los 12 grupos de alimentos que más gasta la población mexicana (Vega et al. 2014)

En las últimas décadas se incrementan los estudios sobre el riesgo que tienen los niños en: reacciones alérgicas, efectos conductuales y neurocognitivos (Martins et al., 2016); así como al consumo y la disponibilidad que se tiene de productos procesados con colores alimentarios sintéticos, Batada y Jacobson (2016) concluye que E.U. es difícil comprar productos sin colores alimentarios sintéticos ya que 4 de 10 alimentos los contienen.

Otro aspecto importante es la microbiota intestinal y su amplia gama de moléculas activas para la salud, la dieta y los alimentos son básicos en la actividad de la microbiota intestinal, sin embargo, bacterias entericas degradan a colorantes alimentarios tipo azo anteriormente mencionadas, en el estado de Puebla México, se tiene un estudio el cual que cepas de microbiota intestinal, aisladas de un niño son capaces de degradar el colorante rojo 40 probablemente a través de mecanismos de azo-reductasas, produciendo sustancias que son perjudiciales para la salud. (Chavez, 2016).

La adopción de estrategias educativas, en la reducción en consumo de alimentos con colorantes artificiales sintéticos para incentivar a una dieta sana y equilibrada, en pro de una buena salud, es más complejo de lo que se piensa, se requiere de un enfoque multidisciplinario para la

comprensión desde los mecanismos de los microorganismos, el cuerpo humano la salud y la sociedad en sus procesos alimentarios.

IX. CONCLUSIONES

- Los alimentos procesados que se registraron con rojo 40 fueron: bebidas, lácteos, confitería, productos para elaborar comida y otros, dichos productos se encuentran en lugares de expendio como en escuelas y hogares, lugares donde los niños adquieren su principal fuente de consumo.
- Se logró diseñar y validar el constructo que determina la frecuencia de consumo de alimentos con rojo 40 que tienen los niños; el valor de fiabilidad y constancia interna de 0.85 del índice del alfa Cronbach.
- La población estudiada consume alimentos procesados con rojo 40 diariamente y de una a tres veces a la semana generando una alta ingesta de estos alimentos.
- Los cereales, yogurt y frituras son los productos alimentarios con rojo 40 que más consume los niños, siendo las frituras las más consumidas.
- Todas las cepas obtenidas de la muestras de los niños con una ingesta alta de alimentos con rojo 40 fueron capaz de remover el colorante, en un intervalo de 28.08% hasta un 60.57%.

X. PERSPECTIVAS

- Realizar una investigación estadística inferencial en donde se aplique un muestreo en las diferentes tiendas de autoservicio, tiendas de abarrotes que ofrecen productos procesados con rojo 40 en la Ciudad de Puebla, debido que en este estudio se reporta los alimentos procesados con rojo 40 en una población finita a los que niños están expuestos.
- La utilización del constructo validado en este trabajo es esencial en futuras evaluaciones para determinar la frecuencia de consumo de alimentos con rojo 40 no solo en niños de 10 a 13 años sino en cualquier otro rango de edad, este instrumento es la pauta para el diseño de otros instrumentos.
- Determinar las concentraciones del colorante presente en los alimentos que fueron identificados en este trabajo, los cuales tienen una frecuencia alta de consumo por los infantes, con el fin de saber si cumplen con las normas establecidas.
- Proponer campañas educativas en donde se establezca los riesgos en la salud por el consumo frecuente de alimentos con el colorante alimenticio como el rojo 40.
- Determinar si las enterobacterias de la microbiota intestinal degradan el colorante rojo 40 generando metabolitos secundarios como aminas aromáticas, dichos metabolitos podrían estar implicados en la salud del consumidor.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, S. U., Badaruddin, M., Sayeed, S. A., Ali, R., Riaz, M. N. (2008). Binding ability of Allura Red with food proteins and its impact on protein digestibility. *Food Chemistry*, 110(3), 605-610.
- Ahued, M. G. (2014). Análisis sensorial de alimentos. *PÄDI Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 2(3).
- Alimentarius, C. (2015). Codex Stan 192, 1995. Norme Générale Codex pour les additifs alimentaires.
- Alonso, J. A. G., Santacruz, M. P. (2015). Cálculo e interpretación del Alfa de Cronbach para el caso de validación de la consistencia interna de un cuestionario, con dos posibles escalas tipo Likert. *Revista Publicando*, 2(2), 62-77.
- Álvarez-Hernández, G., Delgado-de la Mora, J. (2015). Diseño de Estudios Epidemiológicos. I. El Estudio Transversal: Tomando una Fotografía de la Salud y la Enfermedad. *Boletín Clínico Hospital Infantil del Estado de Sonora*, 32(1), 26-34
- Amchova, P., Kotolova, H., Ruda-Kucerova, J. (2015). Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73(3), 914-922.
- Arencibia, D., Rosario, L., y Gámez, R. (2008). Métodos generales de conservación de microorganismos. La Habana, Cuba: Finlay.
- Arribas, M. (2004). Diseño y validación de cuestionarios. *Matronas Profesión*, 5(17), 23-29.
- Ashfaq, N., Masud, T. (2002). Surveillance on artificial colours in different ready to eat foods. *Pakistan J Nutr*, 5, 223-225.
- Astiasarán, I. (2003). Alimentos y nutrición en la práctica sanitaria. Ediciones Díaz de Santos.
- Batada, A., Jacobson, M. F. (2016). Prevalence of artificial food colors in grocery store products marketed to children. *Clinical Pediatrics*, 55(12), 1113-1119.
- Berzas, Juan (2005). ¿Conocemos los aditivos alimentarios que ingieren los niños en la calle?, Universidad de Castilla-La Mancha.
- Brohm, K., Frohwein, E. (1937). Nachweis von durch Säuerungentfarbten künstlichen Eigelbfrabststoffen in Milchspeiseeis. *Zbl. Lebensmitt. Forsch*, 73: 30.
- Calvillo, Alejandro (2012) El ambiente obesigénico escolar, El poder del consumidor. IFAI. Mexico.
- Cabada, X. (2010). Impacto de la presencia de comida chatarra en los hábitos alimenticios de niños y adolescentes en comunidades indígenas-campesinas de la región Centro-Montaña Guerrero. *El Poder del Consumidor*, 43
- Chang, J. S., Chen, B. Y., Lin, Y. S. (2004). Stimulation of bacterial decolorization of an azo dye by extracellular metabolites from *Escherichia coli* strain NO3. *Bioresource Technology*, 91(3), 243-248
- Chavez-Bravo, E., Alonso-Calderon, A. I. A., Sanchez-Calvario, L., Castaneda-Roldan, E., Robles, E. V., Salazar-Robles, G. (2016). Characterization of the degradation products from

the red dye 40 by enterobacteria. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(4), 2569-2576.

- Chen, H. (2006). Recent advances in azo dye degrading enzyme research. *Current Protein and Peptide Science*, 7(2), 101-111.
- ChertoviskI, Salomon. (2012). Acuerdo por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios,. México: Diario Oficial.
- Chung KT, Stevens SE Jr, Cerniglia CE. (1992). The reduction of azo dyes by the intestinal microflora. *Critical Reviews of Microbiology*. 18(3).175-190.
- Connolly, A., Hearty, A., Nugent, A., Mckevitt, A., Boylan, E., Flynn, A., 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.
- Corral de Franco, Y. J. (2009). Validez y confiabilidad de los instrumentos de investigación para la recolección de datos.
- Cronbach, L. J., Shavelson, R. J. (2004). My current thoughts on coefficient alpha and successor procedures. *Educational and Psychological Measurement*, 64(3), 391-418.
- De Omena Messias, C. M. B., dos Santos Souza, H. M., Reis, I. R. M. S. (2016). Consumo de alimentos ultraprocesados e corantes alimentares por adolescentes de uma escola pública. *Adolescencia e Saude*, 13(4), 7-14.
- Diouf, F., Berg, K., Ptok, S., Lindtner, O., Heinemeyer, G., Hesecker, H. (2014). German database on the occurrence of food additives: application for intake estimation of five food colours for toddlers and children. *Food Additives Contaminants: Part A*, 31(2), 197-206.
- Dixit, S., Purshottam, S. K., Khanna, S. K., Das, M. (2011). Usage pattern of synthetic food colours in different states of India and exposure assessment through commodities preferentially consumed by children. *Food Additives Contaminants: Part A*, 28(8), 996-1005.
- Doell, D. L., Folmer, D. E., Lee, H. S., Butts, K. M., Carberry, S. E. (2016). Exposure estimate for FDC colour additives for the US population. *Food Additives Contaminants: Part A*, 33(5), 782-797.
- Domínguez Gómez, J. A., Aledo Tur, A. (2001). *Sociología ambiental*. Grupo Editorial Universitario.
- Dos Santos, A. B., F. J. Cervantes, and J. B. Van Lier. (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Biores. Technology*, 2369–2385.
- Efsa European Food Safety Authority. (2015). Refined exposure assessment for Allura Red AC (E 129). *EFSA Journal*, 13(2), 4007.,2015.Reevaluacion de R-40
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2010). Scientific Opinion on the appropriateness of the food azo-colours Tartrazine (E 102), Sunset Yellow FCF (E 110), Carmoisine (E 122), Amaranth (E 123), Ponceau 4R (E 124), Allura Red AC (E 129), Brilliant Black BN (E 151), Brown FK (E 154), Brown HT (E 155) and Litholrubine BK (E 180) for inclusion in the list of food ingredients set up in Annex IIIa of Directive 2000/13/EC. *EFSA Journal*, 8(10), 1778.
- EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food. (2009). Scientific Opinion on the re-evaluation of Allura Red AC (E 129) as a food additive. *EFSA Journal*, 7(11), 1327
- Elbanna, K., Hassan, G., Khider, M., Mandour, R. (2010). Safe Biodegradation of Textile Azo Dyes by Newly Isolated Lactic Acid Bacteria and Detection of Plasmids Associated With Degradation. *J Bioremed Biodegrad* 1: 112. doi: 10.4172/2155-6199.100011 2

- Elhkim, M. O., Héraud, F., Bemrah, N., Gauchard, F., Lorino, T., Lambré, C., Poul, J. M. (2007). New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine: an update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 47(3), 308-316.
- Fallico, B., Chiappara, E., Arena, E., Ballistreri, G. (2011). Assessment of the exposure to Allura Red colour from the consumption of red juice-based and red soft drinks in Italy. *Food Additives Contaminants: Part A*, 28(11), 1501-1515.
- FAO. (2011). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación. Ahorrar para crecer: Guía para los responsables de políticas de intensificación sostenible de producción de cultivos por pequeños agricultores. Roma.
- Feng, J., Cerniglia, C. E., y Chen, H. (2012). Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 4, 568.
- Feng, J., M Heinze, T., Xu, H., E Cerniglia, C., Chen, H. (2010). Evidence for significantly enhancing reduction of Azo dyes in *Escherichia coli* by expressed cytoplasmic Azoreductase (AzoA) of *Enterococcus faecalis*. *Protein and peptide letters*, 17(5), 578-584.
- Frazier, T. H., DiBaise, J. K., y McClain, C. J. (2011). Gut microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 14S-20S.
- FSANZ, Food Standards Australia New Zealand. Survey of added colours in foods available in Australia. 2008. Available from: <http://www.foodstandards.gov.au/science/surveillance/pages/surveyofaddedcolours5519.aspx>
- García, A. P., Rodríguez, F. M. (2010). Enterobacterias. *Medicine: Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(51), 3426-3431.
- Giglio Norberto D., Burgosb Fernando y Cavagnari Brian (2013). Microbiota intestinal: sus repercusiones clínicas en el cuerpo humano. *Arch Argent Pediatr*;111(6):523-527.
- Golka, K.; Kopps, S.; Myslak, Z.W. (2004). Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability – a Review. *Toxicology Letters*.151 (1): 203- 210
- Gupta, V.K., Suhas. (2009). Application of low-cost adsorbents for dye removal a review. *En: Journal of environmental management*. 90(8):2313-2342.
- Ha, M. S., Ha, S. D., Choi, S. H., y Bae, D. H. (2013). Exposure assessment of synthetic colours approved in Korea. *Food Additives Contaminants: Part A*, 30(4), 643-653.
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., Baptista Lucio, P. (2006). *Metodología de la investigación (Vol. 3)*. México: McGraw-Hill.
- HLPE, High Level Panel of Experts (2012). *Laseguridad alimentaria y el cambio climático*. Roma, Italia. <http://www.fao.org/3/a-me421s.pdf>
- Hooper, L. V., y Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292(5519), 1115-1118.
- Hooper, L. V., y Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 159.
- Hu, T.L. (1994). Decolourization of reactive azo dyes by transformation with *Pseudomonas Luteola*. *Bioresource Technology*, 49 (1): 47-51.
- Husain, A., Sawaya, W., Al-Omar, A., Al-Zenki, S., Al-Amiri, H., Ahmed, N., Al-Sinan, M. (2006). Estimates of dietary exposure of children to artificial food colours in Kuwait. *Food additives and contaminants*, 23(3), 245-251.
- Icaza-Chávez, M. E. (2013). Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Revista de Gastroenterología de México*, 78(4), 240-248.


- Işık, M., Sponza, D. T. (2003). Effect of oxygen on decolorization of azo dyes by *Escherichia coli* and *Pseudomonas* sp. and fate of aromatic amines. *Process Biochemistry*, 38(8), 1183-1192.
- Jiménez, J. L. G., Palanca, M. A., García, D. B., de Luján, S. H. (2008). Aditivos alimentarios: los grandes desconocidos. *Distribución y consumo*, 18(102), 80-86.
- Jirasripongpun, K., Nasanit, R., Niruntasook, J., Chotikasatian, B. (2007). Decolorization and Degradation of CI Reactive Red 195 by *Enterobacter* sp. *Thammasat Int. J. Sc. Tech*, 12(4), 6-11.
- Kale, R. V., Thorat, P. R. (2014). Biodegradation of Allura Red AC (ARAC) by *Ochrobactrum anthropi* HAR08, isolated from textile dye contaminated soil. *International Journal*, 2(9), 432-441.
- Kandelbaur A, Guebitz GM. (2005). Bioremediation for the decolorization of textile dyes - a review. En: *Environmental Chemistry Springer Berlin Heidelberg*, 269- 288.
- Kobylewski, S., Jacobson, M. F. (2010). Food dyes: A rainbow of risks. Center for Science in the Public Interest. USA
- Lin, J., Zhang, X., Li, Z., Lei, L. (2010). Biodegradation of Reactive blue 13 in a two-stage anaerobic/aerobic fluidized beds system with a *Pseudomonas* sp. isolate. *Bioresource technology*, 101(1), 34-40.
- Martínez, I., Villezca, P. (2003). La alimentación en México: un estudio a partir de la Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares. *Revista de información y análisis*, 21(2000), 26-37.
- Martins, N., Roriz, C. L., Morales, P., Barros, L., Ferreira, I. C. (2016). Food colorants: Challenges, opportunities and current desires of agro-industries to ensure consumer expectations and regulatory practices. *Trends in Food Science Technology*, 52, 1-15.
- McCann, D., Barrett, A., Cooper, A., Crumpler, D., Dalen, L., Grimshaw, K., Sonuga-Barke, E. (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.
- McMullan, G., Meehan, C., Conneely, A., Kirby, N., Robinson, T., Nigam, P., Smyth, W. F. (2001). Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(1-2), 81-87
- Nakanishi, M., Yatome, C., Ishida, N., Kitade, Y. (2001). Putative ACP phosphodiesterase gene (*acpD*) encodes an azoreductase. *Journal of Biological Chemistry*.
- Ochoa, C. (2013). La biota intestinal, el metabolismo energético, y la Diabetes mellitus. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 23(1), 113-129.
- Oforika, N. C., Oranusi, N. A. (2004). Decolourisation of azo-based food colouran (carmoisine and ponceau 4r) by *Escherichia coli*. *African Journal of Applied Zoology and Environmental Biology*, 6(1).
- Oranusi, N. A., Njoku, H. O. (2006). Biotransformation of Food Dyes by Human Intestinal Bacteria (*Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*). *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 10(2).
- Orn A, Bruce P, Lauren S, Ingar O Floyd, E. (2005). Dewhirst Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity *Journal of clinical microbiology*, 5721–5732.
- Ospina Rave, B. E., Sandoval, J. D. J., Aristizábal Botero, C. A., Ramírez Gómez, M. C. (2005). La escala de Likert en la valoración de los conocimientos y las actitudes de los profesionales de enfermería en el cuidado de la salud. *Antioquia*, 2003.

- Prats, G. (2005). *Microbiología Clínica*. Buenos aires: Panamericana.
- Rau J, Knackmuss HJ, Stolz A. (2002). Effects of different quinoid redox mediators on the anaerobic reduction of azo dyes by bacteria. *Environ Sci Technol*, 36:1497–1504.
- Russ, R., Rau, J., Stolz, A. (2000). The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1429-1434.
- Sawaya, W., Husain, A., Al-Otaibi, J., Al-Foudari, M., Hajji, A. (2008). Colour additive levels in foodstuffs commonly consumed by children in Kuwait. *Food control*, 19(1), 98-105.
- Sanchez, A. (2015) Degradación del colorante alimenticio (Rojo 40) por Enterobacterias de la microbiota intestinal. Tesis de licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J. S., Govindwar, S. P. (2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(1), 138-157.
- Stevens, L. J., Burgess, J. R., Stochelski, M. A., y Kuczek, T. (2014). Amounts of artificial food colors in commonly consumed beverages and potential behavioral implications for consumption in children. *Clinical pediatrics*, 53(2), 133-140
- Stevens, L. J., Burgess, J. R., Stochelski, M. A., y Kuczek, T. (2015). Amounts of artificial food colors in commonly consumed beverages and potential behavioral implications for consumption in children: revisited. *Clinical pediatrics*, 54(12), 1228-1230.
- Stolz, A. (2001) Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:69-80.
- Toledo, M. C. F., Guerchon, M. S., y Ragazzi, S. (1992). Potential weekly intake of artificial food colours by 3–14-year-old children in Brazil. *Food Additives y Contaminants*, 9(4), 291-301.
- Tsuda, S., Murakami, M., Matsusaka, N., Kano, K., Taniguchi, K., y Sasaki, Y. F. (2001). DNA damage induced by red food dyes orally administered to pregnant and male mice. *Toxicological Sciences*, 61(1), 92-99.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027.
- Van der Zee, F.P., Bisschops, I.A.E., Blanchard, V.G., Bouwman, R.H.M., Lettinga, G., Field, J.A. (2002) Biotic and abiotic processes of azo dye reduction in anaerobic sludge. submitted.
- Van Hylckama Vlieg, J. E., Veiga, P., Zhang, C., Derrien, M., Zhao, L. (2011). Impact of microbial transformation of food on health—from fermented foods to fermentation in the gastro-intestinal tract. *Current opinion in biotechnology*, 22(2), 211-219.
- Vega-Macedo, M., Shamah-Levy, T., Peinador-Roldán, R., Méndez-Gómez Humarán, I., Melgar-Quiñónez, H. (2014). Inseguridad alimentaria y variedad de la alimentación en hogares mexicanos con niños menores de cinco años. *salud pública de méxico*, 56, s21-s30
- Vojdani, A., y Vojdani, C. (2015). Immune reactivity to food coloring. *Alternative Therapies*, 148.
- Yamada, T., y Ishiwata, H. (2000). Daily intake study of food additives by age cohort based on the market basket method. The Japan Food Chemical Research Foundation [online]. Tokyo: The Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare.

- Yuet-Wan Lok, K., Chung, W. Y., Benzie, I. F., y Woo, J. (2010). Colour additives in snack foods consumed by primary school children in Hong Kong. *Food Additives and Contaminants*, 3(3), 148-155.
- Wang, H., Zheng, X. W., Su, J. Q., Tian, Y., Xiong, X. J., Zheng, T. L. (2009). Biological decolorization of the reactive dyes Reactive Black 5 by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. EC3. *Journal of Hazardous Materials*, 171(1-3), 654-659.
- Wang, L., Zhang, G., y Wang, Y. (2014). Binding properties of food colorant allura red with human serum albumin in vitro. *Molecular biology reports*, 41(5), 3381-3391.
- Wilson, B.G., S.L. Bahna (2005). Adverse reactions to food additives, *Ann. Allergy Asthma Immunol*: 95: 499-507.

XII. ANEXOS

Anexo 1.- Permisos otorgados de escuelas primarias para el proyecto.




BUAP

D^{r.} José Ramón Zamora Jiménez
Escuela Primaria
Hacienda de Cueltaco
Clave: 21DPR10000
Presenta:


Le suscribe la D^{a.} en C. Edith Chávez Bravo Profesora Investigadora del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla e integrante de la planta académica del Posgrado en Ciencias Ambientales del ICIAP, para solicitarle de la manera más atenta su apoyo para que la C. **Rebeca Dey Garcia** alumno de posgrado en Ciencias Ambientales, pueda realizar una encuesta dirigida a madres de familia de sexto grado en la escuela que usted dignamente dirige, con la finalidad de conocer la frecuencia de consumo de alimentos procesados en infantes de nivel básico. Dicho tema es de gran importancia a nivel salud poblacional e involucra aspectos socioeconómicos-alimentarios, además forma parte de la tesis de Maestría de la alumna Dey Garcia que se dirigirá con usted.

Sin más por el momento, agradezco de antemano su apoyo y quedo a su disposición para cualquier duda o aclaración a los 16 días de junio de 2017.


Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"



Dra. Edith Chávez Bravo
Profesor-Investigador
Laboratorio de Patogenicidad Microbiana
ICM-ICIAP
Tel 2295500 Ext.2540
echb_02@yahoo.com.mx



C.c.p. Archivo.



2017 JUN 16 10:00 AM
SECRETARÍA DE INVESTIGACIONES Y DESARROLLO TECNOLÓGICO
INSTITUTO DE CIENCIAS AMBIENTALES Y DEL MEDIO AMBIENTE
CALLE 25 DE JUNIO 1000
PUEBLA, PUE.
TEL. 2295500

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICM)

EFICIO ICI.
Calle Universidad
Cd. San Marcos, Puebla, Pue. C.P. 72570
Tel. (229) 229 55 00 Ext. 3021



BUAP

Directora Martha Alejandrina Miranda Sánchez
Escuela Primaria
Emiliano Zapata
Clave: 210PRO198J
Presente:

Le suscribe la D. en C. Edith Chávez Bravo Profesora investigadora del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla e integrante de la planta académica del Posgrado en Ciencias Ambientales del ICUAP, para solicitarle de la manera más atenta su apoyo para que la **C. Rebeca Dey García** alumna de posgrado en Ciencias Ambientales, pueda realizar una encuesta dirigida a madres de familia de sexto grado en la escuela que usted dignamente dirige, con la finalidad de conocer la frecuencia de consumo de alimentos procesados en infantes de nivel básico. Dicho tema es de gran importancia a nivel salud poblacional e involucra aspectos socioeconómicos-alimentarios, además forma parte de la tesis de Maestría de la alumna Dey García quien se dirigirá con usted.

Sin más por el momento, agradezco de antemano su apoyo y quedo a su disposición para cualquier duda o aclaración a los 16 días de junio de 2017.

Atentamente
"Pensar bien, para vivir mejor"

Dra. Edith Chávez Bravo
Profesor-Investigador
Laboratorio de Patogenicidad Microbiana
CICM-ICUAP
Tel 2295500 Ext. 2540
echb_c2@yahoo.com.mx



Recibi original
19-06-17

Directora Tecuila
Martha Alejandrina
Miranda Sánchez



ESTADO LIBRE Y SOBERANO DE PUEBLA
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
DIRECCIÓN DE CALIDAD EDUCATIVA
EJE PRINCIPAL Nº1
"EMILIANO ZAPATA"
C.C.T. DOMINIO
PUEBLA, PUE.

Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

EDS04C11
Ciudad Universitaria
Calle San Mateo, Puebla, Pue. C.P. 72019
01 (222) 229-5500 Ext. 2540