



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR SUCRALOSA EN
Cyprinus carpio Y DETERMINAR SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES
FISICOQUÍMICAS Y TEXTURALES**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

M. en C.Q. KARINNE SAUCEDO VENCE

DIRIGIDA POR:

Dr. OCTAVIO DUBLÁN GARCÍA

Dr. LEOBARDO M. GÓMEZ OLIVÁN

Dra. MARCELA GALAR MARTÍNEZ



TOLUCA, EDO. DE MÉXICO

DICIEMBRE DE 2017

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR SUCRALOSA EN (*Cyprinus carpio*) Y DETERMINAR SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y TEXTURALES

INDICE GENERAL

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. Antecedentes	5
3.1 El agua	5
3.2 Contaminación del agua	5
3.3 Edulcorantes	6
3.3.1 sucralosa	9
3.3.1.3 Metabolismo	10
3.4 EFECTO Y CONTAMINACIÓN POR EDULCORANTES	10
3.5 Ocurrencia	13
3.6 Efectos tóxicos de la sucralosa en diversas especies	14
3.8 Concentración ambiental prevista y Concentración prevista sin efecto	16
3.9 Transformaciones bióticas y abióticas de la sucralosa	16
3.10 <i>Cyprinus carpio</i>	18
3.10.1 Rasgos biológicos	18
3.10.2 Composición nutrimental de la carpa <i>Cyprinus carpio</i>	19
3.11.3 Hábitat y biología	20
3.11.4 Importancia económica de la carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>) en México	22
3.11 Bioindicador	24
3.12 Biomarcadores	24
3.12.1 Clasificación de biomarcadores	25
3.11.3 Biomarcadores de susceptibilidad	25
3.11.4 Biomarcadores de efecto (o respuesta)	25
3.12 Estrés oxidativo	26

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR SUCRALOSA EN (*Cyprinus carpio*) Y DETERMINAR SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y TEXTURALES

3.12.1 Radicales libres	27
3.12.2 Especies reactivas del oxígeno	28
3.12.3 Efecto del estrés oxidativo sobre biomoléculas	29
3.12.4 Antioxidantes	32
4. JUSTIFICACIÓN	42
5. HIPÓTESIS.	43
6. OBJETIVOS	43
7. METODOLOGÍA	44
7.3.1 Determinación del grado de lipoperoxidación	46
7.3.2 Determinación de los niveles de oxidación de proteínas	46
7.3.3 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa	46
7.3.4 Determinación de la actividad de la catalasa	47
7.4 Análisis fisicoquímicos	47
7.4.1 Medición pH	47
7.4.2 Capacidad de retención de agua (CRA)	47
7.4.3 Solubilidad. Método	48
7.4.4 Determinación de grupos disulfuro y sulfhídrido totales	48
7.5 identificación de proteínas	48
7.6 Análisis estadístico	49
8. RESULTADOS	50
8.1 Discusión de resultados	64
9. Conclusión	72
10. Anexos	73
11. Referencias	113

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de edulcorantes	7
Figura 2. Estructura química de sucralosa	9
Figura 3. Rutas de ingreso de edulcorantes artificiales y sus productos de transformación en el ambiente acuático	13
Figura 4. Diferentes rutas de transformación de la sucralosa	18
Figura 5. Producción global de <i>Cyprinus carpio</i>	23
Figura 6. Curva típica de análisis de perfil de textura lograda en máquina Instron	39
Figura 7. Contenido de hidroperóxidos	51
Figura 8. Grado de lipoperoxidación	53
Figura 9. Contenido de proteínas carboniladas	55
Figura 10. Actividad de la Superóxido dismutasa en	57
Figura 11. Actividad de la Catalasa	59
Figura 12. Contenido de grupos sulfhidrilos	60
Figura 13. Determinación de pH	61
Figura 14. Comportamiento de la solubilidad	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los edulcorantes	8
Tabla 2. Composición química de la carpa en 100g de porción comestible	19
Tabla 3. Principales especies de la producción pesquera del Estado de México en 2009	22
Tabla 4. Propiedades funcionales de las proteínas	34
Tabla 5. Análisis de perfil de textura en músculo de <i>Cyprinus carpio</i>	64

ABREVIATURAS

1,5-DCF	1,6-dicloro-1,6-didesoxi-fructosa
4-CG	4-cloro-4-desoxi-galactosa
ACE	Acesulfame
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de Varianza
ATP	Adenosín trifosfato
CAT	Catalasa
CRA	Capacidad de retención de agua
CYC	Ciclamatos
CYP450	Citocromo P450
EAI	Edulcorante de alta intensidad
ERN	Especies reactivas del hidrogeno
EROs	Especies reactivas del oxígeno
HPC	Hidroperóxidos
LPX	Lipooxidación
M	Molaridad
MDA	Malondialdehído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NOEC	Concentración de efecto no observado
PCC	Proteínas carboniladas

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR SUCRALOSA EN (*Cyprinus carpio*) Y DETERMINAR SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y TEXTURALES

PEC	Concentración ambiental prevista
pH	Potencial de hidrogeno
pi	Punto isoeléctrico
PNEC	Concentración prevista sin efecto
RL	Radical libre
SAC	Sacarina
SOD	Superóxido dismutasa
SUC	Sucralosa

1. RESUMEN

La sucralosa es un edulcorante artificial relativamente nuevo y considerado seguro para el consumo humano, sin embargo, los efectos en el ecosistema aún no han sido estudiados a profundidad. Estudios de este tipo de edulcorantes han demostrado que produce estrés oxidativo generando daño a nivel proteico; por lo que el objetivo del presente estudio fue determinar los productos de oxidación mediante el grado lipoperoxidación, contenido de hidroperóxidos y proteínas carboniladas, así como las propiedades fisicoquímicas y texturales en el músculo de *Cyprinus carpio* (carpa común). Los resultados del estudio demostraron que la exposición de la especie a sucralosa (0.05 y 155 µg/L) durante diferentes tiempos (12, 24, 48, 72 y 96 horas) produjo un aumento en el nivel de lipoperoxidación (LPX), el contenido de proteínas carboniladas (PCC) e hidroperóxidos (HPC), asimismo, las enzimas antioxidantes evaluadas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) se modifican significativamente con respecto al control en sangre, hígado, branquias, cerebro y músculo, siendo éste último el que sufre diferentes tipos de alteraciones a causa de la oxidación proteica por la presencia del xenobiótico, causando cambios significativos con respecto al control en pH, acidez, solubilidad, capacidad de retención de agua (CRA) y formación de grupos sulfhidrilo, viéndose afectados también los parámetros de textura, modificando los atributos sensoriales del alimento.

Abstract

Sucralose is a relatively new artificial sweetener and considered safe for human consumption, however, the effects on the ecosystem have not been studied yet in depth. Studies of this type of sweeteners have shown that it produces oxidative stress generating damage at the protein level; therefore, the objective of the present study was to determine the oxidation products through the degree lipoperoxidation the content of hydroperoxides and carbonylated proteins, as well as the physicochemical and textural properties in the muscle of *Cyprinus carpio* (common carp). The results of the study showed that the exposure of the species to sucralose (0.05 and 155 µg / L) during different times (12, 24, 48, 72 and 96 hours) produced an increase in the level of lipoperoxidation (LPX), the content of carbonylated proteins (PCC) and hydroperoxides (HPC), also, antioxidant enzymes evaluated superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) are significantly modified with

respect to the control in blood, liver, gills, brain and muscle, the latter being the that undergoes different types of alterations due to protein oxidation due to the presence of xenibiotic, causing significant changes with respect to the control in pH, acidity, solubility, water holding capacity (WHC) and formation of sulfhydryl groups, being affected also the texture parameters, modifying the sensory attributes of the food.

2. INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes son considerados como aquellos que no están regulados en el medio ambiente (barceló, año), entre los cuales se encuentran: productos farmacéuticos, productos de cuidado personal y aditivos alimentarios, entre ellos los edulcorantes, todos estos, en los últimos años están recibiendo una atención con respecto a su destino ambiental y propiedades toxicológicas (Brooks *et al.*, 2009; Ankley *et al.*, 2007), éstos últimos, llamados edulcorantes artificiales, que son derivados de compuestos naturales (García-Almeida *et al.*, 2013), están considerados como aditivos alimentarios seguros, sin embargo, debido a su persistencia extrema y ubicuidad en los ecosistemas acuáticos, son ahora reconocidos como contaminantes ambientales (Richardson y Ternes, 2011), estos compuestos son resistentes a los procesos de depuración de aguas residuales, ya que se introducen continuamente en los ambientes acuáticos, esto a través de efluentes hospitalarios, industriales y domésticos. Hasta la fecha su comportamiento medioambiental, el destino, así como las contribuciones ecotoxicológicas a largo plazo en recursos hídricos sigue siendo en gran parte desconocido (Ziye *et al.*, 2013), debido a esta exposición constante al medio ambiente, se necesitan estudios ecotoxicológicos para evaluar los riesgos ambientales de estos contaminantes. En algunos estudios (Winter *et al.*, 2009; Huggett *et al.*, 2005.; Huggett *et al.*, 2003), se ha demostrado que algunos de estos contaminantes en los sistemas mamíferos, causan estrés oxidativo, ocasionando daño en diferentes moléculas como lo son proteínas y ADN (Lund, 2011), asimismo, se han realizado estudios con diversos contaminantes como fármacos y metales (Morachis-Valdez *et al.*, 2014; Saucedo-Vence *et al.*, 2014; Islas-Flores *et al.*, 2013) en los que se ha demostrado un daño significativo en diversos órganos como: hígado, branquias, cerebro, sangre y músculo, éste último de importancia nutrimental y tecnológica en la industria alimentaria, y en la actualidad se está estudiando el efecto de algunos edulcorantes como la estevia en especies acuáticas (Sánchez-Aceves *et al.*, 2017).

Los edulcorantes artificiales son utilizados como sustitutos de azúcar en cantidades considerables y cada vez más en los alimentos y bebidas, especialmente para aquellas personas que son diabéticas o padecen obesidad (Weihrauch y Diehl, 2004). Ziye (2013), estudió la presencia de los edulcorantes

artificiales como: acesulfame, ciclamato, sacarina y sucralosa, en un sistema de costa abierta encontrando una concentración de esta última que va de 0.05 a 155 µg/L, observando que la sucralosa es uno de los productos más persistentes a la fotodegradación afectando de esta manera los ecosistemas acuáticos. La presencia y efecto de estos xenobióticos pueden ser evaluados a través de la determinación del estrés oxidativo (Ron van der Oost *et al.*, 2003) mediante la producción de especies reactivas del oxígeno (eros), algunos biomarcadores (contenido de hidroperóxidos y proteínas carboniladas; nivel de lipoperoxidación; enzimas antioxidantes como mecanismo de defensa tales como catalasa y superóxido dismutasa) a nivel bioquímico incluyen estudios en los que el objetivo es evaluar éste estrés a través del daño a moléculas inducido por eros (Barata *et al.*, 2005), asimismo, la evaluación de este efecto a través de la determinación de parámetros fisicoquímicos y texturales del músculo de la especie acuícola, la cual es utilizada como un bioindicador, debido a que son especies sensibles, de fácil contención y son utilizadas para pruebas toxicológicas, además que son de importancia económica y nutrimental.

El efecto tóxico de muchos xenobióticos está mediado por la formación de eros. Un xenobiótico es capaz de inducir estrés oxidativo como resultado de un proceso cíclico de oxidación-reducción en el cual, sufre la reducción por un electrón donado por el NADPH pudiéndolo transformar en una especie reactiva que puede ser un radical libre (Abdollahi *et al.*, 2004). Esta especie reactiva, al intentar recuperar su configuración original, busca transferir o donar su electrón no apareado al oxígeno (O₂). Así el O₂ se reduce transformándose en el anión superóxido (O₂^{•-}) con la consecuente regeneración del componente original. El O₂ reacciona a su vez con otras moléculas o consigo mismo y genera el radical hidróxilo (OH[•]) que mediante una serie de reacciones en cadena y su capacidad de oxidar moléculas puede ocasionar la muerte celular (Livingsnston, 2001). Lund (2011) observó que estos efectos provocan diversas reacciones como la oxidación de grupos sulfhidrilos presentes en las proteínas formando ácido sulfínico, ácido sulfónico, entrecruzamientos de proteína por formación de puentes disulfuro, disminución del pH por concentraciones elevadas de malondialdehído durante el proceso de lipoperoxidación Estévez, (2011), ocasionando una disminución de la capacidad de retención de agua (CRA), causando la insolubilización de la proteína afectando su calidad textural, su uso tecnológico y nutrimental. Por lo que, el objetivo de estudio de este trabajo fue determinar la toxicidad producida por sucralosa usando como bioindicador a

Cyprinus carpio a través de biomarcadores de estrés oxidativo y la determinación de las propiedades físicoquímicas y textuales en el músculo de esta especie.

3. Antecedentes

3.1 El agua

El agua, es un compuesto cuya fórmula química es H₂O, contiene en su molécula un átomo de oxígeno y dos de hidrógeno. A temperatura ambiente es un líquido insípido, inodoro e incoloro. El agua tiene una importancia esencial en biología porque es el medio en el cual se realizan procesos biológicos y es hábitat de múltiples comunidades acuáticas. Todos los organismos vivos contienen agua. Su extracción para uso doméstico, agrícola, minero, industrial, para la generación de energía, así como el vertido de contaminantes, puede llevar un deterioro en su calidad y cantidad, impactando no sólo el sistema acuático, sino también a la disponibilidad de agua segura para consumo humano (SAGAN, 2013).

3.2 Contaminación del agua

Los procesos acelerados de contaminación que aquejan a la humanidad están sin duda ligados al crecimiento de la población mundial y al aumento y diversificación de las actividades del hombre.

La contaminación ambiental es definida como cualquier modificación indeseable de la composición natural del medio, debida a la introducción de agentes biológicos, químicos o físicos que no pertenecen al mismo. La contaminación es una consecuencia indeseable de los procesos productivos que afecta no sólo a la salud humana sino también a la integridad de los ecosistemas, ocasionando daños a veces irreversibles, tales como la pérdida de biodiversidad. Donde quizás el deterioro ambiental se hace más apremiante es en el agua, pues es un insumo básico para la subsistencia de todo organismo vivo y para las actividades productivas del hombre (Albert y Namihira, 2004).

Los ecosistemas acuáticos, incluyendo ríos, lagos, mares y océanos son el vehículo y depósito final de un sin número de contaminantes que son vertidos directamente en éstos para su eliminación (desechos humanos e industriales), llevados por arrastres diversos (aportes de agua de lluvia y aguas de riego), depositados del aire o que son el producto de derrames accidentales o descargas intencionales.

Los contaminantes más importantes de los cuerpos de agua incluyen a moléculas inorgánicas y orgánicas, dentro de las que destacan: metales pesados, hidrocarburos, gases, detergentes, plaguicidas y recientemente los productos farmacéuticos que son actualmente considerados contaminantes emergentes.

Es importante mencionar que muchos contaminantes son bioacumulados a lo largo de la cadena alimentaria, ya que la ingestión de partículas en suspensión o alimentos contaminados depende de los hábitos alimenticios de cada uno de los hidrobiontes (Moreno, 2003).

La toxicidad producida por contaminantes como metales pesados, hidrocarburos y plaguicidas en ambientes acuáticos ha sido ampliamente evaluada, pero existen pocos estudios sobre el efecto de los aditivos alimentarios.

Sustancias como aceites, grasas, breas, tinturas, productos químicos sintéticos, plaguicidas y otros afectan los procesos metabólicos de los organismos acuáticos, incluso se ha demostrado que producen estrés oxidativo. Investigaciones realizadas en anfípodos de agua dulce (*Gammarus lacustris* Sars y *Gammarus tigrinus*), expuestos a disolventes orgánicos presentes en aguas negras, mostraron una elevación significativa en los niveles de catalasa, peroxidasa, glutatión s-transferasa y en la concentración celular de peróxido de hidrógeno, lo cual puede derivar en la acumulación del H₂O₂ y provocar daño a las estructuras lipídicas derivando en una lesión celular o en la muerte del organismo (Timofeyev *et al.*, 2006)

3.3 Edulcorantes

El término edulcorante, hace referencia a aquel aditivo alimentario que es capaz de mimetizar el efecto dulce del azúcar y que, habitualmente, aporta menor energía. Algunos de ellos son extractos naturales mientras que otros son sintéticos, en este último caso se denominan edulcorantes artificiales (García-Almeida *et al.*, 2013). Son utilizados como sustitutos de azúcar en cantidades considerables y cada vez más en los alimentos y bebidas, especialmente para aquellos que son diabéticos o padecen obesidad. También se han utilizado en otro tipo de productos como farmacéuticos y productos de cuidado personal tales como las pastas dentales.

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR SUCRALOSA EN (*Cyprinus carpio*) Y DETERMINAR SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y TEXTURALES

Los edulcorantes autorizados por las diferentes autoridades internacionales como aditivos alimentarios incluyen al acesulfame y la sucralosa (EU, 2008; EE.UU. FDA, 2007). La sucralosa (1,6-dicloro-1,6-dideoxi-BD-fructo-furanosilo 4-cloro-4-desoxi-α-D-galactopiranosido), es un edulcorante vendido bajo el nombre de Splenda®, y es producida por la cloración de sacarosa, lo que conduce a un compuesto estable que no se absorbe en el sistema gastro-intestinal de los mamíferos (Sims *et al.*, 2000). La mayor parte de la sucralosa ingerida se excreta como un compuesto original sin cambios con <1% de la dosis original oral excretada en forma de dos glucuronidos (Sims *et al.*, 2000). En la figura 1. se muestran las estructuras químicas de algunos edulcorantes naturales y sintéticos; en la tabla 1 se encuentra la clasificación de estos.

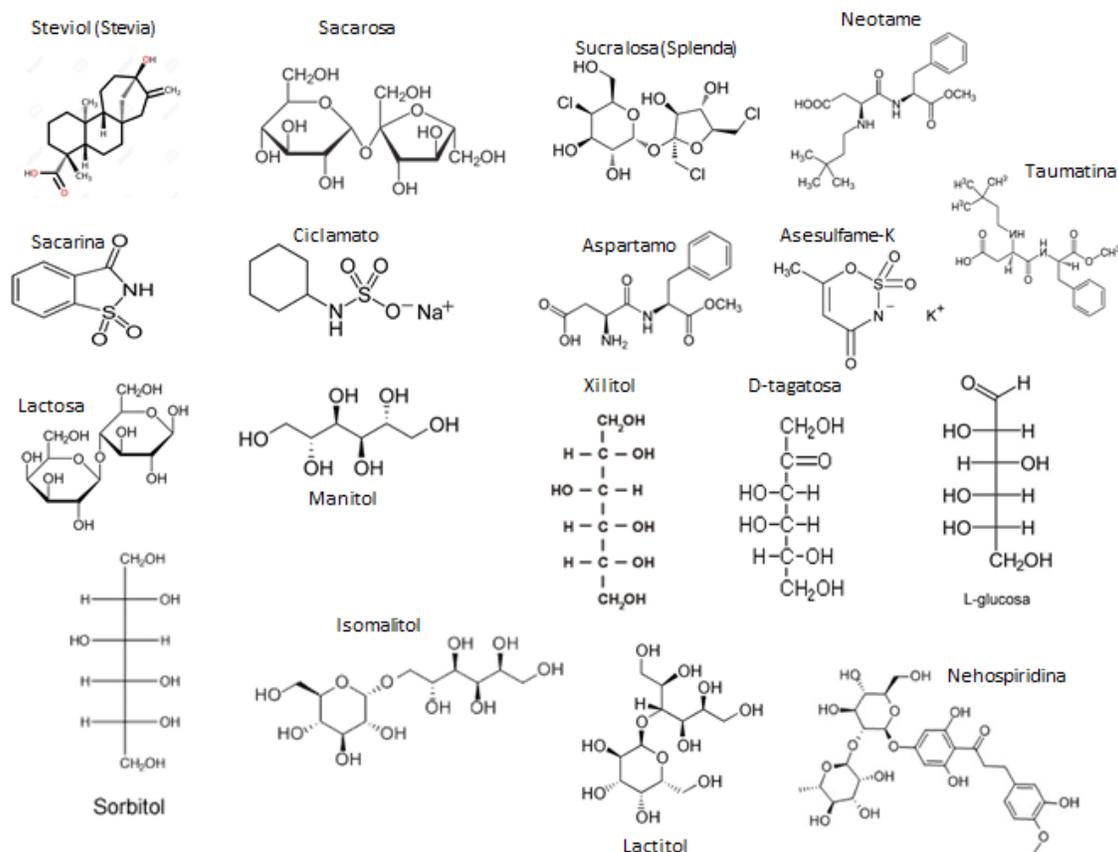


Figura 1. Estructura química de edulcorantes (García-Almeida *et al.*, 2013)

Tabla 1. Clasificación de los edulcorantes

<u>CALÓRICOS</u>	Naturales	Azúcares	Sacarosa, glucosa, dextrosa, fructosa, lactosa, maltosa, galactosa y trehalosa, tagatosa
		Edulcorantes naturales calóricos	Miel, jarabe de arce, azúcar de palma o de coco, jarabe de sorgo
	Artificiales	Azúcares modificados	Jarabe de maíz de alto fructosa, caramelo, azúcar invertido
		Alcoholes del azúcar	Sorbitol, xilitol, manitol, eritritol, maltitol, isomaltulosa, lactitol, glicerol
<u>NO CALÓRICOS</u>	Naturales	Edulcorantes naturales sin calorías	Luo Han Guo, stevia , taumatina, pentadina, monelina, brazzeína
	Artificiales	Edulcorantes artificiales	Aspartamo , sucralosa , sacarina, neotamo, acesulfame K , ciclamato, neohesperidina DC, alitamo, advantamo

Fuente: (FDA, 2014)

Al tratarse de aditivos alimentarios, el consumo de edulcorantes está permitido por diversas agencias de seguridad alimentaria en más de 70 países alrededor del mundo:

Seis edulcorantes de alta intensidad (EAI) han recibido aprobación por parte de la FDA (*Food and Drugs Administration*) en los Estados Unidos: sacarina, aspartame, acesulfame potásico (ACE-K), sucralosa, neotame y advantame (FDA, 2014)

Las notificaciones GRAS (*Generally Recognized As Safe*) han sido aprobadas por la FDA a dos tipos de EAI (ciertos glicósidos de steviol obtenidos de las hojas de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni y los extractos obtenidos de la fruta *Siraitia grosvenorii* Swingle también conocida como fruta Luo Han

Guo). Los extractos crudos de la hoja de stevia son sujetos de una Alerta de Importación y no está aprobado su uso como edulcorante (FDA, 2014)

3.3.1 sucralosa

3.3.1.2 Características generales de Sucralosa

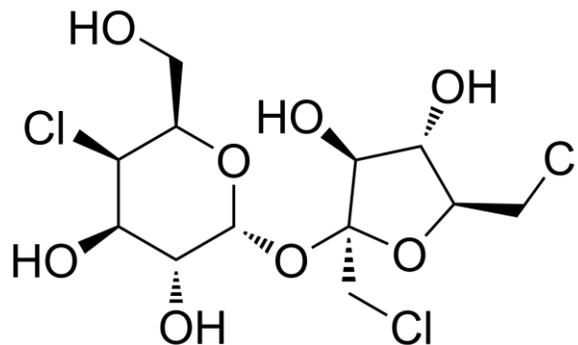


Figura 2. Estructura química de sucralosa (Grice y Goldsmith, 2000)

Nombre químico: 1,6-Dicloro-1,6-dideoxi-β-D-fructofuranosil-4-cloro-4-deoxi-α-D-galactopiranosido.

Fórmula química: C₁₂H₁₉Cl₃O₈

Peso molecular: 397.633 mol/g

pka= 11.91

Solubilidad en agua: 12.9 mg/mL

La sucralosa es un edulcorante de alta intensidad (EAI) derivado de la sacarosa en un proceso donde tres grupos hidroxilos son reemplazados por tres átomos de cloro, produciendo una sustancia muy estable (Grice y Goldsmith, 2000)

La sucralosa fue descubierta en 1976 como resultado de un proyecto conjunto de investigación sobre edulcorantes realizado por Tate y Lyle y el Queen Elizabeth College de Londres, RU (Tollefsen *et al.*, 2012)

La sucralosa es una forma modificada de azúcar común (sacarosa) sin calorías y 600 veces más dulce que el azúcar. Tiene un sabor que difiere considerablemente del azúcar común y no se descompone con el calor. Es muy consumida a nivel mundial, sola o con otros edulcorantes, y se puede encontrar en más de 4.500 alimentos y bebidas (García-Almeida *et al.*, 2013). En la Unión Europea, también se conoce con el código de aditivo E-955.

3.3.1.3 Metabolismo

La incorporación del cloro produce la liberación de calorías ya que este elemento transforma la molécula de sucralosa en inerte tanto química como biológicamente por lo que atraviesa el organismo sin ser absorbida y se elimina después de su consumo (Grotz *et al.*, 2009).

Estudios en animales y humanos han concluido que la sucralosa es segura para consumo humano; 90% de la dosis oral pasa a través del cuerpo sin ser absorbida y es eliminada en su forma original (Grice y Goldsmith, 2000).

3.4 EFECTO Y CONTAMINACIÓN POR EDULCORANTES

Basados en las evidencias científicas existentes, las agencias de seguridad alimentaria alrededor del mundo han concluido que los edulcorantes aprobados como aditivos alimentarios son seguros para la población en general bajo ciertas condiciones de uso ya que a las dosis de consumo admisible no representan daños para la salud humana, sin embargo, desde el año 2009 se ha venido considerando a los edulcorantes como contaminantes emergentes.

Algunos estudios de toxicidad indican que la sucralosa no tiene modo específico de acción tóxica conocido y no causa efectos adversos en los principales sistemas fisiológicos (por ejemplo, el sistema reproductivo) (Molinary y Quinlan, 2006 ; Kille *et al.*, 2000a , b; Mann *et al.*, 2000a, b), sin embargo, Mohamad Al-Saleh *et al.* (2011) reportó que el receptor del gusto dulce T1R2/R3 se encuentra en la superficie de las células beta pancreáticas, por lo que investigaron los efectos de los edulcorantes

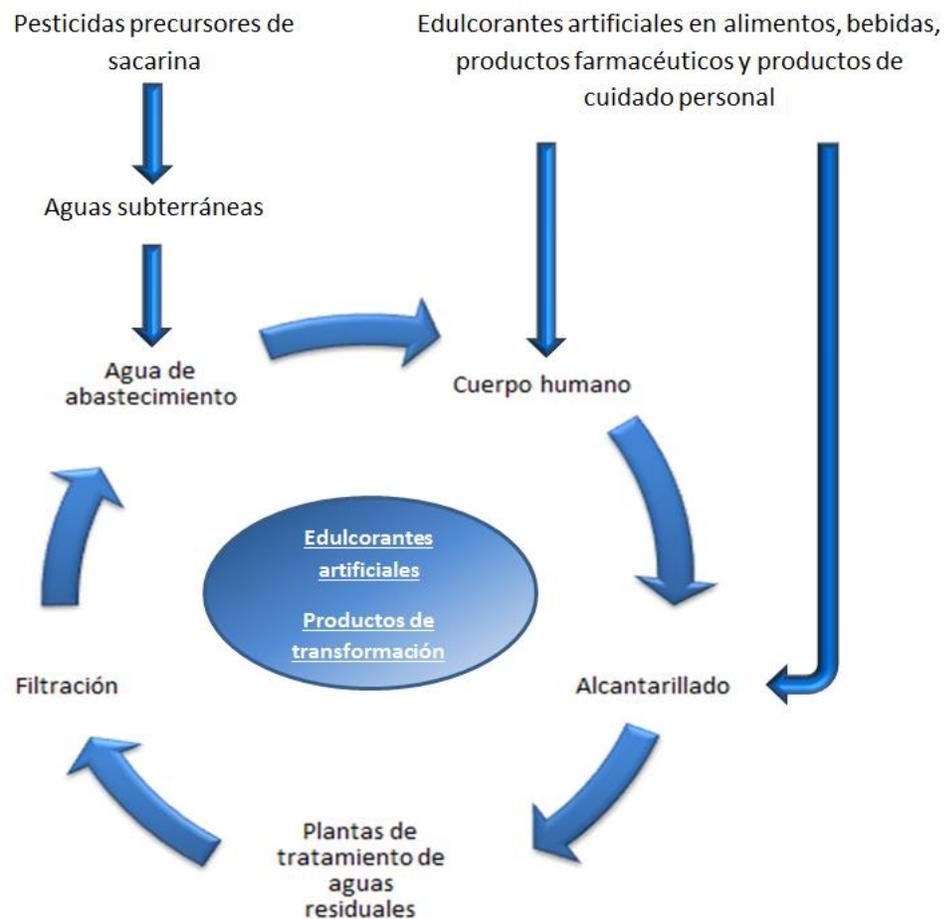
artificiales en la secreción de insulina, especies reactivas de oxígeno (ERO's) y consumo de oxígeno. La sucralosa, aspartamo y sacarina aumentó la secreción de insulina basal en islotes de rata después de 30 min de incubación estática en disoluciones que contienen edulcorante 2,5 mM, además Abou-Donia *et al.* (2008) reportaron que la sucralosa incrementó el peso corporal, disminuyó la flora intestinal beneficiosa y puede interferir en la absorción de nutrientes y fármacos.

Una vez excretada la sucralosa, no se degrada dentro del proceso de tratamiento de las aguas residuales y se ha detectado en los efluentes municipales y las aguas superficiales encontrando concentraciones arriba de 1µg/L (Loos *et al.*, 2009; Scheurer *et al.*, 2009; King, 1986, 1984). Se dispone de pocos datos en la literatura que investigue los efectos de la sucralosa en los organismos acuáticos (Soh *et al.*, 2011; Hjorth *et al.*, 2010). Como la sucralosa ha sido ampliamente detectada en las aguas superficiales, se necesitan estudios para evaluar el potencial y observar los efectos adversos asociados con este compuesto. Estudios ecotoxicológicos serían útiles para comprender la posible ecotoxicidad asociada con la sucralosa como por ejemplo en la reproducción (Ankley *et al.*, 2007).

Los edulcorantes, son altamente solubles en agua, muestran un bajo potencial de bioacumulación y un bajo potencial de sorción en el suelo y en la materia orgánica, por lo tanto, se encuentran predominantemente presente en la columna de agua (Tollefsen *et al.*, 2012). Diversos estudios de concentraciones ambientales han confirmado la extendida distribución de sucralosa (SUC), acesulfame (ACE), ciclamatos (CYC), sacarina (SAC) en el ciclo del agua a niveles que se encuentran entre los más altos dentro de los contaminantes antropogénicos (Stolte *et al.*, 2013).

Debido a su excepcional estabilidad combinada con su alta solubilidad en agua y su extendido uso, la sucralosa es un candidato ideal como indicador de las actividades humanas en el medio acuático (Wiklund *et al.*, 2012). Diversos estudios señalan que la sucralosa posee una larga vida media en varios compartimentos ambientales (Tollefsen *et al.*, 2012). La exposición del medio ambiente terrestre a la sucralosa se limita a áreas sujetas a inundaciones y depósitos directos de aguas residuales o lodos de aguas residuales. El principal compartimento receptor de sucralosa en el medio ambiente son las aguas continentales superficiales a escala regional y las aguas superficiales del mar a escala continental y global. La otra fracción asociada a otros compartimentos, incluyendo atmósfera, suelos, partículas sedimentadas en agua y sedimentos es prácticamente insignificante.

La abundancia relativa de la sucralosa en efluentes de aguas residuales y superficiales, su espectro de masas característico, y su naturaleza conservativa nos indican que su identificación en el agua es fácil, haciéndola un marcador químico ideal para la contaminación de aguas residuales en aguas superficiales y subterráneas (Soh *et al.*, 2011; Wiklund *et al.*, 2012). Existen diversos estudios que señalan que la sucralosa puede poseer un importante papel como trazador del ciclo del agua, inclusive más que otros trazadores comúnmente utilizados para dicho fin (Berset *et al.*, 2012; Soh *et al.*, 2011). En la figura 3, se muestran las diferentes rutas de ingreso de los edulcorantes al ambiente acuático.



Fuente: Berset *et al.*, 2012

Figura 3. Rutas de ingreso de edulcorantes artificiales y sus productos de transformación en el ambiente acuático

3.5 Ocurrencia

Recientemente diversos estudios de concentraciones ambientales de edulcorantes artificiales han destacado la extensa distribución de SUC, ACE, CYC, SAC dentro del ciclo del agua (Buerge *et al.*, 2009; Loos *et al.*, 2009; Scheurer *et al.*, 2009; Van Stempvoort *et al.*, 2011). Scheurer *et al.*, (2009) determinaron concentraciones de hasta $190 \mu\text{gL}^{-1}$ de ciclamatos, $40 \mu\text{gL}^{-1}$ de ACE y SAC y concentraciones $<1 \mu\text{gL}^{-1}$ de SUC en los efluentes provenientes de una Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) en Alemania. Los mismos autores encontraron que las PTAR remueven SUC y ACE en forma muy limitada, sin embargo, CYC y SAC fueron casi completamente eliminados ($>94\%$). En general han sido determinadas concentraciones de ACE y SUC en rangos que abarcan hasta μgL^{-1} en aguas superficiales, mantos acuíferos subterráneos y agua de consumo (Lange *et al.*, 2012). El tratamiento con carbón activado es el único proceso utilizado capaz de eliminar una proporción significativa de edulcorantes de aguas residuales (Scheurer *et al.*, 2010; Minten *et al.*, 2011). Las concentraciones de diferentes efluentes se han situado en un rango de $0.71\text{-}11 \mu\text{g L}^{-1}$. Estudios conducidos en diversos puntos de Europa arrojaron concentraciones entre 0.1 y $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Loos *et al.*, 2009; Minten *et al.*, 2011). Mawhinney *et al.* (2011) llevaron a cabo el análisis de sucralosa presente en muestras de 19 plantas de tratamiento de agua potable en Estados Unidos utilizando la técnica de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), encontrándose en aguas provenientes del canal de descarga en 15 de 19 plantas de tratamiento analizadas ($47\text{-}2900 \text{ ng/L}$), en 13 de 17 plantas se presentaron concentraciones de $49\text{-}2400 \text{ ng/L}$ en muestras después de tratamiento y en 8 de 12 plantas ($48\text{-}2400 \text{ ng/L}$) en agua proveniente del sistema de distribución. Se encontró que la sucralosa estaba presente en muestras de agua del canal de descarga que habían tenido contacto con aguas residuales y/o de uso recreativo y que existía un bajo porcentaje de remoción (12% promedio) en las plantas donde se analizaron muestras tratadas listas para consumo. En el conjunto de plantas de tratamiento donde se analizó agua proveniente del sistema de distribución, se observó que el compuesto es persistente independientemente de la presencia de cloro o cloraminas residuales.

3.6 Efectos tóxicos de la sucralosa en diversas especies

Estudios de toxicidad acuática llevados a cabo con protocolos estandarizados y validados utilizados en la toma de decisiones derivadas de diversas regulaciones indican que la sucralosa no altera la supervivencia, crecimiento y reproducción de organismos acuáticos (como plantas, algas, crustáceos y peces) a concentraciones 9000 veces mayores que las detectadas en el ambiente. Algunos estudios llevados a cabo utilizando protocolos no estandarizados han reportado alteraciones en el comportamiento y respuestas no tradicionales en organismos acuáticos, sin embargo, la relevancia de estos estudios para la evaluación de efectos adversos en individuos y poblaciones requiere investigación posterior (Tollefsen *et al.*, 2012)

Hjorth *et al.*, (2010) estudió los efectos de sucralosa en dos especies de copépodos del ártico. En dicho estudio encontraron que la ingesta de alimento incrementó dependientemente del aumento de concentraciones de sucralosa en el copépodo marino *Calanus glacialis* no así en *Calanus finmarchicus*, mientras que la producción de huevos no fue afectada. Lillicrap *et al.*, (2011) condujeron estudios de bioacumulación usando diferentes especies, algas de agua dulce *Pseudokirchneirella subcapita*, el microcrustáceo *Daphnia magna* y pez zebra *Danio rerio*, encontrando valores de factores de bioconcentración (FBC) <1 para algas y peces y valores mayores de FBC (1.6-2.2) para dáfnidos. Aun cuando estos estudios indican que la sucralosa posee una baja toxicidad y no se bioacumula a un grado significativo en organismos acuáticos, su persistencia combinada con el incremento en el consumo del edulcorante demanda una evaluación ecotoxicológica más detallada, llevando a cabo análisis de toxicidad subletal. En los ambientes acuáticos las señales químicas son la principal ruta de comunicación (Hay, 2009). El sentido del gusto es el regulador dominante y la fuerza motora del comportamiento de alimentación y los principios fundamentales del sistema gustativo son los mismos en diversos organismos como mamíferos e insectos (Yamolinsky *et al.*, 2009) lo que puede significar que los receptores de sabores dulces que se encuentran en humanos podrían estar presentes en otros grupos taxonómicos. Estudios recientes proveen evidencias de receptores gustativos de sabores dulces en crustáceos (Peñalva-Arana *et al.*, 2009).

Estudios de quimiorreceptores en crustáceos demuestran que las especies carnívoras tienen la capacidad de detectar aminoácidos mientras que las especies herbívoras y omnívoras son también sensibles a los carbohidratos (Corotto y O'Brien, 2002). La persistencia de la sucralosa en combinación con su alta solubilidad en agua, su semejanza estructural con el azúcar y su perfil de dulzor hacen de esta sustancia un reto para la evaluación del riesgo en los ambientes acuáticos. Es muy improbable que la sucralosa pueda acumularse en los sedimentos debido a su naturaleza hidrofílica. Eriksson *et al.*, (2011) llevaron a cabo estudios de bioconcentración, comportamiento y toxicidad crónica y aguda en *D. magna*, *Nitocra spinipes*, *Gammarus oceanicus* y *Gammarus zaddachi* encontrando que la sucralosa afectó la locomoción de *D. magna* y *G. zaddachi* en concentraciones de 0.5, 5 and 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, así como un aumento en la ingesta de alimentos con concentraciones de sucralosa más elevadas en *C. glacialis*.

La sucralosa no exhibe efectos adversos en la tasa de crecimiento de *Lenma gibba* (7d) a concentraciones $<1000 \text{ mgL}^{-1}$ (Soh *et al.*, 2011). Hugget y Stoddard (2011) investigaron la toxicidad crónica de SUC no encontrando reducción significativa en la supervivencia o reproducción a concentraciones hasta de 1800 mgL^{-1} para *Daphnia magna* (21 d) o 93 mgL^{-1} para *Americamysis bahia* (28d).

Es muy poco conocido el destino post consumo de la sucralosa en el medio ambiente. Gran cantidad de moléculas cloradas (bifenilos policlorados, aldrin, clordano, heptaclor, dioxinas) han presentado una gran persistencia, alto potencial de bioacumulación y gran cantidad de efectos tóxicos (USEPA, 1999; CDC, 2009). Es conocido que la sucralosa es persistente a los procesos metabólicos en distintas especies y en el medio ambiente, sin embargo, se ha demostrado que posee un bajo potencial de bioacumulación ($K_{ow}= 0,3$) (Grieco y Goldsmith, 2000). A dosis mayores del 3% de la ingesta diaria (significativamente mayor que el límite permitido por FDA) los efectos adversos incluyen elongación del ciego, mineralización pélvica e hiperplasia epitelial en ratas, así como alteraciones gastrointestinales en conejos (Kille *et al.*, 2000; Mann *et al.*, 2000). Un estudio llevado a cabo en ratas muestra efectos adversos a dosis que se encuentran dentro del rango de la ingesta diaria permisible por la FDA incluyendo una disminución en la microflora bacteriana fecal y un incremento en el pH fecal (Abu-Donia *et al.*, 2008). Adicionalmente, el consumo de Splenda administrado a dosis de 1.1-11 mg/kg , mostró un mejoramiento en la expresión de glicoproteínas intestinales y las

isoformas de CYP450, CYP3A4 y CYP2D1, las cuales limitan la biodisponibilidad de productos farmacéuticos administrados por vía oral por extrusión desde el intestino y metabolismo acelerado, generando una disminución de la absorción (Abu-Donia *et al.*, 2008). Los efectos generados a partir de la presencia en concentraciones significativas de sucralosa en el medio ambiente no son claros o definitivos.

3.8 Concentración ambiental prevista y Concentración prevista sin efecto

Basado en la medición de los datos reportados en aguas superficiales se determinó que la Concentración Ambiental Prevista (*Predicted environmental concentration*, PEC) de la sucralosa es de 10 µg/L (Tollefsen *et al.*, 2012).

En términos de evaluación del riesgo tradicional, la concentración prevista sin efecto propuesta para organismos acuáticos (PNEC) ha sido determinada en 0.93 mg/L, basado en la concentración de efecto no observado (NOEC) de un estudio de toxicidad crónica con camarón *mysida* y con la aplicación de un valor de seguridad de 100 (Tollefsen *et al.*, 2012).

Se determinó que el cociente resultante de PEC/PNEC es claramente menor de 1 (PEC/PNEC=0.08), indicando de este modo un riesgo al medio ambiente limitado utilizando enfoques tradicionales de evaluación de riesgo toxicológico (Tollefsen *et al.*, 2012).

3.9 Transformaciones bióticas y abióticas de la sucralosa

La sucralosa es principalmente excretada de forma inalterada. Debido a la cloración de la sucralosa la molécula es modificada de un modo que la convierte en un compuesto persistente para las enzimas glicosídicas que normalmente degradan a los carbohidratos en el intestino (EC, 2000). Únicamente dos metabolitos polares han sido tentativamente identificados, lo que significa no más del 10% de la sucralosa total administrada de forma oral. Dichos metabolitos fueron identificados en perro, ratón y el hombre sin diferencias significativas entre especies, mientras que no fueron identificadas en conejo (John *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2000). Autores como Grice y Goldsmith (2000) no encontraron señales de dechloración producto de dicho metabolismo. Se encontró que los metabolitos fueron aún más polares que la molécula original, dichos

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR SUCRALOSA EN (*Cyprinus carpio*) Y DETERMINAR SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y TEXTURALES

compuestos fueron identificados como 4-cloro-4-desoxi-galactosa (4-CG) y 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-fructosa (1,6-DCF), ambos productos de la hidrólisis del edulcorante (NICNAS, 2001) ambos metabolitos presentan características de glucurónidos de SUC. Roberts *et al.* (2000) observaron una pronunciada termolabilidad de uno de los metabolitos encontrados en humanos con la técnica de espectrometría de masas en termospray; en test de incubación la hidrólisis de la sucralosa ocurrió rápidamente, concluyendo que este metabolito de SUC es un monoglucurónido con sustitución en la posición de uno de los cuatro hidroxilos secundarios debido a que el compuesto es fácilmente hidrolizado y la sustitución en una única posición primaria habría resultado en un metabolito más estable, asimismo, en experimentos con perros administrados con SUC de forma oral e intravenosa el segundo metabolito fue tentativamente identificado mediante experimentos de fragmentación iónica, este segundo metabolito es probablemente un glucurónido de SUC generado a partir de la conjugación con ácido glucurónico en la posición 6 del residuo 4-CG de la sucralosa, todo esto se comprobó al utilizar un estándar que el metabolito potencial sucralosa-6-ácido carboxílico no se forma. En la figura 4, se muestra las diferentes rutas de transformación de la sucralosa

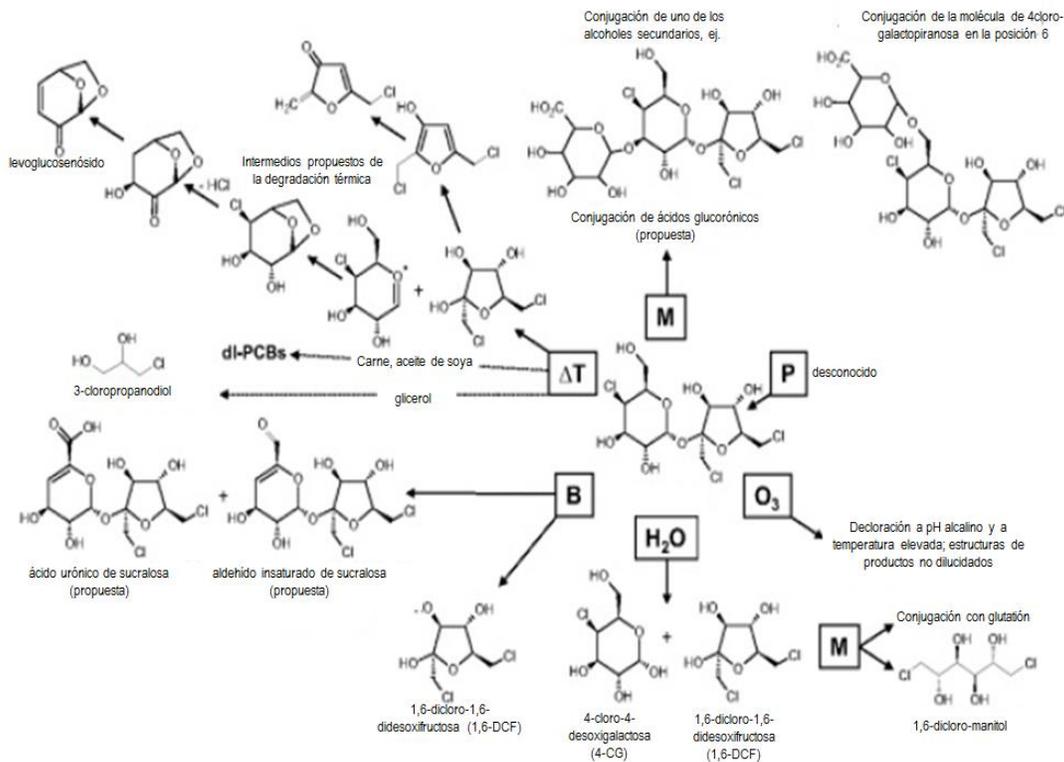




Figura 4. Diferentes rutas de transformación de la sucralosa

Fuente: Roberts *et al.* (2000)

3.10 *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758)

3.10.1 Rasgos biológicos

La carpa *Cyprinus carpio*, se caracteriza por poseer cuerpo alargado y algo comprimido. Labios gruesos. Dos pares de barbillas en el ángulo de la boca, las más cortas sobre el labio superior. Base de la aleta dorsal larga con 17-22 rayos ramificados y una espina dorsal fuerte y dentada en el frente; contorno de la aleta dorsal cóncavo anteriormente. Aleta anal con 6-7 rayos blandos; borde posterior de la 3ª espina de las aletas dorsal y anal con espínulas filudas. Línea lateral con 32 a 38 escamas. Dientes faríngeos 5:5, dientes con coronas aplanadas. Color variable, las carpas silvestres son de color parduzco verdoso sobre el dorso y parte superior de los costados, con tonalidad amarillodorada ventralmente (Camarero, 2006). Las aletas son oscuras, ventralmente con un matiz rojizo, como puede apreciarse en la imagen 1.



Imagen 1 Carpa común *Cyprinus carpio*

Fuente: <http://www.all-fish-seafood-recipes.com/index.cfm/fish/Carp/>

3.10.2 Composición nutrimental de la carpa *Cyprinus carpio*

La carpa presenta un contenido graso de algo más de 5 g/100 g de porción comestible, por lo que se engloba dentro del grupo de pescados semigrasos; además de poseer proteínas de alto valor biológico. Su contenido vitamínico (algunas del complejo B: B2, B6, B12 y Vitamina E) representa cantidades poco significativas; sin embargo, la vitamina A está presente en cantidades destacadas en relación con el resto de pescados. En cuanto a los minerales, la carpa es uno de los pescados más ricos en hierro, aunque su valor se encuentra por debajo del que contienen las carnes. En relación con el fósforo, es el pescado más rico en este mineral, sólo por debajo del pez espada. En la Tabla 2 se puede ver reducidamente la composición nutrimental de la carpa (Miranda, 2011).

Tabla 2. Composición química de la carpa en 100g de porción comestible

a) ELEMENTO	CANTIDAD
Humedad (%)	77.7
Proteínas (%)	15.1
Grasas (%)	4.2
Cenizas (%)	1.2

Fuente: Miranda, 2011

El músculo de pescado puede ser de dos tipos: rojo y blanco; ambos son parecidos en composición, pero el músculo rojo tiene un mayor contenido de hemopigmentos, tales como la mioglobina para el transporte de oxígeno y más lípidos no estructurales para proveer energía, reflejando su papel en una fuerte actividad natatoria de especies como el atún o la caballa. El músculo rojo está situado a lo largo de los laterales del cuerpo, debajo de la piel, seguido por el músculo blanco.

Dependiendo su función y solubilidad, las proteínas del músculo del pescado se pueden dividir en tres grupos:

1. **Proteínas estructurales** (actina, miosina, tropomiosina y actomiosina), que constituyen el 65-80% de la proteína total, las cuales dan al músculo su estructura y actividad. Estas proteínas son solubles en disoluciones salinas de concentración superior a 0,3 M.

2. **Proteínas sarcoplásmicas** (mioalbúmina, globulina y enzimas), que son solubles en agua y se encuentran normalmente en el plasma de las células, constituyendo entre el 18-20% del total de proteínas musculares.

3. **Proteínas del tejido conectivo** (estroma), representan alrededor del 3-5% del total de las proteínas, son solubles en disoluciones salinas muy concentradas, o mediante la cocción.

La propia naturaleza de los diferentes tipos de músculo refleja su importancia en la elaboración de productos marinos. Las proteínas sarcoplásmicas, al ser muy solubles, no contribuyen a la formación de geles, a diferencia de las proteínas miofibrilares, que confieren la estructura de geles por acción del calor; mientras que las proteínas del estroma, que se solubilizan por calor, pueden ser componentes "inertes" en los productos finales (Estrada, 2005). De igual manera, el músculo de pescado, contiene un intervalo de 1-5 % de lípidos, del cual, el 90% son fosfolípidos. Los lípidos en los alimentos provenientes del mar, tienen significativamente niveles más altos de ácidos grasos $\Omega 3$.

El agua, principal componente de la fracción comestible de los peces, siendo mayor la retención de agua en el pescado fresco, pues durante la cocción se pierde aproximadamente un cuarto de humedad.

Posee Vitaminas y Nutrimientos inorgánicos: vitaminas hidrosolubles, el complejo B y C; vitaminas liposolubles A, D, K y E (Estrada, 2005).

3.11.3 Hábitat y biología

La carpa común silvestre (generalmente referida simplemente como 'carpa' en esta hoja de información) vive en las corrientes medias y bajas de los ríos, en áreas inundadas y en aguas confinadas poco profundas, tales como lagos, meandros y embalses de agua. Las carpas son principalmente habitantes del fondo, pero buscan alimento en las capas media y superior del cuerpo

de agua. Los típicos 'estanques de carpas' en Europa son pozas poco profundas, eutróficas con un fondo fangoso y vegetación acuática densa en los diques. El espectro ecológico de la carpa es amplio. El mejor crecimiento se obtiene cuando la temperatura del agua está en el intervalo 23 °C y 30 °C. Los peces pueden sobrevivir períodos de inviernos fríos. Salinidades hasta alrededor de 5‰ son toleradas. La gama de pH óptimo es 6,5-9,0. La especie puede sobrevivir bajas concentraciones de oxígeno (0,3-0,5 mg/L) así como súper saturación. Las carpas son omnívoras, con una gran tendencia hacia el consumo de alimento animal, tal como insectos acuáticos, larvas de insectos, gusanos, moluscos y zooplancton. El consumo de zooplancton es dominante en estanques de peces donde la densidad de siembra es alta. Adicionalmente, la carpa consume los tallos, hojas y semillas de plantas acuáticas y terrestres en descomposición, etc. El cultivo de la carpa en estanques se basa en la habilidad de la especie para aceptar y utilizar cereales proporcionados por los granjeros. El crecimiento diario de la carpa puede llegar a ser 2 a 4 por ciento del peso corporal. Las carpas pueden alcanzar 0,6 a 1,0 kg de peso corporal dentro de una estación en los estanques de cría de peces en policultivo de áreas subtropicales/tropicales. El crecimiento es mucho más lento en la zona temperada: ahí los peces alcanzan pesos corporales de 1 a 2 kg después de dos a cuatro estaciones de crianza. En Europa, las carpas hembras necesitan alrededor de 11 000 a 12 000 grados-días para alcanzar la madurez en las zonas climáticas templadas y subtropicales. Las carpas macho están maduras dentro de un período que es 25-35 por ciento más corto. El período de madurez de las cepas asiáticas de carpa es levemente más corto. El desove de la carpa europea comienza cuando la temperatura del agua es 17-18 °C. Las cepas asiáticas comienzan a desovar cuando la concentración de iones del agua disminuye abruptamente al comienzo de la estación lluviosa. Las carpas silvestres son desovantes parciales. Las carpas domesticadas liberan todos sus huevos maduros dentro de unas pocas horas.

Después del tratamiento hormonal las carpas liberan sus huevos maduros dentro de un período mucho más corto, lo que hace posible "ordeñar" a los reproductores para obtener sus gametos (huevos y espermios). La cantidad de huevos liberados es 100 a 230 g/kg de peso corporal. La cáscara del huevo se hace pegajosa después del contacto con el agua.

El desarrollo embrionario de la carpa común demora alrededor de tres días a 20-23 °C (60-70 grados-días). Bajo condiciones naturales, los peces eclosionados se pegan al substrato. Alrededor de tres

días después de la eclosión se desarrolla la parte posterior de la vejiga natatoria, las larvas nadan horizontalmente y comienzan a consumir alimento externo con un tamaño máximo de 150-180 μm (principalmente rotíferos).

3.11.4 Importancia económica de la carpa común (*Cyprinus carpio*) en México

En México, el cultivo de carpa tiene gran importancia porque el manejo de su cultivo es sencillo, económico y de gran impacto social; independientemente de que el 78% de la superficie de los cuerpos de agua epicontinentales reúnen las características limnológicas adecuadas en donde se han creado importantes pesquerías que basan su producción en la explotación semi intensiva de carpas, dentro de las cuales la especie *Cyprinus carpio* es la más abundante (Aragones, 1995). En el 2009, la carpa común ocupó en la producción pesquera nacional el 17º lugar, mientras que en el Estado de México la carpa es una de las principales especies que se producen (Tabla 3) (CONAPESCA, 2009). Sin embargo, su consumo es monótono, es decir, se consume únicamente de forma empapelada o frita, no teniendo otra alternativa de su consumo. Por lo cual, es necesario presentar alternativas de consumo para que esta especie pueda ser aprovechada a nivel industrial; siendo esto último, una gran oportunidad de crecimiento económico para el Estado de México.

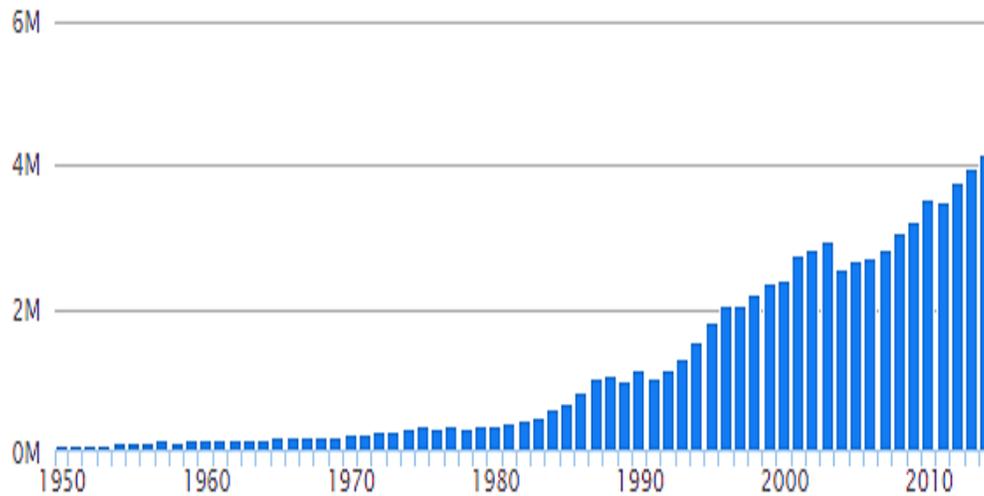
Tabla 3. Principales especies de la producción pesquera del Estado de México en 2009

ESPECIE	TONELADAS
Carpa	6437
Trucha	3713
Mojarra	925

Fuente: CONAPESCA, 2009

3.6.1.5 Estadísticas de producción

Figura 5. Producción global de *Cyprinus carpio*(toneladas)



Fuente: FAO Fishery Statistic, 2010

La producción de carpa común cultivada fue cercana al 14 por ciento del total de la producción global de acuicultura de agua dulce en 2002 (3 202 561 toneladas). La producción de carpa común aumentó en una tasa promedio global de 9,5 por ciento/año entre 1985 (681 319 toneladas) y 2002. En la década pasada (1993-2002) ésta ha aumentado a 10,4 por ciento/año. Esto es mayor que la tasa de expansión de producción de cultivo de diferentes tipos de carpas: china (10,1 por ciento/año), plateada (8,8 por ciento/año) y cabezona (7,2 por ciento/año), pero menor que aquella de tilapias (11,8 por ciento/año) durante esta década. En 2002, las principales áreas productoras de carpa común fueron Asia (alrededor de 93 por ciento) y Europa (4,5 por ciento). En Europa, la producción de esta misma común fue 144 602 toneladas en 2002. Esto representa una reducción substancial desde el máximo de producción por sobre 402 000 toneladas en 1990, causada por cambios en Europa del este. Sin embargo, la producción europea parece estar aumentando gradualmente de nuevo; la mínima del período 1993-2002 fue 125 274 toneladas en 1997 (FAO Fishery Statistic, 2010).

3.11 Bioindicador

La denominación de una especie como indicadora requiere de conocimiento previo respecto a su composición comunitaria bajo condiciones normales, incluyendo el ciclo de vida de las especies, su estacionalidad y sus variaciones naturales, de manera que sea posible comparar las condiciones antes y después de una perturbación ambiental (Raz-Guzmán, 2000).

El concepto de organismo indicador se refiere a especies seleccionadas por su sensibilidad o tolerancia a varios parámetros (Washington, 1984). Odum (1972) definió a los organismos indicadores como la presencia de una especie en particular, que demuestra la existencia de ciertas condiciones en el medio, mientras que su ausencia es la consecuencia de la alteración de tales condiciones.

3.12 Biomarcadores

Un biomarcador es definido como un cambio en la respuesta biológica (midiendo los cambios moleculares, celulares y fisiológicos en la respuesta conductual) que puede ser relacionado con la exposición de tóxicos que están en el ambiente.

Los efectos negativos que se producen sobre los organismos como consecuencia de la exposición a los xenobióticos ambientales pueden expresarse inmediatamente o tardar años en manifestarse. Es por ello que para identificar el problema antes de que se genere un daño irreversible al ecosistema, se aplican estudios con marcadores que permitan establecer la relación entre los contaminantes y sus efectos biológicos, detectando alteraciones iniciales en fases que aún no son letales (van der Oost *et al.*, 2003).

3.12.1 Clasificación de biomarcadores

3.12.1.2 Biomarcadores de exposición o de dosis interna

Los biomarcadores de exposición o de dosis interna pueden ser un compuesto exógeno (o un metabolito) dentro del organismo que refleja la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se realiza en fluidos corporales (sangre y orina, fundamentalmente) o incluso aire espirado (Repetto, 1997). En el caso de tóxicos acumulativos, la dosis interna puede también reflejar la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales (Van Cauteren *et al.*, 1996).

En 1986 Bernard y Lauwerys, dividen los biomarcadores de exposición en dos subgrupos, basándose en la especificidad de las pruebas de detección; a) Los biomarcadores selectivos se basan en la medida directa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos (por ejemplo: plomo en sangre); b) Los no selectivos constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición (por ejemplo; tioésteres en orina como indicadores de exposición a sustancias electrófilas y, por tanto, reflejo de la absorción de sustancias mutagénicas y cancerígenas).

3.11.3 Biomarcadores de susceptibilidad

Existen biomarcadores de susceptibilidad los cuales sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos. Se deben generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de ADN y sus fragmentos de restricción (RFLPs, por sus siglas en inglés), clonado de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas (Repetto, 1997).

3.11.4 Biomarcadores de efecto (o respuesta)

Los biomarcadores de respuesta o efecto son indicativos de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. Incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARNm, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos

específicos (auto anticuerpos) contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares (núcleo, membrana, etc.) (Repetto, 1997).

Algunos contaminantes (hidrocarburos aromáticos policíclicos y halogenados, metales pesados, herbicidas y disolventes) son capaces de originar un daño oxidativo en el organismo. En respuesta a dicho estrés oxidativo, se desencadenan mecanismos adaptativos a través de sistemas de protección cuantificados habitualmente en plasma que incluyen la razón glutatión oxidado (GSSG)/glutatión reducido (GSH) y las actividades glutatión reductasa, catalasa, superóxido dismutasa y peroxidasa. Las macromoléculas que pueden resultar afectadas incluyen a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Di Giulio *et al.*, 1989).

3.12 Estrés oxidativo

De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable (O₂), sin embargo, por reacciones puramente químicas, enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de producir daño celular (Venero, 2002).

El desbalance entre la producción de RL y la defensa antioxidante provoca un daño orgánico conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular. Se puede medir este daño mediante métodos directos e indirectos. Entre los indirectos, los cuales son más indicados, se encuentran los siguientes: a) determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre biomoléculas, como el grado de lipoperoxidación a través de la cuantificación del malondialdehído (MDA); b) medición de la concentración de antioxidantes como vitaminas E, C y coenzima Q, que se realiza mediante cromatografía líquida de alta resolución, sobre material biológico que puede ser plasma, orina o tejido; c) medición del estado oxidativo, que refleja el balance entre el sistema oxidante y prooxidante y es beneficioso en muchas enfermedades.

El posible destino celular bajo condiciones de estrés dependerá de varios factores: el contenido endógeno de defensas antioxidantes, el grado de estimulación de las mismas bajo la condición de

estrés, la reversibilidad de las modificaciones a macromoléculas producidas, la magnitud del estrés oxidativo y sus consecuencias funcionales. Existen varios sistemas de reparación de daño al ADN, y a nivel de proteínas hay muchas reacciones que son reversibles, en tanto que los lípidos quizás sean las macromoléculas más establemente afectadas y con consecuencias más directas sobre la integridad celular, (Berlett y Stadtman; 1997) de allí la gran atención que se ha puesto en ellos.

Las especies reactivas derivadas del oxígeno es un término colectivo ampliamente empleado, que comprende todas aquellas especies reactivas que, siendo o no radicales libres, centran su reactividad en un átomo de oxígeno. No obstante, a menudo, bajo la denominación ERO se incluyen otras especies químicas cuya actividad se centra o se deriva en átomos distintos al oxígeno. En rigor, sin embargo, las especies cuya reactividad deriva, o se centra en átomos como Nitrógeno o cloro deben referirse como ERN.

El estrés oxidativo es un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis oxido-reducción intracelular, esto significa que hay un desbalance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas (ERO) y/o por la deficiencia en los mecanismos antioxidantes (Ríos, 2003), todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano (Venero, 2002).

3.12.1 Radicales libres

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas, o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera gran inestabilidad y desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas que se producen por diferentes mecanismos como la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales moléculas del organismo. Los radicales libres (RL) más importantes de las células aerobias (como las células humanas), son el oxígeno, el súper óxido, los radicales de hidroxilo, el peróxido de hidrógeno y los metales de transición. Los RL que se forman dentro de las células

pueden oxidar las biomoléculas (moléculas empleadas dentro de las células, en especial a los lípidos) y por tanto producir la muerte celular, es importante destacar que el ADN es muy sensible a la oxidación por los radicales libres (Venero, 2002).

3.12.2 Especies reactivas del oxígeno

Se consideran como (ERO's) el oxígeno atómico (O) y el ozono (O₃), al oxígeno singulete (¹O₂) que se produce con la excitación de uno de los electrones desapareados de O₂ y al superóxido (O₂^{·-}), al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y al radical hidroxilo (-OH) que son especies parcialmente reducidas. Las ERO's en bajas concentraciones estimulan el crecimiento de las células, de algunas bacterias y de otros microorganismos, además de que son indispensables para la diferenciación celular y la muerte celular programada (Konigsberg, 2008).

El (¹O₂) reacciona con la mayoría de los compuestos celulares, con la membrana plasmática, los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e hidratos de carbono muy cerca del sitio donde se forma. Interacciona con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos siendo el producto principal la 8-hidroxi guanina.

El (O₂^{·-}) es a la vez un anión y un radical, se produce principalmente en la cadena respiratoria. Es tóxico para la célula porque a partir de él se puede originar el (¹O₂) y el (H₂O₂).

El (H₂O₂) se forma cuando uno de los electrones del (O₂) se ha apareado con un electrón de giro contrario. Puede formar aductos con los hidratos de carbono, aminoácidos y bases nitrogenadas. Es tóxico debido a que puede formar (¹O₂) y (-OH), asociado a la reacción con algunos metales de transición con los que produce el radical (-OH) que interacciona irreversiblemente con las proteínas y el ADN.

El (-OH) se produce principalmente por la reacción de Fenton. Es uno de los compuestos más reactivos que existen, puede oxidar a las bases púricas y pirimídicas, así como a la desoxirribosa, además puede producir rupturas en el ADN. También reacciona con cualquier aminoácido en el sitio que se origina, incluso con los ácidos grasos poliinsaturados (Valavanidis *et al.*, 2006).

Otras fuentes endógenas de ERO's interiormente de las células son las enzimas oxidativas como triptófano dioxigenasa, xantino de oxidasa y el CYP450 reductasa, que pueden producir ($O_2 \cdot^-$), mientras que la enzima guanidinciclasa y glucosa oxidasa generan peróxido de hidrógeno. Los contaminantes son una fuente importante para la generación de ERO's en los organismos, tal es el caso de los metales de transición, herbicidas, quinonas y compuestos nitroaromáticos., conocidos ampliamente por la generación de estrés oxidativo (Valavanidis *et al.*, 2006).

3.12.3 Efecto del estrés oxidativo sobre biomoléculas

3.12.3.1 Lipoperoxidación

La oxidación lipídica por los RL se lleva a cabo mediante una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina. Este proceso es conocido como lipoperoxidación y genera numerosos subproductos, muchos de ellos como el malondialdehído (MDA), cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos para evaluar el estrés oxidativo.

La lipoperoxidación o peroxidación lipídica puede ocurrir por vía enzimática como no enzimática, es una reacción autocatalítica donde las especies reactivas del oxígeno o radicales libres (RL) sustraen átomos de hidrógeno a las moléculas de ácidos grasos poliinsaturados, es decir, que atacan a los residuos de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, ya que altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular. Los RL destruyen a la membrana lipídica, produciendo una variedad de compuestos como alcoholes, aldehídos, y ésteres, los cuales pueden provocar mutagénesis y carcinogénesis, la reacción termina cuando dos moléculas de peróxidos colisionan entre sí o cuando reaccionan con algún antioxidante disponible. La determinación de los productos terminales de la peroxidación lipídica, entre ellos el malondialdehído, y la técnica de quimioluminiscencia constituyen métodos de amplio uso para evaluar el estrés oxidativo o el daño por radicales libres a las membranas celulares y las lipoproteínas (Valko *et al.*, 2005).

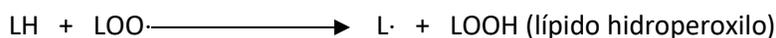
3.12.3.1.1 Etapas de la lipoperoxidación

Este proceso está compuesto por un conjunto de reacciones en cadena, sobre los ácidos grasos poliinsaturados (Valavanidis *et al.*, 2006).

Iniciación de la lipoperoxidación: comienza cuando un ácido graso poliinsaturado es atacado por una ERO que es capaz de absorber o retirar un átomo de hidrógeno de un grupo metileno. El metileno queda como radical libre que se estabiliza mediante un rearrreglo molecular que da origen a un dieno que no reacciona con el siglete de oxígeno, sino con oxígeno molecular y forma el radical peroxilo.



Propagación de la lipoperoxidación: la molécula a la que se le ha abstraído un hidrógeno, hará lo mismo a la molécula de ácido graso poliinsaturado adyacente, estableciendo una reacción en cadena y de esta forma se propaga la lipoperoxidación a través de la membrana.



Terminación: la terminación de la lipoperoxidación es el resultado de la interacción de los radicales lipídicos y/o la formación de especies no radicales por los radicales lipídoperoxilo. El resultante – LOOH que puede descomponerse fácilmente a varias especies reactivas, incluyendo radicales lípido-alcohol (LO·), aldehídos (malondialdehído), alcanos, epoxi-lípidos y alcoholes (Valavanidis *et al.*, 2006).

3.12.3.1.2 Efectos de la lipoperoxidación

Cuando reaccionan los radicales libres de ácidos poliinsaturados entre sí se pueden formar dímeros por entrecruzamiento o pueden ciclarse, creando aglomerados que conducen a la disminución de la fluidez y de la permeabilidad de la membrana, modificando su estructura y con ello la función de las células y de los tejidos. De manera indirecta los productos de lipoperoxidación pueden reaccionar con otras moléculas como los aminoácidos y dañar a la célula (Konigsberg, 2008).

3.12.3.3 Daño genético

Una de las consecuencias del estrés oxidativo es la producción de especies reactivas de oxígeno que pueden interactuar con el ADN y eventualmente producir mutaciones. Para identificar compuestos genotóxicos, se emplean biomarcadores específicos en el ADN de organismos expuestos. Estos estudios forman parte de las investigaciones toxicológicas y se les denominan “estudios especiales”. Su objetivo es correlacionar a los factores de riesgo y el incremento en el daño al ADN. La identificación de marcadores de genotoxicidad es útil para definir un estado de prepatogénesis, de vital importancia para la prevención. Si se induce un daño genético, este puede ser visualizado mediante técnicas citogenéticas o moleculares (Pastor, 2002).

Se puede decir que todo agente que provoque lesión celular originará enfermedad, si su acción es lo suficientemente extensa para abarcar un número grande de células. El daño casi siempre es precedido por una lesión inicial bioquímica, que afecta alguno de los sistemas básicos para la supervivencia de la célula, su destrucción o alteración funcional resultará en anomalías en los tejidos, que a su vez integran órganos más o menos vitales, cuya función se verá deteriorada, el daño genético, por ejemplo, se traduce en modificaciones severas de la síntesis proteica (Vindas *et al.*, 2004).

La pérdida de bases, la desaminación de la citosina en uracilo y de la 5-metilcitosina en timina así como la ruptura de una de o dos hebras de ADN, son eventos que ocurren normalmente, siendo su tasa de producción muy baja pero continua (Hangsber, 2002). Sin embargo, dichos eventos pueden ser inducidos, elevando su tasa de producción por efecto de las ERO's. Ejemplo de ello es el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) que tiene gran reactividad y la capacidad de desunir átomos de hidrógeno de la molécula de DNA, así como unirse a las bases formando aductos (Koningsberg, 2008).

La heterogeneidad de la molécula del ADN permite al hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) atacar tanto a las bases púricas o pirimidicas, y a la desoxiribosa generando rupturas en su cadena. El oxígeno O_2 es más

selectivo e interacciona con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos, siendo el producto principal la 8-hidroxiguanina; ésta a su vez puede unirse al -OH, pudiendo ocasionar la ruptura de la hebra, puede hacer puentes de hidrogeno con una adenina en lugar de una citosina, o bien con una guanina en lugar de una tiamina. Otros radicales hidroxilo pueden reaccionar con uniones de azúcar-fosfato de ADN causando lesiones, incluyendo sitios sin purinas, donde las bases han sido removidas, oxidación del azúcar o fragmentación de desoxirribosa (Valavanidis *et al.*, 2006).

3.12.3.2 Daño a proteínas

En caso de las proteínas se oxidan preferentemente los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina y metionina) y como consecuencia se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos e impiden el normal desarrollo de sus funciones (Oteiza; 1995).

Muchas proteínas son capaces de tolerar gran cantidad de oxidaciones sin que aparentemente se vea afectada su función. La oxidación parcial y selectiva en algunos casos produce proteínas modificadas que pueden actuar como moduladores en algunas reacciones, favoreciendo la homeostasis celular, en este caso la oxidación tiene una finalidad fisiológica. Por otro lado, existe una gran cantidad de agentes oxidantes que pueden dañar a las proteínas. Uno de los daños que es utilizado como marcador de la oxidación directa de los residuos de lisinas, arginina, prolina y treolina. También pueden ser introducidos por reacciones con aldehídos (malonaldehído, 4-hidroxi-2-nonenal) producidos durante la lipoperoxidación o al incorporar un grupo carbonilo a la proteína al reaccionar residuos de lisina con azúcares reductores o de sus productos de oxidación (Konigsberg, 2008; Hangsber, 2002).

3.12.4 Antioxidantes

Todos los organismos soportan numerosos factores exógenos y endógenos de estrés oxidativo, por lo que existen sistemas antioxidantes de defensa regulables, tanto enzimáticos como no enzimáticos, que protegen al organismo del estrés oxidativo.

Entre los enzimáticos destacan la superóxido dismutasa (SOD), esta enzima destruye el anión superóxido (O_2^-) mediante su transformación en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), lo que contribuye al mantenimiento del equilibrio fisiológico antioxidante-prooxidante. (Domínguez 2006), la catalasa (CAT) transforma al H_2O_2 en O_2 y H_2O a cualquier pH entre 4 y 11 existen catalasas monofuncionales que tienen una sola actividad y otras que son capaces de oxidar algunas moléculas pequeñas como etanol y metanol, y la glutatión peróxidasa (GPX) cataliza la reducción de peróxidos (ROOH, inclusive al H_2O_2) a alcoholes (ROH) (Ríos, 2003).

La GPX y la glutatión reductasa (GRd) se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GPx/GRd), y la CAT de otro (SOD/CAT). Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par; la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 y la GPX lo hace a concentraciones bajas, lo que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas. Además, algunas citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), el interferón (IFN) y la interleucina-1 (IL-1) son capaces de inhibir la actividad de la GPX (Cisneros *et al.*, 1997).

La aparición y el impacto de la oxidación en los alimentos se ignoró durante décadas, sin embargo, actualmente se sabe que la oxidación de proteínas en los tejidos vivos desempeña un papel esencial en las enfermedades cronicodegenerativas. Esto ha propiciado un crecimiento del interés por estudiar la oxidación proteica, ya que puede tener un impacto en la calidad de la carne y el valor nutricional. Estudios recientes han contribuido tanto al conocimiento científico sólido sobre los mecanismos básicos de oxidación, como a las metodologías avanzadas para evaluar con precisión la oxidación proteica en los sistemas alimentarios. Algunos de estos estudios han proporcionado información sobre las reacciones involucradas en las modificaciones oxidativas experimentadas por las proteínas musculares, mientras que otros han identificado una variedad de productos derivados de proteínas de músculo oxidado, incluyendo enlaces cruzados y carbonilos, y el impacto de la oxidación en la funcionalidad de la proteína y en rasgos específicos de calidad de la carne (Lund *et al.*, 2011).

3.13.1.5 Propiedades funcionales de las proteínas del musculo de pescado

Por lo general las proteínas tienen una gran influencia sobre los atributos sensoriales del alimento, por ejemplo: las propiedades texturales y organolépticas de los productos cárnicos dependen en buena medida de las proteínas musculares (miosina y actina). La funcionalidad de las proteínas alimentarias se define como aquellas propiedades físicas y químicas que derivan del comportamiento de las proteínas en los sistemas alimenticios durante el procesado, el almacenamiento, la preparación y el consumo (Vera, 2010).

En otras palabras, las propiedades funcionales de las proteínas para el procesado son atributos que, a concentración adecuada del componente respectivo o aditivos y en condiciones apropiadas, proveen de ciertas características deseables al producto. Estas propiedades de las proteínas son el resultado de su interacción con el disolvente que las rodea, iones, otras proteínas, sacáridos, y lípidos, y en fenómenos de superficie (Miranda, 2011). En la tabla 4 se muestran las propiedades funcionales de las proteínas.

Tabla 4. Propiedades funcionales de las proteínas

INTERACCIONES DE PROTEÍNAS CON		
AGUA	AGUA Y PROTEÍNAS	LÍPIDOS O GASES
Hinchamiento	Inducción de Viscosidad	Capacidad de emulsificación
Rehidratación	Gelificación	Estabilidad de emulsificación
Retención de agua	Formación de fibras	Habilidad espumante
Solubilidad	Formación de masas	Estabilidad espumante

Fuente: Miranda, 2011

De las propiedades de las proteínas destacan cuatro, las cuales se describen a continuación.

3.13.1.5.1 Solubilidad

La solubilidad es la propiedad funcional más importante en alimentos, tanto si se busca aumentarla como si se desea evitarla. Sin embargo, debido a su tamaño, las proteínas no forman soluciones en el sentido estricto, sino suspensiones o soles. En muchos casos, como en los productos emulsificados, la proteína debe ser soluble para ser funcional (Hall, 1996).

La solubilidad de la proteína está determinada por los aminoácidos presentes en la superficie de la molécula y por el balance entre las interacciones energéticas dentro de la proteína, así como entre la proteína y el solvente. La superficie de una proteína soluble en agua está cubierta por aminoácidos polares que favorecen la interacción con el agua; las proteínas insolubles en agua tienen más grupos hidrofóbicos en la superficie (Creighton, 1993)

La solubilidad de las proteínas afecta diversas propiedades de las mismas, entre estas: espesantes, espumantes, emulgentes y gelificantes; por lo cual una proteína insoluble tendrá muy poco uso en el procesamiento de alimentos. La solubilidad de las proteínas depende de las interacciones iónicas e hidrofóbicas. Las primeras promueven las interacciones proteína-agua y aumentan la solubilidad y las segundas promueven la interacción proteína-proteína y disminuyen la solubilidad (Miranda, 2011).

La solubilidad puede ser definida como el porcentaje total de proteína muscular que permanece en solución bajo condiciones específicas y que no es sedimentable bajo fuerzas moderadas de centrifugación. Por lo tanto, representa un estado de equilibrio entre el soluto (proteína) y el disolvente (Miranda, 2011).

Las principales variables que pueden alterar la solubilidad son: el pH, la temperatura y la fuerza iónica. Estas variables afectan la solubilidad de las proteínas por que causan alteraciones en los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, así como en las interacciones presentes en la estructura molecular de la proteína (Miranda, 2011). La solubilidad de las proteínas se ve incrementada a temperaturas de entre 0 y 40-50°C.; sin embargo, al elevar la temperatura, se da un incremento de

la energía cinética afectando las interacciones no covalentes que mantienen estable tanto las estructuras secundarias como terciarias de la proteína provocando con esto su desnaturalización, exponiendo los grupos hidrofóbicos que se encontraban en su interior los cuales interaccionan entre sí, provocando que se dé una disminución de la solubilidad y así precipitando (Miranda, 2011).

La fuerza iónica determina la capacidad de las proteínas (por ejemplo, miofibrilares) para ligar agua y así poder entrar en disolución. Existen dos fenómenos que ocurren a diferentes fuerzas iónicas: la solubilización (salting-in) y la insolubilización (salting-out) (Miranda, 2011).

La mayoría de las proteínas alimentarias son ácidas, por lo que exhiben una solubilidad mínima a pH 4-5 (punto isoelectrico), debido a la ausencia de repulsión electrostática, y máxima a pH's alcalinos. La desnaturalización por calor modifica el perfil de solubilidad de las proteínas frente al pH. Asimismo, a pH y fuerza iónica constantes, la solubilidad de la mayor parte de las proteínas suele incrementar con la temperatura entre 0°C y 40°C, exceptuando a las muy hidrófobas. Por encima de los 40°C se presenta la desnaturalización de la proteína, lo cual provoca un descenso de la solubilidad (Fennema, 2010).

3.13.1.5.2 Propiedades gelificantes

Un gel es un estado intermedio entre el estado sólido y el estado líquido. Técnicamente se define como un sistema sustancialmente diluido que exhibe un flujo de estado no estacionario, está formado por un entrecruzamiento de gruesas moléculas (polímeros) reticuladas por las uniones transversales (enlaces covalentes o no covalentes) formando una red inmersa en un líquido. Esta propiedad depende de la interacción agua-proteína. En esta estructura, el líquido impide que la red se rompa y por otro parte, la red mantiene atrapado al líquido; por lo cual las proteínas no pueden moverse. Esta transformación se ve facilitada por el calor, las enzimas o los cationes divalentes, en condiciones adecuadas. El papel de polímero es asumido por las proteínas miofibrilares, y el del solvente por el agua y sales minerales (Bucharles *et al.*, 1991).

La mayor parte de los geles proteicos alimentarios se preparan calentando una disolución de proteína. En este procedimiento de gelificación, la proteína en estado de solución se transforma primero en un “estado progel”, por desnaturalización. El progel suele ser un líquido viscoso en el que ya ha tenido lugar un cierto grado de polimerización. En esta etapa la proteína se despliega y se expone un número crítico de grupos funcionales (como grupos hidrófobos y grupos formadores de puentes de hidrógeno) de forma que permita el inicio de la segunda etapa, es decir, la constitución de la red tridimensional proteica. La formación del progel es irreversible, porque tienen lugar muchas interacciones proteína-proteína entre las moléculas desplegadas. Cuando el progel se enfría a temperatura ambiente o de refrigeración, el descenso de energía cinética térmica facilita la formación de enlaces no covalentes estables entre los grupos funcionales expuestos de las diversas moléculas; esto es lo que constituye la gelificación. Las fuerzas implicadas en la formación de la red son, fundamentalmente, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones electroestáticas. Las proteínas que contienen cisteína y cistina pueden polimerizar vía reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro durante el calentamiento, y formar una red covalente que continúa al enfriarse (Fennema, 2010).

Las proteínas globulares con pesos moleculares menores a 23,000 Da, no pueden formar un gel inducido por tratamiento térmico, a ninguna concentración razonable de proteína a no ser que contengan, por lo menos, un grupo sulfhidrilo o un enlace disulfuro. El pH óptimo para la formación de geles es de 7-8, para la mayor parte de las proteínas (Fennema, 2010).

3.13.1.5.4 Capacidad de retención de agua

Es una propiedad fundamental en la carne y productos cárnicos, ya que se relaciona con la jugosidad y terneza. El agua se asocia con la superficie de las proteínas por interacciones dipolo-dipolo y por puentes de hidrógeno, y forma una sola capa o monocapa en la superficie de las proteínas. Esta agua, que representa 0.3 gramos de agua por gramo de proteína, tiene propiedades diferentes al agua libre, y está fuertemente ligada a la proteína (Chinachoti, 2000). El resto del agua está adsorbida o atrapada en capilares, poros, células u otras estructuras y puede fluir libremente. La

determinación de la retención de agua mide el agua libre y parte del agua adsorbida (Hui *et al.*, 2006).

La capacidad de retención de agua se define como la facultad de la carne de conservar el agua que le es propia o el agua añadida, bajo el efecto de una tensión cualquiera (Bucharles *et al.*, 1991). El tejido muscular contiene un 75% de agua, en donde el principal responsable de la retención del agua es el componente proteico. La mayor parte de agua en el músculo está en las miofibrillas.

Esta propiedad se ve afectada por varios factores ambientales como la concentración de iones, presencias de ATP, pH, temperatura, tipo de sales y la conformación proteica. Las proteínas exhiben su hidratación mínima a su punto isoeléctrico, al que las interacciones proteína-proteína minimizan la interacción con el agua (Fennema, 2010).

La retención de agua de los concentrados proteicos aumenta en el intervalo de 20 a 100°C, en muchos casos, esto es debido a la formación de geles proteicos, en los que el agua se asocia con la superficie de las proteínas por puentes de hidrógeno y se atrapa dentro de los poros de la res proteica (Foegeding, 1989)

Las proteínas en las fibras musculares se asocian por cargas en la superficie de las moléculas proteicas. Al aumentar la concentración de sal, los iones de sodio y cloro se unen a los grupos cargados de las proteínas debilitando las interacciones entre fibras, lo que permite que entre más agua debido a que hay menos interacciones proteína-proteína y más interacciones proteína-agua (Vojdani, 1996).

Por este motivo la retención de sal tiene una gran influencia en la retención de agua. En los homogeneizados musculares aumenta la concentración de sal de 0 a 2 M NaCl a pH 6.0, las muestras homogeneizadas sin sal pierden agua, mientras que las homegeneizadas con 0.65M NaCl retienen más su peso en agua (Matsumura y Mori, 1996)

El pH de la solución también afecta a la retención de agua. Al igual que con la solubilidad, el pH influye en las cargas. En un homogeneizado muscular la retención de agua disminuye al mínimo en

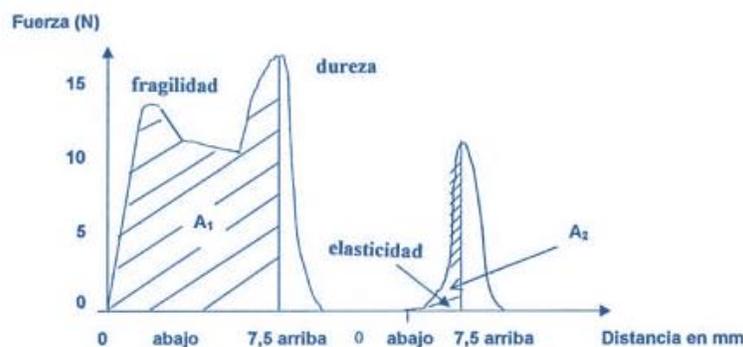
el punto isoeléctrico (pH 5.0, aproximadamente). En este momento la interacción proteína-proteína entre aminoácidos cargados es dominante. Si el pH se retira del pI la proteína se hace cada vez más cargada y las interacciones proteína-proteína ceden su lugar a proteína-agua (Chinacchi, 2000).

3.13.1.5.5 Perfil de textura

El análisis de perfil de textura (TPA) es un método objetivo correlacionado con el análisis sensorial de la textura. El ensayo comprende la compresión de una muestra dos veces seguidas, imitando el proceso de masticación.

Un pequeño cilindro de gel (aproximadamente 2cm de diámetro y 0.8cm de altura) se coloca sobre la plataforma de un texturómetro tipo prensa Instron, o similar. Sobre el mismo actúa un plato plano que lo comprime hasta una altura predeterminada. La determinación del perfil de textura involucra dos compresiones sucesivas del material a una velocidad constante durante las cuales se registra la evolución de la fuerza. En la figura 6 se muestra la curva típica de análisis de perfil de textura lograda en máquina Instron.

Figura 6. Curva típica de análisis de perfil de textura lograda en máquina Instron



Fuente: Bourne, 1978

Del análisis de las curvas de la figura 4 se logran cuatro parámetros texturales.

- Dureza (hardness) es definida como la fuerza pico logrado durante el primer ciclo de compresión.
- Cohesividad (cohesiveness) es definido como la razón del área positiva lograda durante la segunda compresión y del área positiva de la primera compresión (A_2 / A_1).
- Elasticidad (springiness antes llamado elasticity) es definida como la altura que recupera el alimento durante el tiempo que transcurre entre la primera y la segunda compresión.
- Gomosidad (Gumminess) es definida como el producto de dureza por cohesividad.

La calidad de un alimento es un concepto que el consumidor actual busca cuando adquiere cualquier tipo de producto alimenticio. Exceptuando la calidad nutricional y microbiológica de los alimentos, la calidad de estos se define como las características fisicoquímicas y funcionales de los mismos. Las principales características fisicoquímicas de la carne son: color, textura, sabor y olor; y se relacionan con el pH y Capacidad de Retención de Agua, la composición química, la degradación proteica, la interacción entre componentes y el grado de oxidación de las grasas. Por otro lado, Las propiedades funcionales de la carne se dividen en: propiedades de hidratación dependientes de las interacciones proteína-agua (retención de agua, adhesión); propiedades relacionadas con las interacciones proteína-proteína (formación de geles); y propiedades de superficie (emulsificación). Las más importantes, debido a su aplicación en la industria alimenticia, son la emulsificación de grasa (CE) y la gelificación (CG), capacidad de retención de agua (CRA). Ésta última se define como la capacidad que tiene la carne para retener agua, tanto propia como añadida, al someterse a una fuerza externa; el agua es retenida en el seno de una red de fibras musculares Su importancia radica en estar directamente relacionada con la suavidad, la jugosidad y el color; depende del pH, los cambios *postmortem* y la presencia de sales. La CE se refiere a la habilidad de las proteínas cárnicas como agentes emulsificantes. Los productos de pasta fina se consideran como emulsiones del tipo aceite en agua, afectados por factores pre y *post rigor*, así como por el tipo y concentración de proteínas, y la relación proteína-grasa. La CG es el resultado de la desnaturalización y agregación de proteínas para formar una red ordenada; la miosina, la actina y en algunos casos la paramiosina, son las principales proteínas responsables de la formación de geles. La temperatura, el pH y las sales, al modificar la estructura cuaternaria o la distribución de la carga neta de las proteínas, afectan el grado de unión de las proteínas, alteran la naturaleza y la estructura de un gel.

Estas características se conjugan entre sí para producir la calidad tanto textural como sensorial. La textura se define por la forma en que los componentes estructurales de un material se arreglan en forma micro y macroscópica, y la manifestación externa de este arreglo. Por ejemplo, la cohesividad se refleja en la habilidad cementante de las proteínas miofibrilares en productos tales como jamones reestructurados (cocidos); el masajeo forma una película proteica alrededor de trozos de carne, la cual se torna cohesiva durante el calentamiento. El *sabor* es el resultado de una mezcla compleja de sensaciones percibidas por los sentidos del gusto y olfato, aunque en varias ocasiones se acompaña de estímulos visuales, táctiles y sonoros. El *sabor* y *olor* se producen por los compuestos volátiles liberados durante el procesamiento de la carne, y por los no volátiles encontrados en las partes magra y grasa de la carne. El *sabor* y *olor* a la vez están generados por precursores, por las interacciones entre los componentes químicos de la carne, y directamente por algunos compuestos.

Por otro lado, la sucralosa está relacionada con la calidad de la carne, se han hecho estudios, en los cuales se muestra que cuando este tipo de especies está en contacto no solo con aditivos, medicamentos y con metales pesados, presentan una licuefacción del cerebro, por lo que se cree que también afecta la calidad fisicoquímica, textural y sensorial de su carne.

4. JUSTIFICACIÓN

Existe una clara relación entre los hábitos alimenticios y la salud. Esta relación es clara en enfermedades como la diabetes mellitus (DM) tipo II, la osteoporosis, la hipertensión, el cáncer del tubo digestivo o de mama, la obesidad y las afecciones cardiovasculares. Estos padecimientos están entre las principales causas de mortalidad en el mundo; y a nivel mundial, México ocupa el segundo lugar en DM tipo II y en obesidad. Aunado a que México es el consumidor de refrescos más grande del mundo. Existe por lo tanto la necesidad de mejorar la salud a través de una reformulación en alimentos que no contengan ninguna caloría, pero ofreciendo el mismo sabor, por ello se propone el uso de diversos edulcorantes entre los que destacan el acesulfame, aspartame y sucralosa, siendo este último uno de los más utilizados.

Algunos estudios de toxicidad indican que la sucralosa no tiene modo específico de acción tóxica conocido, sin embargo, es resistente a la fotodegradación por lo que proyecta aún más el impacto de este compuesto que es persistente bajo una exposición de irradiación solar intensiva. Una vez excretada, la sucralosa no se degrada dentro del proceso de tratamiento de las aguas residuales y se ha detectado en los efluentes municipales y las aguas superficiales. Se dispone de pocos datos en la literatura que investigue los efectos de la sucralosa en los organismos acuáticos. Como la sucralosa ha sido ampliamente detectada en las aguas superficiales, se necesitan estudios para evaluar el potencial y observar los efectos adversos asociados con este compuesto. Estudios ecotoxicológicos serían útiles para comprender la posible ecotoxicidad asociada con la sucralosa.

Los edulcorantes artificiales como la sucralosa producen una gran cantidad de agentes oxidantes que pueden dañar a las proteínas. Uno de los daños que es utilizado como marcador de la oxidación de las proteínas es su carbonilación, la cual puede llevarse a cabo por la oxidación directa de los residuos de lisina, arginina, prolina y treolina. También pueden ser introducidos por reacciones con aldehídos (malondialdehído, 4-hidroxi-2-nonenal) producidos durante la lipoperoxidación o al incorporar un grupo carbonilo a la proteína al reaccionar residuos de lisina con azúcares reductores o de sus productos de oxidación. Debido a los cambios producidos por los agentes oxidantes en las proteínas tenemos que, también pueden existir alteraciones de las características fisicoquímicas,

texturales, y funcionales sobre la carpa común (*Cyprinus carpio*). Por lo que es necesario llevar a cabo un estudio para evaluar el efecto de la sucralosa sobre estas características.

5. HIPÓTESIS.

Si la sucralosa produce toxicidad mediante el mecanismo de estrés oxidativo entonces puede tener efecto en las propiedades fisicoquímicas y texturales de la carne de carpa común (*Cyprinus carpio*).

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General:

Evaluar la toxicidad inducida por sucralosa en *Cyprinus carpio* y determinar su efecto en las propiedades fisicoquímicas y texturales de la carne de carpa común.

6.2 Objetivos Específicos:

- Determinar la toxicidad aguda inducida por sucralosa en *Cyprinus carpio*.
- Determinar el estrés oxidativo inducido por sucralosa en *Cyprinus carpio* a través de la determinación del grado de lipoperoxidación, contenido de hidróperóxidos, contenido de proteínas carboniladas y actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT)
- Determinar las características fisicoquímicas y texturales de la carne de carpa común expuesta a sucralosa.

7. METODOLOGÍA

7.1 Colecta y mantenimiento de la carpa (*Cyprinus carpio*)

Las carpas con una longitud de 18.39 ± 0.31 cm y peso de 50.71 ± 7.8 g se obtuvieron del centro acuícola Tiacaque, Estado de México. La carpa común fue transportada de forma segura al laboratorio en bolsas de polietileno bien empaquetadas las cuales contienen que contienen agua vivificada. La carpa común *Cyprinus carpio* fue sembrada en un gran tanque que contenía agua del grifo sin cloro y se aclimataron a las condiciones de ensayo durante 30 días antes de su uso en el experimento. Durante la aclimatación los peces fueron alimentados con Pedregal Silver Corp^{MR}. Tres cuartas partes del agua fueron reemplazadas cada 24 horas para mantener el medio ambiente saludable. Las características fisicoquímicas del agua del grifo se mantuvieron a las siguientes condiciones [temperatura (20 ± 2 ° C), la concentración de oxígeno de 80-90%, pH (7.5 a 8.0), la alcalinidad total ($17,8 \pm 7,3$ mg / L) dureza total ($18,7 \pm 0,6$ mg / L). La carpa se mantuvo en los ciclos naturales de luz y oscuridad.

7.2 Determinación de la toxicidad aguda

Los sistemas de intoxicación consistieron en peceras de 120x80x40 cm. Se tuvieron dos sistemas de prueba los cuales contenían dos diferentes concentraciones de sucralosa ($0.05 \mu\text{g/L}$ y $155 \mu\text{g/L}$) en agua reconstituida y un tercer sistema control libre de edulcorante, se seleccionaron 6 carpas al azar (usando el método de número aleatorio) y se colocaron en cada sistema. Un total de 270 peces fueron utilizados en la determinación de la toxicidad del xenobiótico. Se expusieron los organismos a 12, 24, 48, 72 y 96 horas. El estudio se realizó por triplicado. Al finalizar cada tiempo de exposición las carpas fueron retiradas de los sistemas y se colocaron en una pecera que contuvo 50mg/L de aceite de clavo, con el fin de anestésiar a los organismos (Yamanaka *et al.*, 2011). Se obtuvieron muestras sanguíneas, branquias, hígado, cerebro y músculo. Las muestras sanguíneas fueron tomadas en la vena caudal con una jeringa hipodérmica de 1ml previamente heparinizada y por

cada 100 μL de sangre se adicionaron 400 μL de PB a pH 7.4, y para la obtención de las muestras restantes se realizó una disección en un baño de hielo, después se pesaron y homogenizaron en 2 mL de PBS pH 7.4 y se centrifugaron a 12 500 rpm a -4°C durante 15 minutos para la obtención del sobrenadante. Todos los biomarcadores: CHP, PLX, CPC, SOD y CAT, se realizaron con el sobrenadante.

7.3 Evaluación del estrés oxidativo

Después de la punción para la obtención de sangre, las muestras fueron sacrificadas por dislocación cervical y se colocaron en baño de hielo. Se retiraron el músculo, branquias, cerebro e hígado, colocándolo en tampón de fosfato [NaCl (Sigma-Aldrich) 0.138M; KCl (VETEC, Sigma-Aldrich) 0.0027 M] con una solución de pH de 7.4 y los tejidos se homogeneizaron por separado. El sobrenadante se centrifugó a 12,500 rpm a una temperatura de -4°C durante 15 minutos. Las muestras de los tejidos se almacenaron a -70°C antes del análisis.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos heparinizados y se colocan en tampón de fosfato [NaCl (Sigma-Aldrich) 0.138M; KCl (VETEC, Sigma-Aldrich) 0.0027 M] con una solución de pH de 7.4 y ultrasonificados. Las muestras de sangre se almacenaron a -70°C antes del análisis.

Los siguientes biomarcadores que se evaluaron fueron: CHP, LPX, PCC y la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT Y GPx. Todos los ensayos se realizaron con el sobrenadante.

Determinación de hidroperóxidos (Método Jiang, 1992) para 100 μL de sobrenadante (previamente desproteinizado con ácido tricloroacético al 10%) Sigma-Aldrich 900 μL de la mezcla de reacción [mM de FeSO_4 0.25 (Sigma-Aldrich), H_2SO_4 25mM (Sigma-Aldrich), 0.1 mM de naranja de xilenol (Sigma-Aldrich) y 4 hidroxitolueno de butilo mM (Sigma-Aldrich) en 90% (v/v) de metanol (Sigma-Aldrich)]. La mezcla se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia se leyó a 560nm frente a un blanco que contenía sólo mezcla de reacción. Los resultados se interpolaron a una curva tipo y se expresaron como nM de CHP (hidroperóxido de cumeno) (Sigma-Aldrich)/mg de proteína.

7.3.1 Determinación del grado de lipoperoxidación (Método de Buege y Aust, 1979)

A 100 μ L de la muestra (sin centrifugar) se completa a 1 mL con solución reguladora tris-HCl 150 mM a pH 7.4 y se le adiciona 2mL de TCA-TBA (ácido tiobarbitúrico al 0.375% en ácido tricloroacético al 15%) se induce un choque térmico de la muestra con agua en ebullición y se deja en un baño maría. Se incuba a 37 °C por 30 min. Concluido el tiempo se centrifugo a 3500 rpm durante 10 min. y se determinó la absorbancia a 535 nm. Los resultados se expresan en mM de malondialdehído / mg proteínas / g tejido, usando el coeficiente de extinción molecular (CEM) el cual es de $1.56 \times 10^5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

$$\text{nM de malondialdehído / mg proteínas / g tejido} = \text{Abs} / \text{CEM}$$

7.3.2 Determinación de los niveles de oxidación de proteínas (Método Burcham, 2007; Parvez y Raisuddin, 2005; Levine *et al.*, 1994)

A 100 μ L de sobrenadante se le adicionaron 150 μ L de 10mM de DNPH/2M HCl. Se incubo durante 1 h a oscuridad. Después de la incubación se le adicionaron 500 μ L de tricloroacético al 20% y se deja reposar durante 15 minutos a 4°C. El precipitado se centrifugo a 11000 rpm durante 5 minutos. El botón se lavó tres veces con etanol-acetato de etilo 1:1 y posteriormente se disolvió en 1 mL de una solución de 6M guanidina pH 2.3 y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. La absorbancia se determinó a 366 nm. Los resultados se expresan en mM o nM de carbonilos reactivos (C=O) /mg proteínas, se utiliza el coeficiente de extinción molecular (CEM) de $21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$$\text{nM de carbonilos reactivos / mg proteínas / g tejido} = \text{Abs} / \text{CEM}$$

7.3.3 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (Método de Misra y Fridovich, 1972)

Se colocaron 40 μ L del homogeneizado en una celda de cuarzo y se adicionaron 260 μ L de la solución amortiguadora de carbonatos (50 mM de carbonato de sodio y 0.1 mM EDTA) a pH 10.2. Se agregaron 200 μ L de adrenalina 30 mM, y se determinó la absorbancia a 480 nm, a los 30 seg y 5

min. Los resultados se expresan en M adrenalina /mg proteínas, se utiliza el coeficiente de extinción molecular (CEM) de $21 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$$\text{M de adrenalina / mg proteínas / g tejido} = \text{Abs} / \text{CEM}$$

7.3.4 Determinación de la actividad de la catalasa (Método de Radi *et al.*, 1991)

A 20 μL del sobrenadante de la muestra fueron colocados en una celda de cuarzo, se le agregaron 280 μL de la solución amortiguadora de aislamiento (0.3 M sucrosa, 1 mM EDTA, 5 mM HEPES y 5 mM KH_2PO_4) y 200 μL de la solución de H_2O_2 20 mM. Posteriormente se realizaron las lecturas a 240 nm, a 0 y 60 seg. Los resultados que se obtienen de las absorbancias son utilizados en la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de catalasa} = (A_0 - A_{60}) / \text{CEM}$$

Donde el CEM del $\text{H}_2\text{O}_2 = 0.043 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; los datos son expresados en mM de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/g}$ tejido

7.4 Análisis fisicoquímicos

7.4.1 Medición pH (Método NMX-F-317- S-1978 “Determinación de pH en Alimentos”)

Se tomó una porción de 10 g de músculo, se mezcló con 90 mL de agua destilada. Se licuó hasta obtener una pasta consistente y uniforme. Se ajustó la temperatura de la pasta a $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Finalmente se realizó la lectura de pH con un potenciómetro previamente calibrado.

7.4.2 Capacidad de retención de agua (CRA). Método Honikel y Hamm (1983) reportado en (Dublán, 2006)

Se tomaron 10 g de músculo y se picaron. Se colocaron 5 g en un tubo de centrifuga y se añadieron 8mL de una disolución de NaCl 0.6 M. Se agitó con varilla de vidrio durante 1 min en baño de hielo,

se dejó reposar 30 minutos. Se agitó 1 minuto. Se centrifugó durante 30 minutos a 2500 rpm. Se decantó el sobrenadante y se midió el volumen. Se reportó el volumen de NaCl retenido por 100 g de muestra.

7.4.3 Solubilidad. Método (Ternes, 2004)

Se extrajeron las proteínas (5 mg/mL, a pH 7) y se centrifugó a una temperatura de 4 °C para evitar su desnaturalización. Al sobrenadante extraído se le midió la concentración de proteínas mediante método biuret. Se reportó la solubilidad como la relación entre el contenido de proteínas del sobrenadante y el contenido de la proteína sin centrifugar por 100.

7.4.4 Determinación de grupos disulfuro y sulfhídrido totales. Método

Ellman (1959), reportado en (Dublán, 2006)

Se mezcló 1 mL de la disolución proteica (5 mg/mL a pH 7) y 9 mL de urea 8 M disuelta en un amortiguador de Tris-Glicina-EDTA (10.4 g/L Tris; 6.9 g/L Glicina; 1.2 g/L EDTA; pH 8). Se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min. Se tomaron 3 mL de la mezcla y se añadieron 50 mL de una disolución del reactivo 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzónico (4 mg/mL en la misma disolución amortiguadora). Se dejó reposar durante 30 min en obscuridad. Se midió la absorbancia a 412 nm. Se transformó el valor de absorbancia empleando la siguiente ecuación. $SS \text{ o } SH_T = (75,53(DO_1 - DO_2) / C)$

Siendo:

SS o SH_T la concentración de los disulfuros o sulfhídridos totales en la muestra ($\mu\text{moles SH}$ o SS/g proteína)

DO_1 la absorbancia a 412 nm de la muestra a los 15 min de agregarse el reactivo.

DO_2 la absorbancia a 412 nm del blanco de reactivos.

C es la concentración de proteína en la muestra (mg/mL).

7.5 identificación de proteínas

Concentración de proteína. Método biuret reportado en (Dublán, 2006). Utilizando tubos de ensayo se midió 1 mL de las disoluciones de proteína y se agregaron 3 mL del reactivo de biuret. Se homogeneizó y se dejó en reposo durante 30 minutos en la sombra sin contacto directo con la luz.

Se midió la absorbancia de la muestra a una $\lambda = 540$ nm. Los datos obtenidos se relacionarán con respecto a una curva patrón de Seroalbúmina-bovina de concentración 0-10 mg/mL. Reactivo de biuret de acuerdo a Gornall (1948). Se disolvió 1.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 6 g de tartrato de sodio y potasio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), se transfirió a un matraz volumétrico de 1000 mL se disolvió con 500 mL de agua destilada, se agregaron 300 mL de hidróxido de sodio 10 % y se llevó a volumen con agua destilada.

Formación de gel. Extraídas las proteínas, se vertieron en un contenedor adecuado. Se colocó el contenedor en un baño de agua. Se sometió a calentamiento gradual de $1^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar una temperatura interna del gel de 80°C para inducir la gelificación. Se retiraron los contenedores y se colocaron en baño de hielo para enfriar. Se almacenó en refrigeración no mayor a 4°C para madurar la estructura del gel. Se realizó prueba de penetración de geles. Se penetró la superficie del gel con un vástago de acrílico de 8 mm de diámetro a una velocidad de 25 mm/s.

Análisis de textura. Método García (Dublán, 2006). Se realizó en geles elaborados a partir de carne de carpa los cuales fueron medidos instrumentalmente con un texturómetro. Se definieron los parámetros de la muestra como tamaño, temperatura y aplicación de la fuerza con respecto a la muestra. Se definieron los procesos de evaluación de textura estos pueden ser:

- 1.- Esfuerzo al corte por medio de la navaja Warner-Bratzler
- 2.- Análisis del perfil de textura (TPA), a través de 5 parámetros: dureza, cohesividad, masticabilidad, elasticidad, resiliencia y adhesividad.

7.6 Análisis estadístico

Se llevó a cabo mediante un análisis de varianza ANOVA y para diferencia de medias se utilizó el método de Bonferroni y con un nivel de significancia ($p < 0.05$), mediante el programa estadístico Statgraphics versión 17.

8. RESULTADOS

Contenido de hidroperóxidos

En la Figura 7, se observa el contenido de hidroperóxidos, mostrándose un incremento significativo con respecto al testigo ($P < 0.005$) en sangre a las 12, 24, 48 y 72 horas en la concentración de 0.05 µg/L (127.9, 131.5, 122.1 y 128.2 % respectivamente) y a las 24 horas para la concentración de 155 µg/L de (130.9%). A las 96 horas para la concentración de 0.05 µg/L y a las 12, 48, 72 y 96 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un decremento estadísticamente significativo de (91.1%) y (82.6, 43, 96.9 y 44.5% respectivamente); en hígado a las 48 horas en la concentración de 0.05 µg/L se observó un incremento significativo con respecto al testigo (159.7%), de igual manera se observó un incremento significativo a las 48 y 72 horas para la concentración de 155 µg/L de (132.3 y 135% respectivamente), a las 12, 24, 72 y 96 horas en la concentración de 0.05 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (40.1, 24.2, 38 y 38% respectivamente); la concentración de 155 µg/L tuvo un decremento significativo con respecto al control a las 12, 24 y 96 horas (46.7, 56.3 y 21% respectivamente); en branquias a las 12 horas para la concentración de 0.05 µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (118.6%), a las 48 y 72 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (189.5 y 101.7% respectivamente), a las 24, 48, 72 y 96 horas para la concentración de 0.05 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (39.3, 98, 62.9 y 27.4% respectivamente); la concentración de 155 µg/L tuvo un decremento significativo con respecto al control a las 12, 24 y 96 horas (97.9, 59.7 y 60.4 respectivamente); en cerebro se observó un incremento significativo con respecto al control en la concentración de 0.05 µg/L a las 48 y 72 horas (500.4 y 210% respectivamente), a las 12, 48 y 72 horas en la concentración de 155 µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (100.2, 353.3 y 432.5% respectivamente), a las 12, 24 y 96 horas para la concentración de 0.05 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (88.2, 26.5 y 45.1% respectivamente), a las 24 y 96 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (71.9 y 50.4 respectivamente); en músculo se observó un incremento significativo con respecto al control en la

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR SUCRALOSA EN (*Cyprinus carpio*) Y DETERMINAR SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y TEXTURALES

concentración de 0.05 µg/L a las 24, 48, 72 y 96 horas (118, 404, 315.8 y 128.2% respectivamente), a las 12, 48 y 72 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (232.2, 185.8 y 142.8% respectivamente), a las 12 horas para la concentración de 0.05 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (87.8%), a las 24 y 96 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (43.5 y 22.4% respectivamente).

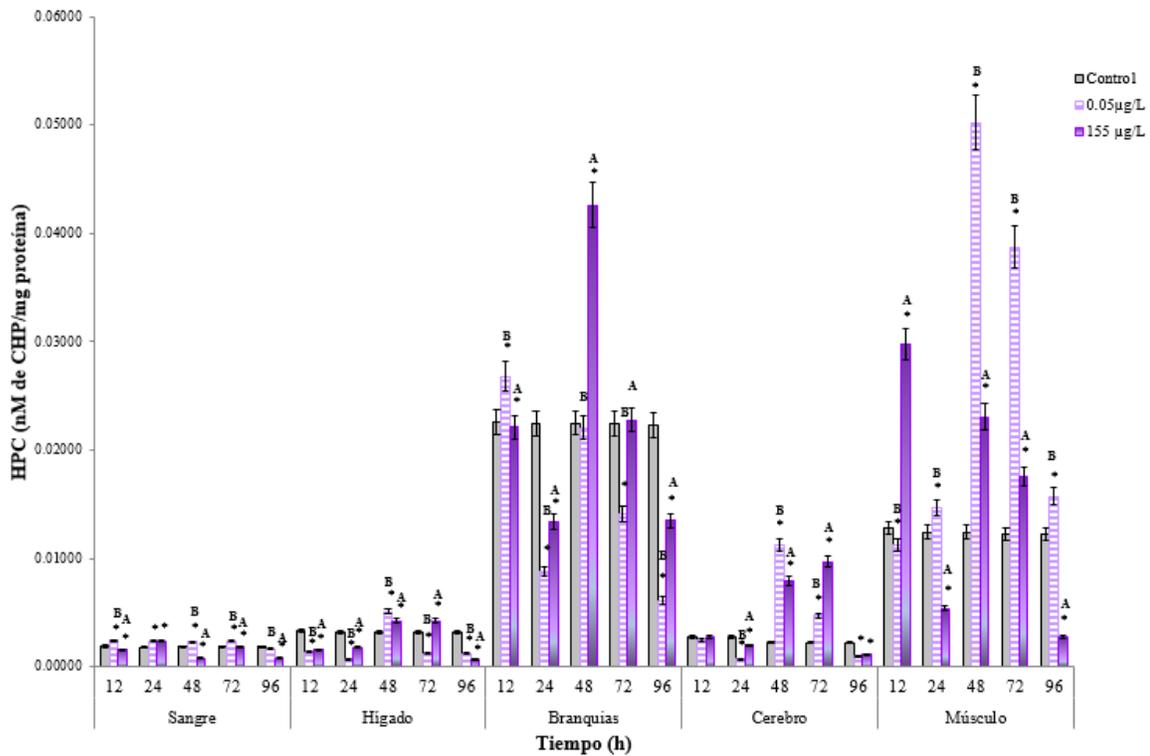


Figura 7. Contenido de hidroperóxidos en sangre, hígado, branquias, cerebro y músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos concentraciones de sucralosa, 0.05 µg/mL y 155 µg/mL, por 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

Notas: (*) diferencia significativa con respecto al control; (A) diferencia significativa con respecto a la concentración 0.05 µg/mL; (B) diferencia significativa con respecto a la concentración 155 µg/mL con un nivel de significancia de ($p < 0.05$).

LPX

En la Figura 8, se observa el contenido de lipoperoxidación, mostrándose un incremento significativo con respecto al testigo ($P < 0.005$) en sangre a las 24 y 72 horas en la concentración de $0.05 \mu\text{g/L}$ (107.7 y 108.3% respectivamente) y a las 12, 24 y 72 horas para la concentración de $155 \mu\text{g/L}$ (155.6, 161.6 y 124.1% respectivamente). A las 12, 48 y 96 horas para la concentración de $0.05 \mu\text{g/L}$ y a las 48 y 96 horas para la concentración de $155 \mu\text{g/L}$ se observó un decremento estadísticamente significativo de (99.2, 80.8 y 88.8% respectivamente) y (86.4 y 82% respectivamente); en hígado a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas en la concentración de $0.05 \mu\text{g/L}$ se observó un decremento significativo con respecto al control (57.4, 60.8, 46.5, 64.7 y 51.8% respectivamente); la concentración de $155 \mu\text{g/L}$ tuvo un decremento significativo con respecto al control a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas (82, 90, 91.2, 49.7, 74.1 y 47.8 % respectivamente); en branquias a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas para la concentración de $0.05 \mu\text{g/L}$ se observó un incremento significativo con respecto al control (829.2, 316.5, 781.4, 522.7 y 262.6 % respectivamente), a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas para la concentración de $155 \mu\text{g/L}$ se observó un incremento significativo con respecto al control (883.9, 548.6, 1252.9, 1113.3 y 693.5 % respectivamente); en cerebro se observó un incremento significativo con respecto al control en la concentración de $0.05 \mu\text{g/L}$ a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas (260.6, 333.5, 3943.4, 623.4 y 7451% respectivamente), a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas en la concentración de $155 \mu\text{g/L}$ se observó un incremento significativo con respecto al control (782.2, 754.5, 2973.5, 1079.5 y 4301.7% respectivamente); en músculo se observó un incremento significativo con respecto al control en la concentración de $0.05 \mu\text{g/L}$ a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas (123.8, 151.2, 517.1, 176 y 106% respectivamente), a las 12, 24, 48 y 72 horas para la concentración de $155 \mu\text{g/L}$ se observó un incremento significativo con respecto al control (233.5, 107.7, 447.9 y 372.2% respectivamente), a las 96 horas para la concentración de $155 \mu\text{g/L}$ se observó un decremento significativo con respecto al control (58.3%).

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR SUCRALOSA EN (*Cyprinus carpio*) Y DETERMINAR SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y TEXTURALES

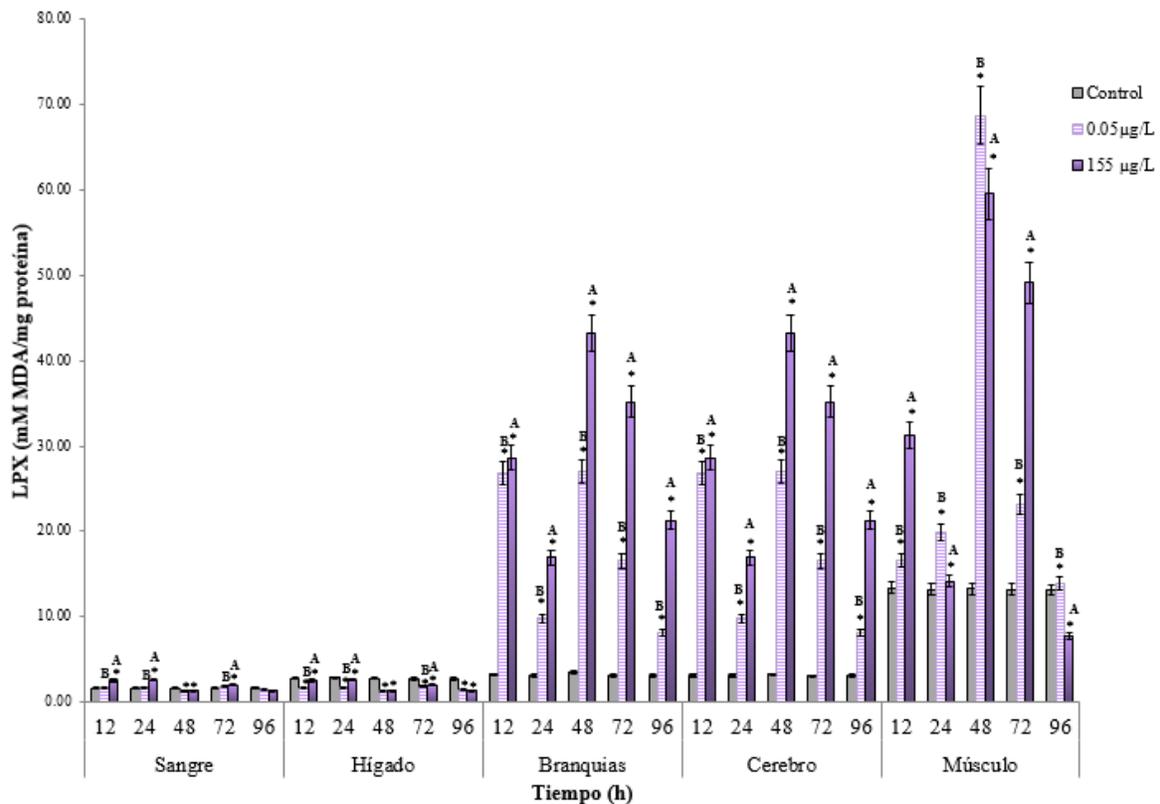


Figura 8. Grado de lipoperoxidación en sangre, hígado, branquias, cerebro y músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos concentraciones de sucralosa, 0.05 µg/mL y 155 µg/mL, por 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

Notas: (*) diferencia significativa con respecto al control; (A) diferencia significativa con respecto a la concentración 0.05 µg/mL; (B) diferencia significativa con respecto a la concentración 155 µg/mL con un nivel de significancia de ($p < 0.05$).

PCC

En la Figura 9, se observa el contenido de proteínas carboniladas, mostrándose un incremento significativo con respecto al testigo ($P < 0.005$) en sangre a las 12 horas para la concentración de 155 µg/L de (135.3%). A las 12, 24, 48, 72 y 96 horas para la concentración de 0.05 µg/L y a las 24, 48, 72 y 96 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un decremento estadísticamente significativo de (45.7, 33.1, 17.9, 95.1 y 14.7% respectivamente) y (80.2, 66.3, 81.9 y 81.3 % respectivamente) ; en hígado a las 48 y 72 horas en la concentración de 0.05µg/L se observó un

incremento significativo con respecto al testigo (242.9 y 131.7% respectivamente), de igual manera se observó un incremento significativo a las 48 y 72 horas para la concentración de 155 µg/L de (248 y 511.1% respectivamente), a las 12, 24 y 96 horas en la concentración de 0.05µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (50.5, 20.4 y 67.5% respectivamente); la concentración de 155 µg/L tuvo un decremento significativo con respecto al control a las 12, 24 y 96 horas (94.5, 76.7 y 40.5% respectivamente); en branquias a las 12, 48 y 72 horas para la concentración de 0.05µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (186.4, 193 y 105.6% respectivamente) , a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (336.4, 270.8, 330.6, 288.9 y 367.6% respectivamente), a las 24 y 96 horas para la concentración de 0.05 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (59.7 y 49.9% respectivamente); en cerebro se observó un incremento significativo con respecto al control en la concentración de 0.05 µg/L a las 48 horas (175.8%), a las 72 horas en la concentración de 155 µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (149.7%), a las 12, 24, 72 y 96 horas para la concentración de 0.05 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (20.1, 20.7, 36.7 y 11.7% respectivamente), a las 12, 24, 48 y 96 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (59, 26.6, 69.4 y 28.6% respectivamente); en músculo se observó un incremento significativo con respecto al control en la concentración de 0.05 µg/L a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas (241.3, 294.6, 1149.2, 160.9 y 110.9 % respectivamente), a las 12, 24, 48 y 72 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (296, 111.3, 559.5 y 220.7% respectivamente), a las 96 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (31.3%).

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR SUCRALOSA EN (*Cyprinus carpio*) Y DETERMINAR SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y TEXTURALES

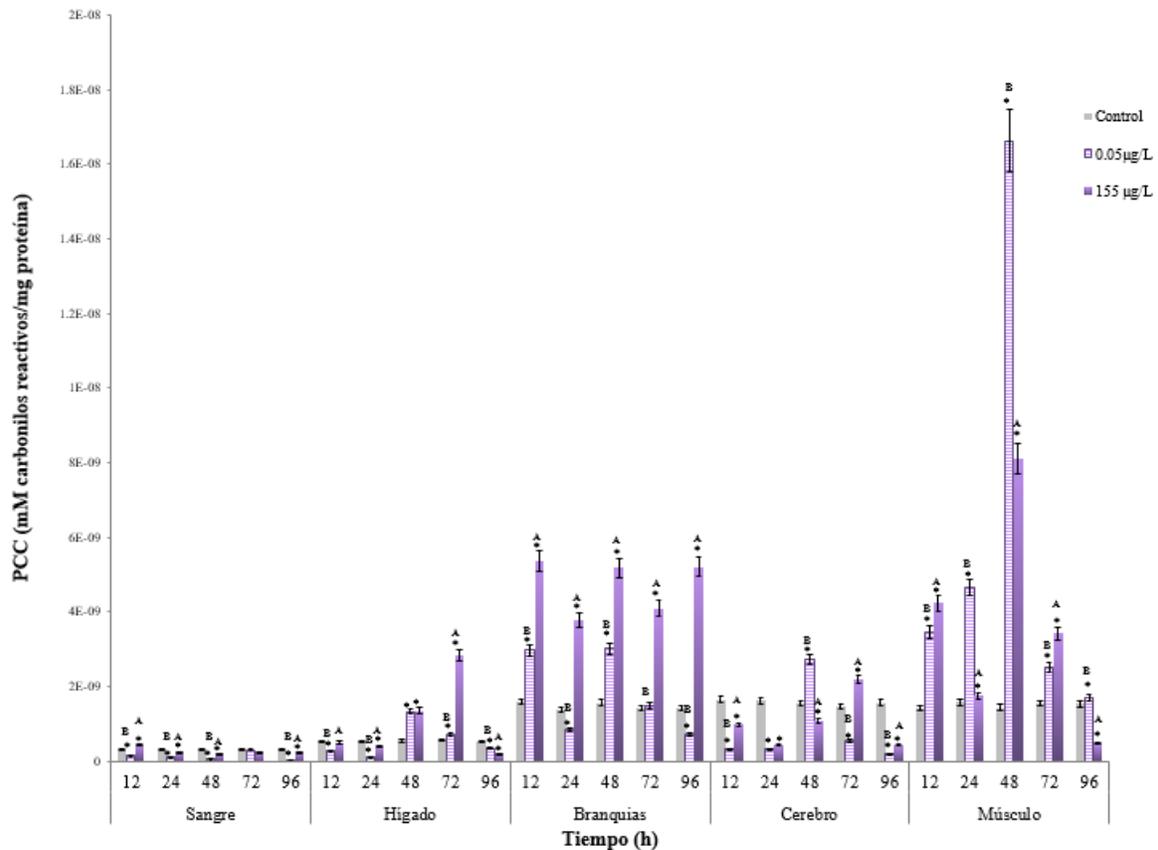


Figura 9. Contenido de proteínas carboniladas en sangre, hígado, branquias, cerebro y músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos concentraciones de sucralosa, 0.05 µg/mL y 155 µg/mL, por 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

Notas: (*) diferencia significativa con respecto al control; (A) diferencia significativa con respecto a la concentración 0.05 µg/mL; (B) diferencia significativa con respecto a la concentración 155 µg/mL con un nivel de significancia de ($p < 0.05$).

SOD

En la Figura 10, se observa la actividad de la superóxido dismutasa, mostrándose un incremento significativo con respecto al testigo ($P < 0.005$) en sangre a las 12, 48 y 72 horas en la concentración de 0.05 µg/L (120.4, 280.9 y 179.2% respectivamente) y a las 12, 24, 72 y 96 horas para la concentración de 155 µg/L de (212.7, 552.9, 156.8 y 223.6% respectivamente). A las 24 y 96 horas para la concentración de 0.05 µg/L y a las 12, 48 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un decremento estadísticamente significativo de (47.1 y 93.4% respectivamente) y (38.7%) ; en

hígado a las 48 horas en la concentración de 0.05µg/L se observó un incremento significativo con respecto al testigo (980.1%), de igual manera se observó un incremento significativo a las 72 horas para la concentración de 155 µg/L de (1445.1%), a las 12, 24, 72 y 96 horas en la concentración de 0.05µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (77.6, 32.2, 42.9 y 26.5% respectivamente); la concentración de 155 µg/L tuvo un decremento significativo con respecto al control a las 12, 24, 48 y 96 horas (62.8, 14.8, 57.8 y 3.3% respectivamente); en branquias a las 12 y 96 horas para la concentración de 0.05µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (627.2 y 213.2% respectivamente) , a las 12, 24, 48 y 72 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (126.1, 110.9, 377.5 y 178.1% respectivamente), a las 24, 48 y 72 horas para la concentración de 0.05 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (15.3, 6.8 y 62.4% respectivamente), la concentración de 155 µg/L tuvo un decremento significativo con respecto al control a las 96 horas (75%); en cerebro se observó un incremento significativo con respecto al control en la concentración de 0.05 µg/L a las 12 y 48 horas (120.5 y 224.8% respectivamente), a las 12, 48 y 72 horas en la concentración de 155 µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (194.5, 384.3 y 740.2% respectivamente), a las 12, 72 y 96 horas para la concentración de 0.05 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (29.2, 98.4 y 40.8% respectivamente), a las 24 y 96 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (96.8 y 50.1% respectivamente); en músculo se observó un incremento significativo con respecto al control en la concentración de 0.05 µg/L a las 12, 24, 48 y 72 horas (104, 256.5, 476.3 y 288.4% respectivamente), a las 12, 48 y 72 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (692.4, 432.3 y 209.6% respectivamente), a las 96 horas para la concentración de 0.05 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (78.8%) , a las 24 y 96 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (59.4 y 87% respectivamente).

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR SUCRALOSA EN (*Cyprinus carpio*) Y DETERMINAR SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y TEXTURALES

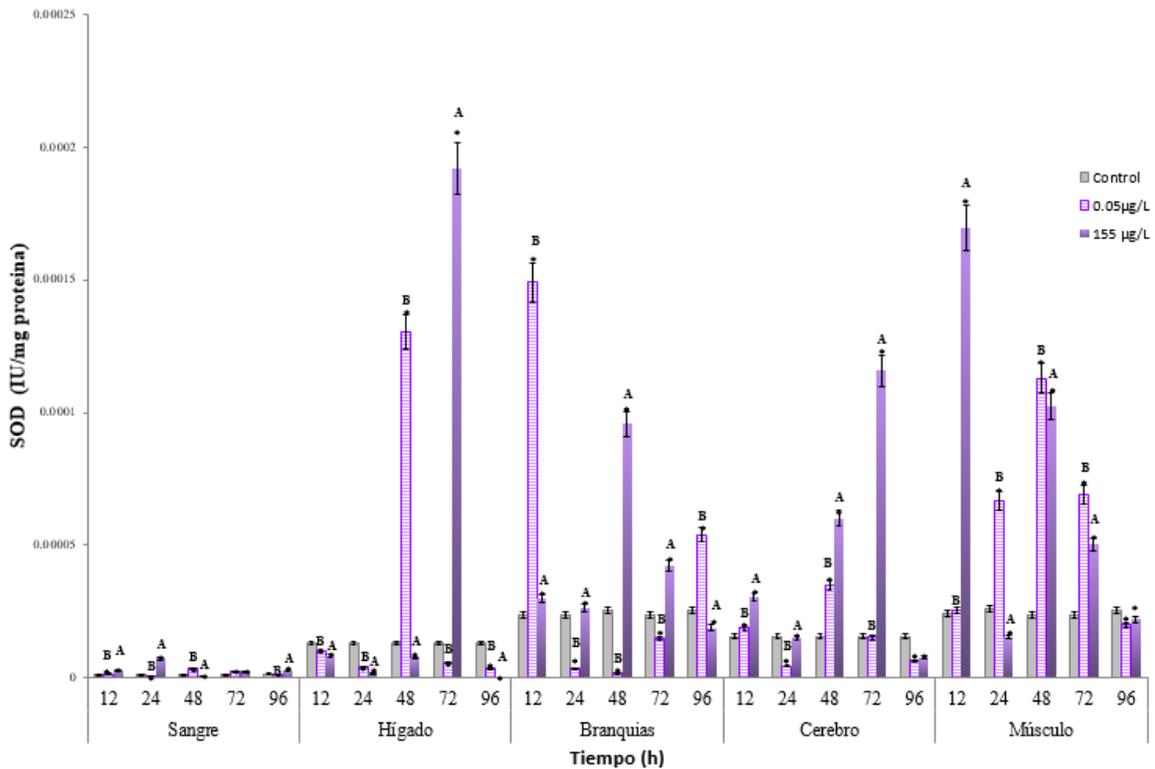


Figura 10. Actividad de la Superóxido dismutasa en sangre, hígado, branquias, cerebro y músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos concentraciones de sucralosa, 0.05 µg/mL y 155 µg/mL, por 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

Notas: (*) diferencia significativa con respecto al control; (A) diferencia significativa con respecto a la concentración 0.05 µg/mL; (B) diferencia significativa con respecto a la concentración 155 µg/mL con un nivel de significancia de ($p < 0.05$).

CAT

En la Figura 11, se observa la actividad de la catalasa, mostrándose un incremento significativo con respecto al testigo ($P < 0.005$) en sangre a las 12, 48, 72, y 96 horas en la concentración de 0.05 µg/L (124.2, 183.2, 165.5 y 144.9% respectivamente) y a las 12 y 24 horas para la concentración de 155 µg/L de (225.3 y 268.6% respectivamente). A las 24 horas para la concentración de 0.05 µg/L y a las 48, 72 y 96 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un decremento estadísticamente significativo de (67.4%) y (10.7, 7.4 y 13.1% respectivamente); en hígado a las 48 horas en la concentración de 0.05 µg/L se observó un incremento significativo con respecto al testigo (244.7%),

igual manera se observó un incremento significativo a las 48 horas para la concentración de 155 µg/L de (167.9%), a las 12, 24, 72 y 96 horas en la concentración de 0.05µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (51.9, 30.8, 33.8 y 48.8% respectivamente); la concentración de 155 µg/L tuvo un decremento significativo con respecto al control a las 12, 24, 72 y 96 horas (32.5, 15.3, 27.1 y 8.6% respectivamente); en branquias a las 48 horas para la concentración de 0.05µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (206.8%), a las 12, 48 y 96 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (105.3, 821.7 y 361.1% respectivamente); para la concentración de 0.05 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control a las 12, 24, 72 y 96 horas (33, 77, 42.5 y 75.2% respectivamente), la concentración de 155 µg/L tuvo un decremento significativo con respecto al control a las 24 y 72 horas (45.5 y 90.4% respectivamente); en cerebro se observó un incremento significativo con respecto al control en la concentración de 0.05 µg/L a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas (606, 220.5, 742.6, 2841.7 y 254.6% respectivamente), a las 12, 48, 72 y 96 horas en la concentración de 155 µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (294.4, 1080.6, 2067.2 y 471.6% respectivamente), a las 24 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un decremento significativo con respecto al control (47.8%); en músculo se observó un incremento significativo con respecto al control en la concentración de 0.05 µg/L a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas (124.8, 298.9, 513.6, 173.4 y 209.2% respectivamente), a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas para la concentración de 155 µg/L se observó un incremento significativo con respecto al control (650.8, 106.4, 890.2, 367.1 y 1942.5% respectivamente).

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR SUCRALOSA EN (*Cyprinus carpio*) Y DETERMINAR SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y TEXTURALES

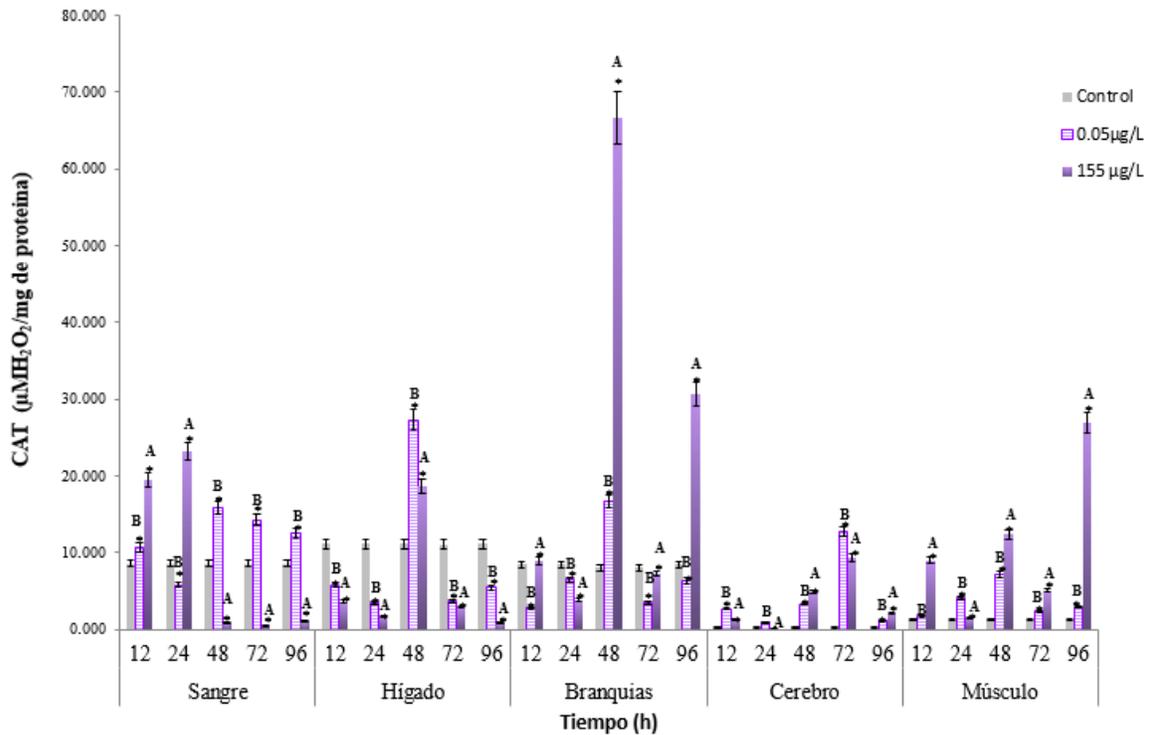


Figura 11. Actividad de la Catalasa en sangre, hígado, branquias, cerebro y músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos concentraciones de sucralosa, 0.05 µg/mL y 155 µg/mL, por 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

Notas: (*) diferencia significativa con respecto al control; (A) diferencia significativa con respecto a la concentración 0.05 µg/mL; (B) diferencia significativa con respecto a la concentración 155 µg/mL con un nivel de significancia de ($p < 0.05$).

La Figura 12 muestra el contenido de grupos sulfhidrilos; observándose un decremento significativo con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 0.05 µg/L a los cinco tiempos de exposición 12, 24, 48, 72 y 96 horas teniendo los siguientes valores (41.83, 12.12, 5.62, 32.06 y 29.58% respectivamente), no siendo así, para la concentración de 155 µg/L la cual mostró un incremento significativo con respecto al control a los cinco tiempos de exposición arrojando los siguientes valores (22.64, 33.06, 74.11, 30.15 y 16.19% respectivamente).

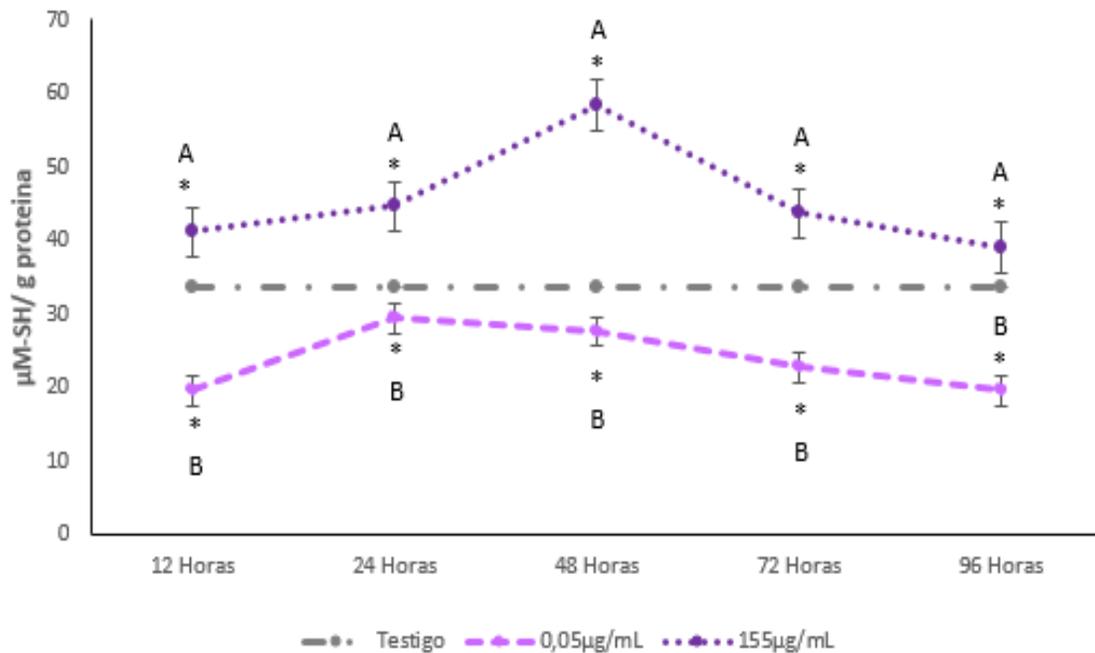


Figura 12. Contenido de grupos sulfhidrilos en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos concentraciones de sucralosa, 0.05 µg/mL y 155 µg/mL, por 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

Notas: (*) diferencia significativa con respecto al control; (A) diferencia significativa con respecto a la concentración 0.05 µg/mL; (B) diferencia significativa con respecto a la concentración 155 µg/mL con un nivel de significancia de ($p < 0.05$).

En la figura 13 se observa el comportamiento del pH a los cinco tiempos de exposición mostrando un incremento con respecto al control, para la concentración de 0.05 µg/L a las 12 horas de exposición arrojando un valor de 2.29% y un decremento significativo a las 24, 48, 72 y 96 horas teniendo los siguientes valores (0.14, 1.57, 2.91 y 2.34% respectivamente); con respecto a la concentración de 155 µg/L se observó un incremento con respecto al control a la 12 y 24 horas arrojando los siguientes valores (2.19 y 0.90% respectivamente) y un decremento a las 48, 72 y 96 horas con los siguientes valores (2.19, 1.91 y 2.48% respectivamente).

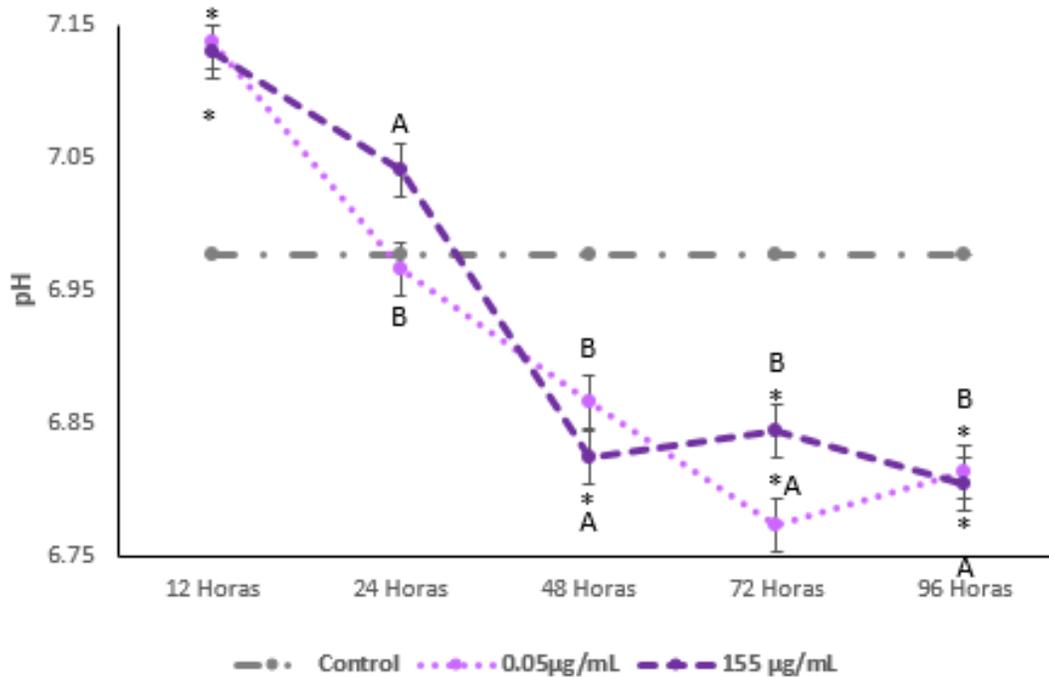


Figura 13. Determinación de pH a dos concentraciones de sucralosa, 0.05 µg/mL y 155 µg/mL, por 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

Notas: (*) diferencia significativa con respecto al control; (A) diferencia significativa con respecto a la concentración 0.05 µg/mL; (B) diferencia significativa con respecto a la concentración 155 µg/mL con un nivel de significancia de ($p < 0.05$).

La figura 14 muestra el comportamiento de la solubilidad; mostrando un decremento significativo con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 0.05 µg/L a las 12, 24 y 48 horas teniendo los siguientes valores (51.97, 52.83 y 19.30% respectivamente) a las 72 y 96 horas se mostró un incremento arrojando los siguientes valores (4.74 y 1.38% respectivamente); para la concentración de 155 µg/L se observó un incremento a las 12, 72 y 96 horas teniendo los siguientes valores (25.75, 4.63 y 13.23% respectivamente) y un decremento a las 24 y 48 horas de (27.65 y 13.63% respectivamente).

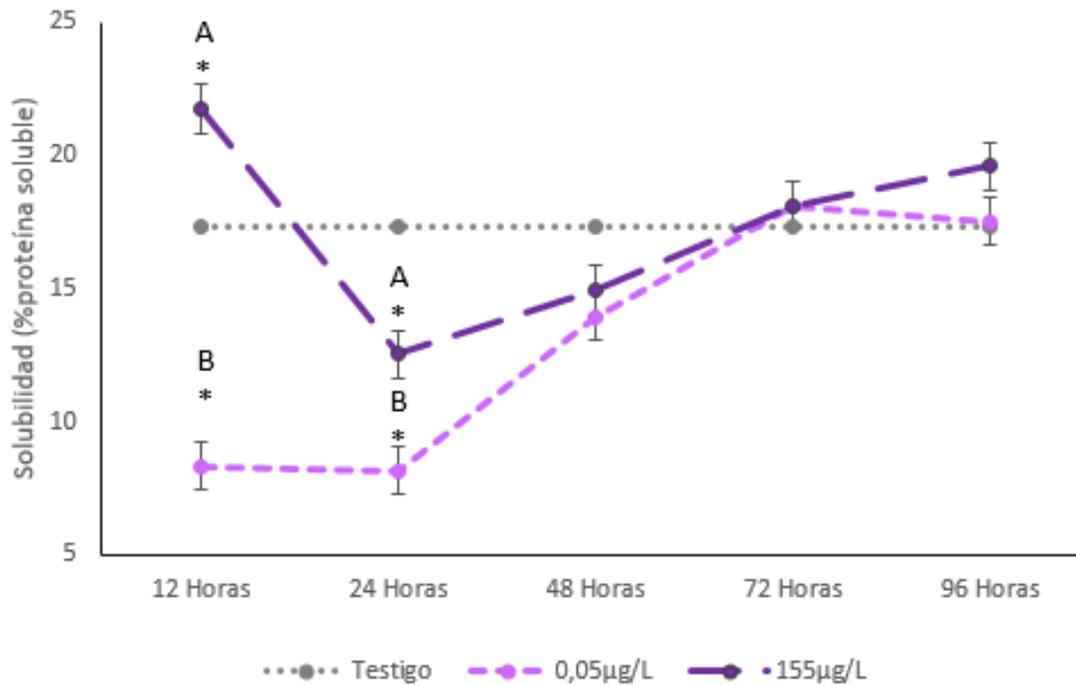


Figura 14. Comportamiento de la solubilidad en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos concentraciones de sucralosa, 0.05 µg/mL y 155 µg/mL, por 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

Notas: (*) diferencia significativa con respecto al control; (A) diferencia significativa con respecto a la concentración 0.05 µg/mL; (B) diferencia significativa con respecto a la concentración 155 µg/mL con un nivel de significancia de ($p < 0.05$).

La tabla 7 muestra el comportamiento del análisis de perfil de textura; mostrando un decremento significativo en dureza con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 0.05 µg/L a las 12, 24, 48 y 72 horas teniendo los siguientes valores (5.73, 8.19, 9.01 y 1.63% respectivamente) a las 96 horas se mostró un incremento de 8.19%; para la concentración de 155 µg/L se observó un incremento a las 72 y 96 horas teniendo los siguientes valores (18.16 y 21.57% respectivamente) y un decremento a las 24 y 48 horas de (2.18 y 9.58 respectivamente). La cohesividad mostró un incremento significativo con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 0.05 µg/L a los cinco tiempos de exposición 12, 24, 48, 72 y 96 horas teniendo los siguientes valores (209.84, 203.50, 195.48, 232.37 y 244.77% respectivamente), para la concentración de 155 µg/L se observó un incremento a los cinco tiempos de exposición 12, 24, 48, 72 y 96 horas teniendo los siguientes

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR SUCRALOSA EN (*Cyprinus carpio*) Y DETERMINAR SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y TEXTURALES

valores (660.53, 641.76, 622.98, 707.48 y 745.04% respectivamente). El atributo de elasticidad mostró un decremento significativo con respecto al control ($p<0.05$) para la concentración de 0.05 $\mu\text{g/L}$ a las 12, 24 y 48 horas mostrando los siguientes valores (8.69, 11 y 14.78% respectivamente), a las 72 y 96 horas se mostró un incremento (2.60 y 12.17% respectivamente); para la concentración de 155 $\mu\text{g/L}$ se observó un incremento a las 96 horas de 5.79%, y un decremento a las 12, 24, 48 y 72 horas teniendo los siguientes valores (4.71, 8.69, 13.04 y 0.72% respectivamente). La masticabilidad mostró un decremento significativo con respecto al control ($p<0.05$) para la concentración de 0.05 $\mu\text{g/L}$ a las 12, 24, 48 y 72 horas teniendo los siguientes valores (1.15, 2.07, 18 y 0.76% respectivamente) y un incremento a las 96 horas teniendo un valor de 0.39%; para la concentración de 155 $\mu\text{g/L}$ se observó un decremento a las 12, 24 y 48 horas teniendo los siguientes valores (0.90, 1.25 y 12.30% respectivamente), y un incremento para las 72 y 96 horas arrojando los siguientes valores (0.39 y 1.38% respectivamente). Finalmente se determinó la gomosidad mostrándose un incremento significativo con respecto al control ($p<0.05$) en el músculo a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas en la concentración de 0.05 $\mu\text{g/L}$ obteniendo los siguientes valores (199.35, 162.60, 165.22, 221.30 y 277.18% respectivamente) y a para la concentración de 155 $\mu\text{g/L}$ a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas de (215.49, 226.75, 214.09, 307.66 y 315.59% respectivamente).

		Tiempo de exposición				
		12 Horas	24 Horas	48 Horas	72 Horas	96 Horas
Dureza	Control	1.22	1.22	1.22	1.22	1.22
	0,005 $\mu\text{g/L}$	1.15	1.13	1.11	1.19	1.33
	0,155 $\mu\text{g/L}$	1.22	1.19	1.10	1.44	1.49
Cohesividad	Control	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
	0,005 $\mu\text{g/L}$	0.33	0.32	0.31	0.35	0.37
	0,155 $\mu\text{g/L}$	0.34	0.36	0.37	0.37	0.36
Elasticidad	Control	0.46	0.46	0.46	0.46	0.46
	0,005 $\mu\text{g/L}$	0.42	0.41	0.39	0.47	0.51
	0,155 $\mu\text{g/L}$	0.44	0.42	0.40	0.46	0.49
Masticabilidad	Control	707	707	707	707	707
	0,005 $\mu\text{g/L}$	699	693	580	702	710
	0,155 $\mu\text{g/L}$	701	698	620	710	717
Gomosidad	Control	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
	0,005 $\mu\text{g/L}$	0.38	0.36	0.35	0.42	0.49
	0,155 $\mu\text{g/L}$	0.41	0.43	0.41	0.54	0.54

Tabla 5. Análisis de perfil de textura en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos concentraciones de sucralosa, 0.05 µg/mL y 155 µg/mL, por 12, 24, 48, 72 y 96 horas.

8.1 Discusión de resultados

Este es el primer estudio que examina el estrés oxidativo producido por SCL en especies acuáticas. Nuestros resultados analíticos demuestran que SCL estuvo presente en los medios acuáticos y dentro de la carpa durante todo el experimento, por lo tanto, los cambios en la actividad enzimática (SOD, CAT) y los daños a las biomoléculas (LPx, HPC, PCC) descritos en el resultado están directamente relacionados con la presencia de este edulcorante artificial. Nuestros resultados indican una elevación significativa de la actividad de las enzimas SOD y CAT en todos los órganos y tejidos analizados, para la actividad SOD el órgano con mayor actividad fue el músculo seguido por el hígado, branquias y cerebro en orden decreciente; la sangre era el único fluido con actividad de SOD despreciable. Por otro lado, para la actividad de CAT los órganos con mayor actividad fueron: branquias, seguido por hígado, sangre, músculo y cerebro en orden decreciente. Se ha reportado un incremento en la actividad de las enzimas CAT y SOD frente a diferentes contaminantes ambientales (Elizalde-Velázquez *et al.*, 2016, SanJuan-Reyes *et al.*, 2015, Islas-Flores *et al.*, 2014, García-Medina *et al.*, 2013), ya que las enzimas SOD y CAT representan la mayor depuración de especies reactivas de oxígeno EROs ya que son mecanismos de primera línea de defensa contra el estrés oxidativo. La SOD cataliza la transformación del anión superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es metabolizado a O_2 y agua por las enzimas CAT (van de Oost *et al.*, 2003). Abou-Donia *et al.* (2008) afirmaron que SCL elevó la expresión de las enzimas CYP en el tracto gastrointestinal de las ratas, en particular las subfamilias CYP3A y CYP2D, por lo que es posible que la SCL pueda ser bio-transformado por las enzimas CYP450 presentes en el retículo endoplasmático liso de las células de los diferentes órganos, como el hígado, el riñón, las branquias, el intestino, el cerebro, el corazón, el músculo, las gónadas, entre otros (Stegeman y Livingstone, 1998). Los citocromos P450 son responsables de la biotransformación de la mayoría de los xenobióticos, también participan activamente en la eliminación de sustancias químicas extrañas del cuerpo, sin embargo, estas enzimas tienen una consecuencia importante relacionada con su actividad ya que estas enzimas reducen el oxígeno molecular para producir especies prooxidantes que no son

contrarrestados eficientemente por antioxidantes y crean estrés oxidativo. Durante el metabolismo mediado por las enzimas CYP se libera una gran fracción de especies reactivas de oxígeno (EROs), el primer CYP produce un intermediario oxigenado, el complejo oxicitocromo P450 con la consecuente liberación del radical anión superóxido ($O_2 \bullet^-$); la segunda producción de EROs se desarrolla mediante la protonación del complejo peroxi-citocromo P450 con la consiguiente formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), además de estas dos ramas productoras de EROs, se produce un mecanismo adicional de fuga de electrones por la reducción de cuatro electrones de la molécula de oxígeno con la producción de agua (H_2O), contribuyendo en el ciclo redox del CYP450 (Doi *et al.*, 2002; Davydov DR, 2001). Dado que las células tienen un alto contenido en el sistema microsomal de monooxigenasa, y la cadena de transferencia de electrones microsomales es una de las principales fuentes de EROs, su actividad se ha asociado a citotoxicidad, genotoxicidad, estrés oxidativo, carcinogénesis, toxicidad de fármacos y patogénesis de Varias enfermedades (Gonzalez, FJ, 2005, Davydov, DR, 2001, Robertson *et al.*, 2001, Bondy y Naderi, 1994). En un estudio reciente Eriksson *et al.* (2014) informaron que la exposición de *Daphnia magna* a SCL induce mecanismos oxidativos con consecuencias potencialmente importantes para el comportamiento animal y la fisiología. Ellos midieron la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC), que representan el nivel de defensas antioxidantes, y encontraron un aumento en los valores de este biomarcador. Por lo tanto, el proceso de biotransformación mediado por el sistema de monooxigenasa microsomal y las enzimas CYP con la consiguiente liberación de EROs podría explicar el aumento de las actividades de SOD y CAT descritas anteriormente en este estudio.

Otra posible explicación podría estar relacionada con la regulación energética; Swithers *et al.* (2008, 2009, 2010) informaron que el consumo de alimentos y líquidos que contenían edulcorantes de alta potencia interfirió con la capacidad del sabor dulce para predecir las consecuencias calóricas y por lo tanto interrumpió la regulación energética (Schiffman y Rother, 2010, 2009, Swithers y Davidson 2008). Sin embargo, los edulcorantes artificiales como SCL tienen calorías despreciables y utilizables, que desacoplan la relación entre las propiedades sensoriales de los alimentos y su contenido calórico (Schiffman y Rother, 2013). Los receptores de azúcar se han encontrado en *Cyprinus carpio* (Hidaka y Yokota, 1967), por lo que la carpa probablemente podría sentir el edulcorante artificial SCL disuelto en el agua que sirve como señal para la ingesta de alimentos. Eriksson *et al.*, (2014) declararon que la exposición de *Daphnia magna* a la sucralosa estimula la alimentación e

incrementa la ingesta calórica que también puede predisponer a las especies de ensayo al estrés oxidativo. En este contexto, Pepino *et al.*, (2013) informaron que los niveles de glucosa e insulina de SCL en mujeres obesas, así como diferentes autores también han informado que SCL modula la glucosa y la secreción de insulina en roedores (Nakawaga *et al.*, 2009; 2007). Breves episodios de hiperglucemia causan daño tisular por mecanismos que implican cambios agudos repetidos en el metabolismo celular; Rolo y Palmeira (2006) incluyen algunas vías metabólicas clave, ya que los principales factores que contribuyen a la hiperglucemia inducen el daño tisular: incrementando el flujo de la vía de polioles y aumentando el producto final de glicación avanzada (AGE). El aumento en el flujo de la vía de poliol disminuye los equivalentes de NADPH y glutatión, lo que aumenta la sensibilidad a EROs intracelular (Brownlee, 2001). La producción de un precursor avanzado del producto final de la glicación (AGE) interfiere con la integridad celular induciendo la producción mediada por receptores de EROs (Yan *et al.*, 1994). Adicionalmente Nishikawa *et al.* (2000b) informaron que la hiperglucemia indujo la sobreproducción de superóxido en las mitocondrias. Por lo tanto, la interrupción en la regulación de la energía debido a un aumento de la glucosa y los niveles de insulina inducida por SCL implica la producción y liberación de EROs intracelular, lo que también podría explicar el aumento de la SOD y CAT actividades descritas anteriormente en este estudio.

Una producción aumentada de EROs no sólo implica un aumento de los niveles de enzimas antioxidantes, sino que también puede causar daño celular atacando las biomoléculas como lípidos y proteínas, lo que resulta en un aumento de LPX y en el contenido de proteínas oxidadas (Gómez-Oliván *et al.*, 2014; Shacter, 2000). La peroxidación lipídica puede describirse generalmente como un proceso que implica una cadena de reacciones de oxidación bajo la cual oxidantes tales como radicales libres o especies no radicales atacan lípidos que contienen enlaces dobles carbono-carbono, especialmente ácidos grasos poliinsaturados que implica la extracción de hidrógeno de un carbono, con Oxígeno que resulta en radicales peroxilo lipídico e hidroperóxidos. Los hidroperóxidos pueden descomponerse fácilmente en diversas especies químicas tales como los lípidos, los radicales alcoxilo, los aldehídos (malondialdehído), los alquenos (4-hidroxinonenal), los epóxidos lipídicos y los alcoholes, la mayoría de los cuales son productos tóxicos (Ayala *et al.*, 2014; 2011, Porter *et al.*, 1995). Entre varios sustratos, el ADN y las proteínas son particularmente susceptibles a la modificación causada por estos aldehídos. Particularmente, el malondialdehído y el 4-

hidroxinonenal pueden producir aductos que juegan un papel crítico en múltiples procesos celulares y pueden participar en reacciones deletéreas secundarias promoviendo entrecruzamientos intramoleculares o intermoleculares de proteína / ADN que pueden inducir una alteración profunda en las propiedades bioquímicas de las biomoléculas, lo que puede facilitar el desarrollo de varios estados patológicos (Ayala *et al.*, 2014). En nuestro estudio utilizamos el HPC y el LPX como biomarcadores moleculares para evaluar el daño de los lípidos y ambos fueron modificados debido a la presencia de estos edulcorantes artificiales; Los órganos que mostraron más daño fueron las branquias, el cerebro y músculo; por otro lado, la sangre y el hígado mostraron un efecto insignificante para estos dos biomarcadores relacionados con la presencia de SCL. Asimismo, se utilizó el biomarcador molecular PCC para medir el daño a las proteínas, así como en los resultados de HPC y LPX los órganos que mostraron más daño fueron las branquias, músculo, cerebro, pero también el hígado mostró un aumento en el contenido de carbonilación de proteínas, la sangre volvió a mostrar un efecto insignificante para este biomarcador molecular. Nuestros resultados están de acuerdo con los informes de Eriksson *et al.* (2014), quienes afirmaron que la SCL induce la peroxidación lipídica en *Daphnia magna* después de su exposición a SCL. Las branquias juegan un papel importante en las especies acuáticas para mantener la presión osmótica, la homeostasis ácido-base y controlar la afluencia y eflujo de agua, oxígeno e iones; Pero también las branquias son los órganos principales en contacto íntimo con los medios acuosos y por consiguiente con los xenobióticos, por lo que es probable que sean blanco de contaminantes acuáticos, además se sabe que las branquias son un sitio con alto metabolismo oxidativo y un sitio de expresión del Citocromo isoformo CYP3A, promoviendo la producción de EROs y consecuentemente el daño oxidativo (Gómez-Oliván *et al.*, 2014, Uno y otros, 2012, Monteiro *et al.* 2005). Tanto el cerebro como los sistemas nerviosos están inadecuadamente equipados con sistemas de defensa antioxidantes para prevenir el daño oxidativo, por lo que son propensos al estrés oxidativo (Halliwell, 2006), en este contexto Eriksson *et al.* (2014), informaron que la exposición a SCL puede inducir mecanismos neurológicos y oxidativos, ya que observaron un efecto estimulante de SCL sobre la actividad de acetilcolinesterasa (AChE) de *Daphnia magna*. La literatura científica ha informado de que la actividad elevada de la AChE se ha relacionado con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple y el síndrome de piernas inquietas (RLS) (Eriksson *et al.*, 2014; Soreq, 2005). Los músculos esqueléticos poseen un

alto metabolismo oxidativo ya que este órgano utiliza altas cantidades de oxígeno y grandes cantidades de energía para realizar sus funciones (Ferrari et al., 1997). Wiklund et al., 2012 informaron que SCL alteró la altura de la natación y aumentó la velocidad de natación de *Daphnia magna*, lo que resulta en un mayor gasto de energía e induce altos costos metabólicos, induciendo así la producción de ROS. Los músculos están hechos de proteínas y aminoácidos, que son blanco de ROS; el daño directo a las proteínas o las modificaciones químicas de los aminoácidos y las proteínas durante el estrés oxidativo, pueden dar origen a los carbonilos de la proteína (Parvez y Raisuddin, 2005).

Se necesitan estudios más experimentales para evaluar la tasa de biodegradación de SCL en medios acuáticos en presencia de diferentes especies acuáticas, así como identificar los diferentes productos de degradación que podrían ser producidos por este proceso, también estudios experimentales en diferentes especies acuáticas que impliquen el uso de diferentes biomarcadores moleculares y diferentes estudios como citotoxicidad y genotoxicidad son necesarios para comprender plenamente el riesgo ecotoxicológico asociado con la presencia de este edulcorante artificial en las masas de agua ambiental, ya que el presente estudio muestra que SCL es efectivamente un retardador ecotoxicológico que modifica la actividad antioxidante normal induciendo daño oxidativo en lípidos y proteínas de *Cyprinus carpio*.

Sulfhidrilos

La exposición SCL tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) en los grupos SH, el último disminuyó Gráfica 6, probablemente debido al hecho de que la conversión de los grupos SH en puentes disulfuro es uno de los primeros eventos observables durante la formación de radicales mediados por oxidación de proteínas. La cisteína presente en el núcleo catalítico de la cabeza de miosina es quizás el residuo más susceptible a los radicales de oxígeno y el primero en ser oxidado (Park et al., 2006). Por lo tanto, los enlaces disulfuro son de gran importancia en la conformación de la estructura terciaria de las proteínas, por lo que es termodinámicamente más estable cuando otras fuerzas de atracción son débiles confiriendo firmeza al músculo. Cuando se observa una mayor cantidad de enlaces disulfuro,

las proteasas presentes son tal vez incapaces de llevar a cabo su función, disminuyendo así la degradación de las propiedades funcionales (Pilossoff, 2000).

pH

La gráfica 7 muestra una disminución significativa de pH. Este decremento es debido al resultado de la acumulación de ácido láctico producido por glicólisis anaerobia que se lleva a cabo en el músculo, la cual disminuye los valores de pH, la cantidad de ácido láctico producido se relaciona con la cantidad del glucógeno almacenado en los tejidos, siendo este la principal fuente de energía en animales, la disminución de este compuesto es una respuesta del estrés inducido por pesticidas, metales y efluentes, incluyendo a los contaminantes emergentes (Cazenave 2014 *et al.*; Preto 2014 y Morachis 2014), (Saucedo *et al.* 2016) corroboran que la carpa común presenta estrés oxidativo en presencia de sucralosa.

Solubilidad

Es sabido que las propiedades funcionales del pescado como matriz alimentaria refleja las características bioquímicas de la miosina, que es el componente mayoritario de las proteínas miofibrilares, la estabilidad de las funciones del alimento en carne de pescado están relacionadas al comportamiento de la miosina, Maitena *et al.* (2004), indican que el punto isoeléctrico del lado ácido de la miosina es debido a la pérdida de la carga de lisina por reacciones de oxidación con malonaldehído Estevez (2011).

En el caso de proteína soluble gráfica 8 se observó diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$) a las 12 horas en ambas concentraciones (0.05 $\mu\text{g/L}$ y 155 $\mu\text{g/L}$) y a las 24 horas de tiempo de exposición en la concentración de 0.05 $\mu\text{g/L}$, no siendo así para los tiempos de exposición de 48, 72 y 96 horas. Halliwell y Gutteridge (1999), observaron que uno de los papeles fundamentales de las defensas antioxidantes, para la desintoxicación de la producción de especies reactivas del oxígeno pueden inducir un daño oxidativo significativo, que incluye la inactivación enzimática, degradación de las proteínas y oxidación de lípidos, en este caso se puede observar que el daño a las proteínas estarían obligando a la formación de nuevos enlaces entre la proteína, de tal manera

que la proteína soluble disminuye para el caso de la especie expuesta a la 12 y 24 horas, probablemente llevando a cabo una conformación diferente de la estructura proteica.

La solubilidad de las proteínas (Gráfica 3), van correlacionadas con la proteína soluble, ya que como se mencionó anteriormente, la presencia de sucralosa, puede actuar a nivel proteico, pudiéndose dar un cambio en la conformación de la proteína, formándose nuevos enlaces proteína-proteína, formación de nuevas redes, enlaces iónicos, enlaces hidrofóbicos y puentes disulfuro (Kinsella *et al.*, 1985), de esta manera también podría existir una degradación proteica (Swaisgood, 1982) dando como consecuencia una mayor solubilidad.

CRA

Se define como la habilidad de la carne de mantener el agua propia o añadida después de ser aplicada una fuerza externa (Lun *et al.*, 2008; citado en Lu 2016)

Es un parámetro cualitativo importante en la industria alimentaria para los atributos sensoriales, así como la influencia en el producto durante su procesamiento o almacenamiento, en la gráfica 8 se observó una disminución de la capacidad de retención de agua (CRA) a medida que incrementó el tiempo de exposición. Lu, Wang, Luo (2016), menciona que la oxidación proteica fue un factor restrictor importante para la capacidad de las miofibrillas de absorber agua, el incremento de la acción proteolítica y el entrecruzamiento de las proteínas miofibrilares ha demostrado que puede afectar negativamente la CRA del músculo.

Algunas investigaciones han encontrado una correlación negativa entre la capacidad de retención de agua y la dureza de músculo de pescado Gault, (1985), así mismo Huff-lonergan y Lonergan (2005) demostraron que la acción proteolítica y el entrecruzamiento disminuyen la capacidad de retención de agua.

TPA

La determinación de textura es una propiedad importante para el procesamiento tecnológico y es un buen indicador de las propiedades texturales de las proteínas miofibrilares del músculo porque no sólo afecta a los atributos sensoriales, sino también a los texturales. El TPA fue llevado a cabo

para ambas concentraciones a diferentes tiempos de exposición, mostrando diferencias significativas con respecto al control para: dureza, cohesividad, elasticidad, masticabilidad y gomosidad, Badii y Howell (2002) una disminución en la dureza, elasticidad y masticabilidad durante las primeras 48 horas de exposición pueden estar relacionados con la desnaturalización de la proteína habiendo un mayor número de enlaces hidrógeno en la matriz proteica lo cual también explica la disminución en la capacidad de retención de agua. A partir de las 72 horas hubo un incremento en dureza cohesividad y masticabilidad lo que estaría indicando la formación de enlaces disulfuro (20 y 21)

Perfil electroforético SDS-PAGE

En el campo de la ciencia de los productos cárnicos es conocido que las proteínas del músculo de pescado tienden a sufrir desnaturalización y/o formar agregados durante el almacenamiento. La formación de agregados se genera a partir de la presencia de formaldehído, que es producido por algunas especies de peces debido a la degradación de la trimetilamina, la oxidación de los ácidos grasos, así como la presencia de aldehídos y cetonas generados a partir de la oxidación de los lípidos, los cuales aceleran la desnaturalización de las proteínas, principalmente las proteínas miofibrilares. Es importante destacar que en diferentes modelos ha sido comprobado que el MDA reacciona con las proteínas miofibrilares para generar agregados. La utilización de técnicas como la electroforesis SDS-PAGE nos permite conocer el grado de daño de las proteínas al observar modificaciones en las bandas generadas a partir de la separación de las proteínas miofibrilares. Esta tecnología ofrece una herramienta fiable utilizada para la separación, identificación y purificación de proteínas. La electroforesis realizada en músculo de carpa común *Cyprinus carpio* expuesta a dos concentraciones de SCL muestra una descomposición en la integridad de las bandas correspondientes a la cadena pesada de miosina y la cadena ligera de la actina durante los tiempos de exposición con respecto al grupo control, las proteínas separadas se observan con alteraciones conforma aumentó el tiempo de exposición en todos los tiempos de exposición, esto puede indicar degradación proteica, incremento en la actividad proteolítica y liberación de un péptido de menor tamaño, que podría corresponder a la troponina T 37.9 kDa o a la β -tropomiosina 39.5 kDa . Wang *et al.* (2010) observaron que una disminución de pH entre 6.3 y 6.0 en músculo de pescado puede generar la degradación de la cadena

pesada de miosina y que a pH mayores de hasta 6.9 esa degradación se veía particularmente disminuida, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, pues se observa degradación de las bandas de la cadena pesada de miosina (250 kDa) a los pH encontrados en el músculo de *Cyprinus carpio* en todos los tiempos y concentraciones analizadas. Los resultados de biomarcadores de EO en el caso de músculo se pueden ver confirmados con el perfil electroforético. La electroforesis realizada en este estudio es un análisis solamente de proteínas, sin embargo, hay que tener en cuenta que la compleja expresión de las proteínas en las células y en los tejidos animales refleja la homeostasis total del animal vivo, es decir la forma en la que el medio ambiente influencia al organismo y las reacciones que éste tiene para mantenerse en equilibrio con el medio.

9. Conclusión

Los resultados de este estudio demuestran que las concentraciones de sucralosa utilizadas (0.05 µg/L y 155 µg/L) son capaces de inducir un aumento significativo de estrés oxidativo en sangre, hígado, branquias, cerebro y músculo de *Cyprinus carpio* o efectos deletéreos en la carne de carpa.

Los resultados de estrés oxidativo muestran que a las concentraciones de sucralosa utilizadas muestran un aumento significativo en los biomarcadores analizados de oxidación celular en el contenido de hidroperóxidos y proteínas carboniladas y el nivel de lipooxidación, asimismo, en la actividad antioxidante de superóxido dismutasa y catalasa en los órganos analizados para ambas concentraciones.

Los parámetros fisicoquímicos pH, porcentaje de acidez, capacidad de retención de agua, solubilidad, grupos sulhidrilo y disulfuros totales, y del análisis de perfil de textura de la carne de *Cyprinus carpio* mostraron diferencia significativa en los diferentes tiempos de exposición analizados, lo que se encuentra en concordancia con los resultados de estrés oxidativo. El perfil electroforético llevado a cabo al músculo de *Cyprinus carpio* muestra una desintegridad de las principales proteínas de la carne de carpa (miosina y actina) principales responsables de las características funcionales y tecnológicas del musculo de la especie.

La presencia de sucralosa en cuerpos de agua disminuye la calidad de la carne de carpa induciendo cambios en la funcionalidad de las proteínas viéndose afectados los parámetros fisicoquímicos y texturales debido a los procesos de oxidación.

La presencia de este tipo de xenobióticos requiere estudios más profundos para observar si existe una correlación directa de estos cambios con una pérdida en los aminoácidos esenciales disminuyendo la digestibilidad afectando el valor nutrimental de esta especie.

10. Anexos

Ms. Ref. No.: STOTEN-D-16-03958R2

Title: Toxicological hazard induced by sucralose to environmentally relevant concentrations in common carp (*Cyprinus carpio*)

Journal: Science of the Total Environment

Hola Leobardo

I am pleased to inform you that your paper "Toxicological hazard induced by sucralose to environmentally relevant concentrations in common carp (*Cyprinus carpio*)" has been accepted for publication in STOTEN and forwarded to the publishers.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Why not submit your tailored methods to MethodsX? The new open access journal publishes the tweaks you make to methods without the article padding, so you can get the credit for the time and effort you have put into making a method work for you. www.elsevier.com/locate/methodsX

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department and work will begin on creation of the proof. If we need any additional information to create the proof, we will let you know. If not, you will be contacted again in the next few days with a request to approve the proof and to complete a number of online forms that are required for publication.

For any production related questions, including changes to proofs, please contact Jennifer Miranda (Journal Manager) J.Miranda@elsevier.com. There is no need to contact the editors.

Thank you for giving us the opportunity to review your article.

Sincerely,

DAMIA BARCELO

Co Editor-in-Chief

Science of the Total Environment



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv



Toxicological hazard induced by sucralose to environmentally relevant concentrations in common carp (*Cyprinus carpio*)



Karinne Saucedo-Vence^a, Armando Elizalde-Velázquez^a, Octavio Dublán-García^a, Marcela Galar-Martínez^b, Hariz Islas-Flores^a, Nely Sanjuan-Reyes^a, Sandra García-Medina^b, María Dolores Hernández-Navarro^a, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{a,*}

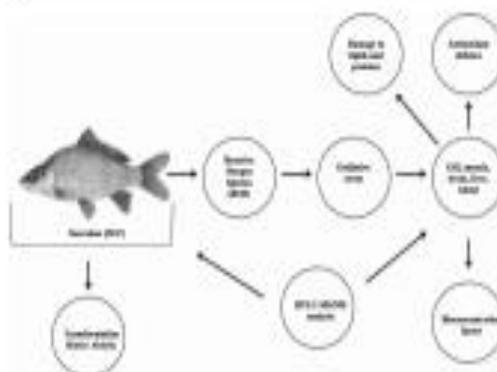
^a Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón s/n, Cerritos, P.O. Box 100, Estado de México, México

^b Laboratorio de Tecnología Alimentaria, Departamento de Alimentos, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, P.O. Box 700, México, México

HIGHLIGHTS

- Sucralose was detected and quantified in different organs of *Cyprinus carpio*.
- Sucralose is not bio-accumulated in the organs and tissues of *Cyprinus carpio*.
- Sucralose induces the SOD and CAT activity in gills, muscle and brain of *Cyprinus carpio*.
- Sucralose induces damage to lipids and proteins in gills, muscle, brain and liver of *Cyprinus carpio*.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 July 2016

Received in revised form 27 September 2016

Accepted 28 September 2016

Available online xxx

Editor: B. Barceló

ABSTRACT

Sucralose (SUC) is an artificial sweetener that is now widely used in North America and Europe; it has been detected in a wide variety of aquatic environments. It is considered safe for human consumption but its effects in the ecosystem have not yet been studied in depth, since limited ecotoxicological data are available in the peer-reviewed literature. This study aimed to evaluate potential SUC-induced toxicological hazard in the blood, brain, gill, liver and muscle of *Cyprinus carpio* using oxidative stress biomarkers. Carps were exposed to two different environmentally relevant concentrations ($10\mu\text{g L}^{-1}$ and $155\mu\text{g L}^{-1}$) for different exposure times (12, 24, 48, 72

Abbreviations: AFB₁, acetylcholinesterase; ACE, acetylcholinesterase; AGE, advanced glycation end product; AL, albumin; ANOVA, analysis of variance; AP, aquaponics; BCF, bioaccumulation factor; CAT, catalase; CVC, cyclamate; DHPH, di-nitro phenyl hydrazine; EA, electrocapillary ionization; HPLC-MS/MS, high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry; HPC, hydroperoxide content; LPI, lipid peroxidation; MDH, malondialdehyde; MIC, molar extraction coefficient; MRM, multiple reaction monitoring; NAD, niastane; NHEK, nontoxic epidermal dihydrochalcone; ORAC, oxygen radical absorbing capacity; PC, protein carbonyl content; RLS, redox log condition; ROS, reactive oxygen species; SUC, sucralose; SOD, superoxide dismutase; TAC, total antioxidant capacity; TBA, thiobarbituric acid; TCA, trichloroacetic acid.

* Corresponding author at: Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón s/n, Cerritos, P.O. Box 100, Estado de México, México.

E-mail addresses: lsaucedo@uaemex.mx, lgomez@uaemex.mx (L.M. Gómez-Oliván).

Assessing the oxidative stress induced by sucralose to environmentally relevant concentrations in common carp (*Cyprinus carpio*)

Karinne Saucedo-Vence^a, Armando Elizalde-Velázquez^a, Octavio Dublán-García^a, Marcela Galar-Martínez^b, Hariz Islas-Flores^a, Sandra García-Medina^c, María Dolores Hernández-Navarro^a, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{a*}

^a Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, México.

^b Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido Massieu Esq. Cda. Miguel Stampa s/n, Delegación Gustavo A. Madero. México, DF. México. C.P.07738.

*Corresponding author:

Dr. Leobardo Manuel Gómez-Oliván

Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Col. Residencial Colón, Toluca, Estado de México, México, CP 50120. Telephone +(52) 7222173890; fax +(52) 7222173890. E-mail: Imgomez@uaemex.mx; lgolivan74@gmail.com

ABSTRACT

Sucralose is a relatively new artificial sweetener that is now widely used in North American and Europe; it has been detected in a wide variety of aquatic environments. This product is considered safe for human consumption but its effects in the ecosystem have not yet been studied in depth, since limited ecotoxicological data are available in the peer-reviewed literature. This study aimed to evaluate potential SCL-induced oxidative stress in the blood, brain, gill, liver and muscle of *Cyprinus carpio*. Carps specimens were exposed to two different environmentally relevant concentrations (0.05 and 155 µg/L) for different exposure times (12, 24, 48, 72 and 96 h), and the following biomarkers were evaluated: lipid peroxidation (LPX), hydroperoxide content (HPC) and protein carbonyl content (PCC), as well as the activity of antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Additionally, the SCL was determined by high performance liquid chromatography techniques (HPLC)–MS/MS. Results show a statically significant increase in LPX, HPC, PCC ($p < 0.05$) in all the organs tested, specially in gill, brain and muscle, as well as significant changes in the activity of the antioxidant enzymes were observed in gill and muscle. Furthermore, the biomarkers employed in this study are useful in the assessment of the environmental impact of this agent on aquatic species.

Key words: SCL, *Cyprinus carpio*, Oxidative stress, LC-MS/MS

INTRODUCTION

Artificial sweeteners are used worldwide as sugar substitutes in remarkable amounts in food, beverages, and also in drugs and sanitary products, such as mouthwashes. They provide no or negligible energy and thus are ingredients of dietary products (Kroger *et al.*, 2006; Zygler *et al.*, 2009). The most popular artificial sweeteners are aspartame (ASP), neotame (NEO), alitame (ALI), acesulfame (ACS), saccharin (SAC), cyclamate (CYC), sucralose (SCL), and neohesperidin dihydrochalcone (NHDC). Of the variety of artificial sweeteners being used, only ACS, CYC, SAC and SCL have been identified in wastewater effluents (Lange *et al.*, 2012).

Artificial sweeteners are highly consumed, particularly in the U.S., with increasing trends in consumption, especially after the introduction of SCL in 1998. The global market for artificial sweeteners reaches \$5.1 billion, of which the U.S. and Europe currently make up 65% (Bennett, 2008). Production volumes of artificial sweeteners vary between reports. The U.S. is currently the largest market for SCL, making use of more than 1500 tons per year, followed by Europe, with around 400 tons per year, as reported by a major Chinese company that recently entered into the SCL market. In the Asian Pacific market, the volume output in total of SAC, CYC, ACS, ASP, SCL, ALI and NEO, grew approximately 10% between 2009 and 2010, reaching approximately 109 000 tons (Kokotou *et al.*, 2012).

Although from the beginning of their use there have been controversies over their risk as potential carcinogens (Weihrauch and Diehl, 2004), these sweetener compounds are generally considered to be safe for use in foodstuffs (Cohen *et al.*, 2008; Kroger *et al.*, 2006; Ahmed and Thomas, 1992). Moreover, due to these compounds are metabolically inert in the human body it has been believed that are also inert in the environment. However in recent years the concern is shifting from health concerns to ecosystem concerns (Sang *et al.*, 2014).

Excretion after human consumption is undoubtedly a major source of artificial sweeteners in the environment, but it is surely not the only one (Kokotou *et al.*, 2012). From households and industries, all artificial sweeteners enter into wastewater treatment plants, where in most cases passes without any change through these processes, as a result they eventually reside in the

receiving environmental water bodies (Houtman, 2010). In addition, direct discharges from industry, households, animal farming and agriculture burden surface waters with artificial sweeteners (Houtman, 2010).

Sucralose (also known as Splenda) is a relatively new artificial sweetener that is now widely used in North American and Europe. SCL is produced by the chlorination of sucrose, which leads to a stable compound that is poorly absorbed in the mammalian gastro-intestinal (GI) tract. The majority of orally ingested sucralose is excreted as unchanged parent compound, with <1% of the original oral dose excreted as two glucuronide adduct metabolites (Sims *et al.*, 2000). It may seem like an odd compound to include as an emerging contaminant, but it is now being found in environmental waters and it is extremely persistent (half-life up to several years) [Richardson, 2010].

Sucralose has been detected in a wide variety of aquatic environments. A Swedish study reported concentrations of SCL in treated effluent to be ≤ 11 $\mu\text{g/L}$, while surface water concentrations were ≤ 3.6 $\mu\text{g/L}$ (Brorstrom-Lunden *et al.*, 2008). Other studies have measured sucralose in effluents in surface waters at concentrations ≤ 2.5 $\mu\text{g/L}$ (Ferrer and Thurman, 2010; Neset *et al.*, 2010; Loos *et al.*, 2009; Scheurer *et al.*, 2009). One hundred and twenty samples were collected from rivers in 27 European countries, and sucralose was found up to 1 $\mu\text{g/L}$, predominantly in samples from the United Kingdom, Belgium, The Netherlands, France, Switzerland, Spain, Italy, Norway, and Sweden, with only minor levels (<100 ng/L) detected in samples from Germany and Eastern Europe, suggesting a lower use of sucralose in those countries (Richardson & Ternes, 2011).

SCL is considered safe for human consumption (the acceptable daily intake for SCL was set at 5 mg/kg of body weight per day) [Grotz & Munro, 2009; Brusick *et al.*, 2010; Viberg & Fredriksson, 2011], but its effects in the ecosystem have not yet been studied in depth, since limited ecotoxicological data are available in the scientific literature. Hjorth *et al.*, (2010) evaluated egg production, hatching rate, food intake and mortality of two species of copepods, *Calanus glacialis* and *Calanus finmarchicus* exposed to six different concentrations (0–50 mg/L) of SCL. The results showed that both species responded weakly to SCL, but with *C. glacialis* being possibly slightly more sensitive than *C. finmarchicus*. Huggett and Stoddard (2011) assessed the effects of SCL on the survival, growth and reproduction of *Daphnia magna* and *Americamysis bahia* (mysid shrimp). They

concluded that the concentrations of SCL detected in the environment are well below those required to elicit chronic effects in freshwater or marine water bodies. On the other hand, recently, a study on crustaceans showed for the first time that physiology and locomotive behaviour could be affected by exposure to SCL (0.0001-5 mg/L). The behavioural response of *Daphnia magna* manifested as altered swimming height and increased swimming speed, whereas in gammarids the time to reach food and shelter was prolonged. These authors suggest that exposure to sucralose may induce neurological and oxidative mechanisms with potentially important consequences for *D. magna* behaviour and physiology (Eriksson-Wiklund *et al.*, 2014). Research on the ecotoxicology of SCL is expected to increase in next years, since both short and long-term effects resulting from exposure to low levels of this compound is largely unknown.

Biomarkers are measurable internal indicators of changes in organisms at the molecular or cellular level, which can offer great potential to understand the environmentally mediated disease, and to improve the process of risk assessment (Valavanidis and Vlachogianni, 2010). Oxidative stress, is considered as one of the major mechanisms of action of toxicants, and is among the most frequently used biomarkers since it is able to evaluate general damage to biomolecules such as lipids, proteins and DNA (Barata *et al.*, 2005). Oxidative damage to lipids, proteins and DNA and adverse effects on enzymatic antioxidant defence mechanisms in aerobic organisms has been used in recent years as biomarkers for monitoring environmental pollution (Valavanidis *et al.*, 2006). The most important oxidative stress biomarkers used in toxicological studies of aquatic systems are lipid peroxidation, hydroperoxide content, protein oxidation, and enzymatic antioxidant defences activity (Dröge, 2003).

Bioindicators can be used to evaluate the toxic impact of contaminants in water bodies. Toxicity studies in fish are one of the most effective methods for understanding the deleterious effects of environmental contaminants in aquatic systems. Fish play a major role in aquatic food webs where they generally occupy an intermediate or higher position: not only are they fed upon by a variety of aquatic predators; they are also a major food source for humans around the world (van der Oost *et al.*, 2003). The common carp (*Cyprinus carpio*) is commonly used as a bioindicator species, since the cyprinids are quantitatively the most important group of teleost fishes cultured

throughout the world for commercial purposes and are also very resistant organisms and easy to maintain (Islas-Flores *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2007).

The aim of this study was to evaluate the toxicity induced by two different concentrations of SCL, (0.05 and 155 µg/L) on various organs (brain, gill, blood, liver and kidney) of the freshwater teleost fish *C. carpio* using oxidative stress biomarkers.

MATERIALS AND METHODS

Test substances

Analytical standard of sucralose, 1,6-Dichloro-1,6-dideoxy-β-D-fructofuranosyl-4-chloro-4-deoxy-α-D-galactopyranoside, was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Purity of the SCL standard was ≥98%, C₁₂H₁₉Cl₃O₈, Molecular Weight 397.63 (CAS Number 56038-13-2).

All reagents were HPLC grade. Formic acid for LC–MS analysis was purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and nitrogen gas was sourced from INFRA, S.A. de C.V. (DF, Mexico). Ultrapure water was obtained using an ultrapure water purification system provided by Merck Millipore. Acetonitrile was purchased from Sigma–Aldrich.

Quantification of SCL by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS)

Stock solution of SCL standard was prepared by dissolution of pure compound in methanol and ultrapure water (50%/50%) at a concentration of 1000 µg/L and then stored at –20 ° C in amber glass bottles.

The high-performance liquid chromatography (HPLC)–MS/MS system used was an Agilent

1290 Infinity HPLC unit (Santa Clara, CA). The chromatography column used was a RRHD Eclipse Plus C18 (2.1 × 50 mm, 1.8- μ m). The separation was performed in gradient elution with ultrapure water acidified with formic acid to pH 2.5 (solvent A) and acetonitrile (solvent B) as the mobile phase. The gradient started isocratically at 5% B for 3 min and then increased to 75% in 6 min, then increased to 100% in 1 min, remaining constant for 1 min and finally returning to 5% B in 1 min. The column temperature was 25 °C and the flow rate was 0.4 mL/min. The injection volume was set to 50 μ L. SCL was eluted in less than 8 min. SCL was quantified on an Agilent 6430 Triple Quadrupole MS equipped with electrospray ionization (ESI). LS-MS/MS analyses were conducted in negative ionization mode using multiple reaction monitoring (MRM) using 395/359 precursor/product ion transitions.

Standard without a column was injected to optimize the conditions of ESI-MS/MS. These conditions were as follows: nebulizer pressure of 45 psi, drying gas (N₂) flow rate of 11 L/min, drying gas temperature of 350 °C and capillary voltage of 4000 V.

Water

Five-milliliter water samples from exposure glass tanks were collected in glass sample vials and refrigerated at -20 °C for subsequent measurement of test concentrations. The results are expressed as time-weighted average concentrations of SCL. Samples were acidified with 1 M HCl and extraction with 5 mL (1 + 1) (v/v) methanol and ultrapure water to extract SCL from 1-mL water samples. These samples were centrifuged at 1,800 × g for 10 min, and then the upper organic layer was re-extracted. Extraction was repeated until the organic layers combined and evaporated to dryness.

Plasma

Frozen plasma samples were brought to room temperature followed by the addition of 5 mL of ice-cold acetone. After thorough mixing on a vortex mixer, contents were centrifuged at 2,000 × g for 10 min. Supernatant was separated, evaporated to 0.5 mL, back-extracted into the extraction

solvent, and finally evaporated to dryness. Samples were analyzed for SCL by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS).

Tissues

Blot-dried tissue (0.2 g) was extracted in 4 mL extraction solvent for 3 min. Extracts were transferred into 15-mL glass centrifuge tubes. Milli-Q water was added and thoroughly mixed, followed by centrifugation at $2,500 \times g$ for 5 min. The top layer was carefully separated into clean 10-mL glass vial. The extraction process was repeated and the extracts were evaporated to dryness. Dried residues

Specimen procurement and maintenance

Common carp (*C. carpio*) 19.45 ± 0.53 cm in length and weight 56.82 ± 8.3 g were obtained from the aquaculture facility in Tiacaque, State of Mexico. Fish were safely transported to the laboratory in well-sealed polyethylene bags containing oxygenated water and subsequently stocked in a large tank with dechlorinated tap water (subsequently reconstituted with salts) and acclimated to test conditions for 45 days prior to the experiment. During acclimation, carp were fed with Pedegral Silver™ fish food, and three-fourths of the tank water was replaced every 24 hours in order to maintain a healthy environment. The physicochemical characteristics of tap water reconstituted with salts were maintained, i.e. temperature 20 ± 2 °C, oxygen concentrations 80-90 %, pH 7.5-8.0, total alkalinity 17.8 ± 7.3 mg/L, total hardness 18.7 ± 0.6 mg/L. A natural light/dark photoperiod was maintained.

Oxidative stress determination

Test systems consisting in 120 x 80 x 40-cm glass tanks filled with water reconstituted from the following salts: NaHCO₃ (174 mg/L, Sigma-Aldrich), MgSO₄ (120 mg/L, Sigma-Aldrich), KCl (8 mg/L, Vetec) and CaSO₄·2H₂O (120 mg/L, Sigma-Aldrich) were maintained at room temperature with a natural light/dark photoperiod and provided with constant aeration. Static systems were used and no food was provided to specimens during the exposure period.

The oxidative stress evaluation involved adding SCL in two different concentrations (0.05 and 155 µg/L) to five test systems with 6 carps each. The target concentrations are based on the environmental water occurrence data of SCL and others sweeteners reported by Arbeláez *et al.*, 2015 (0.05-155 µg/L). Kinetics was run for the following exposure periods: 12, 24, 48, 72, and 96 h.

A SCL free control systems with 6 carp were set up for each exposure time, and the assays were performed in triplicate. In total 216 fish were used in the oxidative evaluation stress. At the end of the exposure period, fish were removed from the systems and placed in a tank containing 50 mg/L of clove oil as an anaesthetic (Yamanaka *et al.*, 2011). Anesthetized specimens were placed in a lateral position and blood was removed by puncture of the caudal vessel using a heparinized 1-mL hypodermic syringe, and performed laterally near the base of the caudal peduncle, at mid-height of the anal fin and ventral to the lateral line.

After the puncture, specimens were placed in an ice bath and sacrificed. The brain, gill, liver and muscle were removed, placed in phosphate buffer solution pH 7.4 and homogenized. The supernatant was centrifuged at 12, 500 x g and -4°C for 15 min. The following biomarkers were then evaluated: HPC, LPX, PCC and the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT. All bioassays were performed on the supernatant.

Determination of HPC

HPC was determined by the Jiang *et al.*, (1992) method. To 100 µL of supernatant (previously deproteinized with 10% trichloroacetic acid; Sigma-Aldrich) was added to 900 µL of the reaction mixture [0.25 mM FeSO₄ (Sigma- Aldrich), 25 mM H₂SO₄ (Sigma-Aldrich), 0.1 mM xylene orange

(Sigma-Aldrich) ad 4 mM butyl hydroxytoluene (Sigma-Aldrich) in 90% (v/v) methanol (Sigma-Aldrich)]. The mixture was incubated for 60 min at room temperature, and absorbance was read at 560 nm against a blank containing only reaction mixture. Results were interpolated on a type curve and expressed as nanomolar cumene hydroperoxide (CHP; Sigma Aldrich) per milligram of protein.

Determination of LPX

LPX was determined by the Büege and Aust (1978) method. To 100 µL of supernatant was added Tris-HCl buffer solution pH 7.4 (Sigma-Aldrich) until a 1 mL volume was attained. Samples were incubated at 37°C for 30 min; 2mL TBA-TCA reagent [0.375% thiobarbituric acid (TBA, Sigma-Aldrich) in 15% trichloroacetic acid (TCA, Sigma-Aldrich)] was added and samples were shaken in a vortex. They were then heated to boiling for 45 min, allowed to cool, and the precipitate removed by centrifugation at 3 000 x g for 10 min. Absorbance was read at 535 nm against a reaction blank. The malondialdehyde (MDA) content was calculated using the molar extinction coefficient (MEC) of MDA (1.56×10^5 M/cm). Results were expressed as millimolars of MDA per milligram of protein.

Determination of PCC

PCC was determined using the method of Levine *et al.*, (1994) as modified by Parvez and Raisuddin (2005) and Burcham (2007). To 100 µL of supernatant was added 150 µL of 10 mM DNPH (Sigma-Aldrich) in 2 M HCl (Sigma-Aldrich), and the resulting solution was incubated at room temperature for 1 h in the dark. Next, 500 µL of 20% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich) was added, and the solution was allowed to rest for 15 min at 4°C. The precipitate was centrifuged at 1,100 x g for 5 min. The bud was washed several times with 1:1 ethanol/ethyl acetate (Sigma-Aldrich), the dissolved in 1 mL of 6M guanidine (Sigma-Aldrich) solution (pH 2.3) and incubated at 37°C for 30

min. Absorbance was read at 366 nm. Results were expressed as micromolar reactive carbonyls formed (C=O) per milligram of protein, using the MEC of 21,000 M/cm.

Determination of SOD Activity

SOD activity was determined by the Misra and Fridovich (1972) method. To 40 μ L of supernatant in a 1-cm cuvette was added 260 μ L of carbonate buffer solution [50 mM sodium carbonate (Sigma-Aldrich) and 0.1 mM EDTA (Vetec)] pH 10.2, plus 200 μ L adrenaline (30 mM, Bayer). Absorbance was read at 480 nm after 30 s and 5 min. Enzyme activity was determined by interpolating the data on a type curve. Results were expressed as international units per milligram of protein.

Determination of CAT Activity

CAT activity was determined by the Radi *et al.*, (1991) method. To 20 μ L of supernatant was added 1 mL isolation buffer solution [0.3 M saccharose (Vetec), 1 mL EDTA (Vetec), 5 mM HEPES (Sigma-Aldrich) and 5mM KH_2PO_4 (Vetec)], plus 0.2 mL of a hydrogen peroxide solution (20 mM, Vetec). Absorbance was read at 240 nm after 0 and 60 s. Results were derived by substituting the absorbance value obtained for each of these times in the formula: $\text{CAT concentration} = (A_0 - A_{60}) / \text{MEC}$, where the MEC of H_2O_2 is 0.043 mM/cm, and where expressed as micromolar H_2O_2 per milligram of protein.

Determination of Total Protein

Total protein was determined by the Bradford (1976) method. To 25 μ L of supernatant were added 75 μ L of deionized water and 2.5 mL Bradford's reagent [0.05 g Coomassie Blue dye (Sigma-Aldrich), 25mL of 96% ethanol (Sigma- Aldrich), and 50 mL H₃PO₄ (Sigma-Aldrich), in 500 mL deionized water]. The test tubes were shaken and allowed to rest for 5 min prior to the reading of absorbance at 595 nm and interpolation on a bovine albumin (Sigma-Aldrich) curve.

Statistical Analysis

Results of the toxicity assays were statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA), and differences between means were compared using the Bonferroni multiple comparisons test, with *P* set at <0.05. The differences with respect to time were testes. Statistical determinations were performed with SPSS v10 software (SPSS, Chicago IL, USA).

RESULTS

SCL quantification

Table 1 shows the concentration of SCL in the water systems and in the carp. As can be seen, the SCL concentrations in the water system are decreasing over the time and increasing in

the carp's organs and tissues analysed. The organs that have a higher uptake of SCL were the gills and the blood; in the other hand the brain was the organ with the less SCL bio-concentration.

HPC

HPC results are shown in Fig. 1. Significant increases with respect to the control group ($P<0.05$) were observed in blood at 12, 24, 48 and 72 h in the concentration of 0.05 µg/L (127.9, 131.5, 122.1 and 128.2 % respectively) and at 24 h in the concentration of 155 µg/L (130.9%). At 96 h in 0.05 µg/L and at 12, 48, 72 and 96 h in 155 µg/L significantly lower (91.1%) and (82.6, 43, 96.9, 44.5%) respectively, were observed. In liver, significant increases was observed at 48 h (159.7%) in 0.05 µg/L and at 48 and 72 h in 155 µg/L (132.3 and 135%). At 12, 24, 72 and 96 h in 0.05 µg/L and at 12, 24 and 96 h in 155 µg/L significant decreases with respect to control were observed ($P<0.05$) (table 2). Significant increases with respect to the control group ($P<0.05$) were observed in gill at 12h (118.6%) in the concentration of 0.05 µg/L, and at 48 and 72 h (189.5 and 101.7%) in the 155 µg/L. At 24, 48, 72 and 96 in 0.05 µg/L and at 12, 24 and 96 h in 155 µg/L significantly lower were observed. In brain at 48 and 72 h in 0.05 µg/L and at 12, 48 and 72 h 155 µg/L was observed a significantly increases with respect to control group ($P<0.05$). Significantly lower were observed at 12, 24 and 96 (88.2, 26.5 and 45.1%, respectively) in 0.05 µg/L and at 24 and 96 h in 155 µg/L (71.9 and 50.4). Finally, in muscle were observed significant increases with respect to control group ($P<0.05$) at 24, 48, 72 and 96 h (118, 404, 315.8 and 128.2%, respectively) in 0.05 µg/L and at 12, 48 and 72 in 155 µg/L (232.2, 185.8 and 142.8% respectively). At 12 h in 0.05 µg/L and at 24 and 96 h in 155 µg/L significantly lowers were observed (Table 2).

LPX

The amount of MDA induced by the SCL is shown in Figure 2. A significant increase compared to the control group ($P<0.05$) was found in blood at 24 and 72 h in 0.05 $\mu\text{g/L}$ (107.7 and 108.3%) and at 12, 24 and 72 h in 155 $\mu\text{g/L}$. These increases were 155.6, 161.6 and 124.1% respectively. In table 2, can be seen at 12, 48 and 96 h in 0.05 $\mu\text{g/L}$ and 48 and 96 h in 155 $\mu\text{g/L}$ a significant decreases with respect to control ($P<0.05$). In liver, a time-dependent decreases compared to the control group ($P<0.05$) was found at all exposure times in two concentrations. These decreases were 57.4, 60.8, 46.5, 64.7 and 51.8% at 12, 24, 48, 72 and 96 h, respectively in 0.05 $\mu\text{g/L}$ and 82.9, 91.2, 49.7, 74.1 and 47.8 %, respectively in 0.05 $\mu\text{g/L}$ at the same times. In gill, brain and muscle, a time-dependent increases compared to the control group ($P<0.05$) was found at all exposure times in two concentrations (Table 2). The most evident increases were observed in brain in 155 $\mu\text{g/L}$. Except in muscle at 96 h in 155 $\mu\text{g/L}$ was observed a significant decrease with respect to control (58.3%).

PCC

PCC results are shown in Fig. 3. A significant increase with respect to the control group ($P<0.05$) was observed in blood at 12 hours in the 155 $\mu\text{g/L}$ concentration (135.3%). At 12, 24, 48,72 and 96 hours in the 0.05 $\mu\text{g/L}$ concentration, and at 24, 48, 72 and 96 hours in the 155 $\mu\text{g/L}$ concentration, significant decreases with respect to control were observed (45.7, 33.1, 17.9, 95.1 and 14.7% respectively) and (80.2, 66.3, 81.9 and 81.3 % respectively). In the liver at 48 and 72 hours for the 0.05 $\mu\text{g/L}$ concentration were observed significant increases with respect to the control group (242.9 and 131.7% respectively), as well as it were seen significant increases at 48 and 72 hours in the 155 $\mu\text{g/L}$ concentration (248 and 511.1% respectively). At 12, 24, and 96 hours in the 0.05 $\mu\text{g/L}$ concentration it were observed significantly decreases with respect to the control group (50.5, 20.4 and 67.5% respectively), moreover the 155 $\mu\text{g/L}$ concentration also had significant decreases with respect to the control group at 12, 24 and 96 hours (94.5, 76.7 y 40.5% respectively); in gills at 12, 48 and 72 hours for the 0.05 $\mu\text{g/L}$ concentration and at 12, 24, 48, 72and 96 hours for the 155 $\mu\text{g/L}$ concentration it were showed significant increases with respect to the control group (Table 2), in the other hand at 24 and 96 hours for the 0.05 $\mu\text{g/L}$ concentration it was showed a significant

decrease with respect of the control group (59.7 and 49.9% respectively); in the brain it was showed a significant increase with respect of the control group in the 0.05 µg/L concentration at 48 hours (175.8%), and at 72 hours for the 155 µg/L concentration (149.7%). At 12, 24, 72 and 96 hours for the 0.05 µg/L concentration it were observed significant decreases with respect to the control group (20.1, 20.7, 36.7 and 11.7% respectively), in muscle it was observed significant increases with respect to the control group for the 0.05 µg/L concentration in all the times of exposure (241.3, 294.6, 1149.2, 160.9 y 110.9 % respectively), and at 12, 24, 48 and 72 for the 155 µg/L concentration, however, at 96 hours for the 155 µg/L concentration it were observed significant decreases with respect to the control group of 31.3% (Table 2).

SOD

SOD results are shown in Fig. 4. A significant increase with respect to the control group ($P < 0.05$) was observed in the blood at 12, 48 and 72 hours in the concentration of 0.05µg/L (120.4, 280.9 and 179.2% respectively) and at 12, 24, 72 and 96 hours for the 155 µg/L concentration (212.7, 552.9, 156.8 and 223.6% respectively). At 24 and 96 hours for the concentration of 0.05 µg/L as well as at 12 and 48 hours for the concentration of 155 µg/L it was observed a statistically significant decrement (Table 2); in the liver at 48 hours for the 0.05µg/L concentration it was observed a significant increase with respect of the control group (980.1%) likewise a significant increase was observed at 72 hours for the 155 µg/L concentration (1445.1%), in contrast statistically significant decrements were observed at 12, 24, 72 and 96 hours in the 0.05µg/L concentration (77.6, 32.2, 42.9 and 26.5% respectively) but also at 12, 24, 48 and 96 hours for the 155 µg/L concentration (62.8, 14.8, 57.8 and 3.3% respectively); in brains at 12 and 96 hours it was observed a statistically significant increment in the 0.05µg/L concentration (627.2 and 213.2% respectively), in the same way a significant increment was observed at 12, 24, 48 and 72 hours for the 155 µg/L concentration (126.1, 110.9, 377.5 and 178.1% respectively), conversely at 24, 48 and 72 hours for the 0.05 µg/L concentration it was observed a significant decrease with respect to the control group (15.3, 6.8 and

62.4% respectively) as well as a significant decrease for the 155 µg/L concentration at the 96 hours (75%); in brain an increase in the SOD activity was observed for the concentration of 0.05 µg/L at 12 and 48 hours (120.5 and 224.8% respectively), but also for the concentration of 155 µg/L at 12, 48 and 72 hours (194.5, 384.3 and 740.2% respectively), contrary at 12, 72 and 96 hours for the 0.05 µg/L concentration (29.2, 98.4 and 40.8% respectively) and at 24 and 96 hours for the 155 µg/L concentration (96.8 and 50.1% respectively) a significant decrease was observed; in muscle a significant increase with respect to the control group was observed for the 0.05 µg/L concentration at 12, 24, 48 and 72 hours (104, 256.5, 476.3 and 288.4% respectively), and for the 155 µg/L concentration at 12, 48 and 72 hours (692.4, 432.3 and 209.6% respectively), conversely a statistically significant decrement was observed for the 0.05 µg/L concentration at 96 hours (78.8%) and at 24 and 96 hours for the 155 µg/L concentration (59.4 and 87% respectively).

CAT

CAT activity results are shown in Fig. 5. A significant increase with respect to the control group ($P < 0.05$) was observed in blood at 12, 48, 72 and 96 hours for the 0.05 µg/L concentration (124.2, 183.2, 165.5 and 144.9% respectively) and also for the 155 µg/L concentration at 12 and 24 hours (225.3 and 268.6% respectively). However, at 24 hours for the 0.05 µg/L and at 48, 72 and 96 hours for the 155 µg/L concentration, it was observed a statistically significant decrement (67.4%) and (10.7, 7.4 and 13.1% respectively); in the liver at 48 hours in the 0.05 µg/L concentration it was showed a significant increment with respect to the control group (244.7%), likewise at 48 hours for the 155 µg/L concentration (167.9%), in the other hand a significant decrease respect to the control group was observed at 12, 24, 72 and 96 hours for the 0.05 µg/L concentration (51.9, 30.8, 33.8 and 48.8% respectively); and at 12, 24, 72 and 96 hours for the 155 µg/L concentration (32.5, 15.3, 27.1 y 8.6% respectively); in the gills the CAT activity showed a significant increase at 48 hours for the lowest concentration (206.8%), as well as at 12, 48 and 96 hours for the 155 µg/L concentration (105.3, 821.7 and 361.1% respectively), conversely for the 0.05 µg/L concentration it was observed a significant decrement at 12, 24, 72 and 96 hours (33, 77, 42.5 and 75.2% respectively), but also for

the 155 µg/L concentration at 24 and 72 hours (45.5 and 90.4% respectively); in the brain a significant increment with respect to the control group was observed for the 0.05 µg/L concentration in all the exposures times (606, 220.5, 742.6, 2841.7 and 254.6% respectively), as well as for the 155 µg/L concentration at 12, 48, 72 and 96 hours (294.4, 1080.6, 2067.2 and 471.6% respectively); in the muscle the CAT activity showed a significant increase with respect to the control group for both concentrations at all the exposures times, for the 0.05 µg/L concentration (124.8, 298.9, 513.6, 173.4 and 209.2% respectively) and (650.8, 106.4, 890.2, 367.1 and 1942.5% respectively) for the 155 µg/L concentration.

Discussion

The artificial sweetener SCL, approved for human consumption in more than 70 countries, is widely and highly consumed around the globe, consequently due to its intensive use and due to its high water solubility recent scientific reports has described its occurrence in different water bodies at concentrations ranging from 0.1-1.0 g/L (Eriksson *et al.*, 2014; Lange *et al.*, 2012; Minten *et al.*, 2011; Loss *et al.*, 2009), moreover this chemical compound poses a high persistence rate, which have raised the environmental concern regarding with its possible biological effects over non-target aquatic species. However, the present state of knowledge is still unable to comprehend fully the possible ecotoxicological risk that this compound may pose.

SCL is a tri-chloro derivate of sucrose, by this chlorination the sucrose change in a way that makes it persistent against glycosidic enzymes that normally degrade carbohydrates in the gut, but also makes it extremely resistant to hydrolysis (European Commission, 2000). Likewise, SCL is consider being a compound very stable at environmental conditions; Grice and Goldsmith (2000) reported that at pH 4 and 6 no detectable loss of SCL was expected to occur within one year; likewise Grotz *et al.*, (2012) reported that in a buffered SCL concentrate solution (25%) there was no chemical changes at pH 4.4 at 20°C over a storage time of five years; moreover The European Commission (2000) reported that at room temperature and in acid pH (3) only 0.3% of hydrolysis was achieved after six months of storage. However, the analytic results obtained in this study show a different

degradation rate of SCL; for the lowest test concentration ($0.05 \mu\text{g L}^{-1}$) the analytic results shows a degradation between 51-60% until the 96 hours considering also the distribution of this compound in the different organs analysed, likewise for the higher test concentration ($155 \mu\text{g L}^{-1}$) the HPLC-MS/MS results shows a degradation rate of SCL between 28.5-36.5% until the 96 hours also considering the distribution of this compound in the different organs analysed. Comparing our results with the reports in literature there is a massive difference between both of them, however it is important to remark that the degradation rate of SCL described in literature was obtained without the presence of any aquatic animal, therefore to our knowledge this is the first study examining the degradation rate of SCL in presence of an aquatic species.

First its important to discuss that abiotic factors like pH, temperature, sunlight and so on are discarded, since during the whole experiment all this factors were daily measured and controlled, but also a remarkable aspect is that different authors have demonstrated a very slow or null degradation rate under different conditions, even in some cases extreme and no natural in the environment (European Commission, 2000; Grice and Goldsmith, 2000; Soh *et al.*, 2011; Grotz *et al.*, 2012), thereby this sweetener was considered by the European Scientific Committee on Food to be extremely resistant to hydrolysis (European Commission, 2000).

On the other hand, biotic transformation due to the presence of bacteria is discarded since Lappin Scott *et al.*, (1987) as well as Labare and Alexander (1993, 1994) reported that SCL was not utilized as carbon source by bacteria, moreover, they also reported that the microbial transformation of SCL is a co-metabolic degradation process, that needs the presence of soil as well as dehalogenating microorganisms with a very slow kinetic of 23% degradation rate within 123 days; likewise the Chemical Notification and Assessment Scheme of the Australian Occupational Health and Safety Commissions (2001) classified the SCL as a compound no biodegradable, since they reported a 5% degradation within 28 days.

Thus the high degradation rate described above could be explained by the presence of the carps in the water test systems; the scientific literature report that less than 10% of the initial dosage of SCL is metabolized in two different metabolites without wide differences between species as dog, mouse, and human. The two metabolites are the, 4-chloro-4-deoxy-galactose (4-CG) and 1,6-dichloro-1, 6-dideoxy-fructose (1,6-DCF), and both metabolites had characteristics of glucuronide

conjugates of SCL (Sims *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2000; Grice and Goldsmith, 2000). Moreover, Abou-Donia *et al.*, 2008 described that SCL elevated the expression of P-gp and CYP (CYP3A, CYP2D) enzymes in the gastrointestinal tract of rats at doses approved by the FDA and EU. The CYP subfamily CYP3A is reported to have specificity over organochlorine drugs like midazolam, therefore the organochlorine sweetener SCL could be a substrate for this CYP enzyme, (Schiffman and Rother, 2013; Higashikawa *et al.*, 1999). In this context, it is noteworthy that the CYP superfamily are related also with the intestinal metabolism of different compounds, contributing significantly to the first pass effect and therefore with the decrease in the concentration of the xenobiotics (Schiffman and Rother, 2013; Paine, M.F. 2009; Paine *et al.*, 2006; Paine and Thummel, 2003; Hall *et al.*, 1999; Thummel *et al.*, 1997). Fishes are capable of xenobiotic metabolism by microsomal oxidation, reduction and conjugation; indeed the enzyme characteristics are similar between fishes and mammals (Chambers and Yarbrough, 1976), particularly the CYP subfamily CYP3A has been reported to be present in liver, intestines, blood and brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), killifish (*Fundulus heteroclitus*), medaka (*Oryzias latipes*), and common carp (*Cyprinus carpio*) (González Mantilla, 2006; Thibaut *et al.*, 2006; Kashiwada *et al.*, 2005; Hegelund and Calendar, 2003; Lee and Buhler, 2003; Buhler and Wang-Buhler, 1998; Cock *et al.*, 1998; Calendar and Stegeman, 1998). Likewise the glucuronidation process in teleost fishes as carps have been reported to play an important role in the hepatic detoxification of different xenobiotics (Yokota *et al.*, 2002; George, S.G., 1994; Clarke *et al.*, 1991; James, O.M., 1987; Forlin and Haux, 1985), therefore it is possible that part of the SCL could be metabolized by oxidation and glucuronidation processes in the carp, leading to the formation of the glucuronide conjugates, 4-CG and 1,6-DCF and other metabolites.

Another possible factor that may explain the lost in concentration of SCL could be that the organochlorine sweetener may be bio-concentrated in different organs and tissues to those analysed in this experiment. Regarding with the bio-concentration result of SCL in *Cyprinus carpio*, for the 155 $\mu\text{g L}^{-1}$ concentration, SCL was detected and quantified in all the exposure times and in all the organs and tissues tested, with the highest concentrations detected within 48-72h, and quantified in the organs in the following decreasing order, blood, gill, liver, muscle, and brain. For the 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ concentration, SCL was detected in all the exposure times in the blood, gill and liver, and only between 72-96h in the brain and muscle; the highest concentrations detected were within 72-96h, and was quantified in the organs in the following decreasing order, blood, gill, liver, muscle

and brain. However, with low-octanol water partitioning coefficient (-0.49^2) and a structure full of hydroxyl groups, SCL poses a low bioaccumulation potential (Tollefsen *et al.*, 2012). The reviewed literature stated that SCL does not accumulate significantly in different aquatic organisms tissues, with a bioaccumulation factors (BCF) lower than the criteria set to identify it as persistent in species as *Danio rerio*, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Daphnia magna* (Lillicrap *et al.*, 2009; Lillicrap *et al.*, 2011). Our results are in agreement with the above, due to in the bigger concentration ($155 \mu\text{g L}^{-1}$) only $12.55 \mu\text{g}$ (8.1%) were accumulated in the different organs and tissues analysed, which means a BCF of 0.1276; likewise in the lower concentration ($0.05 \mu\text{g L}^{-1}$) only $0.00461 \mu\text{g}$ (9.22%) were accumulated in the different organs and tissues analysed, which means a BCF of 0.0922. For both concentrations, the BCF results obtained in this study for the uptake of SCL were below than the unit, which means that SCL does not accumulate significantly in the different organs and tissues of *Cyprinus carpio*.

With a low bio-concentration factor (less than 10%) and a high stability for the abiotic factors, a possible explanation for the lost in concentration of SCL reported above is that *Cyprinus carpio* may metabolize this synthetic sweetener. Schiffman and Rother, 2013 stated that the rise in CYP3A described by Abou-Donia *et al.*, 2008 could be the result from an auto induction process by which sucralose enhance its own metabolism by the induction of proteins involved in their own detoxification process; another possibility is that SCL were distributed in different organs and tissues to those analysed in this experiment, whatever until now the conditions needed to degrade SCL are not yet fully understood and further experiments are needed.

Regarding with the toxicology of SCL, in the recent decades it has been tested in different aquatic organisms (*Lemna gibba*, *Calanus glacialis*, *Calanus finmarchicus*, *Pseudokirchneirella subcapita*, *Daphnia magna*, *Danio rerio*) resulting always in negligible adverse acute/chronic toxic effects as well as in low bio-concentration factor (Soh *et al.*, 2011; Lillicrap *et al.*, 2011; Hjorth *et al.*, 2010); however Eriksson *et al.*, 2012 reported that SCL modifies the swimming height and swimming speed in *Daphnia magna* as well as modifies the time to reach food and the shelter time in *Gammarus oceanicus* and *Gammarus zaddachi*, moreover Eriksson *et al.*, 2014 report that SCL induce neurological and oxidative damage with potentially important consequences for animal behaviour and physiology. However the present knowledge and scientific data until now is insufficient to

demonstrate its environmental innocuity.

To our knowledge this is the first study examining the oxidative stress produced by SCL in aquatic species. Our analytic results demonstrate that SCL was present in the water media and within the carp during the whole experiment, thereby the changes in the enzymatic activity (SOD, CAT) and the damages to the biomolecules (LPx, HPC, PCC) described in the result section are directly related to the presence of this artificial sweetener. Our results indicate a significant elevation in the activity of SOD and CAT enzymes in all the organs and tissues analysed, for the SOD activity the organ with the highest activity was the muscle followed by the liver, gill and brain in a decreasing order; the blood was the only tissue with negligible SOD activity; in the other hand, for the CAT activity the organ with the highest activity was the gill, followed by the liver, blood, muscle and brain in a decreasing order. An increase in the activity of CAT and SOD enzymes has been reported in the face of different environmental pollutants (Elizalde-Velázquez *et al.*, 2016; SanJuan-Reyes *et al.*, 2015; Islas-Flores *et al.*, 2014, Garcia-Medina *et al.*, 2013; Islas-Flores *et al.*, 2013; SanJuan-Reyes *et al.*, 2013; Garcia-Medina *et al.*, 2010), since SOD and CAT enzymes represents the major reactive oxygen species (ROS) scavenging mechanisms and thereby the first line of defence against oxidative stress. SOD catalyses the transformation of superoxide anion (O_2^-) to hydrogen peroxide (H_2O_2), which is metabolized to O_2 and water by CAT enzymes (van de Oost *et al.*, 2003). As we described before in this manuscript, Abou-Donia *et al.*, (2008) stated that SCL elevated the expression of CYP enzymes in the gastrointestinal tract of rats, particularly the CYP3A and CYP2D subfamilies, thus it is possible that SCL could be bio-transformed by CYP450 enzymes present in the smooth endoplasmic reticulum of cells in the different organs such as the liver, kidney, gills, gut, brain, heart, muscle, gonads, among others (Stegeman and Livingstone, 1998). Cytochromes P450 are responsible for the biotransformation of most xenobiotics as well as participate actively in the elimination of foreign chemicals from the body, however these enzymes has an important consequence related to its activity since these enzymes reduce molecular oxygen to produce prooxidant species, which, if are not countered efficiently by antioxidants, create oxidative stress. During the metabolism mediated by CYP enzymes a large fraction of ROS are released, first CYP produces an oxygenated intermediate, the oxy-cytochrome P450 complex with the consequent release of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$); the second ROS production is developed by the protonation of the peroxy-cytochrome P450 complex with the consequent formation of hydrogen peroxide (H_2O_2), moreover besides these two

ROS producing branches, an additional mechanisms of electron leakage is performed by the four electron reduction of the oxygen molecule with the production of water (H₂O), contributing in the redox cycling of the CYP450 (Doi *et al.*, 2002; Davydov D.R., 2001). Since the cells have a high content of the microsomal monooxygenase system, and the microsomal electron transfer chain is one of the main sources of ROS, its activity has been associated to cytotoxicity, genotoxicity, oxidative stress, carcinogenesis, drug toxicity, and the pathogenesis of several diseases (Gonzalez, F. J., 2005; Davydov D.R., 2001; Robertson *et al.*, 2007; Bondy and Naderi, 1994). In a recent study Eriksson *et al.*, (2014) reported that the exposure of *Daphnia magna* to SCL induces oxidative mechanisms with potentially important consequences for animal behaviour and physiology. They measured the oxygen radical absorbing capacity (ORAC), which represent the level of antioxidant defences, and they found an increase in the values of this biomarker. Therefore the biotransformation process mediated by the microsomal monooxygenase system and the CYP enzymes with the consequent release of ROS, could explain the increase in the SOD and CAT activities described above in this study.

Another possible explanation could be related with the energy regulation; Swithers *et al.*, (2008, 2009, 2010) reported that consumption of foods and fluids containing high potency sweeteners interfered with the ability of sweet taste to predict caloric consequences and therefore disrupted energy regulation (Schiffman and Rother, 2013; Swithers *et al.*, 2010, 2009; Swithers and Davidson 2008). The sweet taste cues have been reliable predictors of energy density of food, however artificial sweeteners like SCL have negligible utilizable calories, which uncouple the relation between sensory properties of foods and their caloric content (Schiffman and Rother, 2013). Sugar receptors have been found in *Cyprinus carpio* (Hidaka and Yokota, 1967), thereby the carp could likely sense the artificial sweetener SCL dissolved in the water serving as a cue for food intake. Eriksson *et al.*, 2014 stated that exposure of *Daphnia magna* to sucralose stimulates feeding and increase caloric intake that may also predispose test animals to oxidative stress. In this context, Pepino *et al.*, 2013 reported that SCL increase glucose and insulin levels in obese women, as well as different authors also have reported that SCL modulates glucose and insulin secretion in rodents (Nakawaga *et al.*, 2009; Mace *et al.*, 2007). Brief episodes of hyperglycemia cause tissue damage by mechanisms involving repeated acute changes in cellular metabolism; Rolo and Palmeira (2006) number some key metabolic pathways as major contributors to hyperglycemia induce tissue damage: by

increasing the polyol pathway flux and by increasing the advanced glycation end product (AGE). The increase in the polyol pathway flux decreases the NADPH and glutathione equivalents, which enhance sensitivity to intracellular ROS (Brownlee, 2001). The production of advanced glycation end product (AGE) precursor interferes with the cell integrity by inducing receptor-mediated production of ROS (Yan *et al.*, 1994). Additionally Nishikawa *et al.*, (2000b) reported that hyperglycemia induced the overproduction of superoxide in the mitochondria. Therefore the disruption in the energy regulation due to an increase of glucose and insulin levels induced by SCL involves the production and release of intracellular ROS, which also could explain the increase in the SOD and CAT activities described above in this study.

An increased ROS production not only involves an increase in the antioxidant enzymes levels it may also cause cell damage by attacking biomolecules as lipids and proteins, resulting in an increase in LPX and in the oxidized protein content (Gómez-Oliván *et al.*, 2014; Shacter, 2000). Lipid peroxidation can be described generally as a process that involves a chain of oxidation reactions under which oxidants such as free radicals or non-radical species attack lipids containing carbon-carbon double bonds, especially polyunsaturated fatty acids that involves hydrogen abstraction from a carbon, with oxygen interstition resulting in lipid peroxy radicals and hydroperoxides. The hydroperoxides can readily break down into various chemical species such as lipids alcoxyl radicals, aldehydes (malondialdehyde), alkenes (4-hidroxinonenal), lipid epoxides and alcohols, most of which are toxic products (Ayala *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2011; Porter *et al.*, 1995). Among several substrates, DNA and proteins are particularly susceptible to modification caused by these aldehydes. Particularly, malondialdehyde and 4-hidroxinonenal can yield adducts that play a critical role in multiple cellular processes and can participate in secondary deleterious reactions by promoting intramolecular or intermolecular protein/DNA crosslink that may induce profound alteration in the biochemical properties of biomolecules, which may facilitate the development of various pathological states (Ayala *et al.*, 2014). In our study we use the HPC and LPX as molecular biomarkers to asses the damage of lipids and both of them were modified due to the presence of these artificial sweetener; the organs that showed more damage were gills, brain and muscle; in the other hand blood and liver showed a negligible effect for this two biomarkers related with the presence of SCL. Likewise, we use the PCC molecular biomarker to measure the damage to proteins, as well as in the HPC and LPX results the organs that showed more damage were gills, muscle, brain,

but also liver showed an increase in the protein carbonylation content, however, the blood again showed a negligible effect for this molecular biomarker. Our results are in agreement with the reports of Eriksson *et al.*, (2014) who stated that SCL induce lipid peroxidation in *Daphnia magna* after its exposure to SCL. Gills play a major role in aquatic species to maintain osmotic pressure, acid-base homeostasis and control the influx and efflux of water, oxygen and ions; but also gills are the main organs in intimate contact with the water media and consequently with the xenobiotics, thereby they are likely to be target for aquatic pollutants, additionally gills are known to be a site with a high oxidative metabolism and a site of expression of the cytochrome isoform CYP3A, promoting the production of ROS and consequently the oxidative damage (Gómez-Oliván *et al.*, 2014; Uno *et al.*, 2012; Monteiro *et al.*, 2005). The brain as well as the nervous systems are inadequately equipped with antioxidant defence systems to prevent oxidative damage therefore are prone to oxidative stress (Halliwell, 2006), in this context Eriksson *et al.*, 2014, reported that exposure to SCL may induce neurological and oxidative mechanisms, since they observed a stimulating effect of SCL on the acetylcholinesterase (AChE) activity of *Daphnia magna*; scientific literature reported that elevated activity of AChE has been linked to neurodegenerative diseases as Alzheimer's disease, Parkinson disease's, multiple sclerosis and restless leg syndrome (RLS) (Eriksson *et al.*, 2014; Akaike *et al.*, 2010; Toiber and Soreq, 2005). Skeletal muscles pose high oxidative metabolism since this organ uses high quantities of oxygen and large amounts of energy to do their functions (Ferrari *et al.*, 1997). Wiklund *et al.*, 2012 reported that SCL altered the swimming height and increased the swimming speed of *Daphnia magna*, which results in increased energy spending and induce high metabolic costs, thereby inducing the production of ROS. Muscles are made of proteins and aminoacids, which are target of ROS; direct damage to proteins or chemical modifications of aminoacids and proteins during oxidative stress, can give rise to protein carbonyls (Parvez and Raisuddin, 2005).

More experimental studies are needed to assess the biodegradation rate of SCL in water media in presence of different aquatic species, as well as identify the different degradation products that could be yield by this processes, likewise experimental studies in different aquatic species that involve the use of different molecular biomarkers, and different studies as cytotoxicity and genotoxicity are needed to fully understand the ecotoxicological risk associated with the presence of this artificial sweetener in the environmental water bodies, since the present study shows that

SCL indeed is an ecotoxicological challenger that modifies the normal antioxidant enzymatic activity and induce oxidative damage in lipids and proteins of *Cyprinus carpio*.

Conclusion.

SCL was degraded almost 50% after 96h in presence of *Cyprinus carpio*, however the artificial sweetener was present in the water media during the whole experiment, thus the enzymatic activity changes reported as well as the biomolecule damage described are related to its presence. SCL posses a low BCF (less than the unit for both test concentrations) which means that this organochlorine compound does not accumulate in the organs and tissues of *Cyprinus carpio*. In both concentrations the higher values of SCL were recorded between 48-96h after it exposition, being the blood the tissues with the higher SCL concentrations and the brain with the less values for this sweetener. SCL modified the normal antioxidant enzyme level and induce oxidative damage in lipids and proteins of *Cyprinus carpio*, the organs which showed more damage were gills, muscle, brain and liver in decreasing order, and the blood was the only tissue with negligible affects. The set of assays used in the present study could be effectively used as potential biomarkers to measure the toxicity of AMX for the freshwater fish in the field of environmental biomonitoring, as well as also constitutes a reliable early warning biomarker for the use in the evaluation of the toxicity induced by these emerging contaminants on aquatic species.

REFERENCES

- . Abou-Donia, M.B., El-Masry, E.M., Abdel-Rahman, A.A., McLendon, R.E., Schiffman, S.S. 2008. Splenda alters gut microflora and increases intestinal P-glycoprotein and cytochrome P450 in male rats. *J. Toxicol. Environ. Health. A.*, 71, 1415-1429. doi: 10.1080/15287390802328630.
- . Ahmed FE, Thomas DB. 1992. Assessment of the carcinogenicity of the nonnutritive sweetener cyclamate. *Crit Rev Toxicol* 229 (2):81-118. doi:10.3109/10408449209146307
- . Akaike A, Takada-Takatori Y, Kume T, Izumi Y., 2010. Mechanisms of Neuroprotective Effects of Nicotine and Acetylcholinesterase Inhibitors: Role of $\alpha 4$ and $\alpha 7$ Receptors in Neuroprotection. *J Mol Neurosci* 40: 211–216. doi 10.1007/s12031-009-9236-1
- . Arbeláez P, Borull F, Pocurull E, Marcé RM. 2015. Determination of high-intensity sweeteners in

- river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1393:106-114. [doi:10.1016/j.chroma.2015.03.035](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.03.035)
- . Australian Government. 2001. Department of Health Ageing, National Industrial Chemicals Notifications and Assessment scheme-Full public report 1,6-dichloro-1,6-dideoxy-β,D-fructofuranosyl-4-chloro-4-deoxy-α,D-galactose, <http://www.nicnas.gov.au/publications/car/new/exfullr/ex0000fr/ex43fr.pdf> (Accessed 23-04-2016)
 - . Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S. 2014. Lipid peroxidación: Production, Metabolism, and Signalling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 1-31. doi.org/10.1155/2014/360438
 - . Barata C, Varo I, Navaro JC, Arum S, Porte C. 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 140:175-186. [doi:10.1016/j.cca.2005.01.013](https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.01.013)
 - . Bondy, S.C., Naderi, S. 1994 Contribution of hepatic cytochrome P450 systems to the generation of reactive oxygen species. *Biochem. Pharmacol.* 48, 155–159. [doi:10.1016/0006-2952\(94\)90235-6](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90235-6)
 - .
 - . Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72(1): 248-254. [doi:10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
 - . Brorstrom-Lunden E, Svenson A, Viktor T, Woldegiorgis A, Remberger M, Kai L, Dye C, Bjerke A, Schlabach M. 2008. Measurements of sucralose in the Swedish screening program 2007 – part 2: Sucralose in biota and regional STP samples. IVL Report B1795. Swedish Environmental Research Institute, Stockholm, Sweden.
 - . Brownlee, M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414, 813–820. [doi:10.1038/414813a](https://doi.org/10.1038/414813a)
 - . Büege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 52: 302–310. [doi:10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
 - . Buhler, D.R., Wang-Buhler, J-L. 1998. Rainbow trout cytochrome P450s: purification, molecular

- aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. *Comp. Biochem. Physiol. C* 121:107-137. [doi:10.1016/S0742-8413\(98\)10033-6](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10033-6)
- . Burcham PC. 2007. Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: A new tool for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury. *J Pharmacol Toxicol* 56(1): 18–22. [doi:10.1016/j.vascn.2006.02.015](https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.02.015)
 - . Bennett D. 2008. The Intense Sweetener World, Ehrenberg Centre for Research in Marketing. [http://www.lsbu.ac.uk/bus-ehrenberg/documents/High Intensity Sweeteners.pdf](http://www.lsbu.ac.uk/bus-ehrenberg/documents/High%20Intensity%20Sweeteners.pdf); (accessed 06.04.2016).
 - . Brusick D, Grotz VL, Slesinki R, Kruger CL, Hayes AW. 2010. The absence of genotoxicity of sucralose. *Food Chem Toxicol* 48(11): 3067-3072. [doi:10.1016/j.fct.2010.07.047](https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.047)
 - . Celander, M.C., Stegeman, J.J. 1997. Isolation of a cytochrome P4503A cDNA sequence (CYP3A30) from the marine teleost *Fundulus heteroclitus* and phylogenetic analyses of CYP3A genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236:306-312. [doi:10.1006/bbrc.1997.6956](https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6956).
 - . Chambers, J. E., & Yarbrough, J. D. (1976). Xenobiotic biotransformation systems in fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 55(2), 77-84. [doi:10.1016/0306-4492\(76\)90027-7](https://doi.org/10.1016/0306-4492(76)90027-7).
 - . Clarke, D.J., George, S.G., Burchell, B. 1991 Glucuronidation in fish. *Aquatic Toxicology*, 20: 35-56.
 - . Cohen SM, Arnold LL, Emerson JL. 2008. Safety of saccharin. *Agro Food Industry Hi-tech* 19 (6): 24-28.
 - . Cok, I., Wang-Buhler, J.L., Kedzierski, M.M., Miranda, C.L., Yang, Y.H., Buhler, D.R. 1998. Expression of CYP2M1, CYP2K1, and CYP3A27 in brain, blood, small intestine, and other tissues of rainbow trout. *Biochem Biophys Res Comm* 244:790-795. [doi:10.1006/bbrc.1998.8273](https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8273).
 - . Davydov, D. R. 2001 Microsomal monooxygenase in apoptosis: another target for cytochrome c signaling?. *Trends in biochemical sciences*, 26(3), 155-160. [doi:10.1016/S0968-0004\(00\)01749-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01749-7).
 - . Doi H, Iwasaki H, Masubuchi Y, *et al.*, 2002 Chemiluminescence associated with the oxidative metabolism of salicylic acid in rat liver microsomes. *Chem Biol Int* 140:109–119. [doi:10.1016/S0009-2797\(02\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00004-2)
 - . Dröge W. 2003. Free radicals in the physiological control of cell functions. *Physiol Rev* 439:47-95.

doi: 10.1152/physrev.00018.2001.

- . Eriksson-Wiklund A-K, Adolfsson-Erici M, Liewenborg B, Gorokhova E. 2014. Sucralose induces biochemical responses in *Daphnia magna*. PLoS ONE 9(4): e92771. doi: [org/10.1371/journal.pone.0092771](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092771)
- . Elizalde-Velázquez A, Galar-Martínez M, Dublán-García O, Gómez-Oliván LM, Rodríguez-Flores J, Castañeda-Peñalvo G. 2016. Effect of amoxicillin exposure on brain, gill, liver and kidney of common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. Environmental Toxicology. Journal Citation Reports (JCR). In Press.
- . European Commission. 2000. Scientific Committee on Food (SCF), Opinion of the Scientific Committee on Food on sucralose–SCF/CS/ADDS/EDUL/190 Final, http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out68_en.pdf. (accessed 6.06.2016).
- . Ferrari, M., Binzoni, T., Quaresima, V. 1997 Oxidative metabolism in muscle. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 352(1354), 677-683. doi: 10.1098/rstb.1997.0049
- . Ferrer I, Thurman EM. 2010. Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. J Chromatogr A 1217: 4127–4134. doi:10.1016/j.chroma.2010.02.020.
- . Forlin, L., Haux, C. 1985 Increased excretion in the bile of 17b-(3H)estradiol-derived radioactivity in rainbow trout treated with beta-naph-tophavolen. Aquatic Toxicology 6: 197-208. doi:10.1016/0166-445X(85)90004-9.
- . Garcia-Medina, S., Razo-Estrada, A. C., Gomez-Olivan, L. M., Amaya-Chavez, A., Madrigal-Bujaidar, E., & Galar-Martinez, M. 2010. Aluminum-induced oxidative stress in lymphocytes of common carp (*Cyprinus carpio*). Fish Physiol Biochem, 36(4), 875-882.
- . Garcia-Medina, S., Nunez-Betancourt, J. A., Lucero Garcia-Medina, A., Galar-Martinez, M., Neri-Cruz, N., Islas-Flores, H., & Gomez-Olivan, L. M. 2013. The relationship of cytotoxic and genotoxic damage with blood aluminum levels and oxidative stress induced by this metal in common carp (*Cyprinus carpio*) erythrocytes. Ecotoxicol Environ Saf, 96, 191-197. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.06.010
- . George, S.G. 1994 Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K., (eds.) Aquatic toxicology: molecular,

- biochemical and cellular perspectives, CRC Press, USA: 37-85.
- . Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Valdés-Alanís, M., Islas-Flores, H., Neri-Cruz, N. 2014 Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug Chem. Toxicol.* Early Online: 1-9. doi:10.3109/01480545.2013.870191.
 - . Gonzalez Mantilla, J.F., 2006 Hepatic phase I and II biotransformation kinetics in fishes: a comparative study, Thesis dissertation Doctor of Philosophy, University of Maryland, 1-228.
 - . Gonzalez, F. J. (2005). Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1), 101-110. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.04.021
 - . Grice, H.C., Goldsmith, L.A. 2000. Sucralose- an overview of the toxicity data. *Food and Chemical Toxicology*, 38(Suppl 2), S1-S6. doi:10.1016/j.yrtph.2009.05.011
 - . Grotz VL, Munro IC. 2009. An overview of the safety of sucralose. *Regul Toxicol Pharmacol* 55(1): 1-5. doi:10.1016/j.yrtph.2009.05.011
 - . Grotz, V.L., Molinary, S., Peterson, R.C., *et al.*, 2012. Sucralose, in *Alternative Sweeteners* (ed L. O'Brien Nabors), CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton.
 - . Hall, S.D., Thummel, K.E., Watkins, P.E., Lown, K.S., Benet, L.Z., Paine, M.F., Mayo, R.R., Turgeon, D.K., Bailey, D.G., Fontana, R.J., Wrighton, S.A., 1999. Molecular and physical mechanisms of first-pass extraction. *Drug Metab. Dispos.*, 27, 161-166.
 - . Hegelund T., Celander M.C., 2003. Hepatic versus extrahepatic expression of CYP3A30 and CYP3A56 in adult killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Aquat. Toxicol.* 64:277-291. doi:10.1016/S0166-445X(03)00057-2
 - . Hidaka, I., Yokota, S., 1967. Taste receptor stimulation by sweet taste substances in the carp. *The Japanese Journal of Physiology*, 17(6): 652-666.
 - . Higashikawa, F., Murakami, T., Kaneda, T., Kato, A., Takano, M., 1999. Dose-dependent intestinal and hepatic first pass metabolism of midazolam, a cytochrome P450 3A substrate with differently modulated enzyme activity in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, 51, 67-72. doi: 10.1211/0022357991771971.
 - . Hjorth M, Hansen JH, Camus L. 2010. Short-term effects of sucralose on *Calanus finmarchicus* and *Calanus glacialis* in Disko Bay, Greenland. *Chem Ecol* 26:385–393.

doi:10.1080/02757540.2010.504672.

- . Houtman CJ. 2010. Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. *J Integr Environ Sci* 7(4):271-295. doi:10.1080/1943815X.2010.511648.
- . Huang DJ, Zhang YM, Song G, Long J, Liu JH, Ji WH. 2007. Contaminants induced oxidative damage on the carp *Cyprinus carpio* collected from the upper Yellow River, China. *Environ Monit Assess* 128(1-3):483-488.
- . Huggett DB, Stoddard KI. 2011. Effects of the artificial sweetener sucralose on *Daphnia magna* and *Americamysis bahia* survival, growth and reproduction. *Food Chem Toxicol* 49: 2575–2579. doi:10.1016/j.fct.2011.06.073
- . Islas-Flores, H., Gomez-Olivan, L. M., Galar-Martinez, M., Colin-Cruz, A., Neri-Cruz, N., & Garcia-Medina, S. 2013a. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 92, 32-38. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.01.025
- . Islas-Flores H, Gomez-Olivan LM, Galar-Martinez M, Garcia-Medina S, Neri-Cruz N, Dublan-Garcia O. 2014. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environ Sci Poll Res* 21(7): 5157-5166. doi: 10.1007/s11356-013-2477-0.
- . Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP. 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem* 202(2): 384–389. doi:10.1016/0003-2697(92)90122-N
- . Kashiwada S., Hinton D.E., Kullman S.W. 2005. Functional characterization of medaka CYP3A38 and CYP3A40: kinetics and catalysis by expression in a recombinant baculovirus system. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 141: 338-348. doi:10.1016/j.cca.2005.07.006.
- . Kokotou MG, Asimakopoulus AG, Thomaidis S. 2012. Artificial sweeteners as emerging pollutants in the environment: analytical methodologies and environmental impact. *Anal Methods*, (4): 3057–3070. doi: 10.1039/C2AY05950A
- . Kroger M, Meister k, Kava R. 2006. Low-calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes: A Review of the Safety Issues. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 5:35–47. doi: 10.1111/j.1541-4337.2006.tb00081.x

- . Labare, M.P., Alexander, M. 1993 Biodegradation of sucralose a chlorinated carbohydrate, in samples of natural environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 797-804. doi: 10.1002/etc.5620120502.
- . Labare, M.P., Alexander, M. 1994 Microbial catabolism of sucralose a chlorinated disaccharide in environmental samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42: 173-178. doi:10.1007/BF00170242.
- . Lappin-Scott, H.M., Holt, G., Bull, A.T. 1987 (Microbial transformation of 1,6-dichloro-1,6-dideoxy- β ,D-fructofuranosyl-4-chloro-4-deoxy- α ,D-galactopyranoside TGS) by soil population. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 3: 95-102. doi: 10.1007/BF00933609
- . Lange FT, Scheurer M, Brauch HJ. 2012. Artificial sweeteners da recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review. *Anal Bioanal Chem* 403 (9): 2503-2518. doi: 10.1007/s00216-012-5892-z.
- . Lee S-J, Buhler DR. 2003. Cloning, tissue ditribution, and functional studies of a new cytochrome P4503A subfamily member, CYP3A45, from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal ceca. *Arch Biochem Biophys* 412:77-89. doi:10.1016/S0003-9861(03)00029-8
- . Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 233: 346–357. doi:10.1016/S0076-6879(94)33040-9
- . Lillicrap, A., Langford, K., Brooks, S., Tollefsen, K. 2009 Determination of the bioaccumulation and elimination of sucralose in the zebrafish, *Danio rerio*.
- . Lillicrap, A., Langford, K., Brooks, S., & Tollefsen, K. 2009 Determination of the bioaccumulation of sucralose on the freshwater alga, *Pseudokirchneriella subcapitata*.
- . Lillicrap A, Langford K, Tollefsen KE. 2011 Bioconcentration of the intense sweetener sucralose in a multitrophic battery of aquatic organisms. *Environmental Toxicology Chemistry*, 30: 673–81. doi: 10.1002/etc.433
- . Loos R, Gawlik BM, Boettcher K, Locoro G, Contini S, Bidoglio G. 2009. Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method. *J Chromatogr A* 1216:1126–1131. doi:10.1016/j.chroma.2008.12.048.
- . Mace, O.J., Affleck, J., Patel, N., Kellett, G.L. 2007. Sweet taste receptors in rat small intestine

- stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J. Physiol.* 582: 379-392. doi: 10.1113/jphysiol.2007.130906.
- . Minten J, Adolfsson-Erici M, Björnlenius B, Alsberg T. 2011 A method for the analysis of sucralose with electrospray LC/MS in recipient waters and in sewage effluent subjected to tertiary treatment technologies. *Int J Environ Anal Chem* 91: 357–366. doi: 10.1080/03067310903582333.
 - . Misra HP, Fridovich I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247(10): 3170–3175. doi: 0.1080/03067310903582333.
 - . Monteiro, S.M., Mancera, J.M., Fontaínhas-Fernandes, A., Sausa, M., 2005. Copper- induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Physiol. Biochem.* 141 (C), 375–383. doi:10.1016/j.cbpc.2005.08.002.
 - . Nakagawa, Y., Nawasaka, M., Yamada, S., Hara, A., Mogami, H., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J., Shigemura, N., Ninomiya, Y., Kojima, I. 2009. Sweet taste receptor expressed in pancreatic β -cells activates the calcium and cyclic AMP signalling systems and stimulates insulin secretion. *PLoS One*, 4: e5106. doi.org/10.1371/journal.pone.0005106
 - . Neset TS, Singer H, Longrée P, Bader HP, Scheidegger R, Wittmer A, Andersson JC. 2010. Understanding consumption-related sucralose emissions – A conceptual approach combining substance-flow analysis with sampling analysis. *Sci Total Environ* 408: 3261–3269. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.04.003
 - . Nishikawa, T., Edelstein, D., Brownlee, M., 2000b. The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int.* 58, S26–S30.
 - . Paine, M.F., 2009. Sites of extra hepatic metabolism, Part II: Gut. In *Handbook of drug metabolism*, 2nd ed., ed. P.G. Pearson and L.C. Wienkers, 273-298. New York, NY: Informa Healthcare USA.
 - . Paine, M.F., Hart, H.L., Ludington, S.S., Haining, R.L., Rettie, A.E., Zeldin, D.C., 2006. The human intestinal cytochrome P450 “pie”. *Drug Metab. Dispos.*, 34, 880-886.
 - . Paine, M.F., Thummel, K.E., 2003. Role of intestinal cytochrome P450 in drug disposition. In *Drug metabolizing enzymes: cytochrome P450 and other enzymes in drug discovery and development*, ed. J.S. Lee, R.S. Obach, M.B., Fisher, 421-452. New York, N.Y.: Marcel Dekker.

- . Parvez S, Raisuddin S. 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ Toxicol Phar* 20(1): 112–117. [doi:10.1016/j.etap.2004.11.002](https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.11.002).
- . Pepino, M.Y., Tiemann, C.D., Patterson, B.W., Wice, B.M., Klein, S. 2013. Sucralose affects glycemic and hormonal responses to an oral glucose load. *Diabetes care*, 36: 2530-2535. [doi: org/10.2337/dc12-2221](https://doi.org/10.2337/dc12-2221).
- . Porter, N.A., Caldwell, S.E., Mills, K.A., 1995. Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30, 2290–2787. doi: 10.1007/BF02536034
- . Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD, Freeman BA. 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 266(32): 22028–22034.
- . Richardson SD. 2010 Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. *Anal Chem* 82(12):4742-4774. doi:10.1021/ac800660d
- . Richardson SD, Ternes TA. 2011. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal Chem* 83:4621-4648. doi: 10.1021/ac9008012.
- . Roberts, A., Renwick, A.G., Sims, J., Snodin, D.J. 2000 Sucralose metabolism and pharmacokinetics in man. *Food and Chemical Toxicology* 38 (Suppl 2), S31-S41. [doi:10.1016/S0278-6915\(00\)00026-0](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00026-0)
- . Robertson, G., Leclercq, I., & Farrell, G. C. 2001 Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 281(5), G1135-G1139.
- . Rolo, A. P., Palmeira, C. M. 2006 Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicology and applied pharmacology*, 212(2), 167-178. [doi:10.1016/j.taap.2006.01.003](https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.01.003).
- . Shacter E. 2000 Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev* 32:307–326. doi: 10.1081/DMR-100102336
- . Sang Z, Jiang Y, Tsoi YK, Leung KSY. 2014. Evaluating the environmental impact of artificial sweeteners: A study of their distributions, photodegradation and toxicities. *Water Res.* 52:260-274. [doi:10.1016/j.watres.2013.11.002](https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.11.002)
- . SanJuan-Reyes, N., Gomez-Olivan, L. M., Galar-Martinez, M., Garcia-Medina, S., Islas-Flores, H., Gonzalez-Gonzalez, E. D., Cardoso- Vera. D., Jimenez-Vargas, J. M. 2015. NSAID-

- manufacturing plant effluent induces geno- and cytotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*). *Science of the Total Environment*, 530-531, 1-10. doi:[10.1016/j.scitotenv.2015.05.088](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.088)
- . SanJuan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., García-Medina, S., Islas-Flores, H., & Neri-Cruz, N. 2013. Effluent from an NSAID-Manufacturing Plant in Mexico Induces Oxidative Stress on *Cyprinus carpio*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(9). doi: 10.1007/s11270-013-1689-8.
 - . Scheurer M, Brauch HJ, Lange FT. 2009. Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Anal Bioanal Chem* 394:1585–1594. doi:10.1007/s00216-009-2881-y
 - . Schiffman SS, Rother KI. 2013 Sucralose, a synthetic organochlorine sweetener: overview of biological issues. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 16(7): 399-451. doi: 10.1080/10937404.2013.842523
 - . Sims J, Roberts A, Daniel JW, Renwick AG. 2000. The metabolic fate of sucralose in rats. *Food Chem Toxicol* 38:115–121. doi: [10.1016/S0278-6915\(00\)00034-X](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00034-X).
 - . Soh, L., Connors, K.A., Brooks, B.W., Zimmerman, J. 2011 Fate of sucralose through environmental and water treatment processes and impact on plant indicator species. *Environmental Science and Technology*, 45: 1363-1369. doi: 10.1021/es102719d.
 - . Stegeman, J.J., Livingstone, D.R. 1998 Forms and functions of cytochrome P450. *Comp. Physiol. Biochem.* 121(C): 1-3.
 - . Swithers, S.E., Davidson, T.L. 2008. A role for sweet taste: Calorie predictive relations in energy regulation by rats. *Behav. Neurosci.* 122: 161-173. doi: [10.1037/0735-7044.122.1.161](https://doi.org/10.1037/0735-7044.122.1.161).
 - . Swithers, S.E., Baker, C.R., Davidson, T.L. 2009. General and persistent effects of high-intensity sweeteners on body weight gain and caloric compensation in rats. *Behav. Neurosci.* 123: 772-780.
 - . Swithers, S.E., Martin, A.A., Davidson, T.L. 2010. High-intensity sweeteners and energy balance. *Physiol. Behav.* 100: 55-62. doi: [10.1037/a0016139](https://doi.org/10.1037/a0016139).
 - . Thibaut, R., Schnell, S., Porte, C. 2006. The interference of pharmaceuticals with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in carp liver: an in vitro study. *Environ. Sci. Technol.* 40: 5154-5160. doi: 10.1021/es0607483

- . Toiber D, Soreq H (2005) Cellular stress reactions as putative cholinergic links in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 30: 909–919. doi: 10.1007/s11064-005-6963-8.
- . Tollefsen, K. E., Nizzetto, L., Huggett, D. B. 2012 Presence, fate and effects of the intense sweetener sucralose in the aquatic environment. *Science of the total environment*, 438: 510-516. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.08.060.
- . Uno, T., Ishizuka, M., Itakura, T. 2012 Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environ Toxicol Pharmacol*, 34(1), 1-13. doi:10.1016/j.etap.2012.02.004.
- . Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 64:178-189. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.03.013.
- . Valavanidis A, Vlachogianni T. 2010. Integrated biomarkers in aquatic organisms as a tool for biomonitoring environmental pollution and improved ecological risk assessment. *Sci Adv Environ Toxicol Ecotoxicol* 10:325-333.
- . van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13(2): 57–149. doi:10.1016/S1382-6689(02)00126-6.
- . Viberg H, Fredriksson A. 2011. Neonatal exposure to sucralose does not alter biochemical markers of neuronal development or adult behaviour. *Nutrition* 27(1):81-85. doi:10.1016/j.nut.2009.10.007.
- . Weihrauch MR, Diehl V. 2004. Artificial sweeteners-do they bear a carcinogenic risk? *Ann. Oncol.* 15 (10):1460-1465.
- . Yamanaka H, Sogabe A, Handoh IC, Kawabata Z. 2011. The effectiveness of clove oil as an anesthetic on adult common carp, *Cyprinus carpio* L. *J Anim Vet Adv* 10(2): 210-213. doi:10.3923/javaa.2011.210.213.
- . Yan, S.D., Schmidt, A.M., Anderson, G.M., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y.S., Pinsky, D., Stern, D., 1994. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 9889–9897.
- . Yin, H., Xu, L., Porter, N. A. 2011 Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews*, 111(10): 5944–5972. doi: 10.1021/cr200084z
- . Yokota, H., Miyashita, N., & Yuasa, A. 2002 High glucuronidation activity of environmental

estrogens in the carp (*Cyprinus carpio*) intestine. Life sciences, 71(8), 887-898.
[doi:10.1016/S0024-3205\(02\)01767-8](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)01767-8).

- . Zygler A, Wasik A, Namiesnik J. 2009. Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. Trac Trends Anal Chem 28 (9): 1082-1102.
[doi:10.1016/j.trac.2009.06.008](https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.06.008).

Artículo 2

Dear Dr. Karinne Saucedo-Vence,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Food and Chemical Toxicology

Corresponding Author: Octavio Dublán-García

Co-Authors: Karinne Saucedo-Vence; Leobardo M Gómez-Oliván; Ana G Morachis-Valdez; Hariz Islas Flores;

Title: Changes in the functional properties of muscle of common carp (*Cyprinus carpio*) induced by environmentally relevant concentrations of sucralose

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at octavio_dublan@yahoo.com.mx; odublang@uaemex.mx; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<https://ees.elsevier.com/fct/l.asp?i=245295&l=N8CKJARG>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help

page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Food and Chemical Toxicology

11. REFERENCIAS

- Abou-Donia, M.B., El-Masry, E.M., Abdel-Rahman, A.A., McLendon, R.E., Schiffman, S.S. 2008. Splenda alters gut microflora and increases intestinal P-glycoprotein and cytochrome P450 in male rats. *J. Toxicol. Environ. Health. A.*, 71, 1415-1429. doi: 10.1080/15287390802328630.
- Albert L., Namihira D. (2004). Capítulo 3: Conceptos básicos en ecología y su relación con la toxicología ambiental. Capítulo 9: Contaminación ambiental y criterios de evaluación. En: *Toxicología ambiental*. Universidad de la Ciudad de Juárez. Chihuahua, México. 52-54 y 154-160.
- Aragones, G.H. (1995). Realizar investigaciones que permitan conocer y aplicar la biotecnología para producir en cautiverio acocil, rana toro, ajolote, desarrollo de lotes. Proyecto de Investigación. México. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Berlett- B S, Stadtman- E R. Protein oxidative in aging, disease and oxidative stress. *J. 1997; Biol. Chem.* 272:20313-16.
- Berset, J-D., Ochsenbein, N., 2012. Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using highperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC– MS/MS). *Chemosphere.* 88, 563-569.
- Bourgeois, M., (1986). Proteínas animales. Editorial El Manual Moderno. México. pp. 261-287.
- Bourne, MC, JF Kenny, J. Barnard. (1978). Lectura asistida por ordenador de los datos de perfil de textura curvas de análisis. *Revista de Estudios de Textura* 9, 481.
- Burcham, P. C. (2007). Modified protein carbonyl assay detects oxidized membrane proteins: a new tool for assessing drug-and chemically-induced oxidative cell injury. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 56(1), 18-22.
- Bucharles, C; Davdin, J.D.; Denoyer, C.; Girard, J. P.; Goutefongea, R.; Laroche M.; Maillard, T. y Ramihone, M. (1991). Tecnología de la carne y de los productos cárnicos. España. Acribia. pp. 269-273, 283-285.
- Buege J, Aust S. (1979). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52: 302-310.
- Buhler- D R and Wang- B J. (1998). Rainbow trout cytochrome P450s: Purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 121. 107-37.

- Buerge IJ, Buser H-R, Kahle M, Müller MD, Poiger T., 2009. Ubiquitous occurrence of the artificial sweetener acesulfame in the aquatic environment: an ideal chemical marker of domestic wastewater in groundwater. *Environ Sci Technol.* 43(12):4381–5.
- CDC., 2009. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals; Cent. Dis. Control and Prevention, Natl Cent Environ. Health: Atlanta, GA.
- Cisneros E., Pupo J., y Céspedes E. (1997). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutación peróxidasa. *Revista Cubana de Investigación Biomédica.* 16 (1): 10-15.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA). (2009). Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2009. SAGARPA. [En línea]. México. Disponible en: http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2009_capitulo_i_preliminar. (Accesado el 30 de junio de 2016).
- Di Giulio R., Wasburn P., Wenning R., Winston G., Jewell C. (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology Chemistry.* 8:1103.
- Dublán- G O. (2006). Evaluación de los cambios estructurales y fisicoquímicos del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante el almacenamiento en refrigeración o congelación, México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana. 54-62.
- Estrada, P., (2005) Desarrollo de una salchicha de pescado utilizando como materia prima carne de trucha (*Salmo gairdneri*) y carpa (*Cyprinus carpio* mounis). Tesis de Licenciatura. México. Facultad de Química, Universidad Autónoma del estado de México. pp. 3-25.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat science*, 89(3), 259-279. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.025>
- FAO (2014) Programa de información de especies acuáticas. *Cyprinus carpio*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Peteri, A. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Available from <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/es#tcNA00D9> [24 January 2014].
- Fennema, O. (2010). Química de los alimentos. 3ª edición. España. Acribia. pp. 412-504.
- Ferrer, I., Thurman E.M., 2010. Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage

- samples by liquid chromatography/time-of-flight-mass spectrometry. J. Chromatogr. A.
- Hangsber W. (2002). Biología de las especies de oxígeno reactivas. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. 24: 19-54.
- Hay, M.E., 2009. Marine chemical ecology: chemical signals and cues structure marine population, communities, and ecosystems. Ann. Rev. Mar. Sci. 1, 193– 212.
- Huss, H.H., Ababouch, L. and Gram, L. (2004). Assessment and management of seafood safety and quality . FAO Fisheries Technical Paper No. 444. Food and Agriculture Organisation, Rome.
- European Commission (2000) Scientific Committee on Food (SCF), Opinion of the Scientific Committee on Food on sucralose - SCF/CS/ADDS/EDUL/190 Final, http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out68_en.pdf (accesado 23-05-2016).
- Grice, H.C., Goldsmith, L.A., 2000. Sucralose- an overview of the toxicity data. Food Chem. Toxicol. 38, 1-6.
- Grotz, V., Munro, I. 2009. An overview of the safety of sucralose. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 55, 1-5
- Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., & Wolff, S. P. (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. Analytical Biochemistry, 202(2), 384-389.
- John, B.A., Wood, S.G., and Hawkins, D.R. 2000. The pharmacokinetics and metabolism of sucralose in the mouse. Food and Chemical Toxicology, 38(Suppl 2), S107–S110.
- Kille, J. W.; Tesh, J. M.; McAnulty, P. A.; Ross, F. W.; Willoughby, C. R.; Bailey, G. P.; Wilby, O. K.; Tesh, S. A. Sucralose: Assessment of teratogenic potential in the rat and the rabbit. Food Chem. Toxicol., 38, S71-S89.
- Kokotou M.G., Asimakopoulos A.G., Thomaidis N.S., 2012. Artificial sweeteners as emerging pollutants in the environment: analytical methodologies and environmental impact. Anal Methods. 4(10):3057–70.
- Koningsberg M. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Editorial el manual modern. México.
- Labare, M.; Alexander, M., 1994. Microbial Cometabolism of Sucralose, a chlorinated disaccharide in environmental samples. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42, 173-178.
- Labare, M.; Alexander, M., 1993. Biodegradation of Sucralose, a Chlorination Carbohydrate, in

- Samples of Natural Environments. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 792-804.
- Lange R, Dietrich D. (2002). Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substance-conceptual considerations. *Toxicology Letters*, 131: 97-104.
- Levine R, Williams J, Stadtman E, Shacter E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233:346-357.
- Li, Y., Kong, B., Xia, X., Liu, Q., & Diao, X. (2013). Structural changes of the myofibrillar proteins in common carp (*Cyprinus carpio*) muscle exposed to a hydroxyl radical-generating system. *Process Biochemistry*, 48(5), 863-870.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2013.03.015>
- Loos, R., Gawlik, B.M., Boettcher, K., Locoro, G.C.S., Bidoglio, G., 2009. Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method. *J. Chromatogr.* , 1216, 1126–1131.
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., & Estevez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular nutrition & food research*, 55(1), 83-95. DOI: 10.1002/mnfr.201000453
- Maitena, U., Katayama, S., Sato, R., & Saeki, H. (2004). Improved solubility and stability of carp myosin by conjugation with alginate oligosaccharide. *Fisheries science*, 70(5), 896-902.
<https://doi/10.1111/j.1444-2906.2004.00884.x/full>
- Mann, S. W.; Yuschak, M. M.; Amyes, S. J. G.; Aughton, P.; Finn, J. P. ,2000. A combined chronic toxicity/carcinogenicity study of sucralose in Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.*, 38, S71–S89.
- Malik, AR, MAA Siddique, PA Sofi y JS Butola. (2011). El síndrome de fatiga crónica: el estrés oxidativo y modificaciones en la dieta. *Altern. Med. Rev.*, 6: 450-459.
- Martinaud, A., Mercier, Y., Marinova, P., Tassy, C., Gatellier, P., & Renerre, M. (1997). Comparison of oxidative processes on myofibrillar proteins from beef during maturation and by different model oxidation systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2481-2487. DOI: 10.1021 / jf960977g
- Mawhinney, D., Young, R., Vanderford, B., Borch, T., Snyder, S., 2011. Artificial Sweetener Sucralose in U.S. Drinking Water Systems, *Environ. Sci. Technol.*, 45 (20), pp 8716–8722.

- Morachis-Valdez, G., Dublán-García, O., López-Martínez, L. X., Galar-Martínez, M., Saucedo-Vence, K., & Gómez-Oliván, L. M. (2015). Chronic exposure to pollutants in Madín Reservoir (Mexico) alters oxidative stress status and flesh quality in the common carp *Cyprinus carpio*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(12), 9159-9172. DOI: 10.1007/s11356-014-4061-7
- Morachis-Valdez, A. G., Gómez-Oliván, L. M., García-Argueta, I., Hernández-Navarro, M. D., Díaz-Bandera, D., & Dublán-García, O. (2017). Effect of Chitosan Edible Coating on the Biochemical and Physical Characteristics of Carp Fillet (*Cyprinus carpio*) Stored at- 18° C. *International Journal of Food Science*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2812483>
- Mead, R.N., Morgan, J.B., Avery Jr., G.B., Kieber, R.J., Kirk, A.M., Skrabal, S.A., Willey, J.D., 2009. Occurrence of the artificial sweetener sucralose in coastal and marine waters of the United States. *Mar. Chem.* 116, 13–17.
- Miranda, S. (2011). Caracterización fisicoquímica, funcional y estructural de 7 productos marinos de importancia económica en México. Tesis de Licenciatura. México. Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. pp. 8-22
- Minten, J., Adolfsson-Erici, M., Björlenius, B., Alsberg, T., 2011. A method for the analysis of sucralose with electrospray LC/MS in recipient waters and in sewage effluent subjected totertiary treatment technologies. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 91(4), 357-366.
- Misra P, Fridovich I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *Biological Chemistry*, 247: 3170-3175.
- Moreno G. (2003). Toxicología ambiental evaluación de riesgo para la salud humana, Mc Graw Hill, España. 370pp.
- NICNAS., 2001. Full Public Report: 1,6-dichloro-1,6-dideoxy-β-D-fruc-tofuranosyl-4-chloro-4-deoxy-R-D-galactose; NA/944; Natl. Ind. Chem. Notification and Assess. Scheme: Sydney, Australia, November ,2001.
- Oliveira, C. 2000. Guía didáctica. Deterioro del pescado. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Instituto de investigaciones pesqueras.
- Oteiza- P A. (1995). Modificación active de las proteínas. *Antioxidante y Calidad de Vida*. 2:12-20.
- Parvez S., Raisuddin S. (2005). Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctate* (Bloch). *Environmental Toxicology &*

- Pharmacology. 20: 112-117.
- Pastor B. (2002). Biomotorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos. Tesis doctoral en Biología. Universidad Autónoma de Barcelona España. 48-50.
- Peñalva-Arana, D.C., Lynch, M., Robertson, H.M., 2009. The chemoreceptor genes of the waterflea *Daphnia pulex*: many Grs but no Ors. *Evol. Biol.* 9, 1–11.
- Pilosof AM (2000). Solubilidad. En Caracterización funcional y estructural de proteínas. Pilosof, A.M.R y Barholomai, G.B. editors. Edit. Ceudeba CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo) p.p.60-75.
- Repetto M. (1997). Concepto y definición de toxicología y toxicidad, en Toxicología Fundamental. Editorial Díaz de Santos. 3a edición, 17 pp.
- Roberts, A., Renwick, A.G., Sims, J., and Snodin, D.J. (2000) Sucralose metabolism and pharmacokinetics in man. *Food and Chemical Toxicology.* 38(Suppl 2), S31–S41.
- SAGAN. Contaminación del agua. Disponible en : http://www.sagan-gea.org/hojared_AGUA/paginas/17agua.html (citado 26/04/2013)
- Saucedo-Vence, K., Elizalde-Velázquez, A., Dublán-García, O., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., SanJuan-Reyes, N., ... & Gómez-Oliván, L. M. (2017). Toxicological hazard induced by sucralose to environmentally relevant concentrations in common carp (*Cyprinus carpio*). *Science of The Total Environment*, 575, 347-357. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.230>
- Scheurer, M., Brauch, H.J., Lange, F.T., 2010. Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 1585–1594.
- Scheurer, M., Brauch, H.J., Lange, F.T., 2010. Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT). *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 1585–1594.
- Stegeman- J J, Livingstone- D R. (1998). Forms and functions of cytochrome P450. *Compos Biochem Physiol.* 211-12.
- Ternes T, Siegrists H, Joss A. (2004) Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environmental Science and Technology*, 393A-399A.

- Timofeyev M, Shatilina Z, Kolesnichenko A, Bedulina D. (2006). Natural organic matter (NOM) induces oxidative stress in freshwater amphipods *Gammarus trigrinus*. *Science of the Total Environment*, 366: 673-681.
- Tollefsen, K.E., Nizzetto, L., Huggett, D. 2012. Presence, fate and effects of the intense sweetener sucralose in the aquatic environment. *Science of the Total Environment*. 438, 510-516.
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecology and Environmental Safety*, 64: 178-189.
- Valko M., Morris H. y Cronin M.T. (2005) Toxicity and oxidative stress. *Current Medical Chemistry*, 12: 1160-1207.
- Van Stempvoort DR, Roy JW, Brown SJ, Bickerton G. 2011. Artificial sweeteners as potential tracers in groundwater in urban environments. *J Hydrol*. 401(1–2):126–33.
- Vera, O., (2010). Efecto de la concentración de inulina de un producto tipo surimi elaborado a base de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), calamar gigante (*Dosicus gigas*) y proteína de soya. Tesis de Licenciatura. México. Facultad de Química. Universidad Autónoma del estado de México. Pp. 23-26, 37-41.
- Venero J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 31 (2): 126-133.
- Vindas R., Ortiz F., Ramírez V., y Cuenca P. (2004). Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. 52 (3): 601-609
- Yamolsky, D.A., Zuker, C.S., Ryba, N.J.P., 2009. Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*. 139, 234–244.
- Wiklund, A-K. E., Breitholtz, M., Bengtsson, B-K., Adolfson-Erici, M. (2012). Sucralose – An ecotoxicological challenger? *Chemosphere*. 86, 50-55.
- Wood, S.G., John, B.A., and Hawkins, D.R. (2000) The pharmacokinetics and metabolism of sucralose in the dog. *Food and Chemical Toxicology*. 38(Suppl 2), S99–S106.