



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTOS TÓXICOS INDUCIDOS POR CONCENTRACIONES
AMBIENTALMENTE RELEVANTES DE
SUCRALOSA, ACESULFAME- K Y SUS MEZCLAS EN *Danio rerio***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA:
COLÍN GARCÍA KARLA

DIRIGIDA POR:
DR. EN C.Q.B LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO

ENERO 2024

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
INDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE TABLAS	12
RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN.....	14
ANTECEDENTES	16
Contaminación acuática	16
Contaminantes emergentes	16
Edulcorantes	17
Tipos de edulcorantes	20
Sucralosa	22
Acesulfame-k.....	26
Bioindicador	28
Pez cebra como organismo de experimentación	28
Las 3R en el uso de animales.....	29
Biomarcadores.....	31
Embriotoxicidad y teratogenicidad	32
Estrés oxidativo.....	32
Pruebas estadísticas	36
JUSTIFICACIÓN	39
HIPOTESIS.....	39
OBJETIVOS.....	39
Objetivo general	39
Objetivos específicos.....	39
MÉTODOS	40
Reactivos	40
Mantenimiento de <i>Danio rerio</i>	40
Primera parte experimental: Efectos tóxicos inducidos por SUC en las primeras etapas de vida de <i>Danio rerio</i>	40
Obtención de los ovocitos de <i>Danio rerio</i>	40
Embriotoxicidad	41
Pruebas de estrés oxidativo	41

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Expresión génica	45
Cuantificación de sucralosa	46
Análisis estadístico	47
Segunda parte experimental: Efectos tóxicos inducidos por SUC, ACE-K y sus mezclas en adultos de <i>Danio rerio</i>.	47
Exposición de adultos de <i>Danio rerio</i>	47
Prueba de Novel Tank (tanque novedoso).....	48
Prueba Dark and Light (oscuridad/luz).....	48
Determinación de acetilcolinesterasa	49
Pruebas de estrés oxidativo	49
Cuantificación de sucralosa y acesulfame-k.....	51
Análisis estadístico	52
RESULTADOS	52
Primera parte experimental: Efectos tóxicos inducidos por SUC en las primeras etapas de vida de <i>Danio rerio</i>.	52
Embriotoxicidad	52
Efectos teratogénicos	54
Estrés oxidativo.....	56
Expresión génica	66
Cuantificación de sucralosa	69
Análisis de componentes principales	70
Segunda parte experimental: Efectos tóxicos inducidos por SUC, ACE-K y sus mezclas en adultos de <i>Danio rerio</i>.	70
Prueba de Novel Tank	70
Prueba Dark and Light.....	74
Determinación de AChE.....	77
Estrés oxidativo.....	78
Determinación de sucralosa y acesulfame-k	86
Correlograma y gráficos de respuesta.....	87
DISCUSIÓN DE RESULTADOS	89
CONCLUSIONES	94
REFERENCIAS	96

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

ABREVIATURAS

1,6-DCF	1,6-dicloro-1,6-didesoxi -d -fructosa
4-CG	4-cloro-4-desoxi- d -galactosa
ACE-K	Acesulfame-k
AChE	Acetilcolinesterasa
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ASP	Aspartame
CAT	Catalasa
CFM	Malformación craneofacial
CH ₂	Metileno
D	Enanismo
DE	Desviación estándar
DHP	Retraso del proceso de eclosión
EA	Ausencia ocular
EC50	Mitad de la concentración efectiva máxima
EDAR	Estación depuradora de aguas residuales
EROS	Especies reactivas de oxígeno
FA	Ausencia de aletas
FDA	Fud and Drug Administration
FESO ₄	Sulfato de hierro II

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

GAC	Carbón activado granulado
GPX	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
H	Hipopigmentación
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HO-	Hidroxilo
HPF	Horas post fecundación
HPX	Hidroperóxidos
Kow	Coefficiente de reparto octanol-agua
LC50	Concentración Letal Media
LOO	Peroxilo
LOOH	Lipoperóxido
LOQ	Límite de cuantificación
LPX	Lipoperóxidos
MDA	Malondialdehído
MRM	Monitoreo de Reacción Múltiple
MT	Malformación de la cola
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ -	Superóxido
PCC	Proteínas carboniladas
PE	Edema pericárdico
PRX	Peroxiderroxina

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

PTAR	Plantas de tratamiento de aguas residuales
qRT-PCR	PCR en tiempo real
REDOX	Oxidación- Reducción
RL	Radicales libres
ROO-	Peróxidos
ROOH	Hidroperóxidos orgánicos
S	Escoliosis
SAC	Sacarina
SOD	Superóxido dismutasa
SUC	Sucralosa
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
YD	Deformación del saco vitelino

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales vías de entrada de los contaminantes emergentes.....	17
Figura 2. Transformación selectiva de la sacarosa a SUC.....	23
Figura 3. Hembra y macho de <i>Danio rerio</i>	30
Figura 4. Puntos por considerar en el uso de un biomarcador.....	32
Figura 5. Método experimental para AChE.....	49
Figura 6. Características del tratamiento del homogeneizado.....	50
Figura 7. Mortalidad en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a seis concentraciones diferentes de SUC.....	53
Figura 8. Malformaciones en larvas de <i>Danio rerio</i> expuestos a diversas concentraciones de SUC.....	54
Figura 9. Incidencia de malformaciones inducidas por SUC en embriones de <i>Danio rerio</i>	54
Figura 10. Principales malformaciones inducidas por SUC en embriones de <i>Danio rerio</i>	56
Figura 11. Actividad de superóxido dismutasa generada por SUC después de 72 horas de exposición en embriones de <i>Danio rerio</i>	58
Figura 12. Actividad de superóxido dismutasa generada por SUC después de 96 horas de exposición en embriones de <i>Danio rerio</i>	58
Figura 13. Actividad de la CAT inducida por SUC después de 72 horas de exposición en embriones de <i>Danio rerio</i>	59
Figura 14. Actividad de la CAT inducida por SUC después de 96 horas de exposición en embriones de <i>Danio rerio</i>	60
Figura 15. Contenido de hidroperóxidos producido por SUC después de 72 horas de exposición en embriones de <i>Danio rerio</i>	61
Figura 16. Contenido de hidroperóxidos producido por SUC después de 96 horas de exposición en embriones de <i>Danio rerio</i>	62
Figura 17. Contenido de proteínas carboniladas generado por SUC después de 72 horas de exposición en embriones de <i>Danio rerio</i>	63
Figura 18. Contenido de proteínas carboniladas generado por SUC después de 96 horas de exposición en embriones de <i>Danio rerio</i>	64
Figura 19. Lipoperoxidación inducida por SUC después de 72 horas de exposición en embriones de <i>Danio rerio</i>	65
Figura 20. Lipoperoxidación inducida por SUC después de 96 horas de exposición en embriones de <i>Danio rerio</i>	66
Figura 21. Expresión del gen Nrf1a en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a SUC.....	66
Figura 22. Expresión del gen Nrf2a en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a SUC.....	67

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Figura 23. Expresión del gen CASP3 en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a SUC.....	68
Figura 24. Expresión del gen CASP9 en embriones de <i>Danio rerio</i> expuestos a SUC.....	69
Figura 25. Análisis de Componentes Principales de biomarcadores evaluados en embriones de <i>Danio rerio</i>	70
Figura 26. Resultados de la distancia total para la prueba Novel Tank de peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas.	72
Figura 27. Resultados de la distancia recorrida en la parte inferior y superior para la prueba Novel Tank de peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas.....	72
Figura 28. Resultados del tiempo transcurrido en la parte inferior y superior para la prueba Novel Tank de peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas.....	73
Figura 29. Resultados del tiempo de inmovilidad para la prueba Novel Tank de peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas.....	74
Figura 30. Resultados de la permanencia en la zona blanca para la prueba de Dark and Light de peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas.....	75
Figura 31. Resultados de la permanencia en la zona negra para la prueba de Dark and Light de peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas.....	76
Figura 32. Resultados de los episodios de congelación de la prueba de Dark and Light de peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas.	77
Figura 33. Resultados de la inhibición de AChE inducida por SUC, acesulfame- K y sus mezclas en cerebro de <i>Danio rerio</i>	78
Figura 34. Actividad de superóxido dismutasa (SOD) provocada por SUC, ACE-K y sus mezclas en cerebro de <i>Danio rerio</i>	80
Figura 35. Actividad de CAT (CAT) generada por SUC, ACE-K y sus mezclas en cerebro de <i>Danio rerio</i>	81
Figura 36. Contenido de hidroperóxidos (HPX) en cerebro de <i>Danio rerio</i> , inducido por SUC, ACE-K y sus mezclas.	83
Figura 37. Contenido de proteínas carboniladas (PCC) generado por SUC, ACE-K y sus mezclas en cerebro de <i>Danio rerio</i>	84
Figura 38. Contenido de lipoperóxidos (LPX) inducido por SUC, ACE-K y sus mezclas en cerebro de <i>Danio rerio</i>	86
Figura 39. Gráficos de respuesta de SUC y acesulfame- K.	88
Figura 40. Mapa de biomarcadores evaluados.	89

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Presencia de SUC y ACE-K en ambientes acuáticos a nivel mundial.	20
Tabla 2. Edulcorantes naturales y artificiales.	22
Tabla 3. Propiedades físicas y químicas de la SUC.	24
Tabla 4. Efectos tóxicos inducidos por SUC en organismos acuáticos.	26
Tabla 5. Efectos tóxicos inducidos por ACE-K en diversos organismos.	28
Tabla 6. Tipos de biomarcadores.	31
Tabla 7. Parámetros de calidad del agua.	40
Tabla 8. Tratamiento del homogeneizado para pruebas de EO.	42
Tabla 9. Tratamiento para pruebas de EO.	45
Tabla 10. Genes utilizados para la qRT-PCR.	46
Tabla 11. Condiciones del ESI negativo para SUC.	46
Tabla 12. Concentraciones de SUC, ACE-K y sus mezclas evaluadas en <i>Danio rerio</i>	48
Tabla 13. Métodos de los biomarcadores de EO.	51
Tabla 14. Condiciones del ESI negativo para SUC y ACE-K.	52
Tabla 15. Principales malformaciones inducidas por SUC en embriones de <i>Danio rerio</i>	55
Tabla 16. Concentraciones nominales de SUC en los tratamientos para exposición de <i>Danio rerio</i>	69
Tabla 17. Concentraciones de SUC y ACE-K en el cerebro de <i>Danio rerio</i>	87

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

RESUMEN

La sucralosa (SUC) y el acesulfame-k (ACE-K) son dos de los edulcorantes artificiales más consumidos a nivel mundial. Diversos estudios han reportado altas concentraciones de estos edulcorantes que son apenas eliminados en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) debido a su bajo metabolismo. En la actualidad, existe poca información de los efectos que pueden generar la SUC, el ACE-K y sus mezclas en organismos acuáticos.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos que la SUC, el ACE-K y sus mezclas pueden inducir en el bioindicador *Danio rerio*. Con base en los resultados, en la primera parte experimental, tras una exposición aguda, la SUC alteró el desarrollo embrionario de los peces generando un alto índice de malformaciones. Las principales malformaciones fueron la escoliosis, el edema pericárdico, deformidad de la cola, deformaciones craneofaciales, ausencia de ojos, falta de aletas e hipopigmentación. Además, la SUC generó una respuesta de estrés oxidativo (EO) caracterizada por un aumento significativamente estadístico en los niveles de peroxidación lipídica (LPX), hidroperóxidos (HPX) y proteínas carbonilo (PCC). Asimismo, se observó un aumento significativo respecto al grupo de control en la expresión de genes de la defensa antioxidante (Nrf1 y Nrf2) y de los genes relacionados con la apoptosis (CASP3 y CASP9).

Por otra parte, en la segunda parte experimental, los adultos de *Danio rerio* tras cuatro meses de exposición a ACE-K, SUC y sus mezclas, mostraron un comportamiento de ansiedad, caracterizado por un aumento en el tiempo de congelación y una menor actividad de natación. Además, el análisis del cerebro de los peces reveló una pérdida de la homeostasis del estado de REDOX, desencadenando una respuesta de EO que podría ser responsable de la inhibición de la actividad de acetilcolinesterasa (AChE).

Finalmente, el ACE-K demostró ser más tóxico que la SUC y las mezclas generaron un mayor daño que los edulcorantes independientes. Por esta razón, se determina que la SUC y el ACE-K en concentraciones ambientalmente relevantes son perjudiciales por su capacidad de inducir efectos tóxicos como malformaciones, estrés oxidativo y neurotoxicidad en organismos acuáticos.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

INTRODUCCIÓN

La contaminación es uno de los problemas ambientales más importantes que afectan en la actualidad y es el resultado de la introducción por parte del hombre de sustancias orgánicas e inorgánicas al medio ambiente en cantidades que pueden tener efectos negativos en las personas, los animales o las plantas (Sánchez *et al.*, 2018). El consumo y uso continuo de edulcorantes, fármacos, plastificantes, plaguicidas, agentes tensoactivos, aditivos, etc., ha generado un aumento en la cantidad de sustancias que se liberan a los cuerpos de agua (Giner, 2020). A estas sustancias químicas se les denomina contaminantes emergentes que son diversos grupos de compuestos que se encuentran en cantidades “invisibles” en el medio ambiente e impactan negativamente al ecosistema (Giner, 2020). Aunque la lista de contaminantes emergentes incluye una amplia variedad de compuestos, en los últimos años, los edulcorantes artificiales han tomado importancia debido a su alto consumo humano, la elevada solubilidad en agua, baja biodegradación y su alta incidencia en el medio acuático (Berset *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2020; Camila *et al.*, 2021).

En cuanto al uso global de edulcorantes no nutritivos en alimentos y bebidas, ASP (18.500 toneladas métricas) es el más utilizado, seguido de SAC (9.700 toneladas métricas), ACE-K (6.800 toneladas métricas) y SUC (3.300 toneladas métricas) (Chemical Economics Handbook). Sin embargo, se prevé que habrá un incremento del 2 al 5% en Asia y el Pacífico en 2024 / 2025 (Dietrich *et al.*, 2021).

La SUC y el ACE-K están presentes en altas concentraciones en ambientes acuáticos y su eliminación en aguas de tratamiento residual es limitada (Kokotou *et al.*, 2012). Algunos estudios demuestran que tratamientos convencionales como la oxidación avanzada, el carbón activado, radiación UV y los métodos de cloración no son eficaces para degradar los edulcorantes de las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) (Scheurer *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2017).

El consumo de ACE-K y SUC ha contribuido a su presencia en el medio acuático desencadenando diversas respuestas tóxicas en organismos y cultivos celulares (Stoddard and Huggett, 2014; Eriksson Wiklund *et al.*, 2014; Vence, 2017; Magnuson, Roberts y Nestmann, 2017; Bian *et al.*, 2017; Hurandhar, Bharihoke y Kalra, 2018; Heredia-García *et al.*, 2019; Pasqualli *et al.*, 2020).

Tal es el caso de Eriksson Wiklund *et al.*, 2014b quienes indicaron que la SUC en concentraciones de 0 - 50 000 µg / L en 14 días de exposición interrumpió el comportamiento locomotor, en los crustáceos *Gobionellus oceanicus*, *Gammarus zaddachi* y *Daphnia magna*. Dos años después, los mismos autores reportaron que la SUC a concentraciones de 0.001 - 5 mg / L generaba daño oxidativo y producción de AChE en *Daphnia magna* tras 24 horas de exposición (Eriksson Wiklund *et al.*, 2014a). También, otros autores informaron que la SUC en concentraciones de 0.05 y 155 µg / L generó una respuesta de especies

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

reactivas de oxígeno (EROS) en diversos órganos de *Cyprinus carpio* (hígado, branquias, cerebro y músculos) (Saucedo-Vence *et al.*, 2017). De manera similar, Saputra *et al.*, 2021 y Colín-García *et al.*, 2022 reportaron que la SUC a concentraciones ambientalmente relevantes de 0.05 - 116.5 µg / L a una exposición aguda perjudica el desarrollo embrionario de *Danio rerio*.

Por otra parte, respecto a la toxicología del ACE-K se tiene que Li, Schmitz *et al.*, 2016 reportaron que a concentraciones de 1×10^4 mg / L inducía malformaciones (edema pericárdico y desprendimiento de cola) en *Danio rerio*. También, otros autores informaron que ACE-K en concentraciones de 0.05 - 149 µg / L produce un incremento de EO en branquias, cerebro, músculo, hígado y sangre de *Cyprinus carpio* (Cruz-Rojas *et al.*, 2018). Además, Dong *et al.*, 2020 demostraron que el ACE-K (concentraciones 1 - 100 mg / L) alteró el comportamiento y los patrones cuantitativos de los neurotransmisores en el cerebro de *Danio rerio*.

Tomando en cuenta que los estudios anteriores carecen de información acerca de mayor cantidad de efectos tóxicos, se planteó evaluar los efectos neurotóxicos y embriotóxicos que la SUC, el ACE-K y sus mezclas pueden inducir en *Danio rerio*. Además, se planteó la hipótesis de que las concentraciones ambientalmente relevantes de SUC, ACE-K, y sus mezclas podrían generar alteraciones en el comportamiento, EO, e inhibición en la actividad de la AChE en adultos de *Danio rerio*, así como que también afectar el desarrollo embrionario de estos organismos de agua dulce.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

ANTECEDENTES

El cuidado y protección del medio ambiente es actualmente una de las principales prioridades de la sociedad para compensar el daño causado por el ser humano y frenar una mayor degradación. Todos los ambientes, incluidos el aire, el agua y el suelo, se ven afectados por el proceso cíclico de contaminación ambiental (Domínguez Gual, 2015).

Contaminación acuática

Los seres vivos dependen en gran medida del agua para sobrevivir. Debido a limitaciones analíticas, es difícil registrar "todas" las sustancias químicas presentes en las muestras ambientales, y los nuevos contaminantes rara vez se regulan debido a la falta de conocimiento sobre sus efectos (Tejada *et al.*, 2014). En la actualidad, los cuerpos de agua son uno de los ecosistemas más afectados debido a que el principal reservorio de contaminantes emergentes son las aguas residuales que, aunque son tratadas en EDAR, no se tiene la capacidad de eliminar y/o remover cantidades significativas para disminuir el impacto en aguas subterráneas, superficiales y agua potable (Vargas *et al.*, 2017).

Contaminantes emergentes

Se entiende por contaminantes emergentes a compuestos químicos que en el medio ambiente pasan desapercibidos en cuanto a su distribución y/o concentración (Giner, 2020). La peculiaridad de esta clase de contaminantes es que, debido a que la entrada continua al medio ambiente puede contrarrestar sus altas tasas de conversión/eliminación y no necesitan permanecer en el medio ambiente para tener un efecto adverso (Damià Barceló *et al.*, 2008). Además, se ha descubierto que estas sustancias ingresan al medio ambiente a través de una variedad de fuentes y vías, incluidos efluentes domésticos e industriales, efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, efluentes de hospitales, actividades agrícolas y ganaderas y fosas sépticas (Gil *et al.*, 2012) (Figura 1). Estos contaminantes pueden viajar a través del suelo y el agua hasta los organismos vivos, donde pueden acumularse y causar problemas de salud (Naik, Zafar *et al.*, 2021).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

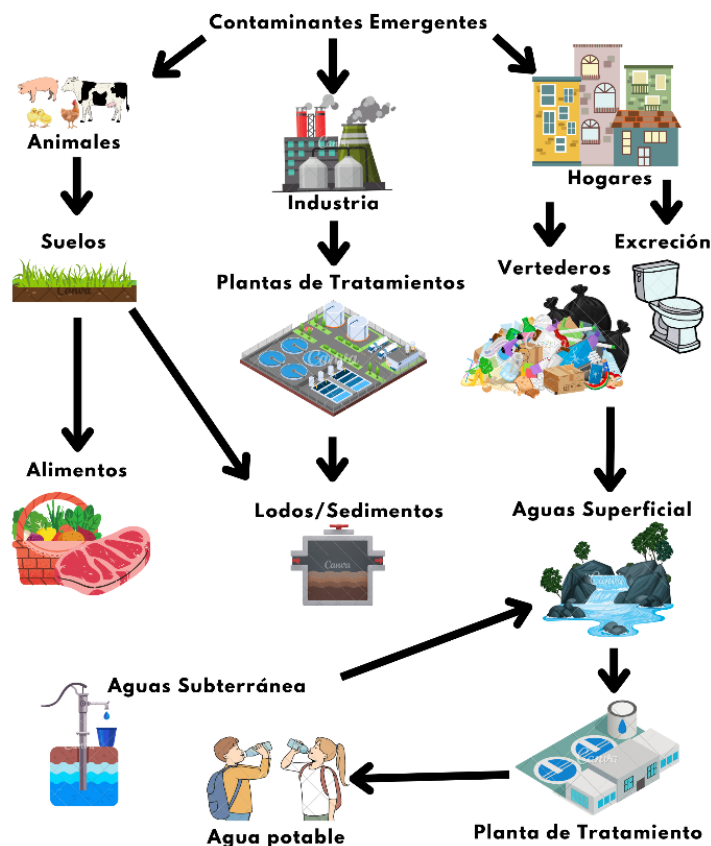


Figura 1. Principales vías de entrada de los contaminantes emergentes.

En los últimos años, la lista de contaminantes emergentes ha incrementado debido al consumo masivo de productos de la vida cotidiana (Sánchez Ramírez *et al.*, 2018). Entre los contaminantes emergentes más importantes se encuentran fármacos (antibióticos, analgésicos y antiinflamatorios), productos de belleza e higiene (filtros solares y perfumes) aditivos alimentarios (edulcorantes), entre otros (Boix *et al.*, 2014; Boix *et al.*, 2016). En las aguas superficiales se han encontrado diversas concentraciones de contaminantes emergentes, cuyos estándares de calidad ambiental aún se desconocen y no pueden eliminarse mediante plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) convencionales (Gil *et al.*, 2012).

Edulcorantes

Los edulcorantes artificiales son una clase de contaminantes emergentes que se utilizan como sustitutos del azúcar seguros para consumo humano que después de ser ingeridos escapan sin cambios del cuerpo humano y llegan al medio acuático (García-Almeida *et al.*, 2013; Richardson y Ternes, 2014). En los últimos años, han ganado importancia debido a que suponen una nueva amenaza para el medio ambiente ya que se utilizan como herramientas en la dieta porque no aportan calorías pero si el sabor dulce del azúcar (Zapata, 2015).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Sin embargo, se desconoce el posible impacto negativo hacia los ecosistemas (Sang *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2014). Debido a su alta persistencia en el ecosistema, los edulcorantes aspartame (ASP), sacarina (SAC), ACE-K, SUC, entre otros han sido considerados como contaminantes emergentes (Camargo Medrano, 2019; Praveena, Cheema y Guo, 2019).

Los edulcorantes artificiales son resistentes a los procesos de tratamiento de aguas residuales y, por tanto, se introducen continuamente en los entornos acuáticos. Sin embargo, los efectos ecotoxicológicos que los edulcorantes artificiales en los ecosistemas pueden generar siguen siendo en gran medida desconocidos. En consecuencia, se ha reportado que la SUC y el ACE-K se encuentran en altas concentraciones (ng / L a µg / L) en diversos cuerpos de agua a nivel mundial (Tabla 1).

Continente	País	Matriz de agua	Concentración (µg / L)	Referencias
SUC				
Asia	China	Agua subterránea	0.0129	Gan, <i>et al.</i> , 2013
		Agua del grifo	0.113 - 0.171	Gan, <i>et al.</i> , 2013
		Agua superficial	0.287 - 0.311	Gan, <i>et al.</i> , 2013
		Agua superficial	0.05	Sang <i>et al.</i> , 2014a
		Agua superficial	0.89 - 20.6	Fu <i>et al.</i> , 2020
	Singapur	Agua subterránea	<0.03	Tran, Hu y Ong, 2013a
		Agua superficial	>0.05	Tran, Hu y Ong, 2013b
Europa	Finlandia	Agua superficial	<0.2 - 1	Perkola y Sainio, 2014
	España	Agua residual	0.5	Ordóñez <i>et al.</i> , 2012
		Agua superficial	25	Ordóñez <i>et al.</i> , 2012
		Agua residual	0.05 - 155	Arbeláez <i>et al.</i> , 2015
		Agua superficial	3.57	Arbeláez <i>et al.</i> , 2015
	Suecia	Agua superficial	0.004	Gan, <i>et al.</i> , 2013
Suiza	Agua superficial	<0.01 - 0.949	Berset <i>et al.</i> , 2012	
América del Norte	Estados Unidos de América	Agua residual	27	Oppenheimer <i>et al.</i> , 2011
		Agua superficial	0.12 - 10	Oppenheimer <i>et al.</i> , 2011
		Agua residual	77	Cantwell <i>et al.</i> , 2019
		Agua superficial	0.018 - 3.18	Cantwell <i>et al.</i> , 2019

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

		Agua residual	0.9176 - 2.0312	Yang <i>et al.</i> , 2021
		Agua superficial	2.07	Yang <i>et al.</i> , 2021
		Agua potable	0.2881 - 0.5053	Yang <i>et al.</i> , 2021
ACE-K				
África	Nigeria	Agua residual	16	Hu <i>et al.</i> , 2021
		Agua superficial	7.7	
Asia	China	Agua residual	46	Gan, <i>et al.</i> , 2013b
		Agua superficial	0.013 - 0.32	Ren <i>et al.</i> , 2020
		Agua potable	0.093 - 0.125	Zhou <i>et al.</i> , 2020
		Agua superficial	0.40 - 2.78	Fu <i>et al.</i> , 2020b
	Corea	Agua subterránea	0.0329	Lee <i>et al.</i> , 2019
	Singapur	Agua residual	4.33 - 135.76	Tran, Hu y Ong, 2013a
		Agua residual	6.316 - 10.513	Tran <i>et al.</i> , 2015
Europa	República Checa	Agua residual	1.40	Kerberová, <i>et al.</i> , 2022
	Alemania	Agua subterránea	34	Lange, <i>et al.</i> , 2012
		Agua superficial	21	Scheurer <i>et al.</i> , 2011
		Agua potable	7	Lange <i>et al.</i> , 2012
	Italia	Agua residual	2500	Loos <i>et al.</i> , 2013
	Noruega	Agua superficial	25	Kokotou <i>et al.</i> , 2012
	Serbia	Agua subterránea	0.02 - 0.017	Gvozdić <i>et al.</i> , 2020
	España	Agua residual	155	Arbeláez <i>et al.</i> , 2015
		Agua residual	0.05	Arbeláez <i>et al.</i> , 2015
		Agua superficial	1.62	Arbeláez <i>et al.</i> , 2015
	Suiza	Agua subterránea	0.524	Ens <i>et al.</i> , 2014
		Agua residual	12 - 46	Buerge <i>et al.</i> , 2009
		Agua subterránea	4.7	Buerge <i>et al.</i> , 2009
		Agua del grifo	2.6	Buerge <i>et al.</i> , 2009
Agua subterránea		5	Buerge <i>et al.</i> , 2009	
América del Norte	Canadá	Agua subterránea	0.541	Wu <i>et al.</i> , 2014
		Agua superficial	0.094	Sérodes <i>et al.</i> , 2021
	Estados Unidos de América	Agua residual	10 - 50	Oppenheimer <i>et al.</i> , 2011

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Oceanía	Australia	Agua de riego	0.35 - 0.61	Mora <i>et al.</i> , 2022
		Agua subterránea	0.005 - 0.34	Mora <i>et al.</i> , 2022
América del Sur	Brasil	Agua residual	13 - 31	Alves <i>et al.</i> , 2021

Tabla 1. Presencia de SUC y ACE-K en ambientes acuáticos a nivel mundial.

Para la remoción de edulcorantes, se requiere de métodos eficaces que los eliminen de los cuerpos de agua donde son persistentes. Sin embargo, la comunidad científica ha reportado que la tecnología de tratamiento de las PTAR es limitada, ya que algunos edulcorantes muestran una degradación incompleta o no tienen cambio alguno (Scheurer *et al.*, 2012; Dong *et al.*, 2020).

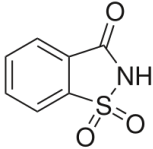
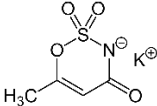
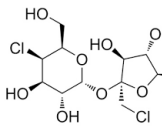
Por ejemplo, Gan *et al.*, 2013; Scheurer *et al.*, 2012 encontraron que el ACE-K y la SUC tuvieron una degradación mínima durante procesos en PTAR y de agua potable. De forma similar, Subedi y Kannan, 2014, reportaron que encontraron una eliminación del 68.2% para ASP y 90.3% para SAC en las EDAR, pero en el caso del ACE-K y la SUC no hubo eliminación significativa (<2%). Además, en 2014, Sharma, Oturan y Kim, aplicaron oxidación electroquímica de carbohidratos para eliminar SUC. Sin embargo, no obtuvieron una eliminación significativa del edulcorante.

Li, Schmitz, *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2016; Sang *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2017 han investigado la degradación y ecotoxicidad de los edulcorantes. Sin embargo, las propiedades del ACE-K y la SUC, vuelven a estos edulcorantes resistentes a la degradación biológica y un indicador perfecto para el impacto antropogénico (Tran *et al.*, 2015). De esta forma se demuestra que la luz solar simulada, radiación UV, ozonización, oxidación fotocatalítica, electrooxidación, carbón activado granulado (GAC) y la filtración GAC como tecnologías convencionales y avanzadas no son totalmente eficaces para la eliminación de edulcorantes como el ACE-K y la SUC (Scheurer *et al.*, 2012; Sang *et al.*, 2014b; Scheurer *et al.*, 2014; Gan, *et al.*, 2013; Lange, Scheurer y Brauch, 2012; Li, Schmitz, *et al.*, 2016; Punturat y Huang, 2016). Además, ciertas tecnologías dan como resultado subproductos más persistentes y hasta >500 veces más tóxicos que el propio edulcorante (Li, Schmitz, *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2017). Con todos estos hallazgos, se requiere de más tratamientos alternativos para eliminar de forma segura los edulcorantes (Chow y Leung, 2019).

Tipos de edulcorantes

Los edulcorantes están presentes en productos alimenticios, productos farmacéuticos y de cuidado personal para personas diabéticas y/u obesas. Ante la gran cantidad de tipos existentes, los edulcorantes se pueden clasificar por su contenido calórico o su origen (naturales o artificiales) (García-Almeida, 2013). Considerando su clasificación por el origen, en la Tabla 2 se resumen los edulcorantes que forman parte de cada grupo.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Edulcorantes artificiales						
Compuesto	Poder edulcorante	Absorción	Metabolismo	Excreción	Referencias	
Sacarina 	300 veces mayor que el de sacarosa.	Se absorbe como la molécula intacta.	No se someten a digestión en el tracto gastrointestinal después de su consumo.	Excretado por orina y heces.	Magnuson <i>et al.</i> , 2016; Cavagnari, 2019	Todos son rápidamente eliminados del organismo sin acumulación.
Acesulfame-k 	Hasta 200 veces mayor que la sacarosa.	Se absorbe como la molécula intacta.	No se someten a digestión en el tracto gastrointestinal después de su consumo.	Excretado, principalmente por los riñones a la orina.	Magnuson <i>et al.</i> , 2016; Cavagnari, 2019	Todos son rápidamente eliminados del organismo sin acumulación.
Sucralosa 	600-700 veces mayor que la sacarosa.	Alrededor del 85% no se absorbe. El 15% se absorbe como la molécula intacta.	No se someten a digestión en el tracto gastrointestinal después de su consumo.	Excretado por orina y heces.	Magnuson <i>et al.</i> , 2016; Cavagnari, 2019	Todos son rápidamente eliminados del organismo sin acumulación.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

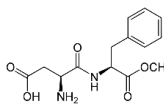
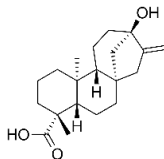
Aspartame	Hasta 200 veces más dulce que el azúcar común.	Se metaboliza la fenilalanina, el aspartato y el metanol.	No se absorbe como tal, es digerido por completo a fenilalanina, aspartato y metanol que se absorben al final.	Excretado, principalmente por los riñones a la orina.	FAD., 2015 Magnuson <i>et al.</i> , 2016; Cavagnari, 2019
	Esteviol	Hasta 300 veces mayor que la sacarosa.	Sólo se absorbe el metabolito esteviol.	No se metaboliza por enzimas humanas, solo por bacterias de microbiota intestinal.	Excreción mediante orina y heces. Durán A. <i>et al.</i> , 2012; Cavagnari, 2019
	Taumatina	2500 veces mayor que la sacarosa.		Excretado por los riñones a la orina.	Cavagnari, 2019; Fragoso <i>et al.</i> , 2020
Mogrósidos	200-300 veces mayor que la sacarosa.				(Cavagnari, 2019; Dong <i>et al.</i> , 2020b)

Tabla 2. *Edulcorantes naturales y artificiales.*

Sucralosa

Estructura química

La SUC (1,6- dicloro- 1, 6- dideoxi- β - D- fructofuranosil- 4- cloro- 4- desoxi- α - D- galactopiranosido), es un edulcorante organoclorado no calórico ampliamente consumido en todo el mundo (Schiffman y Rother, 2013). La SUC se deriva de la cloración selectiva de tres grupos hidroxilo por átomos de cloro en la molécula de la sacarosa (Magnuson, Roberts y Nestmann, 2017) (Figura 2). Los tres cloros que contiene la SUC no son dañinos para la salud porque su presencia en la molécula es lo que hace que el edulcorante sea no calórico (Molina Pérez, 2014).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

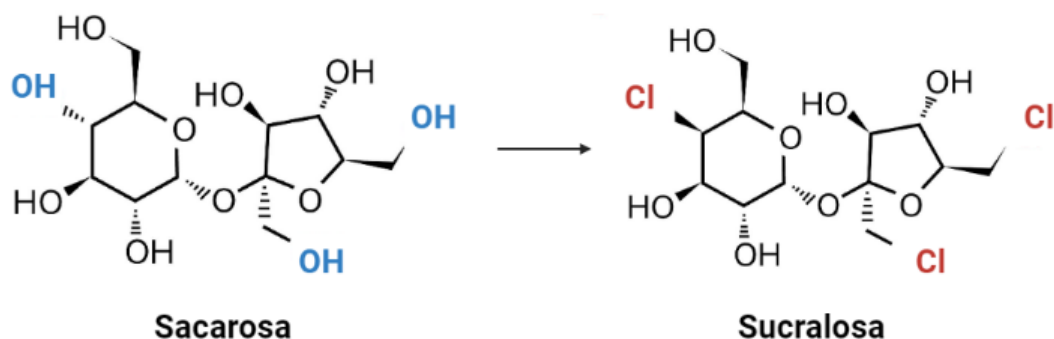


Figura 2. Transformación selectiva de la sacarosa a SUC.

Historia

La SUC presenta un poder edulcorante 600 - 700 veces mayor que la SAC (Cavagnari, 2019). Fue descubierta accidentalmente en 1976 por el becado indio Shashikant Phadnis intentando sintetizar azúcares halogenados en el laboratorio del Profesor L. Hough en el Queen Elizabeth College de Londres, Inglaterra (Valenzuela B. y Valenzuela B, 2015).

El descubrimiento de la SUC inició por un error lingüístico del idioma inglés, Shashikant Phadnis ejecutó de forma incorrecta una tarea que formaba parte del experimento (Uriza *et al.*, 2020). El profesor L. Hough pidió a Phadnis que comprobara la estructura de la sustancia (“test it”). Sin embargo, el becado entendió que probara la sustancia (“taste it”) y fue así como cloró el azúcar (Valenzuela B. y Valenzuela B, 2015).

Propiedades

La SUC es un polvo cristalino blanco higroscópico estable al calor, soluble en agua y con una alta temperatura de fusión (Molina Pérez, 2014). La presencia de grupos hidroxilo (OH) en la molécula la convierten en un compuesto altamente hidrofílico con una liposolubilidad baja (coeficiente de partición octanol-agua bajo) (Magnuson, Roberts y Nestmann, 2017) (Tabla 3).

Estado físico	Sólido	Referencias
Color	Blanco cristalino	Merck, 2022
Olor	Inodoro	
Peso molecular	397,63 g / mol	
Punto de fusión	114.5 °C -	
Solubilidad en agua	Soluble. 300 g/L a 25 °C	
Coefficiente de reparto n-octanol/agua	Log Pow: -0.51 a 20°C	

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Tabla 3. Propiedades físicas y químicas de la SUC.

En la estructura química de la SUC, el cloro no está en forma de haluros de alquilo, sino están unidas al anillo de forma estable lo que limita las interacciones y biotransformación (Berry *et al.*, 2016). La presencia de cloro en la SUC da como resultado que la molécula sea químicamente estable e impide la función de las enzimas glucosídicas que hidrolizan a la SAC siendo imposible escindir a la SUC (Molina Pérez, 2014; Cavagnari, 2019).

Absorción, distribución, metabolismo y excreción de SUC (Proceso ADME)

La SUC no se cataboliza, no genera retención o acumulación y no genera energía en el organismo (Magnuson, Roberts y Nestmann, 2017b). En la ingesta oral, no se declara ni se degrada en compuestos más pequeños (Berry *et al.*, 2016). Posterior a la ingestión, alrededor del 85% de la SUC no se absorbe y se elimina sin cambio alguno en las heces y orina (Del Pozo *et al.*, 2022). Por otra parte el 15% restante es absorbido por difusión pasiva a través del lumen del tubo digestivo pero debido a su alta solubilidad en agua, se excreta rápidamente (Socolovsky, S., 2018).

Una mínima cantidad (2 - 3%) del consumo oral sufre un metabolismo de fase II conocido como glucoronidación (Berry *et al.*, 2016). La glucoronidación es un mecanismo de detoxificación celular que se da cuando un xenobiótico reacciona con la molécula activada del ácido glucurónico (ácido glucurónico uridina difosfato), para formar un conjugado glucurónico altamente soluble en agua para facilitar su eliminación (Molina Pérez, 2014).

La SUC inalterada y sus conjugados clorados resultantes de la biotransformación (1,6-dicloro-1,6-didesoxi-d-fructosa (1,6-DCF) y 4-cloro-4-desoxi-d-galactosa (4-CG) se eliminan fácilmente en la orina (Berry *et al.*, 2016; Magnuson, Roberts y Nestmann, 2017a).

Efectos tóxicos en especies acuáticas

Aunque el uso de la SUC ha ido en aumento, su seguridad se ha mantenido controvertida por los efectos negativos que puede generar en cultivos celulares y organismos (Dhurandhar *et al.*, 2018; Eriksson Wiklund *et al.*, 2014a; Stoddard y Huggett, 2014; Bian *et al.*, 2017b; Magnuson, Roberts y Nestmann, 2017b; Saucedo-Vence *et al.*, 2017; Heredia-García *et al.*, 2019; Pasqualli *et al.*, 2020).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Organismo	Concentración	Tiempo de exposición	Efecto tóxico	Referencias
Crustáceos: <i>Gobionellus oceanicus</i> , <i>Gammarus zaddachi</i> , <i>Daphnia magna</i>	0 - 50 000 µg / L	14 días	Interrupción en el comportamiento y sistema de locomoción (velocidad de nado y altura de nado).	Eriksson Wiklund <i>et al.</i> , 2014a
Crustáceo pulga de agua (<i>Daphnia magna</i>)	0.0001 - 5 mg / L	24 horas	Alteraciones en la AChE (AChE) y generación de EO.	Eriksson Wiklund <i>et al.</i> , 2014a
Adulto de carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	0.05 y 155 µg / L	12, 24, 48, 72 y 96 horas	Inducción de EO en sangre, hígado, cerebro, branquias y músculo.	Saucedo-Vence <i>et al.</i> , 2017
Embriones de los piscardos de cabeza gorda (<i>Pimephales promelas</i>)	98 mg / L		Eclosión, la supervivencia y el crecimiento no se vieron afectados.	Stoddard y Huggett, 2014
Embriones de pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	100 000 µg / L	96 horas	Generación de malformaciones: escoliosis y enanismo.	Arndorfer, 2018
Larvas de pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	100 ppb	12 y 72 horas	Aumento significativo de frecuencia cardíaca.	Saputra <i>et al.</i> , 2021
Adulto de carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	0.05 y 155 µg / L	12, 24, 48, 72 y 96 horas	Incremento en los niveles de peroxidación lipídica, hidroperóxidos y contenido de carbonilo de proteínas en branquias, cerebro, músculo y sangre de peces.	Heredia-García <i>et al.</i> , 2019

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Renacuajo de rana toro americana (<i>Lithobates catesbeianus</i>)	1, 15 y 32 mg / L	48 horas	Alteración de la expresión de genes (CYP3A4, Nr1i2 y Nr1i3) de respuesta involucrados en la metamorfosis.	Abbott y Helbing, 2021
---	-------------------	----------	---	------------------------

Tabla 4. Efectos tóxicos inducidos por SUC en organismos acuáticos.

Acesulfame-k

Estructura química, propiedades e historia

El ACE-K de potasio es un derivado del acetoacético, y es la sal de potasio del 6- metil -1, 2,3 - oxatiazina - 4 (3 H)-1,2, 2- dióxido sustituido por un grupo metilo en la posición 6 Durán A. et al., 2012. Descubierta en 1967 por el alemán Karl Clauss. Fue aprobado en 1988 por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (Belton *et al.*, 2020). Posee un poder endulzante de hasta 200 veces mayor que la sacarosa y debido a su efecto sinérgico con sustitutos como el ASP y la SUC se utiliza en una gran variedad de productos alimenticios (Shankar, Ahuja y Sriram, 2013; Valenzuela B. y Valenzuela B, 2015; Cavagnari, 2019).

El ACE-K es un edulcorante producido químicamente sólido, de color blanco e inodoro, termoestable y altamente soluble en agua (posee un bajo coeficiente de partición ($K_{ow} = -1,33$), su estabilidad en estados sólidos es bastante buena siempre que no se sometan temperaturas elevadas (Ryu *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2021).

Absorción, distribución, metabolismo y excreción de ACE-K (Proceso ADME)

Después del consumo y la absorción intestinal, el ACE-K no es degradado metabólicamente (Castronovo *et al.*, 2017). Sin embargo, existe un estudio donde se menciona que sufre una transformación en el metabolismo y forma acetoacetato (Kroger, Meister y Kava., 2006). Además, diversos autores han señalado que al transformar el ACE-K mediante diversas técnicas de remoción pueden generar productos más tóxicos (Gan, Sun, Wang, *et al.*, 2013; Li, Schmitz, *et al.*, 2017; Yin *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2021).

Efectos tóxicos en organismos

Dado que existen pocos estudios de los efectos tóxicos del ACE-K, la información es más limitada. Sin embargo, algunos autores han reportado alguna serie de efectos dañinos en organismos (Ren *et al.*, 2016;

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Nishimura *et al.*, 2016; Cruz-Rojas *et al.*, 2018; Ibi, Suzuki y Hiramatsu, 2018; Dong *et al.*, 2020a; Lin *et al.*, 2021; Wiklund, Guo y Gorokhova, 2023). (Tabla 5).

Organismo	Concentración	Tiempo de exposición	Efecto tóxico	Referencias
Adulto de pez dorado (<i>Carassius auratus</i>)	0.1 y 10 mg / L	7 días	Aumento de los niveles de malondialdehído e inhibición de la actividad de superóxido dismutasa en hígado.	Ren <i>et al.</i> , 2016
Adulto de carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	0.05 y 149 µg / L	12, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición	Aumento de biomarcadores de EO y enzimas antioxidantes en branquias, cerebro y músculo.	Cruz-Rojas <i>et al.</i> , 2018
Ratones macho C57BL/6J		Exposición crónica	Funciones de memoria cognitiva deteriorada.	Nishimura <i>et al.</i> , 2016
Ratones		4 semanas	Disminución en la memoria cognitiva a corto plazo.	Ibi, Suzuki y Hiramatsu, 2018
Crustáceo pulga de agua (<i>Daphnia Magna</i>)	100 000 µg / L		Respuesta bifásica en la actividad de la AChE: inhibición en concentraciones más bajas y estimulación en concentraciones más altas.	Wiklund, Guo y Gorokhova, 2023
Ratones apoE-/-		8 semanas	Aumento en la dislipidemia inducida por HCD a través de un incremento en la lipogénesis y una disminución en la lipólisis.	Lin <i>et al.</i> , 2021
Adulto de Pez cebra	1, 10 y 100 mg / L	NOEC (Concentración)	Alteración del comportamiento: preferencia por la luz/oscuridad, capacidad de exploración,	Dong <i>et al.</i> , 2020a

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

<i>(Danio rerio)</i>	a la que no se observa efecto)	capacidad de aprendizaje y memoria.
----------------------	--------------------------------	-------------------------------------

Tabla 5. Efectos tóxicos inducidos por ACE-K en diversos organismos.

Consumo

En 2019, la ingesta de edulcorantes a nivel mundial se estimó que superaba las 1.6×10^3 toneladas con un valor de 2 mil millones de dólares estadounidenses (Praveena, Cheema y Guo, 2019). Sin embargo, en 2020 reportaron que la ingesta se estimó a 85.920 millones de dólares y se prevé que se genere un incremento del 2.49% de 2021 a 2026 (Mordor Intelligence, 2023). Cabe mencionar que, dentro de los mayores consumidores y productores se encuentra Asia (23%), Estados Unidos de América (23%), Europa (12%) y África (7%) (PRNewswire, 2019).

Bioindicador

El término “bioindicador” hace referencia a una especie o grupo de especies (plantas, animales y/o microorganismos) que tienen una tolerancia limitada a uno o más factores ambientales de origen biótico o abiótico (Tenjo Morales, A. I., y Cárdenas Castro, E., 2015). Los bioindicadores pueden evaluar y predecir los efectos de las modificaciones ambientales antes que el daño sea irreversible (Romano, 2016).

En la actualidad, cada día es más común el uso de indicadores biológicos como herramientas que permiten obtener información de una cierta condición del entorno de ese hábitat (De la Lanza-Espino, G., y Hernández-Pulido, S., 2014).

Pez cebra como organismo de experimentación

Debido a la amplia aceptación de las ventajas inherentes del sistema modelo, el uso y adopción del pez cebra han aumentado exponencialmente en los últimos 20 años (Tanguay, 2018). El pez cebra es un modelo animal con muchas cualidades que lo convierten en una alternativa de investigación deseable, incluida su alta fecundidad, su rápido desarrollo desde la etapa embrionaria hasta la edad adulta, el costo de la infraestructura, etc. Además, debido a su alta capacidad reproductiva y bajo riesgo de extinción, no es una especie protegida porque es relativamente sencilla de obtener (Vargas, 2017).

Los principales beneficios de utilizar el pez cebra como sustituto de mamíferos en estudios incluyen la biología de vertebrados, la simplicidad en el manejo, la alta fecundidad, el pequeño tamaño corporal, el desarrollo rápido y las larvas transparentes. La mayoría de los órganos del pez cebra funcionan de manera similar a los órganos humanos y exhiben una buena conservación fisiológica, a pesar de algunas diferencias significativas en la anatomía y fisiología asociadas con las especies acuáticas (Cassar *et al.*, 2020).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

El embrión de pez cebra es un organismo complejo, a diferencia de los modelos in vitro, con vías metabólicas establecidas y funcionales y otras respuestas fisiológicas que permiten la evaluación de la toxicidad en términos de absorción, respuesta metabólica y excreción (Cornet, C., *et al.*, 2017). Además, las larvas de pez cebra a los 5 días después de la fertilización se aceptan como una alternativa a los experimentos con animales y como modelo in vitro de acuerdo con los estándares éticos internacionales cumpliendo así el principio de las 3R (Cornet, C., *et al.*, 2017).

Las 3R en el uso de animales

El pez cebra cumple con las 3R (reemplazo, reducción y refinamiento) de la investigación con animales. La investigación con animales ha evolucionado junto con las directivas regulatorias y las nuevas tecnologías, dando un resultado positivo hacia la ciencia y el bienestar animal (Cornet, C., *et al.*, 2017). *Danio rerio* no se considera un verdadero modelo animal porque se puede evaluar todo el período de desarrollo de los embriones antes de que se desarrollen por completo (4 o 5 días después de la fertilización) (Nishimura *et al.*, 2016).

Características generales

El pez cebra es un pequeño pez de agua dulce (4 cm) perteneciente a la familia *Cyprinidae*. Es originario del río Indo y está muy extendido en Bangladesh, Nepal, Nyanma y Pakistán. Aunque es común en acuarios de todo el mundo debido a su popularidad como mascota (Vargas, 2017). En su hábitat natural suele encontrarse en el fondo del agua para evitar el ataque de sus depredadores (Teame, T., *et al.*, 2019). El desarrollo de embriones y larvas ocurre durante un corto período de tiempo (3 - 5 días después de la fertilización) y posterior a la fertilización, en tan solo tres meses se convierten en adultos (Lawrence, 2007). Kimmel et al. 1995 mencionaron que el desarrollo embrionario del pez cebra se caracteriza por la transparencia, lo que permite el monitoreo directo del desarrollo y función de los órganos internos en condiciones normales utilizando técnicas de microscopía convencional sin necesidad de sacrificar al pez cebra. La mayoría de los órganos casi han terminado de desarrollarse entre 48 y 72 hpf, con la excepción de los órganos gastrointestinales. Después de las 76 hpf, el hígado, el páncreas y los intestinos están completamente formados y a las 96 hpf, el sistema digestivo ya está completamente formado (Cassar, S., *et al.*, 2019).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

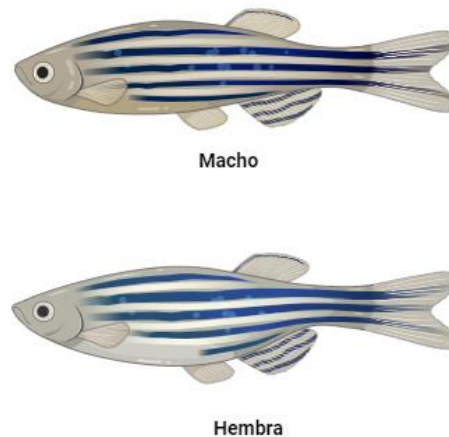


Figura 3. Hembra y macho de *Danio rerio*.

Mantenimiento

Se sugieren de 3 a 5 peces cebra por litro de agua. El agua debe tener un pH específico (6.8 a 7.5), mantener una temperatura constante (23 a 30 °C) y realizar un cambio de 10 a 25% cada semana. Se requiere un sistema de iluminación controlado con ciclo de luz - oscuridad garantizado (de 14 a 20 horas). Cada mes se reemplazan los filtros y se limpia el acuario (Palomino Echeverría, 2018).

Alimentación

Nutricionalmente, el pez cebra es omnívoro, pero hay alimentos comerciales en pellets o en escamas disponibles para proporcionar una nutrición completa; alimentar una o dos veces al día y en las primeras etapas de desarrollo se recomienda alimentar con camarones en salmuera (*artemia nauplii*) (Vargas, 2017; Palomino Echeverría, 2018).

Reproducción

El pez cebra se reproduce continuamente, cada hembra produce un promedio de 200 huevos y alrededor del 90% de los huevos fertilizados eclosionan (Vargas, 2017). Los reproductores (machos y hembras) generalmente se mantienen en tanques de cría en una proporción de 2 a 3 machos por 1 hembra en el acuario. Los reproductores (machos y hembras) generalmente deben separarse y colocarse en el mismo tanque sólo cuando se planifica la reproducción (Palomino Echeverría, 2018). Además, en comparación con el costo de

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

albergar a los roedores, los gastos de crianza y mantenimiento de los *Danio rerio* y la infraestructura son bajos (Vargas, 2017).

Biomarcadores

Para medir la exposición a agentes exógenos que causan enfermedades y pronosticar posibles reacciones tóxicas, se hace uso de diversos biomarcadores (Arango, 2012) (Tabla 6). Cuando un agente químico, físico o biológico interactúa con un sistema biológico y se evalúa como una respuesta funcional o fisiológica que tiene lugar en células o moléculas, la interacción se denomina "biomarcador" (Arango, 2012). Gupta, R. C., 2019 define un biomarcador como “un parámetro biológico específico, sensible, estable y no invasivo que puede detectar tempranamente una intoxicación y su progresión a tiempo de un organismo”.

Biomarcadores de exposición	Biomarcadores de efecto	Biomarcadores de susceptibilidad	Referencias
También conocidos como dosímetros biológicos. Interacción entre un agente xenobiótico y molécula diana de un organismo.	Evaluación de la alteración bioquímica, fisiológica o de comportamiento producida en el organismo. Indican cambios a nivel de la célula.	Indicador de capacidad heredada o adquirida de un organismo para responder al desafío de la exposición a un determinado sustancia xenobiótico.	Swenberg <i>et al.</i> , 2008; Mussali-Galante, 2013
Dan medidas de las alteraciones en ADN como: daño oxidativo en el ADN y proteínas, alteraciones en enzimas, etc.	Daño oxidativo (desequilibrio entre especies reactivas de oxígeno y enzimas antioxidantes) a macromoléculas como el ADN (modificaciones y roturas), proteínas y lípidos.		Swenberg <i>et al.</i> , 2008; Mussali-Galante, 2013

Tabla 6. Tipos de biomarcadores.

Las interacciones entre el xenobiótico y el organismo dependen de las características genéticas y adquiridas del sistema biológico y se deben de tener en cuenta parámetros que permitan la evaluación del bioindicador (Figura 4).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

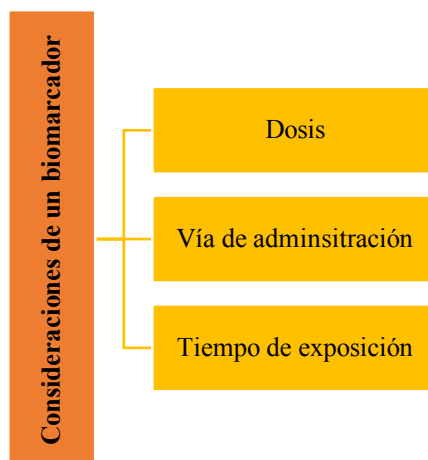


Figura 4. Puntos por considerar en el uso de un biomarcador.

Embriotoxicidad y teratogenicidad

Carolina *et al.*, 2017 define a la teratogenicidad como las malformaciones o defectos estructurales que ocurren en la etapa embrionaria y son causados por compuestos químicos que provocan toxicidad limitando las funciones, crecimiento o muerte del embrión.

La embriotoxicidad describe la capacidad de una sustancia de tener efectos tóxicos en la descendencia en las primeras etapas de vida de un organismo y forma parte de la toxicología del desarrollo y la reproducción porque estos efectos podrían incluir deformidades, retraso en el crecimiento, disfunción y muerte prenatal (Carolina *et al.*, 2017).

Las pruebas de embriotoxicidad y teratogenicidad inducidas por sustancias y/o mezclas en peces revelan información sobre la toxicidad en su desarrollo (Tenorio Chávez, 2020).

Estrés oxidativo

Cualquier proceso de oxidación siempre va seguido de un proceso de reducción. Se trata de procesos redox que implican pares conjugados (Zambrano, 2016). Casi todo en la naturaleza se oxida con la ayuda del oxígeno (Chang R., 1992). Además, debido a que proporcionan la mayor parte de la energía libre que necesitan los seres vivos, las reacciones de oxidación - reducción (REDOX) desempeñan un papel importante en la bioquímica (Voet D., 1992).

El desequilibrio entre las EROS y el sistema antioxidante en los organismos produce el llamado estrés oxidativo. Se da cuando existe una producción descontrolada de EROS y una disminución de los antioxidantes.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

El estrés oxidativo perjudica las funciones de las células y contribuye a ciertas enfermedades y toxicidad (Kensler, Wakabayashi y Biswal, 2007). En ocasiones, las EROS alteran la actividad de las vías metabólicas y las membranas al interactuar con moléculas como el ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas, lípidos, carbohidratos y otras estructuras que, sumado a una inadecuada respuesta antioxidante, genera la acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial, excitotoxicidad y apoptosis (Dasuri *et al.*, 2013; Caiaffo *et al.*, 2016).

Radicales libres

Dado que los radicales libres (RL) son el resultado final de innumerables reacciones metabólicas necesarias para la vida celular, su formación es un proceso común e inevitable (Zambrano, 2016). Cualquier especie química que tenga al menos un electrón desapareado en el orbital más externo de su átomo o molécula se considera un RL. Como consecuencia, tienden a estabilizarse donando o aceptando electrones desapareados de otras moléculas del entorno, actuando como agentes reductores en el primer caso y como oxidantes en el segundo, lo que los hace extremadamente reactivos y con vidas medias muy cortas (Elejalde *et al.*, 2001). Los RL tienden a iniciar reacciones en cadena, en las que un RL conduce a otro, y así sucesivamente (Rica, 2019).

Algunos RL derivan del oxígeno por lo que son llamados “especies reactivas de oxígeno”. Las principales EROS son: el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) el anión radical superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (HO^-) y el oxígeno molecular (O_2). Además, dentro de las secundarias se encuentran los radicales peróxidos (ROO), los hidroperóxidos orgánicos (ROOH) y los peróxidos lipídicos (Elejalde *et al.*, 2001).

Hidroperóxidos y lipoperoxidación

La peroxidación lipídica es un proceso degenerativo que ocurre en condiciones de estrés oxidativo y destruye las membranas celulares, lipoproteínas y otras estructuras que contienen fosfolípidos, glicolípidos y colesterol insaturados (Fernández, 2009). Los HPX son los primeros subproductos inestables de la peroxidación lipídica, que se descomponen en una serie de productos altamente reactivos (Zorrilla, 2002; Schwarzer, E., *et al.*, 2015). La peroxidación lipídica es un proceso que se produce mediante reacciones en cadena de RL (Schwarzer, E., *et al.*, 2015). La peroxidación puede iniciarse mediante radicales hidroxilos (HO^-), radicales hidroperóxido y posiblemente oxígeno singlete, pero no mediante radicales superóxidos (O_2^-) o peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Membrillo Ortega *et al.*, 2003; Schwarzer, E., *et al.*, 2015). Como resultado de la peroxidación se producen en mayores cantidades dienos conjugados e hidroperóxidos, así como productos secundarios como malondialdehído (MDA), F2 - isoprostanos, pentanos expirados, etanos o hexanos (Fernández, 2009).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

La peroxidación lipídica ocurre en tres pasos (Membrillo Ortega *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2008):

- **Iniciación:** Un RL ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, ocurre la abstracción de hidrógeno del grupo metileno (-CH₂-) unido a un carbono flanqueado por dobles enlaces de un ácido graso poliinsaturado, con la formación de una especie radicalica (radical alquílico).
- **Fase de propagación:** reacción en cadena con la extensión del daño y la formación de más especies radicalicas. La especie radicalica formada en la primera fase reacciona con el oxígeno y forma un radical peroxilo (LOO[•]) que puede reaccionar con otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes y originar un hidroperóxido o lipoperóxido (LOOH) y un radical alquílico; así se produce una reacción en cadena y el daño a un número creciente de ácidos grasos.
- **Fase de terminación o descomposición:** HPX formados se descomponen en etano, pentano, aldehídos reactivos y cetonas. Los aldehídos formados, como el malonildialdehído y el 4-hidroxinonenal, pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos, lo que determina efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos, etc.

Según Demidchik (2015); Giuliani y Regoli (2014), la peroxidación lipídica se considera un biomarcador confiable del daño por EO en organismos acuáticos. El producto más conocido de la peroxidación lipídica es el MDA, una molécula altamente tóxica que afecta a las proteínas y al ADN (Caiaffo *et al.*, 2016).

Proteínas carboniladas

Las proteínas carboniladas con los resultados inmediatos del daño de los RL a las proteínas (Gutiérrez-Salinas *et al.*, 2016). Las reacciones en cadena de RL que apuntan a enlaces insaturados, anillos aromáticos y grupos tiol hacen que las proteínas se oxiden (Hagerman, Dean y Davies, 2003). Por su estabilidad y fácil detección, la formación de grupos carbonilo ha sido uno de los biomarcadores de EO más utilizados (Irazusta *et al.*, 2008). Las proteínas sufren modificación oxidativa porque son uno de los objetivos principales de las EROS. Esto permite la modificación estructural y funcional de proteínas con alto contenido de ciertos aminoácidos (triptófano, tirosina, fenilalanina, histidina, metionina y cisteína) (Tamarit *et al.*, 1998; DalleDonne *et al.*, 2006). La respuesta de una proteína a los radicales de oxígeno depende de la composición de aminoácidos de la proteína, así como la importancia y ubicación de los aminoácidos que contribuyen a la estructura y función de la proteína y la posibilidad de reparación del daño (Zorrilla, 2002).

Sistema antioxidante

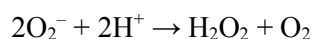
Los antioxidantes son sustancias con capacidad de retardar o prevenir la oxidación de un sustrato que se opone a la acción del oxígeno independiente de su mecanismo (Fragoso *et al.*, 2020). Existen varios

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

sistemas de enzimas antioxidantes que metabolizan los RL generados por procesos REDOX celulares (CAT peroxisomal, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) y varios antioxidantes no enzimáticos (vitamina E, ascorbato, glutatión, transferrina, ceruloplasmina, etc.) (Elejalde *et al.*, 2001).

Superóxido dismutasa

A nivel mitocondrial se producen la mayoría de las EROS (Rica, 2019). Los superóxidos dismutasas (SOD) son un conjunto de metaloenzimas que funcionan como la primera línea de defensa de un organismo contra el daño provocado por especies reactivas de oxígeno (Leiva Correa, 2022). Se crean en los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones, mediante una transferencia de electrones al oxígeno molecular. Además, el O₂ es la principal ERO y producen otras EROS biológicamente significativas (Leiva Correa, 2022). La SOD cataliza la conversión del anión superóxido (O₂⁻) a peróxido de hidrógeno (H₂O₂):

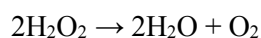


El O₂⁻ y el H₂O₂ constituyen la mayoría de las EROS generadas en las células en circunstancias normales. Sin embargo, las concentraciones de superóxido (O₂⁻) pueden superar cierto punto debido a la actividad mitocondrial, que puede reducir la viabilidad celular en ausencia de mecanismos antioxidantes eficientes (Rica, 2019).

Catalasa

Las células han desarrollado una variedad de mecanismos de defensa antioxidantes (por ejemplo, metabolitos, vitaminas y enzimas) para neutralizar o reducir los efectos nocivos de las EROS (Carrillo Esper *et al.*, 2016). Tal es el caso del SOD que dismuta el superóxido (O₂⁻) en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que es degradado por la catalasa (CAT) o el glutatión peroxidasa (GPX) (Nandi *et al.*, 2019).

La CAT, una enzima antioxidante que reduce significativamente el EO al destruir el peróxido de hidrógeno celular (H₂O₂) para producir agua y oxígeno (Nazırođlu, M., 2012). Tanto los peroxisomas como las mitocondrias contienen esta enzima. La CAT divide dos moléculas de peróxido de hidrógeno en una molécula de oxígeno y dos moléculas de agua en una reacción de dos pasos (Nandi *et al.*, 2019).



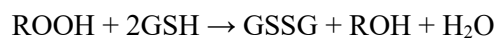
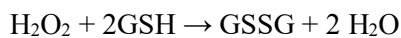
La CAT, el GPX y la peroxiderroxina (PRX) desempeñan un papel clave en el mantenimiento de concentraciones bajas de H₂O₂ en estado estacionario que mantienen la homeostasis y adaptan a las células

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

de mamíferos al estrés. A diferencia de las otras dos enzimas implicadas en la eliminación de H₂O₂, la CAT no requiere cofactores para llevar a cabo el ciclo catalítico. Generalmente se cree que GPX y PRX son los principales responsables de la eliminación de H₂O₂ en concentraciones bajas, mientras que la CAT es más eficiente en concentraciones altas de H₂O₂ (Gebicka y Krych-Madej, 2019).

Glutación peroxidasa

Es una selenoenzima constituida por 4 subunidades selenio-cisteína, codificada por un triplete adenosina-uridina-guanosina que existe en varias isoformas (GPX citosólica, la GPX plasmática y la GPX fosfolípida) (Fernández, 2009; Fragoso *et al.*, 2020). Se encuentra en el citoplasma, las mitocondrias y la membrana celular (Fernández, 2009). La enzima utiliza dos moléculas de glutación reducido (GSH) para catalizar la reducción del peróxido, de hidroperóxidos y alcohol. Los productos de la reacción son glutación oxidado (GSSG) y agua (H₂O) (Alves *et al.*, 2021).



El GPX dependiente de selenio desempeña un papel clave en los procesos REDOX celulares, catalizando reacciones que ayudan a destruir los peróxidos de hidrógeno y los peróxidos de ácidos grasos (hidroperóxidos orgánicos) producidos en el cuerpo (López Alonso, M., *et al.*, 1997).

Pruebas estadísticas

Análisis de Kaplan-Meier

El método de Kaplan-Meier es un método de estimación de modelos que permite estimar una curva de supervivencia (IBM, 2021). Es un método no paramétrico y se basa en la estimación de las probabilidades condicionales en cada punto temporal cuando tiene lugar un evento y en tomar el límite del producto de esas probabilidades para estimar la tasa de supervivencia en cada punto temporal (Molina Arias, M., y Sangrador, O.2022).

Las curvas de Kaplan Meier representan gráficamente tasas de supervivencia o funciones de supervivencia. El eje x representa el tiempo y el eje y representa la tasa de supervivencia. Las curvas de Kaplan-Meier muestran la probabilidad de supervivencia acumulada. Una pendiente más pronunciada indica una mayor tasa de eventos (mortalidad) y, un peor pronóstico de supervivencia. Una pendiente más plana indica una tasa de eventos más baja y, por lo tanto, un mejor pronóstico de supervivencia. La curva puede tener una meseta o un área plana, lo que indica una supervivencia relativamente estable (Molina Arias, M., y Sangrador, O.2022).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Student Newman Keuls

La prueba Student Newman Keuls es una prueba de comparaciones múltiples. Una vez que un ANOVA haya dado un resultado estadísticamente significativo, puede ejecutar un Newman-Keuls para ver qué pares de medias específicos son diferentes. La prueba se basa en la distribución del rango estudentizado. Utiliza un umbral móvil, como esa técnica, basado en el número de medias están implicadas en el recorrido de la resta de medias comparada pero con una diferencia: aquí el nivel de significación no cambia, no se altera, se mantiene en el general, que suele ser, como siempre de 0.05 (Hervé' Abdi., et al., 2010).

Prueba ANOVA unidireccional

El análisis de varianza (ANOVA) es un método estadístico utilizado para comparar las medias de dos o más grupos. Por lo tanto, el ANOVA unidireccional es una extensión de la prueba t independiente para más de dos grupos o muestras. En particular, ANOVA unidireccional es un método ampliamente utilizado para analizar la variación de una única variable continua en dos o más grupos categóricos. A menudo se utiliza en estudios experimentales para comparar los efectos de diferentes tratamientos o intervenciones sobre un resultado particular (Anderson et al., 2021). La idea básica detrás del análisis de varianza es separar la variabilidad total de los datos en dos componentes: variación entre grupos (debido al tratamiento) y variación dentro de cada grupo (debido a variación aleatoria y diferencias individuales) (Anderson et al., 2021). La prueba ANOVA calcula el estadístico F, que es la correlación entre la variación entre grupos y la variación dentro de cada grupo. Si el estadístico F es suficientemente grande y el valor p asociado está por debajo de un nivel de significancia predeterminado (por ejemplo, 0,05), existe evidencia sólida de que la media de al menos un grupo es significativamente diferente de las otras medias (Anderson et al., 2021).

Prueba de Shapiro-Wilk

La prueba de Shapiro-Wilks propone la hipótesis nula de que la muestra proviene de una distribución normal. Elegimos un nivel de significancia, por ejemplo, 0.05 y tenemos la hipótesis alternativa de que la distribución no es normal (Razali, et al., 2011). Para ello se calcula la media y la varianza muestral S^2 y se ordenan las observaciones de menor a mayor. La diferencia entre el primero y el último se calcula de la siguiente manera: segundo y penúltimo, tercero y penúltimo, etc. y corregido con los coeficientes dados por Shapiro- Wilk (Razali, et al., 2011). Las estadísticas de la prueba son las siguientes:

$$W = \frac{D^2}{nS^2}$$

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Donde “D” es la suma de las diferencias corregidas. Se rechaza la hipótesis nula cuando el estadístico W es menor que el valor crítico para el tamaño de muestra y el nivel de significancia dado.

Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (PCA) es un método estadístico que se utiliza para sintetizar información o reducir la dimensionalidad (el número de variables). Es decir, ante una base de datos con muchas variables, el objetivo es reducir las variables a un número menor y con ello reducir la cantidad de información faltante. Los nuevos componentes o factores principales serán combinaciones lineales de las variables originales y serán independientes entre sí. El aspecto central del PCA es la interpretación de los factores, ya que no está dada a priori, sino que se obtiene tras observar las relaciones de los factores con las variables originales (de ahí la necesidad de estudiar el signo y magnitud de las correlaciones). Esto no siempre es fácil y el conocimiento experto del tema de investigación es esencial (Céspedes, J. M. N., Cardoso, G. M. C., y Rodríguez, E. G., 2010).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, el consumo de los edulcorantes ha aumentado siendo los más populares a nivel mundial el ASP, la SAC, el ACE-K y la SUC. Son altamente ingeridos en la vida diaria como sustitutos del azúcar en alimentos, bebidas y productos farmacéuticos. Por tal motivo, los edulcorantes artificiales han sido detectados en cantidades que van desde los ng / L a µg / L dentro del medio ambiente, especialmente en cuerpos de agua. Debido a las características y naturaleza de la SUC y el ACE-K, no pueden ser eliminados y degradados de forma eficaz mediante tratamientos convencionales en las plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR).

En la actualidad, la seguridad de la SUC, el ACE-K y sus mezclas es un tema de preocupación constante debido a la poca existencia de estudios que nos informen acerca de los efectos tóxicos que pueden generar en los organismos acuáticos. Por ejemplo, la SUC puede interrumpir el comportamiento y los movimientos locomotores de diversos crustáceos (*Gobionellus oceanicus*, *Gammarus zaddachi*, *Daphnia magna*) y puede producir EROS y AChE en la especie *Daphnia magna* a concentraciones de 0.0001 - 5 mg / L. Además, otros autores observaron que la SUC en concentraciones ambientalmente relevantes de 0.05 - 116.5 µg / L generaba diversas malformaciones y aumento de la frecuencia cardíaca en embriones de *Danio rerio*.

Por tal motivo, se considera que existen pocas investigaciones que estudien los efectos embriotóxicos y neurotóxicos de la SUC y el ACE-K así como su combinación en los organismos acuáticos.

HIPOTESIS

Concentraciones ambientalmente relevantes de SUC, ACE-K, y sus mezclas generarán alteraciones en el comportamiento, estrés oxidativo, e inhibición en la actividad de la AChE en adultos de *Danio rerio*, así como también afectarán el desarrollo embrionario de estos organismos de agua dulce.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto embriotóxico y neurotóxico que producen concentraciones ambientalmente relevantes de SUC, ACE-K, y sus mezclas en *Danio rerio*.

Objetivos específicos

- Determinar si la SUC puede generar efectos nocivos en las primeras etapas de vida de *Danio rerio*.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

- Cuantificar el posible daño oxidativo producido por SUC, ACE-K y sus mezclas en cerebro de *Danio rerio*, mediante las enzimas antioxidantes (SOD y CAT) y las especies reactivas de oxígeno (HPX, LPX y PCC).
- Identificar si la SUC, el ACE-K y sus mezclas pueden afectar el comportamiento y actividad de AChE en *Danio rerio*.

MÉTODOS

Reactivos

La SUC (>98 %; número CAS: 56038-13-2), el ACE-K (Número CAS 55589-62-3), y todos los demás reactivos fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Se realizó una solución madre de SUC y una solución madre de ACE-K con agua ultrapura, a partir de las cuales se realizaron las exposiciones a las diversas concentraciones.

Mantenimiento de *Danio rerio*

Hembras y machos de *Danio rerio* de cinco meses de edad (cepa AB) permanecieron en acuarios de 100 L de capacidad (1 pez por cada litro de agua). Los parámetros de calidad del agua fueron monitoreados cada dos días como se muestran en la Tabla 7 durante la conservación de los organismos.

Parámetros	Valor medido
Los ₂	9.2 ± 0. 2 mg / L
NO ₂ ⁻	0.025 ± 0,008 mg / L
NO ₃ ⁻	2.8 ± 0.4 mg / L
pH	7.33 ± 0,18
NH ₃	0.010 ± 0,003 mg / L

Tabla 7. Parámetros de calidad del agua.

La temperatura de los acuarios se mantuvo a 27± 1°C (temperatura constante) y los ciclos de oscuridad/luz (14:10 h). La alimentación de los peces se realizó tres veces al día con espirulina (Ocean Nutrition, US) y cada dos días con camarones en salmuera (*Artemia sp. nauplii*).

Primera parte experimental: Efectos tóxicos inducidos por SUC en las primeras etapas de vida de *Danio rerio*.

Obtención de los ovocitos de *Danio rerio*

Una noche antes del desove, diversos machos y hembras de *Danio rerio* (relación 2:1) fueron colocados en cámaras de reproducción individuales. El inicio de la luz del día siguiente estimuló el desove de los

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

embriones. Los embriones se recolectaron, enjuagaron y blanquearon con agua ultrapura siguiendo los protocolos de Westerfield, 2007 y Varga, 2011. Posteriormente, los embriones se clasificaron de acuerdo con el método de Kimmel *et al.*, 1995 y se utilizó un microscopio estereoscópico (Zeiss Stemi 305). Solamente los embriones en etapa de blástula media (2.5 hpf) fueron elegidos y se incubaron en cajas de Petri a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que alcanzaron las 4 hpf (etapa de esfera).

Embriotoxicidad

Se eligieron setenta y dos embriones en etapa de esfera (4 hpf) para cada concentración de SUC (0, 0.05, 19.3, 48.4, 77.5, 96.97, 116.25 $\mu\text{g} / \text{L}$). Las concentraciones se seleccionaron considerando las reportadas en ecosistemas acuáticos (Tabla 1) y las más altas utilizadas en estudios previos que dañan a organismos acuáticos (Eriksson Wiklund *et al.*, 2012; Eriksson Wiklund *et al.*, 2014; Saucedo-Vence *et al.*, 2017; Arndorfer 2018; Saputra *et al.*, 2021).

Cada uno de los embriones fue asignado de forma aleatoria en placas de 24 pocillos. Los pocillos contenían 2 ml de agua ultrapura o una solución correspondiente a cada una de las concentraciones de SUC. Se utilizaron tres placas por concentración de SUC, se incubaron a $27^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvieron bajo los mismos períodos de luz/oscuridad (relación 14 h: 10h).

La mortalidad y las tasas de malformación fueron evaluadas a 12, 24, 48, 72 y 96 hpf durante el periodo de exposición a SUC. La tasa de malformación se dio como el porcentaje de embriones con al menos una deformación corporal en comparación con el grupo de control. Con los datos obtenidos de la mortalidad, se realizó un análisis de regresión lineal de máxima verosimilitud para determinar CL50 y CE_{50m} con sus intervalos de confianza del 95% ($p < 0,05$). Además, mediante el uso del software SigmaPlot 12.3, se realizó un análisis de Kaplan-Meier. Finalmente, con el software IBM SPSS Statistics 22, se construyó un gráfico con las principales alteraciones inducidas por SUC en los embriones.

Pruebas de estrés oxidativo

Para las pruebas de EO se ocuparon aproximadamente 1600 embriones en etapa de esfera (4 hpf). Los embriones fueron repartidos en 7 grupos, uno de los grupos pertenecía al control (grupo expuesto solo a agua ultrapura) y el resto de los grupos era de cada una de las concentraciones de SUC, respectivamente.

Los embriones de pez cebra utilizados para las pruebas de estrés oxidativo se mantuvieron a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para los embriones, a las 72 hpf y 96 hpf, se seleccionaron aleatoriamente y homogeneizaron 500 larvas en 1 ml de solución buffer de fosfatos (PBS, pH 7.4). Los puntos finales fueron seleccionados porque a esas horas post fecundación los embriones ya habían eclosionado y sus enzimas antioxidantes ya estaban activas (Elizalde-Velázquez *et al.*, 2021a, b).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Una vez obtenido el homogeneizado, se dividió en dos tubos de Eppendorf (Tabla 8).

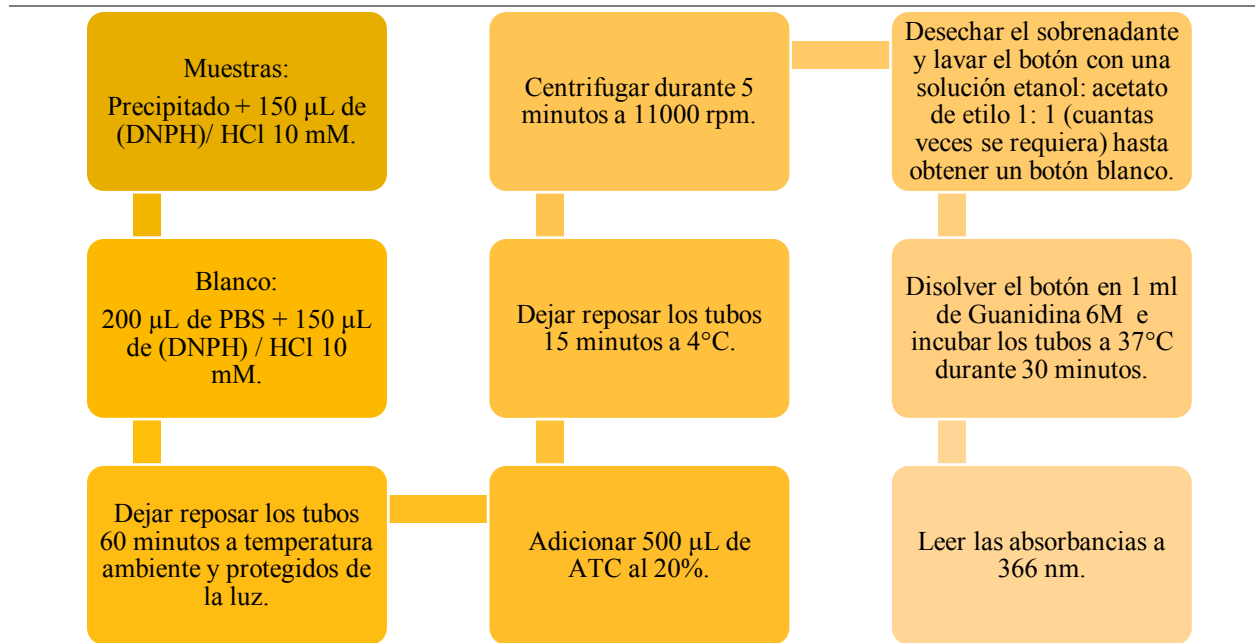
	Contenido	Centrifugación	Pruebas para las que se utiliza
Tubo 1	300 μ l de homogeneizado + 300 μ l ácido tricloroacético al 20%	11495 rpm a 4° C por 15 minutos.	Precipitado: <ul style="list-style-type: none"> - Contenido de proteínas carboniladas (POX). Sobrenadante: <ul style="list-style-type: none"> - Grado de lipoperoxidación (LPX). - Contenido de hidroperóxidos (HPX).
Tubo 2	700 μ l de homogeneizado	12500 rpm a 4° C.	<ul style="list-style-type: none"> - Determinación de la actividad de superóxido dismutasa (SOD). - Determinación de catalasa (CAT). - Determinación de proteínas totales (PT).

Tabla 8. Tratamiento del homogeneizado para pruebas de estrés oxidativo.

Posteriormente, las condiciones utilizadas para cada técnica de estrés oxidativo se resumen en la Tabla 9. Finalmente, los resultados de cada uno de los biomarcadores se normalizaron contra las proteínas totales siguiendo el método de Bradford (1976). Las pruebas de estrés oxidativo se realizaron por triplicado, obteniendo diversas replicas para cada biomarcador que posteriormente se utilizaron para realizar análisis estadísticos y gráficos.

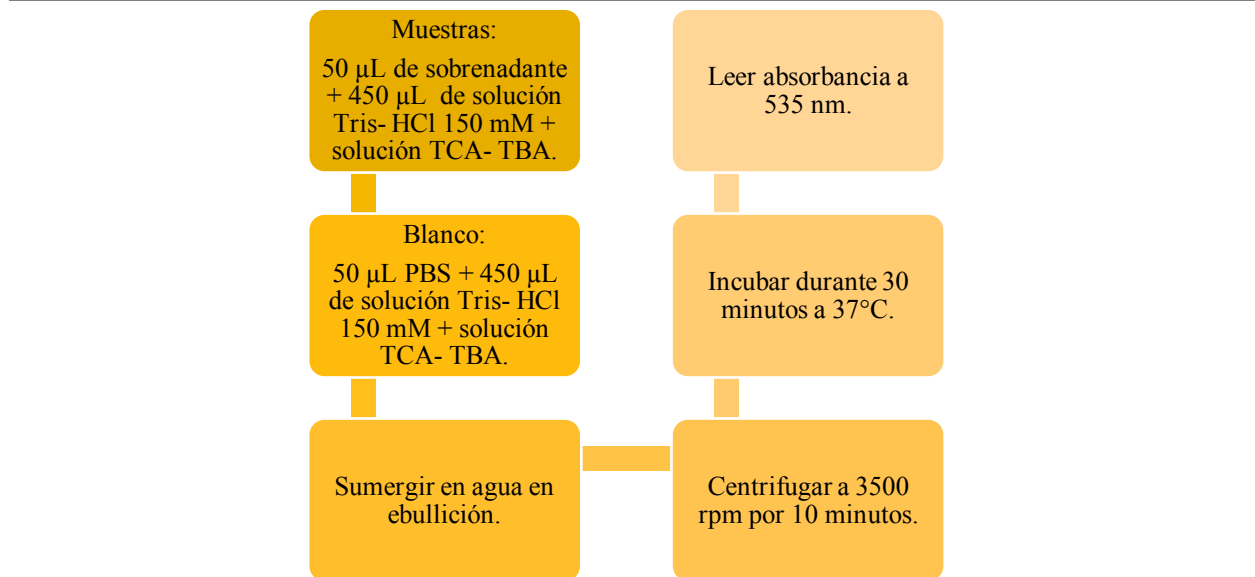
Tubo 1	
Proteínas carboniladas	Levine <i>et al.</i> , 1994; Parvez y Raisuddin, 2005; Burchman., 2007

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.



Lipoperóxidos

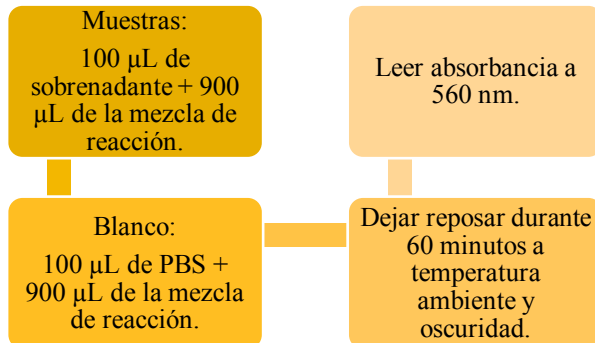
Buege y Aust, 1978



Hidroperóxidos

Jiang, Hunt y Wolff, 1992

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.



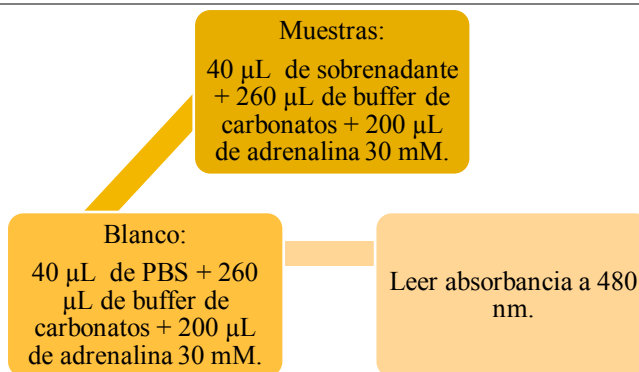
Mezcla de reacción:

- Solución A: FeSO₄ y H₂SO₄
- Solución B: Butilato deshidroxitolueno y Anaranjado de Xilenol

Tubo 2

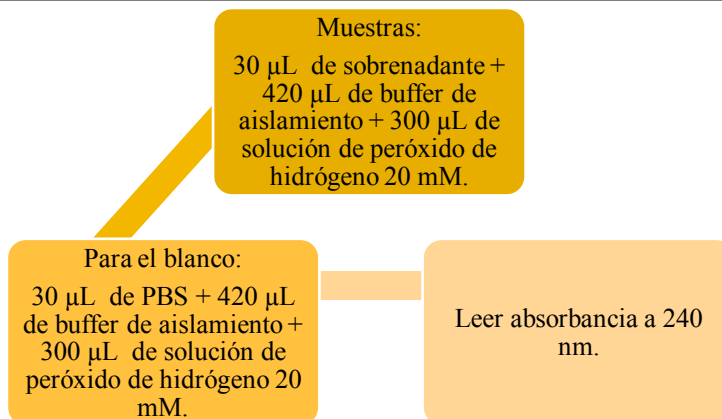
Superóxido dismutasa

Misra y Fridovich, 1972



Catalasa

Radi *et al.*, 1991



Proteínas totales

Bradford, 1976

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

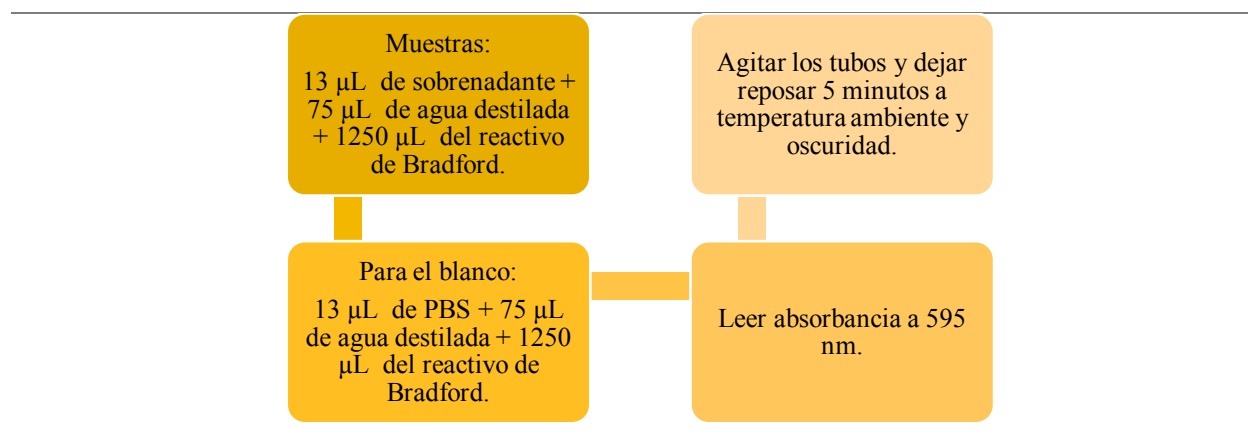


Tabla 9. Tratamiento para pruebas de estrés oxidativo.

Expresión génica

Se aisló el ARN para una media de 100 ovocitos (DE: ± 25 larvas) por concentración de SUC y el kit RNeasy® (Quiagen). Posterior al aislamiento, se determinó mediante la relación 260 / 280 y electroforesis, la concentración y pureza del ARN. Después, para la transcripción inversa, utilizamos 1 μg del ARN total y el kit para transcripción inversa QuantiTect® (QIAGEN, Hilden, Alemania, REF 205313) a 42°C (15 minutos) y 95°C (3 minutos).

La PCR en tiempo real (qRT-PCR) se realizó con un Rotor-Gene Q (Qiagen) a 94°C (15 s), seguido de 35 ciclos de 94°C (15 s), 60°C (30 s) y 72°C (30 s). Cada una de las reacciones se hizo en una solución de 50 μL que contenía 0.3 μmol de cebadores, 25 μL 2X SYBER Green QuantiTec® (QIAGEN, Hilden, Alemania) y 500 ng de plantilla de ADNc.

Los genes utilizados para llevar a cabo la QRT-PCR, se seleccionaron porque tienen relación con la respuesta de EO y la apoptosis celular (Tabla 10). Además, la B-actina cumplió su papel de gen de limpieza para normalizar las muestras. Al igual que en las pruebas anteriores, analizamos tres muestras diferentes por concentración de SUC y cada muestra fue analizada por triplicado. Por esta razón, obtuvimos nueve resultados por gen que fueron utilizados para hacer los gráficos y análisis estadísticos correspondientes ($n = 9$).

Gen	Imprimación delantera	Imprimación inversa	Referencia
Nrf1	TTT GGT TCC CGA TGA AGA CG	TGA TTA GCG TGA GAC TGA GC	Sant <i>et al.</i> , 2017
Nrf2	ACC CAA TAG ATC TAC AGA GC	GGT GTT TGG ACA TCA TCT CG	Sant <i>et al.</i> , 2017

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

CASP3	CCG CTG CCC ATC ACTO A	ATC CTT TCA CGA CCA TCT	Félix <i>et al.</i> , 2018
CASP9	CGG AGG TGA GAA GGA TAT	TCC AGC ACA CGA TCA AGA TT	Jiang <i>et al.</i> , 2014

Tabla 10. Genes utilizados para la qRT-PCR.

Cuantificación de sucralosa

El muestreo se realizó siguiendo la metodología de Elizalde-Velázquez *et al.*, 2021, 2022. Es decir, para el experimento de embriotoxicidad se recolectaron 140 µL de agua de cada uno de los pozos (72 pozos). Por lo que obtuvimos 10 mL de agua para cada concentración de SUC. Para la parte de EO, se recolectaron 10 ml de agua de cada uno de los 7 sistemas de SUC. Con base al método de Saucedo- Vence *et al.*, 2017, realizamos la extracción de SUC a partir de muestras de agua. Para iniciar, acidificamos 10 mL de agua con HCl 1M. Después, realizamos la extracción de SUC de 1 mL de agua acidificada con 5 mL de metanol (1:1). Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 1800 x g durante 10 minutos y la capa orgánica se utilizó para la cuantificación de SUC.

La cuantificación de SUC se realizó en un equipo Agilent 1290 Infinity HPLC acoplado a un Agilent 6430 Triple Quadrupole MS equipado con electropulverización. La separación del compuesto se llevó a cabo con una columna RRHD Eclipse Plus C18 (2.1 x 50 mm, 1.8 µm).

La fase móvil fue una mezcla de agua, ácido fórmico (pH 2.5) y acetonitrilo. El volumen de inyección para el HPLC fue de 50 µL y el caudal de 0.4 mL / min. Para el análisis, se utilizó el modo negativo con ayuda del monitoreo de Reacción Múltiple (MRM). El ESI se optimizó con condiciones específicas (Tabla 11).

Condición	
Presión del nebulizador	45 psi
Flujo de gas secado (N ₂)	11 L / min
Temperatura del gas de secado	350 °C
Voltaje capilar	4000 V

Tabla 11. Condiciones del ESI negativo para SUC.

La precisión del método propuesto para la cuantificación de SUC se confirmó mediante el procedimiento de control de aumento donde se utilizó una mezcla ultrapura de agua-metanol (50% - 50%) con SUC a 3 niveles (80%, 100% y 120%). Las muestras se evaluaron tres veces.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Análisis estadístico

Todos los datos experimentales se expresaron como la media \pm desviación estándar (DE). Se utilizó la prueba de Student- Newman- Keuls para establecer las diferencias significativas entre las medias. También, se realizó una prueba de ANOVA de una vía en el software SigmaPlote 12.3 con intervalos de confianza del 95% para determinar la diferencia significativa entre las concentraciones. Mediante la prueba de Shapiro- Wilk se evaluó la normalidad. Finalmente, usando el software R, se realizó un análisis de componentes principales ($p < 0,05$) para correlacionar todas las variables involucradas en el estudio.

Segunda parte experimental: Efectos tóxicos inducidos por SUC, ACE-K y sus mezclas en adultos de *Danio rerio*.

Exposición de adultos de *Danio rerio*

Se tuvieron 16 sistemas de 30 L de capacidad durante cuatro meses de exposición. Cada sistema contenía 10 machos y 10 hembras. Cada sistema fue asignado a una concentración diferente y al control (Tabla 12). El agua se renovó cada 2 días y se verificó que la temperatura (27 ± 1 °C) y los ciclos de luz/oscuridad (14 h:10 h) fueran constantes a lo largo de la exposición.

Tratamientos	Concentraciones ($\mu\text{g} / \text{L}$)
SUC 1	50
SUC 2	75
SUC 3	125
ACE-K 1	50
ACE-K 2	75
ACE-K 3	125
M1 (SUC + ACE-K)	50 + 50
M2 (SUC + ACE-K)	50 + 75
M3 (SUC + ACE-K)	50 + 125
M4 (SUC + ACE-K)	75 + 50
M5 (SUC + ACE-K)	75 + 75
M6 (SUC + ACE-K)	75 + 125
M7 (SUC + ACE-K)	125 + 50
M8 (SUC + ACE-K)	125 + 75
M9 (SUC + ACE-K)	125 + 125

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Tabla 12. Concentraciones de SUC, ACE-K y sus mezclas evaluadas en Danio rerio.

Prueba de Novel Tank (tanque novedoso)

Para realizar la prueba de Novel Tank, utilizamos la mitad de los peces hembras y machos expuestos (relación 1:1). Después, se mantuvieron los organismos en la sala de comportamiento durante 50 minutos para conseguir su aclimatación. El acuario de comportamiento tiene la misma característica que el acuario de exposición, es decir, una temperatura de 27 ± 1 °C. Sin embargo, difieren entre sí porque el acuario de comportamiento está aislado de sonido y tampoco permite el paso de la luz. Posteriormente, colocamos un pez en un tanque rectangular novedoso de 15 L de capacidad (21.2 cm x 21.2 cm x 25.2 cm) durante un periodo de 12 minutos. Dos minutos fueron de aclimatación para el organismo mientras que el tiempo restante fue para llevar a cabo la prueba. Los tanques cumplieron con los parámetros del agua (Tabla 7) y no contenían ninguno de los dos edulcorantes.

De los diez minutos de prueba, obtuvimos un video que posteriormente fue analizado con el software Ethovision XT 13.0. El software evaluó la distancia recorrida en la parte superior e inferior (cm), el tiempo pasado en la parte superior e inferior (s), la distancia total recorrida (cm) y el tiempo que los peces permanecieron congelados en la parte superior e inferior (s). La prueba de Novel Tank se llevó a cabo diversos días por la mañana para evitar alteraciones del comportamiento de los organismos durante la grabación de los videos. La prueba se llevó a cabo por triplicado y calculamos la media de los valores obtenidos para generar gráficos de barras ($n = 3$).

Prueba Dark and Light (oscuridad/luz)

La mitad restante de adultos hembra y macho de cebra (relación 1:1) se utilizó para realizar la prueba de oscuridad/ luz. A diferencia de la prueba de comportamiento anterior, hicimos uso de tanques de acrílico (15 cm x 10 cm x 45 cm) que fueron divididos en dos partes iguales, una mitad correspondía a la parte negra y la otra mitad a la parte blanca.

El material con el que fueron recubiertos los tanques de acrílico era antirreflejante para evitar alteraciones en el comportamiento de los organismos durante el tiempo de la prueba. Además, al igual que en la prueba del tanque novedoso, los tanques cumplieron con los parámetros del agua (Tabla 7) y estaban libres de SUC y ACE-K.

Para la prueba obtuvimos cintas de video de seis minutos. Iniciamos colocando un pez a la vez en el tanque de acrílico durante nueve minutos. Tres minutos correspondieron al tiempo de aclimatación y los seis minutos restantes eran de la prueba. Los puntos que se consideraron para evaluar el comportamiento en esta

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

prueba fueron el tiempo de permanencia en el área blanca y negra, así como, el número de episodios donde el organismo se mantuvo congelado. Posteriormente, haciendo uso del software Ethovision XT 13.0, analizamos cada uno de los videos. Obtuvimos tres resultados diferentes de tres experimentos independientes, calculamos su media y los representamos en gráficos de barras.

Determinación de acetilcolinesterasa

Una vez finalizadas las pruebas de comportamiento, mediante el método de choque hipotérmico (Underwood y Anthony, 2020) sacrificamos a los organismos. Después, extrajimos el cerebro de cada pez y los almacenamos en tubos de Eppendorf que contenía un 1 mL de PBS pH 7.4. Para cada tratamiento recolectamos 14 cerebros que fueron homogeneizados con un rotor- estator (Ultra- turrax T25, IKA, Alemania) durante 30 segundos. Posteriormente, llevamos a cabo la evaluación de la actividad de AChE, tratando las muestras como Elizalde- Velázquez *et al.*, 2022 describió (Figura 5). La prueba de AChE se llevó a cabo por triplicado en experimentos diferentes (n = 9).

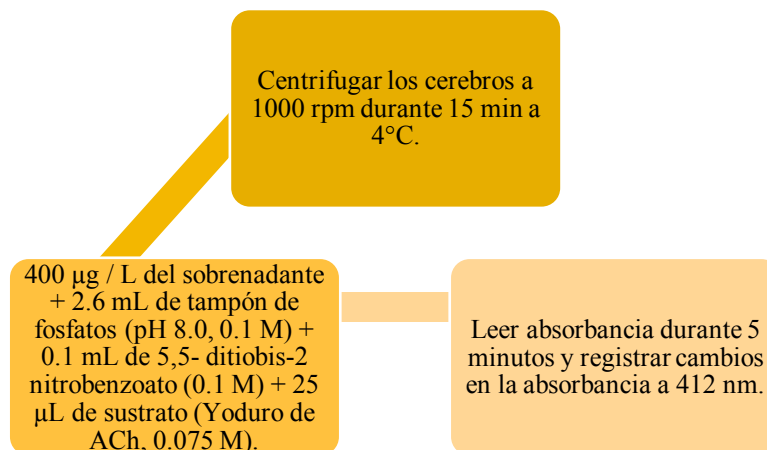


Figura 5. Método experimental para AChE.

Pruebas de estrés oxidativo

Las muestras se trataron con base en el protocolo descrito por Elizalde- Velázquez *et al.*, 2021. Dividimos el homogeneizado obtenido de cada una de las muestras en dos tubos de Eppendorf (Figura 6). El tubo 1 fue utilizado para evaluar los biomarcadores de EO, PCC (Levine *et al.*, 1994), LPX (Buege y Aust, 1978) e HPX (Jiang *et al.*, 1992). Mientras que el tubo 2 fue necesario para la actividad de SOD (Misra y Fridovich, 1972) y CAT (Radi *et al.*, 1991).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Tubo 1	Tubo 2
<ul style="list-style-type: none"> • 300 μL de homogeneizado + 300 μL ácido tricloroacético al 20%. • Centrifugar a 11495 rpm a 4° C por 15 minutos. • Se utilizará para: <ul style="list-style-type: none"> • Proteínas carboniladas (Precipitado). • Lipoperoxidación y contenido de hidroperóxidos (Sobrenadante). 	<ul style="list-style-type: none"> • 700 μL de homogeneizado. • Centrifugar a 12500 rpm a 4° C. • Pruebas para las que se utiliza: <ul style="list-style-type: none"> • Actividad de superóxido dismutasa, catalasa y proteínas totales.

Figura 6. Características del tratamiento del homogeneizado.

Los resultados los normalizamos con el contenido de proteínas totales (Bradford, 1976). El procedimiento para cada biomarcador se describe en la Tabla 13. Además, las muestras fueron evaluadas por triplicado de tres experimentos diferentes por lo que obtuvimos nueve resultados (n = 9).

	Biomarcador	Contenido	Reactivos	Longitud de onda
Tubo 1	Proteínas carboniladas (Levine <i>et al.</i> , 1994)	Precipitado	150 μ L de (DNPH)/ HCl 10 mM.	366 nm
		*El blanco debe de llevar el mismo tratamiento de la muestra.	500 μ L de ATC al 20%.	
			1 mL de Guanidina 6M.	
	Lipoperoxidación (Buege y Aust, 1979)	50 μ L de sobrenadante	450 μ L de solución Tris- HCl 150 mM.	535 nm
		*El blanco debe de llevar el mismo tratamiento de la muestra.	Solución TCA- TBA.	
	Hidroperóxidos (Jiang <i>et al.</i> , 1992)	100 μ L de sobrenadante.	900 μ L de la mezcla de reacción (FeSO ₄ , H ₂ SO ₄ , butilato de dehidroxitolueno y naranja xilenol).	560 nm
		*El blanco debe de llevar el mismo tratamiento de la muestra.		
Tubo 2	Superóxido dismutasa (Misra	40 μ L de sobrenadante.	260 μ L de buffer de carbonatos.	480 nm

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

y Fridovich, 1972)	*El blanco debe de llevar el mismo tratamiento de la muestra.	200 µL de adrenalina 30 mM.	
Catalasa (Radi <i>et al.</i> , 1991)	30 µL de sobrenadante. *El blanco debe de llevar el mismo tratamiento de la muestra.	420 µL de buffer de aislamiento. 300 µL de solución de peróxido de hidrógeno 20 mM.	240 nm.
Proteínas carboniladas (Bradford, 1976)	13 µL de sobrenadante. *El blanco debe de llevar el mismo tratamiento de la muestra.	75 µL de agua destilada. 1250 µL del reactivo de Bradford.	595 nm

Tabla 13. Métodos de los biomarcadores de estrés oxidativo.

Cuantificación de sucralosa y acesulfame-k

Para llevar a cabo la cuantificación de SUC y ACE-K, utilizamos seis cerebros por grupo. Los cerebros se homogeneizaron en 4 mL de metanol- agua (relación 1:1) y se centrifugaron a 2500 revoluciones durante cinco minutos. Utilizamos un HPLC- MS/MS para examinar la capa superior a detalle. Además, para la determinación de compuestos utilizamos un HPLC Agilent 1290 Infinity acoplado a un Agilent 6430 Triple Quadruple MS equipado con electropulverización. Con la columna RRHD Eclipse Plus C18 (2.1 x 50 mm, 1.8 µm) logramos la separación para ambos casos.

Para el ACE-K usamos agua ultrapura y acetonitrilo con acetato de amonio (5 mM) y TRIS (1 mM) como fase móvil. Por otra parte, para la cuantificación de SUC utilizamos agua con ácido fórmico (pH 2.5) y acetonitrilo. El volumen de inyección fue de 30 µL y el caudal fue de 0.4 mL / min. Para probar los dos compuestos, ajustamos el ESI negativo con parámetros específicos (Tabla 14). Cada muestra se evaluó tres veces.

Condición	
Presión del nebulizador	45 psi
Flujo de gas de secado	11 L /min N ₂
Temperatura del gas de secado	350 °C

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Voltaje capilar	400 V
------------------------	-------

Tabla 14. Condiciones del ESI negativo para SUC y ACE-K.

Análisis estadístico

Utilizando las pruebas de Bartlett y Shapiro-Wilk, evaluamos la homocedasticidad y la normalidad de los datos, respectivamente. También, mediante la prueba de Student Newman Keuls ($p < 0,05$) y un ANOVA de una vía ($\alpha = 0,05$), identificamos las diferencias significativas en los grupos de tratamiento y en las medias.

Con ayuda del software SigmaPlot 12.3 se evaluaron todos los datos expresados como la media \pm la desviación estándar (DE). Finalmente, normalizamos los resultados para las gráficas de respuesta y correlación determinando la respuesta relativa de los biomarcadores en función del valor control.

RESULTADOS

Primera parte experimental: Efectos tóxicos inducidos por SUC en las primeras etapas de vida de *Danio rerio*.

Embriotoxicidad

La mortalidad ($F(6,14) = 322,784$, $p < 0,001$) y las tasas de malformación ($F(6,14) = 217,806$, $p < 0,001$) mostraron una tendencia creciente dependiente de la concentración después de 96 horas de exposición con SUC (Figura 7 y 8). Como resultado, la concentración más elevada de SUC ($116.5 \mu\text{g} / \text{L}$) se asoció con la mayor cantidad de embriones muertos (58%) y malformados. Además, observamos variaciones significativas entre los grupos de tratamiento con respecto al grupo de control. Finalmente, se calcularon LC50 y EC50 de malformaciones dando valores de $123.15 \text{ g} / \text{L}$ y $4.88 \text{ g} / \text{L}$, respectivamente.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

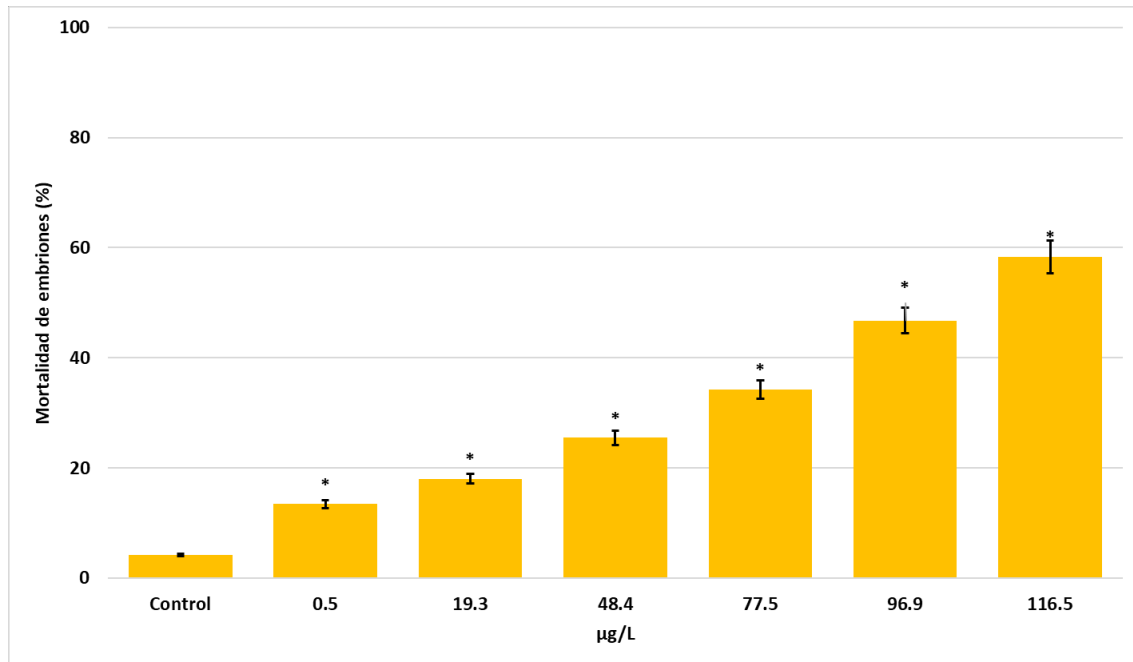
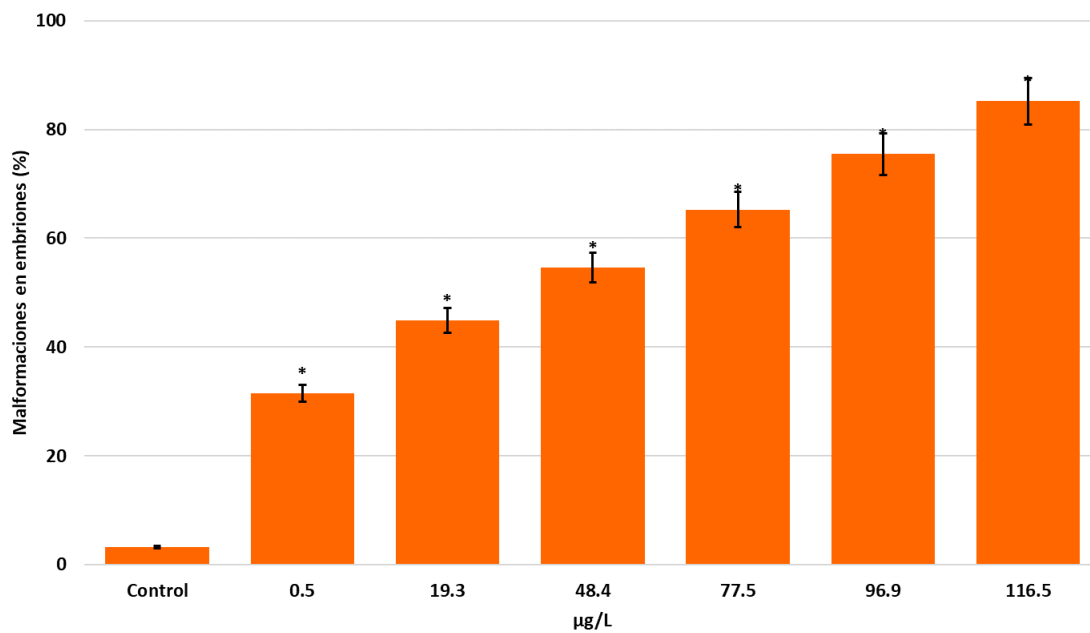


Figura 7. Mortalidad en embriones de *Danio rerio* expuestos a seis concentraciones diferentes de SUC.

Nota: Datos representados de la media \pm desviación estándar (n = 3). * indica un cambio significativo en comparación con el control.



Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Figura 8. Malformaciones en larvas de *Danio rerio* expuestos a diversas concentraciones de SUC.

Nota: Datos representados de la media \pm desviación estándar (DE) (n = 3). * indica un cambio significativo en comparación con el control.

Efectos teratogénicos

A las 96 hpf, notamos hipopigmentación en tres embriones del grupo de control. Sin embargo, los peces de los tratamientos con SUC exhibieron más deformidades, las cuales fueron más graves que los grupos de control. Las anomalías embrionarias generadas por la SUC incluyeron deformidades de la cola, edema pericárdico, malformaciones craneoencefálicas, deformidad en el saco vitelino, enanismo, ausencia de ojos y/o aletas, escoliosis, hipopigmentación y retraso en la eclosión (Figura 9 y 10).

Cabe señalar que la gravedad de las anomalías y la proporción de las malformaciones por embrión aumentaron a medida que la concentración de SUC aumentaba (Tabla 15). Por lo tanto, en comparación con otras concentraciones de SUC, observamos una mayor incidencia de escoliosis, deformidad del saco vitelino, edema pericárdico y malformación craneofacial en embriones con una concentración de SUC de 116.5 $\mu\text{g/L}$.

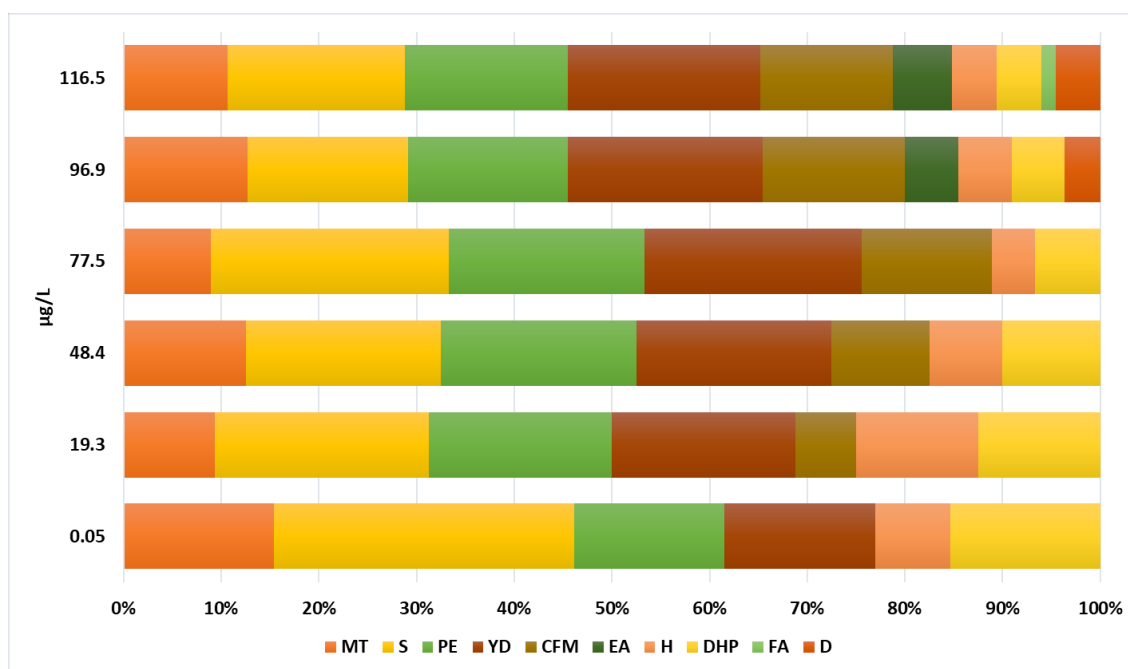


Figura 9. Incidencia de malformaciones inducidas por SUC en embriones de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) (n = 3). MT: malformación de la cola. S: escoliosis. PE: edema pericárdico. YD: deformación del saco vitelino. CFM: malformación craneofacial.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

EA: ausencia ocular. H: hipopigmentación. DHP: retraso en el proceso de eclosión. FA: ausencia de aletas. D: enanismo.

Concentración de SUC (µg / L)	Índice de malformaciones										
	MT	S	PE	YD	CFM	LE	H	DFH	LF	D	T
Control	0/72	1/72	0/72	0/72	0/72	0/72	3/72	0/72	0/72	0/72	4/72
0.05	4/72	7/72	4/72	4/72	0/72	0/72	2/72	4/72	0/72	0/72	26/72
19.3	3/72	8/72	6/72	6/72	2/72	0/72	4/72	4/72	0/72	0/72	32/72
48.4	5/72	8/72	8/72	8/72	4/72	0/72	3/72	4/72	0/72	0/72	40/72
77.5	4/72	11/72	9/72	10/72	6/72	0/72	2/72	3/72	0/72	0/72	45/72
96.9	7/72	9/72	9/72	11/72	8/72	3/72	3/72	3/72	0/72	2/72	55/72
116.5	7/72	12/72	11/72	13/72	9/72	4/72	3/72	3/72	1/72	3/72	66/72
Total	72 embriones analizados										

*Tabla 15. Principales malformaciones inducidas por SUC en embriones de *Danio rerio*.*

Nota: MT: Los datos representan el número de embriones malformados en placas de 24 pocillos (n = 3).
 MT: malformación de la cola. S: escoliosis. PE: edema pericárdico. YD: deformación del saco vitelino.
 CFM: malformación craneofacial. EA: ausencia ocular. H: hipopigmentación. DHP: retraso en el proceso
 de eclosión. FA: ausencia de aletas. D: enanismo.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

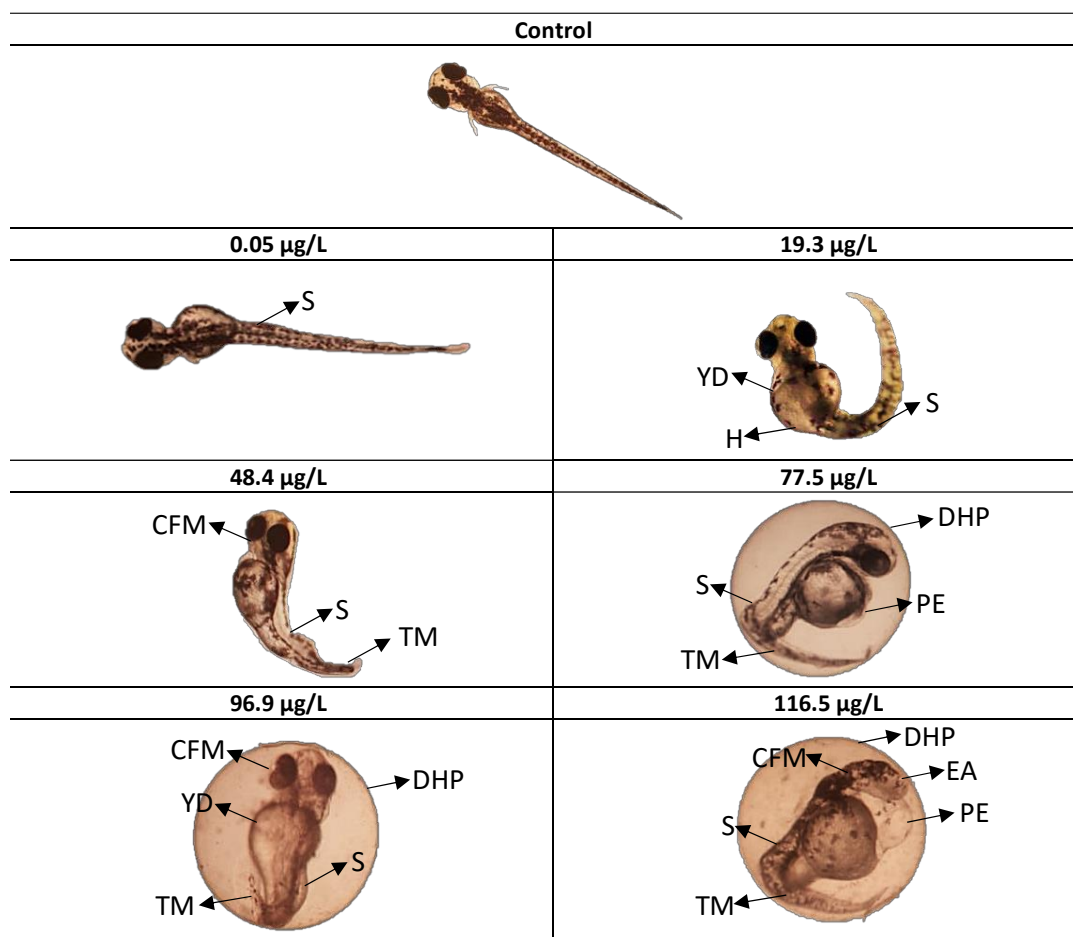


Figura 10. Principales malformaciones inducidas por SUC en embriones de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) (n = 3). MT: malformación de la cola. S: escoliosis. PE: edema pericárdico. YD: deformación del saco vitelino. CFM: malformación craneofacial. EA: ausencia ocular. H: hipopigmentación. DHP: retraso del proceso de eclosión. FA: ausencia de aletas.

Estrés oxidativo

Al igual que con las tasas de mortalidad y deformación, observamos un aumento dependiente de la concentración en los biomarcadores de daño oxidativo y las enzimas antioxidantes (Figura 11 - 20). Sin embargo, se debe de tener en cuenta que la actividad de SOD (Figura 11 y 12) ($F(6,56) = 890.416, p < 0.001$) y CAT (Figura 13 y 14) ($F(6,56) = 1009.612, p < 0.001$) no aumentó tanto como el contenido de HPX (Figura 15 y 16) ($F(6,56) = 1979.350, p < 0.001$), PCC (Figura 17 y 18) ($F(6,56) = 366.539, p < 0.001$) y la LPX (Figura 19 y 20) ($F(6,56) = 1538.233, p < 0.001$). Por ejemplo, en el caso de las enzimas antioxidantes (SOD y CAT), se observó que los valores de los tratamientos con SUC casi no superaban a

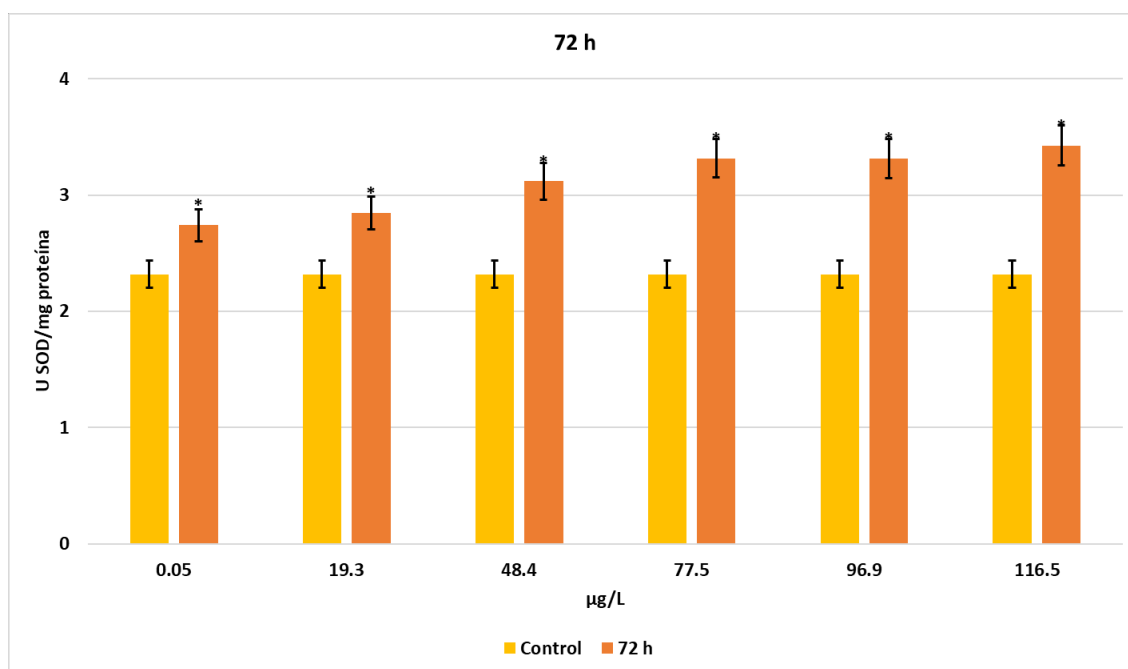
Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

los del grupo de control. En comparación con los controles, los niveles de LPX, PCC y HPX en los peces expuestos a SUC fueron cuatro veces más altos. Como resultado, creemos que SOD y CAT no pueden revertir el daño oxidativo provocado por SUC. Todos los biomarcadores fueron significativamente diferentes entre los grupos de tratamiento, incluido el grupo de control. Además, en términos de tiempo de exposición, descubrimos que todos los valores de los biomarcadores aumentaron a 96 hpf en comparación con los valores observados a 72 hpf. Por lo tanto, para todos los biomarcadores excepto LPX y PCC en concentraciones de 96.9 y 116.5 $\mu\text{g/L}$, encontramos diferencias estadísticamente significativas en los tiempos de exposición y las concentraciones.

Superóxido dismutasa

La actividad de SOD mostró un incremento dependiente de la concentración para las 72 hpf y 96 hpf. Además, existieron diferencias significativas para cada uno de los tratamientos con SUC con respecto al grupo de control.

En las 72 hpf (Figura 11), la actividad de SOD más alta (3.42 U SOD/mg proteína) se obtuvo en la concentración de 116.5 $\mu\text{g/L}$. Además, a las 96 hpf (Figura 12) se obtuvo una actividad de 3.55 U SOD / mg proteína. Lo anterior respalda, que a las 96 hpf la actividad de la enzima fue mayor que a las 72 hpf. Aunque ambas enzimas mostraron mayor actividad que el grupo de control, el aumento no fue tan elevado comparado con el de otros biomarcadores.



Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Figura 11. Actividad de SOD generada por SUC después de 72 horas de exposición en embriones de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) (n = 9). * indica una diferencia significativa en comparación con el grupo de control.

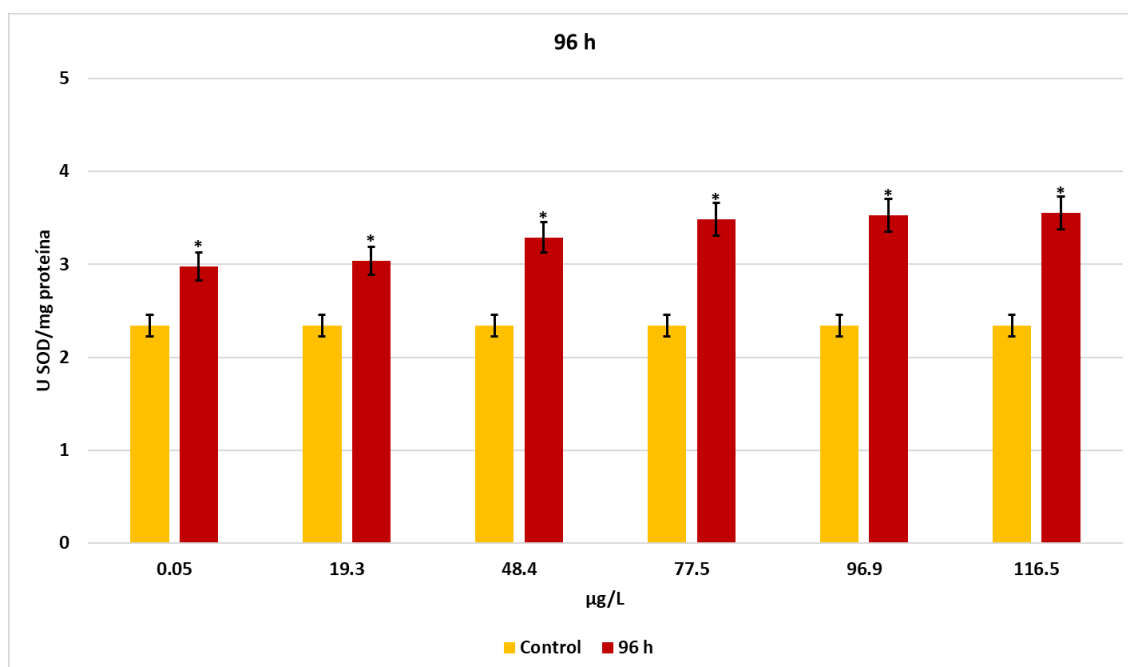


Figura 12. Actividad de SOD generada por SUC después de 96 horas de exposición en embriones de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) (n = 9). * indica una diferencia significativa en comparación con el grupo de control.

Catalasa

En la Figura 13 podemos observar la actividad de la CAT inducida por la SUC después de 72 hpf en embriones de *Danio rerio*. La actividad mostró un aumento significativo en cada uno de los tratamientos (0.05 µg / L, 19.3 µg / L, 48.4 µg / L, 77.5 µg / L, 96.9 µg / L y 116.5 µg / L) con respecto al grupo de control. El valor de CAT más alto (7298.12 µM H₂O₂/ µg proteína) se obtuvo en la concentración más elevada (116.5 µg / L) y fue poco más del doble del valor del control (3536.52 µM H₂O₂/ µg proteína). Por otra parte, a las 96 hpf (Figura 14) la CAT generó diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

de control. Además, de manera similar a las 72 hpf, en la concentración de 116.5 $\mu\text{g/L}$ se obtuvo la cantidad más alta de CAT (7845.16 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 / \mu\text{g proteína}$). La actividad de la CAT fue dependiente de la concentración a las 72 hpf y 96 hpf. Finalmente, al igual que en el comportamiento del SOD, la CAT mostró una mayor actividad a las 96 hpf.

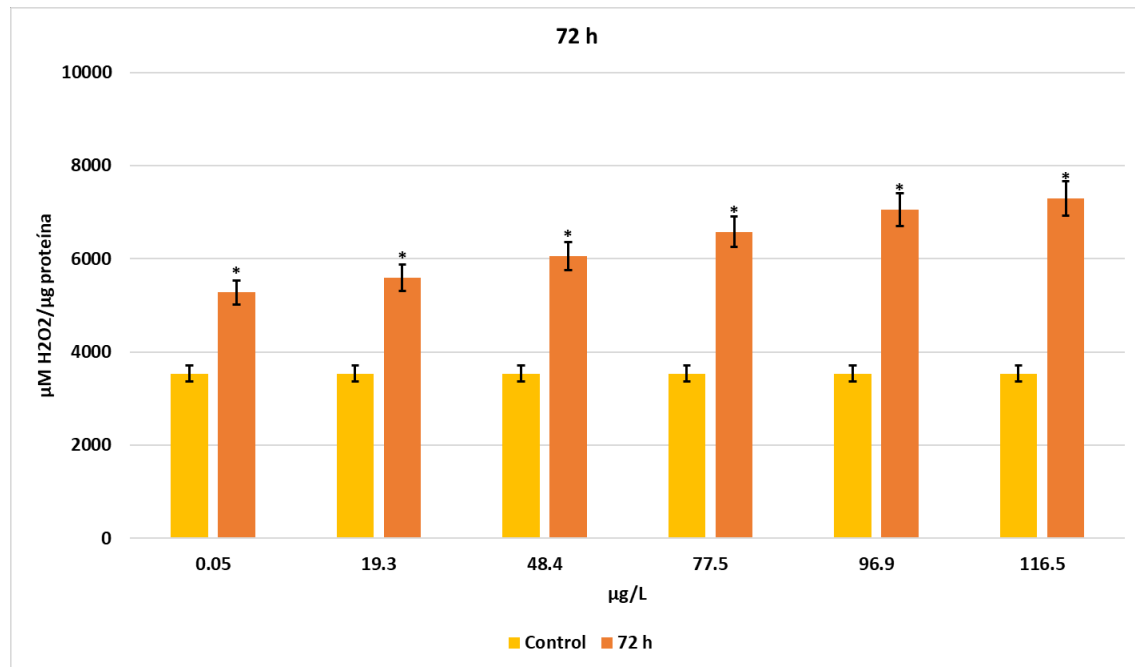


Figura 13. Actividad de la CAT inducida por SUC después de 72 horas de exposición en embriones de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) ($n = 9$). * indica una diferencia significativa en comparación con el grupo de control.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

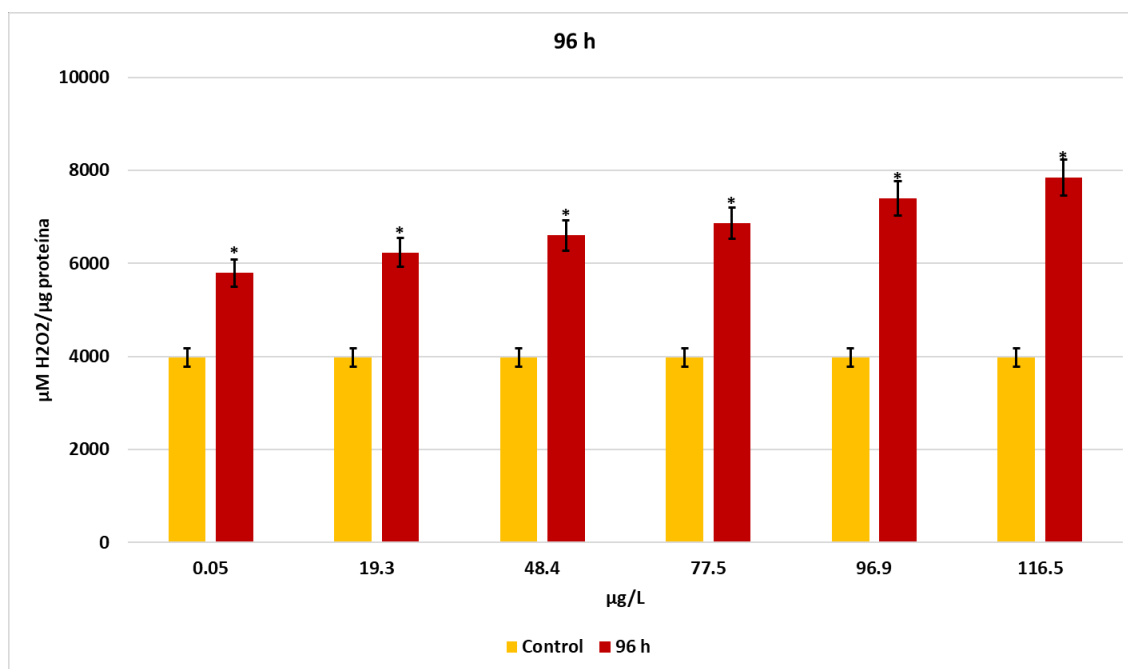


Figura 14. Actividad de la CAT inducida por SUC después de 96 horas de exposición en embriones de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) (n = 9). * indica una diferencia significativa en comparación con el grupo de control.

Hidroperóxidos

El contenido de HPX fue hasta cuatro veces mayor que el valor del grupo de control (1.72 nM de HPA / mg proteína) a las 72 hpf (Figura 15). El contenido del biomarcador aumentó dependiente de la concentración. En la concentración más baja (0.05 µg / L) la cantidad de HPX fue de 2.63 nM de HPA / mg proteína y fue aumentando en cada una de las concentraciones restantes (19.3 µg / L, 48.4 µg / L, 77.5 µg / L, 96.9 µg / L, 116.5 µg / L) dando valores de 3.39, 4.50, 5.61, 7.10 y 7.81 nM de HPA / mg proteína, respectivamente.

En la Figura 16 podemos observar que a las 96 hpf hubo grandes diferencias significativas entre los tratamientos y el grupo de control. El contenido de HPX se elevó de la misma manera que a 72 hpf, es decir, fue cuatro veces mayor que el del grupo de control. La cantidad de HPX fue dependiente de la concentración. Por esta razón, a 116.5 µg / L obtuvimos un contenido de 8.47 nM de HPA / mg proteína. Tomando en cuenta los valores obtenidos para las 72 hpf y 96 hpf, se determina que a las 96 hpf se dio un

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

mayor contenido de hidroperóxidos. Por otra parte, comparando a los HPX con las enzimas antioxidantes, podemos observar que la actividad de SOD y CAT no se elevó tanto como en este biomarcador.

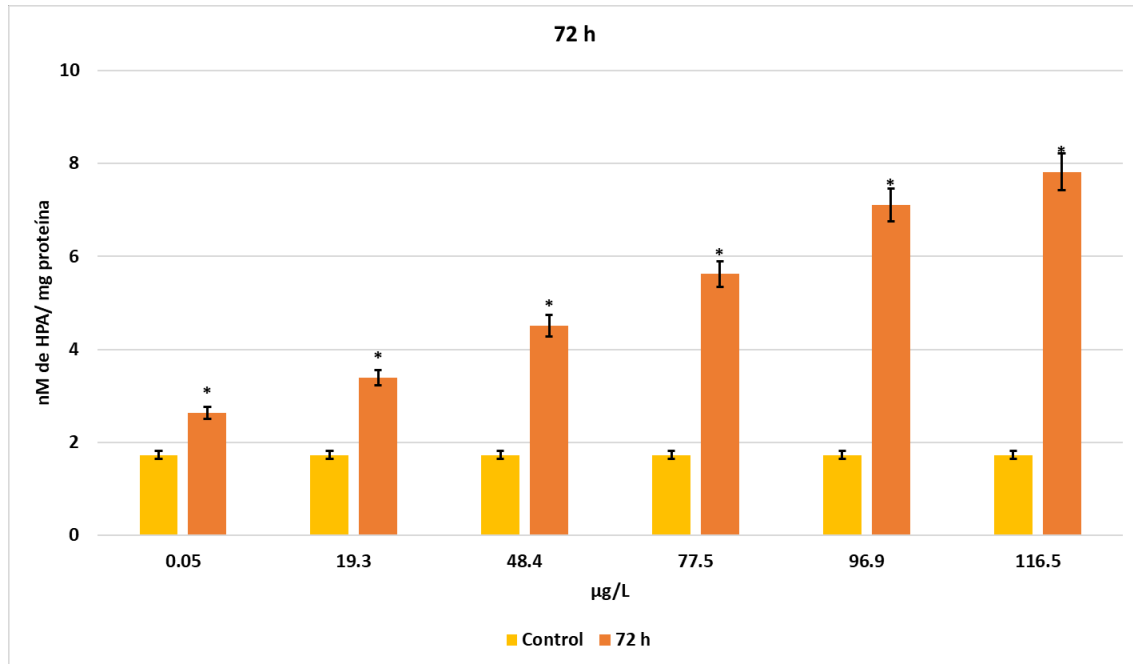


Figura 15. Contenido de HPX producido por SUC después de 72 horas de exposición en embriones de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) (n = 9). * indica una diferencia significativa en comparación con el grupo de control.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

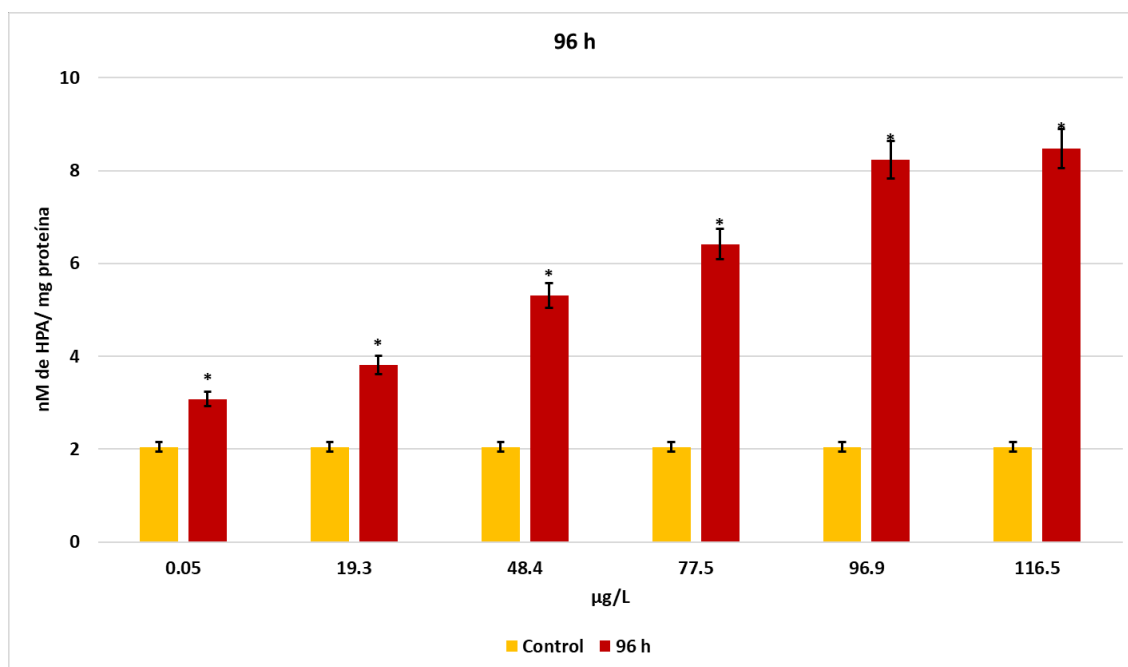


Figura 16. Contenido de HPX producido por SUC después de 96 horas de exposición en embriones de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) (n = 9). * indica una diferencia significativa en comparación con el grupo de control.

Proteínas carboniladas

El aumento de las PCC a las 72 hpf se dio dependiente de la concentración para todas las concentraciones (0.05 µg / L, 19.3 µg / L, 48.4 µg / L, 77.5 µg / L, 96.9 µg / L y 116.5 µg / L) (Figura 17). Además, se observa un incremento significativo en todos los tratamientos con respecto al grupo de control. En la concentración de 0.05 µg / L el valor de PCC obtenido fue de 1.95 nM CO / mg proteína y los datos mostraron una tendencia creciente para las demás concentraciones. Para las 72 hpf, el pico más alto fue de 2.84 nM CO / mg proteína a 116.5 µg / L mientras que para las 96 hpf fue de 2.86 nM CO / mg proteína a la misma concentración.

Por otra parte, en la Figura 18 podemos observar que a las 96 hpf también hubo una diferencia significativa de cada uno de los tratamientos (incluido el grupo de control). Además, el incremento de la cantidad de PCC fue dependiente de la concentración. La concentración más alta (116.5 µg / L) de SUC elevó a las PCC casi el doble del valor del grupo de control. A las 96 hpf, el valor de las PCC fue mayor que a las 72

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

hpf. Sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa a 96.9 $\mu\text{g/L}$ y 116.5 $\mu\text{g/L}$ en los tiempos de exposición y las concentraciones.

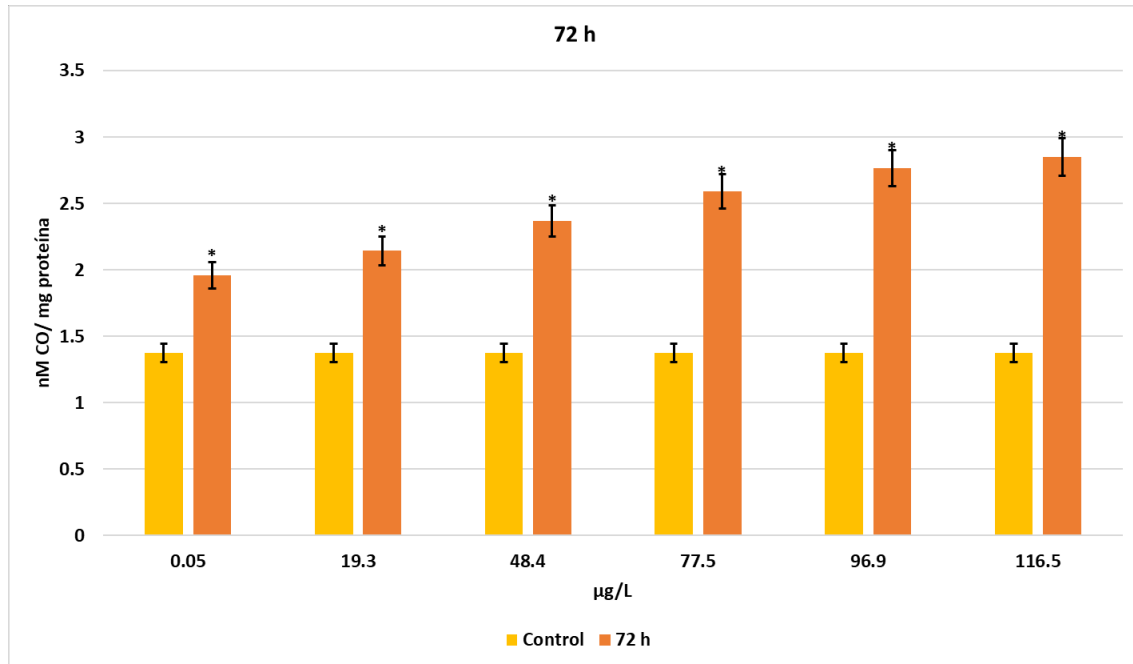


Figura 17. Contenido de PCC generado por SUC después de 72 horas de exposición en embriones de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) (n = 9). * indica una diferencia significativa en comparación con el grupo de control.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

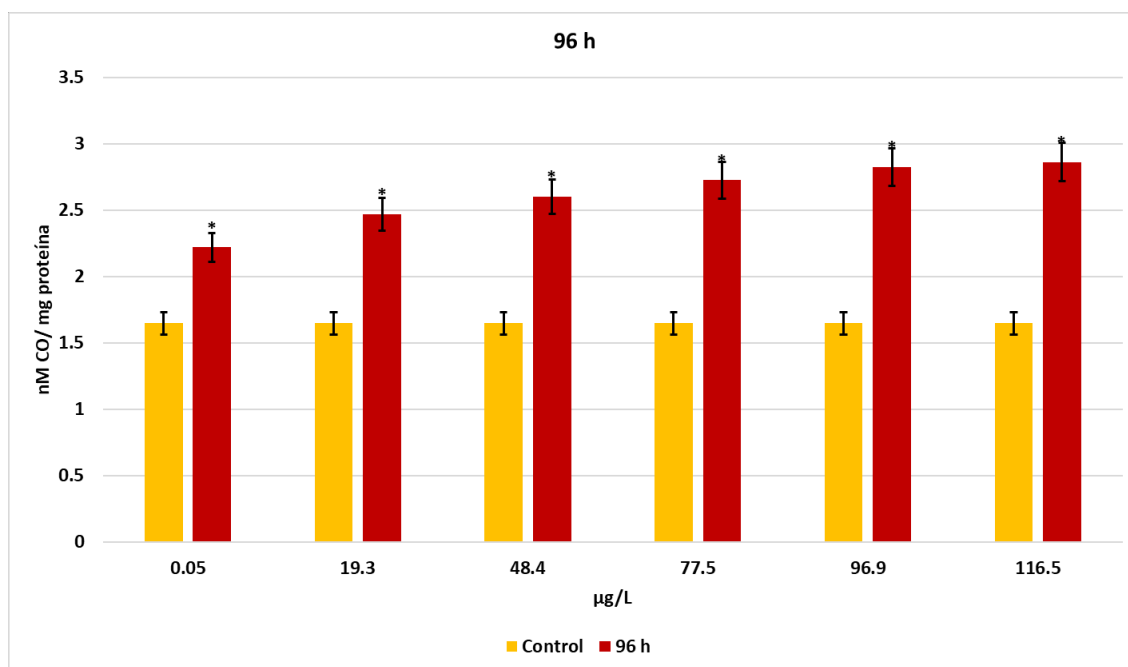


Figura 18. Contenido de PCC generado por SUC después de 96 horas de exposición en embriones de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) (n = 9). * indica una diferencia significativa en comparación con el grupo de control.

Liperoxidación

El nivel de LPX en los embriones de *Danio rerio* a las 72 hpf fue dependiente de la concentración y aumentó significativamente en cada una de las concentraciones (0.05 µg / L, 19.3 µg / L, 48.4 µg / L, 77.5 µg / L, 96.9 µg / L y 116.5 µg / L) con respecto al grupo de control (Figura 19). Comparando el valor del control (1.14×10^{-6} nM MDA / mg proteína) con el nivel más alto (2.64×10^{-6} nM MDA / mg proteína) obtenido para lipoperóxidos en la concentración de 116.5 µg / L, observamos que la cantidad de LPX aumentó poco más del doble del control. No obstante, el pico más elevado para las 96 hpf fue de 2.74×10^{-6} nM MDA / mg proteína (Figura 20). Por lo tanto, a las 96 hpf, el nivel de LPX fue mayor que a las 72 hpf. Los datos de LPX a las 96 hpf tuvieron un comportamiento similar a los valores obtenidos para las 72 hpf. A las 96 hpf observamos una diferencia significativa dependiente de la concentración en los tratamientos con respecto al grupo de control. Sin embargo, en las concentraciones de 96.9 y 116.5 µg / L no encontramos diferencias estadísticas significativas en las concentraciones y tiempo de exposición.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

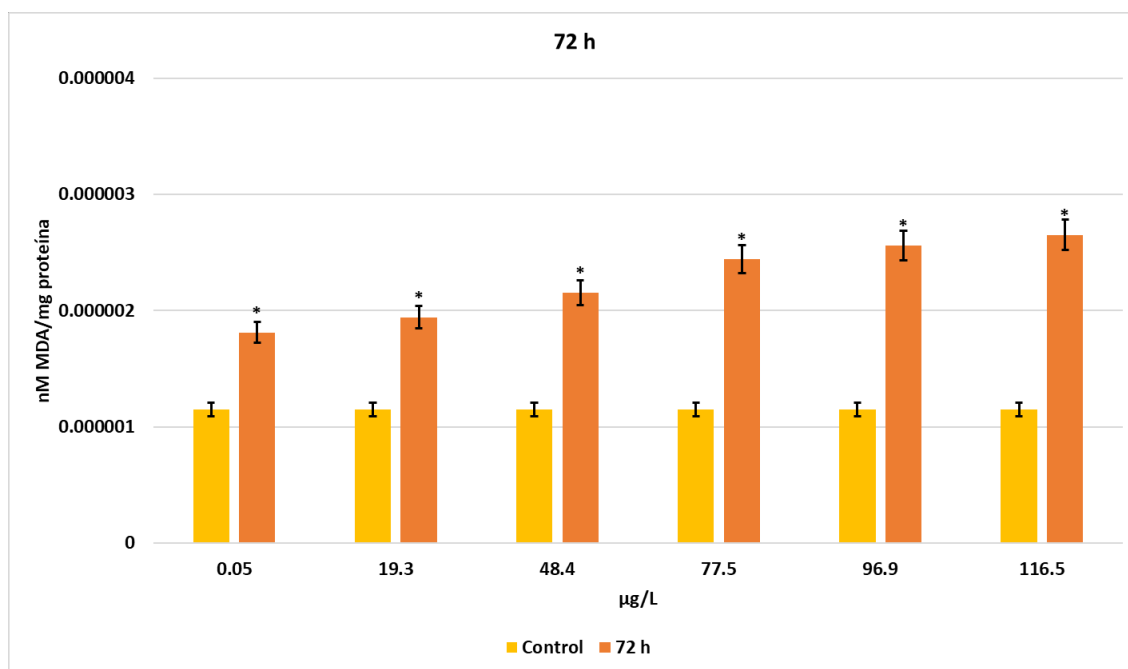
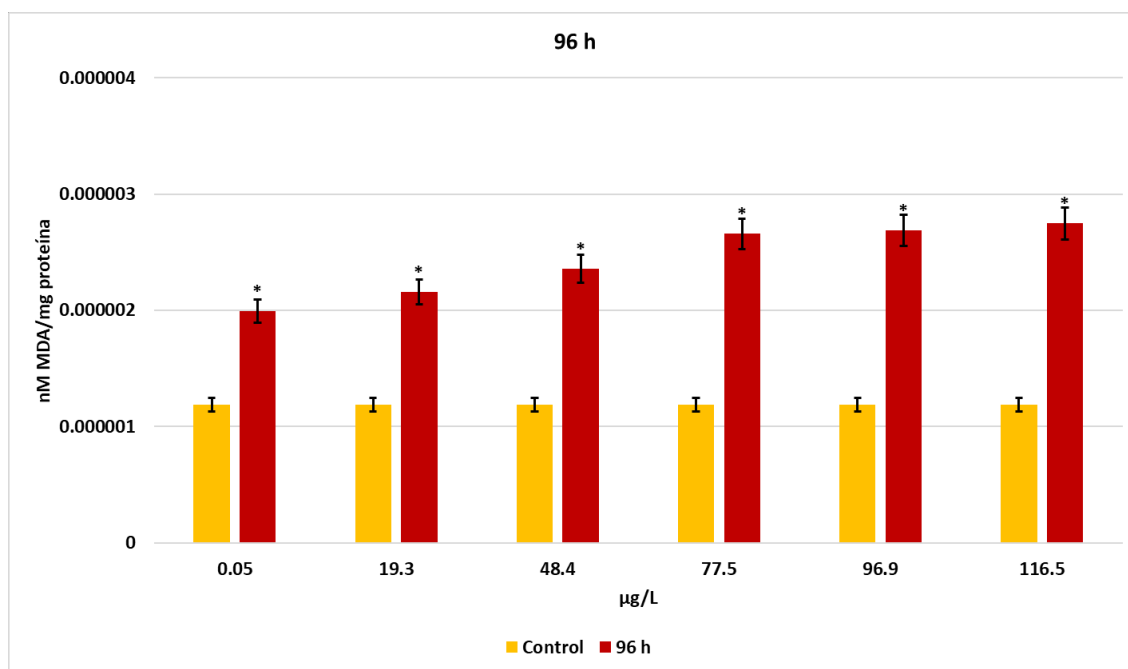


Figura 19. Lipoperoxidación inducida por SUC después de 72 horas de exposición en embriones de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) (n = 9). * indica una diferencia significativa en comparación con el grupo de control.



Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Figura 20. Lipoperoxidación inducida por SUC después de 96 horas de exposición en embriones de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) (n = 9). * indica una diferencia significativa en comparación con el grupo de control.

Expresión génica

Todos los genes utilizados para cada tratamiento con SUC tuvieron cambios significativos en comparación al grupo de control y su comportamiento fue dependiente de la concentración.

Nrf1a y *Nrf2a*

Los genes de defensa antioxidante *Nrf1a* y *Nrf2a* se elevaron de manera dependiente de la concentración y tuvieron diferencias significativas en comparación con el grupo de control (Figura 21 y 22). En la concentración más alta el gen *Nrf1a* ($F(6,56) = 895.419$, $p < 0.001$). Se expresó hasta cuatro veces más que el grupo de control, mientras que el gen *Nrf2a* ($F(6,56) = 791.134$, $p < 0.001$) se expresó poco más de cuatro veces. Por lo que observamos mayor expresión del gen *Nrf2a* que para el gen *Nrf1a*.

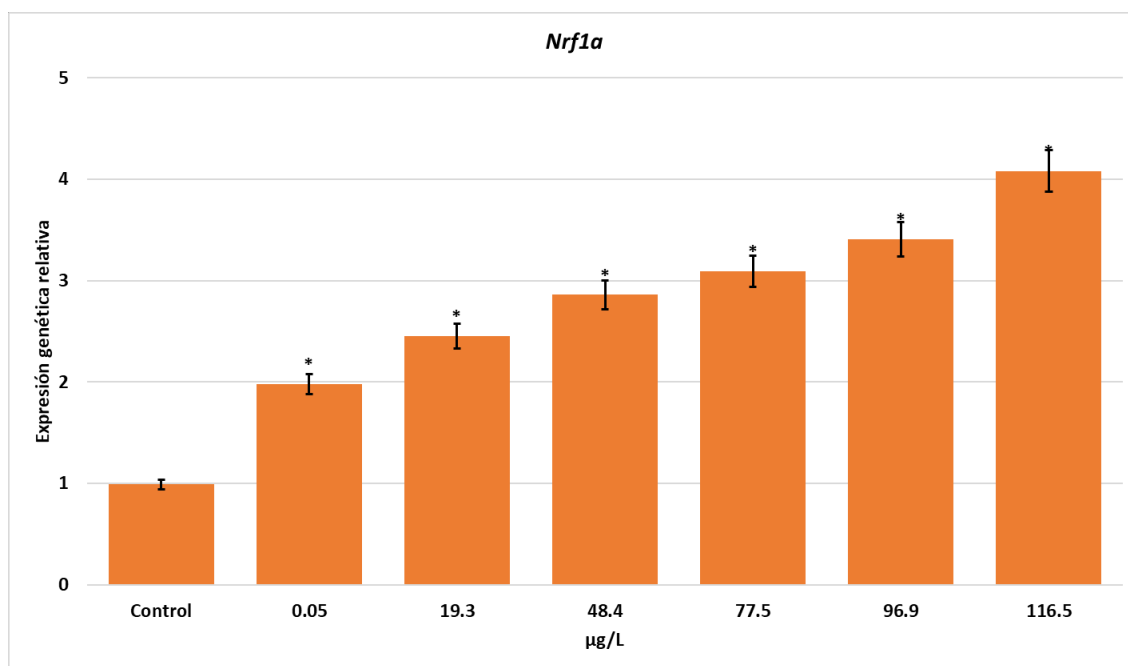


Figura 21. Expresión del gen *Nrf1a* en embriones de *Danio rerio* expuestos a SUC.

Nota: Datos representados de la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 9). * indica un cambio significativo en comparación con el control.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

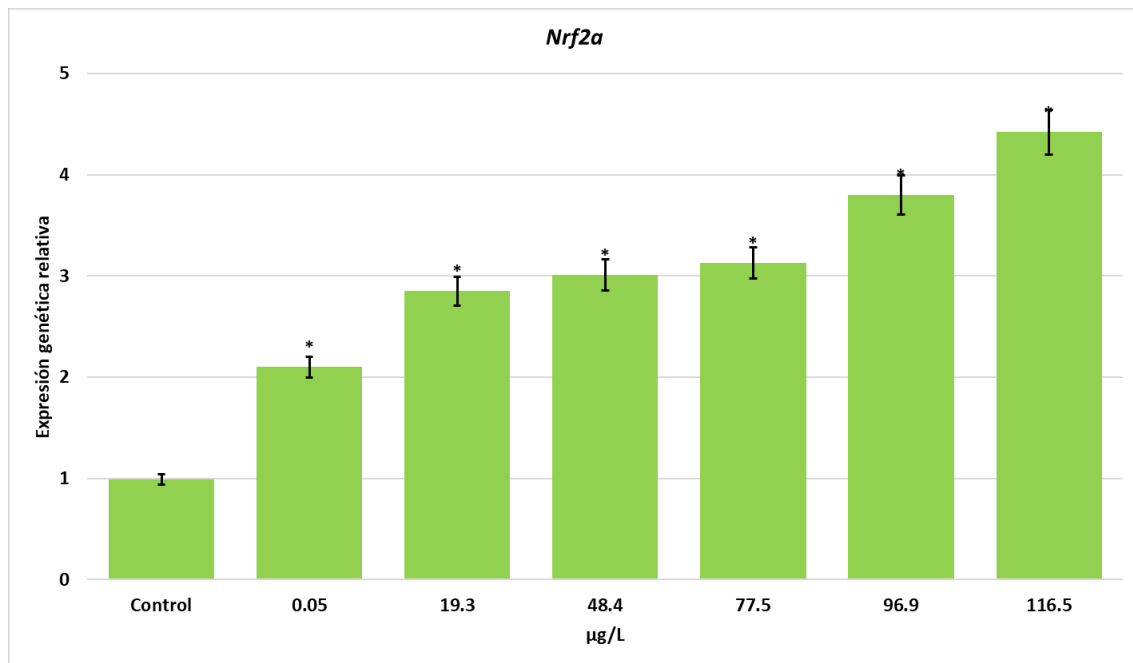


Figura 22. Expresión del gen *Nrf2a* en embriones de *Danio rerio* expuestos a SUC.

Nota: Datos representados de la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 9). * indica un cambio significativo en comparación con el control.

CASP3* y *CASP9

De forma similar a los genes de defensa antioxidante, notamos que la expresión de los genes *CASP3* y *CASP9* relacionados con la apoptosis fue significativamente mayor en los grupos de tratamiento que en el grupo de control (Figura 23 y 24). Entre estos dos genes, *CASP9* ($F(6,56) = 951.932, p < 0.001$) aumentó su expresión genética mucho más que la *CASP3* ($F(6,56) = 1013.212, p < 0.001$). Además, entre los grupos de tratamiento (incluido el grupo de control) hubo diferencias significativas en cada gen.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

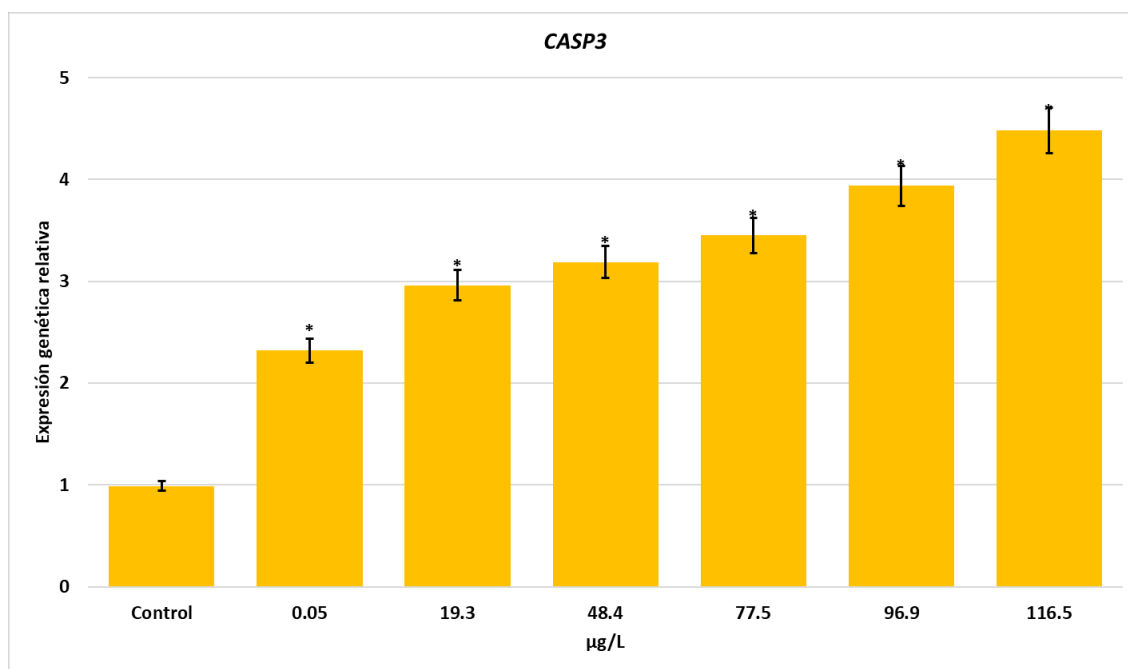
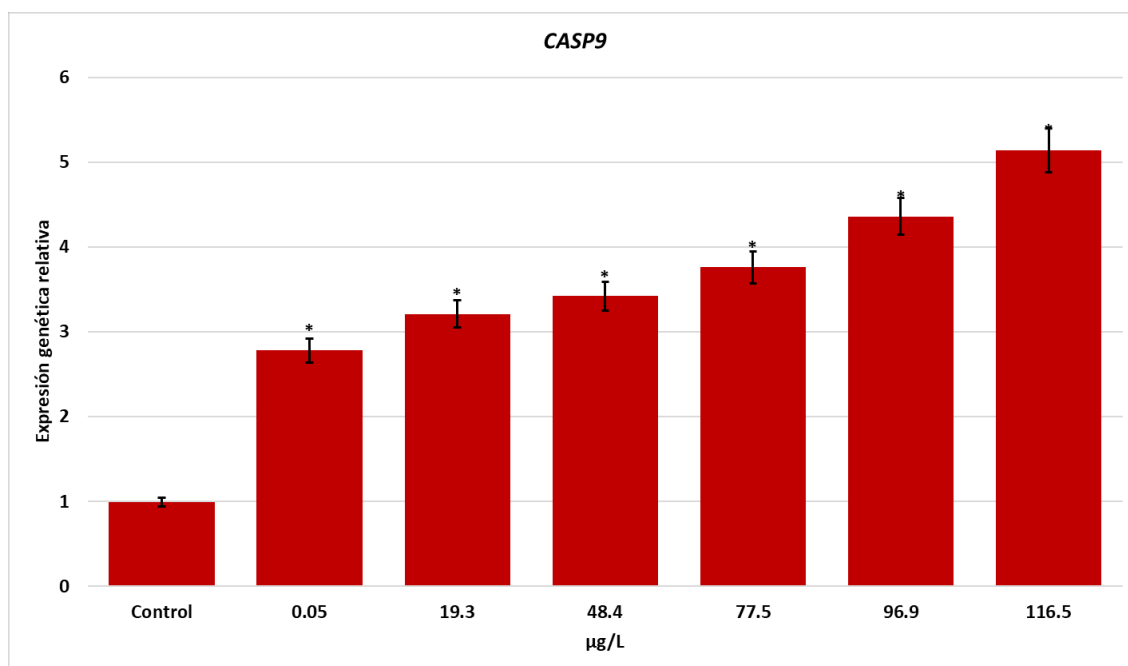


Figura 23. Expresión del gen CASP3 en embriones de *Danio rerio* expuestos a SUC.

Nota: Datos representados de la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 9). * indica un cambio significativo en comparación con el control.



Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Figura 24. Expresión del gen CASP9 en embriones de *Danio rerio* expuestos a SUC.

Nota: Datos representados de la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 9). * indica un cambio significativo en comparación con el control.

Cuantificación de sucralosa

Las concentraciones de SUC medidas en las pruebas de embriotoxicidad y EO fueron notablemente más bajas que las concentraciones nominales (Tabla 16). Además, la concentración de SUC en el grupo de control permaneció por debajo del límite de cuantificación (<LOQ) (las concentraciones de SUC no disminuyeron más del 80% de la concentración nominal). Por lo cual, cada uno de los resultados se basó en las concentraciones nominales de la SUC.

	Concentración nominal ($\mu\text{g} / \text{L}$)	Concentración medida ($\mu\text{g} / \text{L}$)
Prueba de embriotoxicidad	Control	<LOQ
	0.5	0.44 \pm 0.02
	19.3	16.98 \pm 0.54
	48.4	40.05 \pm 0.73
	77.5	63.53 \pm 1.01
	96.9	80.42 \pm 1.26
	116.5	101.35 \pm 2.05
Prueba de esfuerzo oxidativo	Control	<LOQ
	0.5	0.42 \pm 0.03
	19.3	15.98 \pm 0.76
	48.4	38.99 \pm 0.81
	77.5	62.09 \pm 0.90
	96.9	78.24 \pm 1.11
	116.5	99.67 \pm 1.93

Tabla 16. Concentraciones nominales de SUC en los tratamientos para exposición de *Danio rerio*.

Nota: LOD: límite de detección (15 ng / L). LOQ: límite de cuantificación (10 ng / L). Los datos representan los valores medios de todas las réplicas \pm desviación estándar.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Análisis de componentes principales

La aparición de embriones malformados se correlacionó positivamente con genes relacionados con la defensa antioxidante (Nrf1 y Nrf2) y la apoptosis (CASP3 y CASP9) (Figura 25). De igual forma, la actividad de SOD, CAT y todos los biomarcadores de daño oxidativo (PCC, HPX y LPX) se asociaron fuertemente con la mortalidad. Como resultado, la correlación entre todas las variables es positiva.

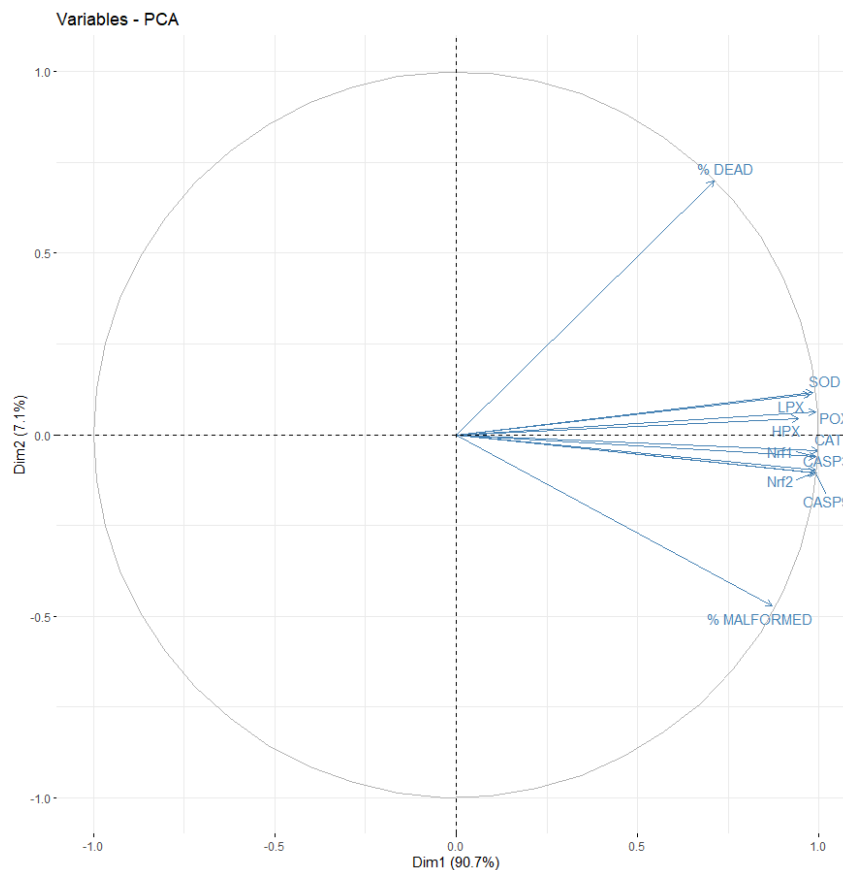


Figura 25. Análisis de Componentes Principales de biomarcadores evaluados en embriones de *Danio rerio*.

Segunda parte experimental: Efectos tóxicos inducidos por SUC, ACE-K y sus mezclas en adultos de *Danio rerio*.

Prueba de Novel Tank

La SUC y el ACE-K alteraron todos los parámetros evaluados en esta prueba (Figura 26 - 29).

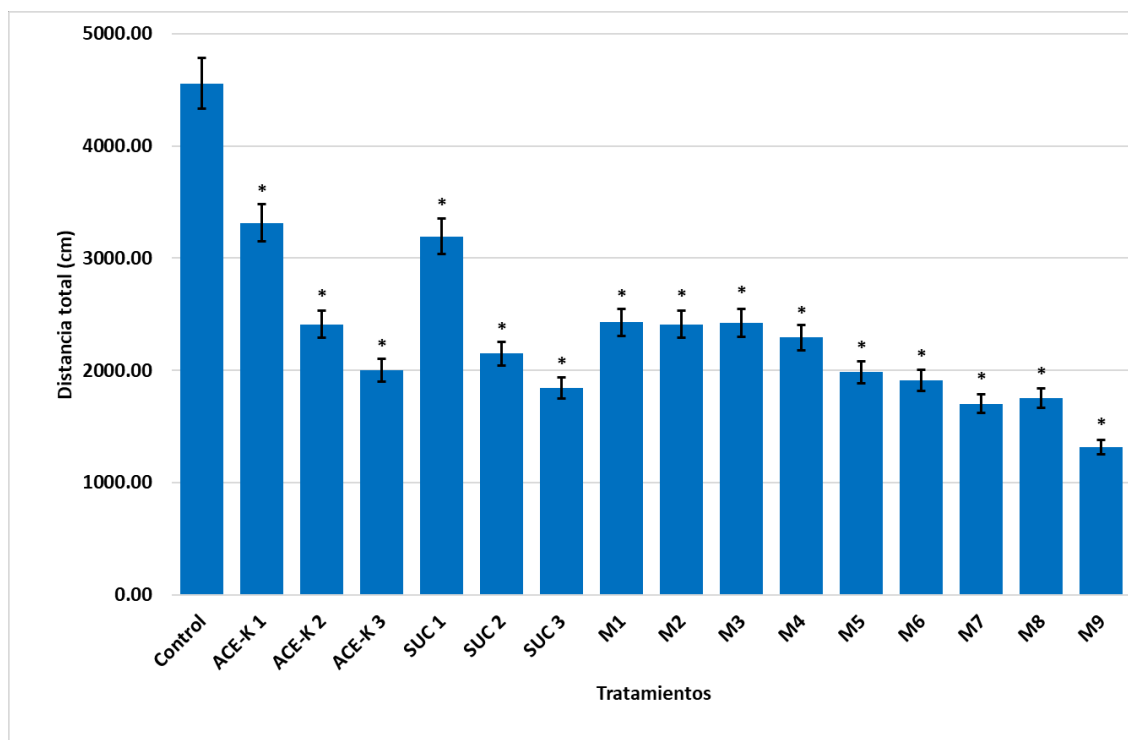
Distancia total recorrida

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Los peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas mostraron un cambio significativo en comparación con el grupo de control. Las mezclas generaron mayor cantidad de efectos que los compuestos por separado (Figura 26) ($F(15,48) = 1229.079, p < 0.001$).

Encontramos diferencias significativas entre los tratamientos de ACE-K y el grupo de control. De las tres concentraciones manejadas para ACE-K, la concentración tres ($125 \mu\text{g} / \text{L}$) generó mayor diferencia significativa. El grupo de control tuvo un valor de 4558 cm de distancia total recorrida mientras que la concentración más alta de ACE-K arrojó valores de 2002 cm. Con lo anterior, podemos demostrar que $125 \mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K pueden disminuir considerablemente la distancia total recorrida de nado para *Danio rerio*. De manera similar, los grupos tratados con SUC disminuyeron significativamente. La concentración más alta de SUC ($125 \mu\text{g} / \text{L}$) disminuyó a menos de la mitad la distancia total recorrida (1842 cm). Lo anterior nos permite realizar una comparación entre ambos compuestos, obteniendo así que la SUC disminuyó más que el ACE-K la distancia total recorrida por los peces.

Por otra parte, realizando una comparación entre el control y las mezclas, obtuvimos que quien mostró una diferencia significativa mayor fue la mezcla 9 que contenía $125 \mu\text{g} / \text{L}$ de SUC y $125 \mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K. No obstante, cada una de las mezclas generó diferencia significativa ante el grupo de control.



Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Figura 26. Resultados de la distancia total para la prueba Novel Tank de peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas.

Nota: Datos representados de la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 9). * indica un cambio significativo en comparación con el control.

Distancia recorrida y tiempo de permanencia en la parte superior e inferior

No se observa una disminución significativa en la distancia recorrida en la parte inferior ($F(15,48) = 866.43$, $p < 0.001$) del acuario por los organismos expuestos a SUC y ACE-K. Sin embargo, el comportamiento de las mezclas da a conocer que si hubo una disminución significativa en el nado de los peces. Por otra parte, los resultados indican que la distancia recorrida en la parte superior ($F(15,48) = 925.59$, $p < 0.001$) de la pecera fue significativamente menor en comparación con el grupo de control (Figura 27). Lo anterior se respalda por el hecho de que los peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas permanecieron más tiempo en la parte superior ($F(15,48) = 379.576$, $p < 0.001$) que en la parte inferior ($F(15,48) = 958.869$, $p < 0.001$) de las peceras en comparación con el grupo de control (Figura 28).

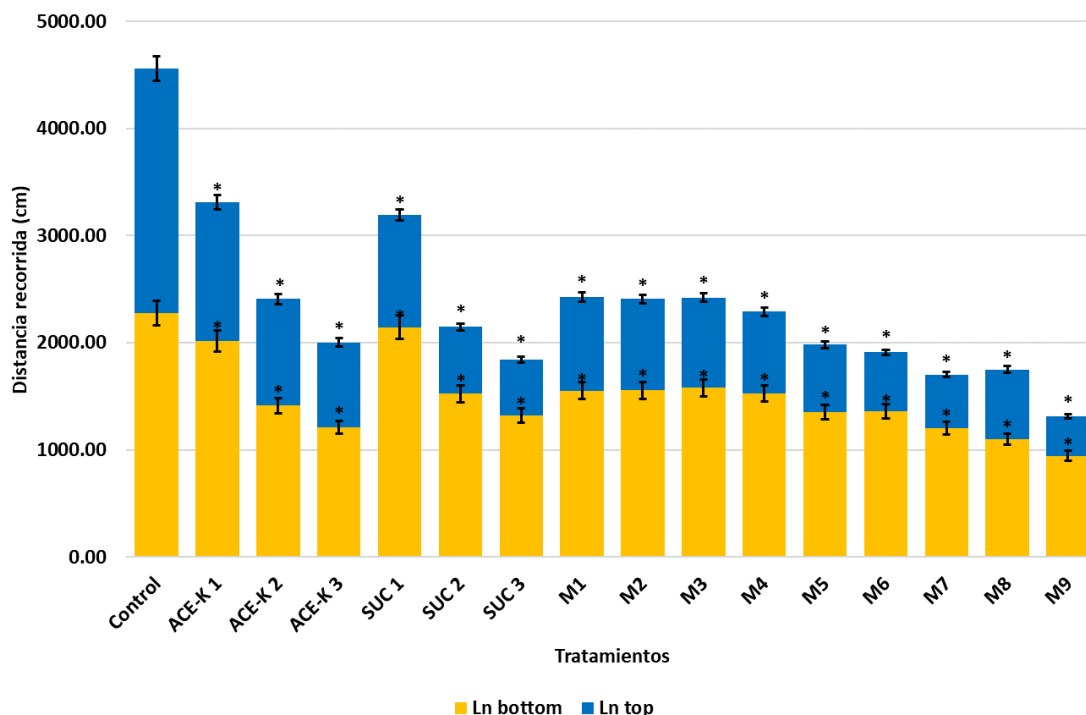


Figura 27. Resultados de la distancia recorrida en la parte inferior y superior para la prueba Novel Tank de peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Nota: Datos representados de la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 9). * indica un cambio significativo en comparación con el control.

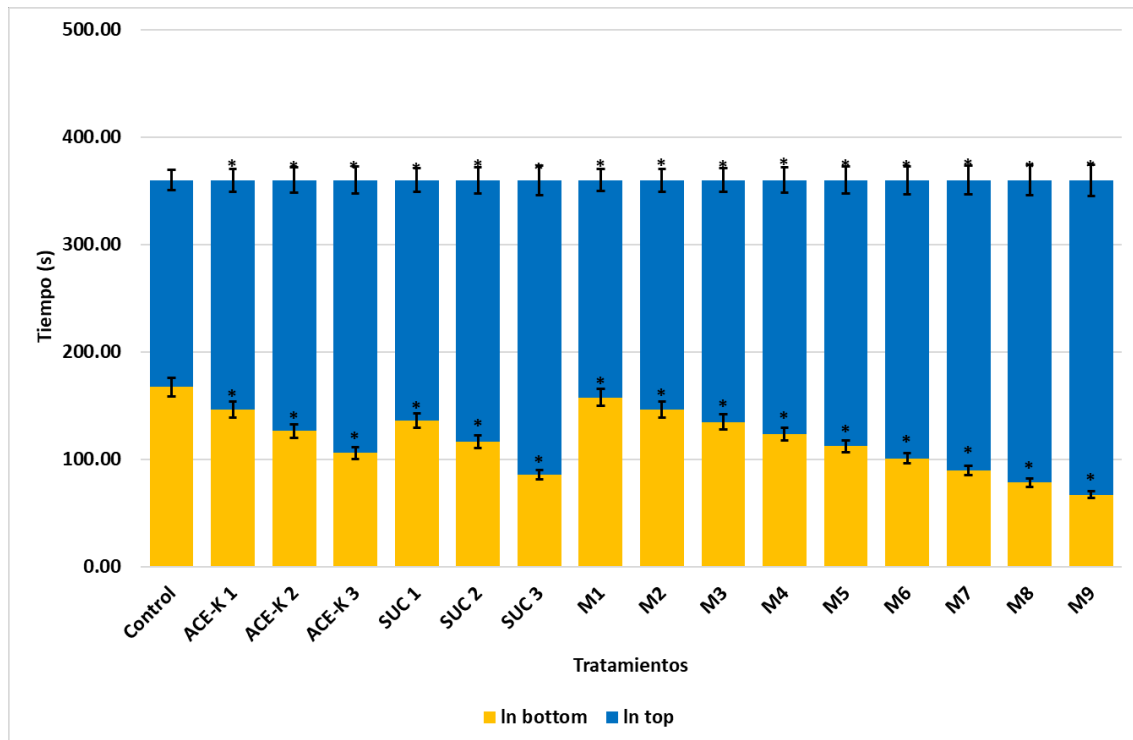


Figura 28. Resultados del tiempo transcurrido en la parte inferior y superior para la prueba Novel Tank de peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas.

Nota: Datos representados de la media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes (n = 9). * indica un cambio significativo en comparación con el control.

Tiempo de inmovilidad

El tiempo de inmovilidad tuvo un comportamiento similar a los parámetros mencionados anteriormente. Los organismos permanecieron mayor tiempo inmóviles en la parte superior que en la inferior. Los peces expuestos a todas las concentraciones de SUC, ACE-K y sus mezclas mostraron una diferencia significativa para la parte inferior ($F(15,48) = 3363.362$, $p < 0.001$) y superior ($F(15,48) = 1929.016$, $p < 0.001$) con respecto al grupo de control.

Cada uno de los parámetros evaluados fue dependiente de la concentración y se observaron cambios significativos entre los tratamientos (Figura 29).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

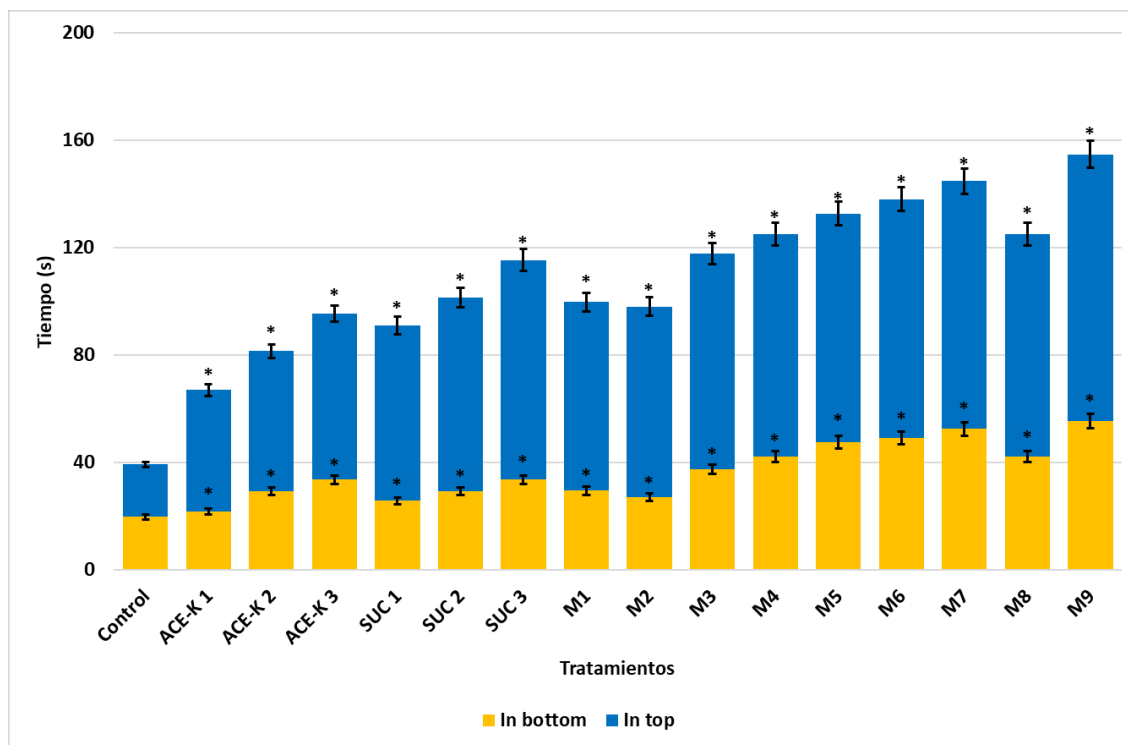


Figura 29. Resultados del tiempo de inmovilidad para la prueba Novel Tank de peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas.

Nota: Datos representados de la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 9). * indica un cambio significativo en comparación con el control.

Prueba Dark and Light

Posterior a la exposición a SUC, ACE-K y sus mezclas, los organismos tuvieron diferencias significativas en todos los parámetros evaluados durante las pruebas de luz y oscuridad (Figura 30 - 32).

Permanencia en la zona blanca y negra

Los peces de los tratamientos con respecto al grupo de control pasaron significativamente más tiempo en la zona oscura que en la blanca. Las mezclas disminuyeron significativamente la permanencia en la zona blanca y los compuestos individuales generaron mayor tiempo de permanencia en la misma zona (Figura 30 y 31) ($F(15,48) = 1126.801, p < 0.001$) y ($F(15,48) = 291.417, p < 0.001$).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

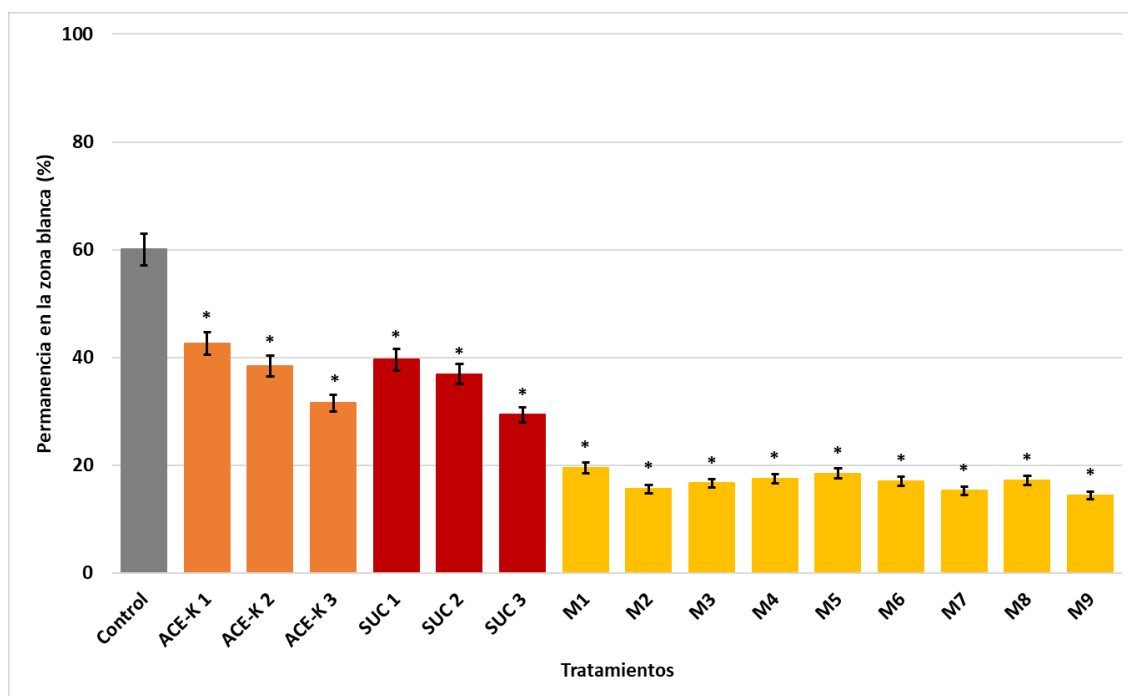


Figura 30. Resultados de la permanencia en la zona blanca para la prueba de Dark and Light de peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 9). * indican un cambio significativo en comparación con el control.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

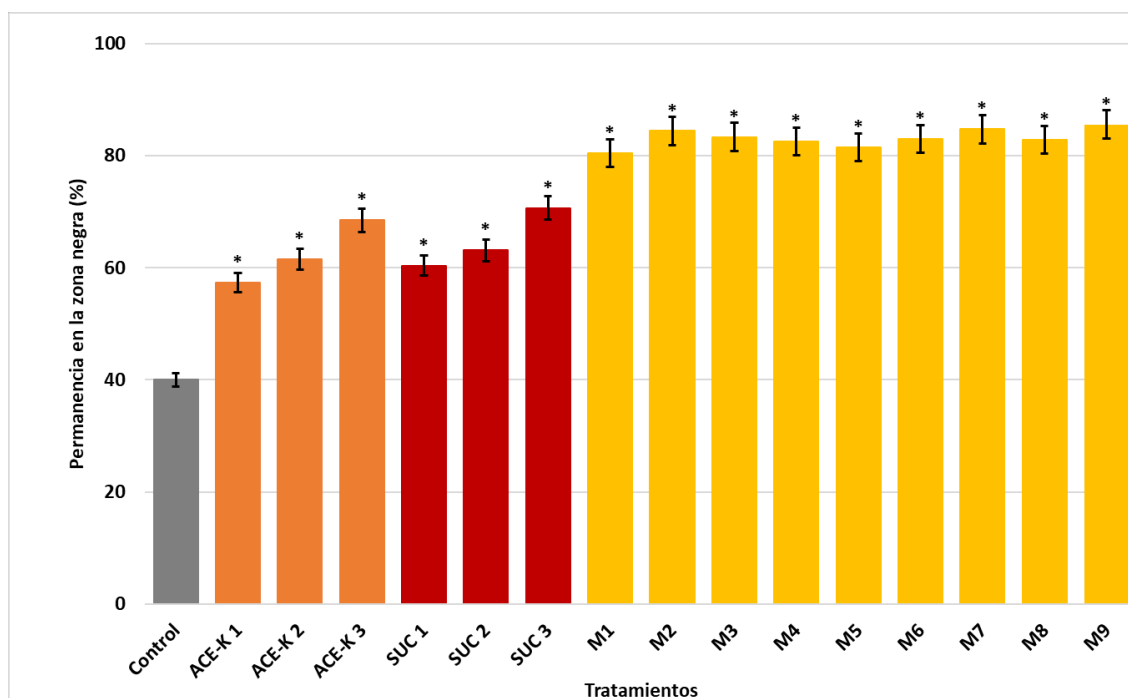


Figura 31. Resultados de la permanencia en la zona negra para la prueba de Dark and Light de peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 9). * indican un cambio significativo en comparación con el control.

Episodios de congelamiento

Al igual que en la prueba del tanque novedoso (prueba de Novel Tank) los adultos de *Danio rerio* expuestos a SUC, ACE-K y las mezclas estuvieron estáticos durante mucho tiempo a diferencia de los peces sin tratar (Figura 32) ($F(15,48) = 219.757, p < 0.001$). Las diferencias en los compuestos individuales fueron dependientes de la concentración. No obstante, las mezclas demostraron cambios casi nulos por lo que no se observaron diferencias significativas entre las mezclas.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

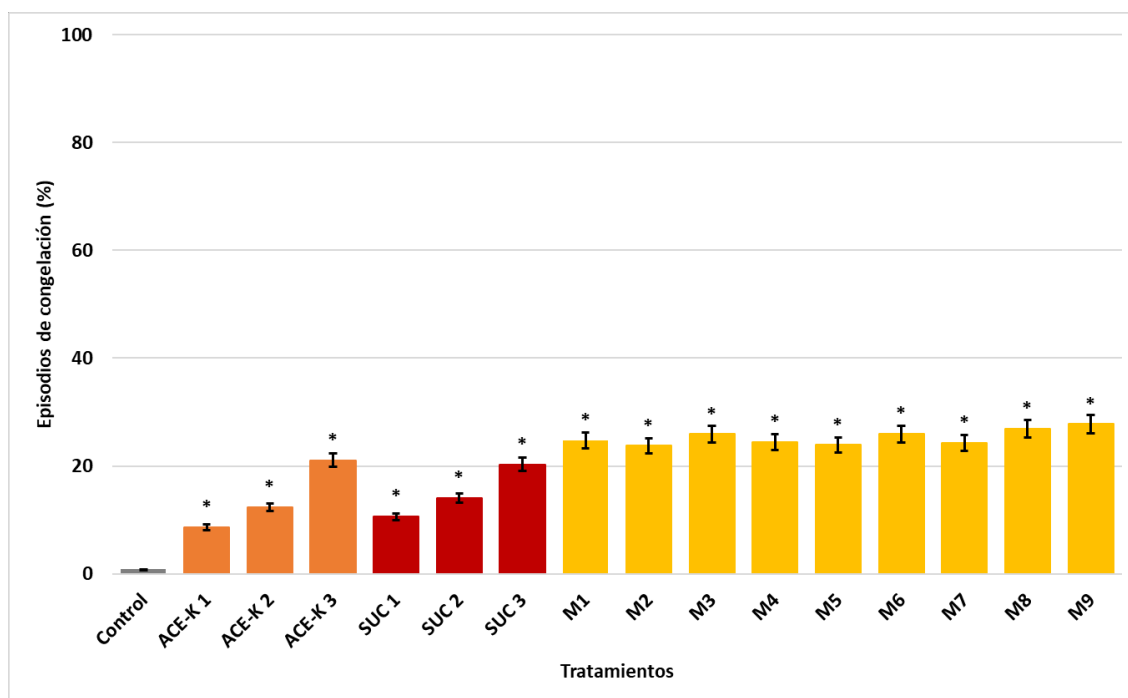


Figura 32. Resultados de los episodios de congelación de la prueba de Dark and Light de peces expuestos a SUC, ACE-K y sus mezclas.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 9). * indican un cambio significativo en comparación con el control.

Determinación de AChE

Después de 96 horas de exposición, la SUC, el ACE-K y las mezclas inhibieron considerablemente la actividad de AChE ($F(15,96) = 114.002$, $p < 0.001$) en los *Danio rerio* de manera dependiente de la concentración (Figura 33). Además, comparando el efecto de los compuestos solos sobre la inhibición de AChE, pudimos notar que el ACE-K provocó un daño mucho más potente que la SUC. En cuanto a las mezclas, observamos que generaron menor impacto que los compuestos solos. Cabe mencionar que encontramos diferencias significativas entre todos los grupos de tratamiento porque la inhibición de la AChE dependía de la concentración.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

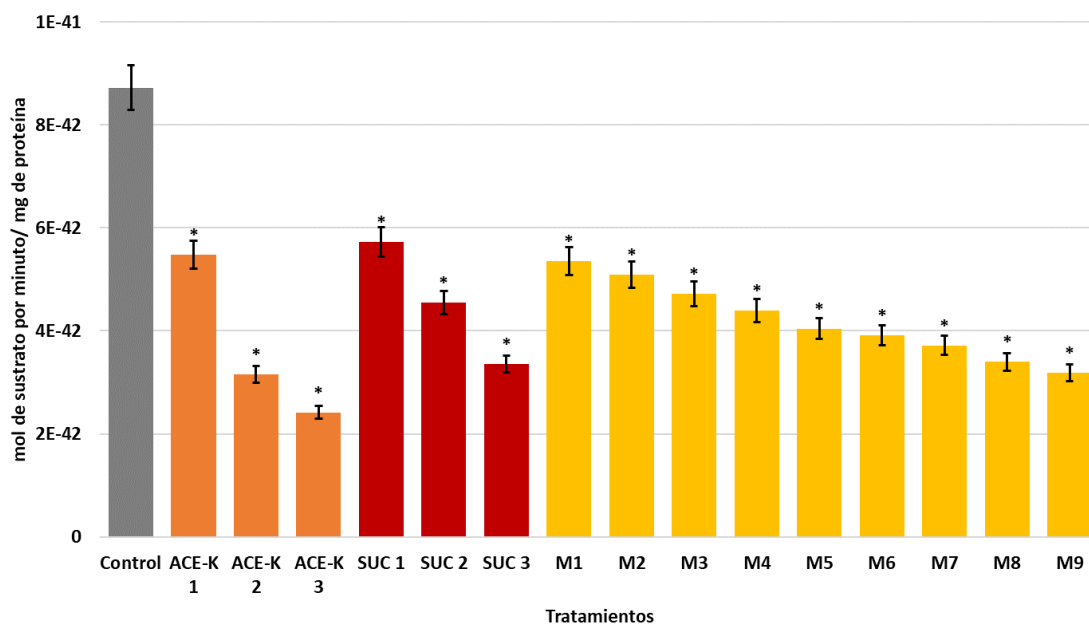


Figura 33. Resultados de la inhibición de AChE inducida por SUC, acesulfame- K y sus mezclas en cerebro de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 9). * indican un cambio significativo en comparación con el control.

Estrés oxidativo

En el cerebro de los *Danio rerio*, la exposición a SUC, ACE-K y sus mezclas desencadenó una respuesta de EO (Figura 34 - 38). Las mezclas elevaron significativamente los niveles de todos los biomarcadores de daño oxidativo en función de la concentración, al igual que los compuestos individuales. En comparación con los peces expuestos a SUC, los peces expuestos a ACE-K produjeron mayor cantidad de HPX y LPX. Sin embargo, la SUC produjo un exceso de proteínas carboniladas (PCC) en el cerebro de los peces. Además, los niveles de las enzimas antioxidantes CAT y SOD aumentaron después de la exposición a SUC, ACE-K y sus mezclas. Estas dos enzimas se encontraron en mayor cantidad en los peces expuestos a las mezclas, seguidas por los peces expuestos a ACE-K y SUC. La dependencia de la concentración en todos los biomarcadores de EO nos permitió detectar diferencias significativas en todos los grupos de tratamiento.

Superóxido dismutasa

La actividad de SOD ($F(15,96) = 1331.90$, $p < 0.001$) se vio aumentada en cada uno de los tratamientos con respecto al grupo de control (Figura 34). Por ejemplo, para los tratamientos con ACE-K la

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

concentración más baja generó 19.35 U SOD / mg proteína, la concentración media 21.95 U SOD / mg proteína y la concentración más alta 23.29 U SOD / mg proteína mientras que el valor del control era 12.29 U SOD / mg proteína. Con lo anterior, demostramos que hubo un incremento dependiente de la concentración, es decir, a mayor concentración, mayor era la respuesta de la enzima antioxidante.

La SUC tuvo un comportamiento similar al edulcorante anterior. La actividad de SOD en los tratamientos con SUC incrementó conforme a la concentración (Concentración baja: 18.0 U SOD / mg proteína, concentración media: 19.16 U SOD / mg proteína y concentración alta (21.30 U SOD / mg proteína) y su pico más alto fue en la concentración más elevada del edulcorante (125 µg / L). Sin embargo, el comportamiento de las mezclas no tuvo similitudes con los compuestos individuales. Aunque las mezclas aumentaron de forma significativa la actividad de la enzima antioxidante, no mostraron un comportamiento dependiente de la concentración. La mezcla uno (50 µg / L de SUC + 50 µg / L de ACE-K) con un valor de 25.09 U SOD / mg proteína generó más del doble de actividad de superóxido dismutasa que el grupo de control. La mezcla dos (50 µg / L de SUC + 75 µg / L de ACE-K), mezcla tres (50 µg / L de SUC + 125 µg / L de ACE-K) y mezcla cuatro (75 µg / L de SUC + 50 µg / L de ACE-K) aumentaron sus valores (27.44 U SOD / mg proteína, 27.59 U SOD / mg proteína, 28.03 U SOD / mg proteína) en comparación con la mezcla uno. Sin embargo, la mezcla cinco (75 µg / L de SUC + 75 µg / L de ACE-K) generó un decremento (27.53 U SOD / mg proteína) con respecto a la mezcla cuatro. Posteriormente, la mezcla seis (75 µg / L de SUC + 125 µg / L de ACE-K) aumentó su valor (29.0 U SOD / mg proteína) y nuevamente hubo una disminución en la mezcla siete (125 µg / L de SUC + 50 µg / L de ACE-K). Finalmente, las mezclas ocho y nueve volvieron a aumentar (26.95 U SOD / mg proteína y 27.41 U SOD / mg proteína, respectivamente).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

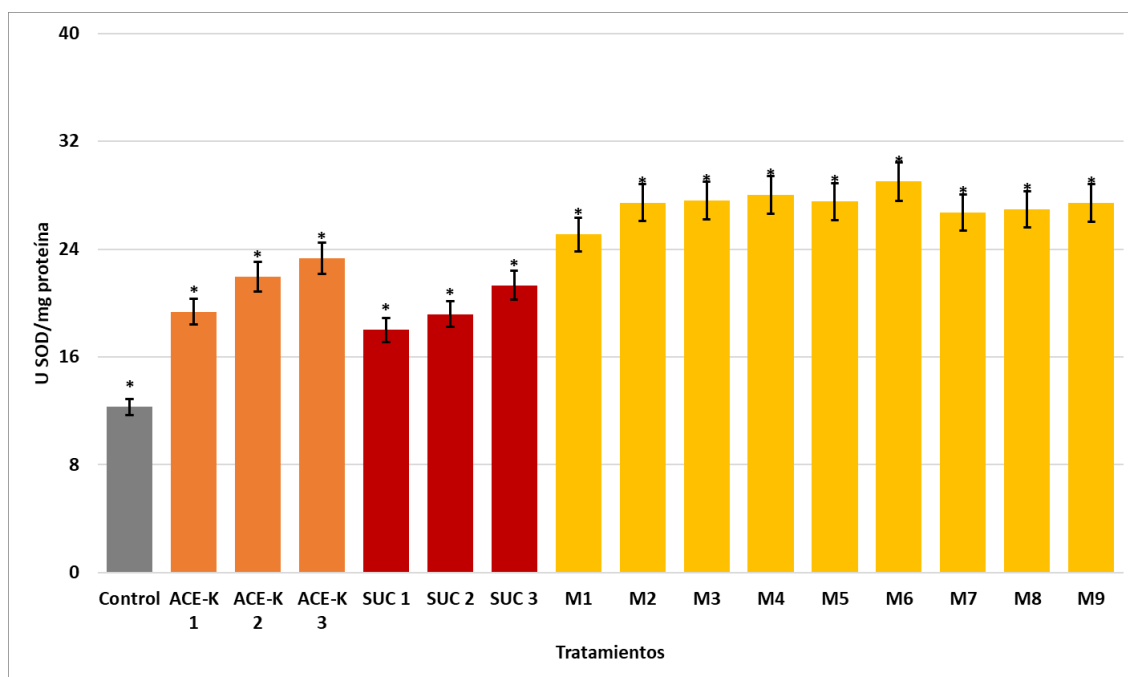


Figura 34. Actividad de superóxido dismutasa provocada por SUC, ACE-K y sus mezclas en cerebro de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 9). * indican un cambio significativo en comparación con el control.

Catalasa

En la Figura 35 se muestra el comportamiento de la CAT ($F(15,96) = 9.206, p < 0.001$) generada por SUC, ACE-K y las mezclas en *Danio rerio*. La CAT aumentó dependiente de la concentración y tuvo diferencias significativas con respecto al grupo de control.

El ACE-K incrementó en todas las concentraciones. Para la concentración de $50 \mu\text{g} / \text{L}$ se obtuvo un valor de $2925.58 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 / \mu\text{g proteína}$, la concentración de $75 \mu\text{g} / \text{L}$ dio una actividad de $3339.07 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 / \mu\text{g proteína}$ y el valor para la concentración de $125 \mu\text{g} / \text{L}$ fue de $3893.81 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 / \mu\text{g proteína}$. Lo anterior demuestra que la actividad de la CAT tuvo un incremento dependiente de la concentración. De manera similar, la SUC generó una elevada actividad de la CAT. Sin embargo, en comparación con el ACE-K, la SUC generó menor alteración en esta enzima antioxidante. Mientras que la concentración más alta ($3893.81 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 / \mu\text{g proteína}$) de ACE-K dio valores cercanos a $4000 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 / \mu\text{g proteína}$, la SUC alcanzó una actividad de $3326.53 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 / \mu\text{g proteína}$. Por lo cual, entre estos dos edulcorantes se determina que generó una mayor respuesta el ACE-K.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

También, pudimos observar que las mezclas fueron aumentando dependientes de la concentración y tuvieron un cambio estadísticamente significativo en comparación con el tratamiento de control. La actividad para cada mezcla fue mayor que la de los edulcorantes por separado, a excepción de la mezcla uno (50 μg / L de SUC + 50 μg / L de ACE-K) que arrojó un valor menor (3558.41 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ / μg proteína) a la concentración más alta de ACE-K (100 μg / L). Las mezclas dos (50 μg / L de SUC + 75 μg / L de ACE-K) y tres (50 μg / L de SUC + 125 μg / L de ACE-K) tuvieron un aumento mayor a la mezcla uno (4320.45 y 4717.20 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ / μg proteína, respectivamente). Sin embargo, la mezcla cuatro (75 μg / L de SUC + 50 μg / L de ACE-K) mostró un ligero decremento (4712.99 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ / μg proteína) de la actividad de la enzima. Posteriormente, la mezcla cinco (75 μg / L de SUC + 75 μg / L de ACE-K) y seis (75 μg / L de SUC + 125 μg / L de ACE-K) aumentaron (4908.54 y 5427.83 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ / μg proteína, respectivamente) y la mezcla siete tuvo una ligera disminución (5390.54 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ / μg proteína). Finalmente las mezclas ocho (125 μg / L de SUC y 75 μg / L de ACE-K) y nueve (125 μg / L de SUC y 75 μg / L de ACE-K) dieron valores de 5679.33 y 5794.95 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ / μg proteína. Cabe mencionar que todas las mezclas incrementaron más del doble que el grupo control.

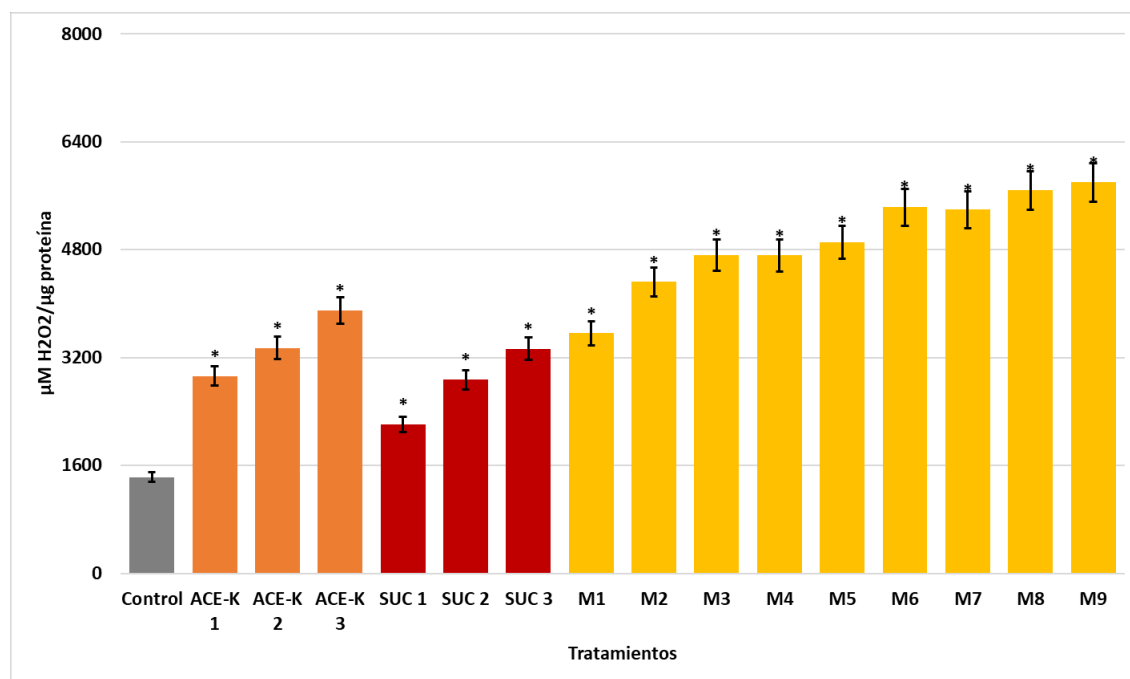


Figura 35. Actividad de CAT generada por SUC, ACE-K y sus mezclas en cerebro de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes ($n = 9$). * indican un cambio significativo en comparación con el control.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Hidroperóxidos

La cantidad de HPX ($F(15,96) = 9.612$, $p < 0.001$) fue dependiente de la concentración para los compuestos individuales y hubo diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos (incluido el grupo de control) (Figura 36). El ACE-K demostró tener mayor contenido de este biomarcador en comparación con la SUC. Las tres concentraciones de ACE-K demostraron tener diferencias significativas porque se elevaron más del doble con respecto al grupo de control (6.86 nM de HPA / mg proteína). El contenido de HPX aumentó de forma dependiente a la concentración. La concentración más baja (50 $\mu\text{g} / \text{L}$) generó 11.48 nM de HPA / mg proteína, la concentración media (75 $\mu\text{g} / \text{L}$) 17.62 nM de HPA / mg proteína y la última concentración (125 $\mu\text{g} / \text{L}$) 24.08 nM de HPA / mg proteína. Por otra parte, la SUC también generó cambios significativos en los tratamientos con respecto al grupo de control. Sin embargo, el contenido de HPX inducido por SUC (15.44 nM de HPA / mg proteína) fue menor al que generó ACE-K (17.62 nM de HPA / mg proteína). Con lo anterior, podemos darnos cuenta que la SUC tuvo menor efecto en este biomarcador. Además, la concentración uno (50 $\mu\text{g} / \text{L}$) y dos (75 $\mu\text{g} / \text{L}$) tuvieron un comportamiento decreciente (10.37 y 12.86 nM de HPA / mg proteína, respectivamente) en comparación de la concentración tres (125 $\mu\text{g} / \text{L}$).

En cuanto al contenido de HPX en las mezclas, hubo diferencias significativas con respecto al grupo de control. Las mezclas elevaron el biomarcador hasta cuatro veces más que el valor del control. Las mezclas generaron un contenido de HPX mayor que la SUC. Los resultados obtenidos para las mezclas fueron los siguientes:

- Mezcla 1 (50 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 50 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K): 21.06 nM de HPA / mg proteína
- Mezcla 2 (50 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 75 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K): 22.31 nM de HPA / mg proteína
- Mezcla 3 (50 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 125 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K): 22.44 nM de HPA / mg proteína
- Mezcla 4 (75 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 50 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K): 24.54 nM de HPA / mg proteína
- Mezcla 5 (75 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 75 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K): 23.96 nM de HPA / mg proteína
- Mezcla 6 (75 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 125 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K): 25.79 nM de HPA / mg proteína
- Mezcla 7 (125 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 50 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K): 28.59 nM de HPA / mg proteína
- Mezcla 8 (125 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 75 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K): 29.34 nM de HPA / mg proteína
- Mezcla 9 (125 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 125 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K): 30.41 nM de HPA / mg proteína

Con el contenido de HPX obtenido para las mezclas podemos observar que de la mezcla uno a la cuatro y de la seis a la nueve, el contenido del biomarcador iba en aumento. Solo hubo una ligera disminución en la mezcla cinco.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

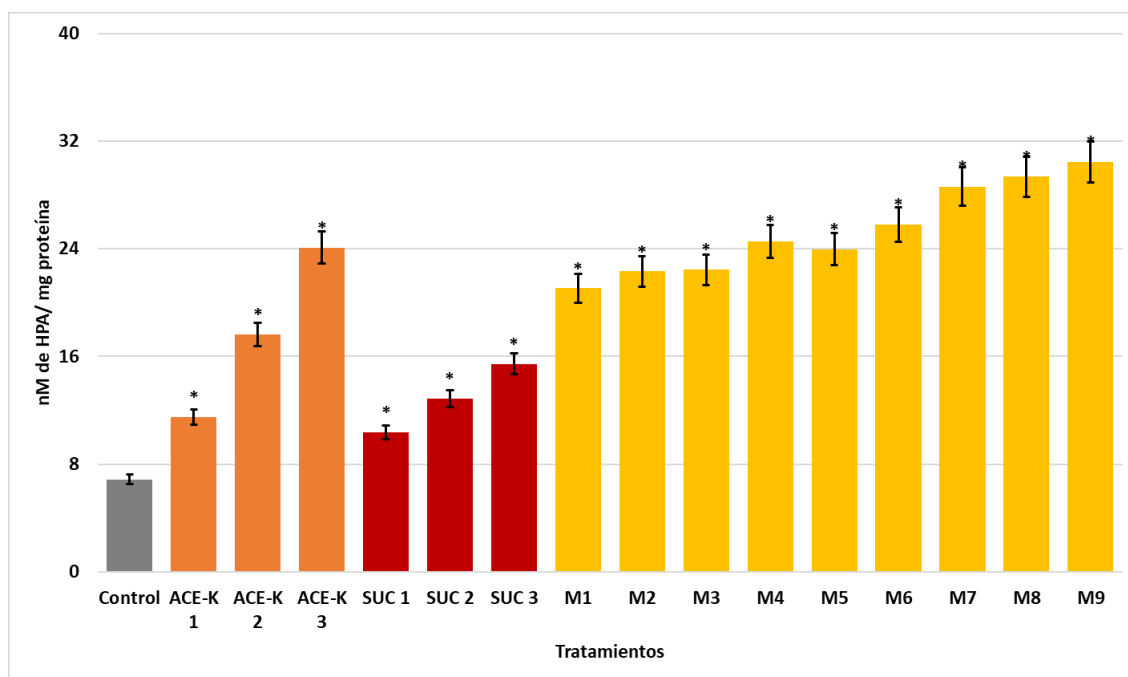


Figura 36. Contenido de hidroperóxidos en cerebro de *Danio rerio*, inducido por SUC, ACE-K y sus mezclas.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 9). * indican un cambio significativo en comparación con el control.

Proteínas carboniladas

El contenido de PCC ($F(15,96) = 705.652, p < 0.001$) para cada tratamiento tuvo diferencias significativas con respecto al grupo de control. Los compuestos individuales aumentaron dependientes de la concentración (Figura 37). El ACE-K en las tres concentraciones (50, 75 y 125 $\mu\text{g/L}$) aumentó de forma significativa el contenido de las PCC. La concentración uno, dos y tres generaron un contenido de 51.13, 53.83 y 57.43 nM CO / mg proteína, respectivamente. Por otra parte, la SUC provocó un exceso de PCC y alcanzó su pico más alto en la concentración de 125 $\mu\text{g/L}$ con un valor de 65.84 nM CO / mg proteína. Además, el contenido (54.70 y 58.87 nM CO / mg proteína) de las concentraciones uno y dos (50 y 75 $\mu\text{g/L}$) fueron más elevados que los del otro edulcorante.

Las mezclas al igual que los compuestos por separado, aumentaron significativamente el contenido de las proteínas carboniladas. Sin embargo, no mostraron un comportamiento dependiente de la concentración. Las mezclas uno (50 $\mu\text{g/L}$ de SUC + 50 $\mu\text{g/L}$ de ACE-K), dos (50 $\mu\text{g/L}$ de SUC + 75 $\mu\text{g/L}$ de ACE-K), tres (50 $\mu\text{g/L}$ de SUC + 125 $\mu\text{g/L}$ de ACE-K), cuatro (75 $\mu\text{g/L}$ de SUC + 50 $\mu\text{g/L}$ de ACE-K),

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

cinco (75 µg / L de SUC + 75 µg / L de ACE-K) y seis (75 µg / L de SUC + 125 µg / L de ACE-K) fueron aumentando (62.32, 64.85, 67.34, 71.16, 71.98, 74.27 nM CO / mg proteína, respectivamente) el contenido de proteínas carboniladas. Sin embargo, la mezcla siete (125 µg / L de SUC + 50 µg / L de ACE-K) disminuyó ligeramente (73.13 nM CO / mg proteína). Finalmente, la mezcla ocho (125 µg / L de SUC + 75 µg / L de ACE-K) y nueve (125 µg / L de SUC + 125 µg / L de ACE-K) se elevaron (74.89 y 76.70 nM CO / mg proteína, respectivamente). Las mezclas aumentaron el contenido de proteínas carboniladas más que los compuestos individuales.

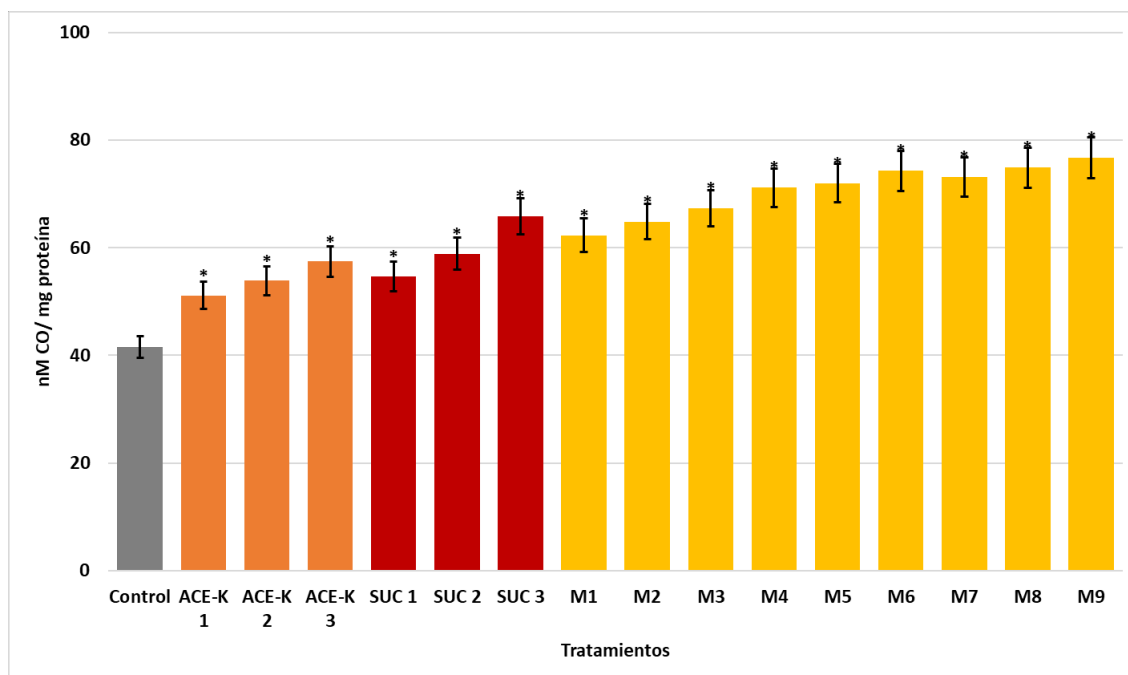


Figura 37. Contenido de proteínas carboniladas generado por SUC, ACE-K y sus mezclas en cerebro de *Danio rerio*.

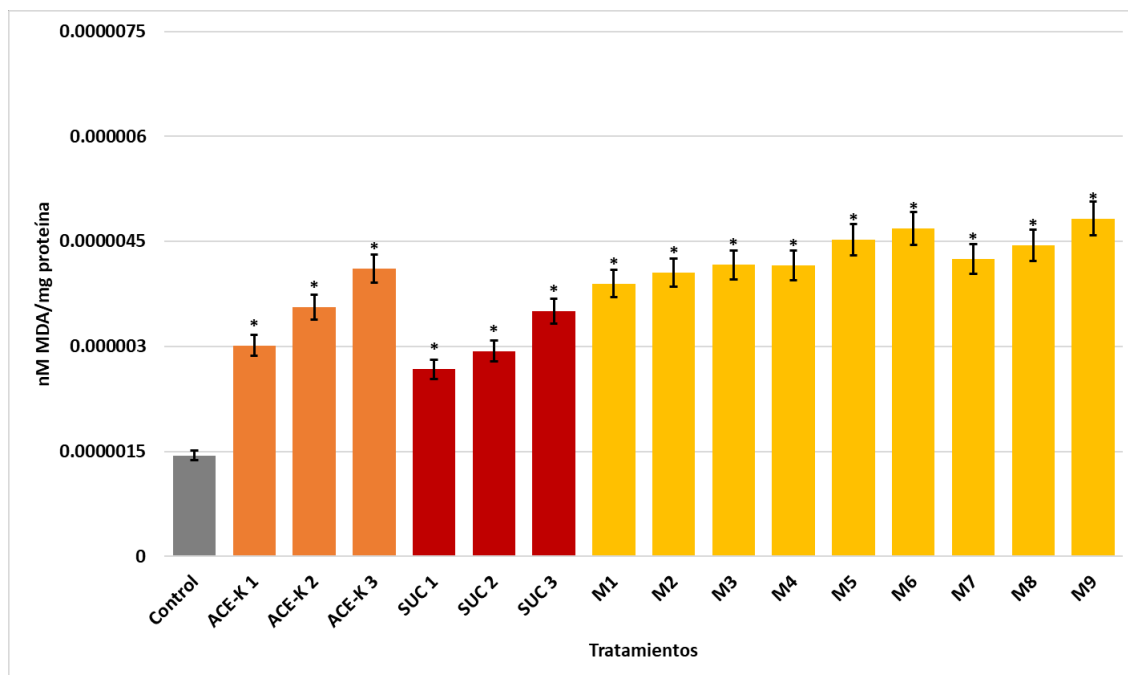
Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 9). * indican un cambio significativo en comparación con el control.

Lipoperóxidos

La peroxidación lipídica ($F(15,96) = 1606.254$, $p < 0.001$) aumentó significativamente en cada uno de los tratamientos de los compuestos individuales con respecto al grupo de control (Figura 38). El ACE-K aumentó más que la SUC el contenido de LPX. El valor (3.01×10^{-6} nM MDA / mg proteína) de la concentración de 50 µg / L fue poco más del doble del valor de control. El contenido de lipoperóxidos (3.56×10^{-6} y 4.10×10^{-6} nM MDA / mg proteína) producidos por la concentración dos y tres (75 y 125 µg

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

/ L) fueron mayores a la concentración inicial del ACE-K. La SUC tuvo diferencias significativas respecto al grupo de control y su comportamiento fue dependiente de la concentración. En la concentración uno y dos dio valores de 2.67 y 2.93 nM MDA / mg proteína, respectivamente. El pico más alto de peroxidación lipídica inducida por SUC se obtuvo en la concentración más alta (125 $\mu\text{g} / \text{L}$) con un valor de 3.5×10^{-6} nM MDA / mg proteína. En cambio, para las mezclas el pico más alto (4.82×10^{-6} nM MDA/mg proteína) fue en la mezcla nueve que contenía 125 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 125 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K. Las mezclas no mostraron dependencia a la concentración debido a que algunas aumentaban en comparación con la anterior y otras disminuían. Por ejemplo, la mezcla uno, dos y tres (50 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 50 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K, 50 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 75 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K y 50 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 125 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K) elevaron el contenido de lipoperóxidos (3.01×10^{-6} , 3.56×10^{-6} , 4.10×10^{-6} nM MDA / mg proteína, respectivamente). Sin embargo, la mezcla cuatro (75 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 50 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K) tuvo un comportamiento decreciente (4.15×10^{-6} nM MDA / mg proteína) con respecto a la mezcla tres (50 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 125 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K). Posteriormente, la mezcla cinco y seis (75 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 75 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K y 75 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 125 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K) aumentaron (4.52×10^{-6} y 4.68×10^{-6} nM MDA / mg proteína, respectivamente), pero la mezcla siete (125 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 50 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K) disminuyó (4.24×10^{-6} nM MDA/mg proteína) en comparación con la mezcla seis. Después, la mezcla ocho y nueve (125 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 75 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K y 125 $\mu\text{g} / \text{L}$ de SUC + 125 $\mu\text{g} / \text{L}$ de ACE-K) incrementaron (4.44×10^{-6} y 4.82×10^{-6} nM MDA / mg proteína) el contenido de peroxidación lipídica. El pico más alto de todos los tratamientos fue en la mezcla nueve.



Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Figura 38. Contenido de LPX inducido por SUC, ACE-K y sus mezclas en cerebro de *Danio rerio*.

Nota: Los datos representan la media \pm desviación estándar (DE) de tres experimentos independientes (n = 9). * indican un cambio significativo en comparación con el control.

Determinación de sucralosa y acesulfame-k

En comparación con las concentraciones nominales, los niveles de SUC y ACE-K en el sistema de agua fueron significativamente más bajos (Tabla 17). Sin embargo, ninguna de las concentraciones en los sistemas de agua se redujo en más del 20%. Por lo tanto, consideramos las concentraciones nominales de los dos edulcorantes artificiales en el análisis. Las concentraciones de ambos compuestos aumentaron dependientes de la concentración. Así, la SUC y el ACE-K atravesaron la barrera hematoencefálica e impactaron negativamente en el cerebro de *Danio rerio*. Cabe mencionar que obtuvimos concentraciones más altas de ACE-K que SUC en el cerebro de los organismos.

Tratamientos	Concentraciones nominales ($\mu\text{g} / \text{L}$)	Concentraciones de agua ($\mu\text{g} / \text{L}$)	Concentraciones cerebrales ($\mu\text{g} / \text{g}$)
Control	Control	<LOQ	<LOQ
JUGO 1	50	41.70 \pm 2,14	0.03 \pm 0,01
JUGO 2	75	62.52 \pm 3,09	0.04 \pm 0,01
JUGO 3	125	104.58 \pm 5,01	0.07 \pm 0,02
ACE-K 1	50	44.24 \pm 1,16	0.21 \pm 0,05
ACE-K 2	75	66.39 \pm 2,78	0.34 \pm 0,07
ACE-K 3	125	107.41 \pm 4,90	0.63 \pm 0,09
M1 (SUC+ACE-K)	50 + 50	40.93 \pm 2.16 + 43.12 \pm 1.57	0.02 \pm 0.01 + 0.24 \pm 0.04
M2 (SUC+ACE-K)	50 + 75	41.22 \pm 2.09 + 65.01 \pm 2.29	0.02 \pm 0.01 + 0.33 \pm 0.08
M3 (SUC+ACE-K)	50 + 125	40.87 \pm 2.33 + 108.87 \pm 4.34	0.02 \pm 0.01 + 0.62 \pm 0.10
M4 (SUC+ACE-K)	75 + 50	62.71 \pm 3.14 + 44.74 \pm 1.40	0.04 \pm 0.01 + 0.22 \pm 0.04
M5 (SUC+ACE-K)	75 + 75	61.90 \pm 3.20 + 66.94 \pm 2.45	0.03 \pm 0.01 + 0.31 \pm 0.07

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

M6 (SUC+ACE-K)	75 + 125	61.63 ± 2.98+ 106.55 ± 4.75	0.03 ± 0.01+ 0.66 ± 0.09
M7 (SUC+ACE-K)	125 + 50	103.43 ± 5.24 + 43.90 ± 1.33	00.08 ± 0.02 + 0.21 ± 0.03
M8 (SUC+ACE-K)	125 + 75	102.82 ± 5.30 + 67.68 ± 2.12	0.07 ± 0.02 + 0.30 ± 0.05
M9 (SUC+ACE-K)	125 + 125	101,91 ± 5,23 + 108,34 ± 4,58	0.07 ± 0.02 + 0.65 ± 0.09

Tabla 1. Concentraciones de SUC y ACE-K en el cerebro de Danio rerio.

Nota: Los valores son la media de tres réplicas ± desviación estándar (DE).

Correlograma y gráficos de respuesta

Como se puede ver en el gráfico de respuestas (Figura 39), los biomarcadores de EO (A-E), congelación (J-L) y zona oscura (O) dependen de la concentración y exhiben respuestas similares. Además, asumimos que el ACE-K indujo una respuesta más tóxica que la SUC porque las esquinas de los gráficos de respuesta de ACE-K generalmente permanecieron en la zona amarilla y roja. Además, podemos observar que la actividad de AChE, la distancia recorrida y el tiempo de permanencia en el fondo mostraron tendencias similares. Para todos estos biomarcadores, se puede observar que la respuesta disminuye significativamente al aumentar la concentración de SUC. Mientras tanto, los valores de ACE-K para todas las concentraciones permanecen en el rango azul, lo que indica una respuesta más destructiva.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

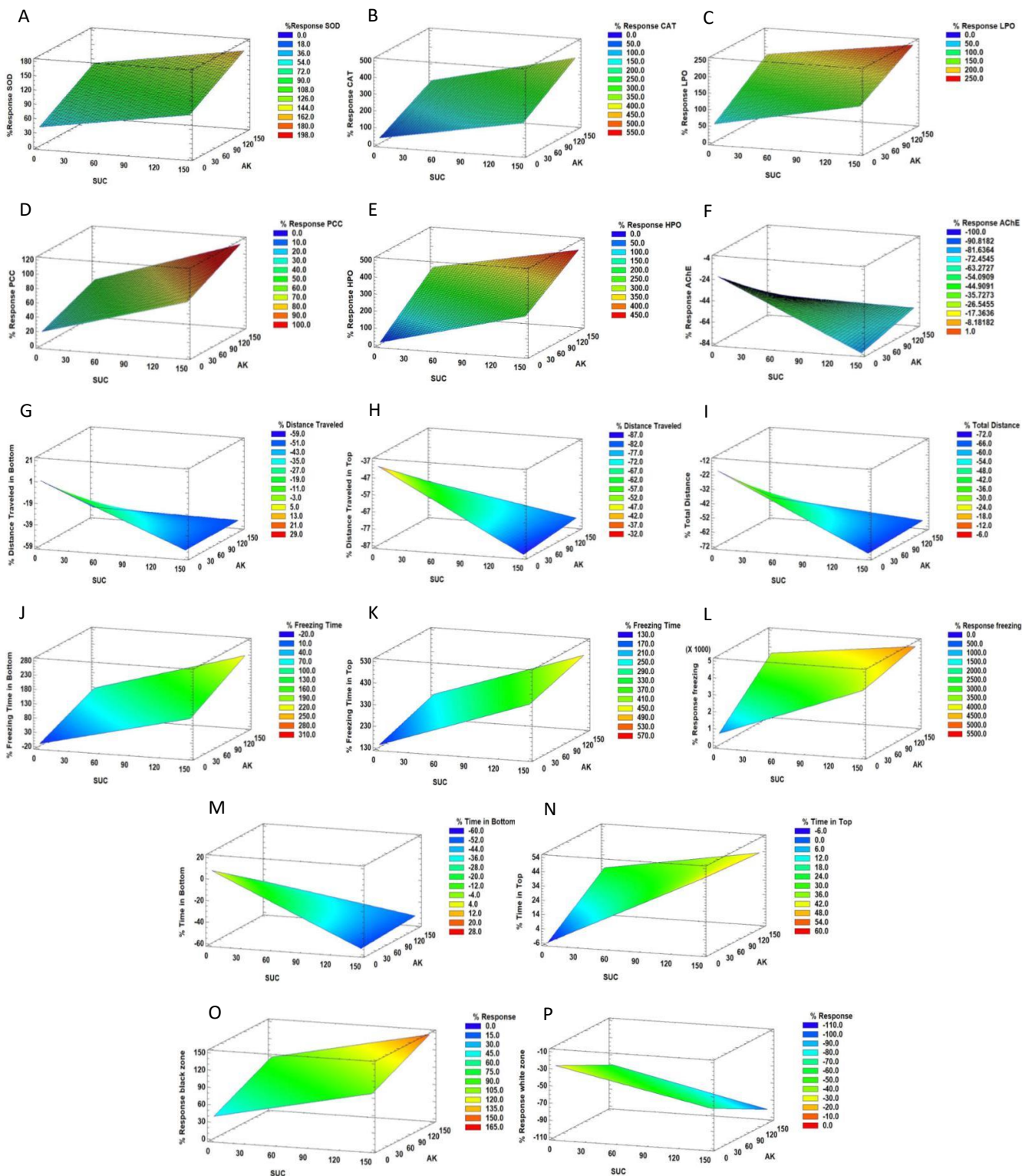


Figura 39. Gráficos de respuesta de SUC y acesulfame- K.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

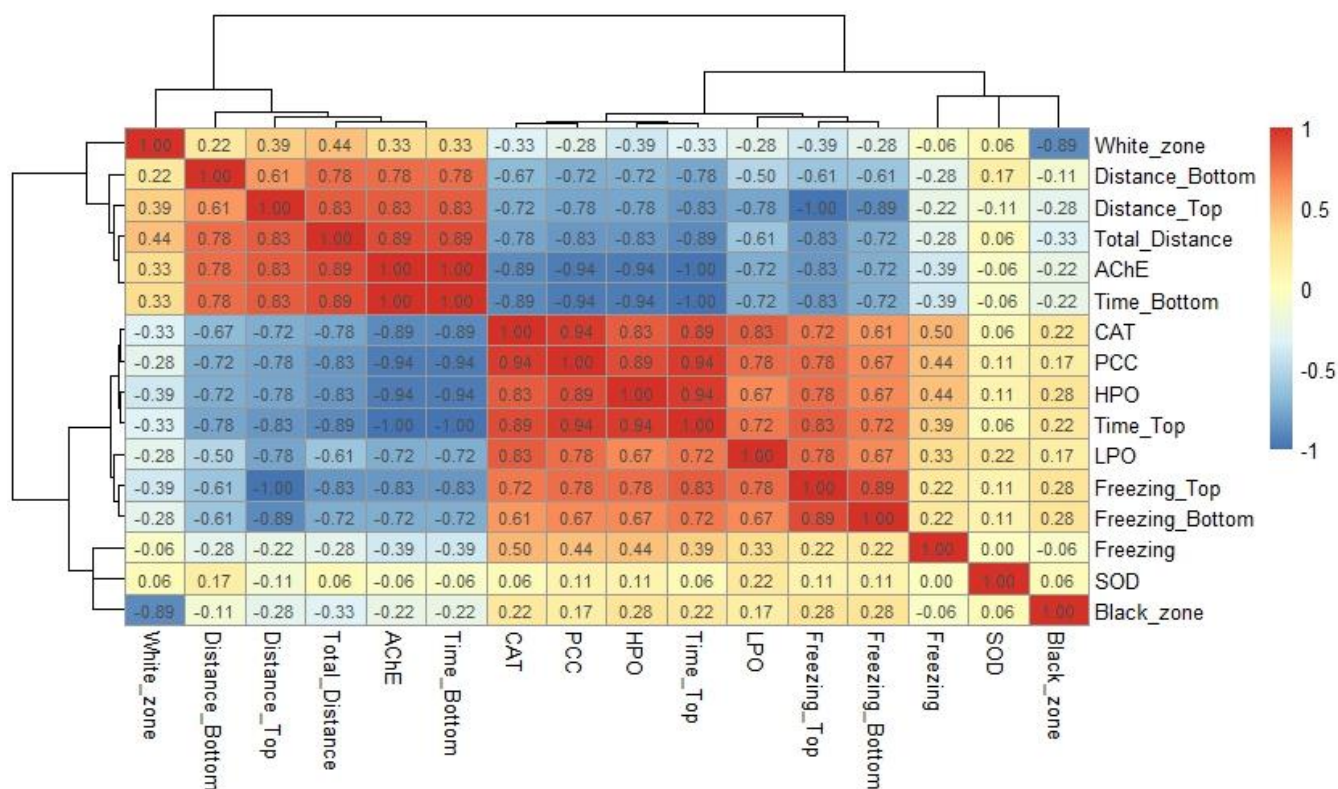


Figura 40. Mapa de biomarcadores evaluados.

Por otra parte, las correlaciones entre todas las variables probadas se muestran en Pheatmap (Figura 40). Esto muestra que la cantidad de tiempo que los peces permanecieron estáticos y en la zona negra se correlaciona fuertemente con los biomarcadores de EO. Nuestro mapa establece que la actividad de la AChE está fuerte y positivamente relacionada con la duración del nado de los peces y la cantidad de tiempo que pasan en el fondo del acuario. Además, el EO y los biomarcadores de AChE tuvieron una correlación negativa, lo que indica que los niveles elevados de ROS pueden estar relacionados con la inhibición de AChE.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la actualidad, la SUC y el ACE-K son dos los edulcorantes mayormente usados a nivel mundial (Li, Wu, *et al.*, 2017; Robertson *et al.*, 2016). Los edulcorantes se han popularizado porque sirven para perder peso y proporcionan la dulzura del azúcar sin calorías y lamentablemente, los mamíferos no pueden metabolizarlo (Durán A. *et al.*, 2012). Las propiedades fisicoquímicas de estos dos edulcorantes propician su presencia como nuevos contaminantes en el medio acuático, por lo que su presencia en las plantas depuradoras de aguas residuales es inevitable (Tran, Hu and Ong, 2013b; Arbeláez *et al.*, 2015; Fu *et al.*,

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

2020a; Yang *et al.*, 2021; Kerberová, Zlámalová Gargošová y Čáslavský, 2022). Diversos autores han reportado que, es difícil la eliminación de la SUC y el ACE-K de las plantas de tratamiento de aguas residuales porque ni los tratamientos convencionales ni los avanzados pueden eliminarlos de los cuerpos de agua. La comunidad científica ha estudiado los efectos tóxicos de la SUC y el ACE-K en las especies acuáticas, pero aún hay escasez de conocimientos sobre estos dos compuestos. Además, se sabe poco sobre los efectos negativos de los edulcorantes artificiales y sus mezclas. Aquí, nuestro objetivo fue ofrecer nuevas perspectivas sobre los efectos tóxicos que la SUC, el ACE-K y sus mezclas pueden inducir en las primeras etapas de vida del pez cebra y en su comportamiento.

Con base en los resultados de la primera parte experimental, la SUC alteró el desarrollo normal de los embriones de *Danio rerio*, dando lugar a malformaciones en ellos. Estos defectos incluyeron deformidades en la cola, escoliosis, ausencia de aletas y ojos, enanismo, edema pericárdico, deformación del saco vitelino, etc. Las malformaciones identificadas en este estudio coincidieron con las descritas en investigaciones anteriores. Tal es el caso de Arndorfer, 2018 quien reportó que la SUC generó enanismo y escoliosis en larvas de *Danio rerio* a concentraciones de 100 000 $\mu\text{g} / \text{L}$. Sin embargo, sus concentraciones utilizadas estaban sumamente elevadas y no mostraban relevancia para el medio ambiente. En contraste con los resultados de Saputra *et al.*, 2021 donde mencionaban que la SUC a 100 ppb no generaba deformaciones cardíacas, nosotros observamos que una de las malformaciones más prevalentes en los embriones fue el edema pericárdico. La diferencia entre los estudios puede explicarse por el tiempo de exposición. En nuestro experimento, expusimos las larvas desde las 4 hpf (etapa de esfera) porque en este momento los embriones son más vulnerables a cualquier contaminante debido a que sus órganos están en desarrollo y carecen de un mecanismo de protección antioxidante (Kimmel *et al.*, 1995; Dennery, 2007). Mientras que Saputra *et al.*, 2021 utilizó embriones de 60 hpf, cuando su circulación sanguínea y sus órganos internos están completamente desarrollados y hay enzimas antioxidantes disponibles para neutralizar y desintoxicar las especies reactivas de oxígeno (Hansen, 2006). Durante la organogénesis, el embrión es más vulnerable a las especies reactivas de oxígeno (Al-Gubory, Fowler y Garrel, 2010). Elizalde-Velázquez *et al.*, 2021 menciona que las EROS regulan una serie de vías de señalización celular relacionadas con la proliferación, diferenciación y apoptosis desarrollando un papel crucial en el desarrollo celular. Sin embargo, las sustancias no endógenas que estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno y causan EO durante el desarrollo embrionario tienen el potencial de alterar el delicado equilibrio entre antioxidantes y oxidantes.

En esta primera parte del estudio, demostramos que la SUC causa estrés oxidativo en embriones de pez cebra en concentraciones ambientalmente relevantes (0.05 – 116.25 $\mu\text{g} / \text{L}$). De manera similar, Eriksson Wiklund *et al.*, 2014, reportaron que la SUC a 0.0001 – 5 mg / L incrementaron los niveles del ácido

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

tiobarbitúrico y la capacidad de absorción de radicales de oxígeno en *Daphnia magna* después de 24 horas de exposición. De manera semejante, Saucedo-Vence *et al.*, 2017 y Heredia-García *et al.*, 2019 expusieron carpas comunes (*Cyprinus carpio*) a concentraciones ambientalmente relevantes (0.05 y 155 µg / L) durante 12, 24, 48, 72 y 96 h y observaron que incrementó el contenido de lipoperóxidos, hidroperóxidos y la cantidad de proteínas carboniladas en cerebro, músculo, branquias y sangre de la carpa común *Cyprinus Carpio*.

Por otra parte, en las pruebas de estrés oxidativo del experimento dos obtuvimos que el ACE-K y las mezclas generan la producción de EROS en el cerebro de los adultos de pez cebra. Sin embargo, en comparación con la SUC, la información del ACE-K es limitada porque solo dos estudios han informado de los efectos negativos en organismos acuáticos. En el primer estudio, utilizaron adultos de pez dorado (*Carassius auratus*) a 0.1 y 10 mg / L de ACE-K durante siete días y observaron que se incrementaban los niveles de malondialdehído e inhibía la actividad de superóxido dismutasa en el hígado de los peces (Ren *et al.*, 2016). En el segundo estudio, Cruz-Rojas *et al.*, 2019 indicaron que ACE-K en concentraciones de 0.05 y 149 µg / L aumentó los biomarcadores de EO y enzimas antioxidantes en las branquias, el cerebro y los músculos de *Cyprinus carpio* posterior a 12, 24, 48, 72 y 96 horas de exposición. Por otra parte, observamos que el ACE-K generó mayor estrés oxidativo que la SUC. Lo anterior coincide con Shankar, Ahuja y Sriram, 2013 y Shahriar *et al.*, 2020 quienes realizaron estudios en ratones y bacterias, y reportaron que la SUC mostró tener efectos menos dañinos que el ACE-K. No obstante, realizando una comparación entre los compuestos individuales y las mezclas, obtuvimos que las mezclas indujeron una respuesta mucho más tóxica que los edulcorantes por separado. En condiciones fisiológicas se producen especies reactivas de oxígeno que son eliminadas por varios sistemas antioxidantes como mecanismo de defensa interno (Daenen *et al.*, 2018). La mayoría de las veces, las EROS son inofensivas para las células pueden controlar las vías de transducción de señales intracelulares y actuar como mensajeros secundarios en pequeñas concentraciones (Elizalde-Velázquez *et al.*, 2021, 2022). El desequilibrio entre los radicales libres oxidativos y los sistemas antioxidantes causa estrés oxidativo, que resulta en una desregulación metabólica y la oxidación de los productos finales de lípidos, ADN y proteínas (Colín-García *et al.* 2022).

En términos generales, todavía no está claro cómo la SUC y el ACE-K causa estrés oxidativo celular (Figura 41). No obstante, diversos autores han propuesto mecanismos. Tal es el caso de Saucedo-Vence *et al.*, 2017 quienes sugirieron que la biotransformación de SUC, mediada por el sistema de la monooxigenasa microsomal y las enzimas de la familia CYP puede conducir a una respuesta de estrés oxidativo. La SUC al tener cloro en su molécula puede ser eliminado por la enzima CYP CYP3A por su alta especificidad por los fármacos organoclorados (Schiffman y Rother, 2013b). Otro posible mecanismo está relacionado con

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

la interrupción de energía. Según Eriksson Wiklund *et al.*, 2013 la SUC estimuló la alimentación e incrementó la ingesta de calorías en *Daphnia magna*. Además, se ha observado que en roedores y personas, este edulcorante artificial provoca hiperglucemia e hiperinsulinemia (Nakagawa *et al.*, 2009; Pepino *et al.*, 2013). Así mismo, Colín-García *et al.*, 2022 mencionan que esta vía reduce los equivalentes de NADPH y glutatión y aumenta la sensibilidad a las ROS intracelulares. Por otra parte, en cuanto al mecanismo de toxicidad de ACE-K se tiene que Mukherjee y Chakrabartien 1997 plantearon la hipótesis de que ACE-K puede interactuar con el material genético celular. Además, investigaciones recientes han demostrado que ACE-K daña el ADN de los linfocitos periféricos humanos en concentraciones entre 1.25 y 5 ppm (Findikli y Türkoğlu, 2014). De acuerdo con estos dos estudios, Hadidi, Varmira y Soltani, 2022 mediante modelos moleculares y espectroscopia demostraron la formación del complejo ADN- ACE-K mostrando que ACE-K permaneció entre la guanina 10 y 16 en el surco menor de ADN. Las roturas de doble cadena se encuentran entre las lesiones más dañinas del ADN porque pueden causar apoptosis, inactivación de genes importantes y aberraciones cromosómicas graves (Barzilay y Yamamoto, 2004). La desactivación de genes estratégicos puede, en última instancia, conducir al estrés oxidativo, como han establecido varios autores (Semchuk *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2021; Seregina *et al.*, 2022).

También demostramos que la SUC aumentó la producción de SOD y CAT, y estimula la expresión de los genes Nrf1 y Nrf2. La familia Nfe2 incluye ambos genes. El gen Nrf1 regula positivamente las respuestas antioxidantes al aumentar la biosíntesis de glutatión. Por otro lado, Nrf2 forma un dímero con la pequeña proteína Maf, y este complejo se une a varios promotores de genes relacionados con respuestas antioxidantes endógenas (Sant *et al.*, 2017). Aunque la vía AMPK podría activar los genes Nrf1 y Nrf2, todavía es discutible si SUC pudiese activar la vía. Tal es el caso de Wang *et al.*, 2016 quienes demostraron que SUC estimula la respuesta del hipotálamo al ayuno mediante la activación de AMPK. En cambio Bórquez *et al.*, 2021 enfatizaron que no observaron ningún cambio en la activación de AMPK luego de la exposición de la línea celular Caco-2 a SUC. Por lo tanto, en nuestra opinión, se cree que el aumento de la expresión de los genes Nrf1 y Nrf2 se debe en gran medida al estrés oxidativo. Gureev, Shaforostova y Popov, 2019 indicaron que las ROS (especialmente el H₂O₂), son un potente activador de Nrf2. Además, según algunos autores (Sajadimajd y Khazaei, 2018; Haque *et al.*, 2020; Bardallo *et al.*, 2021; Sekine y Motohashi, 2021), el estrés oxidativo provoca una reacción que activa las vías Nrf1 y Nrf2 en una variedad de órganos, células y organismos. Además, la activación de CASP3 y CASP9 puede verse influenciada por el estrés oxidativo. Por ejemplo, nuestros hallazgos demuestran que la expresión de los genes CASP3 y CASP9 en larvas de pez cebra aumenta con concentraciones ambientalmente relevantes de SUC. De manera similar, Heredia-García *et al.*, 2019 demostraron que SUC en concentraciones de 0.05 y 155 µg / L)

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

promovía la actividad enzimática CASP3 en leucocitos de carpa (*Cyprinus carpio*). La CASP9 es la caspasa inicial en la cascada apoptótica mitocondrial que escinde a las CASP3 y otras caspasas en condiciones oxidativas celulares (Zuo *et al.*, 2009). Según Heredia-García *et al.*, 2019, la CASP3 es una enzima ejecutora de apoptosis que organiza la destrucción de las estructuras celulares. Nuestros hallazgos y los mencionados por Heredia-García *et al.*, 2019 indican que CASP3 se activa a través de la vía intrínseca después de la exposición a SUC.

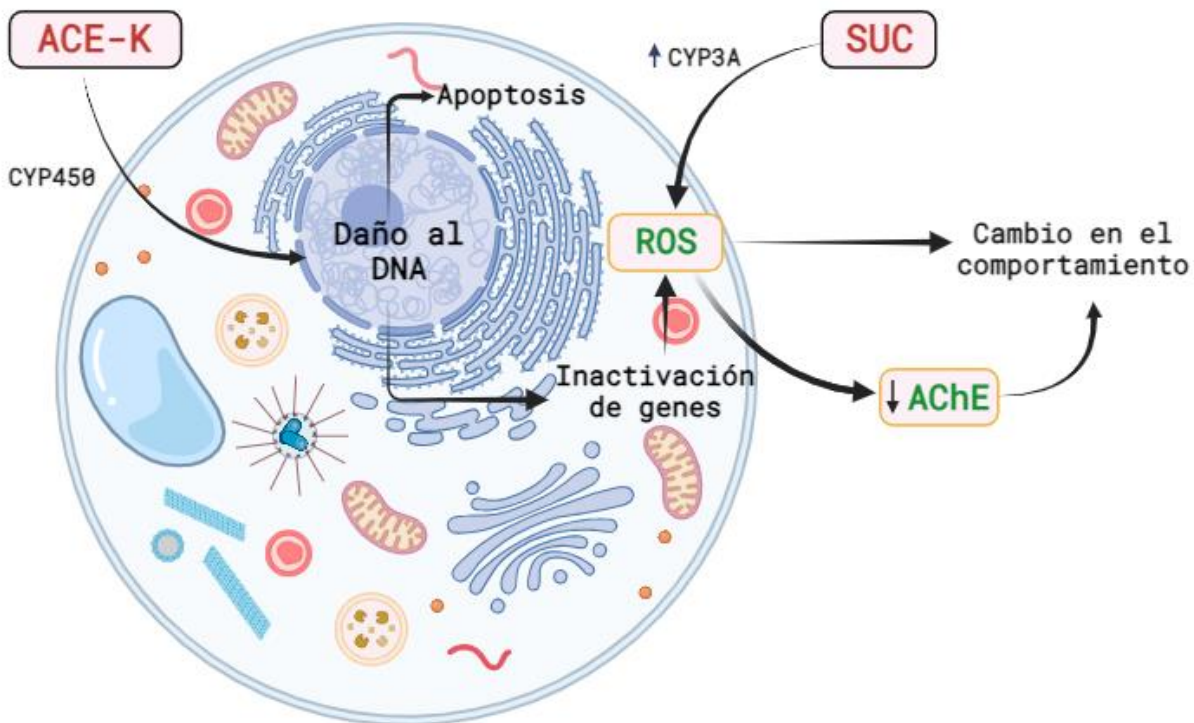


Figura 41. Mecanismo de toxicidad de SUC y ACE-K.

Además, el estrés oxidativo está relacionada con una disminución de la función cognitiva. El cerebro es extremadamente vulnerable al daño de las EROS debido a sus altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, disminución de la actividad antioxidante cerebral y disminución de la regeneración celular (Chandravanshi, Sarma y Akhtar, 2018). Aquí, demostramos cómo la SUC, ACE-K y sus mezclas influyeron en el comportamiento de natación del pez cebra adulto tanto en la prueba Novel Tank como en la de luz/oscuridad. Los peces expuestos en comparación con del grupo de control, en todos los tratamientos de ambas pruebas mostraron un comportamiento ansioso, que se caracterizó por una distancia de recorrido

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

superior significativamente más corta, un tiempo de congelación en el parte superior más largo, un tiempo de residencia más largo en la zona negra y una mayor cantidad de episodios de congelación.

El ACE-K alteró de forma significativa el comportamiento (cuantificada con la prueba del tanque novedoso) del pez cebra en comparación con la SUC. Esta prueba se considera altamente sensible para evaluar el efecto de los contaminantes emergentes en el comportamiento del pez cebra y determinar si el organismo presenta episodios de ansiedad o estrés debido a la exposición a SUC, ACE-K y sus mezclas. Además, los peces expuestos a mezclas mostraron más ansiedad durante la natación que los expuestos a edulcorantes por separado. Así mismo, en nuestro estudio obtuvimos que había cambios en el comportamiento de natación en las dos pruebas. Los cambios en el comportamiento de natación observados en los peces durante los dos ensayos también pueden estar estrechamente relacionados con la inhibición de la actividad de la AChE.

La acetilcolinesterasa (AChE) es una enzima crucial para todos los seres vivos porque inhibe la difusión de la acetilcolina y la estimulación de los receptores cercanos, regulando la transmisión sináptica y la actividad neuronal (Trang y Khandhar, 2021). Así, la inhibición de la acetilcolinesterasa puede provocar parálisis, convulsiones, pérdida de coordinación y otros trastornos del comportamiento (Ren *et al.*, 2015). Además, numerosos estudios, particularmente los realizados en peces, han demostrado que la inhibición de la acetilcolinesterasa está relacionada con la aparición de ansiedad y una disminución de la capacidad de huir de los depredadores (Sandoval-Herrera *et al.*, 2019; Pullaguri y otros, 2020; Elizalde-Velázquez *et al.*, 2022). Aunque no se ha investigado el mecanismo por el cual estos dos compuestos inhiben la AChE, especulamos que puede ser una consecuencia de la respuesta al estrés oxidativo. Por ejemplo, Eriksson Wiklund *et al.*, 2014 observaron correlaciones positivas y negativas entre la AChE y los biomarcadores oxidativos TBARS y ORAC, respectivamente. Además, datos recientes sugieren que las EROS, particularmente el H₂O₂, oxidan los residuos de cisteína de la AChE, reduciendo la actividad de la enzima (Elizalde-Velázquez *et al.*, 2022).

CONCLUSIONES

La SUC, el ACE-K y sus mezclas indujeron EO en embriones y adultos de *Danio rerio*. Además, la SUC indujo diversas malformaciones en los embriones de los peces. Dentro de las malformaciones encontramos edema pericárdico, escoliosis, ausencia de ojos, deformación del saco vitelino, etc. Así mismo, observamos un aumento significativo en la tasa de mortalidad (hasta 56% de muertes en la concentración de 116. 5 µg/l).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Se cree que el EO fue el responsable de las malformaciones y el incremento significativo de los genes de la defensa antioxidante (Nrf1 y Nrf2) y apoptosis (CASP3 y CASP9) en los embriones de *Danio rerio*. De igual forma, las especies reactivas de oxígeno generadas por SUC, ACE-K y sus mezclas alteraron el comportamiento y actividad de la AChE en el cerebro de los adultos de *Danio rerio*. Los edulcorantes indujeron un comportamiento de ansiedad (menor actividad de natación y mayor permanencia de congelamiento) en los organismos. Finalmente, pudimos observar que existe una correlación entre las pruebas de comportamiento evaluadas (prueba de Novel Tank y prueba de Dark and Light), el EO (enzimas antioxidantes y biomarcadores) y la neurotoxicidad (inhibición de la AChE). En general, nuestros resultados sugieren que la SUC y el ACE-K en concentraciones ambientalmente relevantes producen efectos perjudiciales en los organismos acuáticos. Sin embargo, el ACE-K induce un mayor daño que la SUC. No obstante, se requiere de otros estudios para indagar los efectos dañinos en las especies acuáticas.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

REFERENCIAS

- Abbott, E.A. and Helbing, C.C. (2021) ‘Sucralose Affects Thyroid Hormone Signaling in American Bullfrog [*Rana (Lithobates) catesbeiana*] Tadpoles’, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 80(4), pp. 735–744. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00244-021-00838-Y/FIGURES/2>.
- ‘Acute exposure to environmentally relevant concentrations of sucralose disrupts embryonic development and leads to an oxidative stress response in *Danio rerio*’ (no date) *Elsevier* [Preprint]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896972201782X> (Accessed: 11 September 2023).
- Al-Gubory, K.H., Fowler, P.A. and Garrel, C. (2010) ‘The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes’, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(10), pp. 1634–1650. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2010.06.001>.
- Alves, P. *et al.* (no date) ‘Removal of low-calorie sweeteners at five Brazilian wastewater treatment plants and their occurrence in surface water’, *Elsevier* [Preprint]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030147972100623X> (Accessed: 10 September 2023).
- Arbeláez, P. *et al.* (2015) ‘Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry’, *Journal of Chromatography A*, 1393, pp. 106–114. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2015.03.035>.
- Arndorfer, M.A. (no date) ‘The Effect of Sugar and Sucralose on the Embryonic Development of Zebrafish’.
- Anderson-Darling, Ryan-Joiner, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, 2021. tests to verify the normality of data in production processes. *Societas. Revista de Ciencias Sociales y Humanísticas*, vol. 23, núm. 2.
- Bardallo, R.G. *et al.* (2021) ‘Role of PEG35, Mitochondrial ALDH2, and Glutathione in Cold Fatty Liver Graft Preservation: An IGL-2 Approach’, *International Journal of Molecular Sciences 2021*, Vol. 22, Page 5332, 22(10), p. 5332. Available at: <https://doi.org/10.3390/IJMS22105332>.
- Barzilai, A. and Yamamoto, K.I. (2004) ‘DNA damage responses to oxidative stress’, *DNA Repair*, 3(8–9), pp. 1109–1115. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2004.03.002>.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

- Belton, K. *et al.* (2020) 'A review of the environmental fate and effects of acesulfame-potassium', *Wiley Online Library* K Belton, E Schaefer, PD Guiney *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2020 • *Wiley Online Library*, 16(4), pp. 421–437. Available at: <https://doi.org/10.1002/ieam.4248>.
- Berry, C. *et al.* (2016) 'Sucralose Non-Carcinogenicity: A Review of the Scientific and Regulatory Rationale', *Nutrition and Cancer*, 68(8), pp. 1247–1261. Available at: https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1224366/SUPPL_FILE/HNUC_A_1224366_SM4954.DOCX.
- Berset, J., Chemosphere, N.O.- and 2012, undefined (no date) 'Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography–tandem mass', *Elsevier* [Preprint]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004565351200358X> (Accessed: 10 September 2023).
- Bian, X. *et al.* (2017a) 'Gut microbiome response to sucralose and its potential role in inducing liver inflammation in mice', *Frontiers in Physiology*, 8(JUL), p. 272733. Available at: <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2017.00487/BIBTEX>.
- Bian, X. *et al.* (2017b) 'Gut microbiome response to sucralose and its potential role in inducing liver inflammation in mice', *Frontiers in Physiology*, 8(JUL). Available at: <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2017.00487/FULL>.
- Biomédicas, A.Z.G.-R.C. de I. and 2002, undefined (no date) 'El envejecimiento y el estrés oxidativo', *scielo.sld.cuAE Zorrilla García Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 2002 • *scielo.sld.cu* [Preprint]. Available at: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002002000300006&script=sci_arttext&tlng=en (Accessed: 10 September 2023).
- Boix, C. *et al.* (2014) 'Investigation of cannabis biomarkers and transformation products in waters by liquid chromatography coupled to time of flight and triple quadrupole mass spectrometry', *Chemosphere*, 99, pp. 64–71. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2013.10.007>.
- Boix, C. *et al.* (2016) 'Biotransformation of pharmaceuticals in surface water and during waste water treatment: Identification and occurrence of transformation products', *Journal of Hazardous Materials*, 302, pp. 175–187. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2015.09.053>.
- Bradford, M.M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254. Available at: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Buege, J.A. and Aust, S.D. (1978) '[30] Microsomal lipid peroxidation', *Methods in Enzymology*, 52(C), pp. 302–310. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
- Buerge, I.J. *et al.* (2009) 'Ubiquitous occurrence of the artificial sweetener acesulfame in the aquatic environment: An ideal chemical marker of domestic wastewater in groundwater', *Environmental Science and Technology*, 43(12), pp. 4381–4385. Available at: https://doi.org/10.1021/ES900126X/SUPPL_FILE/ES900126X_SI_001.PDF.
- Caiaffo, V. *et al.* (2016) 'Anti-inflammatory, antiapoptotic, and antioxidant activity of fluoxetine', *Wiley Online Library*, 4(3), p. 231. Available at: <https://doi.org/10.1002/prp2.231>.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Camargo Medrano, L. (2019) 'Desarrollo de una técnica electroforética de preconcentración en línea para el análisis de edulcorantes artificiales en muestras de agua.' Available at: <http://200.57.56.70:8080/xmlui/handle/231104/2471> (Accessed: 10 September 2023).

Camila, Y. *et al.* (2021) 'Estudio del impacto ambiental ya la salud humana provocado por edulcorantes artificiales como contaminantes emergentes'. Available at: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/24626> (Accessed: 10 September 2023).

Cantwell, M.G. *et al.* (2019) 'Evaluation of the artificial sweetener sucralose as a sanitary wastewater tracer in Narragansett Bay, Rhode Island, USA', *Marine Pollution Bulletin*, 146, pp. 711–717. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2019.07.036>.

Carolina, A. *et al.* (2017) 'Optimización del ensayo de embriotoxicidad con células madre de ratón mediante el uso de genes biomarcadores de diferenciación celular'. Available at: <http://dspace.umh.es/handle/11000/3777> (Accessed: 10 September 2023).

Carrillo Esper, R. *et al.* (no date) 'Reactive oxygen species, sepsis and metabolic theory of the septic shock', *scielo.org.mx* Carrillo Esper, JA Díaz Ponce Medrano, CA Peña Pérez, OI Flores Rivera *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 2016 • *scielo.org.mx* [Preprint]. Available at: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0026-17422016000100006&script=sci_abstract&tlng=en (Accessed: 10 September 2023).

Cassar, S. *et al.* (2020) 'Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology', *Chemical Research in Toxicology*, 33(1), pp. 95–118. Available at: <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.9B00335>.

Castronovo, S. *et al.* (2017) 'Biodegradation of the artificial sweetener acesulfame in biological wastewater treatment and sandfilters', *Water Research*, 110, pp. 342–353. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2016.11.041>.

Cavagnari, B.M. (2019) 'Edulcorantes no calóricos: características específicas y evaluación de su seguridad', *Archivos argentinos de pediatría*, 117(1), pp. e1–e7. Available at: <https://doi.org/10.5546/AAP.2019.E1>.

Céspedes, J. M. N., Cardoso, G. M. C., & Rodríguez, E. G. (2010). Análisis de Componentes Principales y Análisis de Regresión para datos categóricos. *Aplicación en la Hipertensión Arterial. Revista de Matemática: Teoría y Aplicaciones*, 17(2), 199-230.

Chandravanshi, S., Sarma, S. Sen and Akhtar, M.J. (2018) 'Design of Triple Band Differential Rectenna for RF Energy Harvesting', *IEEE Transactions on Antennas and Propagation*, 66(6), pp. 2716–2726. Available at: <https://doi.org/10.1109/TAP.2018.2819699>.

Chow, C.H. and Leung, K.S.Y. (2019) 'Removing acesulfame with the peroxone process: Transformation products, pathways and toxicity', *Chemosphere*, 221, pp. 647–655. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.01.082>.

Científico-técnico Seguimiento De La Política De Aguas, P. DE, Damià Barceló, L. and José López de Alda, M. (no date) 'Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes', *elaguapotable.com* [Preprint]. Available at: <http://elaguapotable.com/Contaminaci%C3%B3n%20y%20calidad%20qu%C3%ADmica%20del%20agua-los%20contaminantes%20emergentes.pdf> (Accessed: 10 September 2023).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Colín-García, K., Elizalde-Velázquez, G. A., Gómez-Oliván, L. M., Islas-Flores, H., García-Medina, S., & Galar-Martínez, M. (2022). Acute exposure to environmentally relevant concentrations of sucralose disrupts embryonic development and leads to an oxidative stress response in *Danio rerio*. *Science of The Total Environment*, 829, 154689.

Colín-García, K., Elizalde-Velázquez, G. A., Gómez-Oliván, L. M., & García-Medina, S. (2023). Influence of sucralose, acesulfame-k, and their mixture on brain's fish: A study of behavior, oxidative damage, and acetylcholinesterase activity in *Danio rerio*. *Chemosphere*, 340, 139928.

Cruz-Rojas, C. *et al.* (2018) 'Acesulfame potassium: Its ecotoxicity measured through oxidative stress biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio*)', *Elsevier* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.034>.

Daenen, K. *et al.* (2018) 'Oxidative stress in chronic kidney disease', *Pediatric Nephrology* 2018 34:6, 34(6), pp. 975–991. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00467-018-4005-4>.

Dasuri, K. *et al.* (no date) 'Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis', *Elsevier* [Preprint]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584912011410> (Accessed: 10 September 2023).

Demidchik, V. (2015) 'Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology', *Environmental and Experimental Botany*, 109, pp. 212–228. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2014.06.021>.

Dhurandhar, D. *et al.* (no date) 'A histological assessment of effects of sucralose on liver of albino rats', *Elsevier* [Preprint]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S128601151830047X> (Accessed: 10 September 2023).

Dhurandhar, D., Bharihoke, V. and Kalra, S. (2018) 'A histological assessment of effects of sucralose on liver of albino rats', *Morphologie*, 102(338), pp. 197–204. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MORPHO.2018.07.003>.

Dietrich, A. *et al.* (no date) 'Mini review: Will artificial sweeteners discharged to the aqueous environment unintentionally “sweeten” the taste of tap water?', *Elsevier* [Preprint]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666821121000168> (Accessed: 10 September 2023).

Domínguez Gual, M.C. (2015) 'La contaminación ambiental, un tema con compromiso social', *Producción + Limpia*, 10(1), pp. 9–21. Available at: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-04552015000100001&lng=en&nrm=iso&tlng=es (Accessed: 10 September 2023).

Dong, G. *et al.* (2020a) 'Zebrafish neuro-behavioral profiles altered by acesulfame (ACE) within the range of “no observed effect concentrations (NOECs)”', *Chemosphere*, 243, p. 125431. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.125431>.

Dong, G. *et al.* (2020b) 'Zebrafish neuro-behavioral profiles altered by acesulfame (ACE) within the range of “no observed effect concentrations (NOECs)”', *Chemosphere*, 243, p. 125431. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.125431>.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Durán A., S. *et al.* (2012) ‘Stevia (stevia rebaudiana), non-caloric natural sweetener [Estevia (stevia rebaudiana), edulcorante natural y no calórico]’, *Revista Chilena de Nutricion*, 39(4), pp. 203–206. Available at: <https://doi.org/10.4067/S0717-75182012000400015>.

Elizalde-Velázquez, G.A. *et al.* (2021) ‘Antidiabetic drug metformin disrupts the embryogenesis in zebrafish through an oxidative stress mechanism’, *Chemosphere*, 285, p. 131213. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.131213>.

Elizalde-Velázquez, G.A. *et al.* (2022) ‘Chronic exposure to realistic concentrations of metformin prompts a neurotoxic response in *Danio rerio* adults’, *Science of The Total Environment*, 849, p. 157888. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.157888>.

Ens, W. *et al.* (2014) ‘Development, validation, and application of a novel LC-MS/MS trace analysis method for the simultaneous quantification of seven iodinated X-ray contrast media and’, *Springer*, 406(12), pp. 2789–2798. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7712-0>.

Eriksson Wiklund, A.K. *et al.* (2014a) ‘Sucralose Induces Biochemical Responses in *Daphnia magna*’, *PLOS ONE*, 9(4), p. e92771. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0092771>.

Eriksson Wiklund, A.K. *et al.* (2014b) ‘Sucralose Induces Biochemical Responses in *Daphnia magna*’, *PLOS ONE*, 9(4), p. e92771. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0092771>.

Especial, A. *et al.* (2020) ‘Nutrición Hospitalaria Non-caloric sweeteners in women of reproductive age-A consensus document Correspondencia’, *Nutr Hosp*, 37(1), pp. 211–222. Available at: <https://doi.org/10.20960/nh.2870>.

Fernández, J., ... M.D.S.-G.-... andaluza de medicina and 2009, undefined (2009) ‘Estrés oxidativo inducido por el ejercicio’, *redalyc.orgJM Fernández, ME Da Silva-Grigoletto, I Túnez-Fiñana Revista andaluza de medicina del deporte, 2009•redalyc.org*, 2(1), pp. 19–34. Available at: <https://www.redalyc.org/pdf/3233/323327657004.pdf> (Accessed: 10 September 2023).

Findıklı, Z. and Türkoğlu, Ş. (2014) ‘Determination of the effects of some artificial sweeteners on human peripheral lymphocytes using the comet assay’, *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences Full Length Research Paper*, 6(8), pp. 147–152. Available at: <https://doi.org/10.5897/JTEHS2014.0313>.

Fragoso, A.B. *et al.* (2020) ‘Sustitutos del azúcar: nuevos edulcorantes intensivos.’ Available at: <https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/20462> (Accessed: 10 September 2023).

Fu, K. *et al.* (2020a) ‘Sucralose and acesulfame as an indicator of domestic wastewater contamination in Wuhan surface water’, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, p. 109980. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2019.109980>.

Fu, K. *et al.* (2020b) ‘Sucralose and acesulfame as an indicator of domestic wastewater contamination in Wuhan surface water’, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 189, p. 109980. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2019.109980>.

Gan, Z., Sun, H., Wang, R., *et al.* (2013) ‘A novel solid-phase extraction for the concentration of sweeteners in water and analysis by ion-pair liquid chromatography–triple quadrupole mass spectrometry’, *Journal of Chromatography A*, 1274, pp. 87–96. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2012.11.081>.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Gan, Z., Sun, H., Feng, B., *et al.* (2013a) 'Occurrence of seven artificial sweeteners in the aquatic environment and precipitation of Tianjin, China', *Water Research*, 47(14), pp. 4928–4937. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2013.05.038>.

Gan, Z., Sun, H., Feng, B., *et al.* (2013b) 'Occurrence of seven artificial sweeteners in the aquatic environment and precipitation of Tianjin, China', *Water Research*, 47(14), pp. 4928–4937. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2013.05.038>.

García-Almeida, J., ... G.C.F.-N. and 2013, undefined (no date) 'Una visión global y actual de los edulcorantes: aspectos de regulación', *SciELO EspanaJM García-Almeida, GM Casado Fdez, J García AlemánNutrición hospitalaria, 2013•SciELO Espana* [Preprint]. Available at: https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=s0212-16112013001000003&script=sci_arttext (Accessed: 10 September 2023).

Gebicka, L. and Krych-Madej, J. (2019) 'The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress', *Journal of Inorganic Biochemistry*, 197, p. 110699. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2019.110699>.

Gil, M.J. *et al.* (2012) 'Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos', *Producción + Limpia*, 7(2), pp. 52–73. Available at: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-04552012000200005&lng=en&nrm=iso&tlng=es (Accessed: 10 September 2023).

Giner, M.P. (2020) 'Contaminantes emergentes'. Available at: <https://riUNET.upv.es/bitstream/handle/10251/142675/Pach%C3%A9s%20-%20Contaminantes%20emergentes.pdf> (Accessed: 10 September 2023).

Giuliani, M.E. and Regoli, F. (2014) 'Identification of the Nrf2–Keap1 pathway in the European eel *Anguilla anguilla*: Role for a transcriptional regulation of antioxidant genes in aquatic organisms', *Aquatic Toxicology*, 150, pp. 117–123. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2014.03.003>.

Gureev, A.P., Shaforostova, E.A. and Popov, V.N. (2019) 'Regulation of mitochondrial biogenesis as a way for active longevity: Interaction between the Nrf2 and PGC-1 α signaling pathways', *Frontiers in Genetics*, 10(MAY), p. 435733. Available at: <https://doi.org/10.3389/FGENE.2019.00435/BIBTEX>.

Gutiérrez-Salinas, J. *et al.* (2016) 'Determinación de proteínas carboniladas y enzima carbonil reductasa en mujeres mexicanas con cáncer de mama: estudio piloto', *Gaceta Médica de México*, 152(1), pp. 13–18. Available at: www.anmm.org.mx (Accessed: 10 September 2023).

Gvozdić, E. *et al.* (2020) 'Trace analysis of artificial sweeteners in environmental waters, wastewater and river sediments by liquid chromatography–tandem mass spectrometry', *Microchemical Journal*, 157, p. 105071. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2020.105071>.

Hadidi, S., Varmira, K. and Soltani, L. (2022) 'Evaluation of DNA damage induced by acesulfame potassium: spectroscopic, molecular modeling simulations and toxicity studies', <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2105955> [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2105955>.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Hagerman, A.E., Dean, R.T. and Davies, M.J. (2003) 'Radical chemistry of epigallocatechin gallate and its relevance to protein damage', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 414(1), pp. 115–120. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0003-9861\(03\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S0003-9861(03)00158-9).

Haque, M.J. *et al.* (2020) 'Synthesis of ZnO nanoparticles by two different methods & comparison of their structural, antibacterial, photocatalytic and optical properties', *Nano Express*, 1(1), p. 010007. Available at: <https://doi.org/10.1088/2632-959X/AB7A43>.

Heredia-García, G. *et al.* (2019) 'Alterations to DNA, apoptosis and oxidative damage induced by sucralose in blood cells of *Cyprinus carpio*', *Elsevier*, 692, pp. 411–421. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.165>.

Hervé Abdi., Lynne J. Williams. (2010). Prueba de Newman-Keuls y prueba de Tukey. En Neil Salkind (Ed.), *Enciclopedia de diseño de investigación*. Thousand Oaks, CA: Sage.

Hu, L.X. *et al.* (2021) 'What is in Nigerian waters? Target and non-target screening analysis for organic chemicals', *Chemosphere*, 284, p. 131546. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.131546>.

Huang, Y. *et al.* (2021) 'Acesulfame aerobic biodegradation by enriched consortia and *Chelatococcus* spp.: Kinetics, transformation products, and genomic characterization', *Water Research*, 202, p. 117454. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2021.117454>.

Ibi, D., Suzuki, F. and Hiramatsu, M. (2018) 'Effect of AceK (acesulfame potassium) on brain function under dietary restriction in mice', *Physiology & Behavior*, 188, pp. 291–297. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.PHYSBEH.2018.02.024>.

IBM. (2021). Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Available at: <https://www.ibm.com/docs/es/spss-statistics/saas?topic=statistics-kaplan-meier-survival-analysis>

Interna, J.E.G.-A. de medicina and 2001, undefined (no date) 'Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes', *SciELO Espana* [Preprint]. Available at: https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0212-71992001000600010&script=sci_arttext (Accessed: 10 September 2023).

Irazusta, V. *et al.* (2008) 'Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas'. Available at: <https://helvia.uco.es/bitstream/handle/10396/9147/pro4.pdf> (Accessed: 10 September 2023).

Jaén Facultad De Ciencias Experimentales, U. DE and Molina Pérez, I. (2014) 'Estudio del metabolismo de la sucralosa en orina'. Available at: <http://crea.ujaen.es/jspui/handle/10953.1/569> (Accessed: 10 September 2023).

Jiang, Z.Y., Hunt, J. V. and 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), pp. 384–389. Available at: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N).

Kensler, T.W., Wakabayashi, N. and Biswal, S. (2007) 'Cell Survival Responses to Environmental Stresses Via the Keap1-Nrf2-ARE Pathway', <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046>, 47, pp. 89–116. Available at: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.46.120604.141046>.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

- Kerberová, V., Zlámalová Gargošová, H. and Čáslavský, J. (2022) ‘Occurrence and ecotoxicity of selected artificial sweeteners in the Brno city waste water’, *International Journal of Environmental Science and Technology*, 19(9), pp. 9055–9066. Available at: <https://doi.org/10.1007/S13762-021-03771-8/FIGURES/5>.
- Kokotou, M. *et al.* (no date) ‘Artificial sweeteners as emerging pollutants in the environment: analytical methodologies and environmental impact’, *pubs.rsc.org/MG Kokotou, AG Asimakopoulos, NS Thomaidis Analytical Methods*, 2012•*pubs.rsc.org* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1039/C2AY05950A>.
- Lange, F.T., Scheurer, M. and Brauch, H.J. (2012) ‘Artificial sweeteners-A recently recognized class of emerging environmental contaminants: A review’, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(9), pp. 2503–2518. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00216-012-5892-Z/METRICS>.
- Lee, H.J. *et al.* (2019) ‘Occurrence and distribution of pharmaceutical and personal care products, artificial sweeteners, and pesticides in groundwater from an agricultural area in Korea’, *Science of The Total Environment*, 659, pp. 168–176. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.12.258>.
- Leiva Correa, G.E. (2022) ‘Expresión heteróloga y caracterización de una nueva superóxido dismutasa altamente termoestable de *Geobacillus wiegellii* GWE1’. Available at: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/188585> (Accessed: 10 September 2023).
- Levine, R.L. *et al.* (1994) ‘[37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins’, *Methods in Enzymology*, 233(C), pp. 346–357. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).
- Li, A., Schmitz, O., *et al.* (no date) ‘Photocatalytic transformation of acesulfame: Transformation products identification and embryotoxicity study’, *Elsevier* [Preprint]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135415303626> (Accessed: 10 September 2023).
- Li, A., Wu, P., *et al.* (no date) ‘Transformation of acesulfame in chlorination: kinetics study, identification of byproducts, and toxicity assessment’, *Elsevier* [Preprint]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135417302439> (Accessed: 10 September 2023).
- Li, A.J. *et al.* (2017) ‘Transformation of acesulfame in chlorination: Kinetics study, identification of byproducts, and toxicity assessment’, *Water Research*, 117, pp. 157–166. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2017.03.053>.
- Lin, C.H. *et al.* (2021) ‘Consumption of Non-Nutritive Sweetener, Acesulfame Potassium Exacerbates Atherosclerosis through Dysregulation of Lipid Metabolism in ApoE^{-/-} Mice’, *Nutrients* 2021, Vol. 13, Page 3984, 13(11), p. 3984. Available at: <https://doi.org/10.3390/NU13113984>.
- Loos, R. *et al.* (2013) ‘EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents’, *Water Research*, 47(17), pp. 6475–6487. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2013.08.024>.
- Magnuson, B.A. *et al.* (2016) ‘Biological fate of low-calorie sweeteners’, *Nutrition Reviews*, 74(11), pp. 670–689. Available at: <https://doi.org/10.1093/NUTRIT/NUW032>.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Magnuson, B.A., Roberts, A. and Nestmann, E.R. (2017a) 'Critical review of the current literature on the safety of sucralose', *Food and Chemical Toxicology*, 106, pp. 324–355. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2017.05.047>.

Magnuson, B.A., Roberts, A. and Nestmann, E.R. (2017b) 'Critical review of the current literature on the safety of sucralose', *Food and Chemical Toxicology*, 106, pp. 324–355. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2017.05.047>.

Membrillo Ortega, A. *et al.* (2003) 'Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: Una revisión', *Interciencia*, 28(12), pp. 699–704. Available at: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442003001200006&lng=es&nrm=iso&tlng=es (Accessed: 10 September 2023).

México, R.V.-V.-A. en and 2017, undefined (no date) 'Pez cebra (*Danio rerio*) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica', *scielo.org.mxRA Vargas-VargasAnestesia en México, 2017*•*scielo.org.mx* [Preprint]. Available at: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S2448-87712017000400086&script=sci_arttext (Accessed: 10 September 2023).

Miranda, E.C., de, J.C.H.-R.C. and 2008, undefined (no date) 'La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso: Realidad o mito', *scielo.sld.cuE Céspedes Miranda, J Castillo HerreraRevista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 2008*•*scielo.sld.cu* [Preprint]. Available at: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-03002008000200003&script=sci_arttext (Accessed: 10 September 2023).

Misra, H.P. and Fridovich, I. (1972) 'The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase.', *Journal of Biological Chemistry*, 247(10), pp. 3170–3175. Available at: [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)45228-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)45228-9).

Molina Arias, M., & Sangrador, O. (2022). Estudios de supervivencia. Método de Kaplan-Meier. *Estudios*, 18(2).

Mora, A. *et al.* (2022) 'Effects of wastewater irrigation on groundwater quality: An overview', *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 25, p. 100322. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.COESH.2021.100322>.

Mukherjee, A. and Chakrabarti, J. (1997) 'In vivo cytogenetic studies on mice exposed to acesulfame-K—A non-nutritive sweetener', *Food and Chemical Toxicology*, 35(12), pp. 1177–1179. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)85469-5](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)85469-5).

Mussali-Galante, P., ... E.T.-S.-R. internacional and 2013, undefined (no date) 'Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems', *scielo.org.mxP Mussali-Galante, E Tovar-Sánchez, M Valverde, E Rojas Del CastilloRevista internacional de contaminación ambiental, 2013*•*scielo.org.mx* [Preprint]. Available at: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0188-49992013000100008&script=sci_arttext&tlng=en (Accessed: 10 September 2023).

Naik, A.Q., Zafar, T. and Shrivastava, V.K. (2021) 'Environmental Impact of the Presence, Distribution, and Use of Artificial Sweeteners as Emerging Sources of Pollution', *Journal of Environmental and Public Health*, 2021. Available at: <https://doi.org/10.1155/2021/6624569>.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

- Nakagawa, Y. *et al.* (2009) 'Sweet Taste Receptor Expressed in Pancreatic β -Cells Activates the Calcium and Cyclic AMP Signaling Systems and Stimulates Insulin Secretion', *PLOS ONE*, 4(4), p. e5106. Available at: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0005106>.
- Nandi, A. *et al.* (2019) 'Role of Catalase in Oxidative Stress- And Age-Associated Degenerative Diseases', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/9613090>.
- Nishimura, Y. *et al.* (2016) 'Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing', *Congenital Anomalies*, 56(1), pp. 18–27. Available at: <https://doi.org/10.1111/CGA.12142>.
- Oppenheimer, J. *et al.* (2011) 'Occurrence and suitability of sucralose as an indicator compound of wastewater loading to surface waters in urbanized regions', *Water Research*, 45(13), pp. 4019–4027. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2011.05.014>.
- Ordóñez, E.Y. *et al.* (2012) 'Determination of artificial sweeteners in water samples by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry', *Journal of Chromatography A*, 1256, pp. 197–205. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2012.07.073>.
- Palomino Echeverría, S. (2018) 'Mantenimiento y cría de peces cebra (*Danio rerio*) en el laboratorio: reproducción natural y artificial'. Available at: <https://academica-e.unavarra.es/handle/2454/29910> (Accessed: 10 September 2023).
- Pasqualli, T. *et al.* (2020) 'Sucralose causes non-selective CD4 and CD8 lymphotoxicity via probable regulation of the MAPK8/APTX/EID1 genes: An in vitro/in silico study', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 47(10), pp. 1751–1757. Available at: <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13362>.
- Perkola, N. and Sainio, P. (2014) 'Quantification of four artificial sweeteners in Finnish surface waters with isotope-dilution mass spectrometry', *Environmental Pollution*, 184, pp. 391–396. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2013.09.017>.
- Del Pozo, S. *et al.* (2022) 'Potential Effects of Sucralose and Saccharin on Gut Microbiota: A Review', *Nutrients* 2022, Vol. 14, Page 1682, 14(8), p. 1682. Available at: <https://doi.org/10.3390/NU14081682>.
- Praveena, S.M., Cheema, M.S. and Guo, H.R. (2019) 'Non-nutritive artificial sweeteners as an emerging contaminant in environment: A global review and risks perspectives', *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, pp. 699–707. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2018.12.048>.
- Pública, S.A.-R.F.N. de S. and 2012, undefined (no date) 'Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana', *scielo.org.coSS ArangoRevista Facultad Nacional de Salud Pública, 2012•scielo.org.co* [Preprint]. Available at: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-386X2012000100009&script=sci_arttext (Accessed: 10 September 2023).
- Punturat, V. and Huang, K.L. (2016) 'Degradation of acesulfame in aqueous solutions by electro-oxidation', *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 63, pp. 286–294. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2016.03.016>.
- Radi, R. *et al.* (1991) 'Detection of catalase in rat heart mitochondria.', *Journal of Biological Chemistry*, 266(32), pp. 22028–22034. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54740-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54740-2).

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Razali, N. M., & Wah, Y. B. (2011). Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests. *Journal of statistical modeling and analytics*, 2(1), 21-33.

Ren, H. *et al.* (2020) 'Screening of organic micropollutants in raw and drinking water in the Yangtze River Delta, China', *Environmental Sciences Europe*, 32(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/S12302-020-00342-5>.

Ren, Y. *et al.* (no date) 'The oxidative stress in the liver of *Carassius auratus* exposed to acesulfame and its UV irradiance products', *Elsevier* [Preprint]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716314929> (Accessed: 10 September 2023).

Rica, C.C.C.-M.L. de C. and 2019, undefined (no date a) 'Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo', *scielo.sa.cr* [Preprint]. Available at: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-00152019000100091&script=sci_arttext (Accessed: 10 September 2023).

Rica, C.C.C.-M.L. de C. and 2019, undefined (no date b) 'Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo', *scielo.sa.cr* *Carvajal Carvajal Medicina Legal de Costa Rica, 2019*•*scielo.sa.cr* [Preprint]. Available at: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S1409-00152019000100091&script=sci_arttext (Accessed: 10 September 2023).

Richardson, S.D. and Ternes, T.A. (2014) 'Water analysis: Emerging contaminants and current issues', *Analytical Chemistry*, 86(6), pp. 2813–2848. Available at: https://doi.org/10.1021/AC500508T/ASSET/AC500508T.FP.PNG_V03.

Robertson, W.D. *et al.* (2016) 'Degradation of sucralose in groundwater and implications for age dating contaminated groundwater', *Water Research*, 88, pp. 653–660. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2015.10.051>.

Romano, L.A. (2016) 'Bioindicadores de Contaminación Acuática en Peces', *Revista AquaTIC*, 0(7). Available at: <http://revistaaquatic.com/ojs/index.php/aquatic/article/view/53> (Accessed: 10 September 2023).

Ryu, J. *et al.* (2014) 'Determination of micropollutants in combined sewer overflows and their removal in a wastewater treatment plant (Seoul, South Korea)', *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(5), pp. 3239–3251. Available at: <https://doi.org/10.1007/S10661-013-3613-5/METRICS>.

Sánchez Ramírez, J.E. and Resumen, (2018)

'Contaminantes emergentes en nuestros ecosistemas acuáticos: enemigos invisibles', *Ingeniería y Región*, 19, pp. 18–21. Available at: <https://doi.org/10.25054/22161325.1750>.

Sang, Z. *et al.* (2014a) 'Evaluating the environmental impact of artificial sweeteners: A study of their distributions, photodegradation and toxicities', *Water Research*, 52, pp. 260–274. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2013.11.002>.

Sang, Z. *et al.* (2014b) 'Evaluating the environmental impact of artificial sweeteners: A study of their distributions, photodegradation and toxicities', *Water Research*, 52, pp. 260–274. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2013.11.002>.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Sant, K.E. *et al.* (2017) 'The role of Nrf1 and Nrf2 in the regulation of glutathione and redox dynamics in the developing zebrafish embryo', *Redox Biology*, 13, pp. 207–218. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2017.05.023>.

Saputra, F. *et al.* (2021) 'Acute and Sub-Chronic Exposure to Artificial Sweeteners at the Highest Environmentally Relevant Concentration Induce Less Cardiovascular Physiology Alterations in Zebrafish Larvae', *Biology* 2021, Vol. 10, Page 548, 10(6), p. 548. Available at: <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10060548>.

Saucedo-Vence, K. *et al.* (2017) 'Toxicological hazard induced by sucralose to environmentally relevant concentrations in common carp (*Cyprinus carpio*)', *Elsevier*, 575, pp. 347–357. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.230>.

Scheurer, M. *et al.* (2011) 'Correlation of six anthropogenic markers in wastewater, surface water, bank filtrate, and soil aquifer treatment', *Journal of Environmental Monitoring*, 13(4), pp. 966–973. Available at: <https://doi.org/10.1039/C0EM00701C>.

Scheurer, M. *et al.* (2012) 'Structural elucidation of main ozonation products of the artificial sweeteners cyclamate and acesulfame', *Environmental Science and Pollution Research*, 19(4), pp. 1107–1118. Available at: <https://doi.org/10.1007/S11356-011-0618-X/METRICS>.

Scheurer, M. *et al.* (2014) 'Transformation of the artificial sweetener acesulfame by UV light', *Science of The Total Environment*, 481(1), pp. 425–432. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2014.02.047>.

Scheurer, M. *et al.* (no date) 'Performance of conventional multi-barrier drinking water treatment plants for the removal of four artificial sweeteners', *Elsevier* [Preprint]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135410002459> (Accessed: 10 September 2023).

Schiffman, S.S. and Rother, K.I. (2013a) 'Sucralose, A Synthetic Organochlorine Sweetener: Overview Of Biological Issues', <http://dx.doi.org/10.1080/10937404.2013.842523>, 16(7), pp. 399–451. Available at: <https://doi.org/10.1080/10937404.2013.842523>.

Schiffman, S.S. and Rother, K.I. (2013b) 'Sucralose, A Synthetic Organochlorine Sweetener: Overview Of Biological Issues', <http://dx.doi.org/10.1080/10937404.2013.842523>, 16(7), pp. 399–451. Available at: <https://doi.org/10.1080/10937404.2013.842523>.

Sekine, H. and Motohashi, H. (2021) 'Roles of CNC Transcription Factors NRF1 and NRF2 in Cancer', *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 541, 13(3), p. 541. Available at: <https://doi.org/10.3390/CANCERS13030541>.

Semchuk, N.M. *et al.* (2009) 'Inactivation of genes, encoding tocopherol biosynthetic pathway enzymes, results in oxidative stress in outdoor grown *Arabidopsis thaliana*', *Plant Physiology and Biochemistry*, 47(5), pp. 384–390. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2009.01.009>.

Seregina, T.A. *et al.* (2022) 'The Inactivation of LPS Biosynthesis Genes in *E. coli* Cells Leads to Oxidative Stress', *Cells* 2022, Vol. 11, Page 2667, 11(17), p. 2667. Available at: <https://doi.org/10.3390/CELLS11172667>.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

Sérodes, J. *et al.* (no date) 'Tracking domestic wastewater and road de-icing salt in a municipal drinking water reservoir: Acesulfame and chloride as co-tracers', *Elsevier* [Preprint]. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135421006916> (Accessed: 10 September 2023).

Shahriar, S. *et al.* (2020) 'Aspartame, acesulfame K and sucralose- influence on the metabolism of *Escherichia coli*', *Metabolism Open*, 8, p. 100072. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.METOP.2020.100072>.

Shankar, P., Ahuja, S. and Sriram, K. (2013) 'Non-nutritive sweeteners: Review and update', *Nutrition*, 29(11–12), pp. 1293–1299. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.NUT.2013.03.024>.

Sharma, V.K., Oturan, M. and Kim, H. (2014) 'Oxidation of artificial sweetener sucralose by advanced oxidation processes: A review', *Environmental Science and Pollution Research*, 21(14), pp. 8525–8533. Available at: <https://doi.org/10.1007/S11356-014-2786-Y/METRICS>.

Stoddard, K.I. and Huggett, D.B. (2014) 'Early life stage (ELS) toxicity of sucralose to fathead minnows, *Pimephales promelas*.', *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 93(4), pp. 383–387. Available at: <https://doi.org/10.1007/S00128-014-1348-9>.

Subedi, B. and Kannan, K. (2014) 'Fate of artificial sweeteners in wastewater treatment plants in New York State, U.S.A.', *Environmental Science and Technology*, 48(23), pp. 13668–13674. Available at: https://doi.org/10.1021/ES504769C/ASSET/IMAGES/MEDIUM/ES-2014-04769C_0004.GIF.

Sweeteners, High-Intensity - Chemical Economics Handbook (CEH) | S&P Global (no date). Available at: <https://www.spglobal.com/commodityinsights/en/ci/products/high-intensity-sweeteners-chemical-economics-handbook.html> (Accessed: 30 October 2023).

Swenberg, J.A. *et al.* (2008) 'Biomarkers in toxicology and risk assessment: Informing critical dose-response relationships', *Chemical Research in Toxicology*, 21(1), pp. 253–265. Available at: https://doi.org/10.1021/TX700408T/ASSET/IMAGES/MEDIUM/TX-2007-00408T_0010.GIF.

Tanguay, R.L. (2018) 'The Rise of Zebrafish as a Model for Toxicology', *Toxicological Sciences*, 163(1), pp. 3–4. Available at: <https://doi.org/10.1093/TOXSCI/KFX295>.

Tejada, C. *et al.* (no date) 'Contaminantes emergentes en aguas: metabolitos de fármacos. Una revisión.', *revistas.unimilitar.edu.co* [Preprint]. Available at: <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/view/341> (Accessed: 10 September 2023).

Tenorio Chávez, P. (2020) 'Embriotoxicidad y teratogenicidad inducida por el influente y efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales del Hospital Ángeles de Puebla sobre *Danio rerio*'. Available at: <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/105628> (Accessed: 10 September 2023).

Tran, N.H. *et al.* (2014) 'Suitability of artificial sweeteners as indicators of raw wastewater contamination in surface water and groundwater', *Water Research*, 48(1), pp. 443–456. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2013.09.053>.

Tran, N.H. *et al.* (2015) 'Sorption and biodegradation of artificial sweeteners in activated sludge processes', *Bioresource Technology*, 197, pp. 329–338. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2015.08.083>.

Efectos tóxicos inducidos por concentraciones ambientalmente relevantes de sucralosa, acesulfame- k y sus mezclas en *Danio rerio*.

- Tran, N.H., Hu, J. and Ong, S.L. (2013a) 'Simultaneous determination of PPCPs, EDCs, and artificial sweeteners in environmental water samples using a single-step SPE coupled with HPLC–MS/MS and isotope dilution', *Talanta*, 113, pp. 82–92. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2013.03.072>.
- Tran, N.H., Hu, J. and Ong, S.L. (2013b) 'Simultaneous determination of PPCPs, EDCs, and artificial sweeteners in environmental water samples using a single-step SPE coupled with HPLC–MS/MS and isotope dilution', *Talanta*, 113, pp. 82–92. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2013.03.072>.
- Valenzuela B., A. and Valenzuela B, R. (2015) 'La innovación en la industria de alimentos: Historia de algunas innovaciones y de sus innovadores', *Revista chilena de nutrición*, 42(4), pp. 404–408. Available at: <https://doi.org/10.4067/S0717-75182015000400013>.
- VENCE, K.S. (2017) 'EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR SUCRALOSA EN *Cyprinus carpio* Y DETERMINAR SU EFECTO EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y'. Available at: <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/68342> (Accessed: 10 September 2023).
- Wiklund, A.-K.E., Guo, X. and Gorokhova, E. (2023) 'Cardiotoxic and neurobehavioral effects of sucralose and acesulfame in *Daphnia*: Toward understanding ecological impacts of artificial sweeteners', *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 273, p. 109733. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2023.109733>.
- Wu, M. *et al.* (2014) 'Direct large volume injection ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of artificial sweeteners sucralose and acesulfame in well water', *Journal of Chromatography A*, 1359, pp. 156–161. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2014.07.035>.
- Yang, Y. *et al.* (2021) 'Sucralose, a persistent artificial sweetener in the urban water cycle: insights into occurrence, chlorinated byproducts formation, and human exposure', *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), p. 105293. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.105293>.
- Yin, K. *et al.* (2017) 'Oxidative transformation of artificial sweetener acesulfame by permanganate: Reaction kinetics, transformation products and pathways, and ecotoxicity', *Journal of Hazardous Materials*, 330, pp. 52–60. Available at: <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2017.02.012>.
- ZAMBRANO, M.I.G. DE (2016) 'LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y ENFERMEDADES CRONICAS DEGENERATIVAS', *Tribuna del Investigador*, 17(1). Available at: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ti/article/view/12666 (Accessed: 10 September 2023).
- Zapata, L. (2015) 'ESTUDIO COMPARATIVO DE ENDULCORANTES NO CALÓRICOS A BASE DE STEVIA Y SUCRALOSA Noviembre 2015'. Available at: <https://www.odecu.cl/wp-content/uploads/2018/08/2016-estudio-edulcorantes.pdf> (Accessed: 10 September 2023).
- Zhou, R. *et al.* (2020) 'Occurrence of Emerging Contaminant Acesulfame in Water Treatment System and Its Degradation during Ozone Oxidation', <https://doi.org/10.1080/01919512.2020.1770573>, 43(2), pp. 185–194. Available at: <https://doi.org/10.1080/01919512.2020.1770573>.
- Zuo, Y. *et al.* (2009) 'Oxidative modification of caspase-9 facilitates its activation via disulfide-mediated interaction with Apaf-1', *Cell Research* 2009 19:4, 19(4), pp. 449–457. Available at: <https://doi.org/10.1038/cr.2009.19>.