



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD INDUCIDA POR  
GLIBENCLAMIDA Y SU INFLUENCIA EN LA CALIDAD DE  
LA CARNE DE *Cyprinus carpio*”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

M. EN I. ERICKA MARÍA GUADALUPE MARTÍNEZ VIVEROS

DIRIGIDA POR:

DR. OCTAVIO DUBLÁN GARCÍA.

DR. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN.

DRA. MARCELA GALAR MARTÍNEZ.

11 de Octubre, 2018



*“He aquí que el temor del Señor es la sabiduría,  
Y el apartarse del mal, la inteligencia” Job 28:28*

## **DEDICADO A:**

### ***Dios***

*Porque contigo soy todo y sin ti no soy nada, tú me conoces,  
has entendido mis pensamientos, y todos mis caminos te son  
conocidos, porque tú formaste mis entrañas, te alabaré  
porque formidables y maravillosas son tus obras...  
Salmo 139.*

### ***Paco, Emmanuel y Naomi***

*Mis grandes amores y mi impulso a seguir adelante....*

### ***Mis queridos padres***

*Evita y Miguel  
siempre los llevo en mi corazón..*

## **AGRADECIMIENTOS:**

*A Dios, porque tú me elegiste y no yo a ti, hasta aquí me has sostenido y sé que no me dejarás ni desampararás hasta terminar tu obra en mí.*

*A todas aquellas personas que ocupan un lugar importante en este proyecto:*

*En especial a mis asesores: Dr. Octavio Dublán García, Dr. Leobardo M. Gómez Oliván y Dra. Marcela Galar Martínez, por su confianza al brindarme la oportunidad de recurrir a su amplia experiencia y conocimientos, por sus atinadas observaciones y asesorías para poder concretar este proyecto.*

*Dra. Alicia Reyes García; Dra. Imelda García Argueta; Dra. Adriana Villanueva Carvajal y Dra. Hariz Islas Flores, integrantes del jurado, por dedicar un tiempo a la revisión de este trabajo, cada valioso comentario, revisión, idea y observación, aportó una mejora en el trabajo escrito.*

*Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento de este proyecto No. De registro DSCSQM – 0717 y a los Laboratorios de Ecotoxicología y de Química de Alimentos de la Universidad Autónoma del Estado de México. (UAEMex).*

*A todos los que no mencioné y que de alguna manera contribuyeron en la realización de éste proyecto, gracias por tanto.*



Universidad Autónoma del Estado de México  
Facultad de Química

Oficio No. 237/2018

Toluca, México, 21 de septiembre de 2018

SEÑORES PROFESORES MIEMBROS DEL  
JURADO DE LA EVALUACIÓN DE GRADO  
ERICKA MARÍA GUADALUPE MARTÍNEZ VIVEROS  
P R E S E N T E

El que suscribe Director de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que se fijó como **FECHA DE LA EVALUACIÓN DE GRADO**, el próximo **jueves 11 de octubre de 2018, a las 12:00 hrs**, en la sala 7 (tercer piso) de la Facultad de Química, por lo que se les solicita su puntual asistencia.

	FIRMA
Dra. Alicia Reyes García <b>PRESIDENTE</b>	
Dr. Octavio Dublán García <b>SECRETARIO</b>	
Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván <b>PRIMER VOCAL</b>	
Dra. Imelda García Argueta <b>SEGUNDO VOCAL</b>	
Dr. Adriana Villanueva Carvajal <b>TERCER VOCAL</b>	
Dra. Hariz Islas Flores <b>SUPLENTE</b>	
Dra. Nelly Ma. de la Paz González Rivas <b>SUPLENTE</b>	

ATENTAMENTE  
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2018, Año del 190 aniversario de la Universidad Autónoma del Estado de México"

DR. ERICK CUEVAS YÁÑEZ  
DIRECTOR  
FACULTAD DE QUÍMICA



U.A.E.M.  
FACULTAD DE QUÍMICA  
DIRECCIÓN

Facultad de Química de la UAEM,  
Paseo Colón Esq. Paseo Toluca,  
Col. Residencial Colón, C.P. 50220,  
Toluca, Estado de México  
Tél. (722) 217209 / 217290  
fqm@uaemex.mx



## INDICE GENERAL

	Página
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	5
<b>2. ANTECEDENTES</b>	6
2.1 Contaminación por fármacos en aguas residuales	6
2.2 Diabetes y consumo de fármacos hipoglucemiantes	9
2.3 Glibenclamida	11
2.3.1 Mecanismo de acción	12
2.3.2 Toxocinética	12
2.3.3 Efectos tóxicos de la glibenclamida	13
2.4 <i>Cyprinus carpio</i>	13
2.4.1 Composición nutrimental	14
2.4.2 Importancia en México	15
2.4.3 Calidad de la carne de pescado	15
2.5 Bioensayo	17
2.5.1 Bioindicadores	17
2.5.2 Biomarcadores	18
2.6 Estrés oxidativo y estrés nitrosativo	20
2.6.1 El oxígeno molecular	21
2.6.2 Radicales Libres	21
2.7 Estrés oxidativo inducido por fármacos en peces	24
2.8 Efecto del estrés oxidativo en el músculo	27
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	29
<b>4. HIPÓTESIS</b>	30
<b>5. OBJETIVOS</b>	30
5.1 Objetivo General	30
5.2 Objetivos Específicos:	30
<b>6. METODOLOGÍA.</b>	31
6.1 Materiales y método Sustancias de prueba	31
6.2 Obtención y aclimatación de la especie	32
6.3 Determinación de la toxicidad aguda (Concentración Letal Media, CL <sub>50</sub> )	32
6.4 Determinación de estrés oxidativo	33
6.5 Determinación de concentración de Hidroperóxidos (CHPx)	34
6.6 Análisis de malondialdehído (MDA)	35
6.7 Determinación de concentración de proteínas carboniladas (CPx)	35
6.8 Determinación de actividad de SOD	36
6.9 Determinación de la actividad de CAT	37
6.10 Determinación de proteínas totales	37
6.11 Cuantificación de glibenclamida por cromatografía de líquidos-tándem espectrofotometría de masas (HPLC-MS/MS)	38

	Página
6.11.1 Equipo y condiciones cromatográficas	39
6.11.2 Extracción en fase sólida	39
6.12 Correlación de Pearson	40
6.13 Análisis Físicoquímicos	40
6.13.1 Medición pH	40
6.13.2 Análisis de Capacidad de Retención de agua (CRA)	41
6.13.3 Solubilidad	41
6.13.4 Determinación de sulfhidrilos totales –SH	41
6.14 Análisis de Esfuerzo al corte (W-B)	42
6.15 Concentración de proteína	42
6.16 Formación de gel	42
6.17 Análisis de perfil de textura TPA	43
6.18 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	43
6.19 2.13 Análisis estadístico	44
<b>7. RESULTADOS</b>	44
7.1 Concentración Letal Media CL <sub>50</sub> – 96h	44
7.2 Concentración de Hidroperóxidos (CHPx)	44
7.3 Concentración de malondialdehído (MDA)	48
7.4 Concentración de Proteínas carboniladas	52
7.5 Actividad de superóxido dismutasa (SOD)	56
7.6 Actividad de catalasa (CAT)	59
7.7 Cuantificación de GLB en agua y tejidos de carpa común <i>Cyprinus carpio</i>	63
7 Correlación de Pearson	65
7.9 Físicoquímicos en músculo	67
7.9.1 Análisis de pH	67
7.9.2 Análisis de Capacidad de retención de agua (CRA )	68
7.9.3 Análisis de Solubilidad:	69
7.9.4 Análisis de sulfhidrilos (-SH)	70
7.9.5 Análisis de esfuerzo al corte (W-B)	71
7.9.6 Análisis de perfil de textura (TPA)	72
7.10 Electroforesis	75
<b>8. DISCUSIÓN</b>	76
<b>9. CONCLUSIONES</b>	89
<b>10. PERSPECTIVAS</b>	89
<b>11. REFERENCIAS</b>	90
<b>12. ANEXOS</b>	104
12.1 Publicación del 1er artículo	104
12.2 Envío del 2º artículo	116

## INDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Tratamientos previos utilizados por los casos de hospitalización de Diabetes Mellitus Tipo 2, México, Enero-marzo 2013. Fuente: SVEHDM/DGAE/Secretaria de salud/México, enero marzo 2013.	10
<b>Figura 2.</b> Hipoglucemiantes orales prescritos para pacientes con DM2 en México –IMSS. Fuente: Zavala, 2014	11
<b>Figura 3.</b> Estructura química de la glibenclamida. Fuente: Goodman & Gilman’s (2008).	12
<b>Figura 4.</b> <i>Cyprinus carpio</i> . Fuente: <a href="http://www.all-fish-seafood-recipes.com/index.cfm/fish/Carp/">http://www.all-fish-seafood-recipes.com/index.cfm/fish/Carp/</a>	14
<b>Figura 5.</b> Producción de Carpa en México 2013 – 2014. Fuente: SAGARPA & CONAPESCA, 2014.	15
<b>Figura 6.</b> Reacción de Lipoperoxidación. Fuente: Eymard et al., (2009)	23
<b>Figura 7.</b> Reacciones de oxidación de proteínas. Fuente: Estévez, (2011).	24
<b>Figura 8.</b> Esquema de oxidorreducción de un xenobiótico. Fuente: Ochoa D. & González J., 2008	26
<b>Figura 9.</b> Contenido de hidroperóxidos (CHPx) en sangre, hígado, branquias, cerebro y músculo de <i>Cyprinus carpio</i> expuesta a GLB. Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis estrés oxidativo.	46
<b>Figura 10.</b> Concentración de malondialdehido (MAD) en sangre, hígado, branquias, cerebro y músculo de <i>Cyprinus carpio</i> expuesta a tres concentraciones de GLB. Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis estrés oxidativo.	50
<b>Figura 11.</b> Concentración de Proteínas Carboniladas (CPx) en sangre, hígado, branquias, cerebro y músculo de <i>Cyprinus carpio</i> expuesta a tres concentraciones de GLB. Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis estrés oxidativo.	53
<b>Figura 12.</b> Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) en sangre, hígado, branquias, cerebro y músculo de <i>Cyprinus carpio</i> expuesta a tres concentraciones de GLB. Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis estrés oxidativo.	57
<b>Figura 13.</b> Actividad de Catalasa (CAT) en sangre, hígado, branquias, cerebro y músculo de <i>Cyprinus carpio</i> expuesta a tres concentraciones de GLB. Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis estrés oxidativo.	61
<b>Figura 14.</b> Valores de pH en músculo de <i>Cyprinus carpio</i> . Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis Físicoquímicos.	68
<b>Figura 15.</b> Valores de CRA en músculo de <i>Cyprinus carpio</i> . Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis Físicoquímicos.	69

	Página
<b>Figura 16.</b> Comportamiento de solubilidad en músculo de <i>Cyprinus carpio</i> . Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis Fisicoquímicos.	70
<b>Figura 17.</b> Contenido de grupos sulfhidrilos (-SH). Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis Fisicoquímicos.	71
<b>Figura 18.</b> Valores de esfuerzo al corte (N). Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis Fisicoquímicos y texturales.	72
<b>Figura 19.</b> Formación de gel para análisis de TPA en músculo de <i>Cyprinus carpio</i> expuesta a dos concentraciones de GLB (C1: 50 ng/L y C2: 100 ng/L) para 0, 24, 48, 72 y 96 h. Fuente: Archivo de fotografías de resultados de la fase experimental de análisis Fisicoquímicos y texturales.	74
<b>Figura 20.</b> Electroforesis de músculo de <i>Cyprinus carpio</i> . Fuente: Archivo de fotografías resultados de la fase experimental de electroforesis.	75
<b>Figura 21.</b> Mecanismo propuesto de generación de estrés oxidativo en <i>Cyprinus carpio</i> . Fuente: Archivo de imágenes de resultados de la fase experimental de estrés oxidativo.	82
<b>Figura 22.</b> Mecanismos propuestos de daños ocasionados por a) Radicales Libres; b) Peróxido de hidrógeno, c) oxígeno singulete y d) MDA en proteínas del músculo de <i>Cyprinus carpio</i> . Fuente: Papuc (2017).	87

## INDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Composición química proximal de la carne de <i>Cyprinus carpio</i> . Fuente: Spuch A. & Judis M, 2004.	15
<b>Tabla 2.</b> Concentración de GLB en agua y las diferentes matrices biológicas ensayadas. Fuente: Archivo de resultados de análisis de estrés oxidativo.	64
<b>Tabla 3.</b> Correlación de Pearson entre las concentraciones de GLB y los biomarcadores de estrés oxidativo evaluados. Fuente: Archivo de resultados de análisis de estrés oxidativo.	66
<b>Tabla 4.</b> Resultados del análisis de perfil de textura en músculo de <i>Cyprinus carpio</i> expuesta a dos concentraciones de GLB (50 ng/L y 100 ng/L) para 0, 24, 48, 72 y 96 h. Fuente: Archivo fotográfico de la fase experimental de análisis fisicoquímicos.	73



## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ANOVA</b>	Análisis de Varianza
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CHPx</b>	Concentración de Hidriperóxidos
<b>CRA</b>	Capacidad de retención de agua
<b>CYP450</b>	Citocromo P450
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentración Letal media
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>ERN</b>	Especies reactivas del nitrógeno
<b>EROs</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>GLB</b>	Glibenclamida
<b>HPx</b>	Hidroperóxidos
<b>LPX</b>	Lipoperoxidación
<b>M</b>	Molaridad
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
<b>RL</b>	Radicales Libres
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutasa

## RESUMEN

A nivel mundial se estima que para el año 2030 el número de personas adultas con diabetes mellitus (DM) se incrementará a 439 millones, de acuerdo al último informe del 2016 emitido por la Organización Mundial de la Salud sobre la diabetes, la prevalencia de ésta, ha aumentado desde 1980 al 2014, pasando del 4,7% al 8,5% con una cifra de 422 millones de personas con éste padecimiento en la población adulta; uno de los fármacos hipoglucemiantes orales de mayor prescripción en México y en el mundo, para controlar esta afección es la glibenclamida (GLB) y debido a su alta prescripción y consumo, la GLB llega a los diversos cuerpos de agua a través de descargas municipales, industriales y hospitalarias; por lo que la presencia de GLB podría causar efecto en las especies de interés comercial y de consumo habitual como lo es *Cyprinus carpio* siendo uno de los teleósteos de mayor distribución en todo el mundo; aunque existen estudios de ocurrencia de este fármaco referidos en la literatura internacional, son pocos los estudios del efecto tóxico de este fármaco y de la calidad de la carne de esta especie. El objetivo de esta investigación fue evaluar el estrés oxidativo inducido por concentraciones ambientalmente relevantes de GLB (50, 100 y 1000 ng/L) y su influencia sobre las propiedades fisicoquímicas y texturales del músculo de *Cyprinus carpio*. Se evaluaron biomarcadores de oxidación celular: como el contenido de hidroperóxidos, grado de lipoperoxidación; contenido de proteínas carboniladas y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa. Además, se determinó la concentración del glibenclamida en agua, branquias, hígado, músculo, cerebro y sangre de la carpa a diferentes tiempos de exposición: 12, 24, 48, 72 y 96 h. En cuanto a los análisis fisicoquímicos y texturales del músculo, se evaluó el valor de pH, solubilidad, capacidad de retención de agua,

pérdida de grupos sulfhidrilos, esfuerzo al corte con navaja de Warner-Bratzler, análisis de perfil de textura y perfil electroforético, para dos concentraciones de significancia en el medio ambiente acuático de GLB (50 y 1000 ng/L) a diferentes tiempos de exposición 0, 24, 48, 72 y 96 h. Los hallazgos encontrados en este estudio demostraron que la GLB generó un incremento en los biomarcadores de oxidación celular y en las enzimas antioxidantes del teleósteo *Cyprinus carpio*, que esta respuesta no es concentración-dependiente y que los órganos son capaces de bioconcentrar este hipoglucemiante.

Para los resultados de análisis fisicoquímicos y texturales, se mostraron alteración del músculo, generando decrementos significativos en las propiedades fisicoquímicas y texturales. Estos hallazgos permiten concluir que la presencia de GLB en los cuerpos de agua afecta la calidad de especies acuícolas para consumo humano; lo cual también puede representar un riesgo comercial y para la salud de los consumidores de éstas especies acuáticas.

**Palabras clave:** oxidación celular, enzimas antioxidantes, glibenclamida, *Cyprinus carpio*, propiedades fisicoquímicas; propiedades texturales.

### **ABSTRACT**

Worldwide it is estimated that by the year 2030 the number of adults with diabetes mellitus (DM) will increase to 439 million, according to the latest report of 2016 issued by the World Health Organization on diabetes, the prevalence of this, has increased from 1980 to 2014, from 4.7% to 8.5% with a figure of 422 million people with this condition in the adult population; One of the most widely prescribed oral hypoglycaemic drugs in Mexico and in the world, to control this condition is glibenclamide (GLB) and due to its high prescription

and consumption, the GLB reaches the various bodies of water through municipal discharges, industrial and hospital; so that the presence of GLB could have an effect on species of commercial interest and habitual consumption such as *Cyprinus carpio* being one of the most widely distributed teleosts in the world; Although there are studies of the occurrence of this drug referred to in the international literature, there are few studies of the toxic effect of this drug and the quality of the meat of this species.

The objective of this investigation was to evaluate the oxidative stress induced by environmentally relevant concentrations of GLB (50, 100 and 1000 ng / L) and its influence on the physicochemical and textural properties of the *Cyprinus carpio* muscle. Biomarkers of cellular oxidation were evaluated: as the content of hydroperoxides, degree of lipoperoxidation; content of carbonylated proteins and the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase. In addition, the concentration of glibenclamide in water, gills, liver, muscle, brain and blood of the carp was determined at different exposure times: 12, 24, 48, 72 and 96 h. Regarding the physicochemical and textural analysis of the muscle, the pH value, solubility, water retention capacity, loss of sulfhydryl groups, effort to cut with Warner-Bratzler knife, analysis of texture profile and electrophoretic profile were evaluated. for two concentrations of significance in the aquatic environment of GLB (50 and 1000 ng / L) at different exposure times 0, 24, 48, 72 and 96 h. The findings found in this study showed that GLB generated an increase in the cell oxidation biomarkers and antioxidant enzymes of the teleost *Cyprinus carpio*, that this response is not concentration-dependent and that the organs are able to bioconcentrate this hypoglycemic agent.

For the results of physicochemical and textural analyzes, muscle alteration was shown, generating significant decrements in the physicochemical and textural properties. These

findings allow us to conclude that the presence of GLB in water bodies affects the quality of aquaculture species for human consumption; which can also represent a commercial risk and for the health of the consumers of these aquatic species.

**Keywords:** Oxidative damage, antioxidant enzymes, glibenclamida, *Cyprinus carpio*, textural properties, physicochemical properties

## 1. INTRODUCCIÓN

La presencia de fármacos en el medio ambiente acuático, puesta de manifiesto en los últimos años, ha suscitado una gran preocupación, debido a que éstas sustancias han sido diseñadas para efectuar una respuesta biológica en el organismo, y la presencia de éstos, así como de sus metabolitos, pueden causar efectos aún más tóxicos en los diversos hidrobiontes o incluso pueden llegar a estar presentes en el agua potable para consumo humano (Ginebreda et al., 2015; Gros et al., 2010). La principal fuente de entrada de estas sustancias en el medio ambiente son las aguas residuales tratadas o sin tratar que se vierten a los cauces naturales, ya que su eliminación en las plantas depuradoras no es completa. Pero también el proceso de fabricación, los efluentes de hospitales, su deposición directa en el medio, y actividades agrarias y ganaderas, contribuyen a su presencia en el medio acuático. La ecotoxicidad de los fármacos de abuso aún presenta una escasa investigación, por lo cual es necesario evaluar el impacto y la toxicidad de éste tipo de contaminantes, ya que se consideran como una posible amenaza a la salud y la seguridad ambiental. (Barceló & López, 2008; Gómez-Oliván et al., 2014; Islas-Flores et al., 2013, 2014)

Estudios han reportado que fármacos hipoglucemiantes como la glibenclamida (GLB), no se retira de las aguas residuales con tratamientos convencionales (Radjenovic et al., 2007; Ginebreda et al., 2011). Así mismo, se ha demostrado que la glibenclamida puede generar alteraciones a nivel proteico, y como consecuencia una alteración en la textura y estructura de especies acuícolas, como es el caso de la carne de carpa común (*Cyprinus carpio*), especie de alto consumo y de importancia económica en México y en el mundo (SAGARPA, 2013; FAO, 2016 ), por lo tanto el propósito de esta investigación fue evaluar la toxicidad inducida

por glibenclamida (GLB) en *Cyprinus carpio* y su relación con la modificación de las propiedades fisicoquímicas de su carne, mediante la exposición de la especie a diferentes concentraciones de GLB. Se determinó la toxicidad aguda inducida por GLB en la *Cyprinus carpio*, el estrés oxidativo inducido por GLB, a través de la determinación de los biomarcadores de lipoperoxidación, contenido de hidroperóxidos, contenido de proteínas carboniladas y actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT); y se analizaron las características fisicoquímicas y texturales de la carne de carpa común expuesta a GLB. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron que la GLB generó un incremento en los biomarcadores de oxidación celular y en las enzimas antioxidantes del teleósteo *Cyprinus carpio*, que esta respuesta no es concentración-dependiente y que los órganos son capaces de bioconcentrar este hipoglucemiante y además, debido a que los resultados de los análisis fisicoquímicos y texturales realizados en el músculo, presentaron un decremento significativo en sus propiedades fisicoquímicas y texturales. Estos resultados permitieron concluir que la presencia de GLB en los diversos cuerpos de agua es un riesgo para las especies acuáticas.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Contaminación por fármacos en diversos cuerpos de agua**

La contaminación ambiental se define como cualquier modificación indeseable de la composición natural del medio, debida a la introducción de agentes biológicos, químicos o físicos que no pertenecen al mismo. Esta contaminación de los procesos productivos afecta no solo a la salud humana, sino también a la integridad de los ecosistemas, ocasionando daños que a veces son irreversibles, tales como la pérdida de biodiversidad. El deterioro ambiental

que se hace más crítico es en el agua, debido a que es el insumo básico que se hace vital para todo ser vivo y para las actividades productivas del ser humano (Becerril, 2009), por lo que la evaluación ecotoxicológica de los productos farmacéuticos y productos químico complejos en los cuerpos de agua es un área de investigación con un desarrollo incipiente a nivel mundial. Cabe hacer mención que tanto los contaminantes emergentes, como los productos farmacéuticos, productos de cuidado personal y aditivos alimentarios, están recibiendo una atención considerable con respecto a su destino ambiental y propiedades toxicológicas.

Dentro de los productos farmacéuticos tales como analgésicos, anticonvulsivos, hormonas y otros, se han encontrado en cuerpos de aguas alrededor de todo el mundo, los primeros hallazgos fueron reportados en 1970; dentro de los primeros estudios se encuentra uno realizado en Alemania, entre 1996 a 1998, que reportó la presencia de 55 fármacos en efluentes de plantas de tratamiento, otra investigación similar se realizó en Estados Unidos, entre 1999 y 2000; en éste se detectaron 82 componentes farmacéuticos en aguas superficiales (Terners et al., 2004). Debido a las actividades antropogénicas, estos compuestos pueden ingresar al medio ambiente a través de descargas municipales e industriales. El incremento de éstos en ambientes acuáticos ocasiona muchos efectos deletéreos en los organismos como: alteraciones en el ciclo de vida, el crecimiento y la reproducción además de diversas manifestaciones en organismos centinelas y endémicos de los ambientes señalados. Existe evidencia de que muchos de estos productos son persistentes en el ambiente y pueden llegar a las aguas superficiales y subterráneas, produciendo impactos en los organismos acuáticos (Postigo et al., 2011), en este sentido la Legislación en algunas regiones de Europa, Estados Unidos y Canadá, exigen una valoración para los nuevos



fármacos que van a ser introducidos al mercado, para lo cual se realizan estudios toxicológicos en algunas especies (algas o peces), para valorar su comportamiento en el ambiente (Lange & Dietrich, 2002), asimismo, la directriz de la UE (93-67-CEE), establecida por la Comisión de las Comunidades Europeas (1996) clasifica a las sustancias por categoría de riesgo de acuerdo a su  $CL_{50}$  (Concentración Letal media), en el que las sustancias con una  $CL_{50}$  de  $<1$  mg/L son extremadamente tóxicos, 1-10 mg/L son tóxicos y 10 a 100 mg/L peligroso para los organismos acuáticos, sin embargo, hasta el momento en México no se cuenta con alguna legislación que contemple la presencia de productos farmacéuticos o de cuidado personal en los diferentes cuerpos de agua, y mucho menos límites permisibles de éstos.

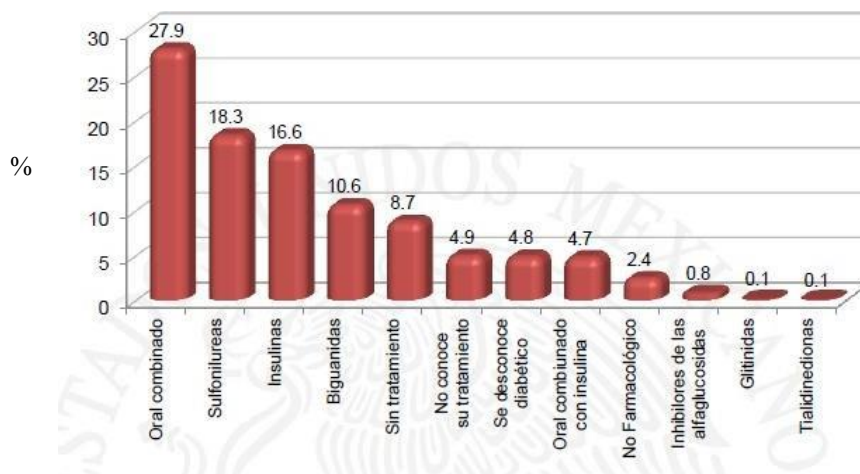
Para la evaluación de los diversos sistemas, se han analizado los diferentes cuerpos de agua como influentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas; aguas superficiales y aguas para riego de U.S.A, Canadá, España, Francia, Alemania, Japón e incluso México; en donde los fármacos que más se han encontrado son principalmente antiinflamatorios, reguladores de lípidos, betabloqueantes, antibióticos, el diurético furosemida y antihipertensivos; también fármacos hipoglucemiantes como la metformina y glibenclamida (Postigo et al., 2011), de éste último; debido a su alta producción y consumo a nivel mundial; se ha demostrado su persistencia en los diversos efluentes de aguas; y dentro de los estudios de ocurrencia se ha reportado en aguas de desecho municipales de Rubí, España concentraciones de 19.2-100  $ng \cdot L^{-1}$  (Radjenovic et al., 2007 & Verlicchi et al., 2012 respectivamente); de 15900  $ng \cdot L^{-1}$  en Terrasa, España (Radjenovic et al., 2009); y de 40  $ng \cdot L^{-1}$  a 2000  $ng \cdot L^{-1}$  en el Río Ebro, España (Rebollo et al., 2011); además, se ha detectado en plantas de tratamiento de agua de Cataluña,

España en concentraciones de 0.6 ng·L<sup>-1</sup> y 4.6 ng·L<sup>-1</sup> (Ginebreda et al., 2012 y 2015 respectivamente); en aguas tratadas para riego en Florida, EE UU en concentraciones de 22 ng·L<sup>-1</sup> (Wang & Gardinali, 2013); y en aguas superficiales de Iberia, España en cantidades de 10.9 a 43.6 ng·L<sup>-1</sup> (Osorio et al., 2016). Sin embargo, hasta la fecha, su comportamiento medioambiental, el destino, así como las contribuciones ecotoxicológicas a largo plazo en México, sigue siendo en gran parte desconocido (Islas-Flores et al., 2013; 2014; Elizalde-Velazquez et al., 2016; Gómez-Oliván et al., 2014; San Juan-Reyes et al.; 2013, 2015).

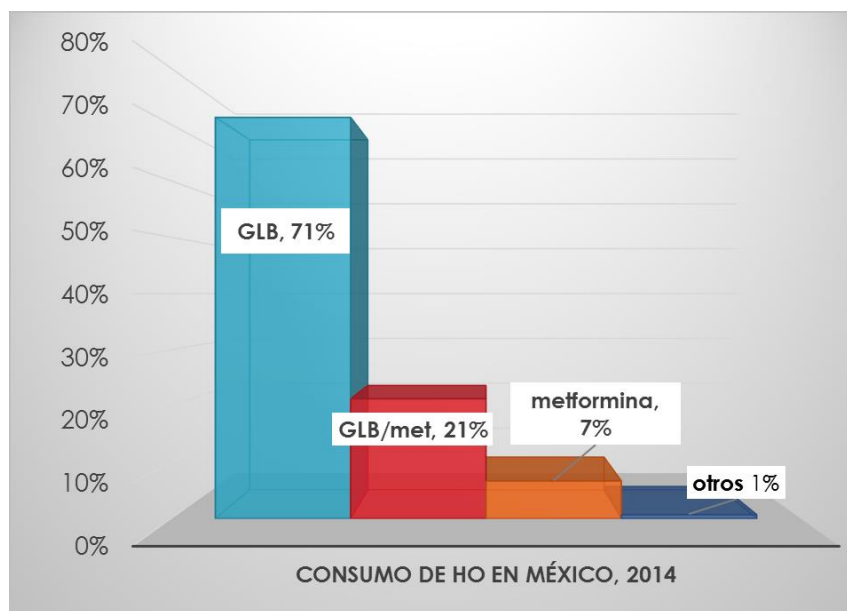
## **2.2 Diabetes y consumo de fármacos hipoglucemiantes**

Los nuevos estilos de vida originados por la globalización, el desarrollo económico e industrial a nivel mundial, han ocasionado el cambio de hábitos alimenticios en la sociedad, presentándose el consumo excesivo de alimentos con contenido alto de energía, abuso de bebidas azucaradas, consumo de alcohol y tabaco, provocando sobrepeso y obesidad, lo que conlleva a enfermedades crónico degenerativas asociadas a estos excesos como lo son la diabetes mellitus tipo II (DM2), hipertensión arterial, cardiopatías coronarias y cáncer (Moodie et al., 2013; Gross et al., 2004). De acuerdo al último informe mundial sobre la diabetes (OMS, 2016), la prevalencia de esta enfermedad ha aumentado desde 1980 a 2014, pasando del 4,7% al 8,5% con una cifra de 422 millones de personas con diabetes en la población adulta, A nivel mundial se estima que para el año 2030 el número de personas con DM se incrementará a 439 millones, lo que representa el 7.7% de la población adulta (de 20 a 79 años de edad) del mundo (Shaw et al., 2010; WHO, 2016). El grupo farmacológico empleado para tratar este padecimiento son los hipoglucemiantes orales, como se puede observar en la Fig. 1, en el 2013, se reportó que los tratamientos con fármacos de tipo oral combinado y del tipo de las sulfonilureas representan el primero y segundo lugar

respectivamente de tratamientos previos utilizados para los pacientes hospitalizados con DM2 en México (Juan et al., 2013); y el fármaco GLB representa el principal consumo de fármacos hipoglucemiantes orales del tipo de las sulfonilureas en nuestro país, como se puede observar en la Fig. 2 (Zavala, 2014). En USA la GLB es el principal tratamiento para la diabetes gestacional y desde el 2007 al 2011; su uso se incrementó de 7.4% a 64.5% (Balsells et al., 2015; Castillo et al., 2014).



**Figura.1** Tratamientos previos utilizados por los casos de hospitalización de Diabetes Mellitus Tipo 2, México, Enero-marzo 2013. Fuente: SVEHDM/DGAE/Secretaria de salud/México, enero marzo 2013.



**Figura. 2** Hipoglucemiantes orales (HO), prescritos para pacientes con DM2 en México – IMSS. Fuente: Zavala, 2014

### 2.3 Glibenclamida (GLB)

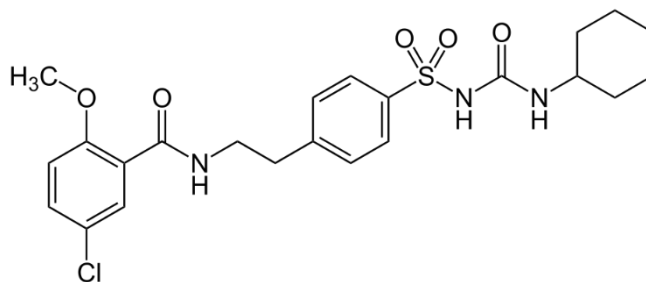
El Fármaco glibenclamida (GLB) (Fig. 3), conocida también como gliburida; es un fármaco hipoglucemiante oral de la clase de las sulfonilureas. Se utiliza en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II. Para marzo del año 2007, la GLB fue incluida como uno de los hipoglucemiantes orales, en la *Lista de Medicamentos Esenciales de la OMS* (2007). Se vende comercialmente en dosis de 1.25 mg, 2.5 mg y 5 mg. Teniendo las siguientes características:

**Nombre Químico:** 5-cloro-N-[2-[4-(ciclohexilcarbamoilsulfamoil)fenil)etil]-2-metoxibenzamida.

**Fórmula Química:** C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>ClO<sub>5</sub>S

**Peso Molecular:** 494.04 g/mol

**Longitud de máxima absorción:** 300 nm



**Figura 3.** Estructura química de la GLB. Fuente: Goodman & Gilman's, 2008.

### 2.3.1 Mecanismo de acción

Como para otras sulfonilureas, su mecanismo de acción implica el cierre de canales de potasio dependientes del ATP (Na-K ATPasa) en células  $\beta$ -pancreáticas. En este mecanismo, la salida de potasio causa la despolarización de la membrana de las células  $\beta$  y activación de los canales de calcio tipo L; por lo tanto, hay una afluencia de calcio al interior de las células pancreáticas, la cual estimula la secreción de insulina, que permite la entrada de la glucosa a la célula y favorece la asimilación de esa molécula, ocasionando un efecto hipoglucémico en la sangre (Aguilar-Bryan et al., 1995; Philipson y Steiner, 1995).

### 2.3.2 Toxocinética

La toxocinética de la GLB en mamíferos incluye una absorción rápida por vía oral, ésta se une a proteínas plasmáticas en un alto porcentaje, hasta de un 98% *in vitro*. Además, la GLB se biotransforma en el hígado por hidroxilación del anillo ciclohexilo en la posición 3 cis y 4 trans a través del sistema citocromo P450, en el que están involucradas las isoformas 2C9, 2C19 y 3A4; también en los riñones existe la biotransformación de este fármaco, aunque en este órgano este proceso es minoritario. Este medicamento, se excreta por vía renal y biliar (Aguilar- Bryan et al., 1995; Philipson & Steiner, 1995).

En la biotransformación por fase I de la GLB, se forma un complejo denominado oxicitocromo P450 ( $O_2$ -P450-  $Fe^{2+}$ -GLB). Este complejo se puede disgregar liberando el radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), con la regeneración a la proteína férrica (P450-  $Fe^{3+}$ -GLB) y la subsecuente generación de  $H_2O_2$ . Estos productos denominados especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden ser responsables de inducir estrés oxidativo, generando daño a biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Guengerich & Munro, 2013; Krest et al., 2013). También estas ROS son responsables de efectos en células y tejidos asociados a mutagénesis y carcinogénesis, de acuerdo a estudios realizados por Ibarra-Costilla (2004) y Martínez (2004).

### **2.3.3 Efectos tóxicos de la glibenclamida**

En referencia a sus efectos tóxicos, la GLB ha demostrado causar efectos nocivos en humanos, roedores y otras especies. (Tüzün et al., 1999; Ibarra-Costilla et al., 2004; Martínez-Pérez, 2004; Morales et al., 2007; Nazaroglu et al. 2009). Sin embargo, poco se conoce acerca de los efectos tóxicos que puede producir este compuesto sobre hidrobiontes comunes de los cuerpos de agua, así como de su comportamiento medioambiental y su destino (Barceló & López, 2008; Santos et al., 2013; Gros et al., 2008 y 2010; Richardson & Terners, 2009 y 2011).

### **2.4 *Cyprinus carpio***

La carpa común *Cyprinus carpio* (Linnæus, 1758), es un organismo natural de Asia, pero su extensa introducción a diversos cuerpos de agua lo hace actualmente uno de los más distribuidos a nivel mundial. La carpa se caracteriza por tener ojos pequeños, labios gruesos

con dos barbas en cada esquina de la boca, escamas grandes y espinas dorsales fuertemente cerradas en las aletas dorsales y anales. Su color es verde variable, pero a menudo del verde oliva al gris plateado dorsal, decolorándose al amarillo plateado en el vientre. Son organismos omnívoros con predominancia bentófaga, aspiran y filtran fango del fondo, así como insectos y plantas de la superficie. En su etapa juvenil se alimenta principalmente de algas, rotíferos y crustáceos microscópicos. Las primeras etapas de su ciclo de vida (embriones, larvas y juveniles) son los más vulnerables a la contaminación, a las fluctuaciones de la temperatura, a la concentración de oxígeno, a la salinidad y a la depredación.



**Figura 4.** *Cyprinus carpio*

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

#### **2.4.1 Composición nutrimental**

Por su contenido de grasa, se encuentra dentro de los pescados semigrasos; además de que posee proteínas de alto valor biológico, su contenido vitamínico representa cantidades poco significativas; sin embargo, la vitamina A, está presente en cantidades importantes en relación con el resto de los pescados. Además, la carpa presenta un alto contenido de hierro y en relación con el fósforo, es el pescado más rico en este mineral, solo por debajo del pez espada. La composición química de la porción comestible de carpa común es la siguiente:

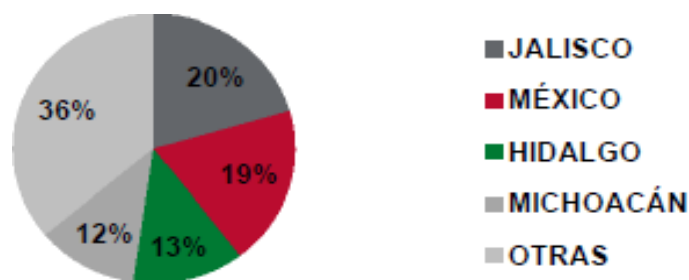
**Tabla 1.** Composición química proximal de la carne de *Cyprinus carpio* (g/100 g)

Componente	Media (g/100g)	%
Humedad	76.62 ± 0.81	76
Proteína	19.3 ± 0.3	19.3
Lípidos totales	0.98 ± 0.01	0.98
Cenizas	1.42 ± 0.04	1.4
Hidratos de Carbono	1.63 ± 0.22	1.6
Valor Energético (Kcal)	92.7 ± 2.17	

Fuente: Spuch A. & Judis M, 2004.

### 2.4.2 Importancia en México

En México el cultivo de carpa tiene gran importancia porque el manejo de su cultivo es sencillo, económico y de gran impacto social. En el 2014, la carpa común ocupó en la producción pesquera nacional el 7º lugar, mientras que en el Estado de México, la carpa ocupa el 1er lugar de producción pesquera (SAGARPA & CONAPESCA, 2014).



**Figura 5.** Producción de Carpa en México 2013 – 2014. Fuente: SAGARPA & CONAPESCA, 2014.

### 2.4.3 Calidad de la carne de pescado

La calidad de un alimento es un concepto que el consumidor actual busca cuando adquiere cualquier tipo de producto alimenticio. Exceptuando la calidad nutricional y microbiológica



de los alimentos; La calidad de la carne es un concepto complejo porque también está influenciada por un sistema multivariado de parámetros fisicoquímicos y funcionales, (García et al., 2004), de gran importancia tecnológica. Los principales parámetros fisicoquímicos de la carne son: color, textura, sabor y olor; y se relacionan con el pH y Capacidad de Retención de Agua, la composición química, la degradación proteica, la interacción entre componentes y el grado de oxidación de las grasas. Por otro lado, las propiedades funcionales de la carne se dividen en: propiedades de hidratación dependientes de las interacciones proteína-agua (retención de agua, adhesión); propiedades relacionadas con las interacciones proteína-proteína (formación de geles); y propiedades de superficie (emulsificación). Las más importantes, debido a su aplicación en la industria alimentaria, son la capacidad de retención de agua (CRA), la emulsificación de grasa (CE) y la gelificación (CG). La CRA se define como la capacidad que tiene la carne para retener agua, tanto propia como añadida, al someterse a una fuerza externa; el agua es retenida en el seno de una red de fibras musculares. Su importancia radica en estar directamente relacionada con la suavidad, la jugosidad y el color; depende del pH, los cambios *postmortem* y la presencia de sales. La gelificación es el resultado de la desnaturalización y agregación de proteínas para formar una red ordenada; la miosina, la actina y en algunos casos la paramiosina, son las principales proteínas responsables de la formación de geles. La temperatura, el pH y las sales, al modificar la estructura cuaternaria o la distribución de la carga neta de las proteínas, afectan el grado de unión de las proteínas, alteran la naturaleza y la estructura de un gel.

Estas características fisicoquímicas se conjugan entre sí para producir la calidad tanto textural como sensorial. La textura se define por la forma en que los componentes estructurales de un

material se arreglan en forma micro y macroscópica, y la manifestación externa de este arreglo.

## **2.5 Bioensayo**

El efecto de los contaminantes en los organismos se valora mediante pruebas controladas de laboratorio, conocidas como ensayos biológicos o “bioensayos”, los cuales consisten en medir la toxicidad de los contaminantes, ya sea en forma individual o en mezcla, sometiendo a algunos seres vivos a distintas concentraciones de éstos (Elissa et al., 2003; Moreno, 2003). Los ensayos en animales tienen múltiples ventajas. Una de ellas es que son realizados bajo condiciones rigurosamente controladas y se puede establecer una relación causal entre la exposición al agente y el efecto producido de forma concluyente (relación-concentración respuesta) (Moreno, 2003).

### **2.5.1 Bioindicadores**

El monitoreo de la calidad del ambiente acuático se puede realizar a través del empleo de organismos de prueba, conocidos como bioindicadores. estudios previos han empleado a *Cyprinus carpio*, observando que ha sido muy útil para las evaluaciones toxicológicas de diferentes contaminantes emergentes. (Islas-Flores et al., 2013; 2014; Elizalde-Velázquez et al., 2016; Gómez-Oliván et al., 2014; San Juan-Reyes et al.; 2013, 2015; Saucedo-Vence et al., 2017)

En una evaluación toxicológica, el organismo debe presentar múltiples ventajas como bioindicador: sencillo mantenimiento y cultivo en condiciones de laboratorio, amplio rango de sensibilidad a diversos xenobióticos, además de alta disponibilidad y abundancia (amplia distribución geográfica). Diversos estudios sugieren que los diversos fármacos en

concentraciones que se encuentran en el medio ambiente pueden tener efectos sobre los organismos acuáticos (Storey, 1996; Daughton & Ternes, 1999; Ferrari et al., 2003).

El estudio de la toxicidad en peces es uno de los métodos más eficaces para la comprensión de los efectos nocivos de los contaminantes ambientales en los sistemas acuáticos. Los peces desempeñan un papel importante, en las redes alimentarias acuáticas donde por lo general ocupan una posición intermedia o superior: no sólo son alimentados por una variedad de depredadores acuáticos; son también una importante fuente de alimento para los seres humanos de todo el mundo (Van der Oost et al., 2003).

La carpa común (*Cyprinus carpio*) es una especie comúnmente utilizada como especie bioindicadora, debido a que el *cyprinidus* es uno de los grupos más importante de peces teleósteos cultivados en todo el mundo con fines comerciales y también son organismos muy sensibles a las sustancias tóxicas, presentan una respuesta rápida a los cambios en su medio acuático y son de fácil manejo en laboratorio (Islas-Flores et al., 2013; 2014; Elizalde-Velazquez et al., 2016; Gómez-Oliván et al., 2014; San Juan-Reyes et al.; 2013, 2015; Huang et al., 2007).

### **2.5.2 Biomarcadores**

El uso de biomarcadores de contaminación ha sido sujeto de diversos estudios, (Martí, 2003; Newman y Unger, 2003 y van der Oost et al., 2003) y se definen como toda respuesta a nivel de suborganismo en sus características bioquímicas, fisiológicas, anatómicas, histológicas y de comportamiento que son usadas para señalar la exposición a tóxicos ya sea de naturaleza química, física o de radiaciones; estos indican si un tóxico estuvo disponible por suficiente tiempo para producir una respuesta o efecto. Los biomarcadores se pueden subdividir en tres

clases: de exposición, de efecto y de susceptibilidad: (van der Oost et al., 2003)

**a) Biomarcadores de exposición**

Comprenden la detección y medición de una sustancia exógena, su metabolito o el producto de una interacción entre un agente xenobiótico y alguna molécula o célula diana que se mide en un compartimiento dentro de un organismo. Este tipo de biomarcador puede ser utilizado para confirmar la exposición de individuos o poblaciones a una sustancia en particular. (van der Oost et al., 2003)

**b) Biomarcadores de efecto**

El biomarcador de respuesta o efecto es indicativo de cambios bioquímicos fisiológicos y otras alteraciones en un organismo como resultado de la exposición a un xenobiótico. Estos incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARN-m, aumento de determinadas proteínas, aparición de anticuerpos específicos contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares (van der Oost et al., 2003).

**c) Biomarcadores de susceptibilidad**

Indican la capacidad inherente o adquirida de un organismo para responder a los cambios producidos por la exposición a una sustancia xenobiótica específica, incluyendo factores genéticos y cambios en los receptores que alteran la susceptibilidad del organismo expuesto (van der Oost et al., 2003)

Específicamente, los cambios bioquímicos son detectables antes de que se manifiesten efectos visibles a niveles superiores, por ejemplo, reducción en el crecimiento y cambios en la reproducción. Por lo que el deterioro de las funciones fisiológicas y bioquímicas en un

organismo es el primer indicador de perturbación ambiental y podría utilizarse para desarrollar indicadores bioquímicos rápidos y sensibles al estrés tóxico (Villaroel, 2004).

El daño oxidativo a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, y los efectos sobre los mecanismos de defensa antioxidante enzimática en organismos, se ha utilizado en los últimos años como biomarcador para la vigilancia de la contaminación ambiental (Dalle-Donne et al., 2003; Lam & Gray, 2003; Kadiiska et al., 2005).

### **2.6 Estrés oxidativo y estrés nitrosativo**

Se entiende por estrés oxidativo a aquella situación en la que las células están expuestas a un ambiente oxidante y los mecanismos defensivos antioxidantes son sobrepasados de forma que se llega a alterar el estado redox celular; este fenómeno se considera uno de los principales mecanismos de acción de sustancias tóxicas (Martínez, 2005).

El estrés oxidativo puede conducir a daño de componentes celulares y tejidos que favorecen la presentación de procesos patológicos. Una condición de estrés oxidativo puede ser causada por un aumento en la producción de factores prooxidantes debido a una exposición a agentes generadores de radicales libres que exceden la capacidad antioxidante del organismo o a una deficiencia en los mecanismos de defensa. Dichos mecanismos celulares de defensa incluyen sistemas enzimáticos y no enzimáticos los cuales se encargan de evitar la formación de radicales libres, capturar los que ya se han formado y remover o reparar las biomoléculas ya dañadas. La cuantificación de los mecanismos antioxidantes y de los daños provocados por la condición de estrés oxidativo en sistemas biológicos puede ser usada para evaluar efectos tóxicos inducidos por diferentes clases de contaminantes ambientales. (Dalle-Donne et al., 2003; Lam & Gray, 2003; Kadiiska et al., 2005).

El proceso de estrés oxidativo se ha considerado un mecanismo de toxicidad significativo sobre los organismos a los que afecta y ha permitido su uso como herramienta de diagnóstico, con capacidad predictiva de evidenciar el impacto de los contaminantes ambientales sobre los organismos. En analogía al término “estrés oxidativo”, se ha denominado “estrés nitrosativo” a la excesiva o desregulada formación del radical óxido nítrico (NO) y especies reactivas del nitrógeno (ERNs) derivadas del mismo (Hausladen & Stambler, 1999).

Las principales ERNs son el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) considerado como uno de los más potentes oxidantes biológicos (Poderoso et al., 1999). Las ERNs pueden dañar células por distintos mecanismos: inactivación de los distintos complejos de la cadena respiratoria, daño a proteínas y lípidos, inhibición de síntesis proteica o de ADN (Kim et al., 1998).

### **2.6.1 El oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ )**

Esta molécula tiene 2 electrones no apareados en su orbital externo. La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua por acción del complejo citocromo-oxidasa (citocromo A+a3) de la cadena respiratoria mitocondrial. En la molécula de  $\text{O}_2$  se generan por su reducción parcial las especies reactivas siguientes:  $\text{O}_2^-$ : anión superóxido,  $\text{OH}^\bullet$ : radical hidroxilo,  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrógeno y  $^1\text{O}_2$ : oxígeno singulete (Reilly & Bulkley, 1990; Witztum et al., 1990).

### **2.6.2 Radicales Libres**

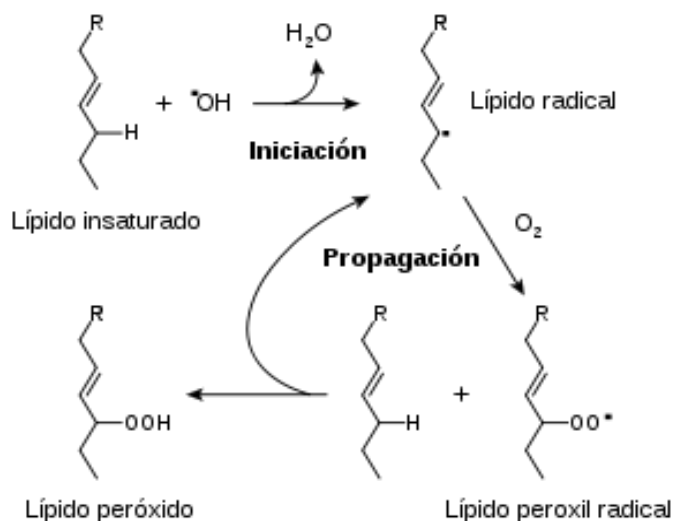
Los radicales libres (RL), son aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que

genera una alta inestabilidad y lo hace extraordinariamente reactivo y de vida transitoria, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente con la diversidad de biomoléculas integrantes de estructura celular, comúnmente son carbohidratos, lípidos, proteína, ácidos nucleídos y derivados de cada uno de ellos (Halliwell & Gutterioge,1989), y provocan diversas reacciones de oxidación en cadena que pueden llegar a afectar el equilibrio redox de las células, como por ejemplo las siguientes reacciones:

**a) Hidroperoxidación y Lipoperoxidación:** La interacción del radical hidroxilo  $\text{OH}^\bullet$  con los ácidos grasos poliinsaturados (AGP), que componen los fosfolípidos de las membranas, son esenciales en el origen del daño oxidativo celular. El  $\text{OH}^\bullet$  puede atacar un átomo de hidrógeno metilénico de un ácido graso y formar un radical lipídico ( $\text{L}^\bullet$ ), como resultado queda un electrón sin aparear en el átomo del carbono metilénico. Este radical sufre un reordenamiento molecular que produce un dieno conjugado que reacciona con el oxígeno molecular para dar lugar a un radical hidroperoxil lipídico ( $\text{LOO}^\bullet$ ). Dicho radical extrae un átomo de hidrógeno del carbono del grupo metilénico del AGP adyacente, y forma otro  $\text{L}^\bullet$  y el hidroperóxido lipídico (LOOH). El  $\text{L}^\bullet$  se combina con otra molécula de oxígeno (reacción en cadena), proceso conocido como peroxidación lipídica (POL), por otra parte, se une con otro  $\text{L}^\bullet$  para formar un complejo no reactivo, a expensas de la unión cruzada de los ácidos grasos de membrana, lo cual conduce a una disminución de la fluidez de la membrana (Figura 4) (Papuc et al., 2017).

Este proceso genera numerosos subproductos, muchos de ellos como el malondialdehído (MDA), cuya determinación en tejidos, plasma u orina es uno de los métodos para evaluar el

estrés oxidativo.

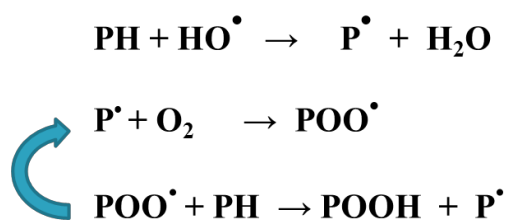


**Figura 6.** Reacción de Lipoperoxidación. Fuente: Eymard et al.,2009.

**b) Proteínas carboniladas:** La mayoría de daños en las proteínas son ocasionados por el radical Hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ), el cual reacciona con cualquier aminoácido en el sitio donde se forma, que generalmente son sitios en donde se encuentra un metal de transición. El oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) es más selectivo y reacciona particularmente con los aminoácidos triptofano, tirosina, histidina, lisina, metionina y cisteína. El grado de oxidación de las proteínas de una célula se puede medir detectando carbonilos en la proteína total purificada. Los carbonilos se forman por la oxidación de la prolina y la arginina en semialdehído de glutamato y por rupturas de la cadena peptídica, dando lugar a radicales oxidados: peroxil y alquilperóxidos (Figura 5). Los daños producidos por el  $\text{HO}\cdot$  y el  $^1\text{O}_2$  son irreversibles y en términos generales marcan las proteínas para su degradación. En las células eucariotas, la mayoría de proteínas oxidadas se degradan en el citosol y sólo algunas en los lisosomas. Otra molécula que es dañada por los RL es el ADN; el daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, promoviendo el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte, o la pérdida de



expresión por daño al gen específico.



**Figura 7.** Reacciones de oxidación de proteínas. Fuente: Estévez, (2011).

### c) Enzimas antioxidantes SOD y CAT.

Como su nombre lo indica, las enzima superóxido dismutasa (SOD), dismutan el  $\text{O}_2^-$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$  y lo hacen de manera muy eficiente ( $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) e independiente del pH. La SOD es una metaloproteína de la cual existen tres isoformas: SODCu, SODZn (citosólicas) y SODMn que se encuentra en la matriz mitocondrial. Las catalasas monofuncionales (CAT) dismutan el  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  y lo hacen con una gran eficiencia a cualquier pH entre 4 y 11. Son enzimas muy resistentes a agentes desnaturalizantes y solventes orgánicos. Son homotetrámeros y homodímeros de subunidades de  $\approx 60 \text{ kDa}$  o de  $\approx 80 \text{ kDa}$ . Hay varios subgrupos de catalasas: uno de plantas, uno de animales, uno de hongos, dos de bacterias y uno de bacterias y hongos en donde se encuentran las catalasas de mayor peso molecular.

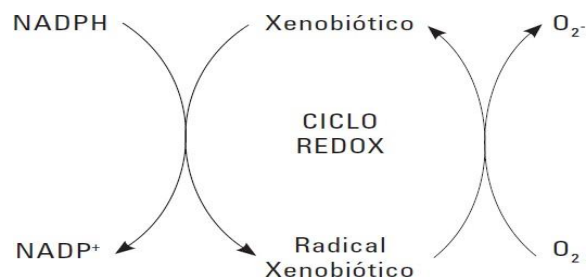
## 2.7 Estrés oxidativo inducido por fármacos en peces

La presencia de fármacos en el medio ambiente acuático, tanto en su forma potencialmente activa (API), como en sus metabolitos, llegan a afectar directamente a los hidrobiontes, (Radjenovik, 2008), debido a que se incrementa su deposición en los tejidos y puesto que estos son susceptibles a la oxidación, una mayor deposición en las membranas celulares

incrementa la susceptibilidad a que los tejidos sufran daños por efectos de la peroxidación, así como cambios en la composición de las membranas, que puede contribuir a generar alteraciones en algunas funciones fisiológicas importantes en los organismos acuáticos, como la osmoregulación (Livingstone. 2003; Gül et al., 2004), o provocar una débil respuesta inmunológica.

Estudios sobre los efectos causados por dichos xenobióticos y su relación con el estrés oxidativo se han reportado en diversos organismos acuáticos; los peces son un foco de especial atención. En los peces la toma de estas sustancias puede ocurrir a partir de sedimentos, material particulado en suspensión, columna de agua o fuentes alimenticias, lo cual dependerá de la dieta y del modo de vida del organismo.

El efecto tóxico de muchos xenobióticos está mediado por la formación de especies reactivas de oxígeno, un xenobiótico es capaz de inducir estrés oxidativo como resultado de un proceso cíclico de oxidación-reducción (ciclo redox) en el cual, al ser biotransformado, sufre la reducción por un electrón donado por el NADPH (la mayor fuente de equivalentes reducidos), transformándose luego en un intermediario o especie reactiva que puede ser un radical libre (Figura 8) Esta especie reactiva, al intentar recuperar su configuración original, busca transferir o donar su electrón no apareado al oxígeno ( $O_2$ ). Así el  $O_2$  se reduce transformándose en el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) con la consecuente regeneración del componente parental. El  $O_2^{\cdot-}$  reacciona a su vez con otras moléculas o consigo mismo y genera el radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) que mediante una serie de reacciones en cadena y la capacidad de oxidar macromoléculas puede ocasionar la muerte celular, (Figura 8), (Ochoa D. & González J., 2008).



**Figura 8.** Esquema de oxidorreducción de un xenobiótico.  
Fuente: Ochoa D. & González J., 2008.

Dentro de las principales lesiones asociadas con el ataque de estos radicales se encuentra la oxidación de las membranas lipídicas (peroxidación lipídica), oxidación a proteínas, oxidación a ácidos nucleicos y alteración del estatus celular redox, (Estévez, 2011; Lund et al., 2011).

Diversas investigaciones se han centrado en estudiar los diferentes aspectos relacionados con el estrés oxidativo, entre los que se incluyen los mecanismos por los cuales se produce daño a nivel celular y bioquímico así como los mecanismos de defensa que exhibe el organismo ante este ataque. Se ha encontrado una gran significancia ecológica al proceso de estrés oxidativo, particularmente relacionado con diferentes tipos de contaminantes ambientales como los fármacos y pesticidas que ingresan al agua y causan efectos en los organismos acuáticos. Se ha hallado que los peces son organismos sensibles ante los cambios provocados por agentes inductores de estrés oxidativo. Por ejemplo, Los niveles basales de actividad de la SOD se evaluaron en 22 especies de peces del Amazonas, en los que se encontró que los niveles de actividad estuvieron cerca de 4 veces por debajo al compararlos con resultados de estudios hechos en peces marinos. Estudios en *Cyprinus carpio* y en *Ictalurus nebulosus* expuestos a concentraciones subletales de diclorvos, un insecticida organofosforado,

demonstraron aumentos en la actividad SOD durante una exposición aguda en hígado, corazón y músculo de ambas especies (Ochoa D. & González J., 2008). Para el caso de la enzima antioxidante catalasa (CAT), está asociada primariamente con peroxisomas en que se detoxifica el  $H_2O_2$  llevándolo a dos moléculas de  $H_2O$  y  $O_2$ . Su actividad ha sido estudiada en diversas especies y muchos de los resultados para *Channa punctatus*, *Piaractus brachypomus* y *Oncorhynchus mykiss* han coincidido en el hecho de encontrar una depleción de la actividad cuando los ejemplares son expuestos a contaminantes en períodos agudos; no obstante, su inducción también ha sido observada en peces expuestos a vertientes de desechos industriales; es el caso de *Channa punctatus*, *Oreochromis niloticus* y *Cyprinus carpio* durante periodos crónicos de exposición (Ochoa D. & González J., 2008; Neri-Cruz et al., 2015; San Juan-Reyes et al., 2015).

Por lo anterior, el entendimiento de los mecanismos por los cuales el estrés oxidativo genera sus efectos es un tema de gran importancia al momento de identificar posibles biomarcadores que indiquen los efectos de la exposición de los organismos acuáticos ante estos contaminantes. Los efectos agudos de estrés oxidativo pueden darnos información útil como una señal de alarma de exposiciones tempranas al xenobiótico y de las posibles consecuencias que se relacionan con daños celulares posteriores.

### **2.8 Efecto de estrés oxidativo en el músculo.**

La oxidación de los lípidos insaturados presentes en el músculo de los peces, conduce a la formación de hidroperóxidos inestables, que una vez fragmentados liberan aldehídos de cadena corta como el malondialdehído (MDA); cetonas y ácidos grasos, así también como el desarrollo de algunos polímeros, los que se cree que contribuyen al sabor rancio de los

mismos (Lund et al., 2011; Estévez, 2011). Estudios previos realizados en diferentes tejidos de neonatos de rata albino macho expuesta a GLB (Tüzün et al., 1999; Nazaroğlu et al., 2009), han demostrado que la GLB puede generar efecto de incremento en niveles de malondialdehído (MDA), actividad de enzimas catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), y como consecuencia, podría ocasionar una alteración en la textura y estructura de los tejidos musculares (Estévez, 2011), por lo cual, la presencia de GLB en los diversos cuerpos de agua, podría tener efecto en especies acuícolas de importancia económica a nivel mundial, como es el caso de la carpa común cuyas características son que presenta una carne blanca, de agradable sabor y de alto valor nutrimental y además de que posee proteínas de alto valor biológico, también presenta un alto contenido de hierro y fósforo.

A pesar de que existen estudios sobre la toxicidad de contaminantes emergentes en especies acuícolas, son pocos los estudios que relacionan estos cambios producidos por los agentes oxidantes en la calidad del músculo cárnico.

La literatura internacional no refiere estudios de la capacidad de este fármaco de inducir estrés oxidativo en especies acuáticas de interés comercial como la carpa común. Por lo que el propósito de este estudio fue evaluar la toxicidad inducida por tres diferentes concentraciones ambientalmente relevantes de GLB que se eligieron de acuerdo a los datos de ocurrencia de GLB en diversos cuerpos de agua (50, 100 y 1000 ng·L<sup>-1</sup>); se analizaron el cerebro, branquias, sangre, hígado y músculo de *C. carpio*, y se evaluaron los biomarcadores de estrés oxidativo tales como contenido de hidroperóxidos (CHP), sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARs), contenido de proteínas carboniladas (CPx), y las enzimas

antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT); así como su relación en los cambios fisicoquímicos y texturales del músculo: capacidad de retención de agua (CRA), solubilidad (SOL), Contenido de grupos sulfhidrilos (-SH), análisis de perfil de textura (TPA) y esfuerzo al corte con navaja de Warner-Bratzlet (W-B).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La importancia de este estudio radica en que la GLB es uno de los fármaco orales hipoglucemiantes de mayor prescripción para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, (segunda causa de muerte en México) y a nivel mundial y debido a su alta producción y consumo, estudios previos han comprobado la presencia de GLB, en diversos cuerpos de agua, como aguas superficiales, aguas para riego y en ríos, la cual se incorpora proveniente de las aguas de desechos industriales, hospitalarias y municipales tratadas o sin tratamientos previos.

Una de las características de estos grupos de contaminantes es que al persistir en el ambiente pueden causar efectos negativos, y para la mayoría de estos contaminantes emergentes, la incidencia, la contribución de riesgo y los datos ecotoxicológicos, no están disponibles. De igual manera es difícil predecir qué efectos pueden tener en el medio ambiente y en organismos acuáticos de interés económico y de consumo humano, como lo es la carpa común (*Cyprinus carpio*), el cual se considera un pez de importancia económica en el país y en el Estado de México, como características presenta una carne blanca, de agradable sabor y de alto valor nutrimental; y aunque se le conoce como una especie bioconcentradora, los estudios sobre la toxicidad de contaminantes emergentes en esta especie son muy escasos y

dado que pueden existir cambios producidos por los agentes oxidantes en las proteínas, podría también existir alteraciones de las características fisicoquímicas, texturales y funcionales sobre la carne de carpa común (*Cyprinus carpio*). Por lo tanto, fue necesario llevar a cabo un estudio toxicológico, fisicoquímico y textural para evaluar el efecto de la GLB sobre dichas características en la calidad de su carne.

#### **4. HIPÓTESIS**

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

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo General**

Evaluar la toxicidad inducida por glibenclamida en *Cyprinus carpio* y determinar su relación con la modificación de la propiedades fisicoquímicas y funcionales de la carne de carpa común.

##### **5.2 Objetivos Específicos**

- a) Determinar la toxicidad aguda inducida por glibenclamida en *Cyprinus carpio*.
- b) Determinar el estrés oxidativo inducido por glibenclamida en *Cyprinus carpio* a través de la determinación del grado de lipoperoxidación, contenido de hidroperóxidos, contenido de proteínas carboniladas y actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT.
- c) Determinar las características fisicoquímicas y texturales de la carne de carpa común expuesta a glibenclamida.
- d) Evaluar la influencia de la toxicidad de la glibenclamida sobre las características texturales de la carne de carpa común.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Sustancias de prueba

La GLB (número CAS 10236-21-8, >99 % de pureza) fue adquirida de Sigma-Aldrich; (Toluca, Estado de México, México), Se preparó una disolución madre de 1 g de GLB y 0.02% de DMSO para disolverlo en 1 L de agua destilada. A partir de esta disolución primaria, se prepararon todas las concentraciones de GLB que se emplearon en el estudio (50, 100 y 1000 ng·L<sup>-1</sup>).

### 6.2 Obtención y aclimatación de la especie.

Los organismos de prueba empleados en este estudio fueron la carpa común (*C. carpio*), las cuales se obtuvieron de un centro acuícola en el Estado de México, México; ubicado en el municipio de Tiacaque. Para las pruebas de toxicidad aguda se emplearon organismos en el estadio de vida de alevines, de un mes de edad, con una talla de  $2.5 \pm 0.5$  cm de largo y un peso de  $5.5 \pm 0.5$  g. Para el estudio subletal se utilizaron organismos juveniles de tres meses de edad, con una talla de  $15.5 \pm 0.5$  cm de longitud y un peso de  $57.5 \pm 4.5$  g. Para transportar los peces, se colocaron de forma segura en bolsas de polietileno selladas que contenían dos terceras partes de agua y un 80 a 90% de saturación de oxígeno, y se trasladaron al laboratorio donde se almacenaron en un tanque grande de capacidad de 500 L que contenía 450 L de agua de grifo de clorada reconstituida previamente con sales. Los peces se mantuvieron en periodo de aclimatación de 30 días previos al experimento. Durante la aclimatación, los peces fueron alimentados con comida para peces Pedregal Silver™ y se estuvo reemplazando 3/4 del agua del tanque cada 24 h. Las características fisicoquímicas del agua reconstituida se mantuvieron: temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , a una concentración de oxígeno entre el 80 % y el 90



%, con un pH de 7.5-8.0, alcalinidad total  $17.8 \pm 7.3 \text{ mg L}^{-1}$ , dureza total de  $18.7 \pm 0.6 \text{ mg L}^{-1}$ , y se mantuvo un fotoperiodo de luz/oscuridad natural (12h: 12 h).

Las aguas de la granja carpícola fueron analizados por absorción atómica con la finalidad de garantizar que las carpas no estaban expuestas a ningún contaminante. En el análisis realizado no se detectó la presencia de As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb y Zn y en las aguas del criadero. Cabe mencionar, que por su ubicación no había fuentes de exposición de fármacos u otros contaminantes que interfirieran en el experimento.

### **6.3 Determinación de la toxicidad aguda (Concentración letal media, $CL_{50}$ )**

El procedimiento para determinar la Concentración Letal media ( $CL_{50}$ ) se realizó de acuerdo a las recomendaciones de la Guía 203 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, 1992), para evaluar el efecto agudo en peces expuestos a sustancias químicas. Para éste análisis se utilizaron cinco sistemas de exposición con cinco diferentes concentraciones de GLB de: 132, 209, 332, 526 y 834  $\text{mg L}^{-1}$ , además se expuso un sexto sistema empleado como control, libre de GLB. Para cada sistema se expusieron diez peces en etapa de alevines, con  $2.5 \pm 0.5 \text{ cm}$  de largo y  $5.5 \pm 0.5 \text{ g}$  de peso. Como lo indica la guía, el experimento fue estático sin renovación de medio. El experimento se realizó por triplicado. El número total de organismos empleados en el experimento fue de 180 peces.

Los recipientes de cada sistema de prueba consistieron en peceras de vidrio de 60x40x20cm; a los cuales se les agregó las concentraciones de GLB arriba mencionadas. Los sistemas se mantuvieron a temperatura ambiente con un fotoperiodo de luz/oscuridad natural 12h:12h y proporcionando aireación constante, a una concentración de oxígeno entre el 80 % y el 90 %, durante el experimento no se proporcionó alimento a los peces.

De acuerdo a lo recomendado en la Guía 203 de la OCDE; para este análisis, el tiempo de exposición fue de 96 h, y se realizaron observaciones de los organismos de prueba a las 12, 24, 48, 72 y 96 h. La principal variable evaluada en este experimento fue la muerte. Finalmente, se calculó el LC<sub>50</sub> de GLB a 96 h, con límites de confianza al 95 % ( $p < 0.05$ ) mediante el empleo del programa de análisis Probit (EPA v1.5).

#### **6.4 Determinación de estrés oxidativo**

Para esta prueba, se emplearon tres diferentes concentraciones de GLB de 50, 100 y 1000 ng·L<sup>-1</sup>; Los tiempos de exposición fueron: 12, 24, 48, 72 y 96 h. El experimento contó con sistemas de exposición (uno por cada concentración ensayada) más un sistema control libre de GLB y para cada tiempo de exposición. El experimento se realizó por triplicado. Cada sistema contenía 5 peces en estadio juvenil, (tamaño y peso descrito en la sección 2.2); En total se utilizaron 60 sistemas de exposición y se emplearon 300 peces para el análisis. Las concentraciones utilizadas en este experimento se basan en los datos de ocurrencia de mayor relevancia de GLB presente en los diversos cuerpos de agua, tanto en aguas de desecho municipales, como en ríos; reportados por Radjenovic et al., 2007 y 2009; Rebollo et al., 2011; Wang y Gardinali, 2013; Ginebreda et al., 2012 y 2015.

Todos los sistemas de prueba se prepararon utilizando el agua con las mismas características y condiciones descritas en la sección 2.2 y los recipientes que se emplearon para cada sistema, consistieron en tanques de 120x80x40cm. Los sistemas utilizados fueron estáticos, sin renovación de medio, no se les proporcionó alimento a los peces y no se hicieron cambios en agua durante todo el experimento. Al final de cada tiempo de exposición, cada pez expuesto, fue anestesiado y se le extrajo sangre por punción utilizando una jeringa hipodérmica de 1

mL y previamente heparinizada, la punción se realizó cerca de la base del pedúnculo caudal, a media altura de la aleta anal y ventral a la línea lateral.

Después de la punción, los peces fueron anestesiados en un recipiente con agua y eugenol al 0.01 % y fueron sacrificados, para extraerles las branquias, hígado, músculo y cerebro. Los órganos fueron colocados en disolución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4); se homogenizaron y luego fueron centrifugados a 12,500 rpm y a -4 °C durante 15 min.

Las muestras centrifugadas se mantuvieron en congelación y se ocupó el sobrenadante para evaluar los siguientes biomarcadores de estrés oxidativo: contenido de hidroperóxidos (CHPx), análisis de malondialdehído (MAD), contenido de proteínas carboniladas (CPx) y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT).

### **6.5 Determinación de concentración de hidroperóxidos (CHPx)**

La concentración de hidroperóxidos (CHPx) analizada, fue basada en la oxidación de iones ferrosos a férricos por presencia de hidroperóxidos en condiciones ácidas, los iones férricos se unen al indicador anaranjado de xilenol para formar un complejo estable coloreado que fue leído a 560 nm; de acuerdo al método descrito por Jiang et al., (1992). Para éste análisis se mezclaron 0.1 mL del sobrenadante y 0.9 mL de disolución de reacción (que contenía FeSO<sub>4</sub> 0.25 mM, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 mM, anaranjado de xilenon 0.1 mM y butilato de deshidroxitolueno 4 mM, en una disolución de metanol al 90% v/v). Una vez obtenida la mezcla, se mantuvo durante un periodo de incubación de 60 min protegida de la luz y a temperatura ambiente; al pasar este tiempo, se realizó la lectura de % de absorbancia a una longitud de onda de 560 nm, frente a un blanco sometido a las mismas condiciones y empleando agua destilada en lugar del sobrenadante. Los resultados fueron expresados en

nanomoles de hidropéroxido de cumeno por miligramo de proteína contenidas en peso húmedo y la concentración de CHPx de las muestras fue calculado empleando un coeficiente de extinción de  $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### **6.6 Análisis de concentración de malondialdehído (MDA)**

El contenido de malondialdehído (MDA) fue analizado como sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBAR), mediante la técnica espectrofotométrica descrita por Buege y Aust (1978); esta técnica consistió en mezclar 0.05 mL de sobrenadante y 0.450 mL de disolución tampón Tris-HCl 150 mM (pH 7,4); a continuación, se le agregó 1 ml de reactivo de TCA-TBA (0.375% ácido tiobarbitúrico en 15% ácido tricloroacético). La disolución obtenida fue agitada durante 1 min en un vórtex y las muestras preparadas se sumergieron en baño maría a ebullición durante 15 minutos e inmediatamente se enfriaron a  $-5 \text{ }^\circ\text{C}$  por 3 min, posteriormente, las muestras se incubaron durante 30 min a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , transcurrido este tiempo, las muestras fueron centrifugadas a 3500 rpm durante 10 min. Por último, se realizó la lectura de % de absorbancia de las muestras a 535 nm empleando un blanco con el mismo tratamiento de las muestras y empleando agua destilada en lugar del sobrenadante. Los resultados fueron expresados en nm de MDA por miligramo de proteína. La concentración de MDA de las muestras fue calculado empleando un coeficiente de extinción de  $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### **6.7 Determinación de Concentración de Proteínas Carboniladas (CPx)**

La cuantificación de las proteínas carboniladas (CPx), se determinó en base al método

descrito por Levine et al. (1994) y modificado por Parvez y Raisuddin (2005) y Burcham (2007). En éste análisis se mezclaron 0.2 mL de sobrenadante y 0.15 mL de dinitrofenilhidrazina (10 mM, disuelta en HCl 2M), la mezcla fue incubada durante 60 min, protegida de la luz y a temperatura ambiente; seguido del tiempo de incubación, a la disolución se le agregó 0.5 mL de ácido tricloroacético al 20%, y se centrifugó durante 5 minutos a 11000 rpm. El precipitado resultante se recolectó y se lavó varias veces con disolución (1:1) de acetato de etilo-etanol, una vez realizados los lavados, el botón del precipitado se disolvió en 1 ml de una disolución de guanidina (6M, pH 2.3) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después de este tiempo, el contenido de proteínas carboniladas se calculó realizando lectura del % de absorbancia de las muestras resultante a 366 nM. Los resultados se expresaron en nM de carbonilos reactivos (C=O)/mg de proteína en tejido húmedo, usando el coeficiente de extinción molar (CEM) con un valor de  $21\ 000\ \text{M}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$

### **6.8 Determinación de actividad de enzima superóxido dismutasa (SOD)**

La actividad de enzima antioxidante SOD fue analizada de acuerdo al método de Marklund & Marklund (1974) modificado por Magnani et al. (2000). En este proceso el sobrenadante fue previamente deslipidado adicionando 0.03 mL de clorofomo y 0.05 mL de metanol, se agitó en vortex por un minuto y se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente a 0.1 mL del sobrenadante se le adicionaron 2.8 mL de disolución amortiguadora Tris-EDTA pH 8.2. La mezcla obtenida se agitó en vortex durante 1 minuto y finalmente se le adicionaron 0.05 mL de disolución de pirogallol 0.2 mM. Se determinó la diferencia de densidades ópticas a los 10 y 60 segundos a una longitud de onda de 420 nm. Posterior a este proceso, se obtuvo el porcentaje de inhibición de la autooxidación de pirogallol del diferencial de densidades

ópticas de la muestra entre el diferencial de densidades del control y este resultado se multiplicó por 100%. Los resultados se expresaron en unidades internacionales de SOD (UI), para lo cual se calculó el cociente del porcentaje de inhibición de la autooxidación del pirogallol entre 50%, debido a que una UI de SOD inhibe en un 50% la reacción de auto oxidación del pirogallol a 25°C. Dichos resultado se expresaron por mg de proteína en tejido húmedo.

### **6.9 Determinación de la actividad de enzima catalasa (CAT)**

La actividad de la CAT fue estimada por el método de Radi et al. (1991); Este método se basa en medir la actividad de la enzima al reducir el sustrato de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en un medio que se realizó mezclando 1 ml de disolución buffer de aislamiento (sacarosa 0.3 M, EDTA 1 mM, HEPES 5 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM) con 0.02 mL de sobrenadante; a dicha mezcla se le agrega 0.2 mL de disolución de peróxido de hidrógeno (20 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La actividad de CAT necesaria para reducir el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se mide a los 0 y 60 segundos; a una longitud de onda de 240 nm. Los resultados se expresaron en μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por miligramo de proteína en tejido húmedo. Los valores se calcularon mediante la substitución de las lecturas de absorbancia obtenidos en la siguiente fórmula: Concentración de CAT= (A<sub>0</sub>-A<sub>60</sub>)/CEM, donde el coeficiente de extinción molar (CEM) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es de 0.043 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Los resultados se expresan en unidades/mg proteína. Una unidad es definida como la cantidad de enzima que puede descomponer un μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto a 25°C y a pH de 7.0

### **6.10 Determinación de proteínas totales**

Se realizó el análisis de proteínas totales de acuerdo al método espectrofotométrico descrito

por Bradford (1976); en éste análisis se mezclan 0.025 mL de sobrenadante con 0.075 mL de agua deionizada y 2.5 ml de reactivo de Bradford. La mezcla resultante se homogenizó en vortex durante 1 min y se incubó durante 5 min, protegida de la luz y a temperatura ambiente. Después de éste tiempo, se realizó la lectura de absorbancia a 595 nm. Para obtener la concentración total de proteínas contenidas en cada muestra, se interpolan las lecturas de absorbancia en una curva estándar de concentración de proteína de albumina sérica bovina, expresado en mg de proteína/mg de tejido húmedo.

### **6.11 Cuantificación de glibenclamida por cromatografía de líquidos-tandem espectrofotometría de masas (HPLC-MS/MS)**

#### **6.11.1 Equipo y condiciones cromatográficas**

La cuantificación de GLB en muestra de agua y tejidos fue realizada con el equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución Agilent 1100 (Palo Alto, CA, USA) equipado con un degasificador de vacío, una bomba cuaternaria y un muestreado automático también de la marca Agilent. La separación se llevó a cabo utilizando columnas provistas por Agilent, LiChrospher® 100 RP-18 (125 mm x 4 mm i.d., 5 µm de tamaño de partícula). El volumen de inyección utilizado fue de 30 µL. La velocidad de flujo fue de 0.7 mL min<sup>-1</sup>. La separación fue realizada utilizando el gradiente de elución con ácido fórmico al 0.1% v/v, como disolvente A y con una disolución acuosa de 10 mM de formiato de amonio [conteniendo ácido fórmico al 0.1% v/v], como disolvente B. El programa de gradiente de dilución fue de: 0–3 min: 10% solvente A, 3–5 min: incremento linear al 50% A, 3–8 min: incremento linear al 90% A, 8–10 min: 90% A, 10–10.1 min: decremento linear al 10% A con un final al 10% A, hasta los 12.0 min. La columna fue mantenida a una temperatura de 25° C.

Las mediciones de espectrofotometría de masas fueron realizadas en un equipo 6520

quadrupole/time-of-flight (Q-TOF) el cual estaba equipado con una fuente de ionización por electrospray (Agilent, Palo Alto, CA, USA). Los siguientes ajustes fueron considerados para lograr la ionización de GLB: 1) MS (voltaje capilar: 3800 V, 2) velocidad de gas de secado 12 L min<sup>-1</sup>, 3) temperatura de gas de secado: 350 C, and 4), presión del nebulizador: 60 psi. El equipo fue operado en el modo de alta resolución 4GHz. El eje de masa se calibró en el rango de 70-3200 m/z usando la mezcla provista por el fabricante. Se utilizó un pulverizador con una solución de referencia para la calibración continua en el modo de ionización positiva usando las masas de referencia: 121.05 m/z and 922.01m/z. La optimización de los parámetros del Q-TOF MS para la GLB fueron: 1) Tiempo de retención en minutos: 8.56; 2) ion precursor (m/z): 494.15; 3) Producto iones (m/z): 169.0027; 171.0037 ; 4) Fragmentador (V): 100; Energía de colisión (eV): 10; límite de detección instrumental.: 0.20 ng L<sup>-1</sup>.

#### **6.11.2 Extracción en fase sólida**

Para la extracción de la GLB de las muestras en fase solida se utilizaron cartuchos Chromabond Tetracycline. Dichos cartuchos fueron acondicionados usando 10 mL de metanol seguidos de 5 mL de agua grado HPLC. Previo a la extracción con los cartuchos empleados, el pH de las muestras en disolución (agua) fue ajustado a 8.5 adicionando NaOH 0.1 M. 200 mL de las muestras de agua fueron percoladas a través de los cartuchos a una velocidad de flujo de aprox. 10 mL min<sup>-1</sup>. Después cada muestra fue mezclada con 10 mL of HPLC-grado analítico. Los cartuchos fueron lavados con otros 5 mL agua grado HPLC y secados por 10 min. La GBL fue diluida utilizando alícuotas de 1 mL de metanol a una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Las diluciones fueron recolectadas en tubos de 10 mL y evaporadas a temperatura ambiente y después se secaron con vapor de nitrógeno. Los



extractos fueron reconstituidos en 1 mL de metanol.

Las muestras de hígado, branquias, cerebro y músculo fueron previamente liofilizadas, y se empleó extracción en fase sólida acelerada utilizando un gramo de tejido liofilizado, metanol con 1% de ácido acético, el agente dispersante utilizado fue arena (20–30 tamaño de partícula de la malla), se emplearon filtros de fibra de vidrio y de celulosa para retener la fase lipídica.

Las condiciones de extracción fueron: 1) 1000 psi; 25°C, 6 min de calentamiento, Ciclo estático de 3 x 10 min, descarga al 100%, purga de 60 s, células de 11 ml que contienen un filtro de celulosa.

Después del proceso de obtuvieron 15 mL de la GLB para su análisis empleando las condiciones mencionadas en la sección anterior.

### **6.12 Correlación de Pearson**

Se realizó un análisis de correlación de Pearson para encontrar relaciones potenciales entre las concentraciones de GLB en los órganos evaluados y los biomarcadores de estrés oxidativo utilizados en este estudio, para dicho fin se empleó el programa Sigma Stat v2.03.

### **6.13 Análisis Físicoquímicos**

#### **6.13.1 Medición de pH**

Este análisis se realizó de acuerdo al método de la AOAC 981.12/2005; se pesó el músculo y se homogenizó con agua destilada sin CO<sub>2</sub> recientemente hervida, (pH 7) en una relación 1:10, la temperatura de la disolución se ajustó a 20°C ± 0,3°C, y se filtró, se realizó la lectura de pH con un potenciómetro digital (Hanna instrument pH 210, Ukraine) previamente verificado con las soluciones buffer de pH 4, 7 y 10.

### **6.13.2 Análisis de Capacidad de Retención de Agua (CRA)**

De acuerdo con el método Honikel & Hamm, 1994, adaptado por Dublán et al., 2006. Se pesaron  $10 \pm 0.5$  g de músculo y se cortaron finamente, a continuación, se tomaron 5 g de esta muestra y se colocaron en un tubo de centrifuga al cual se le adicionaron 8 mL de una disolución de NaCl 0,6 M, esta mezcla se agitó con varilla de vidrio durante 1 min en baño de hielo y se dejó reposar durante 30 min, pasado este tiempo, se agitó nuevamente con varilla de vidrio por 1 min y se centrifugó por 15 min a 3500 rpm. El sobrenadante se decantó y se midió el volumen. Los resultados se reportaron como el volumen de NaCl retenido por 100 g de muestra.

### **6.13.3 Análisis de Solubilidad**

Se realizó de acuerdo al método de Pilosof, 2000. A una muestra de 10 mL que contenga 5 mg·mL<sup>-1</sup> de proteína (CP), se centrifugó a 3500 rpm a 4°C. Al sobrenadante extraído se le determinó la concentración de proteínas mediante el método biuret. La solubilidad se reportó como la relación entre el contenido de proteínas del sobrenadante y el contenido de la proteína sin centrifugar por 100 para expresarlas en porcentaje.

### **6.13.4 Determinación de Sulfhidrilos totales (-SH)**

Se llevó a cabo de acuerdo al método Ellman, 1959; reportado por Morachis-Valdez et al., 2017; se mezcló 1 mL del CP (con 5 mg·mL<sup>-1</sup> de proteína), y 9 mL de urea 8 M disuelta en un amortiguador de Tris-Glicina-EDTA (10,4 g·L<sup>-1</sup> Tris; 6.9 g·L<sup>-1</sup> Glicina; 1.2 g·L<sup>-1</sup> EDTA; pH 8). Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min, posteriormente a 3 mL de la mezcla se agregaron 50 mL de una disolución del reactivo 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzónico (4 mg·mL<sup>-1</sup> en la misma disolución amortiguadora) y se dejó reposar durante 30 min en

obscuridad, se midió la absorbancia a una longitud de onda  $\lambda = 412$  nm. La concentración final de -SH fue expresada como  $\mu\text{M SH}/(\text{mg de proteína})$ .

#### **6.14 Análisis de Esfuerzo al corte W-B**

Se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por De Huidobro et al., 2005, con modificaciones. Muestras de  $3 \text{ cm}^2$  se colocaron horizontalmente entre la base de la celda y la navaja que efectuó el corte, que bajó verticalmente hasta cortarla en dos partes. La resistencia al corte se evaluó con una velocidad de prueba de  $1 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$  y velocidad de retroceso de  $2 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ , con una navaja Warner-Bratzler (HDP/BSW, Stable MicroSystems, Surrey, UK) adaptada al analizador de textura TA-XT2, versión 2.63, (Texture Technologie Corporation, Scarsdale, Nueva York, USA). Se reportó la fuerza máxima detectada para el esfuerzo al corte en Newtons.

#### **6.15 Concentración de proteína (CP)**

Para su determinación se empleó el método biuret reportado por Zhou & Regenstein, 2006. Se mezcló 1 mL de disoluciones 1:1, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25 de músculo:agua destilada y 3 mL del reactivo de biuret (1.5 g de sulfato de cobre y 6 g de tartrato de sodio y potasio en 500 mL de agua destilada, en matraz volumétrico de 1L, se adicionaron 300 mL de hidróxido de sodio al 10% y se aforó a 1L con agua destilada). Se homogenizó y se dejó en reposo en oscuridad durante 30 min, se midió a una longitud de onda de  $\lambda = 540$  nm, los datos obtenidos se correlacionaron con una curva patrón de seroalbúmina-bovina de concentración 0 -10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

#### **6.16 Formación de gel**

Método reportado por Silva-Ríos 2013, con modificaciones. Cada muestra de concentrado protéico (CP), con  $50 \text{ mg de proteína}\cdot\text{mL}^{-1}$ , se vertió en un frasco de vidrio con tapón rosca; el

proceso de formación del gel se llevó a cabo sometiendo cada frasco de vidrio a una rampa de temperatura en baño maría: primero, las muestras son calentadas gradualmente hasta llegar a los 40°C y se mantienen a esta temperatura durante 30 minutos, pasado este tiempo, se va elevando la temperatura 1°C/min hasta alcanzar los 75°C dentro del gel, las muestras se mantienen a esa temperatura durante 20 minutos y pasado este tiempo, se llevan a un choque térmico colocándolas en un baño de hielo. Finalmente, los geles se dejan madurar en refrigeración a 4°C durante 24 h para su posterior evaluación.

#### **6.17 Análisis de Perfil de Textura (TPA)**

Se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado en Jafarpour & Gorczyca (2009), con modificaciones: en texturómetro TA-XT2, versión 2.63, (Texture Technologie Corporation, Scarsdale, Nueva York, USA) y con una celda de carga de 5 Kg. Los geles formados en los tubos se colocaron en una base y se penetraron utilizando un vástago de acrílico de 8 mm de diámetro. La velocidad de descenso del vástago fue de 1 milésima de segundo y la penetración correspondió al 75% del espesor del gel, seguido de una segunda penetración. El valor obtenido fue el trabajo total o área bajo la curva expresado en  $\text{Newtons}\cdot\text{s}^{-1}$ , determinando: dureza, cohesividad, elasticidad, masticabilidad y gomosidad.

#### **6.18 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes**

De acuerdo al método reportado por García-Carreno et al., (1993), con modificaciones, primero se realizó la extracción de proteínas. Se mezcló una relación 1:4 muestra: amortiguador, muestra (disolución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% + mercaptoetanol al 5% + azul de bromofenol al 0.05%+ glicerol, 0.5M Tris-HCl pH 6.8) y se calentó en un baño maría a 97°C durante 2 min, antes de su aplicación. Se inyectó 20  $\mu\text{L}$  de muestra en cada carril de gel separador de 12% de poliacrilamida y concentrador 4%. Se

inyectó 10  $\mu\text{L}$  de un marcador que contenga proteínas de interés, las muestras se trataron en las mismas condiciones. Se utilizó un buffer de corrida (9.0 g base tris, 43.2 g de glicina y 3.0 g de SDS se adicionaron 600 mL de agua desionizada, conductividad del agua:  $0,056 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Para una corrida electroforética se diluyeron 60 mL de buffer con 240 mL de agua desionizada. Se conectó a una fuente de poder con un voltaje de 200 y una temperatura de  $4\pm 1^\circ\text{C}$ , para evitar así el efecto Joule. Una vez terminado el proceso de separación, se tiñeron los geles empleando una disolución de azul brillante de Coomassie R-250 al 0.1%, metanol 40% y ácido acético al 10% durante 30 min. Para desteñir se empleó una disolución al 40% de metanol y 10% de ácido acético.

### **6.19 Análisis estadístico**

El análisis de toxicidad aguda a 96 h ( $CL_{50}$  de glibenclamida en alevines de *C. carpio*), fue calculado mediante el programa Probit (EPA v 1.5) con un grado de significancia del 95%. Los resultados obtenidos del análisis de estrés oxidativo, fueron analizados estadísticamente mediante el programa de análisis de varianza de una vía (ANOVA) y las diferencias entre medias fueron comparadas mediante la prueba de Bonferroni de comparación múltiple, con un valor de  $p < 0.05$ . El software que se empleó fue el SPSS v 9 (SPSS, Chicago IL, USA). Los resultados obtenidos en el análisis fisicoquímico y textural, se llevó a cabo mediante un análisis de varianza ANOVA y prueba de diferencia de medias con el método de Tukey con un nivel de significancia de ( $p < 0.05$ ), con el programa SPSS v 9.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Concentración letal media $CL_{50}$ – 96h**

El valor obtenido de la  $CL_{50}$  a 96 h de GLB en alevines de *C. carpio* fue  $509.06 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , con

un intervalo de confianza del 95 % de 505.96 a 512.16 mg L<sup>-1</sup> ( $p < 0.05$ ).

## 7.2 Concentración de Hidroperóxidos (CHPx)

Los resultados de CHPx se muestran en la Fig. 9. Para la concentración de 1000 ng L<sup>-1</sup> se presentaron incrementos significativos con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ) a las 24, 48, 72 y 96 h en **cerebro** (254, 207, 214 y 119% respectivamente); en **sangre** se observó para los 5 tiempos incrementos significativos respecto al grupo control de 418, 614, 704, 669 y 884% respectivamente; en **hígado** a los 5 tiempos se observó aumento significativo respecto al grupo control de 55, 94, 68, 66 y 51% respectivamente; en **branquias** a las 24 y 96 h, de un 37% a un 54% y finalmente en los 5 tiempos se observó aumento significativo respecto al control ( $p < 0.05$ ) en **músculo**, de 368, 736, 734, 928 y 803% respectivamente. Para la concentración de 100 ng L<sup>-1</sup> se presentaron aumentos significativos con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ) en **sangre** para los 5 tiempos, de 318, 314, 585, 598, y 762% respectivamente, en **hígado** a los 5 tiempos (de 38, 46, 29, 32 y 52% respectivamente); en **branquias** a las 12, 24 y 48 h (26, 28 y 26% respectivamente) y en **músculo** se presentó un incremento significativo respecto al grupo control en los 5 tiempos (de 301, 450, 451, 436, y 324% respectivamente). Para el caso de la menor concentración de GLB, que fue de 50 ng L<sup>-1</sup>; solo se presentaron diferencias significativas con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ) para **sangre** en los 5 tiempos (318, 314, 585, 598 y 762% respectivamente); y para **músculo** en todos los tiempos (124, 379, 380, 394 y 319% respectivamente).

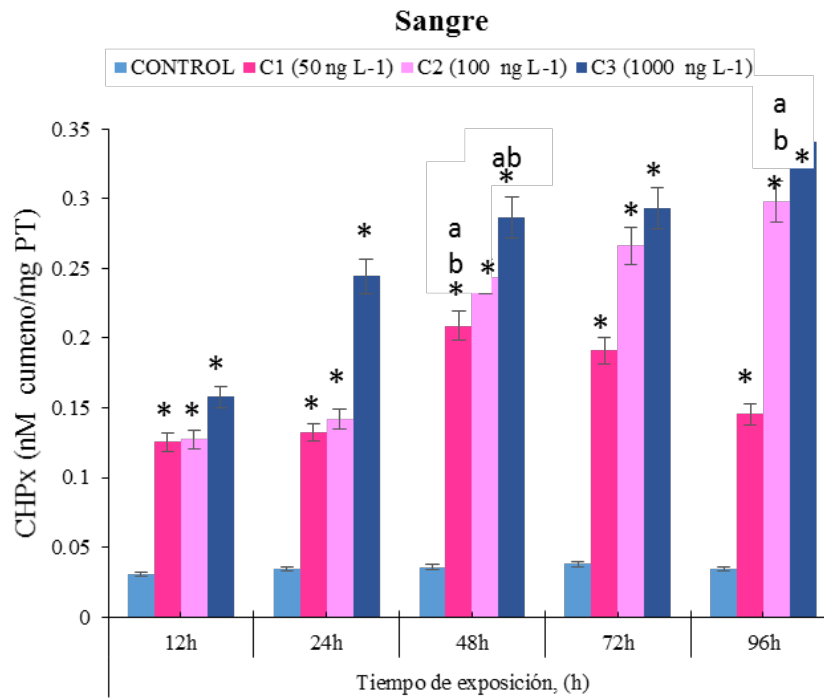


Figura 9 a.

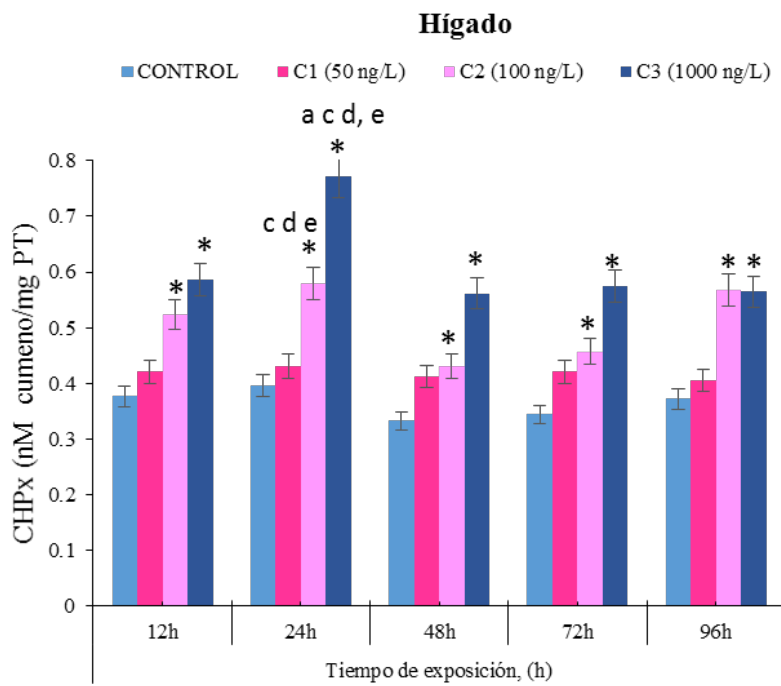


Figura 9 b.

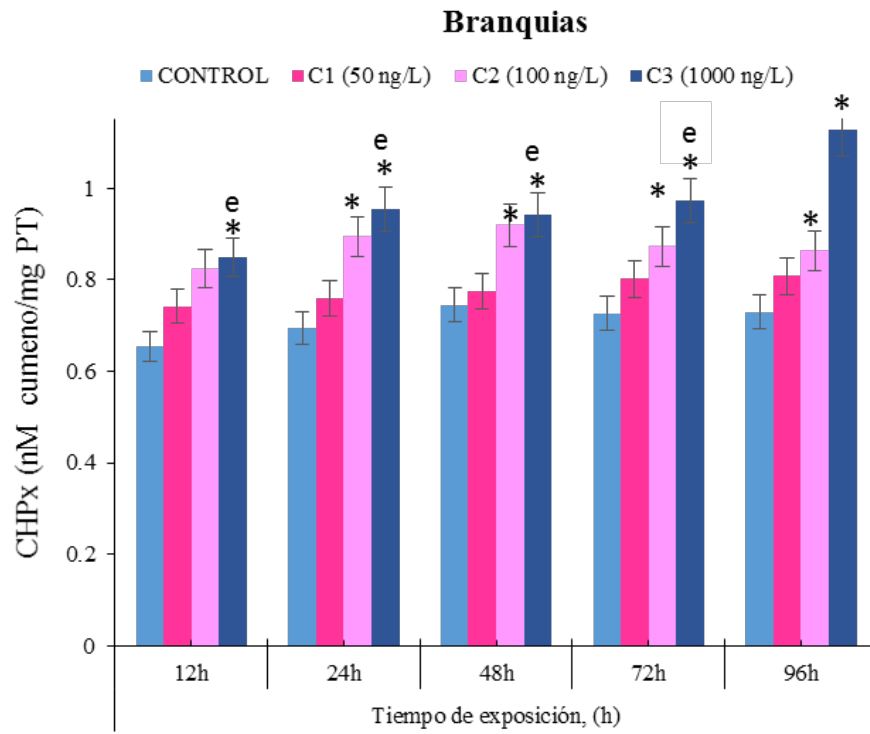


Figura 9 c.

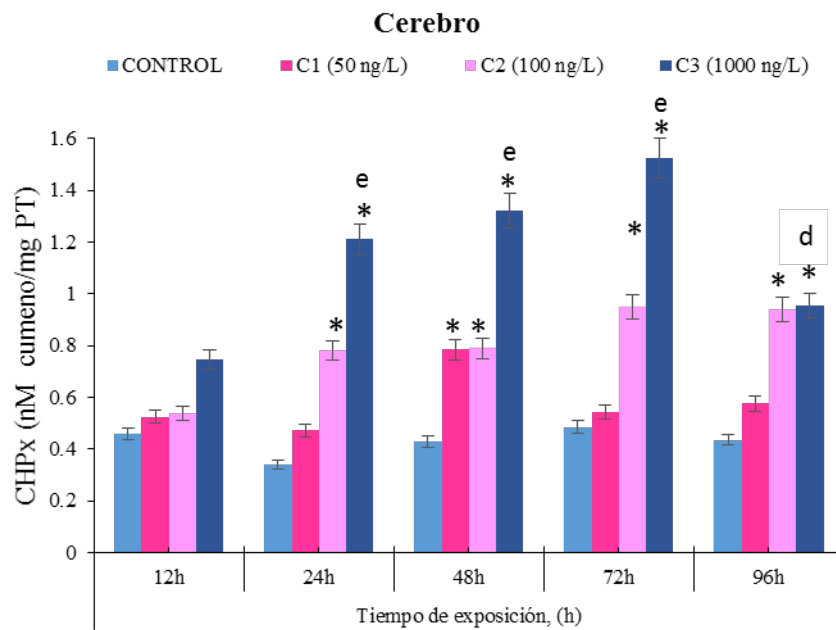
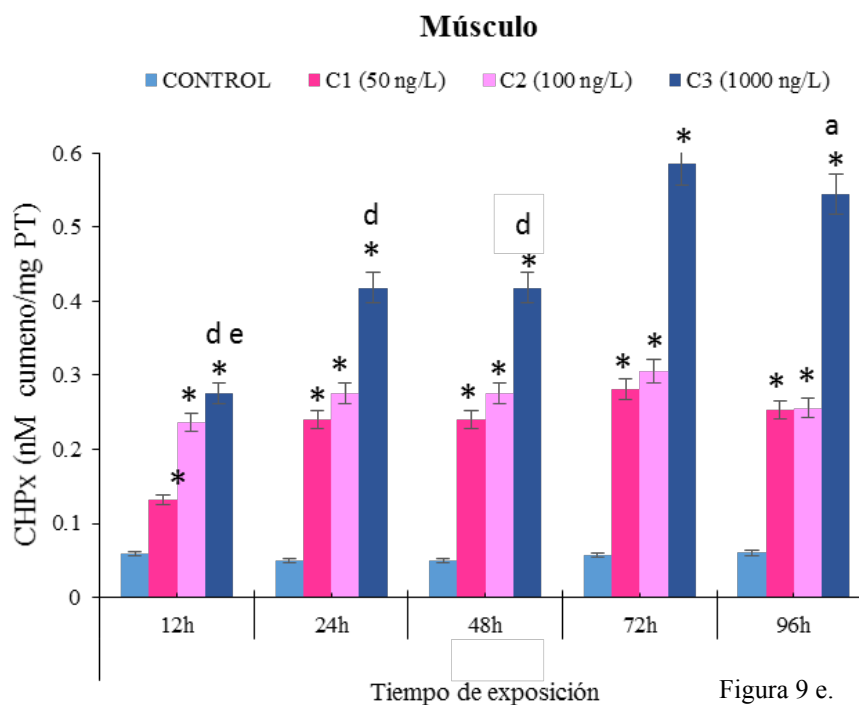


Figura 9 d.





**Figura 9.** Contenido de hidroperóxidos (CHPx) en a. sangre, b. hígado, c. branquias, d. cerebro y e. músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a tres concentraciones de GLB (C1: 50 ng/L, C2: 100 ng/L y C3: 1000 ng/L) para 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la media de tres repeticiones  $\pm$  DE. CHP: hidroperóxido de cumeno. \*Diferencia significativa con respecto al grupo control, <sup>a</sup> 0h, <sup>b</sup> 24h, <sup>c</sup> 48h, <sup>d</sup> 72h y <sup>e</sup> 96 h. ANOVA y Bonferroni ( $p < 0.05$ ). Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis estrés oxidativo.

### 7.3 Concentración de malondialdehido (MDA)

La concentración de MDA inducida por GLB se muestra en la Fig. 10. Para la mayor concentración de 1000 ng L<sup>-1</sup>, en *sangre* se observó un incremento significativo en comparación con el grupo control ( $p < 0.05$ ) en los 5 tiempos 12, 24, 48, 72 y 96 h (de 198, 315, 268, 211 y 171% respectivamente); en *hígado* también se observaron incrementos significativos respecto al grupo control en los 5 tiempos (de 148, 186, 195, 143 y 129%, respectivamente); en *branquias* de igual manera se obtuvo un incremento significativo respecto al grupo control para los 5 tiempos (de 312, 471, 437, 294 y 302% respectivamente); en *cerebro* el aumento significativo respecto al grupo control se presentó a las 72 y 96 h (112 y 87% respectivamente) y en *músculo* se presentó un aumento significativo respecto al grupo

control para los 5 tiempos (1391, 1621, 1309, 1334 y 850% respectivamente). Para el caso de la concentración de 100 ng L<sup>-1</sup>, se obtuvo en **sangre** un aumento significativo respecto al grupo control ( $p<0.05$ ) en los 5 tiempos de 88, 169, 172, 177 y 111% respectivamente; en **hígado** se observó un aumento significativo respecto al grupo control a las 12, 24, 48 y 72 h (de 150, 185, 167 y 92% respectivamente); en **branquias** se observaron importantes incrementos significativos respecto al grupo control en los 5 tiempos (137, 617, 409, 336 y 310% respectivamente); en **cerebro** se observó incremento significativo respecto al grupo control a las 72 y 96 h (53 y 50% respectivamente) y en **músculo** se observó un incremento significativo respecto al grupo control durante todos los tiempos (696, 835, 1223, 966 y 591%, respectivamente). Para el caso de la menor concentración de 50 ng L<sup>-1</sup>, se encontraron diferencias significativas con respecto al grupo control ( $p<0.05$ ), en **sangre** a las 24 y 48h (47 y 40% respectivamente); en **hígado** a las 48, 72 y 96 h (134, 145 y 147%); en **branquias** para todos los tiempos (103, 219, 141, 110 y 153% respectivamente); en **cerebro** en los tiempos de 72 y 96 h (96 y 103% respectivamente) y en **músculo** a las 24, 48, 72 y 96 h con incrementos de 99, 346, 727 y 631% respectivamente.

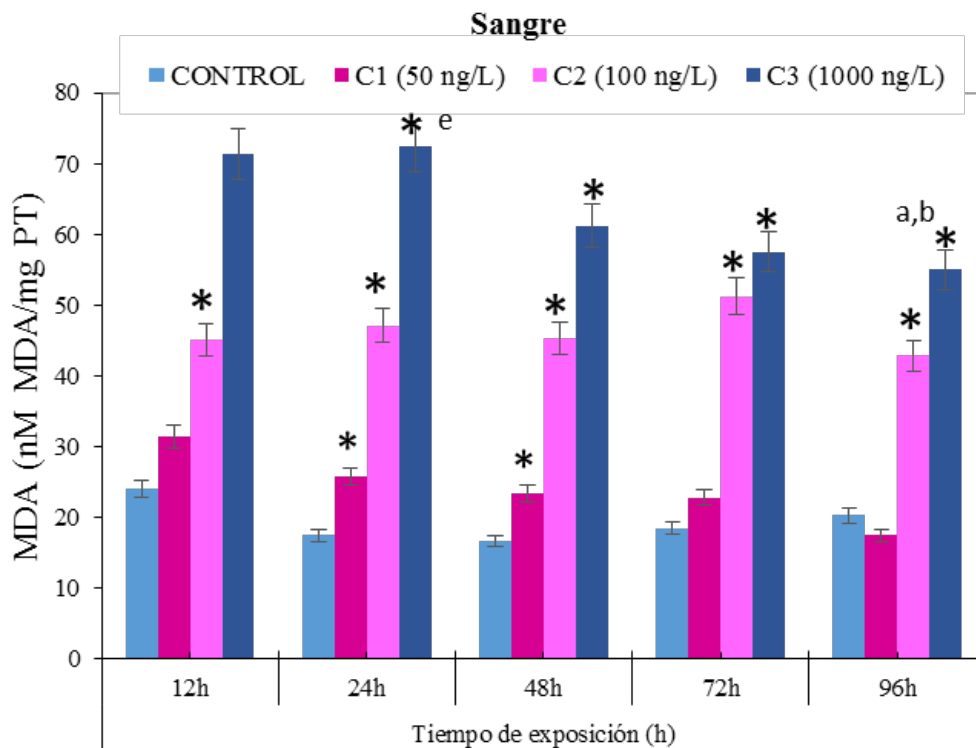


Figura 10 a.

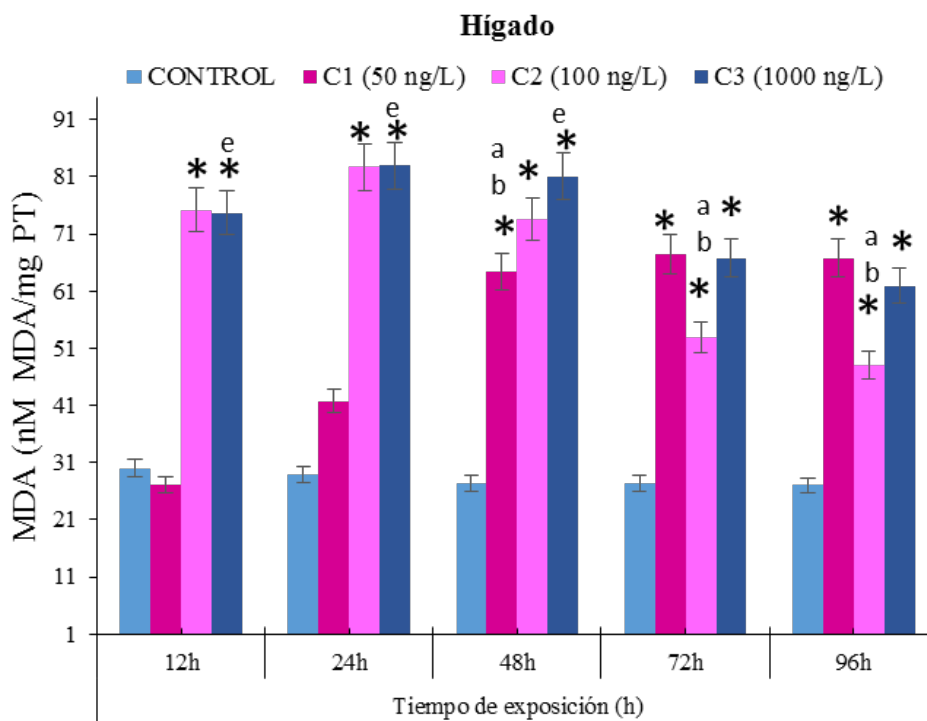


Figura 10 b.

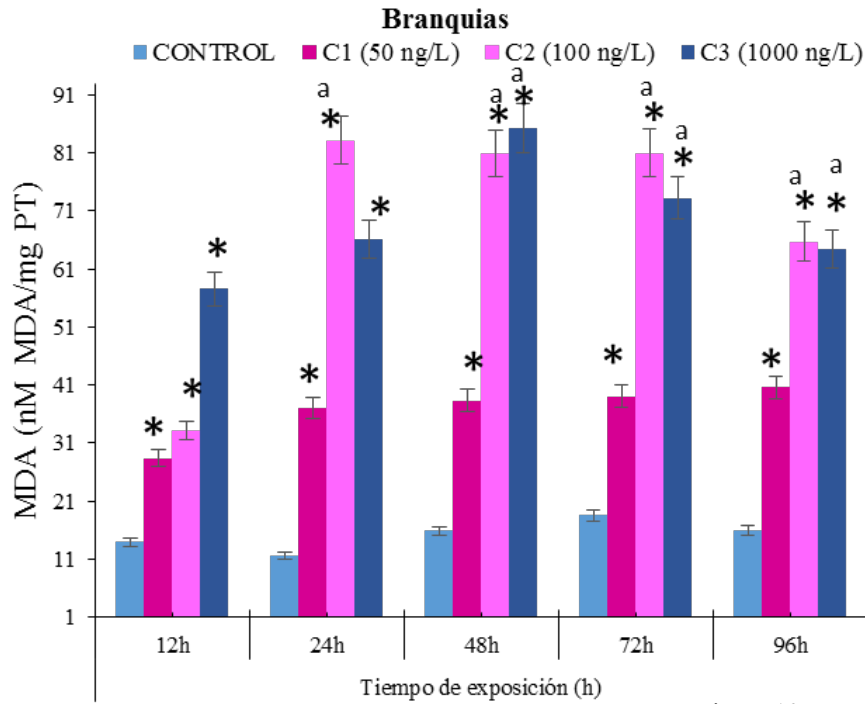


Figura 10 c.

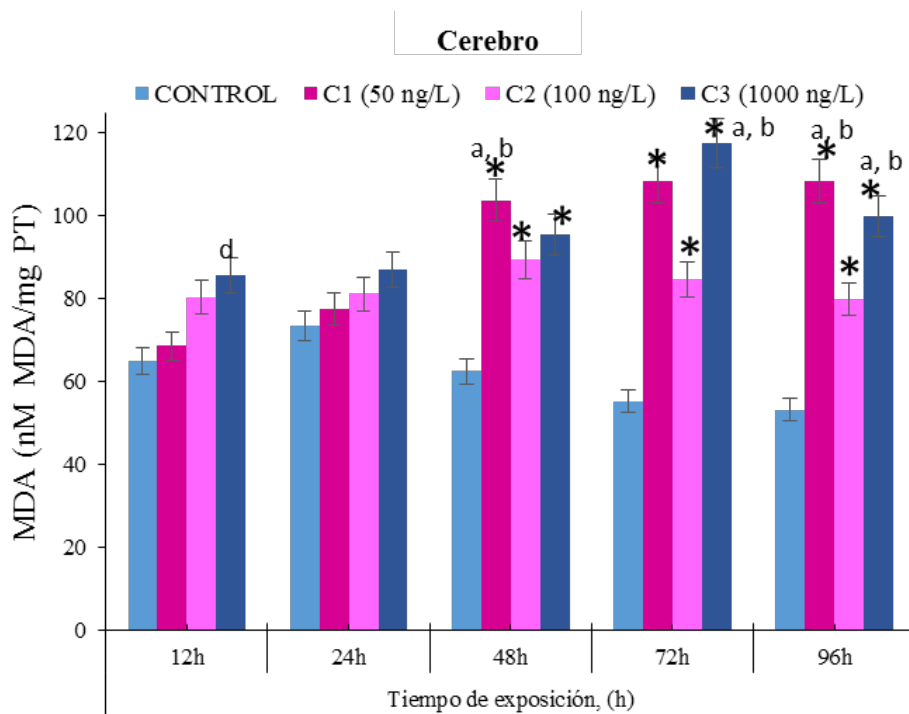


Figura 10 d.

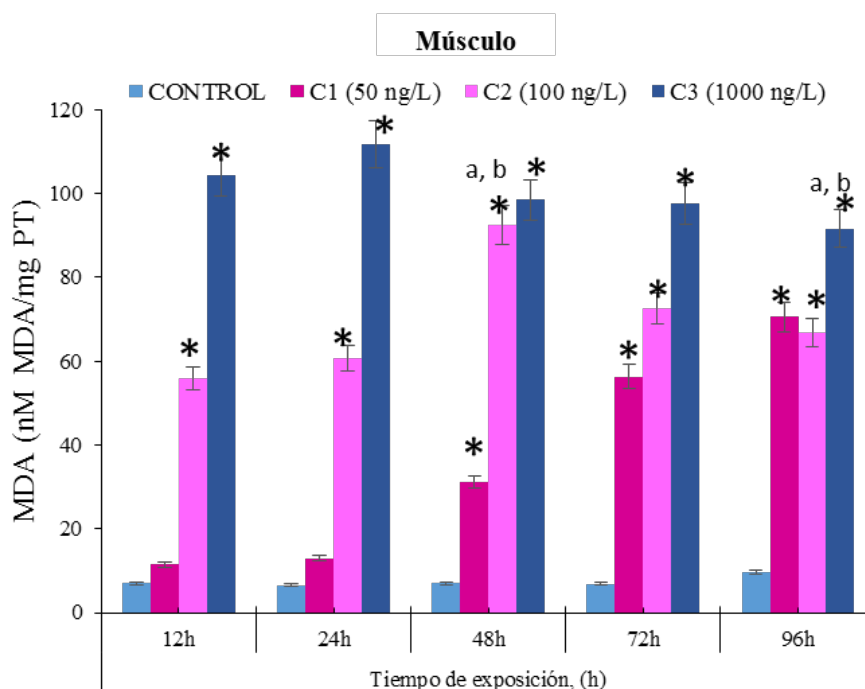


Figura 10 e.

**Figura 10.** Peroxidación lipídica (LPX) en a) sangre, b) hígado, c) branquias, d) cerebro y e) músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a tres concentraciones de GLB (C1: 50 ng/L, C2: 100 ng/L y C3: 1000 ng/L) para 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la media de tres repeticiones  $\pm$  DE. MDA: malondialdehído. \*Diferencia significativa con respecto al grupo control, <sup>a</sup> 0h, <sup>b</sup> 24h, <sup>c</sup> 48h, <sup>d</sup> 72h y <sup>e</sup> 96 h. ANOVA y Bonferroni ( $p < 0.05$ ). Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis estrés oxidativo.

#### 7.4 Concentración de Proteínas carboniladas (CPx)

Los resultados de CPx se muestran en la Fig. 11. Un aumento significativo con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ) fue encontrado en **sangre** en todos los tiempos en la concentración de 1000 ng L<sup>-1</sup> (119, 108, 116, 100 y 119% respectivamente) en **hígado** a las 12, 24 y 48 h (47, 73 y 54% respectivamente), en **branquias** a las 12, 24 y 48 h, (47, 75 y 57% respectivamente); en todos los tiempos en **cerebro** (233, 308, 322, 304 y 347% respectivamente) y en **músculo** en todos los tiempos (141, 231, 249, 401 y 675% respectivamente). Para la concentración de 100 ng L<sup>-1</sup>; se encontró diferencia significativa respecto al grupo control en **cerebro** para todos los tiempos (156, 218, 141, 216 y 299% respectivamente); para el **músculo** en todos los tiempos (111,

269, 234, 317 y 401% respectivamente), en **sangre** se obtuvo diferencia significativa respecto al grupo control ( $p<0.05$ ) a las 12, 24 y 48 h (67, 30 y 50%); en **hígado** a las 12, 24 y 48 h (41, 49 y 30% respectivamente); en **branquias** se presentó un incremento significativo respecto al grupo control a las a las 12, 24 y 48 h (34, 75 y 26% respectivamente); y finalmente para una concentración de  $50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  se presenta diferencia significativa respecto al grupo control en **sangre** a las 12 y 24 h (28 y 24% respectivamente); en **hígado** a las 12 24 h (30 y 31% respectivamente); en **branquias** a las 24 y 48h (75 y 26% respectivamente); en **cerebro** a las 24, 48, 72 y 96 h, (94, 212, 214 y 165% respectivamente) y en **músculo** a las 48, 72 y 96 h (90, 132 y 180 % respectivamente).

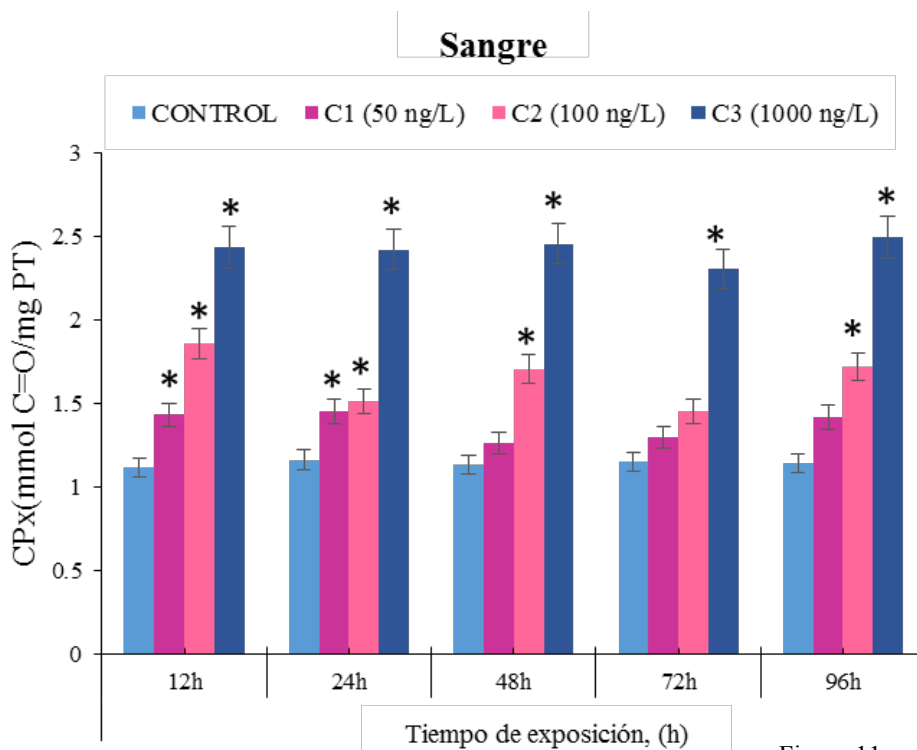


Figura 11 a.

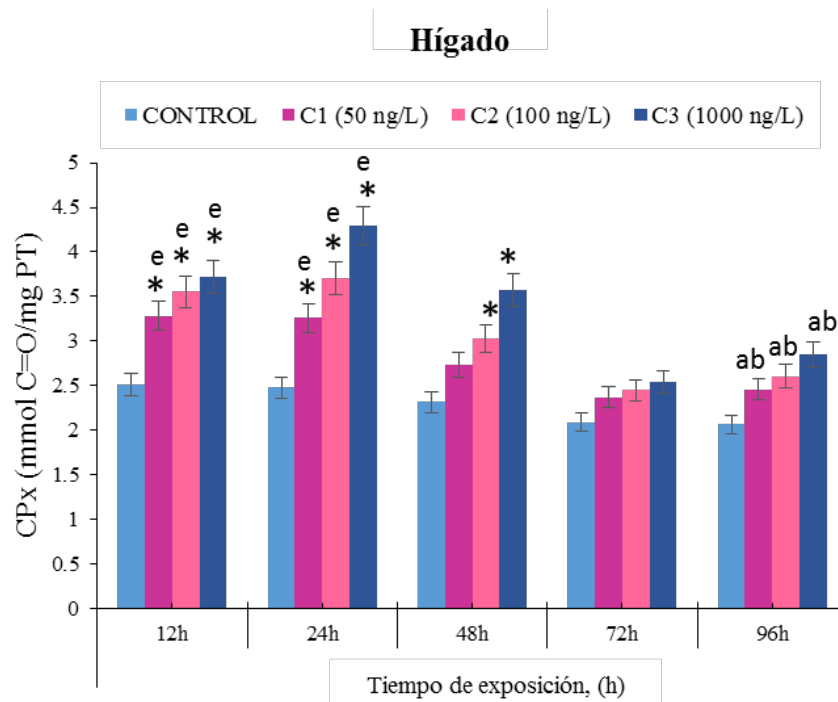


Figura 11 b.

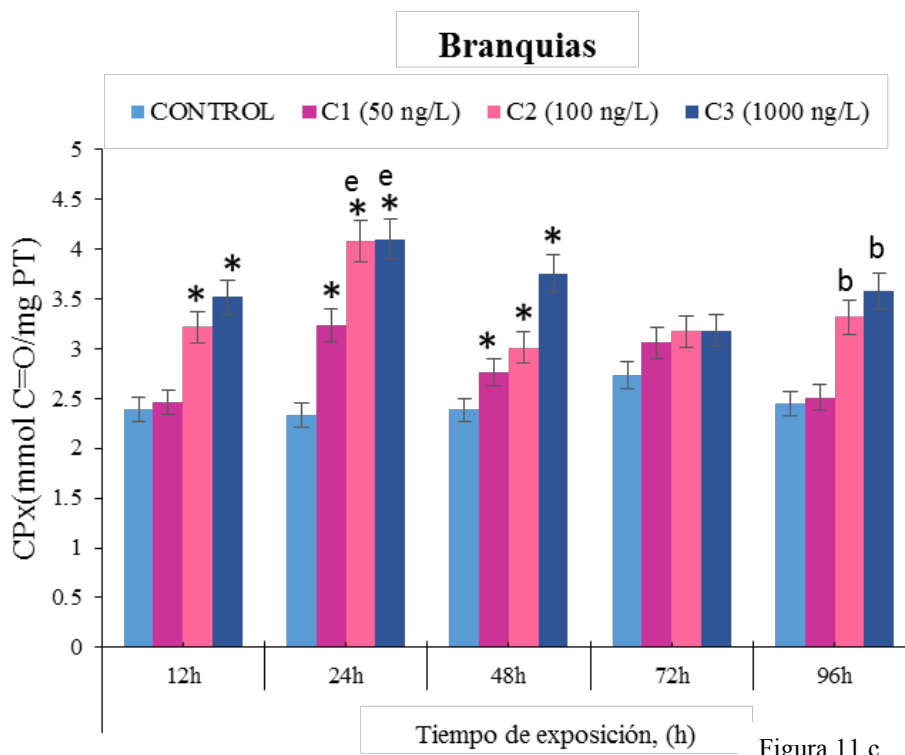
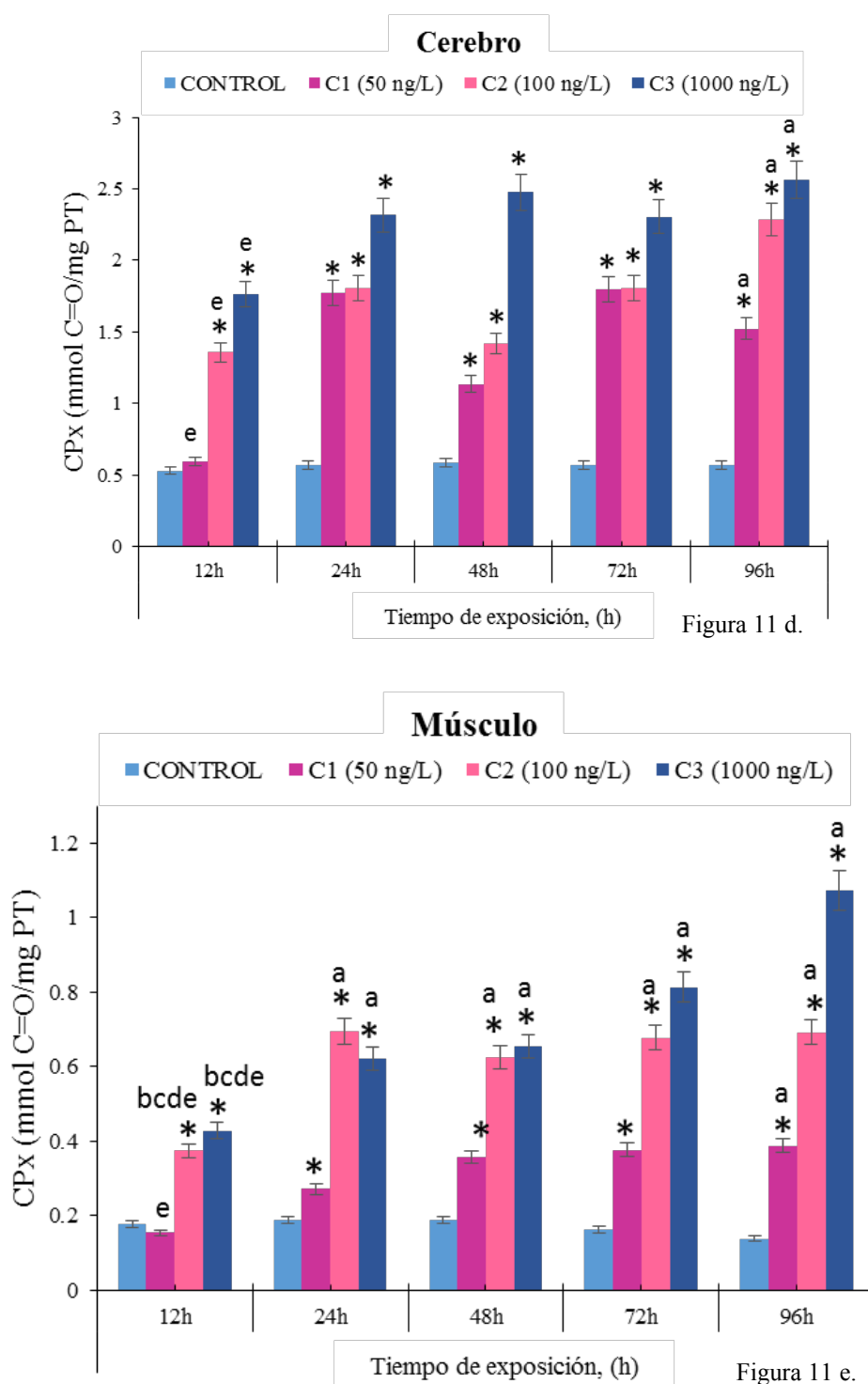


Figura 11 c.

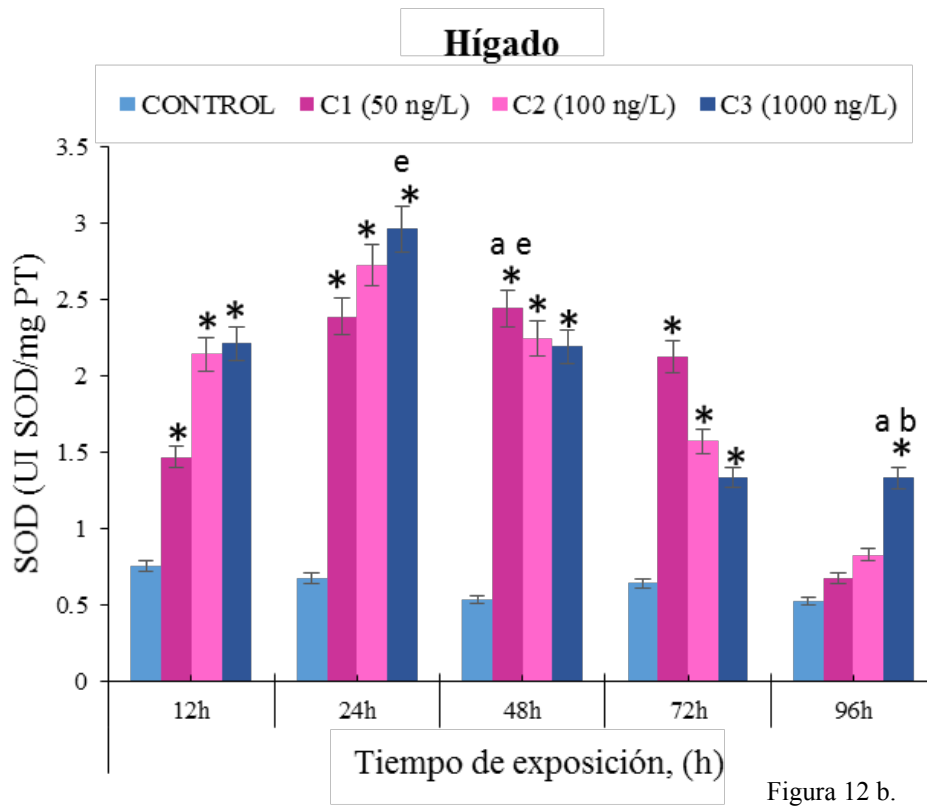
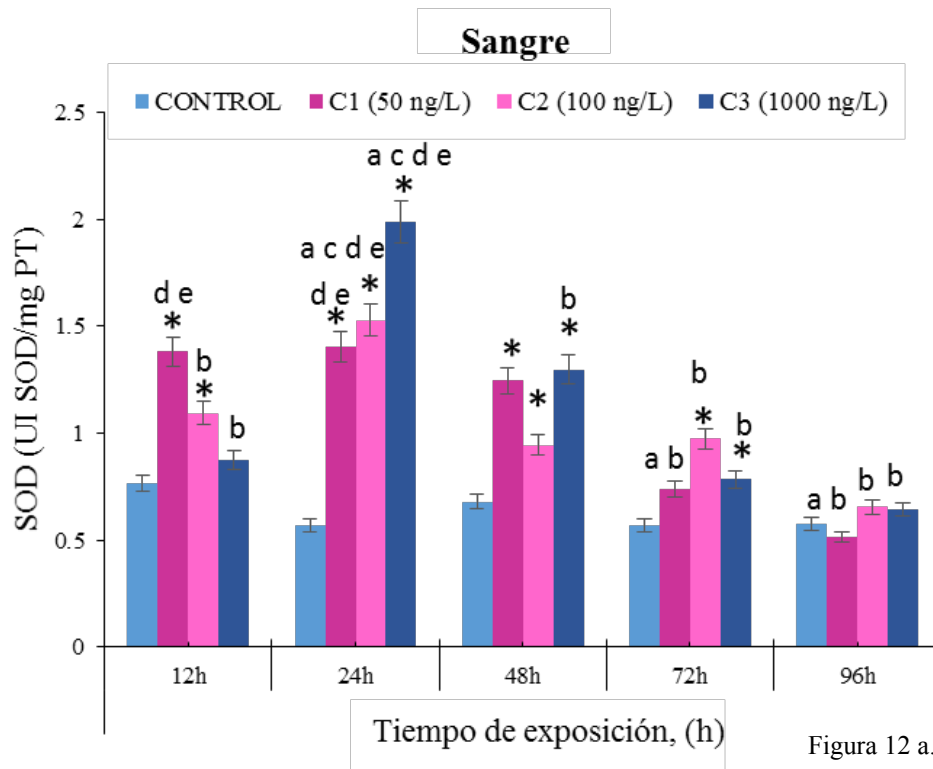


**Figura 11.** Concentración de Proteínas Carboniladas (CPx) en a) sangre, b) hígado, c) branquias, d) cerebro y e) músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a tres concentraciones de GLB (C1: 50 ng/L, C2: 100 ng/L y C3: 1000 ng/L) para 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la media de tres repeticiones ± DE. \*Diferencia significativa con respecto al grupo control, <sup>a</sup> 0h, <sup>b</sup> 24h, <sup>c</sup> 48h, <sup>d</sup> 72h y <sup>e</sup> 96 h. ANOVA y Bonferroni ( $p < 0.05$ ). Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis estrés oxidativo.



### 7.5 Actividad de enzima Superóxido dismutasa (SOD)

Los resultados de SOD se muestran en la Fig. 12. Aumentos significativos con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ) fueron observados en la concentración de 1000 ng L<sup>-1</sup> en la **sangre**, a las 24, 48 y 72 h (250, 90 y 37% respectivamente); para el **hígado**, a las 12, 24, 48 y 72 h (194, 337, 310, 108 y 154% respectivamente) en **branquias** a las 12, 24 y 48 h (36, 55 y 59% respectivamente), en el **cerebro** a las 12, 24 y 48 h (136, 114 y 73% respectivamente) y para el **músculo** en todos los tiempos de exposición (399, 484, 505, 573 y 526% respectivamente). Para la concentración de 100 ng L<sup>-1</sup>, aumentos significativos con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ) fueron observados a los tiempos de 12, 24, 48 y 72 h en la **sangre** (42, 169, 38 y 71% respectivamente), a las 12, 24, 48 y 72 h para el **hígado** (184, 302, 320, 145% respectivamente), a las 12, 24, 48 y 72 h para **branquias** (52, 55, 38 y 44% respectivamente); para el **cerebro** a las 12, 24 y 48 h (68, 80 y 95% respectivamente) y a todos los tiempos para el **músculo** (399, 484, 505, 537 y 526% respectivamente). Para la concentración de 50 ng·L<sup>-1</sup> se observaron aumentos significativos con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ) en **sangre** a las 12, 24 y 48h (79, 147 y 118% respectivamente); en **hígado** a las 12, 24, 28 y 72 h (95, 253, 357 y 232% respectivamente); en **branquias** a las 12 y 24 h; (57 y 31% respectivamente) en **cerebro** a las 24, 48 y 72 h (51, 185 y 241% respectivamente) y finalmente en **músculo** en todos los tiempos (114, 159, 160, 1154 y 837% respectivamente).



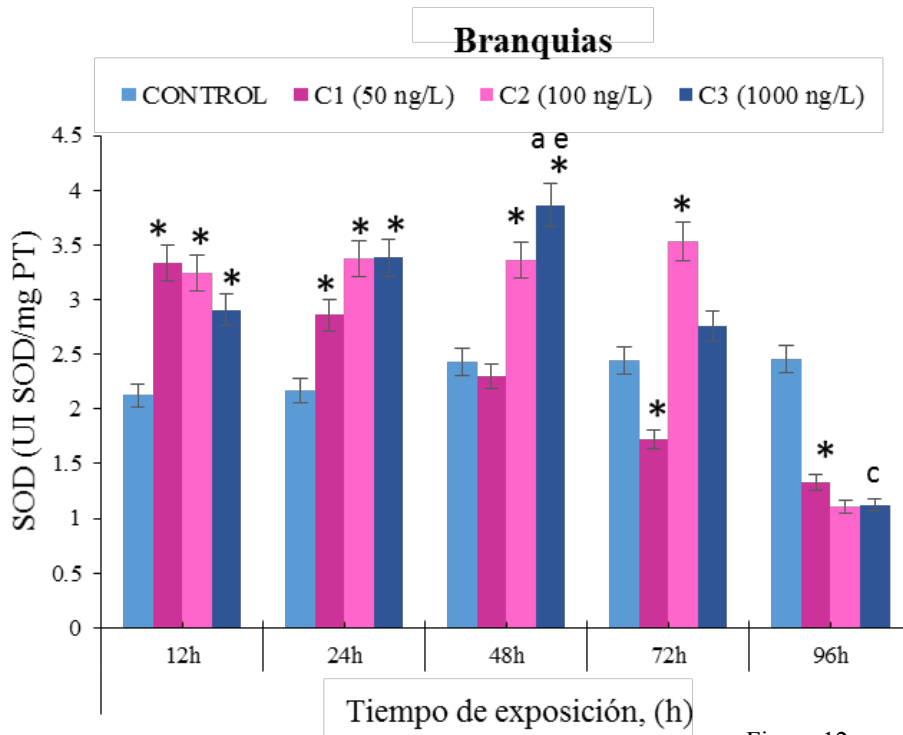


Figura 12 c.

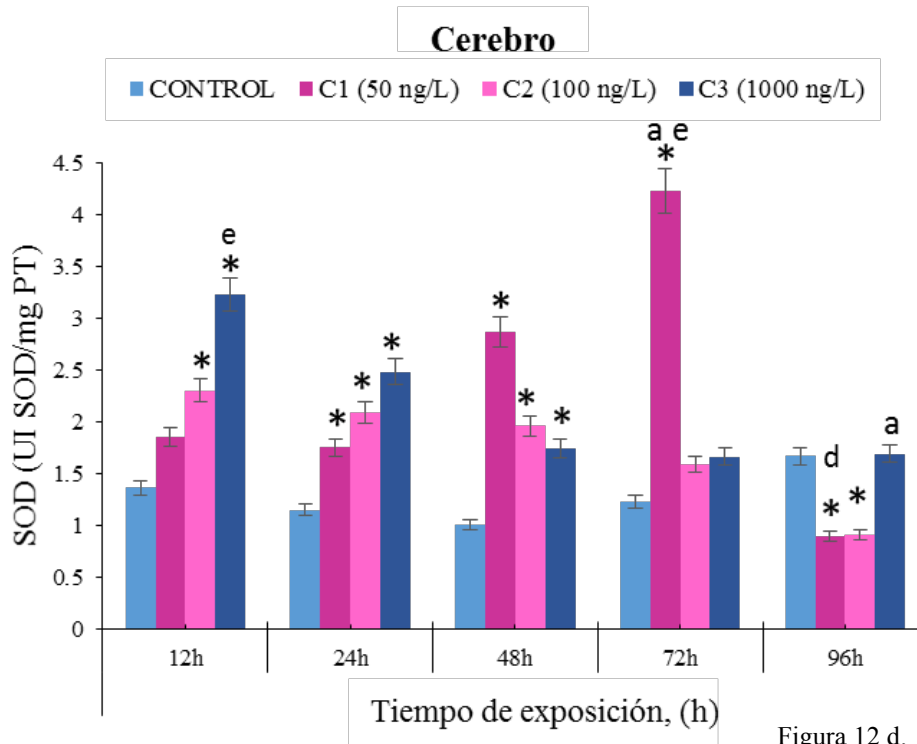


Figura 12 d.

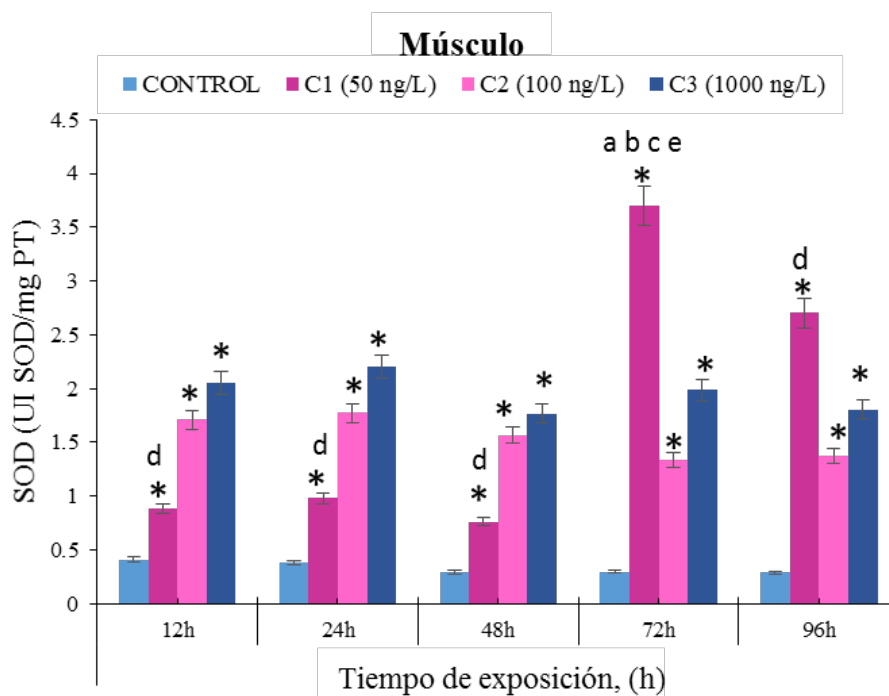


Figura 12 e.

**Figura 12.** Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) en sangre, hígado, branquias, cerebro y músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a tres concentraciones de GLB (C1: 50 ng/L, C2: 100 ng/L y C3: 1000 ng/L) para 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la media de tres repeticiones  $\pm$  DE. \*Diferencia significativa con respecto al grupo control, a 0h, b 24h, c 48h, d 72h y e 96 h. ANOVA y Bonferroni ( $p < 0.05$ ). Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis estrés oxidativo.

## 7.6 Actividad de enzima catalasa (CAT)

Los resultados de la actividad antioxidante de CAT se muestran en la Fig. 13. Aumentos significativos con respecto para el grupo control ( $p < 0.05$ ) se observaron en la concentración de 1000 ng·L<sup>-1</sup>, en la *sangre* en todos los tiempos 12, 24, 48, 72 y 96 h (199, 393, 481, 278 y 11% respectivamente); en *hígado* se presentó un mayor aumento significativo respecto al grupo control ( $p < 0.5$ ) para todos los tiempos (404, 614, 738, 1144 y 446% respectivamente); en *Figura 12 e.* también se observó un aumento de concentración tiempo dependiente desde las 12 las 96 h (81, 92, 228, 343 y 103% respectivamente); para el *cerebro* se observaron aumentos significativos con respecto al grupo control ( $p < 0,05$ ) para todos los tiempos (264, 303, 675, 557 y 569% respectivamente) y para el *músculo* al igual que los demás órganos,

se presentó aumento significativo respecto al control para todos los tiempos (69, 279, 204, 122 y 119%). Para la concentración de 100 ng·L<sup>-1</sup>, fueron observados aumentos significativos con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ) a las 12, 24 y 48 y 72 h en la **sangre** (154, 196, 253 y 49% respectivamente); en el **hígado**; a las 12, 24, 48 y 72 h (181, 259, 345 y 127% respectivamente) en las **branquias**; a las 24, 48 y 72 h (56, 135 y 319%); en el **cerebro** en todos los 5 tiempos (248, 237, 147, 348 y 472 % respectivamente y para los tiempos de 24, 48 y 72h en **músculo** (177, 78, y 84%). Finalmente para la concentración de 50 ng·L<sup>-1</sup>, se presentó un aumento significativo con respecto al grupo control ( $p < 0.5$ ) en **sangre** a las 24, 48 y 72 h (27, 24 y 26% respectivamente), en **hígado** a las 24 y 48 h (83 y 100% respectivamente); en **branquias** durante las 24, 48 y 72 h (49, 74 y 100% respectivamente), en **cerebro** a las 24, 48, 72 y 96 h (116, 83, 197 y 347% respectivamente) y por último en **músculo** se presentó un incremento significativo con respecto al grupo control a las 24 y 48 h (35 y 45% respectivamente).

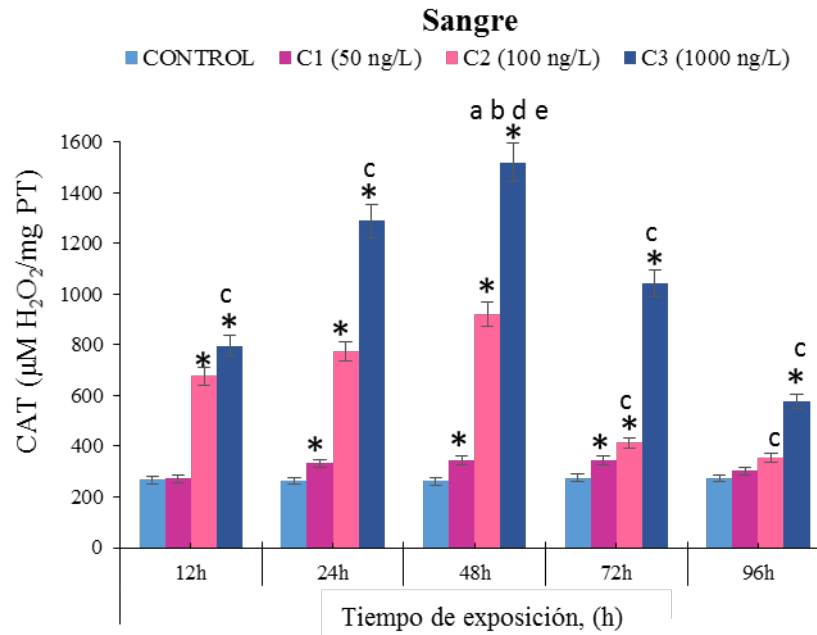


Figura 13 a.

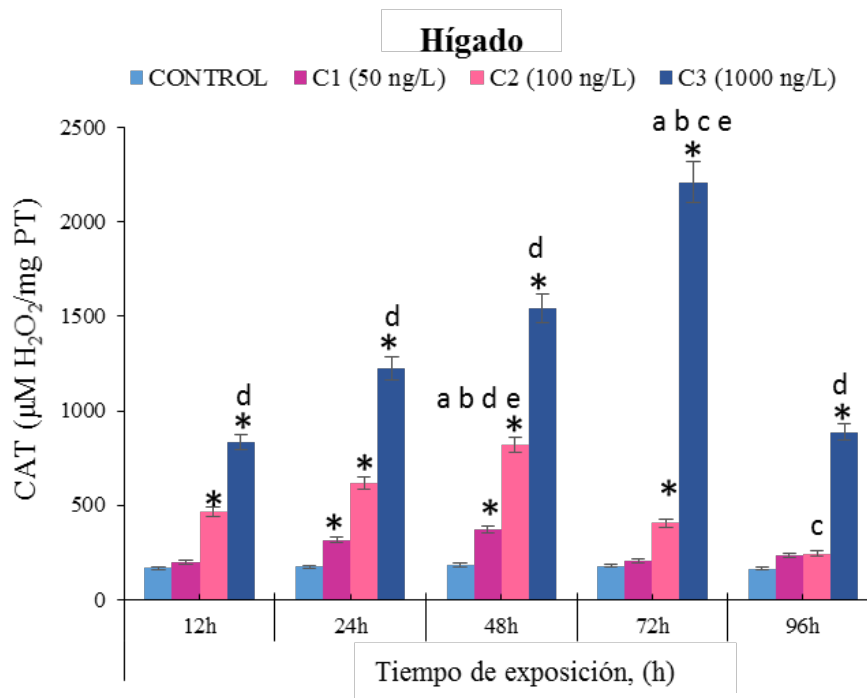


Figura 13 b.

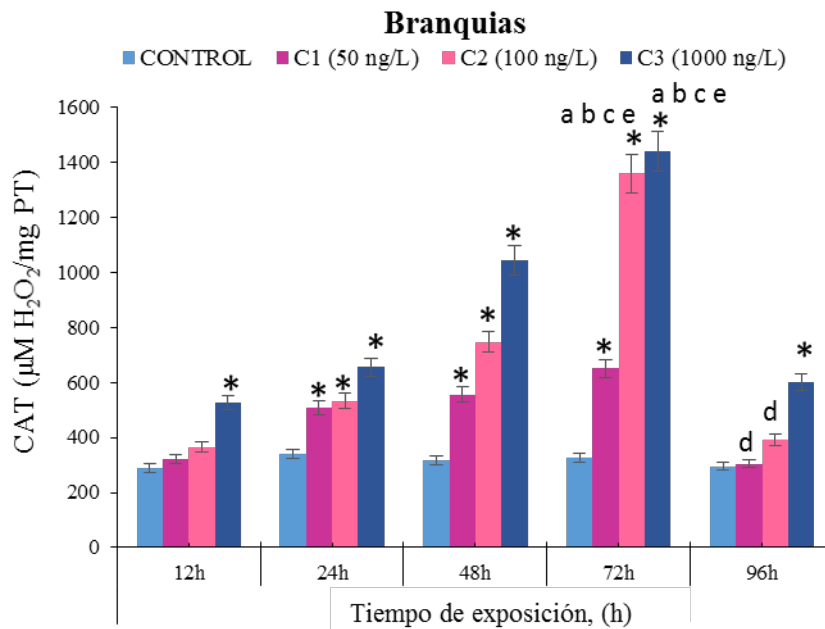


Figura 13 c.

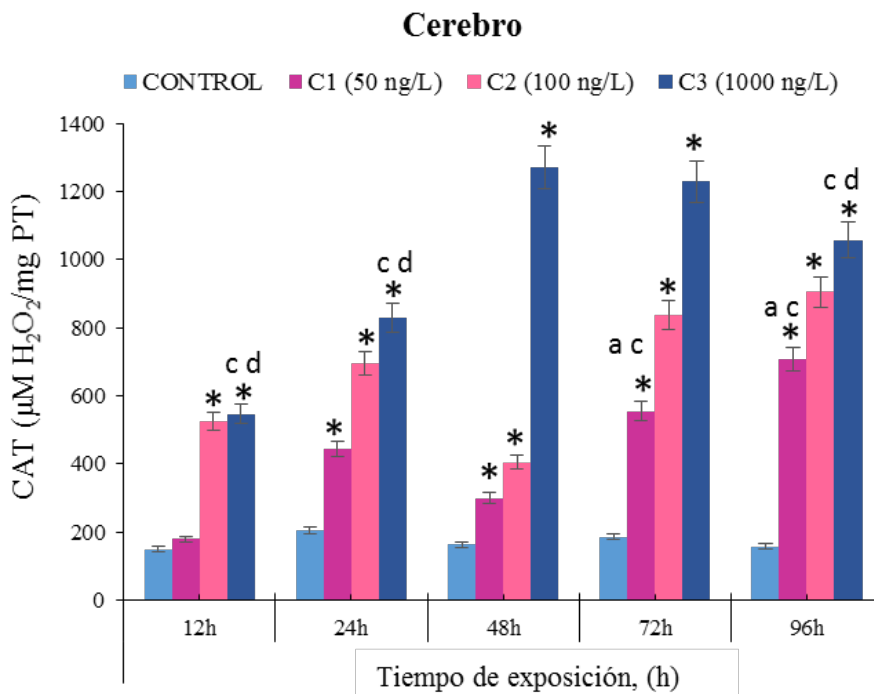


Figura 13 d.

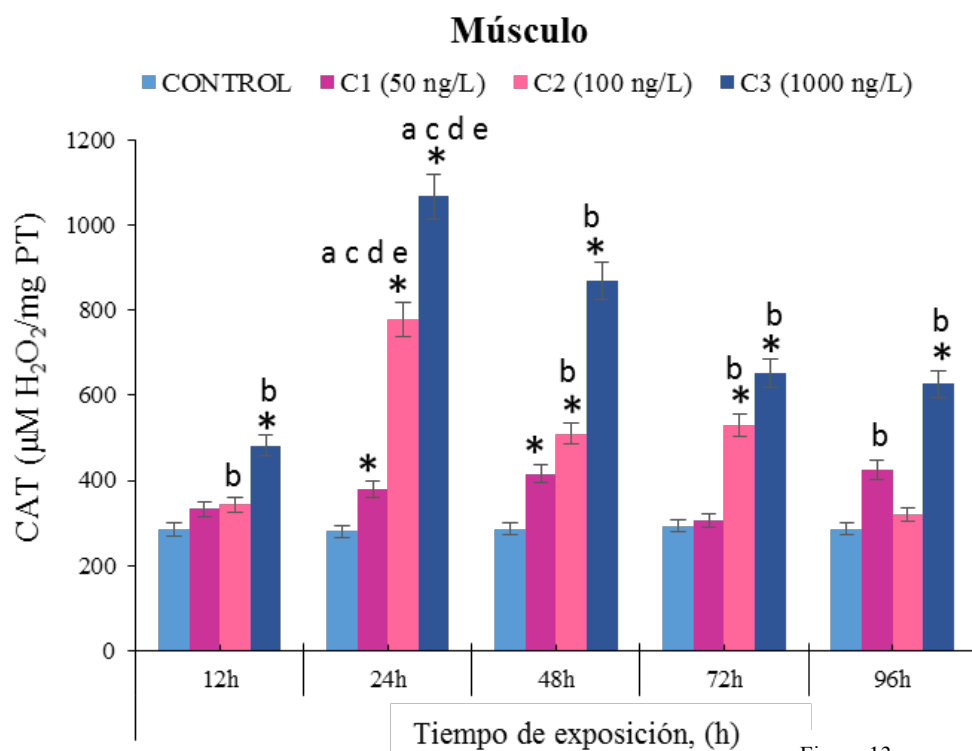


Figura 13 e.

**Figura 13.** Actividad de Catalasa (CAT) en sangre, hígado, branquias, cerebro y músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a tres concentraciones de GLB (C1: 50 ng/L, C2: 100 ng/L y C3: 1000 ng/L) para 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la media de tres repeticiones  $\pm$  DE. \*Diferencia significativa con respecto al grupo control, <sup>a</sup> 0h, <sup>b</sup> 24h, <sup>c</sup> 48h, <sup>d</sup> 72h y <sup>e</sup> 96 h. ANOVA y Bonferroni ( $p < 0.05$ ). Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis estrés oxidativo.

### 7.7 Cuantificación de GLB en agua y tejidos de *Cyprinus carpio*

La tabla 2, contiene los valores de las concentraciones de GLB a los diferentes tiempos de exposición en el agua de exposición y en los diferentes órganos ensayados, como se puede observar a partir de las 12 h de exposición hay una disminución en la concentración de GLB en el agua en los sistemas de prueba, y se observa cómo se va incrementando en los diferentes órganos ensayados, la principal acumulación se presenta en sangre, hígado y músculo y va aumentando con respecto al tiempo. Los órganos donde menos acumulación de GLB hay es el cerebro y las branquias, sin embargo, también la concentración se va incrementando al aumentar los tiempos de exposición.



**Tabla 2.** Concentración de GLB en agua de los sistemas expuestos y las diferentes matrices biológicas ensayadas. Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis estrés oxidativo.

Concentración de Exposición	Tiempo (h)	Agua	Sangre	Hígado	Branquias	Cerebro	Músculo
50 ng/L	12	38 ± 1.2	3.6 ± 0.8	2.8 ± 0.6	1.6 ± 0.4	0.9 ± 0.1	2.6 ± 0.5
	24	35 ± 1.3	3.8 ± 0.7	3.0 ± 0.7	2.1 ± 0.6	1.0 ± 0.2	2.8 ± 0.4
	48	31 ± 1.8	4.0 ± 0.8	3.2 ± 0.6	2.4 ± 0.7	1.4 ± 0.3	3.2 ± 0.6
	72	27 ± 1.1	4.8 ± 0.6	3.5 ± 0.8	2.8 ± 0.6	1.7 ± 0.6	3.5 ± 0.7
	96	20 ± 1.5	5.0 ± 0.7	3.8 ± 0.6	3.2 ± 0.5	2.1 ± 0.7	3.8 ± 0.6
100 ng/L	12	75 ± 1.8	5.2 ± 1.1	4.1 ± 1.1	3.8 ± 0.8	2.6 ± 0.7	4.2 ± 0.8
	24	70 ± 2.1	5.7 ± 1.3	4.4 ± 0.9	4.1 ± 0.9	3.2 ± 0.6	4.6 ± 0.7
	48	66 ± 1.3	6.2 ± 0.9	4.9 ± 0.8	4.5 ± 0.8	3.8 ± 0.9	4.8 ± 0.8
	72	52 ± 1.6	6.8 ± 1.2	5.3 ± 1.2	5.1 ± 0.9	4.1 ± 1.1	5.2 ± 0.9
	96	49 ± 2.1	7.1 ± 0.9	6.1 ± 1.0	5.8 ± 1.0	4.6 ± 0.9	6.1 ± 1.1
1000 ng/L	12	770 ± 3.8	45 ± 1.1	32 ± 2.1	26 ± 1.2	19 ± 1.1	29 ± 0.9
	24	623 ± 2.8	53 ± 2.3	37 ± 1.3	32 ± 1.0	23 ± 1.6	33 ± 1.1
	48	556 ± 3.1	59 ± 1.8	41 ± 1.6	38 ± 1.3	29 ± 2.1	38 ± 1.4
	72	447 ± 1.8	64 ± 1.7	47 ± 1.9	44 ± 1.6	31 ± 1.7	41 ± 1.0
	96	382 ± 2.1	69 ± 1.7	51 ± 1.5	47 ± 2.1	39 ± 1.8	47 ± 0.9

### **7.8 Correlación de Pearson**

En la Tabla 3 se muestran las correlaciones encontradas entre los biomarcadores de estrés oxidativo, tiempos de exposición y concentración de glibenclamida en los diferentes órganos. Los valores en negrita indican un mayor grado de correlación entre las variables analizadas. Todos los biomarcadores utilizados muestran una correlación con las distintas concentraciones de exposición. Lo que sugiere que existe estrés oxidativo en los órganos estudiados.

**Tabla 3 a.** Correlación de Pearson entre las concentraciones de GLB y los biomarcadores de daño oxidativo de estrés oxidativo evaluados. Los coeficientes de correlación  $> 0.5$  son significativos (se muestran en negrita). Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis estrés oxidativo.

DAÑO OXIDATIVO											
Biomarcadores	Organos	Tiempo (h)	Concentraciones			Biomarcadores	Organos	Tiempo (h)	Concentraciones		
			50 ng L <sup>-1</sup>	100 ng L <sup>-1</sup>	1000 ng L <sup>-1</sup>				50 ng L <sup>-1</sup>	100 ng L <sup>-1</sup>	1000 ng L <sup>-1</sup>
CHPx	SANGRE	12	<b>0.801</b>	-0.295	<b>0.999</b>	LPX	SANGRE	12	<b>-0.564</b>	0.462	<b>0.644</b>
		24	0.347	-0.364	0.333			24	<b>-0.992</b>	<b>0.992</b>	<b>0.928</b>
		48	<b>-0.985</b>	<b>-0.740</b>	<b>0.788</b>			48	-0.289	<b>-0.891</b>	-0.123
		72	0.109	<b>-0.683</b>	<b>-0.687</b>			72	<b>-0.739</b>	<b>0.794</b>	<b>-0.821</b>
		96	<b>0.645</b>	0.235	<b>-0.980</b>			96	0.099	0.090	0.127
	HIGADO	12	<b>-0.774</b>	<b>-0.990</b>	<b>0.998</b>		HIGADO	12	0.165	<b>-0.854</b>	<b>-0.554</b>
		24	<b>0.793</b>	0.226	<b>0.914</b>			24	<b>0.987</b>	0.333	-0.059
		48	-0.148	<b>-0.860</b>	<b>0.887</b>			48	<b>0.961</b>	-0.421	<b>-0.925</b>
		72	0.012	<b>0.510</b>	<b>0.573</b>			72	-0.218	-0.319	<b>-0.725</b>
		96	<b>-0.905</b>	<b>-0.650</b>	<b>0.981</b>			96	<b>0.592</b>	<b>0.618</b>	<b>-0.823</b>
	BRANQUIAS	12	0.194	-0.371	<b>-0.678</b>		BRANQUIAS	12	-0.192	-0.232	<b>0.956</b>
		24	<b>0.837</b>	<b>-0.770</b>	<b>0.994</b>			24	-0.268	<b>0.832</b>	<b>0.970</b>
		48	0.003	<b>-0.763</b>	-0.420			48	<b>0.844</b>	-0.279	<b>-0.815</b>
		72	<b>0.908</b>	<b>-0.723</b>	<b>0.994</b>			72	-0.467	<b>0.883</b>	<b>-0.867</b>
		96	<b>-0.999</b>	0.022	<b>-0.887</b>			96	<b>0.534</b>	<b>-0.558</b>	<b>-0.998</b>
	CEREBRO	12	<b>0.998</b>	<b>0.847</b>	<b>0.989</b>		CEREBRO	12	<b>-0.996</b>	0.043	<b>-0.559</b>
		24	0.095	<b>-0.742</b>	0.472			24	<b>0.924</b>	-0.364	-0.466
		48	-0.130	0.189	<b>0.578</b>			48	<b>-0.837</b>	<b>-0.613</b>	<b>-0.551</b>
		72	<b>-0.997</b>	<b>0.718</b>	-0.157			72	<b>0.562</b>	<b>0.769</b>	-0.347
		96	0.235	<b>0.616</b>	0.287			96	<b>-0.746</b>	<b>0.968</b>	<b>-0.999</b>
	MUSCULO	12	<b>0.965</b>	0.135	<b>-0.998</b>		MUSCULO	12	0.435	-0.429	0.200
		24	<b>0.765</b>	0.092	-0.267			24	<b>0.981</b>	0.391	<b>-0.984</b>
		48	<b>-0.822</b>	<b>0.778</b>	-0.165			48	-0.338	<b>0.512</b>	<b>-0.996</b>
		72	0.459	-0.464	<b>0.981</b>			72	<b>0.829</b>	<b>-0.928</b>	<b>0.931</b>
96		<b>-0.717</b>	<b>0.690</b>	0.314	96	<b>-0.980</b>		<b>-0.640</b>	<b>0.661</b>		
CPx	SANGRE	12	-0.333	<b>-0.996</b>	-0.459		SANGRE	12	-0.333	<b>-0.996</b>	-0.459
		24	<b>-0.951</b>	<b>0.583</b>	0.214			24	<b>-0.951</b>	<b>0.583</b>	0.214
		48	<b>0.811</b>	<b>0.991</b>	<b>0.896</b>			48	<b>0.811</b>	<b>0.991</b>	<b>0.896</b>
		72	0.123	<b>0.928</b>	-0.248			72	0.123	<b>0.928</b>	-0.248
		96	<b>0.973</b>	-0.122	0.093			96	<b>0.973</b>	-0.122	0.093
	HIGADO	12	<b>-0.693</b>	-0.354	<b>0.998</b>		HIGADO	12	<b>-0.693</b>	-0.354	<b>0.998</b>
		24	-0.430	0.186	<b>-0.987</b>			24	-0.430	0.186	<b>-0.987</b>
		48	<b>0.735</b>	<b>0.857</b>	-0.360			48	<b>0.735</b>	<b>0.857</b>	-0.360
		72	<b>0.800</b>	-0.137	<b>0.879</b>			72	<b>0.800</b>	-0.137	<b>0.879</b>
		96	<b>-0.813</b>	<b>-0.903</b>	<b>-0.979</b>			96	<b>-0.813</b>	<b>-0.903</b>	<b>-0.979</b>
	BRANQUIAS	12	0.357	0.108	<b>0.675</b>		BRANQUIAS	12	0.357	0.108	<b>0.675</b>
		24	<b>-0.662</b>	<b>-0.999</b>	<b>0.778</b>			24	<b>-0.662</b>	<b>-0.999</b>	<b>0.778</b>
		48	<b>0.769</b>	0.273	<b>-0.936</b>			48	<b>0.769</b>	0.273	<b>-0.936</b>
		72	-0.004	<b>-0.660</b>	-0.200			72	-0.004	<b>-0.660</b>	-0.200
		96	<b>-0.580</b>	<b>-0.994</b>	<b>0.925</b>			96	<b>-0.580</b>	<b>-0.994</b>	<b>0.925</b>
	CEREBRO	12	<b>0.781</b>	0.215	<b>0.913</b>		CEREBRO	12	<b>0.781</b>	0.215	<b>0.913</b>
		24	<b>-0.961</b>	<b>-0.982</b>	<b>-0.585</b>			24	<b>-0.961</b>	<b>-0.982</b>	<b>-0.585</b>
		48	<b>0.778</b>	<b>-0.746</b>	<b>-0.813</b>			48	<b>0.778</b>	<b>-0.746</b>	<b>-0.813</b>
		72	<b>0.917</b>	<b>-0.732</b>	<b>-0.959</b>			72	<b>0.917</b>	<b>-0.732</b>	<b>-0.959</b>
		96	0.184	0.160	-0.083			96	0.184	0.160	-0.083
MUSCULO	12	<b>-0.883</b>	<b>-0.637</b>	<b>0.993</b>	MUSCULO	12	<b>-0.883</b>	<b>-0.637</b>	<b>0.993</b>		
	24	<b>0.733</b>	<b>0.951</b>	<b>0.828</b>		24	<b>0.733</b>	<b>0.951</b>	<b>0.828</b>		
	48	<b>0.945</b>	<b>0.658</b>	<b>0.619</b>		48	<b>0.945</b>	<b>0.658</b>	<b>0.619</b>		
	72	0.217	<b>0.644</b>	<b>0.986</b>		72	0.217	<b>0.644</b>	<b>0.986</b>		
	96	-0.320	<b>-0.786</b>	<b>-0.959</b>		96	-0.320	<b>-0.786</b>	<b>-0.959</b>		

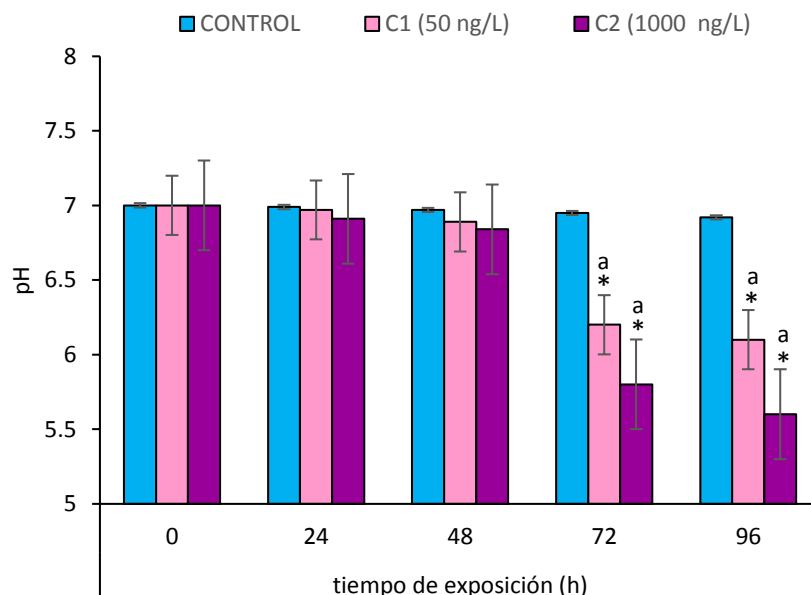
**Tabla 3 b.** Correlación de Pearson entre las concentraciones de GLB y los biomarcadores de actividad antioxidante de estrés oxidativo evaluados. Los coeficientes de correlación > 0.5 son significativos (se muestran en negrita).

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE											
Biomarcadores	Organos	Time (h)	Concentración			Biomarcadores	Organos	Time (h)	Concentración		
			50 ng L <sup>-1</sup>	100 ng L <sup>-1</sup>	1000 ng L <sup>-1</sup>				50 ng L <sup>-1</sup>	100 ng L <sup>-1</sup>	1000 ng L <sup>-1</sup>
SOD	SANGRE	12	<b>-0.641</b>	<b>-0.787</b>	<b>-0.813</b>	CAT	SANGRE	12	-0.402	0.348	<b>0.772</b>
		24	0.215	<b>-0.999</b>	<b>0.989</b>			24	-0.102	<b>-0.544</b>	-0.263
		48	<b>0.992</b>	<b>0.980</b>	<b>-0.713</b>			48	-0.223	<b>0.993</b>	<b>0.992</b>
		72	<b>0.647</b>	<b>-0.514</b>	<b>0.518</b>			72	<b>0.528</b>	<b>0.821</b>	<b>-0.974</b>
		96	-0.496	<b>-0.980</b>	<b>-0.671</b>			96	0.348	0.433	0.032
	HIGADO	12	<b>-0.811</b>	<b>-0.609</b>	<b>0.990</b>		HIGADO	12	<b>-0.990</b>	<b>0.784</b>	<b>-0.771</b>
		24	<b>0.736</b>	<b>-0.999</b>	<b>-0.936</b>			24	<b>0.908</b>	<b>-0.770</b>	<b>-0.997</b>
		48	<b>0.756</b>	<b>-0.947</b>	<b>-0.850</b>			48	<b>-0.991</b>	<b>-0.940</b>	<b>0.566</b>
		72	<b>-0.724</b>	<b>0.854</b>	<b>0.963</b>			72	0.125	0.044	0.295
		96	<b>0.987</b>	<b>-0.962</b>	<b>-0.983</b>			96	<b>0.982</b>	<b>-1.000</b>	-0.089
	BRANQUIAS	12	<b>-0.987</b>	<b>0.631</b>	<b>-0.981</b>		BRANQUIAS	12	<b>0.529</b>	<b>0.834</b>	<b>-0.505</b>
		24	0.242	<b>0.947</b>	<b>0.693</b>			24	<b>0.526</b>	0.173	<b>-0.906</b>
		48	0.302	<b>-0.765</b>	<b>0.949</b>			48	<b>0.706</b>	<b>-0.998</b>	<b>0.801</b>
		72	<b>0.592</b>	<b>0.998</b>	0.128			72	0.496	-0.089	<b>0.999</b>
		96	<b>0.901</b>	<b>-1.000</b>	<b>0.794</b>			96	<b>0.690</b>	-0.353	<b>0.980</b>
	CEREBRO	12	<b>-0.971</b>	<b>0.974</b>	<b>0.983</b>		CEREBRO	12	<b>0.976</b>	<b>0.766</b>	<b>0.968</b>
		24	<b>0.966</b>	<b>-0.840</b>	<b>0.816</b>			24	<b>0.725</b>	<b>-0.987</b>	<b>0.731</b>
		48	<b>-0.827</b>	<b>-0.904</b>	<b>0.622</b>			48	<b>0.700</b>	<b>-0.773</b>	<b>0.915</b>
		72	0.109	0.447	<b>-0.825</b>			72	0.496	<b>-0.890</b>	-0.397
		96	-0.101	<b>-0.860</b>	<b>-0.928</b>			96	<b>-0.881</b>	0.011	-0.259
MUSCULO	12	<b>1.000</b>	0.252	-0.404	MUSCULO	12	<b>0.888</b>	-0.435	<b>-0.646</b>		
	24	<b>-0.975</b>	<b>-0.783</b>	<b>-0.897</b>		24	<b>-0.933</b>	<b>-0.812</b>	<b>0.744</b>		
	48	-0.438	0.241	<b>-1.000</b>		48	<b>-0.958</b>	<b>0.613</b>	<b>-1.000</b>		
	72	<b>-0.767</b>	0.241	<b>0.710</b>		72	<b>-0.526</b>	<b>-0.780</b>	<b>-0.534</b>		
	96	<b>-0.907</b>	-0.186	-0.003		96	<b>-0.966</b>	0.246	0.497		

## 7.9 Resultados Físicoquímicos en músculo

### 7.9.1 Análisis de pH

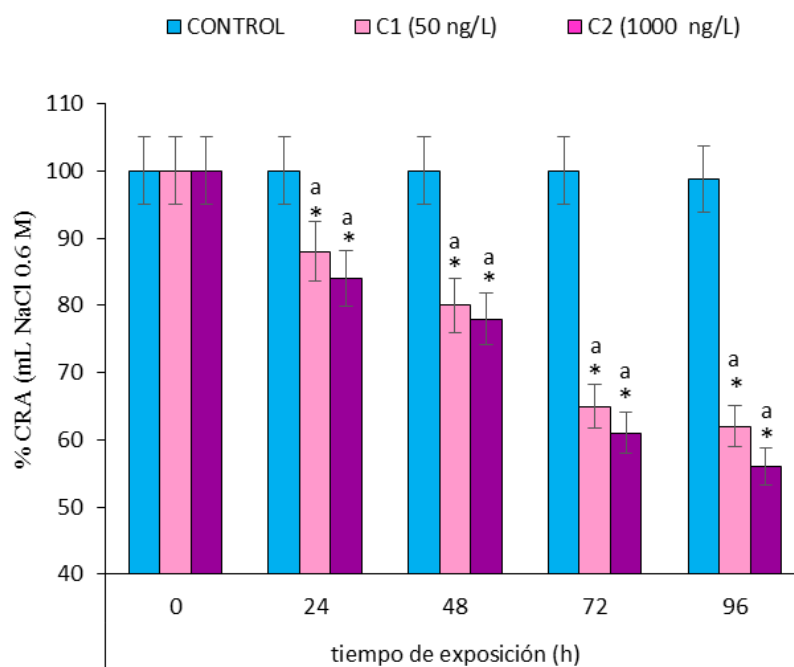
Los resultados muestran que para la concentración de 1000 ng·L<sup>-1</sup>, se presentaron disminuciones significativas con respecto al grupo control (p<0.05) para los tiempos de 72 y 96 h, de 17 y 19 % respectivamente; y para la concentración de 50 ng·L<sup>-1</sup>, se presentaron disminuciones significativas con respecto al grupo control (p<0.05) para los tiempos de 72 y 96 h de 11 y 12% respectivamente. (Fig., 14).



**Figura 14. Valores de pH en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos diferentes concentraciones de GLB (C1: 50 ng/L y C2:1000 ng/L) para 0, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son el promedio de tres replicas  $\pm$  SE. \*diferencia significativa respecto al grupo control; a 0h, b 24h, c 48h, d 72h y e 96h. ANOVA y Tukey ( $p < 0.05$ ). Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis Físicoquímicos.**

### 7.9.2 Análisis de CRA

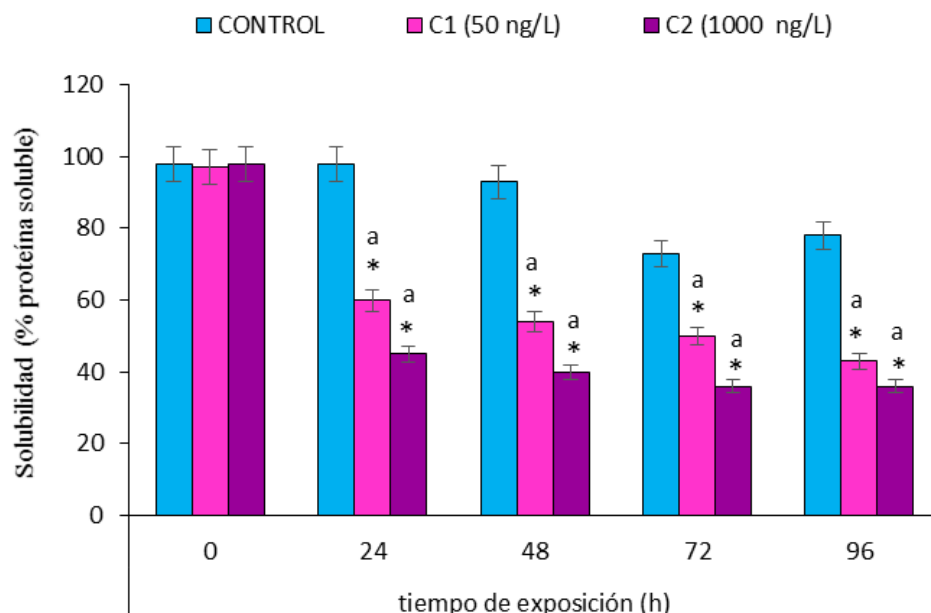
Los resultados muestran disminuciones significativas ( $p < 0.05$ ), respecto al grupo control para la mayor concentración de  $1000 \text{ ng.L}^{-1}$  a las 48, 72 y 96 h, de 22, 40 y 43 % respectivamente, y para la concentración de  $50 \text{ ng.L}^{-1}$ , se presentaron disminuciones significativas con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ) para los tiempos de 48, 72 y 96 h de 20, 35 y 37% respectivamente (Fig. 15).



**Figura 15.** Valores de CRA en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos diferentes concentraciones de GLB (C1: 50 ng/L y C2:1000 ng/L) para 0, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son el promedio de tres replicas  $\pm$  SE. \*diferencia significativa respecto al grupo control; <sup>a</sup> 0h, <sup>b</sup> 24h, <sup>c</sup> 48h, <sup>d</sup> 72h y <sup>e</sup> 96h. ANOVA y Tukey ( $p < 0.05$ ). Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis Físicoquímicos.

### 7.9.3 Análisis de Solubilidad

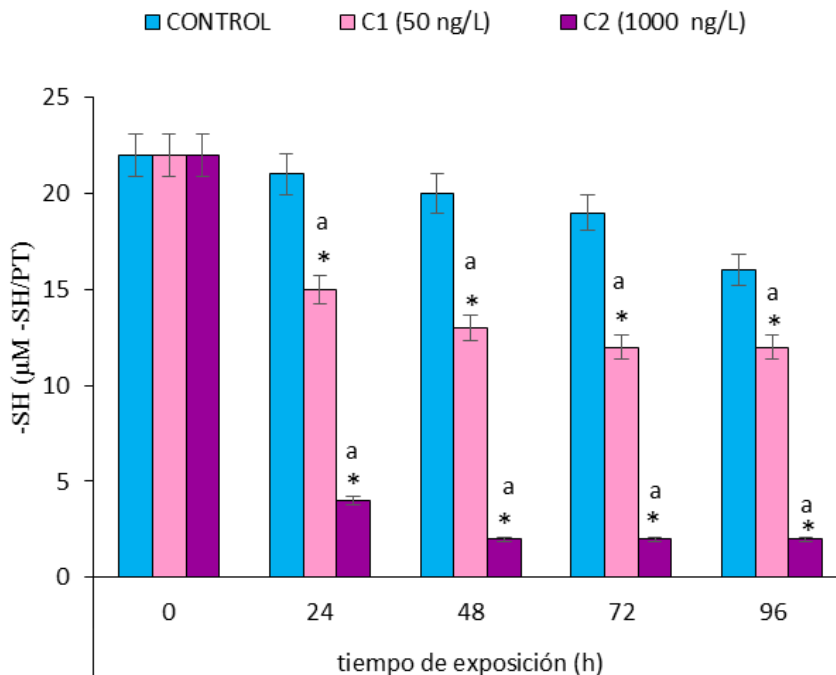
Los resultados se muestran en la Fig. 16, en donde se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control para ambas concentraciones, en 50 ng.L<sup>-1</sup> de 38, 41, 31 y 44 % respectivamente y para 1000 ng.L<sup>-1</sup> de 54, 56, 50 y 53% respectivamente, para los cuatro tiempos.



**Figura 16.** Comportamiento de solubilidad en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos diferentes concentraciones de GLB (C1: 50 ng/L y C2:1000 ng/L) para 0, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son el promedio de tres replicas  $\pm$  SE. \*diferencia significativa respecto al grupo control; a 0h, b 24h, c 48h, d 72h y e 96h. ANOVA y Tukey ( $p < 0.05$ ). Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis Físicoquímicos.

#### 7.9.4 Análisis de sulfhidrilos (-SH)

Se observa en la Fig. 17, para ambas concentraciones una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) respecto al grupo control para las 24, 48, 72 y 96 h de exposición, en 50 ng·L<sup>-1</sup> de 28, 35, 36 y 25% respectivamente y para 1000 ng·L<sup>-1</sup> de 80, 90, 89 y 87% respectivamente.

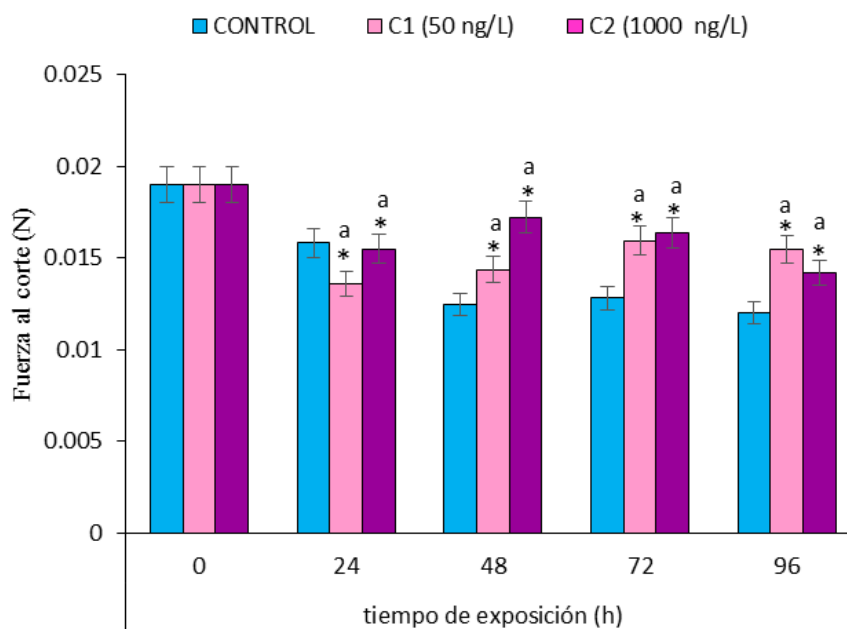


**Figura 17. Contenido de grupos sulfhidrilos (-SH) en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos diferentes concentraciones de GLB (C1: 50 ng/L y C2:1000 ng/L) para 0, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son el promedio de tres replicas  $\pm$  SE. \*diferencia significativa respecto al grupo control; a 0h, b 24h, c 48h, d 72h y e 96h. ANOVA y Tukey ( $p < 0.05$ ). Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis Físicoquímicos.**

### 7.9.5 Análisis de esfuerzo al corte (W-B)

Los resultados se muestran en la Fig. 18, en la concentración de 50 ng.L<sup>-1</sup>, se observó un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) a las 72 y 96 h, de 24 y 28% respectivamente y para 1000 ng.L<sup>-1</sup>, un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de 38, 27 y 18% para las 48, 72 y 96 h respectivamente.





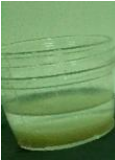

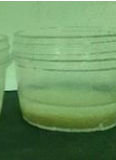



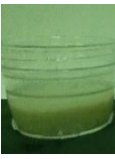







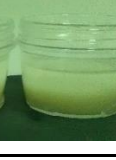



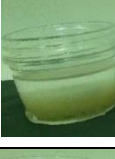

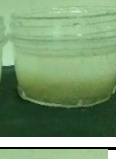
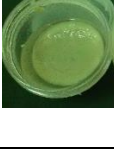

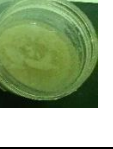


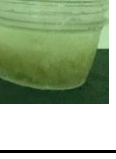



**Figura 18.** Valores de esfuerzo al corte (N), con navaja de Warner Bratzlet (W-B) en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos diferentes concentraciones de GLB (C1: 50 ng/L y C2:1000 ng/L) para 0, 24, 48, 72 y 96h. Los valores son el promedio de tres replicas  $\pm$  SE. \*diferencia significativa respecto al grupo control; <sup>a</sup> 0h, <sup>b</sup>24h, <sup>c</sup> 48h, <sup>d</sup> 72h y <sup>e</sup> 96h. ANOVA y Tukey ( $p < 0.05$ ). Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis Fisicoquímicos.

### 7.9.6 Análisis de perfil de textura (TPA)

Los resultados se observan en la tabla 4, los cuales muestran a partir de las 24 h una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en todos los atributos respecto al control. La capacidad de gelificación se vio afectada por el tiempo de exposición para ambas concentraciones (Figura 19).

**Tabla 4.** Resultados del análisis de perfil de textura en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos concentraciones de GLB (50 ng/L y 100 ng/L) para 0, 24, 48, 72 y 96 h. \* Diferencia significativa con respecto al grupo control; a: diferencia significativa con respecto a las 0 h. Fuente: Archivo de resultados de la fase experimental de análisis Fisicoquímicos.

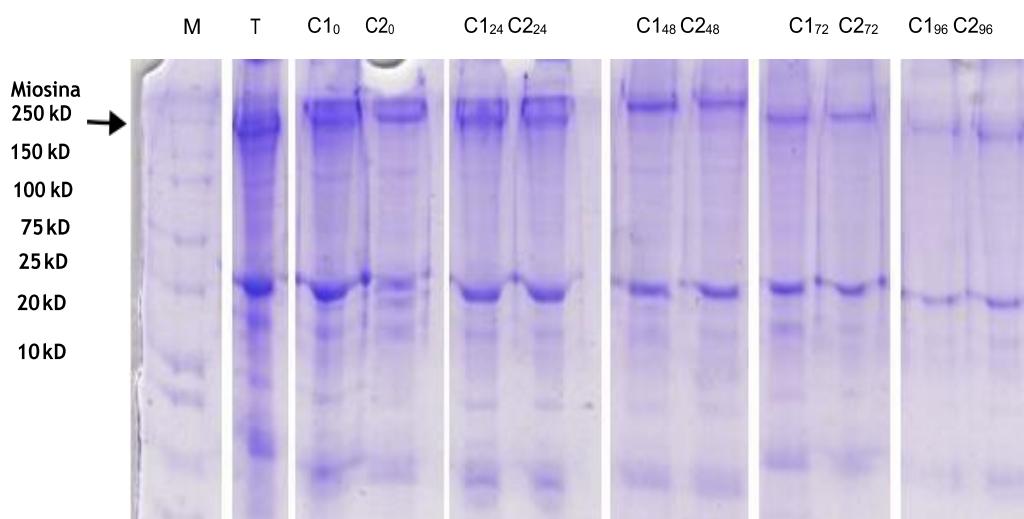
		Tiempo de exposición				
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Dureza	Control	1.087 ± 0.021	1.022 ± 0.005	0.980 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.946 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.929 ± 0.003 <sup>a</sup>
	50 ng/L	0.955 ± 0.007	0.092 ± 0.006 <sup>*a</sup>	0.040 ± 0.003 <sup>*a</sup>	0.029 ± 0.002 <sup>*a</sup>	0.010 ± 0.000 <sup>*a</sup>
	100 ng/L	0.922 ± 0.005	0.066 ± 0.001 <sup>*a</sup>	0.024 ± 0.002 <sup>*a</sup>	0.011 ± 0.001 <sup>*a</sup>	0.005 ± 0.001 <sup>*a</sup>
Cohesividad	Control	0.015 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.012 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.012 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.010 ± 0.000 <sup>a</sup>
	50 ng/L	0.014 ± 0.001	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>
	100 ng/L	0.014 ± 0.000	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>
Elasticidad	Control	0.367 ± 0.015	0.347 ± 0.015	0.333 ± 0.015 <sup>a</sup>	0.277 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.253 ± 0.001 <sup>a</sup>
	50 ng/L	0.363 ± 0.006	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>
	100 ng/L	0.330 ± 0.010	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>
Masticabilidad	Control	0.006 ± 0.000	0.005 ± 0.000	0.004 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.003 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.002 ± 0.000 <sup>a</sup>
	50 ng/L	0.005 ± 0.000	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>
	100 ng/L	0.005 ± 0.000	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>
Gomosidad	Control	0.016 ± 0.000	0.013 ± 0.000	0.012 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.011 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.009 ± 0.000 <sup>a</sup>
	50 ng/L	0.013 ± 0.000	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>
	100 ng/L	0.012 ± 0.000	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>

Tiempo de exposición	T	C1	C2	T	C1	C2
0 h						
24 h						
48 h						
72 h						
96 h						

**Figura 19.** Formación de gel para análisis de TPA en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos concentraciones de GLB (T: Testigo, C1: 50 ng/L y C2: 100 ng/L) para 0, 24, 48, 72 y 96 h. Fuente: Archivo de fotografías de resultados de la fase experimental de análisis Físicoquímicos y texturales.

## 7.10 Electroforesis

En la figura 20, se muestran los perfiles proteicos de los diferentes geles obtenidos de cada músculo expuesto a las dos concentraciones y a los diferentes tiempos, observándose una clara degradación de la miosina, principal proteína responsable de la formación de redes proteicas, al transcurrir el tiempo de exposición para ambas concentraciones, asimismo, hay aparición de nuevas bandas de bajo peso molecular.



**Figura 20.** Electroforesis de músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a dos concentraciones (C1:50 ng/L y C2: 1000 ng/L) para los tiempos de 0, 24, 48, 72 y 96 h. M: Marcador, T: Testigo. Fuente: Archivo de fotografías resultados de la fase experimental de electroforesis.

## 8. DISCUSIÓN

El presente trabajo es relevante y novedoso, debido a que la GLB es un fármaco hipoglucemiante que es ampliamente empleado en todo el mundo, este medicamento es liberado al ambiente por descargas municipales, hospitalarias e industriales, aunque existen estudios de ocurrencia de este fármaco referidos en la literatura internacional, son pocos los estudios de toxicidad y los existentes sólo son en algunas especies de peces y en el crustáceo *Daphnia magna* y están orientados a determinar la toxicidad aguda de este compuesto a través de la determinación de la  $CL_{50}$ , por lo que es necesario caracterizar los efectos tóxicos de la GLB en otras especies de peces de interés comercial como lo es *Cyprinus carpio* y utilizar biomarcadores que nos den información acerca de cómo este compuesto puede dañar a las biomoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Los resultados obtenidos en la presente investigación determinan que la GLB es tóxica. Aunque los datos de  $CL_{50}$  son elevados con respecto a otros contaminantes emergentes, en este estudio demostramos que concentraciones en el orden de  $ng\ L^{-1}$  son capaces de inducir la oxidación de lípidos y proteínas y de inducir el fenómeno de estrés oxidativo.

El resultado de  $CL_{50}$  obtenido en este estudio mostró un valor mayor a  $500\ mg\cdot L^{-1}$  ( $505.96$  a  $512.16\ mg\cdot L^{-1}$ ). La guía OCDE número 27 sobre pruebas y evaluación (Documento de orientación sobre el uso del sistema armonizado para la clasificación de productos químicos peligrosos para el medio ambiente acuático) considera a las sustancias con una  $CL_{50}$  mayor a  $100\ mg\cdot L^{-1}$  en el nivel IV, lo que implica que la GLB sería no tóxica para *Cyprinus carpio*. Al comparar la  $CL_{50}$  de glibenclamida en *C. carpio* con otras especies, se puede observar que la carpa común es una especie más resistente. En la hoja de seguridad de la GLB emitida por la Comunidad Europea en su reglamento CE número 1907/2006 con fecha de emisión del

27/06/2013 se menciona que la  $CL_{50}$  para el crustáceo *Daphnia magna* y en peces fue  $>100 \text{ mg L}^{-1}$ . También Cunningham et al. (2006) reportaron que existe una baja ecotoxicidad inducida por GLB, ellos demostraron valores de  $EC_{50} > 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en diferentes especies como daphnidos, algas y peces. La mortalidad de los peces observada en este estudio podría ser explicada debido a que el exceso de GLB en los peces genera un estado de hipoglicemia, por lo que el balance homeostático de los iones se ve alterado. Este proceso, induce a una despolarización de la membrana y la liberación masiva de neurotransmisores en cerebro de la carpa incluyendo el glutamato (Siesjo, 1988; Erecinska & Silver, 1989). La acumulación de glutamato conduce a un incremento en la concentración de calcio mitocondrial y de ROS (Choi, 1987; Coyle & Puttfarcken 1993), lo que genera estrés oxidativo. Este fenómeno contribuye a presencia de isquemia cerebral e hipoxia, las cuales inhiben la cadena de transporte de electrones con una pérdida del potencial de la membrana mitocondrial y una posterior inhibición en la síntesis de ATP (Siesjo et al., 1995). Esta serie de sucesos pueden haber contribuido en la muerte del pez.

Los resultados de los biomarcadores de oxidación celular mostraron en el CHPx y MDA (Figs. 1 y 2) incrementos con respecto a los grupos control en todos los órganos evaluados y en las tres concentraciones ensayadas, en la mayoría de forma significativa. En el CHPx se observó que en el caso de sangre, branquias y músculo el incremento del biomarcador fue concentración dependiente, y en el MDA se observó una tendencia al incremento significativo del biomarcador a la concentración de  $1000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . Para ambos biomarcadores (CHPx y MDA) su mayor incremento se observó en cerebro. Como se sabe existen varios factores que pueden favorecer a que el sistema nervioso central sea altamente susceptible al estrés oxidativo: 1) el tejido cerebral experimenta una alta fosforilación oxidativa y emplea una

cantidad elevada de oxígeno, 2) es rico en ácidos grasos poliinsaturados que pueden ser sustrato de la peroxidación lipídica, y 3) algunas regiones del cerebro contienen una alta concentración del hierro (Fe) libre que facilita la formación de radicales libres (Olanow, 1993). Los resultados de nuestro estudio son similares a los hallazgos encontrados por Tüzün et al., 1999, quienes demostraron un incremento significativo en los niveles de MDA en cerebro, hígado y riñón de ratas albinas machos neonatales. Los incrementos en el contenido de CHPx y MDA podrían ser explicados por el mecanismo de acción de la GLB, cuando está sulfonilurea se une a su receptor biológico, presente en las membranas celulares, produce un cierre de los canales de potasio (de la bomba sodio potasio ATPasa) que disminuye la salida de potasio, produciendo la despolarización de la membrana, inhibición de la síntesis de ATP e incremento de  $Ca^{2+}$  intracelularmente (Eliasson et al., 1996), que ha sido asociado con el aumento en los niveles de glutamato extracelular (Ferrand-Drake et al., 1999) y con la activación de una gran variedad de enzimas dependientes de calcio, entre las que destacan las proteasas, lipasas y endonucleasas, las cuales dañan el citoesqueleto, membrana celular y a los ácido nucleicos respectivamente en cerebro (Orrenius et al., 1989). Así mismo, el incremento en los niveles de calcio intracelular han sido relacionados con la generación de radicales libres, mediante la activación de la fosfolipasa A2 y de la óxido nítrico sintetasa (NOS) (Lafon-Cazal et al., 1993). Adicionalmente, los incrementos en el contenido de CHPx y MDA pueden ser explicados por la biotransformación por fase 1 de la GLB, por el sistema de citocromo P450, que puede dar origen a la generación de radicales libres como son el radical hidroxilo, oxígeno singulete y radical superóxido, estas ROS son altamente reactivas y pueden atacar directamente a los lípidos de membrana. La subfamilia CYP2 es especialmente conocido por ser el responsable de la biotransformación de GLB,

especialmente la CYP2C9 (Blanco et al. 2005; Zanger et al., 2008). Diferentes familias de genes P450 (CYP) se han caracterizado en los peces como *C. carpio*, como la CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP11, CYP17 y CYP19

(Stegeman y Livingstone, 1998; Botello, et al., 2005). Esto sugiere que la biotransformación de la GLB por fase 1, a 3 y 4 hidroxí-GLB puede ser similar al proceso que ocurre en mamíferos, generando las ROS que incrementan estos biomarcadores en los diferentes órganos evaluados. Se sabe que las branquias, son el primer órgano del pez que se encuentra en contacto directo con el medio ambiente y en donde se lleva a cabo el intercambio de iones como el oxígeno y la regulación ácido – base y que tienen capacidad de biotransformación de los xenobióticos (Monteiro et al., 2005), así mismo el hígado es el órgano que por excelencia se encarga de la biotransformación de xenobióticos como la GLB (Groop et al., 1991). Por lo tanto, como en estos órganos hay biotransformación de tipo oxidativa de la GLB, esto puede explicar el incremento de ROS con el subsecuente aumento de CHPx y MDA.

Los resultados de la evaluación de las enzimas antioxidantes mostraron incrementos respecto al grupo control para SOD (Fig. 12) en todas las concentraciones ensayadas en todos los tiempos en sangre, hígado y músculo; para el caso de branquias y cerebro se observó el mismo comportamiento hasta las 72h. En referencia a la actividad de CAT (Fig.13) se observó incremento respecto al grupo control en todas las concentraciones, órganos ensayados y tiempos de exposición; particularmente en cerebro el efecto fue concentración dependiente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Elmali et al. (2004) quienes observaron incrementos en la actividad de las enzimas SOD y CAT por exposición a GLB con respecto al grupo control en ratas albino macho. También Tüzün et al. (1999) observó

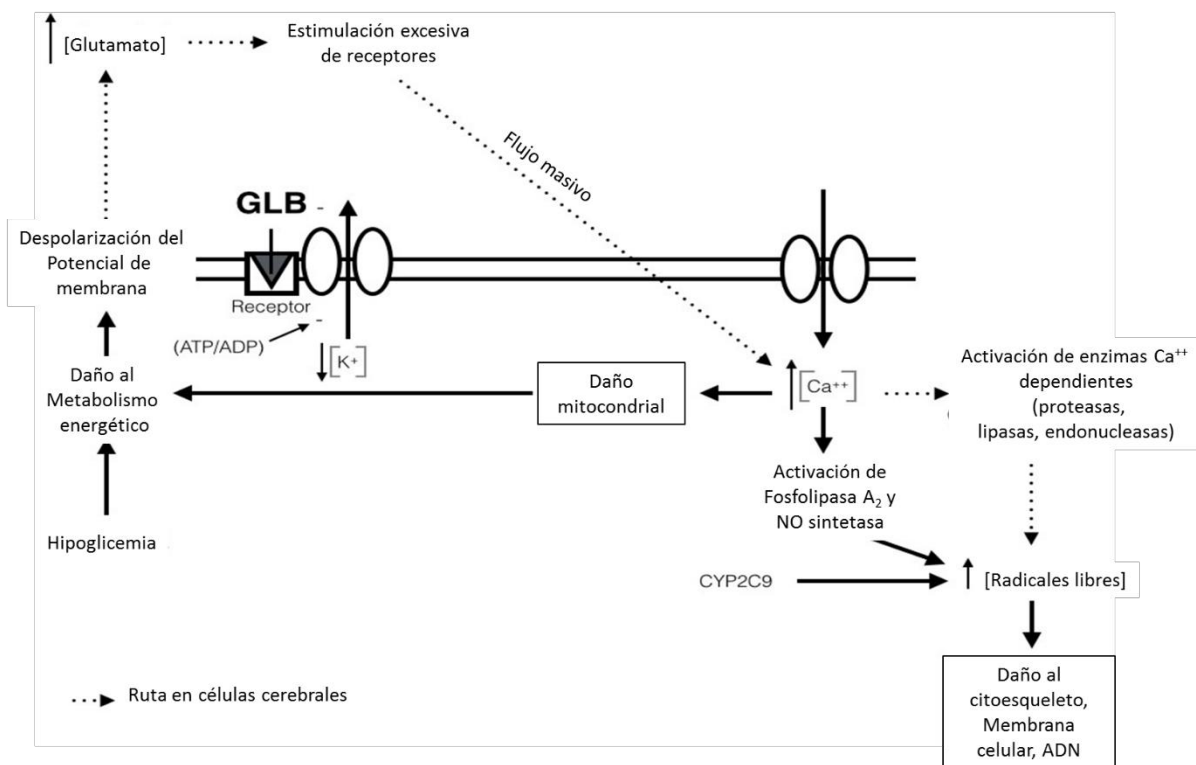


un incremento en la actividad de la CAT por exposición a GLB en ratas albino macho neonatos, con respecto a los grupos control. Es bien sabido, que el sistema antioxidante está mediado por las enzimas antioxidantes SOD y CAT, que funcionan secuestrando ROS y las convierten en compuestos con menor toxicidad y reactividad. La SOD es la primera enzima que participa en el proceso y es la encargada de dismutar el radical anión superóxido formando peróxido de hidrogeno (Van der Oost et al., 2003). Posteriormente, la CAT actúa sobre este sustrato generando H<sub>2</sub>O y O<sub>2</sub> (Vendemiale et al., 1999). Los incrementos observados en este estudio en las enzimas SOD y CAT puede ser explicado por la biotransformación y el mecanismos de acción de la GLB que como ya se mencionó previamente generan radicales libres en el superóxido y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sustratos de la SOD y CAT, respectivamente.

Las concentraciones de GLB en los diferentes órganos evaluados y a los diferentes tiempos de exposición mostraron que las matrices biológicas donde hubo una mayor captación de la GLB fueron sangre, hígado y músculo y que los órganos con menor captación de la GLB fueron branquias y cerebro. Las propiedades fisicoquímicas de la GLB refieren que es un fármaco pobremente soluble en agua (aproximadamente 38 µM/L a 37°C) con una pobre biodisponibilidad por vía oral (Censi et al. 2016), lo que se comprueba en la tabla 2, ya que los valores de bioconcentración de GLB en los diferentes órganos es bajo. Sin embargo, estas bajas concentraciones captadas de GLB son capaces de inducir estrés oxidativo a los diferentes tiempos de exposición y de manera estadísticamente significativa con respecto a los controles.

En resumen y de acuerdo a los hallazgos encontrados en la presente investigación, sugerimos

que la GLB es capaz de generar estrés oxidativo en *Cyprinus carpio* mediante el siguiente mecanismo (ver Fig. 21). La GLB se une a su receptor biológico en la membrana celular, como consecuencia se presenta un cierre de los canales de potasio dependientes de la bomba sodio potasio ATPasa, por lo que disminuye la salida de potasio, lo que conlleva a una despolarización de la membrana. Esta despolarización por una parte, puede conducir al incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el cual activa la fosfolipasa  $\text{A}_2$  y la NO sintetasa produciendo radicales libres; por otra parte, específicamente en cerebro, puede producir una liberación de neurotransmisores como el glutamato, el cual al acumularse favorece también el incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, activando enzimas dependientes del  $\text{Ca}^{2+}$  como proteasas, lipasas y endonucleasas las cuales también pueden liberar radicales libres. Otra forma en la que se liberan radicales libres es a través de la biotransformación por fase 1 de la GLB, por el sistema de citocromo P450, que puede dar origen a la generación de radicales libres. Finalmente, estos radicales libres pueden dañar el citoesqueleto, membrana celular y DNA.



**Figura 21.** Mecanismo propuesto de generación de estrés oxidativo en *Cyprinus carpio*. La GLB se une a su receptor biológico en la membrana celular, como consecuencia se presenta un cierre de los canales de potasio dependientes de la bomba sodio potasio ATPasa, por lo que disminuye la salida de potasio, lo que conlleva a una despolarización de la membrana. Esta despolarización por una parte, puede conducir al incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el cual activa la fosfolipasa  $\text{A}_2$  y la NO sintetasa produciendo radicales libres; por otra parte, específicamente en cerebro, puede producir una liberación de neurotransmisores como el glutamato, el cual al acumularse favorece también el incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, activando enzimas dependientes del  $\text{Ca}^{2+}$  como proteasas, lipasas y endonucleasas las cuales también pueden liberar radicales libres. Otra forma en la que se liberan radicales libres es a través de la biotransformación por fase 1 de la GLB, por el sistema de citocromo P450, que puede dar origen a la generación de radicales libres. Finalmente, estos radicales libres pueden dañar el citoesqueleto, membrana celular y DNA.

Por otra parte, los resultados de incremento tanto en el grado de MDA como en el grado de CPx inducidos por la GLB en ambas concentraciones de 50 y 1000  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  durante los 5 tiempos de exposición en la carpa común, comprueban el efecto de este xenobiótico en las propiedades fisicoquímicas y texturales del músculo, esto se debe a que la GLB es un fármaco que al ser una sustancia biológicamente activa y al llegar a los diferentes órganos de los hidrobiontes, puede biotransformarse y originar moléculas más reactivas como son las

diversas especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente el oxígeno singulete, el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos; estas moléculas son conocidas por ser altamente reactivas y llegar a inducir daño a las proteínas musculares (MP), causando oxidación de los aminoácidos presentes en las cadenas, como consecuencia diversas afectaciones en la funcionalidad de las proteínas, como lo es la pérdida de solubilidad, oxidación de grupos sulfhidrilo (-SH), alteración de CRA (Fig. 19) y daño en la textura, causando un detrimento en la calidad de la carne (Lund et al., 2011; Estévez, 2011).

Los resultados del grado de L-OX, en todas las muestras presentaron un incremento en la concentración de malondihaldeido (MDA), esto podría explicarse debido al alto grado de insaturación de los lípidos presentes en el músculo y a su alta concentración de metales (Kanner et al., 1987), Kandemir, Ş. y Polat, N., 2007, mencionan que la carne de pescado es una de las más sensibles a la oxidación de lípidos y es la mayor causa del deterioro de la grasa del mismo, esta oxidación de los lípidos, conduce a la formación de hidroperóxidos (moléculas inestables), que una vez fragmentados, liberan aldehídos de cadena corta como el MDA, cetonas y ácidos grasos, lo que podría contribuir al deterioro de la textura y del sabor de la carne, como lo menciona Spuch y Judis (2004). Por lo que, en el presente estudio, se observó una mayor reducción del valor del pH para la mayor concentración a partir de las 72 h, esta reducción del pH (Fig. 14) se puede explicar debido al incremento en la concentración de MDA y a la acumulación de lipoperóxidos, provocando la degradación de las proteínas estructurales del músculo de pescado principalmente la miosina, como lo menciona Wang (2011).

El incremento en la formación de P-OX, podría deberse a que en el proceso de biotransformación oxidativa de la GLB se generan ROS como  $H_2O_2$  y  $O_2^-$ , las cuales actúan

---

extrayendo un átomo de hidrógeno ( $H^\bullet$ ) de los grupos metileno de los aminoácidos de las proteínas, promoviendo la formación del radical carbonilo ( $P^\bullet$ ), consecuentemente este radical es convertido en radical peroxilo ( $POO^\bullet$ ) en la presencia de  $O_2$  y de un alquil peróxido ( $POOH$ ), mediante la extracción de un átomo de hidrógeno de otra molécula adyacente (Lund et al., 2011); dichas ROS tienden a unirse a los aminoácidos de las proteínas e inducir daño a los centros nucleofílicos, causar oxidación de los  $-SH$ , la fragmentación de péptidos, la modificación de grupos prostéticos y la nitración de proteínas, del mismo modo, los aminoácidos lisina, prolina y arginina, al ser oxidados en presencia de  $Fe^{+3}$  y de  $H_2O_2$ , forman compuestos oxidados de MP, llamados semialdehidos  $\alpha$ -aminoadipico y  $\gamma$ -glutámico (AAS y GGS, respectivamente), los cuales podrían representar hasta el 70% de las proteínas carboniladas de las MP, por lo que al presentarse en un alto porcentaje, podría ocasionar la pérdida de la funcionalidad de las proteínas (Estévez, 2011), en este estudio se observó un decremento ( $p < 0.05$ ) de los grupos sulfhidrilos ( $-SH$ ) en ambas concentraciones (Fig. 17), esto podría ser debido a que los  $-SH$  son altamente susceptibles a la oxidación en presencia del  $H_2O_2$ , el cual es acumulado en las células y originado por la biotransformación de la GLB. Principalmente los grupos tioles de la cisteína son los más susceptibles a la oxidación, generando una serie de productos oxidados tales como el ácido sulfénico ( $RSOH$ ), ácido sulfinico ( $RSOOH$ ) y entrecruzamiento de grupos disulfuro ( $RSSR$ ) (Lund 2011), coincidiendo con lo reportado por Eymard et al. (2009), donde menciona una pérdida de  $-SH$  en pescado hasta de un 50% debido a la carboxilación de las proteínas del músculo. La miosina, al ser una de las proteínas estructurales que se encuentra en mayor proporción en el músculo (70 a 80%) es una de las MP más susceptibles al daño oxidativo, Hanan y Shaklai (1995) han observado que en presencia de  $H_2O_2$  forma agregados covalentes insolubles

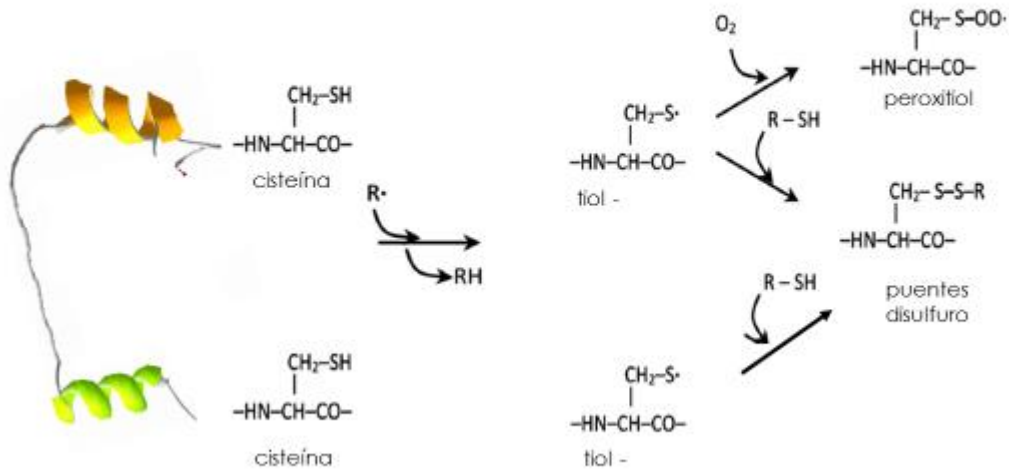
formando entrecruzamiento de proteínas, por lo tanto, los enlaces proteína- proteína se ven favorecidos y los enlaces proteína-agua se ven reducidos, debido a que se pierden las estructuras terciarias y cuaternarias (Xiong, 2000) menciona que una oxidación indeseable causa alteraciones en las características fisicoquímicas del músculo y productos procesados exhibiendo signos de oxidación como una baja CRA, y baja habilidad de formación de geles, así como una fragmentación en la proteína miofibrilar (Baron et al. 2009; Liu & Xiong 2000) en el presente estudio se observó una pérdida en la solubilidad ( $p<0.05$ ) y una disminución en la CRA ( $p<0.05$ ), sabiendo que la CRA se define como la habilidad de la carne de mantener su propia agua o el agua añadida, durante la aplicación de una fuerza externa; esta capacidad de la carne se vio afectada por los procesos de carboxilación de las proteínas, como lo describe Huff-Lonergan y Lonergan, (2005), así como una pérdida de la jugosidad del músculo, haciéndolo más duro como se pudo observar en el resultado del esfuerzo al corte; como lo reportan Fuentes et al., (2010); Xiong, (2000), Sun et al., (2011); pudiendo todo esto alterar su valor tecnológico, como se comprobó con los resultados del TPA (tabla 4), en donde hubo una disminución significativa ( $p<0.05$ ) en los parámetros de dureza, cohesividad, elasticidad, masticabilidad y gomosidad de los geles elaborados con las proteínas a los diferentes tiempos de exposición y en ambas concentraciones. Por lo que la presencia de la GLB afectó la funcionalidad de las proteínas disminuyendo la capacidad de gelificación a medida que incrementa el tiempo de exposición para ambas concentraciones la formación de la red tridimensional no se llevó a cabo, esto debido a la disminución del pH el cual se acercó al punto isoeléctrico de las proteínas, teniéndose como consecuencia una disminución en la CRA y por lo tanto una disminución en la solubilidad como se observa en la figura 19. La posible fragmentación por el proceso de oxidación debido a la presencia de la GLB se

pudo confirmar en el análisis de electroforesis (SDS-PAGE) (Fig. 20), donde se muestra una degradación en la miosina a partir de las 24 horas de exposición para ambas concentraciones, observándose la aparición de péptidos de bajo peso molecular, lo cual representa una evidencia directa de los cambios oxidativos en las proteínas como lo reporta Xiong (2000). El mecanismo propuesto para estas respuestas se muestran en la figura 22, donde se observa que en a) Los grupos SH- que contienen las cadenas laterales de los restos de aminoácidos como la cisteína, son los más susceptibles a la oxidación, debido a la alta reactividad del grupo tiol (Zhang y otros, 2013). La oxidación del grupo tiol ocurre por 2 vías principales: (1) los radicales libres oxidan los grupos SH para generar radicales de tiol, que pueden reaccionar con otros tioles/tiolatos para formar enlaces disulfuro o reaccionar con O<sub>2</sub> para producir radicales (RSOO peroxy-tiol); y 2) Un no-radical RS (por ejemplo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>) reacciona con el grupo tiol formando ácidos que contienen azufre, que puede ser objeto de nuevas reacciones. Por ejemplo, en el b) se observa que al reaccionar el peróxido de hidrógeno con cisteína se genera, ácido sulfénico (CysSOH), ácido sulfinico, (CysSO<sub>2</sub>H) y ácido sulfónico (CysSO<sub>3</sub>H) (Claibore et al., 2003), los cuales puede producir oxiacidos por las reacciones de hidrólisis o compuestos con enlaces disulfuro. Por otra parte, en el c) se muestra la oxidación de la metionina por oxígeno singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) en donde los residuos de metionina pueden ser fácilmente oxidados y el principal producto resultante de la oxidación de la metionina es el metil sulfoxido (MET SO-), que además pueden ser objeto de oxidación para generar la metionina sulfona (Met-SO) (Vogt, 1995). Finalmente en el c) se muestra la reacción de dos aductos de proteínas como la lisina, que al reaccionar con el MDA se obtuvieron: (1) aducto de base de Schiff MDA a la ε-amino de los residuos de lisina; y (2) bis-base de Schiff diimina con enlace entrecruzado, formadas por la reacción de

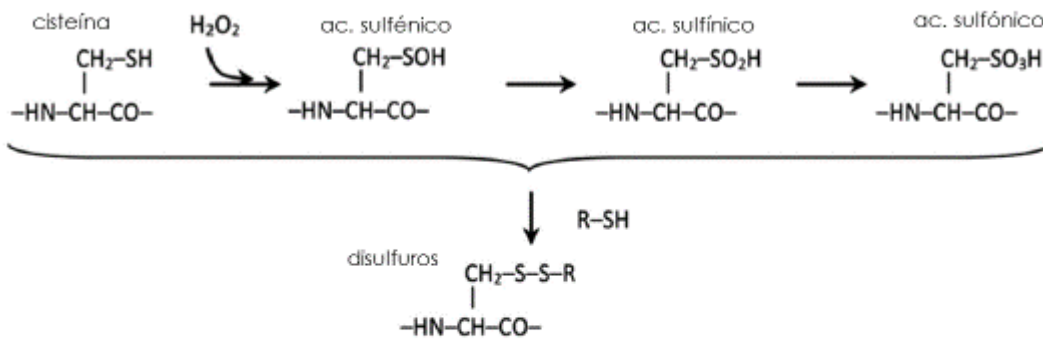
condensación de MDA con 2 ε-amino grupos de residuos de lisina, dando como resultado enlaces entrecruzados inter o intra-moleculares. (Requena y otros 1996).

**Mecanismo propuesto de daño en músculo ocasionado por GLB**

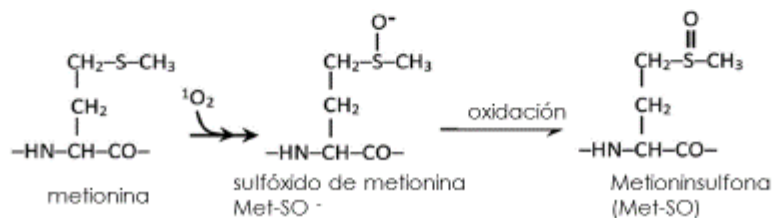
**a) daño ocasionado por un R<sup>•</sup>**



**b) daño ocasionado por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

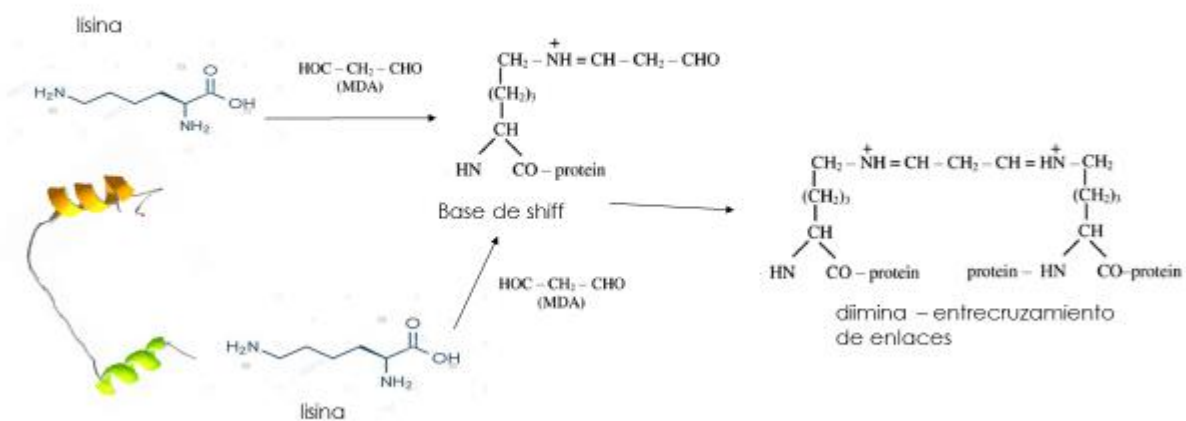


**c) Oxidación de metionina con oxígeno singulete**





d) daño ocasionado por MDA



**Figura 22.** Mecanismos propuestos de daños ocasionados por a) Radicales Libres; b) Peróxido de hidrógeno, c) oxígeno singulete y d) MDA en proteínas del músculo de *Cyprinus carpio*. Fuente: Papuc (2017).

## 9. CONCLUSIONES

*Cyprinus carpio* bioconcentra GLB a partir de las 12 h de exposición a las concentraciones de GLB de 50, 100 y 1000 ng·L<sup>-1</sup>, y los órganos donde más se concentran estos compuestos son sangre, hígado y músculo. La GLB indujo incrementos de CHPx, MDA, CPx y la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT en todos los órganos evaluados.

A pesar de que cerebro fue uno de los órganos que menos bioconcentró a la GLB se observaron incrementos significativos de los biomarcadores de oxidación celular con respecto a los controles.

El incremento en el grado de lipoperoxidación (L-OX) y en la oxidación de las proteínas (P-OX) del músculo de *C. carpio* tuvo un efecto significativo en las propiedades fisicoquímicas y texturales, ocasionando un detrimento en su calidad funcional y probablemente en su calidad nutrimental.

Este estudio demostró que la presencia de estos xenobióticos podría tener un impacto ecotoxicológico en especies acuáticas de importancia económica y nutrimental.

## 10. PERSPECTIVAS

En base a los resultados obtenidos en esta investigación; se propone continuar con los siguientes estudios como:

- Estudios de genotoxicidad y citotoxicidad inducidos por GLB.
- Estudios de teratogénesis y/o mutagénesis inducidos por GLB.
- Evaluación del perfil de aminoácidos del músculo del *C. carpio* expuesto a GLB.
- Evaluación del efecto tóxico de los metabolitos de la GLB en especies hidrobiontes.

## 11. REFERENCIAS

- Aguilar-Bryan, L., Nichols, C. G., Wechsler, S. W., & Clement, J. P., 1995. 4th, Boyd AE 3rd, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science and Food Chemistry* 57: 4185–4194.
- AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International (2005). 17th edition current through 1st revision. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities.
- Balsells, M., García-Patterson, A., Solá, I., Roqué, M., Gich, I., Corcoy, R., 2015. Glibenclamide, metformin, and insulin for the treatment of gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ* 350, h102. <https://doi.org/10.1136/bmj.h102>, 2015.
- Barceló, D., & López, M. J., 2008. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Panel Científico-Técnico de seguimiento de la política de aguas, 1, 24. Instituto de Investigaciones Químicas Ambientales – CSIC, Barcelona, España.
- Baron, C. P., Hyldig, G., & Jacobsen, C. (2009). Does feed composition affect oxidation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during frozen storage?. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(10), 4185-4194. DOI: 10.1021/jf803552h
- Blanco, G., Martínez, C., García-Martín, E., & Agúndez, J. A., 2005. Cytochrome P450 gene polymorphisms and variability in response to NSAIDs. *Clinical Research and Regulatory Affairs*, 22(2), 57-81. <http://dx.doi.org/10.1080/10601330500214559>
- Botello, A. V., Benítez, J. L., & Jorge, A., 2005. Golfo de México, contaminación e impacto ambiental diagnóstico y tendencias. Universidad Autónoma de Campeche, Centro de Ecología, Pesquerías y Oceanografía del Golfo de México.; 2a ed. 695 p

- 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), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 52, 302-310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)
- Burcham, P. C., 2007. Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: a new tool for assessing drug-and chemically-induced oxidative cell injury. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 56(1), 18-22. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.02.015>
- Castillo, C., Boggess, K., Sturmer, T., Brookhart, M.A., Benjamin, D.K., Jonsson Funk, M., 2014. Trends in glyburide compared with insulin use for gestational diabetes treatment in the United States, 2000-2011. *Obstet. Gynecol.* 2014 (123), 1177e1184.
- Censi, R., Gigliobianco, M. R., Dubbini, A., Malaj, L., & Di Martino, P., 2016. New Nanometric Solid Dispersions of Glibenclamide in Neusilin® UFL2. *AAPS PharmSciTech*, 17(5), 1204-1212. DOI: 10.1208/s12249-015-0457-z
- Choi, D. W., 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 7(2), 369-379.
- Coyle, J. T., & Puttfarcken, P., 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*, 262(5134), 689-696.
- Cunningham, V. L., Buzby, M., Hutchinson, T., Mastrocco, F., Parke, N., & Roden, N., 2006. Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: next steps. *Environmental science & technology*, 40(11), 3456-3462. <http://dx.doi.org/10.1021/es063017b>.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R., 2003. Protein carbonyl

groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica chimica acta*, 329(1), 23- 38.

[https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)

De Huidobro, F. R., Miguel, E., Blázquez, B., & Onega, E. A (2005). Comparison between two methods (Warner–Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. *Meat science*, 69(3), 527-536. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.09.008>.

Dublán, G. O., Cruz, C. R., Guerrero, L. I., & Ponce, A. E. (2006). Effect of refrigerated storage on proteolytic activity and physicochemical and microstructural properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *Muscle Foods.*, 17, 291-310. DOI: 10.1111/j.1745-4573.2006.00051.x

Eliasson, L., Renstrom, E., Ammala, C., Berggren, P.O., Bertorello, A.M., Bokvist, K., Chibalin, A., Deeney J.T., Flatt, P.R., Gabel, J., Gromada, J., Larsson, O., Lindstrom, P., Rhodes, C.J., Rorsman, P., 1996. PKC-dependent stimulation of exocytosis by sulfonylureas in pancreatic  $\beta$ -cells. *Science* 271:813–815.

Elizalde-Velázquez, A., Galar-Martínez, M., Dublán-García, O., Gómez-Oliván, L.M., Rodríguez-Flores, J., Castañeda-Peñalvo, G., 2016. Effect of amoxicillin exposure on brain, gill, liver and kidney of common carp (*Cyprinus carpio*): The role of amoxicilloic acid. *Environmental toxicology*, 32(4), 1102-1120. DOI: 10.1002/tox.22307

Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77.

Elmalí, E., Altan, N., & Bukan, N., 2004. Effect of the sulphonylurea glibenclamida on liver and kidney antioxidant enzymes in streptozocin-induced diabetic rats. *Drugs in R & D*, 5(4), 203-208. DOI:10.2165/00126839-200405040-00003

- Erecińska, M., & Silver, I. A., 1989. ATP and brain function. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 9(1), 2-19.
- Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat science*, 89(3), 259- 279.  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.025>
- European Parliament and the Council of the European Union., 2008. Regulation (Ec) 1272/2008 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of the European Union*, L353/1,1355.  
<http://eurex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:353:0001:0001:EN:PDF>
- Eymard, S., Baron, C. P., Jacobsen, C., (2009). Oxidation of lipid and protein in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. *Food Chemistry*, 114,57–65.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.030>
- Ferrand-Drake, M., Friberg, H., & Wieloch, T., 1999. Mitochondrial permeability transition induced DNA-fragmentation in the rat hippocampus following hypoglycemia. *Neuroscience*, 90(4), 1325-1338.
- Fuentes, V., Ventanas, J., Morcuende, D., Estévez, M., Ventanas, S., (2010). Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure. *Meat Science*, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.02.024>
- García Macías J.A., F.A. Núñez González, O. Chacón Pineda . y M.R. Espinosa Hernández. 2004. Calidad de canal y carne de trucha arco iris, *Oncorhynchus mykiss* Richardson, producida en el noroeste del Estado de Chihuahua. *Hidrobiológica* 14 (1): 19-26
- Garcíacarreno, F. L., Dimes, L. E., & Haard, N. F., (1993). Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Analytical biochemistry*, 214(1), 65-69.

- Ginebreda, A., Jelić, A., Petrović, M., de Alda, M. L., & Barceló, D., 2012. New indexes for compound prioritization and complexity quantification on environmental monitoring inventories. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(4), 958– 970. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0557-6>
- Ginebreda, A., Pérez, S., Rivas, D., Kuzmanovic, M., & Barceló, D., 2015. Pollutants of Emerging Concern in Rivers of Catalonia: Occurrence, Fate, and Risk. In *Experiences from Surface Water Quality Monitoring* (pp. 283-320). Springer International Publishing. DOI: 10.1007/698\_2015\_348
- Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Valdés-Alanís, A., Islas-Flores, H., & Neri-Cruz, N., 2014. Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug and chemical toxicology*, 37(4), 391-399. DOI:10.3109/01480545.2013.870191.
- Groop, L. C., Barzilai, N., Ratheiser, K., Luzi, L., Wählin-Boll, E., Melander, A., & DeFronzo, R. A., 1991. Dose-dependent effects of glyburide on insulin secretion and glucose uptake in humans. *Diabetes Care*, 14(8), 724-727.
- Gros, M., Petrovic, M., & Barcelo, D., 2008. Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Analytical Chemistry*, 81(3), 898-912. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac801358e>
- Gros, M., Petrović, M., Ginebreda, A., & Barceló, D., 2010. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environment international*, 36(1), 15-26. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.09.002>

- Gross, L. S., Li, L., Ford, E. S., & Liu, S. (2004). Increased consumption of refined carbohydrates and the epidemic of type 2 diabetes in the United States: an ecologic assessment. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 774-779.
- Guengerich, F. P., & Munro, A. W., 2013. Unusual cytochrome P450 enzymes and reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17065-17073. DOI: 10.1074/jbc.R113.462275
- Gül, Ş., Belge-Kurutaş, E., Yıldız, E., Şahan, A., & Doran, F. (2004). Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environment International*, 30(5), 605-609. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00059-X](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00059-X)
- Hanan, T., & Shaklai, N. (1995). The role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generated myoglobin radical in crosslinking of myosin. *Free radical research*, 22(3), 215-227.
- Honikel, K. O., & Hamm, R. (1994). Measurement of water-holding capacity and juiciness. In *Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products*. Springer US (pp. 125-161) <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.02.015>
- Huang, D. J., Zhang, Y. M., Song, G., Long, J., Liu, J. H., & Ji, W. H., 2007. Contaminants- induced oxidative damage on the carp *Cyprinus carpio* collected from the upper Yellow River, China. *Environmental monitoring and assessment*, 128(1), 483-488. DOI: 10.1007/s10661-006-9341-3
- Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat science*, 71(1), 194-204.
- Ibarra-Costilla., 2004 ¿Es el esquema de tratamiento un posible factor causal de estrés oxidativo en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2? *Revista de Investigación Clínica*. 56(6): 817-818.
- Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Colín-Cruz, A., Neri-Cruz, N., &



- García-Medina, S., 2013. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 92, 32-38.
- Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Neri-Cruz, N., & Dublán-García, O., 2014. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(7), 5157-5166. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-013-2477-0>.
- Jafarpour, A., & Gorczyca, E. M. (2009). Characteristics of sarcoplasmic proteins and their interaction with surimi and kamaboko gel. *Journal of food science*, 74(1). DOI: 10.1111/j.1750-3841.2008.01009.x
- Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., & Wolff, S. P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical biochemistry*, 202(2), 384-389. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90122-N](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(92)90122-N).
- Kadiiska, M. B., Gladen, B. C., Baird, D. D., Germolec, D., Graham, L. B., Parker, C. E., & Brot, N., 2005. Biomarkers of oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl<sub>4</sub> poisoning? *Free Radical Biology and Medicine*, 38(6), 698-710. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.09.017>
- Kandemir, Ş., & Polat, N. (2007). Seasonal Variation of Total Lipid and Total Fatty Acid in Muscle and Liver of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* W, 1792) Reared in Derbent Dam Lake. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7(1). [http://www.trjfas.org/uploads/pdf\\_308.pdf](http://www.trjfas.org/uploads/pdf_308.pdf)
- Kanner, J., German, J. B., Kinsella, J. E., & Hultin, H. O. (1987). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 25(4), 317-364. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398709527457>
-

- Krest, C. M., Onderko, E. L., Yosca, T. H., Calixto, J. C., Karp, R. F., Livada, J., & Green, M. T., 2013. Reactive intermediates in cytochrome P450 catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17074-17081. DOI: 10.1074/jbc.R113.473108
- Lafon-Cazal, M., Pietri, S., Culcasi, M., & Bockaert, J., 1993. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature*, 364(6437), 535-537.
- Lam, P. K., & Gray, J. S., 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*, 46(2), 182-186. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00449-6](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00449-6)
- Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., & Schacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. 233, 346- 357. [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).
- Liu, G., & Xiong, Y. L. (2000). Electrophoretic pattern, thermal denaturation, and in vitro digestibility of oxidized myosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 624-630. DOI: 624–630. DOI: 10.1021/jf990520h
- Livingstone, D. R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Medecine Veterinaire*, 154(6), 427-430. <http://plymsea.ac.uk/id/eprint/3780>
- Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., & Estevez, M. (2011). Protein oxidation in muscle foods: A review. *Molecular nutrition & food research*, 55(1), 83-95. DOI: 10.1002/mnfr.201000453
- Magnani, L., Gaydou, E. M., & Hubaud, J. C., 2000. Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. *Analytica Chimica Acta*, 411(1), 209-216. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)00717-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)00717-0)
- Marklund, S., & Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the

autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. The FEBS Journal, 47(3), 469-474.

Martínez Pérez, L. M., 2004. Evaluación de la mutagenicidad de tratamientos utilizados en pacientes con diabetes Mellitus tipo 2 (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Martínez Sánchez, G., 2005. Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. Revista Cubana de Farmacia, 39(3).

Monteiro, S. M., Mancera, J. M., Fontainhas-Fernandes, A., & Sousa, M., 2005. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 141(4), 375-383. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.08.002>

Moodie, R., Stuckler, D., Monteiro, C., Sheron, N., Neal, B., Thamarangsi, T & Lancet NCD Action Group. (2013). Profits and pandemics: prevention of harmful effects of tobacco, alcohol, and ultra-processed food and drink industries. The Lancet. , 381 (9867), 670-679. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62089-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62089-3)

Morachis-Valdez, A. G., Gómez-Oliván, L. M., García-Argueta, I., Hernández-Navarro, M. D., Díaz-Bandera, D., & Dublán-García, O. (2017). Effect of Chitosan Edible Coating on the Biochemical and Physical Characteristics of Carp Fillet (*Cyprinus carpio*) Stored at – 18° C. International Journal of Food Science. <https://doi.org/10.1155/2017/2812483>

Morales-Alvarado, V. J., Murga-Valdez, M., Moreno-Luján, J., López-Deza, E., Gutiérrez-Bustamante, J., & Sánchez-Reyna, V., 2007. Efecto genotóxico de la glibencamida, metformina y terapia combinada en línea celular de ovario de hámster. CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana, 12(2).

<http://www.redalyc.org/html/717/71712203/>

- Nazaroglu, N. K., Sepici-Dincel, A., & Altan, N., (2009). The effects of sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in the brain tissue of streptozotocin-induced diabetic rat. *Journal of Diabetes and its Complications*, 23(3), 209-213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2007.09.001>
- Neri-Cruz, N., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., del Socorro Romero-Figueroa, M., Islas-Flores, H., García-Medina, S. & SanJuan-Reyes, N. (2015). Oxidative stress in *Cyprinus carpio* induced by hospital wastewater in Mexico. *Ecotoxicology*, 24(1), 181-193.
- Olanow, C. W., 1993. A radical hypothesis for neurodegeneration. *Trends in neurosciences*, 16(11), 439-444.
- Organisation for Economic Cooperation and Development, 1992. OECD guidelines for testing of chemicals. Guideline no. 203: fish, acute toxicity test. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf>
- Orrenius, S., McConkey, D. J., Bellomo, G., & Nicotera, P., 1989. Role of Ca<sup>2+</sup> in toxic cell killing. *Trends in Pharmacological Sciences*, 10(7), 281-285.
- Osorio, V., Larrañaga, A., Aceña, J., Pérez, S., & Barceló, D., (2016). Concentration and risk of pharmaceuticals in freshwater systems are related to the population density and the livestock units in Iberian Rivers. *Science of the Total Environment*, 540, 267- 277. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.143>
- Parvez, S., & Raisuddin, S., 2005. Protein carbonyls: Novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 20(1), 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.11.002>
- Philipson, L. H., & Steiner, D. F., 1995. Pas de deux or more: The sulfonylurea receptor and K<sup>+</sup>

channels. *Science*, 268(5209), 372.

Pilosof AM (2000). Solubilidad. En *Caracterización Funcional y estructural de proteínas*. Pilosof, A.M.R y Bartholomai, G.B. editors. Edit. Ceudeba. (pp. 60-75). CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo).

Radi, R., Turrens, J. F., Chang, L. Y., Bush, K. M., Crapo, J. D., & Freeman, B. A., 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 266(32), 22028–22034.

Radjenović, J., Pérez, S., Petrović, M., & Barceló, D., (2008). Identification and structural characterization of biodegradation products of atenolol and glibenclamide by liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1210 (2), 142-153.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.060>

Radjenovic, J., Petrovic, M., & Barceló, D., (2007). Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*., 387(4), 1365–1377. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0883-6>

Radjenović, J., Petrović, M., & Barceló, D., 2009. Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research*, 43(3), 831–841.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.043>

Rebollo, C. P., Calvo, M. G., de Alda Villaizán, M. J. L., Petrovic, M., Martí, A. G., & Culleres, D. B., 2011. Repercusiones sanitarias de la calidad del agua: los residuos de medicamentos en el agua. *Revista de Salud Ambiental*, 11(1-2), 17-26.

Richardson, S. D., & Ternes, T. A., 2009. Water analysis: emerging contaminants and current

- issues. *Analytical Chemistry*, 81(12), 4645–4677. <https://doi.org/10.1021/ac500508t>
- Richardson, S. D., & Ternes, T. A., 2011. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Analytical chemistry*, 83(12), 4614-4648. <https://doi.org/10.1021/ac200915r>
- San Juan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Islas- Flores, H., González-González, E. D., & Jiménez-Vargas, J. M., 2015. NSAID- manufacturing plant effluent induces geno-and cytotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*). *Science of the Total Environment*, 530, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.088>.
- San Juan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L. M., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., García- Medina, S., Islas-Flores, H., & Neri-Cruz, N., 2013. Effluent from an NSAID- manufacturing plant in Mexico induces oxidative stress on *Cyprinus carpio*. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(9), 1689. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-013-1689-8>.
- Santos, L. H. M. L. M., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Delerue-Matos, C., Pena, A., Barceló, D., & Montenegro, M. C. B. S. M., 2013. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Science of the Total Environment*, 461–462, 302–316. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.077>
- Shaw, J. E., Sicree, R. A., & Zimmet, P. Z., 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*, 87(1), 4-14. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.10.007>
- Siesjö, B.K., 1988. Hypoglycemia, brain metabolism, and brain damage. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 4(2), 113-144.
- Siesjö, B. K., Katsura, K. I., Zhao, Q. I., Folbergrová, J., Pahlmark, K., Siesjö, P., & Smith, M. L., 1995. Mechanisms of secondary brain damage in global and focal ischemia: a

speculative synthesis. *Journal of neurotrauma*, 12(5), 943-956.

Silva-Ríos, A., Dublán-García, O., Quintero-Salazar, B., Dominguez-Lopez, A., Gómez- Oliván, L. M., López-Martínez, L. X., & Salem, A. F. Z. (2013). Evaluation of physicochemical, functional and textural properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored at low temperatures. *African Journal of Biotechnology*, 12(32). DOI:10.5897/AJB2013.12133

Spuch, A. R., Judis, M. A., (2004). Estudio de la calidad nutricional y susceptibilidad oxidativa de *Cyprinus carpio* cultivados en la región centrochaqueña, *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, Ed. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina., E-075, 1–4

Stegeman, J. J., & Livingstone, D. R., 1998. Forms and functions of cytochrome P450. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology*, 121(1-3), 1.

Sun, W., Cui, C., Zhao, M., Zhao, Q., Yang, B., (2011). Effects of composition and oxidation of proteins on their solubility, aggregation and proteolytic susceptibility during processing of Cantonese sausage. *Food chemistry*, 124, 336–341. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.042>

Tüzün, S., Girgin, F. K., Sözmen, E. Y., Menteş, G., & Ersöz, B., 1999. Antioxidant status in experimental type 2 diabetes mellitus: effects of glibenclamide and glipizide on various rat tissues. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 51(4-5), 436-441. [http://dx.doi.org/10.1016/S0940-2993\(99\)80036-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0940-2993(99)80036-0)

Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149. [http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6).

- Vendemiale, G., Grattagliano, I., & Altomare, E., 1999. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *International journal of clinical & laboratory research*, 29(2), 49-55.
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M., & Zambello, E., 2012. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment- A review. *Science of the Total Environment*, 429, 123–155. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>
- Wang, C., & Gardinali, P. R., 2013. Detection and occurrence of microconstituents in reclaimed water used for irrigation - A potentially overlooked source. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(18), 5925–5935. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6799-z>
- Wang, P. A., Vang, B., Pedersen, A. M., Martinez, I., & Olsen, R. L. (2011). Post-mortem degradation of myosin heavy chain in intact fish muscle: Effects of pH and enzyme inhibitors. *Food chemistry*, 124(3), 1090-1095. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.093>
- World Health Organization. (2016). Global report on diabetes. [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf)
- Xiong, Y. L. (2000). Protein oxidation and implications for muscle food quality. In Eric A. Decker, Cameron Faustman, Clemente J. Lopez-Bote (Eds.), *Antioxidants in Muscle Foods: Nutritional Strategies to Improve Quality* (pp. 85-90). New York: Wiley and Sons.
- Zanger, U. M., Turpeinen, M., Klein, K., & Schwab, M., 2008. Functional pharmacogenetics /genomics of human cytochromes P450 involved in drug biotransformation. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 392(6), 1093-1108. DOI: 10.1007/s00216-008-2291-6



## 12. ANEXOS

### 12.1 Publicación de primer artículo



**Chemosphere**  
Available online 9 February 2018  
In Press, Accepted Manuscript — Note to users



### Environmentally relevant concentrations of glibenclamide induce oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*)

Ericka María Guadalupe Martínez-Viveros<sup>a</sup>, Hariz Islas-Flores<sup>a</sup>,  , Octavio Dublán-García<sup>a</sup>, Marcela Galar-Martínez<sup>b</sup>, Nely SanJuan-Reyes<sup>a</sup>, Sandra García-Medina<sup>b</sup>, María Dolores Hernández-Navarro<sup>a</sup>, Leobardo Manuel Gómez-Oliván<sup>a</sup>,   

<sup>a</sup> Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tolloca s/n. Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, Mexico

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

Available online 9 February 2018

[Show less](#)

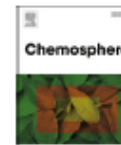
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.020> [Get rights and content](#)



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chemosphere](http://www.elsevier.com/locate/chemosphere)



## Environmentally relevant concentrations of glibenclamide induce oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*)



Erica María Guadalupe Martínez-Viveros<sup>a</sup>, Hariz Islas-Flores<sup>a, \*\*</sup>, Octavio Dublán-García<sup>a</sup>, Marcela Galar-Martínez<sup>b</sup>, Nely SanJuan-Reyes<sup>a</sup>, Sandra García-Medina<sup>b</sup>, María Dolores Hernández-Navarro<sup>a</sup>, Leobardo Manuel Gómez-Oliván<sup>a, \*</sup>

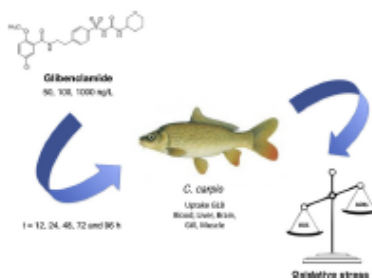
<sup>a</sup> Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón Intersección Paseo Toluca s/n, Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, México

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

### HIGHLIGHTS

- GLB is antidiabetic drug used around the world.
- GLB is released into water bodies.
- This work evaluated GLB-induced oxidative damage in *Cyprinus carpio*.
- GLB uptake is high in liver and muscle of *C. carpio* and lower in brain and gill.
- Exposure to GLB induced oxidative stress in *C. carpio*.
- Exposure to ng/L of GLB induces oxidative damage in fish.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 17 October 2017  
Received in revised form 12 December 2017  
Accepted 6 January 2018

**Handling Editor:** Jim Lazorchak

**Keywords:**  
Oxidative damage  
Antioxidant enzymes

### ABSTRACT

The hypoglycemic pharmaceutical glibenclamide (GLB) is widely used around the world. This medication is released into the environment by municipal, hospital and industrial wastewater discharges. Although there are reports of its environmental occurrence in the scientific literature, toxicity studies on aquatic species of commercial interest such as the common carp *Cyprinus carpio* are scarce. The present study aimed to evaluate the oxidative stress induced on *C. carpio* by environmentally relevant concentrations of GLB. Biomarkers of oxidative damage such as hydroperoxide content, lipid peroxidation and protein carbonyl content were evaluated as well as the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase and catalase. The concentration of GLB was determined in water as well as in gill, liver, muscle, brain and blood of carp at 12, 24, 48, 72 and 96 h. The findings obtained in the study prove that GLB induces increases in biomarkers of oxidative damage and antioxidant enzyme activity in the teleost *C. carpio*, that

**Abbreviations:** CAT, Catalase; CHP, Cumene hydroperoxide; CYP450, Cytochrome P450; EC50, Median effective concentration; GLB, Glibenclamide; HPC, Hydroperoxide content; HPLC-MS/MS, High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC50, Median lethal concentration; LPX, Lipid peroxidation; MDA, Malondialdehyde; MEC, Molar extinction coefficient; OD, Optical density; PCC, Protein carbonyl content; SOD, Superoxide dismutase; TBARS, Thiobarbituric acid reactive substances.

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [hislaz@uaemex.mx](mailto:hislaz@uaemex.mx) (H. Islas-Flores), [lmgomez@uaemex.mx](mailto:lmgomez@uaemex.mx) (L.M. Gómez-Oliván).

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.020>  
0045-6535/© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Type 2 diabetes mellitus is one of the metabolic disorders currently prevalent at world level. In 2012, the International Diabetes Federation estimated that more than 371 million people live with this disease and 4.8 million die from it each year. At the global level, it is estimated that by 2030 the number of diabetic persons will have increased to 439 million, representing 7.7% of the adult population (aged 20–79 years) in the world (Juan et al., 2013).

The group of pharmaceuticals used to treat this ailment are oral hypoglycemic agents. One of the more commonly prescribed of these is glibenclamide (GLB) which is widely produced and consumed throughout the world, it is the most common treatment for gestational diabetes since 2007 in US and their use increased from 7.4% to 64.5% in this country (Balsells et al., 2015; Castillo et al., 2014). Previous studies have determined the presence of GLB in diverse effluents: in Spain in the municipal wastewater of Rubí (Barcelona) at concentrations of 19.2–100 ng L<sup>-1</sup> (Radjenovic et al., 2007; Verlicchi et al., 2012); in wastewater and sewage sludge of Terrassa (Barcelona) at 15900 ng L<sup>-1</sup> (Radjenovic et al., 2009); in Río Ebro water at concentrations of 40 ng L<sup>-1</sup> to 2000 ng L<sup>-1</sup> (Postigo Rebollo et al., 2011); and in water treatment plants of Catalonia at concentrations of 0.6 and 4.6 ng L<sup>-1</sup> (Ginebreda et al., 2012, 2015). The presence of GLB has also been detected in reclaimed water for irrigation in Florida (US) at concentrations of 22 ng L<sup>-1</sup> (Wang and Gardinali, 2013) and surface waters in Portugal and Spain at 10.9–43.6 ng L<sup>-1</sup> (Osorio et al., 2016).

As regards GLB toxicity, it has been proved to have harmful effects on humans, rodents and other animal species like DNA damage, oxidative stress, genotoxicity and mutagenesis (Ibarra-Costilla et al., 2010; Martínez-Pérez, 2004; Morales-Alvarado and Murga-Valdez, 2007; Nazaroglu et al., 2009; Tüzün et al., 1999). However, very little is known about its toxic effects on hydrobionts common in aquatic systems or its behavior and fate in the environment (Barceló et al., 2009; Gros et al., 2010; Richardson and Terners, 2009, 2011; Santos et al., 2013).

The toxicokinetics of GLB in mammals includes rapid oral absorption; GLB binds to plasma proteins in a high percentage. Also, it is biotransformed in the liver via hydroxylation of the cyclohexyl ring at the cis-3 and trans-4 positions by the cytochrome P450 (CYP450) system, in which the isoforms 2C9, 2C19 and 3A4 are involved. GLB is also biotransformed in the kidneys although this is a minor process. This pharmaceutical is eliminated from the body through renal and biliary excretion (Aguilar-Bryan et al., 1995; Philipson and Steiner, 1995). Although the presence of the 2C9 isoform has not been reported in the international literature, the same events may occur in fish.

In the phase I biotransformation of GLB, a complex called oxy-cytochrome P450 (O<sub>2</sub>-P450-Fe<sup>2+</sup>-GLB) is formed. This complex breaks down, releasing the superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), with regeneration of the ferric protein (P450-Fe<sup>3+</sup>-GLB) and subsequent formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The latter products, called reactive oxygen species (ROS), are responsible for oxidative stress induction, eliciting damage in biomolecules such as lipids, proteins and nucleic acids (Guengerich, 2012; Krest et al., 2013).

The regulated production of free radicals and the maintenance

of redox homeostasis are essential for the physiological health of organisms. The generation of ROS is induced by internal and external agents, such as phagocytes, enzymes (such as CYP450), radiation and exogenous chemicals. In the same way, the generation of ROS can be reduced or reversed by various enzymes, called antioxidants, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR) (Kovacic and Jacintho, 2001). The endogenous ROS serve as a second messenger in signal transduction and are thought to be important in ion transport, immune defense of the host, transcription and cell apoptosis (Lander, 1997; Dennerly, 2007). However, ROS can also be harmful due to their covalent or irreversible binding to cellular macromolecules, they are responsible for diverse effects on cells and tissues associated with mutagenesis and carcinogenesis (Ibarra-Costilla, 2004; Martínez-Pérez, 2004).

Oxidative stress refers to a state in which the cell is exposed to an increasingly oxidizing environment and antioxidant defense mechanisms are overcome, so that cellular redox status is altered; this is considered one of the major mechanisms of action of toxic substances due to this causes the irreversible oxidation of DNA, proteins and lipids, which leads to the inactivation of many enzymes and cell death and it can also affect gene expression by interfering with the activity of redox-sensitive transcription factors and signal transduction by the oxidation of thiols (Martínez, 2005; Sahambi and Hales, 2006). The oxidative damage induced on lipids, proteins and nucleic acids, and its effects on enzymatic mechanisms of antioxidant defense in living organisms have been used in recent years as a biomarker for monitoring environmental contamination (Dalle-Donne et al., 2003; Kadiiska et al., 2005; Lam and Gray, 2003).

Fish toxicity studies are among the most effective methods for understanding the harmful effects induced by environmental contaminants in aquatic systems. Fish play a major role in aquatic food webs, where they usually occupy an intermediate or high position: they not only feed on a variety of aquatic predators, they are also an important source of food for human populations around the world (van der Oost et al., 2003).

To evaluate the toxic effects of contaminants in diverse water bodies, test species known as bioindicators are used. The common carp *Cyprinus carpio* is frequently used as a bioindicator species, since cyprinids are one of the major groups of teleost fishes cultured for commercial purposes throughout the world and its members are also highly sensitive to toxic substances, show rapid response to changes in their aquatic environment and are easy to maintain in the laboratory (Elizalde-Velazquez et al., 2016; Gómez-Oliván et al., 2014; Huang et al., 2007; Islas-Flores et al., 2013, 2014; San Juan-Reyes et al., 2013, 2015). While some studies have shown that GLB induces oxidative stress in mammals such as male albino rat neonates at doses of 5 mg/kg weight (Tüzün et al., 1999) and changes in the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase in male Sprague Dawley rat at the same dose (Nazaroglu et al., 2009), the scientific literature includes no studies on the capacity of GLB to induce oxidative stress on aquatic species of commercial interest such as common carp. Therefore, the present study aimed to evaluate the toxicity induced by three environmentally relevant concentrations of GLB (50, 100



and 1000 ng L<sup>-1</sup>), which were selected based on available data of occurrence of GLB in diverse water bodies. Brain, gill, blood, liver and muscle of *C. carpio* were analyzed to evaluate oxidative stress biomarkers such as hydroperoxide content (HPC), lipid peroxidation (LPC) and protein carbonyl content (PCC), as well as the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Test substance

Glibenclamide (CAS No. 10236-21-8, >99% purity) was purchased from Sigma-Aldrich (Toluca, State of Mexico). A stock solution was prepared with 1 g GLB in 0.02% DMSO for dilution in 1 L distilled water. From this primary solution all other GLB concentrations (50, 100 and 1000 ng L<sup>-1</sup>) were prepared.

### 2.2. Species procurement and acclimation

Test organisms used in the study were obtained from the common carp aquaculture center in Tlaquepaque (State of Mexico). In the acute toxicity assay, one-month-old alevins of *Cyprinus carpio*, 2.5 ± 0.5 cm long and weighing 5.5 ± 0.5 g, were used. In the sub-lethal toxicity assay, three-month-old juveniles, 15.5 ± 0.5 cm long and weighing 57.5 ± 4.5 g, were used. Fish were securely packed in sealed polyethylene bags containing two-thirds water with 80–90% oxygen saturation, transported to the laboratory where they were stocked in a large 500-L tank filled with 450 L of dechlorinated tap water previously reconstituted with salts, and acclimated for 30 days prior to the experiment. During acclimation, carp were fed Pedregal Silver™ fish food and 1% of the tank water was replaced every 24 h. The physicochemical characteristics of reconstituted water were maintained: temperature 20 ± 2 °C, oxygen concentration 80–90%, pH 7.5–8.0, total alkalinity 17.8 ± 7.3 mg L<sup>-1</sup>, total hardness 18.7 ± 0.6 mg L<sup>-1</sup>. A natural light/dark photoperiod was maintained (12:12 h).

Water from the fish farm was analyzed by atomic absorption to ensure that carp had not been exposed to other contaminants like As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb and Zn. The results obtained didn't show pharmaceuticals or other contaminants that might interfere with the experiment.

### 2.3. Determination of acute toxicity (median lethal concentration, LC<sub>50</sub>)

The procedure used to determine the LC<sub>50</sub> was performed as provided in Guideline 203 of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD, 1992), for determination of acute toxicity in fish exposed to chemical substances. In this assay, five exposure systems with five different concentrations of GLB (132, 209, 332, 526 and 834 mg L<sup>-1</sup>) were used, as well as a sixth GLB-free control system. Ten fish at the alevin stage were exposed in each system. As stipulated in Guideline 203, the experiment was static without medium renewal. The assay was performed in triplicate, using a total of 180 fish.

Test system containers (60 × 40 × 20-cm glass tanks) were added the aforementioned GLB concentrations. The systems were maintained at ambient temperature with a natural light/dark photoperiod (12:12 h); constant aeration (80–90% oxygen concentration) was provided and fish were not fed during the assay.

As recommended in the OECD Guideline, the exposure time was 96 h and test specimens were observed at 12, 24, 48, 72 and 96 h. The principal variable evaluated in this experiment was mortality. The 96-h LC<sub>50</sub> of GLB and its 95% confidence limits (*p* < .05) were estimated using the EPA Probit analysis program v1.5. Also, this

protocol was reviewed and approved by the Bioethics Committee of the Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM) to ensure that it was carried out in accordance with institutional standards for the care of animal test subjects. Provisions set out in the official Mexican norm on the production, care and use of laboratory animals (NOM-062-200, 1999) were also taken into account.

### 2.4. Quantification of GLB by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)

#### 2.4.1. Equipment and chromatographic conditions

Quantification of GLB in water and tissue samples was performed using an Agilent 1100 HPLC system (Palo Alto, CA) equipped with Agilent vacuum degasser, quaternary pump and autosampler. Separation was done with Agilent Lichrospher® 100 RP-18 columns (125 mm × 4 mm ID, 5 μm particle size). The injection volume was 30 μL; the flow rate was 0.7 mL min<sup>-1</sup>. Separation was made by gradient elution using 0.1% formic acid (v/v) as solvent A and an aqueous solution of 10 mM ammonium formate [containing 0.1% formic acid (v/v)] as solvent B. The gradient elution program was 0–3 min: 10% solvent A; 3–5 min: linear increase to 50% A; 3–8 min: linear increase to 90% A; 8–10 min: hold at 90% A; 10–10.1 min: linear decrease to 10% A; with a final hold at 10% A until 12.0 min. The column was thermostated at 25 °C.

MS was performed with an Agilent 6520 Q-TOF unit equipped with electrospray ionization source. The settings used for GLB ionization were: MS capillary voltage 3800 V; drying-gas flow rate 12 L min<sup>-1</sup>; drying-gas temperature 350 °C; nebulizer pressure 60 psi. The system operated in the high resolution mode (4 GHz). Mass axis was calibrated over the range 70–3200 m/z using the manufacturer-provided mixture. A spray with a reference solution was used for continuous calibration in positive ionization mode using as reference masses 121.05 m/z and 302.01 m/z. The optimization of spectrometer parameters for GLB was: retention time 8.56 min; precursor ion 404.15 m/z; product ions 169.0027 m/z (product ion used for quantification 171.0037 m/z); fragmentor 100V; collision energy 10 eV; instrumental detection limit 0.20 ng L<sup>-1</sup>.

#### 2.4.2. Solid phase extraction

Chromabond Tetracycline cartridges were used for solid phase extraction of GLB from water and tissue samples. Cartridges were conditioned with 10 mL methanol, followed by 5 mL HPLC-grade water. Prior to extraction, the pH of water samples was adjusted to 8.5 by adding 0.1M NaOH. Water samples (200 mL) were percolated through the cartridges at a flow rate of approximately 10 mL min<sup>-1</sup>. Then, each sample bottle was rinsed with 10 mL HPLC-grade water and the rinse was drawn through the cartridge. Cartridges were washed with a further 5 mL HPLC-grade water and dried for 10 min. GLB was eluted using four successive aliquots of 1 mL methanol at a flow rate of approximately 1 mL min<sup>-1</sup>. The eluates were collected in 10-mL collection tubes and evaporated at room temperature to dryness with a gentle nitrogen stream. Then, the extracts were reconstituted in 1 mL methanol.

Gill, liver, brain and muscle samples were lyophilized, and accelerated solid-phase extraction was employed using 1 g of lyophilized tissue, methanol with 1% acetic acid, and sand (20–30 mesh particle size) as the dispersing agent. Fiberglass and cellulose filters were used to retain the lipidic phase. Extraction conditions were: 1000 psi; 25 °C; heat-up time 6 min; static cycle 3 × 10 min; flush volume 100%; purge time 60s; 11 mL cells contained in one cellulose filter.

At the end of the procedure, 15 mL of the sample were obtained for subsequent analysis, under the conditions described in section 2.4.1.

## 25. Determination of oxidative stress

Three different concentrations of GLB (50, 100 and 1000 ng L<sup>-1</sup>; hereafter referred to as C1, C2 and C3 respectively) were used for this assay. Exposure times were 12, 24, 48, 72 and 96 h. The experiment comprised three exposure systems (one for each test concentration) plus one GLB-free control system for each exposure time. The assay was performed in triplicate. Each system contained five fish at the juvenile stage (weight and size as described in section 2.2.). A total of 60 systems and 300 fish were used. The GLB concentrations used are based on relevant data of occurrence of GLB in diverse water systems, both municipal wastewater and river water, reported by Gineberda et al. (2012, 2015), Pastorjo Robollo et al. (2011), Radjenovic et al. (2007, 2009), and Wang and Cardinali (2013).

All test systems were prepared using water with the same characteristics and conditions described in section 2.2. The containers used were 120 × 80 × 40-cm glass tanks. Static systems without renewal were used. No food was provided to specimens and tank water was not changed during the assay. At the end of each exposure time, fish were anesthetized and blood was collected by puncture using a previously heparinized 1-mL hypodermic syringe. Puncture was made near the base of the caudal peduncle, at mid-height of the anal fin and ventral to the lateral line.

After puncture, fish were anesthetized in a container filled with water and 0.01% eugenol, and euthanized prior to removal of the gills, liver, muscle and brain. Then, 1 g of each organ were placed in phosphate buffer solution (pH 7.4), homogenized and then centrifuged at 12,500 × g and -4 °C for 15 min. Centrifuged samples were frozen and the supernatant was used to evaluate HPC, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), PCC, and SOD and CAT activity.

## 26. Determination of HPC

HPC determination was based on oxidation of ferrous ions to the ferric state due to presence of hydroperoxides under acidic conditions; ferric ions bind to the xylenol orange indicator to form a stable colored complex which is read at 560 nm, according to the method described by Jiang et al. (1992). First, 0.1 mL of supernatant was mixed with 0.9 mL reaction solution (0.25 mM FeSO<sub>4</sub>, 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 mM xylenol orange and 4 mM butylhydroxytoluene in 90% methanol v/v). The mixture was incubated for 60 min at ambient temperature while light protected, after which, absorbance was read at 560 nm against a blank subjected to the same conditions but using distilled water instead of supernatant. HPC content was estimated using the molar extinction coefficient (MEC) of 4.3 × 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> and results were expressed as nM cumene hydroperoxide (CHP) mg<sup>-1</sup> protein wet weight.

## 27. TBARS assay

Malondialdehyde (MDA) content was analyzed as TBARS by the spectrophotometric method described by Bilses and Aust (1978). This procedure involved mixing 0.05 mL of supernatant and 0.45 mL Tris-HCl buffer solution (150 mM, pH 7.4). Next, 1 mL TBA-TCA reagent (0.375% thiobarbituric acid in 15% trichloroacetic acid) was added. The resulting solution was vortex-shaken for 1 min, and samples thus prepared were immersed in a boiling water bath for 15 min, then immediately cooled at -5 °C for 3 min. Samples were later incubated for 30 min at 37 °C, then centrifuged at 3500 × g for 10 min. Absorbance was read at 535 nm using a blank subjected to the same treatment as samples, and distilled water instead of supernatant. Results were expressed as nM MDA, using the MEC of 1.56 × 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> to calculate MDA content.

## 2.8. Determination of PCC

PCC was determined by the method described in Levine et al. (1994), as modified by Parvez and Raisuddin (2005) and Burcham (2007). In this analysis, supernatant (0.2 mL) was mixed with 0.15 mL 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH, 10 mM in 2 M HCl). The mixture was incubated for 60 min at room temperature while light protected, then supplemented with 0.5 mL of 20% TCA and centrifuged for 5 min at 11,000 × g. The resulting precipitate was collected and washed several times with 1:1 ethyl acetate:hexanol. Next, the fluid was dissolved in a 1 mL guanidine solution (6 M, pH 2.3) and incubated at 37 °C for 30 min, then absorbance was read at 366 nm. Results were expressed as nM reactive carbonyls (C=O) mg protein wet tissue<sup>-1</sup>, using the MEC of 21,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

## 2.9. Determination of SOD activity

SOD activity was analyzed by the method of Marklund and Marklund (1974) as modified by Maguani et al. (2000). The supernatant was previously delipidized by adding 0.09 mL chloroform and 0.05 mL methanol, then Vortex-shaken for 1 min and centrifuged at 8000 × g for 15 min. Next, to 0.1 mL of delipidized supernatant was added 2.8 mL Tris-EDTA buffer solution, pH 8.2. The resulting mixture was shaken in the Vortex for 1 min, and was then added 0.05 mL of a 0.2 mM pyrogallol solution. The difference between optical density (OD) at 10 and 60 s, at 420 nm wavelength was determined. After this, the percentage of inhibition of pyrogallol autooxidation was obtained by dividing the difference in test sample ODs by the difference in control sample ODs and multiplying by 100. Results were expressed as IU SOD mg protein wet tissue<sup>-1</sup>; to this end the quotient of the percentage of pyrogallol autooxidation was divided by 50%, since 1 IU SOD induces a 50% inhibition of pyrogallol autooxidation at 25 °C.

## 2.10. Determination of CAT activity

CAT activity was estimated by the Radi et al. (1991) method, which is based on evaluating enzyme activity when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is reduced in a medium prepared by mixing 1 mL isolation buffer solution (0.3M sucrose, 1mM EDTA, 5mM HEPES and 5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) with 0.02 mL of supernatant, and supplementing with 0.2 mL of 20mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The CAT activity required to reduce the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> substrate was measured at 0 and 60 s, at 240 nm, and was expressed as μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mg protein wet tissue<sup>-1</sup>. Values were calculated by substituting absorbance readings in the formula: CAT concentration = (A<sub>0</sub> - A<sub>60</sub>)/MEC, where the MEC of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is 0.043 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Results were expressed as units mg protein<sup>-1</sup>; 1 unit is defined as the quantity of enzyme required to break down 1 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> at 25 °C and pH 7.0.

## 2.11. Determination of total protein content

Total protein content was determined by the spectrophotometric method described by Bradford (1976), in which 0.025 mL of supernatant is mixed with 0.075 mL deionized water and 2.5 mL Bradford reagent. This mixture was homogenized in a Vortex for 1 min and incubated for 5 min at room temperature while light protected, after which, absorbance was read at 595 nm. Absorbance readings were interpolated on a bovine serum albumin type curve and total protein content was expressed as mg protein wet tissue.

## 2.12. Statistical analysis

Oxidative stress results were statistically analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), and differences between means



were compared using the Bonferroni multiple comparisons test, with  $p$  set at  $<0.05$ . SPSS v9 software (SPSS, Chicago, IL) was used.

Pearson's correlation analysis was performed to find potential correlations between GLB concentrations in the organs evaluated, and the oxidative stress biomarkers used. To this end, Sigmapast v2.03 software was used.

### 3. Results

#### 3.1. 96-h LC<sub>50</sub>

The 96-h LC<sub>50</sub> of GLB in adults of *C. carpio* was 509 mg L<sup>-1</sup>, with a 95% confidence interval of 505.96–512.16 mg L<sup>-1</sup> ( $p < .05$ ). The  $\chi^2$  linear adjustment test was not significant at  $p < .05$ .

#### 3.2. Quantification of GLB in water and tissue samples

Table 1 lists GLB concentration at the different exposure times in exposure systems water and in the organs evaluated. As can be seen, beginning at 12 h, GLB concentration in water decreased in all exposure systems and increased gradually over time in all organs. GLB bioaccumulation was highest in blood, liver and muscle, and increased with time. Brain and gill were the organs of lowest bioaccumulation of GLB, although concentrations also increased in these organs with increasing exposure.

#### 3.3. HPC

HPC results are shown in Fig. 1. At the C3 concentration (1000 ng L<sup>-1</sup>), significant increases relative to the control group ( $p < .05$ ) occurred from 24 to 96 h in brain (254% for 24 h, 207% for 48 h, 214% for 72 h and 119% for 96 h); from 12 to 96 h in blood (418% for 12 h, 614% for 24 h, 704% for 48 h, 669% for 72 h and 884% for 96 h) as well as liver (55% for 12 h, 94% for 24 h, 68% for 48 h, 68% for 72 h and 51% for 96 h); at 24 and 96 h in gill (37% for 24 h and 54% for 96 h); and from 12 to 96 h in muscle (368% for 12 h, 736% for 24 h, 734% for 48 h, 928% for 72 h and 803% for 96 h). At the C2 concentration (100 ng L<sup>-1</sup>), significant increases were found from 12 to 96 h in blood (318% for 12 h, 314% for 24 h, 585% for 48 h, 508 for 72 h and 762% for 96 h) as well as liver (38% for 12 h, 46% for 24 h, 20% for 48 h, 32% for 72 h and 52% for 96 h); from 12 to 48 h in gill (26% for 12 h, 28% for 24 h and 26% for 48 h); from 24 to 96 h in brain (128% for 24 h, 84% for 48 h, 95% for 72 h and 115% for 96 h); and from 12 to 96 h in muscle (301% for 12 h, 490% for 24 h, 451% for 48 h, 436% for 72 h and 324% for 96 h). At the lowest concentration (C1, 50 ng L<sup>-1</sup>), significant differences were observed only from 12 to 96 h in blood (318% for 12 h, 314% for 24 h, 585% for 48 h, 598% for 72 h and 762% for 96 h) as well as muscle (124% for 12 h, 379% for 24 h, 380% for 48 h, 394% for 72 h and 319% for 96 h).

#### 3.4. TBARS assay

The MDA content induced by GLB is shown in Fig. 2. At the highest concentration (C3), significant increases with respect to the control group ( $p < .05$ ) were observed from 12 to 96 h in blood (198, 315, 268, 211 and 171%), liver (148, 186, 195, 143 and 129%) and gill (312, 471, 487, 294 and 302%); from 72 to 96 h in brain (112 and 87%); and from 12 to 96 h in muscle (1391, 1621, 1309, 1334 and 850%). At the C2 concentration, significant increases were recorded from 12 to 96 h in blood (88, 169, 172, 177 and 111%); from 12 to 72 h in liver (150, 185, 167 and 92%); from 12 to 96 h in gill (137, 617, 409, 336 and 310%); from 72 to 96 h in brain (53 and 50%); and from 12 to 96 h in muscle (696, 835, 1223, 966 and 591%). At the lowest concentration (C1), significant differences were found from 24 to 48 h in blood (47 and 40%); from 48 to 96 h in liver (134, 145 and

147%); from 12 to 96 h in gill (103, 219, 141, 110 and 153%); from 72 to 96 h in brain (96 and 103%); and from 24 to 96 h in muscle (99, 346, 727 and 631%).

#### 3.5. PCC

Fig. 3 shows PCC results. Significant increases with respect to the control group ( $p < .05$ ) were observed at the C3 concentration from 12 to 96 h in blood (119, 108, 116, 100 and 119%); from 12 to 48 h in liver (47, 73 and 54%) as well as gill (47, 75 and 57%); and from 12 to 96 h in brain (233, 308, 322, 304 and 347%) and muscle (141, 231, 249, 401 and 675%). At the C2 concentration, significant increases were found from 12 to 96 h in brain (156, 218, 141, 216 and 219%) as well as muscle (111, 289, 234, 317 and 401%); and from 12 to 48 h in blood (67, 30 and 50%), liver (41, 49 and 30%) and gill (34, 75 and 26%). At the C1 concentration, significant increases occurred from 12 to 24 h in blood (28 and 24%) and liver (30 and 31%); from 24 to 48 h in gill (75 and 26%); from 24 to 96 h in brain (94, 212, 214 and 165%); and from 48 h to 96 h in muscle (90, 132 and 180%).

#### 3.6. SOD activity

Results of SOD activity are shown in Fig. 4. Significant increases relative to the control group ( $p < .05$ ) were observed at the C3 concentration from 24 to 72 h in blood (250, 90 and 37%); from 12 to 72 h in liver (194, 337, 310, 108 and 154%); from 12 to 48 h in gill (36, 55 and 50%) as well as brain (136, 114 and 73%); and from 12 to 96 h in muscle (309, 484, 505, 573 and 526%). At the C2 concentration, significant increases occurred from 12 to 72 h in blood (42, 169, 38 and 71%), liver (184, 302, 320 and 145%) and gill (52, 55, 38 and 44%); from 12 to 48 h in brain (68, 80 and 95%); and from 12 to 96 h in muscle (309, 484, 505, 537 and 526%). At the C1 concentration, significant increases were found from 12 to 48 h in blood (79, 147 and 118%); from 12 to 72 h in liver (95, 253, 357 and 232%); from 12 to 24 h in gill (57 and 31%); from 24 to 72 h in brain (51, 185 and 241%); and from 12 to 96 h in muscle (114, 159, 160, 1154 and 837%).

#### 3.7. CAT activity

Fig. 5 shows the results of CAT antioxidant activity. Significant increases relative to the control group ( $p < .05$ ) occurred at the C3 concentration from 12 to 96 h in blood (199, 393, 481, 278 and 11%) as well as in liver, with even higher increases (404, 614, 738, 1144 and 446%), and also in gill (81, 92, 228, 343 and 109%), brain (264, 303, 675, 557 and 569%) and muscle (69, 279, 204, 122 and 119%). At the C2 concentration, significant increases were observed from 12 to 72 h in blood (154, 196, 253 and 40%) and liver (181, 259, 345 and 127%); from 24 to 72 h in gill (56, 135 and 319%); from 12 to 96 h in brain (248, 237, 147, 348 and 472%); and from 24 to 72 h in muscle (177, 78 and 84%). At the C1 concentration, significant increases occurred from 24 to 72 h in blood (27, 24 and 26%); from 24 to 48 h in liver (83 and 100%); from 24 to 72 h in gill (49, 74 and 100%); from 24 to 96 h in brain (116, 83, 197 and 347%); and from 24 to 48 h in muscle (35 and 45%).

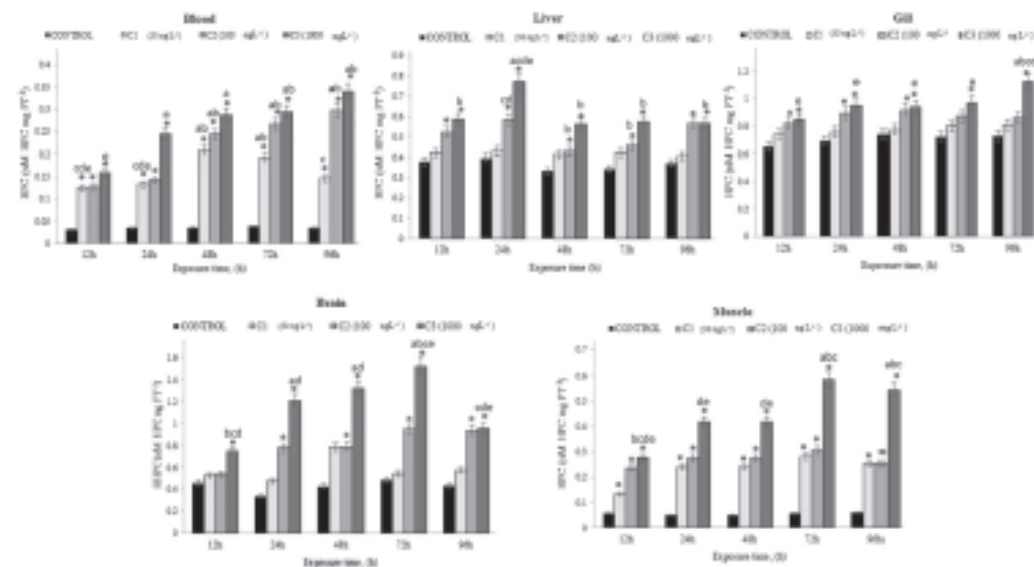
#### 3.8. Pearson's correlation analysis

Table 2 shows the correlations found between oxidative stress biomarkers, exposure times and GLB bioconcentration in organs. Values in bold indicate a closer correlation between analyzed variables.

Table 3 shows the bioconcentration values obtained from the ratio of the GLB concentration of each tissue between the concentration in water.

**Table 1**  
Glibenclamide concentrations in exposure system water and evaluated organs.

Test concentration	Exposure time (h)	Water	Blood	Liver	GI	Brain	Muscle
50 ng L <sup>-1</sup> (C1)	12	38 ± 1.2	3.6 ± 0.8	2.8 ± 0.6	1.6 ± 0.4	0.9 ± 0.1	2.6 ± 0.5
	24	35 ± 1.3	3.8 ± 0.7	3.0 ± 0.7	2.1 ± 0.6	1.0 ± 0.2	2.8 ± 0.4
	48	31 ± 1.8	4.0 ± 0.8	3.2 ± 0.6	2.4 ± 0.7	1.4 ± 0.3	3.2 ± 0.6
	72	27 ± 1.1	4.8 ± 0.6	3.5 ± 0.8	2.8 ± 0.6	1.7 ± 0.6	3.5 ± 0.7
	96	20 ± 1.5	5.0 ± 0.7	3.8 ± 0.6	3.2 ± 0.5	2.1 ± 0.7	3.8 ± 0.6
100 ng L <sup>-1</sup> (C2)	12	75 ± 1.8	5.2 ± 1.1	4.1 ± 1.1	3.8 ± 0.8	2.6 ± 0.7	4.2 ± 0.8
	24	70 ± 2.1	5.7 ± 1.3	4.4 ± 0.9	4.1 ± 0.9	3.2 ± 0.6	4.6 ± 0.7
	48	66 ± 1.3	6.2 ± 0.9	4.9 ± 0.8	4.5 ± 0.8	3.8 ± 0.9	4.8 ± 0.8
	72	52 ± 1.6	6.8 ± 1.2	5.3 ± 1.2	5.1 ± 0.9	4.1 ± 1.1	5.2 ± 0.9
	96	49 ± 2.1	7.1 ± 0.9	6.1 ± 1.0	5.8 ± 1.0	4.6 ± 0.9	6.1 ± 1.1
1000 ng L <sup>-1</sup> (C3)	12	770 ± 3.8	45 ± 1.1	32 ± 2.1	26 ± 1.2	19 ± 1.1	39 ± 0.9
	24	620 ± 2.8	53 ± 2.3	37 ± 1.3	32 ± 1.0	23 ± 1.6	38 ± 1.1
	48	536 ± 3.1	59 ± 1.8	41 ± 1.6	36 ± 1.3	29 ± 2.1	38 ± 1.4
	72	447 ± 1.8	64 ± 1.7	47 ± 1.9	44 ± 1.6	31 ± 1.7	41 ± 1.0
	96	362 ± 2.1	69 ± 1.7	51 ± 1.5	47 ± 2.1	39 ± 1.8	47 ± 0.9



**Fig. 1.** Hypoglycemic content (HPC) in blood, liver, GI, brain and muscle of *C. carpio* exposed to three different concentrations of glibenclamide (C1, C2 and C3) for 12, 24, 48, 72 and 96 h. Values are the mean of three replicates ± SE. GFP = glucose hypoglycemic. Significant differences relative to \* control group; \* 12h; \* 24; \* 48 h; \* 72 h; \* 96h; ANOVA and Bonferroni ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

The present study is relevant and innovative due to the fact that the hypoglycemic agent GLB is widely used around the world and is released into the environment through municipal, hospital and industrial discharges. While the scientific literature includes studies on the occurrence of this pharmaceutical in the environment, there are very few studies regarding its toxicity. Existing ones have been conducted only on certain fish species as well as the crustacean *Daphnia magna*, and are aimed at determining the acute toxicity of this compound through  $LC_{50}$  determination. Therefore, the toxic effects induced by GLB on other fish species of commercial interest, such as *C. carpio*, need to be characterized using biomarkers that provide information on how this compound damages biomolecules such as proteins, lipids and nucleic acids. Results

obtained in the present study determine that GLB is toxic. Although its  $LC_{50}$  values are high in comparison to other emerging contaminants, our study proves that concentrations of  $ng L^{-1}$  can induce lipid and protein oxidation as well as oxidative stress.

The  $LC_{50}$  of GLB was determined to be  $>500 mg L^{-1}$  ( $505.96$ – $512.95 mg L^{-1}$ ) in our study. The pertinent OECD document on testing and assessment (OECD, 2001) ranks substances with an  $LC_{50} > 100 mg/L$  as category IV, which implies that GLB is not toxic to *C. carpio*.

Comparison of the  $LC_{50}$  of GLB in *C. carpio* and other species reveals that the common carp is a more resistant species. The safety data sheet issued in accordance with (EC) Regulation No. 1907/2006 as amended by (EC) No. 1272/2008 of the European Commission (06, 2013) states that the  $LC_{50}$  of GLB in *D. magna* and in fish is  $> 100 mg L^{-1}$ . Also, Cunningham et al. (2006) reported low GLB-

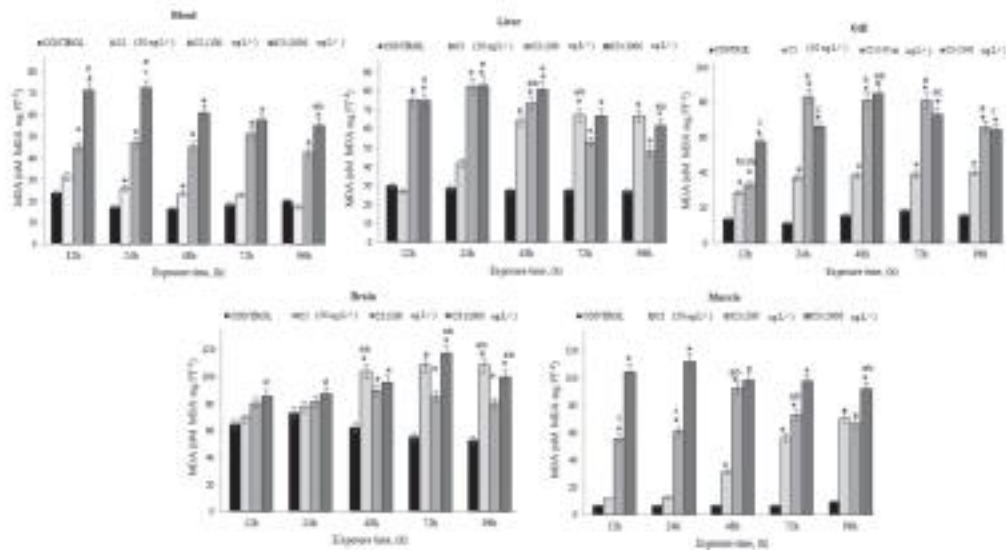


Fig. 2. Lipid peroxidation (MDA) in blood, liver, gill, brain and muscle of *C. carpio* exposed to three different concentrations of glibenclamide (C1, C2 and C3) for 12, 24, 48, 72 and 96 h. Values are the mean of three replicates  $\pm$  SE. MDA = malondialdehyde. Significant differences relative to: \* control group; <sup>a</sup> 12h; <sup>b</sup> 24h; <sup>c</sup> 48h; <sup>d</sup> 72h; <sup>e</sup> 96 h; ANOVA and Bonferroni ( $p < 0.05$ ).

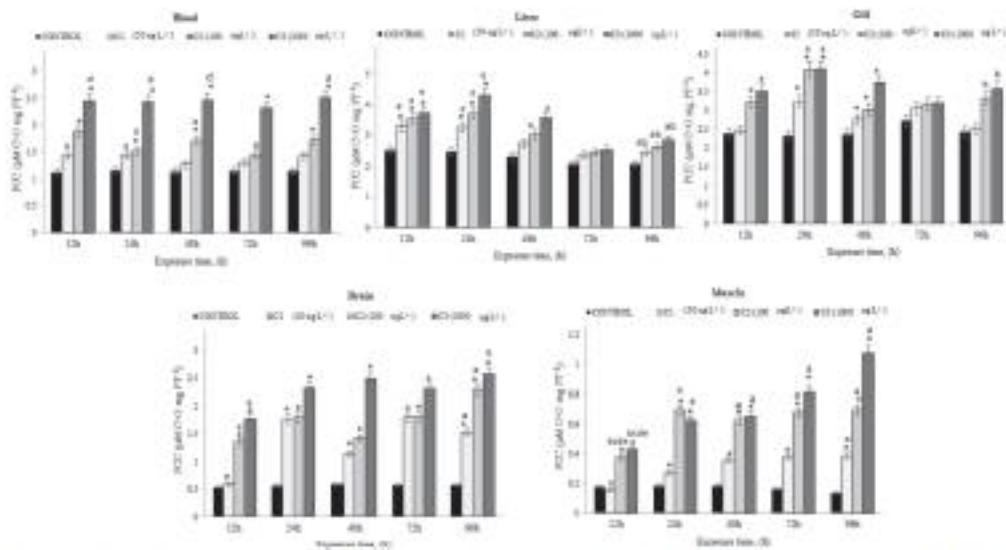


Fig. 3. Protein carbonyl content (PCC) in blood, liver, gill, brain and muscle of *C. carpio* exposed to three different concentrations of glibenclamide (C1, C2 and C3) for 12, 24, 48, 72 and 96 h. Values are the mean of three replicates  $\pm$  SE. Significant differences relative to: \* control group; <sup>a</sup> 12h; <sup>b</sup> 24h; <sup>c</sup> 48h; <sup>d</sup> 72h; <sup>e</sup> 96 h; ANOVA and Bonferroni ( $p < 0.05$ ).

induced toxicity; they found median effective concentration ( $EC_{50}$ ) values  $> 100 \text{ mg L}^{-1}$  in diverse species including daphnids, algae and fish. Fish mortality in the present study may be due to the

fact that excess GLB induces a hypoglycemic state in fish, altering ion homeostasis. The latter process induces cell membrane depolarization and massive release of brain neurotransmitters in carp.



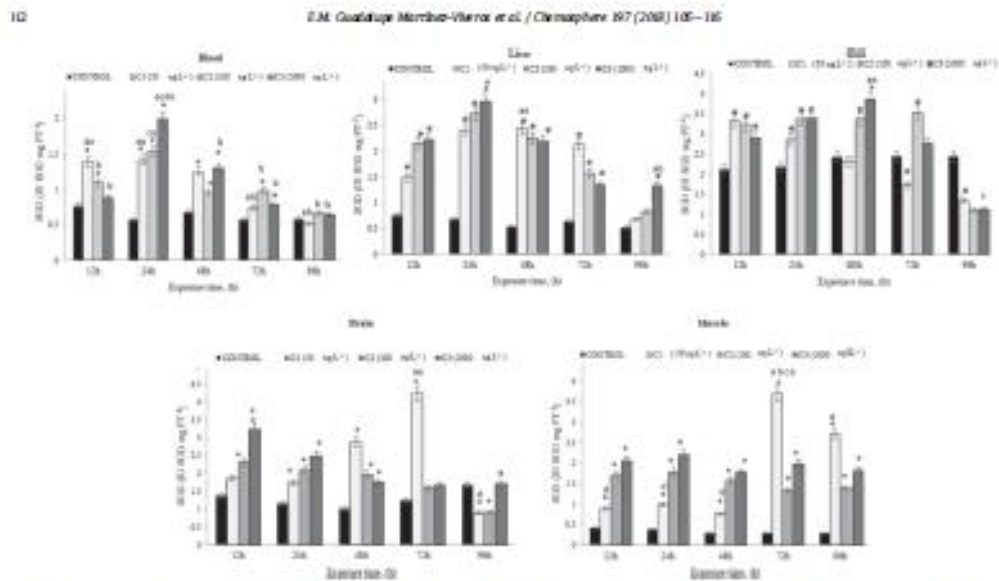


Fig. 4. Superoxide dismutase (SOD) activity in blood, liver, gill, brain and muscle of *C. carpio* exposed to three different concentrations of glibenclamide (C1, C2 and C3) for 12, 24, 48, 72 and 96 h. Values are the mean of three replicates  $\pm$  SE. Significant difference relative to: \* control group; <sup>a</sup> 12h; <sup>b</sup> 24h; <sup>c</sup> 48h; <sup>d</sup> 72h; <sup>e</sup> 96h; ANOVA and Bonferroni ( $p < 0.05$ ).

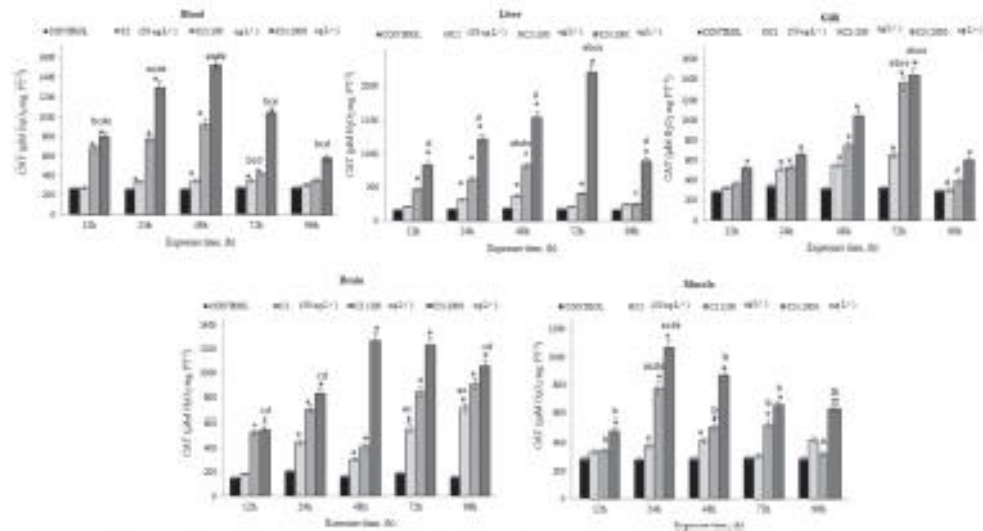


Fig. 5. Catalase (CAT) activity in blood, liver, gill, brain and muscle of *C. carpio* exposed to three different concentrations of glibenclamide (C1, C2 and C3) for 12, 24, 48, 72 and 96 h. Values are the mean of three replicates  $\pm$  SE. Significant difference relative to: \* control group; <sup>a</sup> 12h; <sup>b</sup> 24h; <sup>c</sup> 48h; <sup>d</sup> 72h; <sup>e</sup> 96h; ANOVA and Bonferroni ( $p < 0.05$ ).

including glutamate (Eneclinska and Silver, 1980; Siesjo, 1988). Glutamate accumulation leads to an increase in mitochondrial calcium levels and ROS (Choi, 1997; Coyle and Puttfarcken, 1993) which induces oxidative stress. This contributes to occurrence of

cerebral ischemia and hypoxia which inhibit the electron transport chain with loss of mitochondrial membrane potential and subsequent inhibition of ATP synthesis (Siesjo et al., 1995). The latter series of events may have contributed to fish mortality in our study.

**Table 2**  
Pearson's correlation analysis of glibenclamide concentration in evaluated organs and oxidative stress biomarker results.

Biomarker	Organ	Time (h)	Concentration			Biomarker	Organ	Time (h)	Concentration				
			50ng L <sup>-1</sup>	100ng L <sup>-1</sup>	1000ng L <sup>-1</sup>				50 ng L <sup>-1</sup>	100 ng L <sup>-1</sup>	1000 ng L <sup>-1</sup>		
<b>OXIDATIVE DAMAGE</b>													
HPX	BLOOD	12	0.801	-0.295	0.999	LFX	BLOOD	12	-0.596	0.462	0.644		
		24	0.347	-0.264	0.333			24	-0.992	0.992	0.928		
		48	-0.985	-0.740	0.788			48	-0.289	-0.891	-0.123		
		72	0.109	-0.683	-0.687			72	-0.730	0.794	-0.821		
		96	0.645	0.235	-0.980			96	0.099	0.090	0.127		
		LIVER	12	-0.774	-0.990			0.998	LMSR	12	0.165	-0.854	-0.554
			24	0.793	0.226			0.914		24	0.987	0.333	-0.059
			48	-0.148	-0.860			0.887		48	0.961	-0.421	-0.925
			72	0.032	0.510			0.573		72	-0.218	-0.319	-0.725
			96	-0.985	-0.659			0.991		96	0.592	0.618	-0.823
			GILL	12	0.196			-0.371		-0.678	GILL	12	-0.192
		24		0.837	-0.779			0.994	24	-0.268		0.832	0.970
	48	0.003		-0.763	-0.420	48	0.844	-0.279	-0.815				
	72	0.908		-0.723	0.994	72	-0.467	0.883	-0.867				
	96	-0.999		0.022	-0.887	96	0.534	-0.358	-0.998				
	BRAIN	12		0.998	0.847	0.989	BRAIN	12	-0.996	0.043		-0.539	
		24	0.096	-0.742	0.472	24		0.924	-0.364	-0.466			
		48	-0.130	0.189	0.578	48		-0.827	-0.613	-0.551			
		72	-0.997	0.718	-0.157	72		0.562	0.769	-0.347			
		96	0.225	0.616	0.287	96		-0.746	0.968	-0.999			
		MUSCLE	12	0.965	0.135	-0.998		MUSCLE	12	0.435	-0.429	0.200	
	24		0.765	0.092	-0.267	24	0.981		0.391	-0.984			
	48		-0.822	0.778	-0.165	48	-0.338		0.512	-0.996			
	72		0.439	-0.464	0.981	72	0.829		-0.928	0.931			
96	-0.717		0.690	0.314	96	-0.990	-0.640		0.661				
<b>PC</b>													
PC	BLOOD	12	-0.323	-0.996	-0.459	CAT	BLOOD	12	-0.402	0.348	0.772		
		24	-0.951	0.583	0.214			24	-0.102	-0.544	-0.263		
		48	0.811	0.991	0.896			48	-0.223	0.993	0.992		
		72	0.120	0.928	-0.248			72	0.528	0.821	-0.974		
		96	0.973	-0.122	0.093			96	0.348	0.433	0.032		
		LIVER	12	-0.693	-0.254			0.998	LMSR	12	-0.990	0.794	-0.771
			24	-0.410	0.195			-0.987		24	0.998	-0.779	-0.997
			48	0.735	0.857			-0.360		48	-0.998	-0.940	0.566
			72	0.890	-0.137			0.879		72	0.125	0.044	0.295
			96	-0.813	-0.983			-0.979		96	0.982	-1.000	-0.089
			GILL	12	0.327			0.108		0.675	GILL	12	0.529
		24		-0.642	-0.999			0.778	24	0.526		0.173	-0.906
	48	0.769		0.273	-0.936	48	0.706	-0.998	0.801				
	72	-0.004		-0.660	-0.200	72	0.495	-0.089	0.999				
	96	-0.580		-0.994	0.925	96	0.690	-0.253	0.990				
	BRAIN	12		0.781	0.215	0.913	BRAIN	12	0.976	0.766		0.968	
		24	-0.961	-0.982	-0.585	24		0.725	-0.987	0.731			
		48	0.778	-0.746	-0.813	48		0.700	-0.773	0.915			
		72	0.917	-0.732	-0.959	72		0.495	-0.890	-0.397			
		96	0.196	0.160	-0.083	96		-0.898	0.011	-0.259			
		MUSCLE	12	-0.883	-0.637	0.993							
	24		0.733	0.951	0.828								
	48		0.945	0.658	0.619								
	72		0.217	0.644	0.986								
96	-0.320		-0.796	-0.959									
<b>ANTIOXIDANT ACTIVITY</b>													
<b>SOD</b>													
<b>ANTIOXIDANT ACTIVITY</b>													
<b>SOD</b>													

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Biomarkers	Organ	Time (h)	Concentration			Biomarkers	Organ	Time (h)	Concentration		
			50 ng L <sup>-1</sup>	100 ng L <sup>-1</sup>	1000 ng L <sup>-1</sup>				50 ng L <sup>-1</sup>	100 ng L <sup>-1</sup>	1000 ng L <sup>-1</sup>
	MUSCLE	12	<b>1.000</b>	<b>0.252</b>	<b>-0.404</b>	MUSCLE	12	<b>0.888</b>	<b>-0.435</b>	<b>-0.966</b>	
		24	<b>-0.975</b>	<b>-0.783</b>	<b>-0.897</b>		24	<b>-0.933</b>	<b>-0.882</b>	<b>0.744</b>	
		48	<b>-0.638</b>	<b>0.261</b>	<b>-1.000</b>		48	<b>-0.958</b>	<b>0.613</b>	<b>-1.000</b>	
		72	<b>-0.767</b>	<b>0.261</b>	<b>0.780</b>		72	<b>-0.526</b>	<b>-0.380</b>	<b>-0.324</b>	
		96	<b>-0.967</b>	<b>-0.106</b>	<b>-0.003</b>		96	<b>-0.966</b>	<b>0.246</b>	<b>0.497</b>	

Correlation coefficient > 0.5 are significant (shown in bold).

Table 3  
Bioaccumulation factors estimated.

Test concentration	Exposure time (h)	Blood	Liver	Gill	Brain	Muscle
50 ng L <sup>-1</sup> (C1)	12	0.09	0.07	0.06	0.02	0.07
	24	0.11	0.09	0.06	0.03	0.08
	48	0.13	0.10	0.08	0.05	0.10
	72	0.18	0.13	0.10	0.06	0.13
	96	0.25	0.19	0.16	0.11	0.19
100 ng L <sup>-1</sup> (C2)	12	0.07	0.05	0.05	0.03	0.06
	24	0.08	0.06	0.06	0.05	0.07
	48	0.09	0.07	0.07	0.06	0.07
	72	0.13	0.10	0.10	0.08	0.10
	96	0.14	0.12	0.12	0.12	0.12
1000 ng L <sup>-1</sup> (C3)	12	0.06	0.04	0.04	0.02	0.04
	24	0.09	0.06	0.06	0.04	0.05
	48	0.11	0.07	0.07	0.05	0.07
	72	0.14	0.11	0.10	0.07	0.09
	96	0.18	0.13	0.12	0.10	0.12

The results of biomarkers of oxidative damage show increases in HPC and TBARS (Figs 1 and 2) in all organs evaluated at all three test concentrations which are in the main significant. HPC increases in blood, gill and muscle were concentration dependent, while TBARS had a tendency to increase significantly at the highest (C3) concentration. The greatest increase in both biomarkers occurred in brain. Diverse factors are known to favor a high susceptibility of the central nervous system to oxidative stress: (1) brain tissue undergoes high oxidative phosphorylation and uses large amounts of oxygen; (2) it is also rich in polyunsaturated fatty acids that can be a substrate of lipid peroxidation; and (3) certain brain regions contain high concentrations of free iron which facilitate free radical formation (Olanow, 1993). Our results are similar to the findings of Tüzün et al. (1999), who reported significant increases in MDA levels in brain, liver and kidney of male albino rat neonates. HPC and MDA increases may be explained by the mechanism of action of GLB: in binding to its biological receptor in the cell membrane, this sulfonurea elicits closing of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump potassium channels which reduces the efflux of potassium, inducing cell membrane depolarization, inhibition of ATP synthesis and increased intracellular calcium (Eliason et al., 1996). This has been associated with higher levels of extracellular glutamate (Ferland-Drake et al., 1999) and activation of a great variety of calcium-dependent enzymes, the most important of these being proteases, lipases and endonucleases which damage the cytoskeleton, cell membrane, and nucleic acids respectively in the brain (Orrenius et al., 1989). Similarly, increased intracellular calcium has been correlated with free radical formation through activation of phospholipase A2 and nitric oxide synthase (NOS) (Lafon-Cazal et al., 1998). Increases in HPC and MDA can also be explained by the phase I biotransformation of GLB mediated by the CYP450 system which can generate free radicals such as hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide. These ROS are highly reactive and can directly attack membrane lipids. The subfamily CYP2 is especially responsible for GLB biotransformation, in particular CYP2C9 (Ranco et al., 2005; Zaiger

et al., 2008). Diverse CYP gene families have been characterized in fish such as *C. carpio*, among others, CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP11, CYP17 and CYP19 (Stegeman and Livingstone, 1998; Bonello et al., 2005). This suggests that the phase I biotransformation of GLB to 3- and 4-hydroxy-GLB may be similar to the process in mammals, yielding ROS that induce increases in these biomarkers in the organs evaluated. The gills are the first fish organs that enter in direct contact with the environment; they are also the site of acid-base regulation and the exchange of ions such as oxygen, and are able to biotransform xenobiotics (Monteiro et al., 2005). Similarly, the liver is the primary organ responsible for the biotransformation of xenobiotics such as GLB (Groop et al., 1991). Thus, since oxidative biotransformation of GLB occurs in these organs, this may explain the ROS increases and subsequent HPC and LPX increases recorded in gill and liver in our study.

Antioxidant enzyme results show increases in SOD activity (Fig. 4) at all test concentrations and exposure times in blood, liver and muscle. The same behavior was observed in gill and brain up to 72 h. As regards CAT activity (Fig. 5), increases were found at all concentrations and exposure times in all organs evaluated, but particularly in brain where this effect was concentration dependent. These results are consistent with those of Elmali et al. (2004) and Tüzün et al. (1999), who found increased SOD and CAT activity due to GLB exposure in male albino rat and male albino rat neonates respectively. The antioxidant defense system is mediated by SOD and CAT which act by scavenging ROS and converting them into less reactive and less toxic compounds. SOD is the first enzyme involved in this process and the one responsible for dismutation of the superoxide anion radical to form hydrogen peroxide (van der Oost et al., 2008). Subsequently, CAT acts on this substrate, yielding H<sub>2</sub>O and O<sub>2</sub> (Vendemiata et al., 1999). Increases in SOD and CAT in the present study can be explained by the biotransformation of GLB and the mechanism of action of this compound which, as stated previously, induce formation of free radicals such as superoxide and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that are substrates of SOD and CAT respectively. On the other hand, the results found are similar to other pharmaceuticals previously reported, such as diclofenac (Islas-Flores et al., 2013) and ibuprofen (Islas-Flores et al., 2017).

GLB concentrations in the organs evaluated at the various exposure times indicate that the biomarkers in which GLB uptake was highest were blood, liver and muscle, while the organs of lowest uptake were gill and brain. The physicochemical properties of GLB make this compound poorly soluble in water (approximately 38 µmol/L at 37 °C) and with low oral bioavailability (Censi et al., 2016), which is confirmed in Tables 1 and 3 by its low bioconcentration values in the different organs. However, these low levels of GLB uptake induced oxidative stress at the various exposure times in a statistically significant manner. In the other hand, all biomarkers used were found to be correlated with the various test concentrations, suggesting the presence of oxidative stress in the organs evaluated (Table 2).

To summarize and based on our findings, GLB is suggested to induce oxidative stress in *C. carpio* through the following mechanism (Fig. 6): GLB binds to its biological receptor in the cell



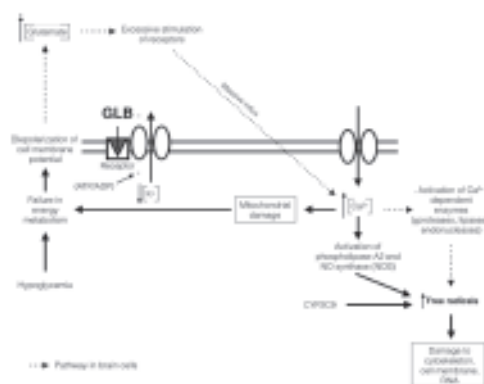


Fig. 6. Proposed mechanism of oxidative stress induction in *Cyprinus carpio*.

membrane. As a consequence, closing of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pump-dependent potassium channels takes place and potassium efflux is reduced, leading to cell membrane depolarization. This depolarization may lead, on the one hand, to increased intracellular calcium which activates phospholipase A2 and NOS to form free radicals, and on the other may induce, in the brain specifically, the release of neurotransmitters such as glutamate which, when accumulated, also favors increased intracellular calcium, activating calcium-dependent enzymes such as proteases, lipases and endonucleases that can in turn release free radicals. A further way in which free radicals are released is through the phase I biotransformation of GLB mediated by the CYP450 system which can originate free radical formation. Finally, these free radicals can damage the cytoskeleton, cell membrane and DNA. Oxidative stress was induced from the lowest concentrations ( $50$  and  $100 \text{ ng L}^{-1}$ ) which are environmentally relevant, as the presence of GLB in water bodies could represent a risk for the species that are in contact with this.

### 5. Conclusions

*C. carpio* bioconcentrates GLB from 12 h of exposure onward, and the organs in which this compound bioconcentrates most are blood, liver and muscle. GLB induced increases in HPC, LPK and PCC as well as SOD and CAT antioxidant activity in all organs evaluated. While the brain was one of the organs with lower GLB bioconcentration, significant increases were nevertheless observed in biomarkers of oxidative damage. The biomarkers of exposure and effect employed in the study are reliable for use in evaluating the impact of the sulfonylurea GLB in fish of commercial interest such as *C. carpio*.

### References

Agular-Bryan, L., Nichol, C.G., Webster, S.W., Grewer, J.R., 1996. Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268, 423–426. <https://doi.org/10.1126/science.7740547>

Balcells, M., García-Paterson, A., Solà, I., Roqui, M., Gilch, I., Corcoy, R., 2015. Glibenclamide, metformin, and insulin for the treatment of gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ* 350, h102. <https://doi.org/10.1136/bmj.h102>, 2015.

Barceló, D., Gros, M., Petrović, M., 2009. Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Anal. Chem.* 81, 898–910. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja90055a>.

Blanco, C., Martínez, C., García-Martín, E., Aguilón, J.A., 2005. Cytochrome P450 gene polymorphisms and variability in response to NSAIDs. *Clin. Res. Regul. Aff.* 22, 57–61. <https://doi.org/10.1080/1060330050024529>.

Bonillo, A.V., Benitez, J.L., Jorge, A., 2005. *Colih de México. Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, second ed. Centro de Ecología, Investigación y Oceanografía del Golfo de México, Universidad Autónoma de Campeche, México, p. 695.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing a principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2698\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2698(76)90527-3).

Blage, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310. [https://doi.org/10.1016/0076-6875\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/0076-6875(78)52032-6).

Burham, P.C., 2007. Modified protein carbonyl assay detects oxidized membrane proteins: a new tool for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 56, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.yjtox.2006.02.005>.

Castro, C., Bergeron, K., Stumpe, T., Broekhart, M.A., Benjamin, D.K., Justen-Rau, M., 2014. Trends in glyburide compared with insulin use for gestational diabetes treatment in the United States, 2009–2011. *Obstet. Gynecol.* 124(123), 1177–1184.

Costi, R., Cigliclihan, M.R., Dibbini, A., Maki, L., Di Martino, P., 2016. New nanometric solid dispersions of glibenclamide in Neudlin® UFI2. *AAPS PharmSciTech* 17(5). <https://doi.org/10.1007/s12249-015-0457-z>, 2014–1212.

Choi, D.W., 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 7, 369–379.

Coyte, J.T., Ruzlandov, P., 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262, 689–695.

Cunningham, V.L., Busby, M., Hutchinson, T., Macrone, F., Parle, N., Roden, N., 2006. Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: next steps. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3403–3402. <https://doi.org/10.1021/es060307a>.

Dalla-Dona, I., Rossi, R., Guarini, D., Mizzari, A., Colombo, R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta* 329, 23–26. [https://doi.org/10.1016/S0009-8961\(03\)00010-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8961(03)00010-2).

Demery, P.A., 2007. Effects of oxidative stress on embryonic development. *Birth Defects Res. Clin. Embryo Today* 81, 155–162.

Hansson, L., Rosmond, E., Arvola, C., Berggren, P.O., Bertello, A.M., Bolinder, K., Chubb, A., Dewey, J.T., Hart, R.R., Gohel, J., Grenada, J., Larson, G., Lindrom, R., Rhoads, C.J., Roman, P., 1996. ACE-dependent stimulation of myocytes by endothelin-1 in pancreatic  $\beta$ -cells. *Science* 271, 810–815.

Hernández-Vázquez, A., Galán-Martínez, M., Dabán-García, G., Gómez-Oliván, L.M., Rodríguez-Hora, J., Camacho-Pérez, C., 2016. Effect of amoxicillin exposure on brain, gill, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio*: the role of amoxicillin acid. *Environ. Toxicol.* 31(4), 1102–1120. <https://doi.org/10.1002/etc.2230>.

Imail, E., Altan, N., Bakan, N., 2004. Effect of the sulphonylurea glibenclamide on liver and kidney antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat. *Drug Res* 4, 203–208. <https://doi.org/10.2165/00020020-200404040-00003>.

Isidoro, M., Sibers, L.A., 1989. ATP and brain function. *J. Cerebr. Blood Flow Metabol.* 9, 2–19.

Reznick-Zacks, M., Friberg, H., Winkler, T., 1999. Mitochondrial permeability transition induced DNA fragmentation in the rat hippocampus following hypoglycemia. *Neuroscience* 90, 1325–1330.

González, A., Jilic, A., Petrović, M., de Aída, M.L., Barceló, D., 2012. New indexes for compound prioritization and complexity quantification in an environmental monitoring inventory. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 958–970. <https://doi.org/10.1007/s11256-011-0557-6>.

González, A., Pérez, S., Riut, D., Kuzmanovic, M., Barceló, D., 2015. Potential of emerging concern in rivers of Catalonia: occurrence, fate and risk. In: Minze, A., González, A., Prar, N. (Eds.), *Experiences from Surface Water Quality Monitoring: The Handbook of Environmental Chemistry*, vol. 42. Springer, Cham, pp. 283–320. <https://doi.org/10.1007/978-2015-240>.

Gómez-Oliván, L.M., Galán-Martínez, M., García-Molina, S., Valde-Alaric, M., Rodríguez-Hora, J., Nieto-Cruz, N., 2014. Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug Chem. Toxicol.* 37(4), 391–399. <https://doi.org/10.3109/08480545.2013.870198>.

Group, L.C., Barcelló, N., Rebeiter, K., Lutz, L., Mikander, A., De Franco, R., 1991. Dose-dependent effect of glibenclamide on insulin secretion and glucose uptake in man. *Diabetes Care* 14, 724–727.

Gros, M., Petrović, M., González, A., Barceló, D., 2010. Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environ. Int.* 36, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.09.002>.

Groesch, J.P., 2012. Cytochrome P450. In: Arzoozabacher, R., Zanger, U.M. (Eds.), *Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, pp. 27–66.

Huang, D.J., Zhang, Y.M., Song, C., Long, J., Liu, J.H., Ji, W.H., 2007. Contaminant-induced oxidative damage on the carp *Cyprinus carpio* collected from the upper Yellow River, China. *Environ. Monit. Assess.* 128, 483–488. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-9318-3>.

Barra-Castillo, 2004. Et el esquema de tratamiento un posible factor causal de asma conductivo en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2. *Rev. Invest. Clin.* 56(5), 817–818.

Barra-Castillo, E., García-Flores, R., Dávalos-Rodríguez, M., Saragoza-Bayot, A., Calzadillo-Flores, C., Cortés-Castellano, E.I., 2010. DNA damage analyzed by comet assay in Mexican patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 47(1),

## 10.2 Envío de segundo artículo:



eesserver@eesmail.elsevier.com en nombre  
de Food Chemistry  
Para [ermartinez2009@hotmail.com](mailto:ermartinez2009@hotmail.com)

jue., 21 de jun. 01:00 p. m.

[Track your recent Co-Authored submission to FOODCHEM](#) 

Dear Dr. Ericka María Martínez-Viveros,

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

Journal: Food Chemistry  
Title: Effect of glibenclamide on the physicochemical and textural properties of the muscle of common carp (*Cyprinus carpio*)  
Corresponding Author: Octavio Dublán-García  
Co-Authors: Ericka María G Martínez-Viveros, MsC.; Hariz Islas-Flores, PhD.; Marcela Galar-Martínez, PhD.; Leobardo M Gómez-Oliván, PhD.;

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: <https://ees.elsevier.com/foodchem/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Ericka María&lname=Martínez-Viveros&email=ermartinez2009@hotmail.com>

Or log in: <https://ees.elsevier.com/foodchem/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=ermartinez2009@hotmail.com>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at [octavio\\_dublan@yahoo.com.mx](mailto:octavio_dublan@yahoo.com.mx); [odublang@uaemex.mx](mailto:odublang@uaemex.mx).

1 **Effect of glibenclamide on the physicochemical and textural properties of the muscle**  
2 **of common carp (*Cyprinus carpio*)**

3 **Running title: Glibenclamide effect on the quality of the muscle of *Cyprinus carpio***

4 Ericka María Guadalupe Martínez-Viveros<sup>a,b</sup>, Hariz Islas-Flores<sup>b</sup>, Marcela Galar-Martínez<sup>c</sup>,

5 Leobardo Manuel Gómez-Oliván<sup>b\*\*</sup> Octavio Dublán-García<sup>a\*</sup>

6

7 <sup>a</sup>Laboratorio de Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México,  
8 Km. 15 Carr. Toluca-Ixtlahuaca. El Cerrillo Piedras Blancas, C. P. 50200 Toluca, México.

9 <sup>b</sup>Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del  
10 Estado de México. Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Col. Residencial Colón,  
11 50120 Toluca, Estado de México, México.

12 <sup>c</sup>Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias  
13 Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido  
14 Massieu Esq. Cda. Miguel Stampa s/n, Delegación Gustavo A. Madero. México, DF. México.  
15 C.P.07738.

16

17 \*Corresponding author: Tel: + 52 722 21965514, E-mail: octavio\_dublan@yahoo.com.mx

18 Corresponding Author's Address: Laboratorio de Alimentos, Facultad de Química, Universidad  
19 Autónoma del Estado de México, Km. 15 Carr. Toluca-Ixtlahuaca. El Cerrillo Piedras Blancas, C.  
20 P. 50200 Toluca, México.

21

22

23

24

25

26

27

28

29 **Abstract**

30 One of the most-prescribed hypoglycemic agents for the control of type 2 diabetes mellitus is  
31 glibenclamide (GLB), which, as a result of its high consumption, reaches different bodies of water  
32 through a diverse number of outlets, where species of commercial interest such as *Cyprinus carpio*, can  
33 be found; however, there are few studies on the effects of these pharmaceuticals over the quality of  
34 these species. The objective of this work was to evaluate the effects of GLB over the physicochemical  
35 and textural properties of the muscles of *Cyprinus carpio*, through determination of the degree of  
36 lipoperoxidation, content of carbonylated proteins, pH, solubility, water holding capacity, total  
37 sulfhydryls, texture profile analysis and electrophoretic profile, for two concentrations of GLB (50 and  
38 1000 ng/L) and exposure times of 0, 24, 48, 72 and 96 h. The results showed a significant decrease in  
39 the physicochemical and textural properties of the muscle.

40 **Key words:** *Cyprinus carpio*; glibenclamide; protein oxidation; physicochemical properties; textural  
41 properties

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

## 58 **1 Introduction**

59 The new lifestyles originated by globalization and worldwide economic and industrial growth have  
60 lead to a change in eating habits within society, in the forms of excessive consumption of foods  
61 with high energy content, abuse of sugary drinks, consumption of alcohol and tobacco, thus causing  
62 obesity, which leads to chronic degenerative illnesses associated to these excesses, such as Type II  
63 Diabetes Mellitus (DM2), high blood pressure, coronary cardiopathies and cancer (Moodie et al.  
64 2013). According to the last world report on Diabetes (WHO, 2016), the global prevalence of this  
65 illness has doubled from 1980 to 2014, passing from 4.7% to 8.5% with a figure of 422 billion  
66 people with diabetes within the adult population, for which one of the most-prescribed  
67 hypoglycemic agents for the control of DM2 is glibenclamide (GLB), which, due to its high  
68 production and consumption worldwide, has been reported to be present in different bodies of water  
69 after waste disposal from pharmaceutical companies is carried out, despite their use of conventional  
70 residue elimination treatments (Rebollo et al., 2011; Radjenovic et al., 2009) in concentrations that  
71 range from 0.6 ng/L to 16 µg/L, with its point of origin usually being hospital, city and industrial  
72 waste waters (Ginebreda et al., 2012; Radjenovic et al., 2007). The presence of these xenobiotic  
73 substances, in their potentially-active form (API), as well as their metabolites (3cis and 4 trans-  
74 hydroxyGLB) (Radjenovik, 2008) directly affect aquatic life, due to its increase in deposition in  
75 tissues, and since these are susceptible to oxidation, a greater deposition in cell membranes increase  
76 the susceptibility of the tissues to damage by the effects of peroxidation, as well as changes in  
77 membrane composition, which could contribute in generating alterations of some important  
78 physiological functions in aquatic organisms, such as osmoregulation (Livingstone, 2003) or lead to  
79 a weak immune response.

80 The oxidation of unsaturated lipids present in fish leads to the formation of unstable



81 hydroperoxides, which, once fragmented, release short-chain aldehydes such as malonaldehyde  
82 (MDA), ketones and fatty acids, as well as the development of some polymers, which are believed  
83 to contribute to the rancid taste of these (Lund et al., 2011; Estévez, 2011). Previous studies have  
84 demonstrated that GLB can generate an increase in the levels of malonaldehyde (MDA) and  
85 catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzyme activity in different tissues of male albino  
86 rat newborns exposed to GLB (Tüzün et al., 1999; Nazaroglu et al., 2009) and, as a consequence,  
87 could cause an alteration in the texture and structure of muscle tissues (Estévez, 2011), for which  
88 the presence of GLB in diverse bodies of water could have effects over aquatic species of  
89 worldwide economic importance, such as the common carp (*Cyprinus carpio*), whose  
90 characteristics are: having white meat, of pleasing taste and high nutritional value, and is found  
91 within the group of “semi-fatty fish”. It also possesses proteins of high biological value and high  
92 content of iron and phosphorous. Despite the fact that there are studies concerning the toxicity of  
93 emerging contaminants in aquatic species, there are few studies which correlate the changes  
94 produced by the oxidizing agents with the quality of the muscle tissues; thus, the objective of this  
95 research was to evaluate the effects induced by GLB over the degree of peroxidation (L-OX) and  
96 the oxidation of proteins (P-OX) of muscle and its relation with the physicochemical changes: water  
97 holding capacity (WHC), solubility (SOL), sulfhydryl group content (-SH) and functional changes:  
98 texture profile analysis (TPA) and effort required while cutting with a Warner-Bratzler blade (W-  
99 B), of the muscle of *Cyprinus carpio*, exposed to two concentrations of GLB of a relevant  
100 occurrence in distinct bodies of water (50 and 1000 ng/L).

## 101 **2 Methodology**

### 102 **2.1 Test substances**

103 Glibenclamide (CAS number 10236-21-8, >99% purity) was acquired from Sigma-Aldrich (Toluca,  
104 State of Mexico, Mexico). A concentrated 1 g GLB solution was prepared and a 0.02% solution of  
105 DMSO was also prepared to dissolve it in 1 L of distilled water in order to prepare the solutions of

106 GLB that were employed in this study (50 and 1000 ng/L).

107

108 **2.2 Collection and maintenance of the carp (*Cyprinus carpio*):** The carps were  
109 obtained from the Tiacaque aquatic center in the State of Mexico, in its “youth” stage (19.5  
110  $\pm 0.5$  cm long and  $145 \pm 0.5$  g of weight on average), and were transported to the  
111 laboratory, in properly-sealed polyethylene bags, with chlorine-less water and 85-90%  
112 oxygen. The fish were acclimated and fed during 15 days in a tank which contained  
113 chlorine-less water, under the following conditions: temperature ( $20 \pm 2^\circ$  C), oxygen  
114 concentration of 85-90%, pH of 7.0-8.0, total alkalinity of  $17.8 \pm 5.3$  mg/L and total water  
115 hardness of  $18.5 \pm 0.6$  mg/L, and were maintained in normal 12h/12h periods of  
116 light/darkness. During the 15-day period, three quarters of the total water volume were  
117 replaced each 24 hours in order to maintain a healthy environment.

118 The waters of the carp-breeding place were analyzed through atomic absorption in order to  
119 guarantee that the carps were not exposed to any contaminant. In the screening carried out, the  
120 presence of As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb and Zn were determined, and after the analysis, none of  
121 these substances were present in the breeding-place waters. It is worth mentioning that, because of  
122 its location, no sources of exposure to pharmaceuticals or other contaminants that could interfere  
123 with this experiment, existed.

124

### 125 **2.3 Exposure of the carp to GLB:**

126 For this analysis, two different concentrations of GLB (50 and 1000 ng/L) were employed, which  
127 were selected according to reported occurrences (Radjenovik et al., 2009; Verlicchi et al., 2012;  
128 Osorio et al., 2016). The exposure times were 0, 24, 48, 72 and 96 h. Five fish were exposed per  
129 system. Likewise, a solution free of GLB was prepared for each exposure time. Each system was

130 carried out in triplicate. In total, 300 fish were employed. The containers of each test system  
131 consisted in glass tanks with a 40-liter capacity each, in which the aforementioned concentrations  
132 of GLB were added. The systems were kept at room temperature with a 12h/12h natural  
133 photoperiod of light/darkness and constant, proportioned aeration, at an oxygen concentration  
134 between 80-90%. During the experiment, no food was provided to the fish. The experiment was  
135 static, with no replenishment of the medium, according to guide 203 of the Organization for  
136 Cooperation and Economic Development (OECD, 1992), to evaluate the acute effects in fish  
137 exposed to chemical substances.

138 At the end of each exposure time, each fish was anesthetized and sacrificed in order to extract the  
139 muscle samples. The muscle samples for each one of the systems was divided into two batches.  
140 The first batch of each system was homogenized in phosphate buffer solution (pH 7.4) and was  
141 centrifuged at 12,500 rpm at -4 °C during 15 minutes. The supernatant was used in order to  
142 evaluate the degree of L-OX through the malonaldehyde content analysis (MDA) and the  
143 precipitate was employed in order to evaluate the P-OX through the carbonylated protein content  
144 analysis (PCC). The second batch of muscle was used in order to evaluate physicochemical  
145 properties such as pH, SOL, WHC, -SH, TPA and W-B.

146

147

#### 148 **2.4 Analysis of MDA**

149 This analysis is based on the colorimetric determination of MDA, employing 2-thiobarbituric acid  
150 (TBARS) in order to be able to estimate the degradation of lipids contained in foods and  
151 biological systems (Büege and Aust, 1978). Fifty microliters of supernatant were mixed with 450  
152 µL of 150 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4). Next, 1 mL of TCA-TBA reagent (0.375% thiobarbituric  
153 acid in 15% trichloroacetic acid), was added. The solution was stirred with a vortex for 1 min and  
154 the samples prepared were maintained in a boiling water bath for 15 min. Immediately after, they

155 were cooled to  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 3 min and were incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 minutes. Finally, the samples  
156 were centrifuged at 3500 rpm for 10 min and an absorbance determination of the samples was  
157 carried out at a wavelength of 535 nm, using a blank with the same treatment as the samples, The  
158 results were expressed in nanomoles of malonaldehyde (nM of MDA) per mg of protein. The  
159 concentration of MDA in the samples was calculated using a extinction coefficient (CEM) of  $1.56$   
160  $\times 10^5\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

## 161 **2.5 Determination of PCC**

162 This analysis was carried out according to the method described by Levine et al. (1994), modified  
163 by Burcham (2007). Two hundred microliters of supernatant and  $150\text{ }\mu\text{L}$  of dinitrophenylhydrazine  
164 ( $10\text{ mM}$ , dissolved in  $2\text{M HCl}$ ) were mixed. This sample was incubated and protected from the light  
165 at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 60 min. Next,  $500\text{ }\mu\text{L}$  of 20% trichloroacetic acid were added and the sample was  
166 centrifuged for 5 min at 11000 rpm. The resulting precipitate was collected and rinsed 4-5 times  
167 with a 1:1 solution of ethyl acetate-ethanol. Once the rinsing had been done, the button obtained  
168 was dissolved in 1 mL of guanidine solution ( $6\text{M}$ , pH 2.3) and incubated at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 30 min.  
169 Finally, the absorbance of the resulting sample was determined at a wavelength of 366 nm. The  
170 results were expressed in nM of reactive carbonyls ( $\text{C}=\text{O}$ )/mg of proteins in wet tissue, using the  
171 CEM with a value of  $21000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

172

173 **2.6 Determination of -SH:** The determination was carried out according to the Ellman method  
174 (1959), reported by Morachis-Valdez et al. (2017): one milliliter of CP (with  $5\text{ mg/mL}$  of protein)  
175 and 9 mL of 8 M urea dissolved in a Tris-Glicine-EDTA buffer ( $10.4\text{ g/L}$  Tris;  $6.9\text{ g/L}$  glicine;  $1.2$   
176  $\text{g/L}$  EDTA, pH 8.0). It was left to rest at room temperature for 30 min. Afterwards, to 3 mL of the  
177 sample, 50 mL of the 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic ( $4\text{ mg/mL}$  in the same buffer solution), was  
178 added and left to rest for 30 min in darkness. The absorbance was measured at a wavelength of 412  
179 nm. The final concentration of -SH was expressed as  $\mu\text{M SH/mg}$  of protein.

1802.7 **pH measurement:** This analysis was carried out according to the AOAC 981.12/2002

181 method. The muscle was weighed and homogenized with distilled water in a 1:10  
182 proportion. The temperature of the solution was adjusted to  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.3\text{ }^{\circ}\text{C}$  and was filtered.  
183 The pH measurement was carried out with a digital potentiometer (Hanna instrument pH  
184 210, Ukraine), which was previously calibrated.

185

186

187 **2.8 WHC analysis:** In agreement with the Honikel and Hamm method, adapted by Dublán et al.  
188 (2006),  $10 \pm 0.5$  g of muscle were weighed and finely cut. Next, 5 g of this sample were taken and  
189 placed in a centrifuge tube, to which 8 mL of a 0.6 M NaCl solution were added. This mixture was  
190 stirred with a glass rod for 1 min in an ice bath and left to rest for 30 min. Once the time had  
191 transpired, the sample was again stirred with a glass rod for 1 min and was centrifuged for 15 min at  
192 3500 rpm. The supernatant was decanted and the volume was measured. The results were reported  
193 as volume of NaCl retained per 100 g of sample.

194

195 **2.9 Concentration of protein:** For this determination, the biuret method was employed, as reported  
196 by Zhou & Regenstein (2006). One milliliter of solution and 3 mL of biuret reagent (1.5 g of copper  
197 sulfate and 6 g of sodium and potassium tartrate in 500 mL of distilled water, in a 1 L volumetric  
198 flask, with 300 mL of 10% sodium hydroxide added, gauged to 1 L with distilled water) were  
199 mixed. The solution was homogenized and left to rest in darkness for 30 min. Finally, the solution  
200 was measured with a wavelength of 540 nm. The data obtained was correlated with a reference  
201 curve of bovine serum albumin, with a concentration of 0 – 10 mg/mL.

202

203 **2.10 Solubility:** Solubility was determined according to the Pilosof method (2000). A sample of 10  
204 mL containing 5 mg/mL of protein (CP) was centrifuged at 3500 rpm at  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The concentration of

205 proteins was determined in the supernatant via the biuret method. Solubility was reported as a  
206 relationship between the content of proteins in the supernatant and the protein content without  
207 centrifugation, multiplied by 100 in order to express it in percentage.

208

209 **2.11 Effort required while cutting (W-B):** The determination was carried out according to the  
210 method reported by De Huidobro et al. (2005), with modifications. Samples of 3 cm<sup>2</sup> were  
211 horizontally placed between the base of the cell and the blade that executed the cut, which lowered  
212 vertically until cutting the sample in half. The resistance towards the cut was evaluated with a test  
213 velocity of 1 mm/s and a recoil velocity of 2 mm/s, with a Warner-Brazler blade (HDP/BSW, Stable  
214 MicroSystems, Surrey, UK), adapted to a TA-XT2 texture analyzer, version 2.63 (Texture  
215 Technologie Corporation, Scarsdale, New York, USA). The maximum force detected was reported  
216 in Newtons.

217

218 **2.12 Gel formation:** The method reported by Silva-Rios (2013) was employed, with modifications.  
219 Each sample of CP (50 mg/mL) was poured into a glass vial with a screw cap. The process of gel  
220 formation was carried out submitting each vial to a temperature ramp in a water bath: first, the  
221 samples are gradually heated until they reach 40 °C and are maintained at that temperature for 30  
222 min. Once the time has transpired, the temperature is increased at a rate of 1 °C per minute until it  
223 has reached 75 °C within the gel. The samples are maintained at this temperature for 20 minutes and  
224 once this time has transpired, they suffer thermic shock when placed in an ice bath. Finally, the gels  
225 are left to age in refrigeration at 4 °C for 24 h until their posterior evaluation.

226 **2.13 TPA analysis**

227 The analysis was carried out according to the method reported by Jafarpour and Gorczyca (2009),  
228 with modifications. A TA-XT2 texturometer, version 2.63 (Texture Technologie Corporation,  
229 Scarsdale, New York, USA) was used, with a loading cell of 5 Kg. The gels formed in the tubes

230 were placed at the base and were penetrated using an 8 mm-diameter acrylic stem. The drop speed  
231 of the stem was one-thousandth of a second and the penetration corresponded to 75% of the gel  
232 thickness, followed by a second penetration. The value obtained was the total work or area under  
233 the curve expressed in Newtons/s, determining hardness ( $g_f$ ), cohesiveness, springiness, chewiness  
234 and gumminess.

235

236 **2.14 Electrophoresis in denaturalized conditions.** The analysis was carried out according to the  
237 method reported by Garcíacarreno et al. (1993), with modifications. First, a protein extraction was  
238 carried out. A 1:4 sample:buffer solution (10% dodecil sodium sulfate (SDS) solution + 5%  
239 mercaptoethanol + 0.05% bromophenol + glycerol, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8) was prepared and was  
240 heated in a water bath at 97 °C for 2 minutes before its application. Twenty microliters of sample  
241 was placed in each separating gel rail at 12% of polyacrylamide and 4% concentrator. Ten  
242 microliters of a marker that contains proteins of interest. The samples were treated in the same  
243 conditions. A running buffer (9.0 g tris buffer, 43.2 g of glycine and 3.0 g of SDS with 600 mL of  
244 deionized water) was prepared. For an electrophoretic run, 60 mL of buffer were diluted with 240  
245 mL of water. It was connected to a 200 V power source and a temperature of  $4 \pm 1$  °C in order to  
246 avoid the Joule effect. Once the separation was finished, the gels were stained using a 0.1% R-250  
247 coomassie brilliant blue stain, a 40% methanol and a 10% acetic acid solution for 30 min. To remove  
248 the stain, a 40% solution of methanol and 10% acetic acid was used.

249

250 **2.15 Statistical analysis:** The analysis was carried out via an ANOVA variance analysis and mean  
251 difference test with the Tukey method, with a significance level of  $p < 0.05$ , using the SPSS program,  
252 version 17.

253

254 **3. Results**

255 **3.1 Degree of L-OX:** The results are shown in Fig. 1a. For the highest concentration (1000 ng/L), a  
256 significant increase ( $p<0.05$ ) was observed for times 24, 48, 72 and 96 h (1268, 1351, 1107 and  
257 1176%, respectively), with regard to the control group and, in the same manner, in the case of the  
258 lowest concentration (50 ng/L), a significant increase ( $p<0.05$ ) of 67, 86, 252 and 608%,  
259 respectively, was observed, with regard to the control group.

260

261 **3.2 PCC content:** The results are shown in Fig. 1b. For the highest concentration (1000 ng/L), a  
262 significant increase ( $p<0.05$ ) was observed for times 24, 48, 72 and 96 h (256, 283, 406 and 439%,  
263 respectively), with regard to the control group. In the case of the lowest concentration (50 ng/L), a  
264 significant increase ( $p<0.05$ ) was observed at 48, 72 and 96 h (117, 116 and 115%, respectively).

265

266 **3.3 -SH analysis:** The results can be observed in Fig. 1c. For both concentrations, there was a  
267 significant decrease ( $p<0.05$ ) with regard to the control group for 24, 48, 72 and 96 h of exposure; for  
268 50 ng/L, 28, 35, 36 and 25%, respectively, and for 1000 ng/L, 80, 90, 89 and 87%, respectively.

269

270 **3.4 pH analysis:** The results show that for 1000 ng/L, significant decreases arose with regard to the  
271 control group ( $p<0.05$ ) for times 72 and 96 h (17 and 19%, respectively). For 50 ng/mL, significant  
272 decreases were also present with regard to the control group ( $p<0.05$ ) for times 72 and 96 h (11 and  
273 12%, respectively) (Fig. 2a).

274

275 **3.5 WHC analysis:** The results show significant decreases ( $p<0.05$ ) with regard to the control  
276 group for 1000 ng/L at 48, 72 and 96 h (22, 40 and 43%, respectively). For 50 ng/L, significant  
277 decreases were present with regard to the control group ( $p<0.05$ ) for times 48, 72 and 96 h (20, 35  
278 and 37%, respectively) (Fig. 2b).

279



280 **3.6 Solubility analysis:** The results are shown in Fig. 2c, in which a significant decrease can be  
281 observed with regard to the control group ( $p < 0.05$ ) for both concentrations. For 50 ng/L, 38, 41, 31  
282 and 44%, respectively. For 1000 ng/L, 54, 56, 50 and 53%, respectively, for all four times.

283

284 **3.7 W-B analysis:** The results are shown in Fig. 2d. For 50 ng/L, a significant increase with regard  
285 to the control group ( $p < 0.05$ ) was observed for times 72 and 96 h (24 and 28%, respectively). For  
286 1000 ng/L, a significant increase with regard to the control group ( $p < 0.05$ ) was observed for times  
287 48, 72 and 96 h (38, 27 and 18%, respectively).

288

289 **3.8 TPA analysis:** The results can be seen in Table 1, which show a significant decrease with  
290 regard to the control group ( $p < 0.05$ ) in all attributes from 24 h onwards. The capacity of jellification  
291 was affected by the time of exposure in the case of both concentrations (Fig. 3).

292

### 293 **3.9 Electrophoresis**

294 In figure 4, the protein profiles of the different gels obtained from each muscle exposed to the two  
295 concentrations at different times, are shown, in which a clear decrease in myosin can be observed  
296 (myosin is the main protein responsible for the formation of protein networks) once the time of  
297 exposure had transpired for both concentrations. Likewise, there was an appearance of new bands of  
298 low molecular weight.

299

## 300 **4. Discussion**

301

302 The present investigation is of great importance in the area of food toxicology with regard to  
303 seafood, due to the fact that until just now, there were few studies on the effects of xenobiotic  
304 substances present in aquatic environments, such as GLB, over the quality of the meat of fish of

305 commercial interest for human consumption, as in the case of *C. carpio*. The results of increase  
306 with regard to the degree of L-OX, as well as in the degree of P-OX, induced by GLB at both  
307 concentrations (50 ng/L and 1000 ng/L) for the 5 exposure times in common carp (Fig. 1) prove the  
308 effects of this xenobiotic over the physicochemical and textural properties of the muscle. This is due  
309 to the fact that GLB is a pharmaceutical that, being a biologically-active substance and once at the  
310 different organs of aquatic species, can biotransform and give origin to more reactive molecules  
311 such as diverse reactive oxygen species (ROS), mainly into singlet oxygen, superoxide radicals,  
312 hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. These molecules are known to be highly reactive and to  
313 cause damage to muscle proteins (MP), causing oxidation of the aminoacids present in the chains,  
314 having diverse affectations in the functionality of the proteins, such as the loss of solubility,  
315 sulfhydryl (-SH) group oxidation, alteration of the WHC (Fig. 2b) and damage in texture, causing  
316 detriment in meat quality (Lund et al., 2011; Estévez, 2011).

317 The results of the degree of L-OX in all samples presented an increase in the concentration of  
318 malonaldehyde (MDA). This could be explained due to the high degree of unsaturation of the lipids  
319 present in the muscle and its high metal concentration (Kanner et al., 1987). Kandemir, S. and Polat,  
320 N. (2007) mention that fish meat is the most sensible to lipid oxidation, which is the main cause of  
321 fat deterioration in fish. This oxidation of lipids leads to the formation of hydroperoxides (unstable  
322 molecules), which once fragmented, release short-chain aldehydes such as MDA, ketones and fatty  
323 acids, which could contribute to the deterioration in the texture and taste of the meat, as mentioned  
324 by Spuch and Judis (2004), reason for which, in the present study, a great reduction in the value of  
325 pH for 1000 ng/L was observed from 72 h onwards. This reduction in pH (Fig. 2a) can be explained  
326 due to the increase in concentration of MDA and the accumulation of lipoperoxides, causing the  
327 degradation of the structural proteins in fish muscle, as mentioned by Wang (2011).

328 The increase in the formation of P-OX could be due to the fact that, in the process of oxidative  
329 biotransformation of GLB, ROS such as  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  are created, which remove an atom of hydrogen

330 (H<sup>•</sup>) from the methylene groups of the protein aminoacids, promoting the formation of carbonyl  
331 radicals (P<sup>•</sup>). Consequently, this radical is converted into the peroxy radical (POO<sup>•</sup>) in the presence  
332 of O<sub>2</sub> and an alkyl peroxide (POOH), through the extraction of a hydrogen atom of an adjacent  
333 molecule (Lund et al., 2011). These ROS tend to bond to protein aminoacids and induce damage to  
334 their nucleophilic centers, causing oxidation of -SH groups, fragmentation of peptides, modification  
335 of prosthetic groups and nitration of proteins. In the same manner, the lysine, proline and arginine  
336 aminoacids, once oxidized in the presence of Fe<sup>+3</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, form oxidized compounds of MP,  
337 called “α-aminoadipic and γ-glutamic semialdehydes (AAS and GGS, respectively), which could  
338 represent up to 70% of MP carbonylated proteins, which, at a high percentage, could lead to the loss  
339 in functionality of the proteins (Estévez, 2011). In this study, a significant decrease in sulfhydryl  
340 groups (-SH) (*p*<0.05) was observed at both concentrations (Fig. 1c). This could be due to the fact  
341 that -SH groups are highly susceptible to oxidation in the presence of hydrogen peroxide, which is  
342 accumulated in cells and originated by the biotransformation of GLB. Primarily, thiol groups in  
343 cysteine are the most susceptible to oxidation, generating a series of oxidized products such as  
344 sulfenic acid (RSOH), sulfinic acid (RSOOH) and the cross-linking of disulfide groups (RSSR)  
345 (Lund et al., 2011), coinciding with that report by Eymard et al. (2009), in which a loss of up to  
346 50% of -SH groups in fish is due to the carboxylation of muscle proteins. Myosin, being one of the  
347 structural proteins found in a greater proportion in muscle (70-80%), is one of the MPs most  
348 susceptible to oxidative damage. Hanan and Shaklai (1995) have observed that in the presence of  
349 hydrogen peroxide, insoluble covalent aggregates are formed, resulting in the cross-linking of  
350 proteins. Thus, protein-protein bonds are favored and protein-water bonds are reduced, due to the  
351 fact that they lose their tertiary and quaternary structures. Xiong (2000) mentions that an  
352 undesirable oxidation causes alterations to the physicochemical characteristics of muscle and  
353 processed products, exhibiting signs of oxidation such as low WHC and low gel-formation capacity,  
354 as well as fragmentation of microfibrillar protein (Baron et al., 2009; Liu and Xiong, 2000). In the

355 present study, a loss of solubility and a decrease in WHC was observed ( $p<0.05$ ). Knowing that  
356 WHC is defined as the capacity of meat to maintain its own water or the water added, during the  
357 application of an external force. This capacity of the meat was affected by the processes of  
358 carboxylation in the proteins, as described by Huff-Lonergan and Lonergan (2005), as well as a loss  
359 in muscle juiciness, making it hard, as can be observed the “effort required while cutting” results, as  
360 reported by Xiong (2000) and Sun et al. (2011), allowing all this to alter its technological value, as  
361 was proven by the TPA results (Table 1), in which a significant decrease ( $p<0.05$ ) in the parameters  
362 of hardness, cohesiveness, elasticity, chewiness and gumminess of the gels prepared with the  
363 proteins at different exposure times and both concentrations, for which the presence of GLB  
364 affected the functionality of the proteins, decreasing the capacity of jellification. As can be observed  
365 in figure 3, as exposure time increases for both concentrations, the formation of the three-  
366 dimensional network does not occur; this is due to the decrease in pH, which reached the isoelectric  
367 point of the proteins, having as a consequence, a decrease in WHC and thus, a decrease in  
368 solubility.

369

370 The possible fragmentation by the process of oxidation due to the presence of GLB was able to be  
371 confirmed with SDS-PAGE (Fig. 4), in which a decrease in myosin can be seen at 24 hours of  
372 exposure for both concentrations, observing the appearance of peptides of low molecular weight,  
373 which represents direct evidence of oxidative changes in the proteins, as reported by Xiong (2000).

374

### 375 **5. Conclusions:**

376 GLB in concentrations of 50 and 1000 ng/L caused an increase in the degree of lipoperoxidation (L-  
377 OX) and the oxidation of proteins (P-OX), having significant effects on the muscle of *Cyprinus*  
378 *carpio* as a consequence, decreasing its physicochemical and textural properties and causing  
379 detriment in its functional and nutritional quality, as could be seen in the loss of attributes in

380 texture, since having been damaged at a protein level, its capacity of jellification was affected, not  
381 being able to form a three-dimensional network, for which its possible technological use could also  
382 be affected. This study demonstrated that the presence of these xenobiotics has an impact not only  
383 on the environment, but also on species of economic and nutrimental importance.

384

#### 385 **Conflict of interest**

386 The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

387

#### 388 **Acknowledgements**

389 Ericka M.G., Martínez-Viveros, thanks the National Council of Science and Technology (Consejo  
390 Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico) for a graduate scholarship.

391

392

393

#### 394 **References**

395

396 AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International (2002). 17th edition  
397 current through 1st revision. Gaithersburg, MD, USA, *Association of Analytical Communities*.

398

399 Baron, C. P., Hyldig, G. and Jacobsen, C. (2009). Does feed composition affect oxidation of  
400 rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during frozen storage? *Journal of Agriculture and Food*  
401 *Chemistry* 57: 4185–4194.

402

403 Büege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in enzymology*, 52,  
404 302-310. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6)

405

406 Burcham, P. C. (2007). Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: a  
407 new tool for assessing drug-and chemically-induced oxidative cell injury. *Journal of*  
408 *pharmacological and toxicological methods*, 56(1), 18-22.

409 <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.02.015>

410

411 De Huidobro, F. R., Miguel, E., Blázquez, B., & Onega, E. A (2005). Comparison between two  
412 methods (Warner–Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked  
413 meat. *Meat science*, 69(3), 527-536. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.09.008>

414

415 Dublán, G. O., Cruz, C. R., Guerrero, L. I., & Ponce, A. E. (2006). Effect of  
416 refrigerated storage on proteolytic activity and physicochemical and microstructural

- 417 properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *Muscle Foods*, 17, 291-310.  
418 DOI: 10.1111/j.1745-4573.2006.00051.x  
419
- 420 Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82,  
421 70-77.  
422
- 423 Estévez, M. (2011). Protein carbonyls in meat systems: A review. *Meat science*, 89(3), 259-  
424 279. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.025>  
425
- 426 Eymard, S., Baron, C. P., Jacobsen, C., (2009). Oxidation of lipid and protein in horse mackerel  
427 (*Trachurus trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. *Food*  
428 *Chemistry*, 114, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.030>  
429
- 430 Garcíacarreno, F. L., Dimes, L. E., & Haard, N. F., (1993). Substrate-gel electrophoresis for  
431 composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase  
432 inhibitors. *Analytical biochemistry*, 214(1), 65-69.
- 433 Ginebreda, A., Jelić, A., Petrović, M., de Alda, M. L., & Barceló, D. (2012). New indexes for  
434 compound prioritization and complexity quantification on environmental monitoring  
435 inventories. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(4), 958–970.  
436 <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0557-6>
- 437
- 438 Hanan, T., & Shaklai, N. (1995). The role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generated myoglobin radical in crosslinking  
439 of myosin. *Free radical research*, 22(3), 215-227.  
440
- 441 Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat:  
442 The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat science*, 71(1), 194-204.  
443
- 444 Honikel, K. O., & Hamm, R. (1994). Measurement of water-holding capacity and juiciness.  
445 In *Quality attributes and their measurement in meat, poultry and fish products*. Springer US (pp.  
446 125-161)  
447
- 448 Jafarpour, A., & Gorczyca, E. M. (2009). Characteristics of sarcoplasmic proteins and their  
449 interaction with surimi and kamaboko gel. *Journal of food science*, 74(1). DOI: 10.1111/j.1750-  
450 3841.2008.01009.x  
451
- 452 Kandemir, Ş., & Polat, N. (2007). Seasonal Variation of Total Lipid and Total Fatty Acid in  
453 Muscle and Liver of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* W, 1792) Reared in Derbent Dam  
454 Lake. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 7(1).  
455 [http://www.trjfas.org/uploads/pdf\\_308.pdf](http://www.trjfas.org/uploads/pdf_308.pdf)  
456
- 457 Kanner, J., German, J. B., Kinsella, J. E., & Hultin, H. O. (1987). Initiation of lipid peroxidation  
458 in biological systems. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 25(4), 317-364.  
459 <http://dx.doi.org/10.1080/10408398709527457>  
460
- 461 Levine, R. L., Williams, J. A., Stadtman, E. P., & Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for  
462 determination of oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. 233, 346-357.

- 463 [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).
- 464
- 465 Liu, G. and Xiong, Y. L. (2000). Electrophoretic pattern, thermal denaturation, and in vitro  
466 digestibility of oxidized myosin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 48: 624–630.  
467 DOI: 10.1021/jf990520h
- 468
- 469 Livingstone, D. R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and  
470 aquaculture. *Revue de Medecine Veterinaire*, 154(6), 427-430.  
471 <http://plymsea.ac.uk/id/eprint/3780>
- 472
- 473 Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., & Estévez, M. (2011). Protein oxidation in muscle  
474 foods: A review. *Molecular nutrition & food research*, 55(1), 83-95.  
475 DOI: 10.1002/mnfr.201000453
- 476
- 477 Moodie, R., Stuckler, D., Monteiro, C., Sheron, N., Neal, B., Thamarangsi, T & Lancet NCD  
478 Action Group. (2013). Profits and pandemics: prevention of harmful effects of tobacco, alcohol,  
479 and ultra-processed food and drink industries. *The Lancet*, 381 (9867), 670-679.  
480 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)62089-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)62089-3)
- 481
- 482 Morachis-Valdez, A. G., Gómez-Oliván, L. M., García-Argueta, I., Hernández-Navarro, M. D.,  
483 Díaz-Bandera, D., & Dublán-García, O. (2017). Effect of Chitosan Edible Coating on the  
484 Biochemical and Physical Characteristics of Carp Fillet (*Cyprinus carpio*) Stored at – 18°  
485 C. *International Journal of Food Science*. <https://doi.org/10.1155/2017/2812483>
- 486
- 487 Nazaroglu, N. K., Sepici-Dincel, A., & Altan, N., (2009). The effects of sulfonylurea glyburide  
488 on superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in the brain tissue of  
489 streptozotocin-induced diabetic rat. *Journal of Diabetes and its Complications*, 23(3), 209-213.  
490 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2007.09.001>
- 491
- 492 Organisation for Economic Cooperation and Development, 1992. OECD guidelines for testing  
493 of chemicals. Guideline no. 203: fish, acute toxicity test.  
494 <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948241.pdf>
- 495
- 496 Osorio, V., Larrañaga, A., Aceña, J., Pérez, S., & Barceló, D., (2016). Concentration  
497 and risk of pharmaceuticals in freshwater systems are related to the population density  
498 and the livestock units in Iberian Rivers. *Science of the Total Environment*, 540, 267-  
277. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.143>
- 499
- 500 Pilosof AM (2000). Solubilidad. En Caracterización Funcional y estructural de proteínas.  
501 Pilosof, A.M.R y Bartholomai, G.B. editors. Edit. Ceudeba. (pp. 60-75). *CYTED (Programa*  
502 *Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo)*.
- 503
- 504 Radjenovic, J., Petrovic, M., & Barceló, D., (2007). Analysis of pharmaceuticals in wastewater  
505 and removal using a membrane bioreactor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*., 387(4),  
1365–1377. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0883-6>
- 506
- 507 Radjenović, J., Pérez, S., Petrović, M., & Barceló, D., (2008). Identification and structural  
characterization of biodegradation products of atenolol and glibenclamide by liquid



- 508 chromatography coupled to hybrid quadrupole time-of-flight and quadrupole ion trap mass  
509 spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, 1210 (2), 142-153.  
510 <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.09.060>
- 511 Radjenović, J., Petrović, M., & Barceló, D., (2009). Fate and distribution of pharmaceuticals in  
512 wastewater and sewage sludge of the conventional activated sludge (CAS) and advanced  
513 membrane bioreactor (MBR) treatment. *Water Research*, 43(3), 831–841.  
514 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.043>
- 515 Rebollo, C. P., Calvo, M. G., de Alda Villaizán, M. J. L., Petrovic, M., Martí, A. G., &  
516 Culleres, D. B., (2011). Repercusiones sanitarias de la calidad del agua: los residuos de  
517 medicamentos en el agua. *Revista de Salud Ambiental.*, 11(1-2), 17-26.
- 518 Silva-Ríos, A., Dublán-García, O., Quintero-Salazar, B., Dominguez-Lopez, A.,  
519 Gómez-Oliván, L. M., López-Martínez, L. X., & Salem, A. F. Z. (2013). Evaluation of  
520 physicochemical, functional and textural properties of rainbow trout (*Oncorhynchus*  
521 *mykiss*) stored at low temperatures. *African Journal of Biotechnology*, 12(32).  
522 DOI:10.5897/AJB2013.12133
- 523 Spuch, A. R., Judis, M. A., (2004). Estudio de la calidad nutricional y susceptibilidad  
524 oxidativa de *Cyprinus carpio* cultivados en la región centrochaqueña, *Comunicaciones*  
525 *Científicas y Tecnológicas*, Ed. Universidad Nacional del Nordeste, Argentina., E-075,  
526 1–4  
527
- 528 Sun, W., Cui, C., Zhao, M., Zhao, Q., Yang, B., (2011). Effects of composition and oxidation of  
529 proteins on their solubility, aggregation and proteolytic susceptibility during processing of  
530 Cantonese sausage. *Food chemistry*, 124, 336–341.  
531 <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.042>  
532
- 533 Tüzün, S., Girgin, F. K., Sözmen, E. Y., Menteş, G., & Ersöz, B., (1999). Antioxidant status in  
534 experimental type 2 diabetes mellitus: effects of glibenclamide and glipizide on various rat  
535 tissues. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 51(4-5), 436-441.  
536 [http://dx.doi.org/10.1016/S0940-2993\(99\)80036-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0940-2993(99)80036-0)  
537
- 538 Verlicchi, P., Al Aukidy, M., & Zambello, E., (2012). Occurrence of pharmaceutical  
539 compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary  
540 treatment-A review. *Science of the Total Environment*, 429, 123–155.  
541 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.04.028>  
542
- 543 Wang, P. A., Vang, B., Pedersen, A. M., Martinez, I., & Olsen, R. L. (2011). Post-mortem  
544 degradation of myosin heavy chain in intact fish muscle: Effects of pH and enzyme  
545 inhibitors. *Food chemistry*, 124(3), 1090-1095. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.093>  
546
- 547 World Health Organization. (2016). *Global report on diabetes*.  
548 [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204871/1/9789241565257_eng.pdf)  
549
- 550 Xiong, Y. L. (2000). Protein oxidation and implications for muscle food quality. In Eric A.  
551 Decker, Cameron Faustman, Clemente J. Lopez-Bote (Eds.), *Antioxidants in Muscle Foods:*



552 *Nutritional Strategies to Improve Quality* (pp. 85-90). New York: Wiley and Sons.

553

554 Zhou, P., & Regenstein, J. M., (2006). Determination of total protein content in gelatin  
555 solutions with the Lowry or Biuret assay. *Journal of food science.* , 71(8). DOI: 10.1111/j.1750-  
556 3841.2006.00151.x

557

558

559

560

561 Figure Captions

562

563 **Fig.1**

564 Changes in lipid peroxidation (LPX) (a); protein carbonyl content (PCC) (b); and **-SH** (c); in

565 muscle of *Cyprinus carpio* exposed to two different concentrations of GLB (C1: 50 ng/L and

566 C2:1000 ng/L) for 0, 24, 48, 72 and 96 h. MDA = malondialdehyde. Values are the mean of three

567 replicates  $\pm$  SE. \*Significant differences with the control group, ANOVA and Tukey ( $P < 0.05$ ).

568 **Fig. 2**

569 Changes in pH (a); WHC (b); SOL (c) and W-B (d) in muscle of *Cyprinus carpio* exposed to two

570 different concentrations of GLB (C1: 50 ng/L and C2:1000 ng/L) for 0, 24, 48, 72 and 96 h.

571 Values are the mean of three replicates  $\pm$  SE. \*Significant differences with the control group,

572 ANOVA and Tukey ( $P < 0.05$ ).

573

574 **Fig. 3**

575 SDS-PAGE profile of muscle of *Cyprinus carpio* exposed to two concentrations of glibenclamide

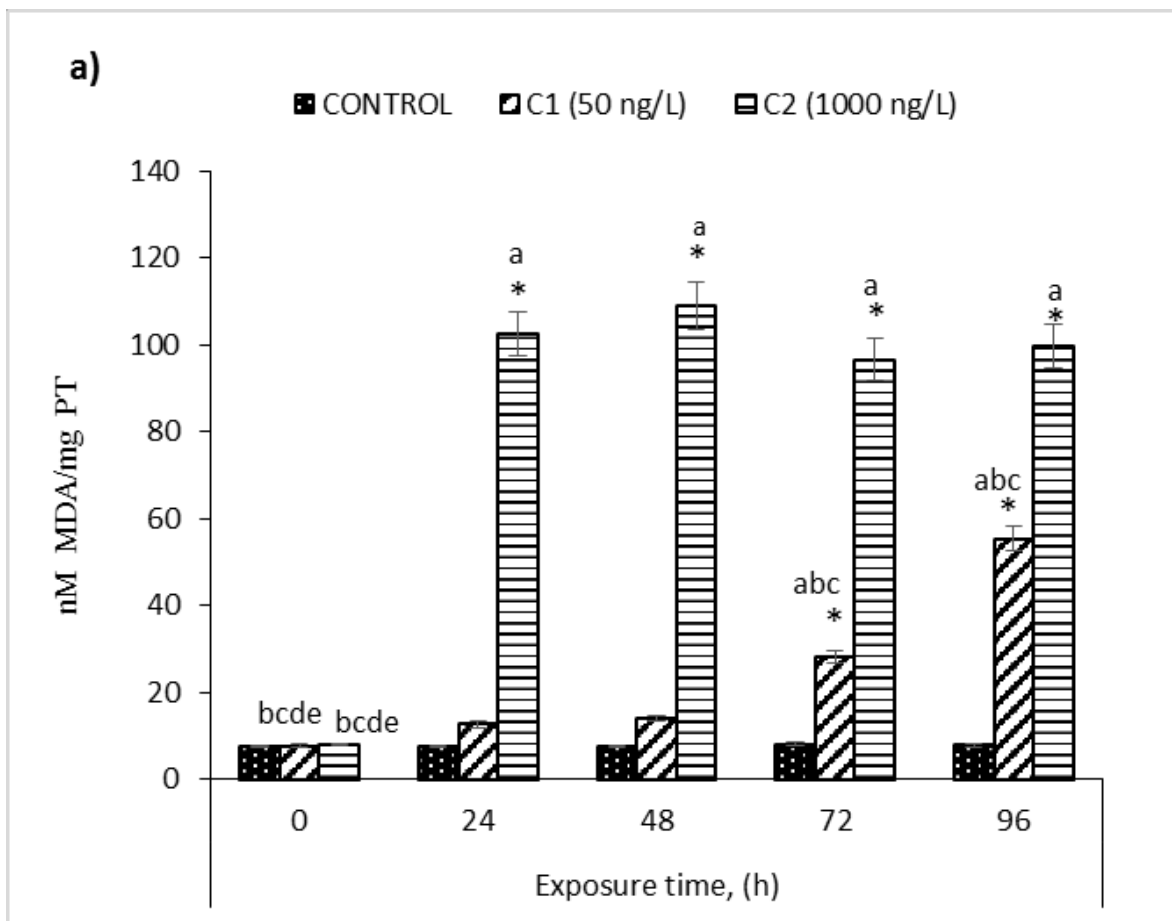
576 (50 and 1000 ng/L) for 12, 24, 48, 72 and 96 h. C1 = concentration 1 (50 ng/L); C2 = concentration

577 2 (1000 ng/L).

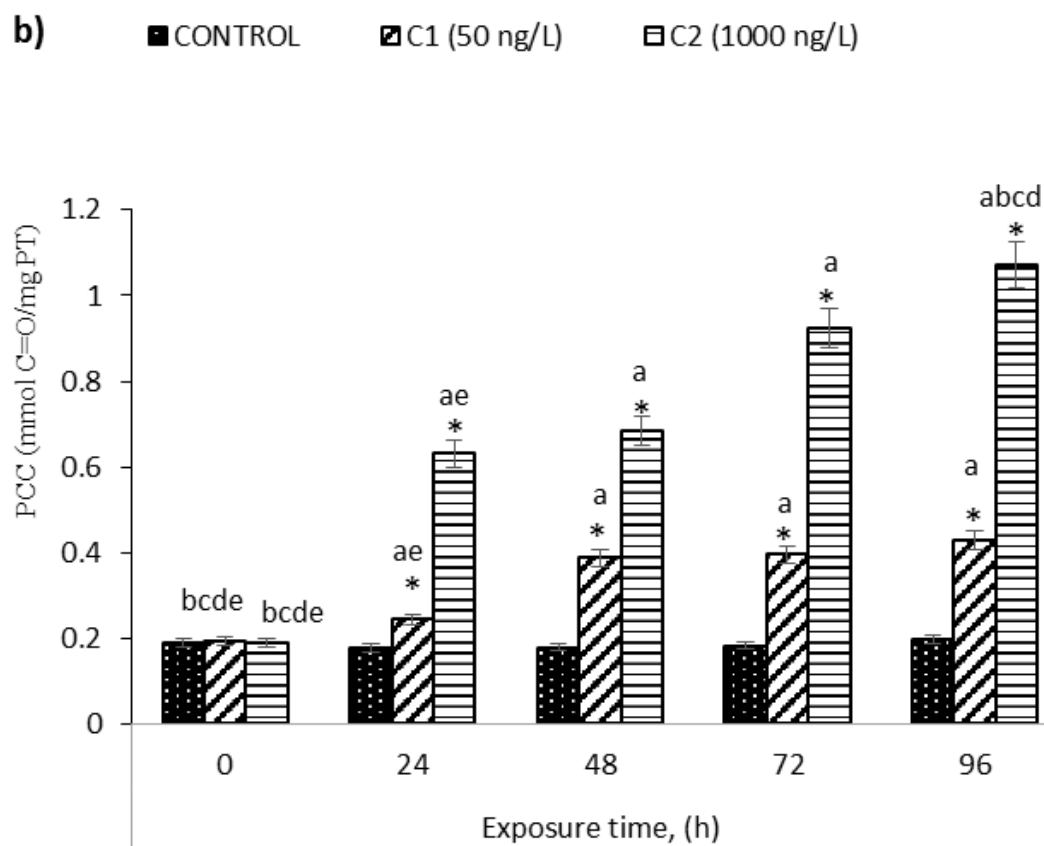
578

579

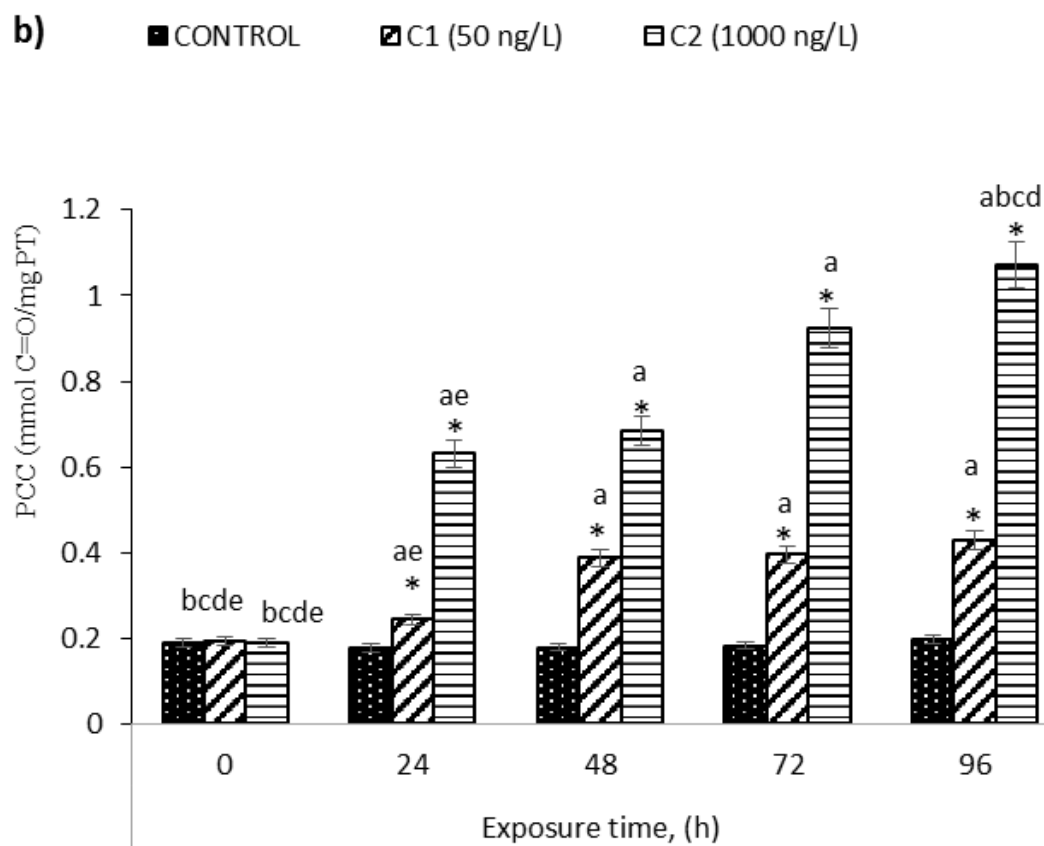
580



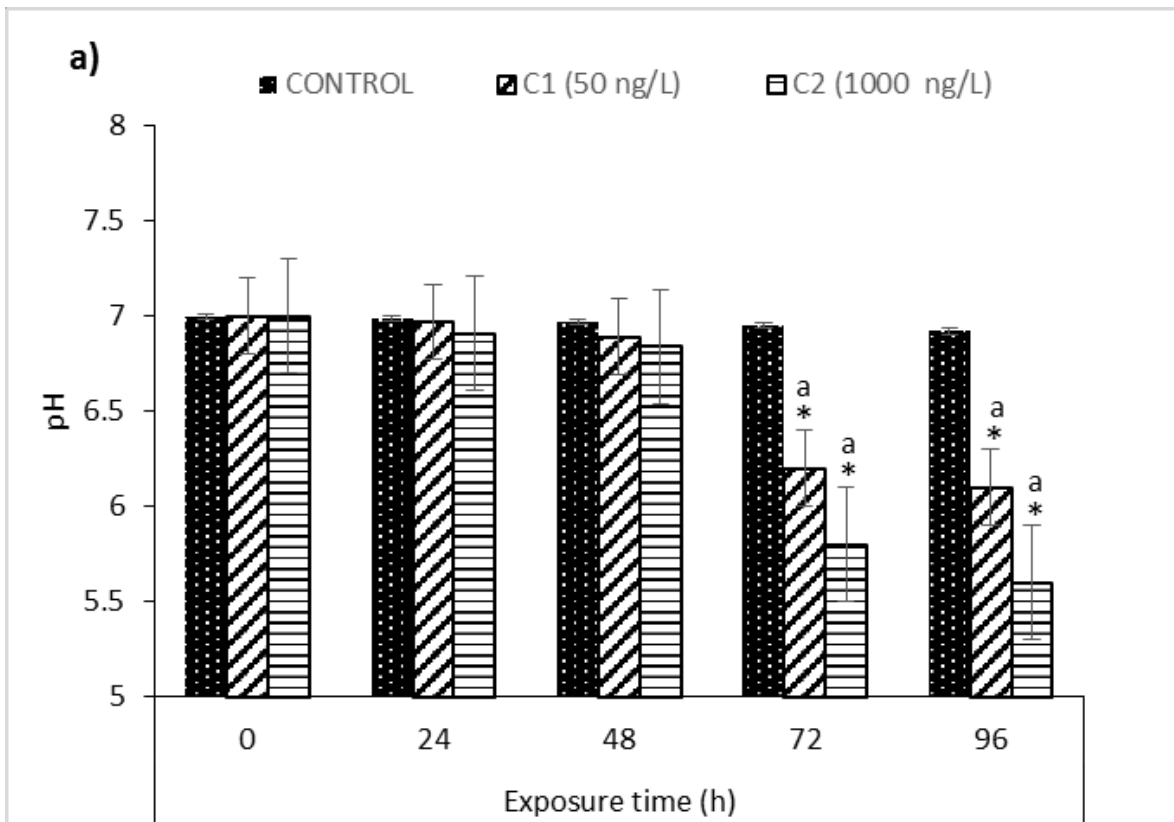
581



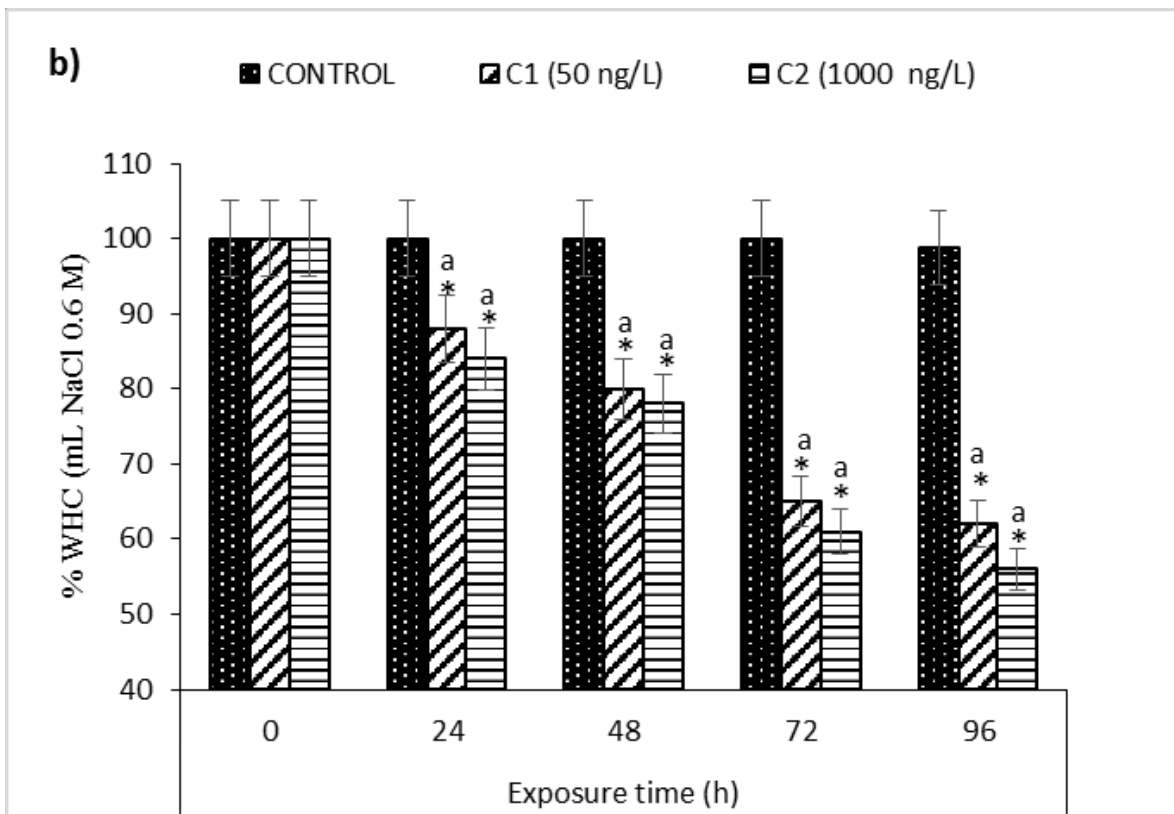
582  
583



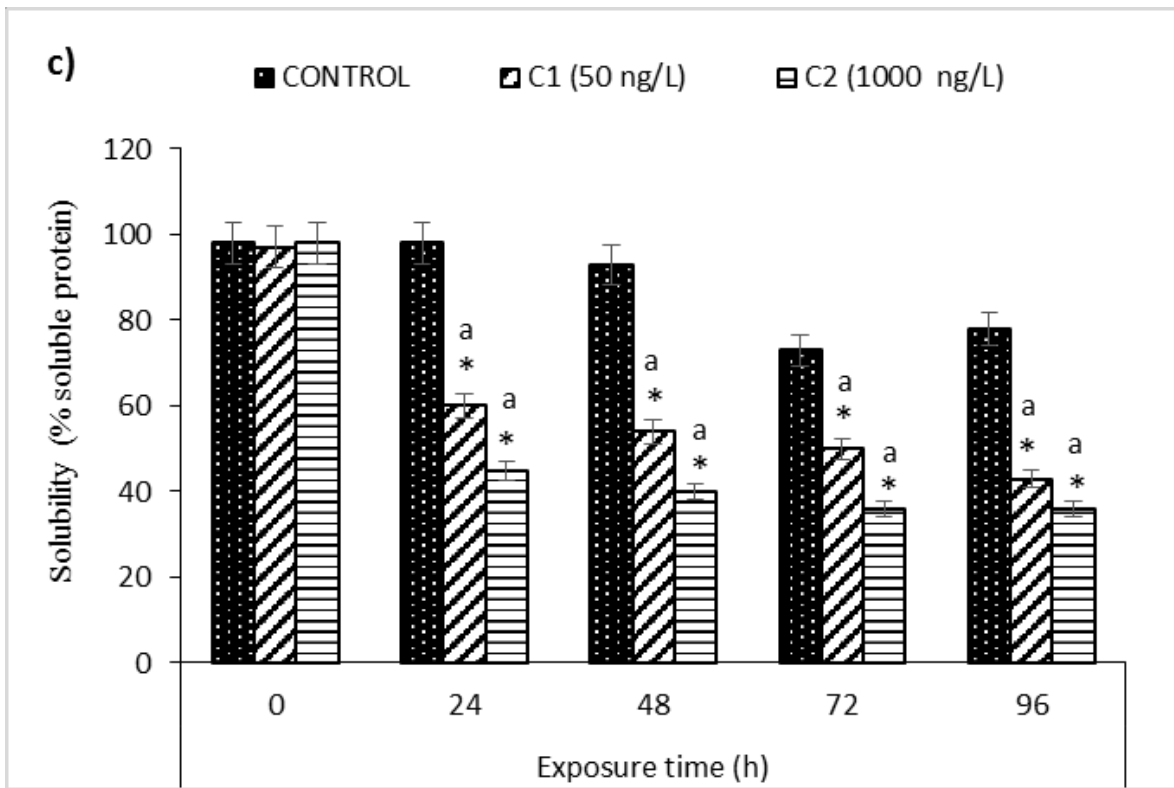
584  
585  
586



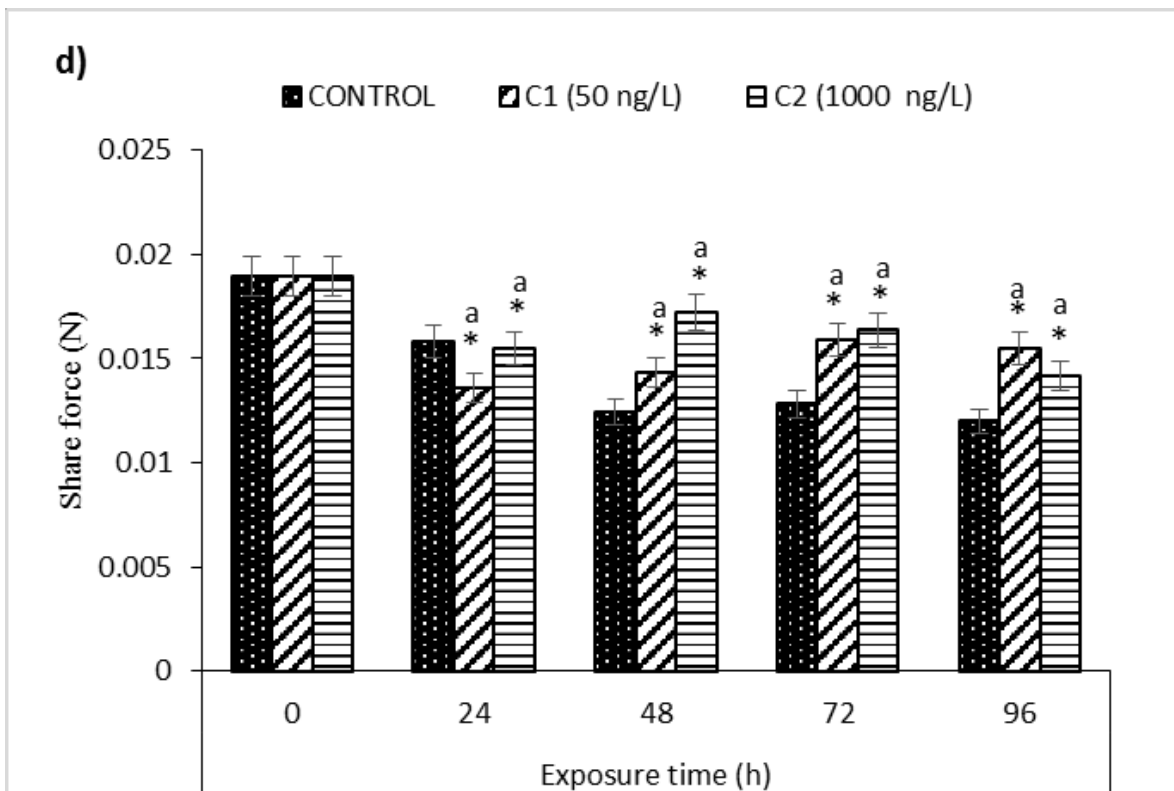
587  
588



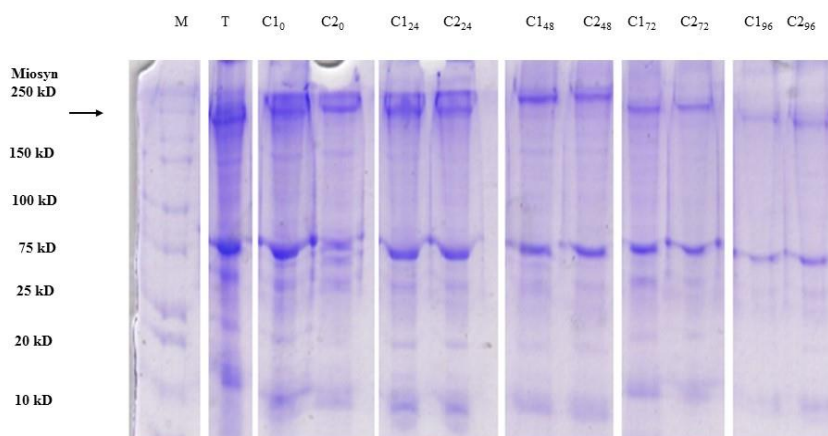
589



590  
591



592  
593



594  
595

596 Table 1. Results of texture profile analysis in muscle of *Cyprinus carpio* exposed to two GLB concentrations  
597 (50 ng/L and 100 ng/L) for 0, 24, 48, 72 and 96 h. \* Significant difference with regard to the control group; a:  
598 significant difference with regard to 0 h.

		Exposure time				
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Hardness	Control	1.087 ± 0.021	1.022 ± 0.005	0.980 ± 0.009 <sup>a</sup>	0.946 ± 0.008 <sup>a</sup>	0.929 ± 0.003 <sup>a</sup>
	50 ng/L	0.955 ± 0.007	0.092 ± 0.006 <sup>*a</sup>	0.040 ± 0.003 <sup>*a</sup>	0.029 ± 0.002 <sup>*a</sup>	0.010 ± 0.000 <sup>*a</sup>
	100 ng/L	0.922 ± 0.005	0.066 ± 0.001 <sup>*a</sup>	0.024 ± 0.002 <sup>*a</sup>	0.011 ± 0.001 <sup>*a</sup>	0.005 ± 0.001 <sup>*a</sup>
Cohesiveness	Control	0.015 ± 0.001	0.013 ± 0.001	0.012 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.012 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.010 ± 0.000 <sup>a</sup>
	50 ng/L	0.014 ± 0.001	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>
	100 ng/L	0.014 ± 0.000	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>
Elasticity	Control	0.367 ± 0.015	0.347 ± 0.015	0.333 ± 0.015 <sup>a</sup>	0.277 ± 0.006 <sup>a</sup>	0.253 ± 0.001 <sup>a</sup>
	50 ng/L	0.363 ± 0.006	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>
	100 ng/L	0.330 ± 0.010	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>	0.001 ± 0.000 <sup>*a</sup>
Chewiness	Control	0.006 ± 0.000	0.005 ± 0.000	0.004 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.003 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.002 ± 0.000 <sup>a</sup>
	50 ng/L	0.005 ± 0.000	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>
	100 ng/L	0.005 ± 0.000	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>
Gumminess	Control	0.016 ± 0.000	0.013 ± 0.000	0.012 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.011 ± 0.000 <sup>a</sup>	0.009 ± 0.000 <sup>a</sup>
	50 ng/L	0.013 ± 0.000	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>
	100 ng/L	0.012 ± 0.000	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>	0.000 <sup>*a</sup>

599

600

601

602

603