



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICAS

TESIS

INFLUENCIA DE LA REMOCIÓN DE 17- β -ESTRADIOL EMPLEANDO UN PROCESO DE OXIDACIÓN AVANZADA SOBRE LA TOXICIDAD Y PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y TEXTURALES DE LA CARNE DE CARPA COMÚN *CYPRINUS CARPIO*

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICAS

PRESENTA

M. en C.A.R.N. LUIS ALBERTO OROZCO HERNÁNDEZ

DIRIGIDO POR:

Dr. LEOBARDO MANUEL GÓMEZ OLIVÁN

Dr. OCTAVIO DUBLÁN GARCÍA

Dra. REYNA NATIVIDAD RANGEL

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, AGOSTO 2019

AGRADECIMIENTOS

A Dios por el favor de la vida.

A mi familia, mis Padres Margarita y Pascual por su gran amor incondicional y su apoyo mil gracias, a mis hermanos Charly, Carmen, Manuel, Lalo y Diego, compañeros de mil batallas.

Al Dr. Leobardo Manuel Gomes Oliván por la bondad de su paciencia y por darme la oportunidad de trabajar con usted, por sus conocimientos y aportaciones para este trabajo de investigación.

Al Dr. Octavio Dublán García y Dra. Reyna Natividad Rangel, por compartir sus conocimientos y experiencia para la realización de este trabajo.

A la Dra. Mariana Ortiz Reynoso coordinadora del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias y Tecnología Farmacéuticas, loablemente le agradezco por la confianza otorgada.

A la Dra. Dolores Hernández Navarro, a la Dra. Hariz Islas Flores, Dra. Nely San Juan Reyes por todo su apoyo en la revisión de este trabajo y siempre tener palabras de aliento.

**A la familia del laboratorio de Toxicología Ambiental
Karen, Manuel, Gerardo, Marlenne, Lucio, Itzayana, Livier, Paulina, Paco, Daniel, Gerardo, Alex, Esmeralda, Verónica, Carmen, a todos gracias.**

Al CONACYT por la beca otorgada.

*“Si los hombres no fueran por naturaleza asesinos, ladrones, adúlteros, embusteros, envidiosos, blasfemos y traidores, Dios no habría tenido que dar los diez mandamientos a ese Moisés. Si algunos hombres los obedecen es por temor supersticioso no porque su corazón se sienta buenamente inclinado hacia ellos. Si las personas piadosas quedaran privadas de religión y supersticiones, ya verías tú lo que sería el caos”. Escévola a Marco Tulio Ciceron,
Taylor Caldwell, La Columna de Hierro*

ÍNDICE

Contenido	Página
AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE.....	ii
ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Contaminación.....	2
2.1.1. Contaminación del agua.....	2
2.2. Contaminantes emergentes en el agua	3
2.2.1. Compuesto orgánicos	4
2.2.2. Surfactantes.....	5
2.2.3. Metales pesados	5
2.2.4. Productos farmacéuticos.....	6
2.2.5. Esteroides.....	7
2.2.6. 17- β -estradiol.....	8
2.2.7. Características generales del 17- β -estradiol.....	8
2.2.8. Farmacodinamia del 17- β -estradiol.....	9
2.2.9. Farmacocinética del 17- β -estradiol.....	9
2.3. Coeficiente de Riesgo ambiental para 17- β -estradiol	11
2.3.1. Datos de ocurrencia del 17- β -estradiol en el ambiente.....	13
2.3.2. Datos de toxicidad del 17- β -estradiol.....	15
2.3.3. Efectos de estrógenos como disruptores endocrinos.....	17
2.3.4. Procesos de oxidación avanzada.....	18
2.4. Ecotoxicología y bioensayos.....	21
2.5. Bioensayos.....	22
2.5.1. Importancia de <i>Cyprinus carpio</i> en México.....	22
2.6. Biomarcadores.....	23
2.7. Estrés Oxidativo.....	25
2.7.1. Radicales Libres.....	25
2.7.2. Especies reactivas de oxígeno	26
2.8. Efectos del estrés oxidativo en biomoléculas	28
2.8.1. Lipoperoxidación.....	28
2.8.2. Daño a proteínas.....	30
2.8.3. Daño a ácidos nucleicos.....	31
2.9. Defensas y enzimas antioxidantes.....	32
2.9.1. Superóxido dismutasa.....	33
2.9.2. Catalasa.....	33
2.9.3. Glutatión peroxidasa.....	34
2.10. Cambios en la calidad de la carne de <i>C. carpio</i> por estrés oxidativo.....	34

2.11. Propiedades funcionales de las proteínas del músculos de pescado.....	36
2.11.1. Solubilidad.....	36
2.11.2. Propiedad gelificante.....	37
2.11.3. Capacidad de retención de agua.....	38
2.11.4. Perfil de textura.....	39
3. Justificación.....	41
4. Hipótesis.....	42
5. Objetivo general.....	42
5.1. Objetivos específicos.....	42
6. Metodología.....	43
6.1. Tratamiento fotocatalítico.....	43
6.2. Estudio de toxicidad.....	43
6.3. Evaluación de estrés oxidativo.....	44
6.3.1. Determinación del grado de lipoperoxidación.....	45
6.3.2. Determinación del contenido de proteínas carboniladas.....	45
6.3.3. Determinación de HPC (Método Jiang <i>et al.</i> , 1992.....	45
6.3.4. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa.....	45
6.3.5. Determinación de la actividad de la catalasa.....	46
6.4. Evaluación de la calidad alimentaria.....	46
6.4.1. Medición de pH.....	46
6.4.2. Capacidad de retención de agua.....	46
6.4.3. Solubilidad.....	46
6.4.4. Determinación de grupos desulfuro y sulfhídrico totales.....	47
6.4.5. Formación de gel.....	47
6.4.6. Análisis de textura TPA (Método García, 2005).....	47
7. Análisis estadístico.....	48
8. Resultados	49
8.1. Degradación fotocatalítica de E2.....	49
8.2. Estrés oxidativo.....	50
8.2.2. Resultados LPX en sangre.....	51
8.2.3. Resultados de HPX.....	52
8.2.4. Resultados de PCC.....	53
8.3. Actividad de las enzimas antioxidantes.....	54
8.3.1. Actividad SOD.....	54
8.3.2. Actividad CAT.....	55
8.4. Pruebas fisicoquímicas.....	56
8.4.1. pH.....	56
8.4.2. Capacidad de retención de agua.....	57
8.4.3. Grupos sulfhidrilo.....	58
8.4.4. Solubilidad.....	59
8.4.5. Análisis de perfil de textura.....	60
9. Discusión.....	61
9.1. Pruebas fisicoquímicas (pH).....	65
10. Conclusiones.....	69

11. Bibliografía.....	70
12. Anexos.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Concentración de 17-β-estradiol en agua y sangre de <i>Cyprinus carpio</i> antes y después de tratamiento fotocatalítico.....	58
Tabla 2. Análisis de perfil de textura en músculo de <i>Cyprinus carpio</i> expuesto a 17-β-estradiol en C1= 1 ngL ⁻¹ y C2= 1 μg/L ⁻¹ durante 12, 24, 48, 72 y 96 h.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo del agua (Barceló & de Alda, 2009)	3
Figura 2. Estructura química del 17-β-estradiol.....	8
Figura 3. Metabolismo-oxidación de 17-β-estradiol (Thomson, 2000)	11
Figura 4. Esquema de reacción de fotocatalisis heterogénea (Homo & Fitzpatrick, 2013).	19
Figura 5. Estructuras cristalinas de TiO ₂ : a) Rutilo; b) anatasa y c) brookita	20
Figura 6. Bioindicador <i>Cyprinus carpio</i>	23
Figura 7. Posible mecanismo a través del cual la carbonilación de proteínas..... puede afectar la calidad de los productos cárnicos (Estévez, 2011).....	35
Figura 8. Curva patrón de análisis de perfil de textura en máquina Instron (Bourne, 1978)	39
Figura 9. Evolución de la concentración de 17-β-estradiol con el tiempo.....	49
Volumen de reacción=14L, T= 298 K, QO2= 50 mL.min ⁻¹	49
Tabla 1. Concentración de 17-β-estradiol en agua y sangre de <i>Cyprinus carpio</i> antes y después de tratamiento fotocatalítico	49
Figura 10. Comparación de grado de peroxidación lipídica (LPX) en sangre de <i>Cyprinus carpio</i> expuesta a agua contaminada con 17-β-estradiol (E2)[1ng (C1) y 1μg (C2)] antes del tratamiento y después de su tratamiento (TiO ₂ /UV, durante 12, 24, 48, 72 y 96 horas.	51
Figura 11. Comparación del contenido de hidroperóxido (HPC) en sangre de <i>Cyprinus carpio</i> expuesto a agua contaminada con 17-β-estradiol (E2)[1ng (C1) y 1μg (C2)] antes y después de su tratamiento (TiO ₂ /UV) durante 12, 24, 48, 72 y 96 h.	52

Figura 12. Comparación de contenido de proteínas carboniladas (PCC) en sangre de <i>Cyprinus carpio</i> expuesta a agua contaminada con 17-β-estradiol (E2)[1ng (C1) y 1μg (C2)] antes del tratamiento y después de su tratamiento (TiO ₂ /UV, durante 12, 24, 48, 72 y 96 h	53
Figura 13. Comparación de Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en sangre de <i>Cyprinus carpio</i> expuesta a agua contaminada con 17-β-estradiol (E2)[1ng (C1) y 1μg (C2)] antes del tratamiento y después al tratamiento (TiO ₂ /UV, durante 12, 24, 48, 72 y 96 h	54
Figura 14. Comparación de la Actividad de la catalasa (CAT) en sangre de <i>Cyprinus carpio</i> expuesta a agua contaminada con 17-β-estradiol (E2)[1ng (C1) y 1μg (C2)] antes de su tratamiento y después de su tratamiento (TiO ₂ /UV), durante 12, 24, 48, 72 y 96 h.....	55
Figura 15. Determinación de pH en músculo de <i>Cyprinus carpio</i> expuesta a 17-β-estradiol [1ng (C1) y 1μg (C2)] por 12, 24, 48, 72 y 96 h.....	56
Figura 16. Determinación de capacidad de retención de agua en músculo de <i>Cyprinus carpio</i> expuesta a 17-β-estradiol [1ng (C1) y 1μg (C2)] durante 12, 24, 48, 72 y 96 h.....	57
Figura 17. Contenido de grupos sulfhidrilo en músculo de <i>Cyprinus carpio</i> expuesta a 17-β-estradiol, durante 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la media de tres repeticiones ± SEM. Significativamente diferente de: * grupo control; ^a 12 h; ^b 24 h; ^c 48 h; ^d 72 h; ^e 96 h. (Bonferroni; p < 0.05).	58
Figura 18. Comportamiento de la solubilidad en músculo de <i>Cyprinus carpio</i> expuesta a 17-β-estradiol, durante 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la media de tres repeticiones ± SEM. Significativamente diferente de: * grupo control; ^a 12 h; ^b 24 h; ^c 48 h; ^d 72 h; ^e 96 h. (Bonferroni; p < 0.05).	59
Tabla 2. Análisis de perfil de textura en musculo de <i>Cyprinus carpio</i> expuesto a 17-β-estradiol en C ₁ = 1 ng/L y C ₂ = 1 μg/L, durante 12, 24, 48, 72 y 96 h.	60

RESUMEN

Debido a su amplio uso en hormonoterapia de sustitución, además de sus usos como promotor de crecimiento en la industria ganadera; el 17- β -estradiol es el fármaco esteroideo más prescrito alrededor del mundo, se reporta un consumo anual de 200,000 Ton. Derivado de su presencia en los cuerpos de agua, se han descrito varios efectos adversos sobre las especies presentes en los cuerpos de agua, además no se cuenta con la información suficiente sobre su potencial toxicológico. Por otra parte los tratamientos convencionales de aguas residuales no son eficaces para remover dichos contaminantes. Los procesos de oxidación avanzada (Advanced Oxidation Processes POAs) surgen como una alternativa para la degradación de contaminantes presentes en el agua. Basadas en foto excitar (UV 240 nm) un material semiconductor (TiO_2) en contacto con agua y en presencia de oxígeno, genera radicales hidroxilo ($\text{HO}\bullet$), capaces de oxidar moléculas orgánicas. Sin embargo, se debe probar los efectos de aguas tratadas con este método sobre organismos vivos. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de la fotocatalisis por TiO_2 en la eliminación de 17- β -estradiol (E2) (en concentraciones relevantes para el medio ambiente) y la toxicidad causada por este contaminante emergente. Después de 60 minutos de tratamiento de TiO_2 /UV a escala piloto (14 L), el E2 se eliminó del agua aproximadamente en un 85%. La toxicidad se evaluó utilizando *Cyprinus carpio* en acuarios de 100 L, se eligió como organismo bioindicador y biomarcadores de estrés oxidativo (BEO): nivel de peroxidación de lípidos (LPX), contenido de hidroperóxido (HPC) y contenido de carbonilo proteico (PCC) y enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Los resultados mostraron un incremento significativo en LPX, HPC, PCC ($p < 0.05$); así como incrementos significativos en la actividad de las enzimas antioxidantes en sangre, con respecto a los sistemas sin tratamiento con POAs contrastados con los testigos ($p < 0.05$). Mientras que con tratamiento fotocatalítico se encontró una reducción significativa de los BEO en aproximadamente 85%. Se encontró que el tratamiento fotocatalítico condujo a una reducción significativa de los BEO en aproximadamente 85-95%. Por lo cual se puede concluir que la fotocatalisis heterogénea por TiO_2 es un proceso eficiente para

disminuir los efectos tóxicos ocasionados por el E2. Lo cual coadyuvaría en remediar el agua contaminada con esta molécula.

ABSTRACT

Due to its wide use in hormone replacement therapy, in addition to its uses as a growth promoter in the livestock industry; 17- β -estradiol is the most prescribed steroid drug around the world, an annual consumption of 200,000 Ton is reported. Derived from its presence in water bodies, several adverse effects on species present in water bodies have been described, and there is not enough information on its toxicological potential. On the other hand, conventional wastewater treatments are not effective in removing these contaminants. Advanced Oxidation Processes (POAs) arise as an alternative for the degradation of contaminants present in water. Based on photo excitar (UV 240 nm) a semiconductor material (TiO₂) in contact with water and in the presence of oxygen, generates hydroxyl radicals (HO \cdot), capable of oxidizing organic molecules. However, the effects of water treated with this method on living organisms must be tested. The objective of this study was to evaluate the efficacy of TiO₂ photocatalysis in the elimination of 17- β -estradiol (E2) (in environmentally relevant concentrations) and the toxicity caused by this emerging pollutant. After 60 minutes of TiO₂/UV treatment on a pilot scale (14 L), E2 was removed from the water by approximately 85%. Toxicity was evaluated using *Cyprinus carpio* in 100 L aquariums, bioindicator organism and oxidative stress biomarkers (BEO) were chosen: lipid peroxidation level (LPX), hydroperoxide content (HPC) and protein carbonyl content (PCC) and superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzymes. The results showed a significant increase in LPX, HPC, PCC ($p < 0.05$); as well as significant increases in the activity of antioxidant enzymes in the blood, with respect to the systems without treatment with POAs contrasted with the controls ($p < 0.05$). While with photocatalytic treatment a significant reduction of the BEO in approximately 85% was found. Photocatalytic treatment was found to lead to a significant reduction in OBEs by approximately 85-95%. Therefore, it can be concluded that heterogeneous photocatalysis by TiO₂ is an efficient process to diminish the toxic effects caused by E2. This would help to remedy the water contaminated with this molecule.

1. INTRODUCCIÓN

Los recursos naturales habían sido considerados disponibles para cualquier uso antropogénico, sin embargo, con el crecimiento poblacional y el mal uso de ellos los han contaminado. Tal es el caso del agua, que es contaminada con compuestos orgánicos e inorgánicos. Una de las vías de contaminación son los vertederos de aguas residuales, plantas potabilizadoras y presas, cuyo cause sirve como reservorio de agentes contaminantes. En dichos sistemas se encuentran inmersos un sin número de sustancias como aditivos para gasolina, pesticidas, retardantes de flama, cosméticos, productos del cuidado personal y los fármacos. Dichos compuestos son susceptibles a transformaciones bióticas y abióticas, generando metabolitos más tóxicos, capaces de ocasionar efectos tóxicos como estrés oxidativo, genotoxicidad y citotoxicidad, disminución de la capacidad reproductiva en la ictiofauna; se han detectado en aguas superficiales en concentraciones de $\text{pg}\cdot\text{L}^{-1}$ a $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ y $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Una vez liberados, pueden reaccionar a través de numerosas vías, como la fotólisis por radiación solar, acumulación, interacciones con otras moléculas. El conocimiento de los efectos tóxicos, además de que los compuestos farmacéuticos son diseñados para tener un efecto biológico; son elementos a considerar para una correcta determinación del impacto que provoca su constante introducción en el ambiente. Se vuelve necesario estudiar su comportamiento en el medio y proponer técnicas de tratamiento que puedan eliminarlos. Con respecto a las técnicas de tratamiento de aguas, se ha demostrado que la fotocatalisis heterogénea con TiO_2 es una alternativa eficaz para la eliminación de sustancias orgánicas en matrices acuosas. El uso de biomarcadores en cuerpos de agua, como los de estrés oxidativo empleando diversos bioindicadores puede aportar respuestas bioquímicas que muestran la salubridad del cuerpo de agua. Por otra parte, *Cyprinus carpio* como bioindicador, ofrece un fácil mantenimiento en el laboratorio, una abundante producción dentro el Estado de México, sobretodo alta sensibilidad a las concentraciones de sustancias contaminantes. Es por todo ello que el propósito de este trabajo fue evaluar la eficacia de la fotocatalisis por TiO_2 en la eliminación de 17- β -estradiol (E2) (en concentraciones mínimas relevantes para el medio ambiente) y la toxicidad causada por este contaminante emergente.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Contaminación

La contaminación es una serie de cambios negativos en las características físicas, químicas o biológicas del aire, tierra y agua, que afectan a la vida. Si un contaminante se encuentra en un medio distinto al de su origen se considera contaminación derivada de la actividad humana que son precursoras de efectos en la salud. Ésta es la principal causa de problemas de salud, debido al tipo de contaminantes que emite (Bermúdez, 2010).

Los contaminantes se clasifican en físicos, biológicos y químicos. Dentro del grupo de los químicos, se consideran las sustancias orgánicas e inorgánicas, que, durante la fabricación, manejo, uso y desecho, ingresan al ambiente en forma líquida, sólida o gaseosa, generando efectos irritantes, asfixiantes, mutagénicos, teratogénicos y cancerígenos en los organismos. La mayoría son altamente persistentes en el ambiente, consisten en especies químicas de cadena larga, que pueden ser concentrados, o magnificados biológicamente durante los ciclos biogeoquímicos y por las cadenas tróficas (Atilio de la Orden, 2000; Mancera, 2002; Bermúdez, 2010).

2.2. Contaminación del agua

EL agua se encuentra contaminada cuando su composición se ve alterada y no reúne las condiciones necesarias para su uso (Bermúdez, 2010; OMS, 2003). Es un recurso natural indispensable para cualquier proceso biológico. Debido al crecimiento poblacional, así como el uso inadecuado se ha alterado. Infinidad de sustancias biológicamente activas utilizadas en los procesos productivos son vertidas al medio sin percibir sus consecuencias (Atilio, 2000).

Así mismo la escasez del agua va en incremento ocasionado por la eutrofización del medio ambiente, la contaminación del agua pone en riesgo a la salud pública, dificulta el abastecimiento del agua potable, afecta a la pesca y a la agricultura (Atilio, 2000). La concentración de los elementos tóxicos presentes en el medio, tiene su origen en el ciclo de agua, en donde se genera su alteración, por medio de la entrada a los sistemas acuáticos de aguas residuales urbanas, industriales y las de origen agropecuario (Figura 1) (Barceló & de Alda, 2009).

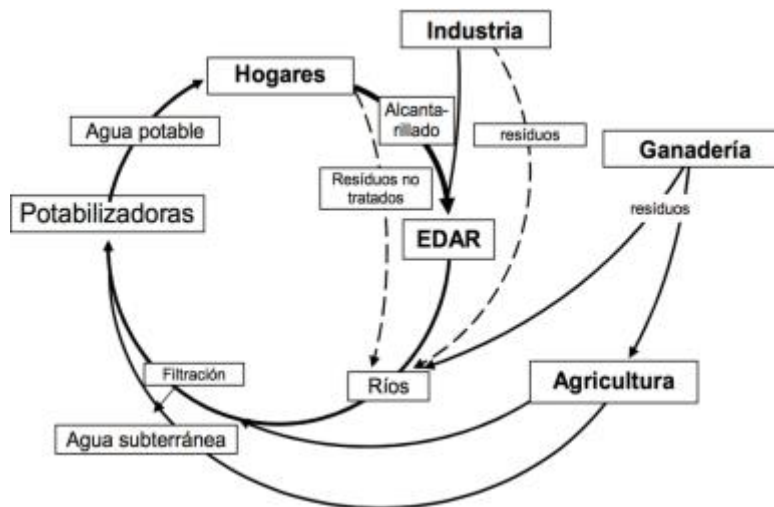


Figura 1. Ciclo del agua (Barceló & de Alda, 2009)

La actividad humana genera innumerables sustancias químicas y biológicas, que son desechadas a los cuerpos de agua. Dependiendo de sus características fisicoquímicas, toxicológicas y de sus concentraciones en el ambiente estos agentes causan alteraciones en la calidad del agua (Ramírez R. & Mendoza C., 2008). Los compuestos orgánicos e inorgánicos, están disueltos en los cuerpos de agua, facilitando su absorción por diferentes organismos acuáticos. Son absorbidos por sedimentos o sólidos suspendidos, así mismo, al ser persistentes se acumulan en las profundidades de los cuerpos de agua. Pueden producir un decremento en la población de especies acuáticas de consumo humano. Llegando a degradar los ecosistemas por la denominada eutrofización, alterar las cadenas tróficas y la vida de los organismos acuáticos y el balance ambiental (Manahan S.E. 2007; Mendoza *et al.*, 2007; Kerdan, 2008). La contaminación del agua es uno de los problemas que afecta a México, así como la disponibilidad de la misma es cada vez menor, por lo que se debe replantear una política hídrica (SEMARNAT-CNA, 2005).

2.3. Contaminantes emergentes en el agua

Éstos compuestos son de distinto origen químico, sus concentraciones en el ambiente son casi imperceptibles. Se descargan continuamente al ambiente, no están regulados por la normatividad vigente, pueden impactar negativamente en el ambiente, a las especies presentes, así como en la salud humana.

Existen estudios previos alrededor del mundo donde han detectado concentraciones de ngL^{-1} a μgL^{-1} , son escasos los datos de incidencia, daños ecotoxicológicos y la variación en sus concentraciones (Kummerer, 2010; Gilbert *et al.*, 2012). La principal vía de entrada en el medio acuático son las aguas residuales, urbanas, industriales y agropecuarias (Figura 1). La prevalencia de una u otra depende en gran medida del nivel de depuración natural que experimentan. Dentro de este grupo también se encuentran a las denominadas sustancias prioritarias del agua (Consuelo *et al.*, 2004; Barceló *et al.*, 2007).

Así también se reporta a los plastificantes, surfactantes y productos para la higiene personal, aditivos para gasolina y fármacos (Petrie *et al.*, 2015; Richardson & Kimura, 2016). Estas sustancias se han reconocido como una amenaza constante para la estabilidad del medio ambiente (Galar-Martínez *et al.*, 2010). En los últimos años se ha expresado una preocupación sobre la prevalencia en el medio acuático de hormonas esteroides (estrógenos, progestágenos y andrógenos), mismos que pueden influir y modificar las funciones endocrinas en animales, por lo que se han denominado como disruptores endocrinos (Matozzo and Marin, 2008).

2.3.1. Compuestos orgánicos

Son compuestos en cuya estructura contiene carbono. Su estructura, tamaño, forma molecular y presencia de grupos funcionales determinan su toxicidad. Se tiene a los bifenilos policlorados (PCBs), son utilizados por sus propiedades físicas; generalmente como líquidos viscosos estables, fluidos hidráulicos, aislantes y plastificantes. Existen alrededor de 209 congéneres de PCB, de los cuales 120 son productos comerciales, tales como Aroclor 1254, Aroclor 1260 y Clofen A60. Tienen baja solubilidad en agua va de $2.7 \mu\text{gL}^{-1}$ a $21 \mu\text{gL}^{-1}$, pero alta solubilidad en aceites y solventes orgánicos de baja polaridad (liposolubles). Otro ejemplo son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son productos de la combustión de los derivados de petróleo. Se pueden encontrar en sedimentos de agua dulce, de agua marina y la atmósfera. Las actividades antropogénicas son la principal fuente de emisión de HAP (Consuelo *et al.*, 2004). Son relevantes ya que una vez en el medio, estos productos pueden interactuar con otras moléculas como los fármacos, resultando en un sinergismo y potenciación en las concentraciones de los compuestos farmacéuticos.

2.3.2. Surfactantes

Un detergente se compone de surfactantes, que forman materia activa capaz de concentrarse en las regiones interface aceite-agua, líquido-gas y líquido-sólido. Su estructura química posee dos regiones; una hidrófoba (apolar) que tiene afinidad por disolventes orgánicos o apolares; cadena hidrocarbonada de tipo alquil benceno. La otra es la porción hidrófila (polar), que tiene atracción hacia disolventes polares. Formada por átomos de oxígeno, azufre, fosfato o nitrógeno, incluidos en grupos funcionales como alcoholes, éteres, ésteres, ácidos, sulfatos, fosfatos, amina. Los surfactantes entran en los cuerpos de agua disueltos o absorbidos, la cloración puede aumentar su efecto, ya que son responsables de la formación de espumas en aguas superficiales, la espuma también disminuye los niveles de O₂, reduce los procesos de auto purificación natural, propiciando la aparición de algas; indicativo de contaminación por detergentes. Las algas cubren la superficie del agua, conforme van muriendo se convierten en alimento de las bacterias, mismas que a su vez consumen oxígeno para descomponer a las algas, lo que genera la disminución de oxígeno a un nivel que es incapaz de soportar otras formas de vida; inhibiendo el proceso de la fotosíntesis, ocasionando la muerte de la flora y fauna acuáticas. A los peces les producen lesiones en las branquias, dificultándoles la respiración y provocándoles la muerte (Sánchez Molina L, 2006; Méndez Díaz, 2008).

2.3.3. Metales pesados

La contaminación por metales es una de las más nocivas para los ecosistemas acuáticos como para el humano. Los peces bioconcentran dichos compuestos, por lo que su consumo se puede convertir en un problema de salud en la población. Los principales son cadmio, mercurio, cromo, cobalto, cobre, molibdeno, níquel, plomo, estaño, titanio, vanadio, zinc y plata, son sustancias con estabilidad química ante los procesos de biodegradación. Los seres vivos son incapaces de metabolizarlos, generando una bioacumulación y un efecto multiplicador en la concentración del contaminante en la cadena trófica. Alcanzan niveles altos de toxicidad y se absorben a través de las membranas biológicas por su afinidad química por el grupo sulfhídrico de las proteínas. Sus concentraciones son más altas en los sedimentos, o en las especies presentes (NMX-AA-051, 2001).

Los peces por representar varios niveles de la cadena alimenticia, son excelentes indicadores de contaminación por metales pesados, ya que pueden bioacumular y biomagnificar altas concentraciones de estos elementos (Mancera Rodríguez *et al.*, 2006). La OMS establece como máxima concentración en agua debe estar en un rango de 0.01-1 ppm. Estudios reportan concentraciones de iones de metales pesados hasta de 450 ppm en efluentes. La acción tóxica de un metal puede inhibir la respiración celular, interferir la actividad de los sistemas enzimáticos, irritación o corrosión de epitelios, desarrollar procesos cancerígenos, así como desequilibrio electrolítico de los fluidos intra y extracelulares (Tejada Tovar C *et al.*, 2015; Consuelo *et al.*, 2004).

2.3.4. Productos farmacéuticos

Aproximadamente 170 fármacos se usan en cantidades mayores a una tonelada por año. En la actualidad los países desarrollados, confirman la presencia de fármacos en todo el medio acuático. Así mismo, se ha detectado una amplia variedad de productos farmacéuticos en aguas superficiales y subterráneas (Pérez *et al.*, 2016; Bernes, 2008). Las aguas residuales de las plantas tratadoras, domésticas e industriales, los efluentes hospitalarios y las actividades agropecuarias son la principal vía de acceso de estos productos a los cuerpos de agua (Poynton *et al.*, 2009). El hallazgo de algunos como el ibuprofeno, diclofenaco y 17- β -estradiol en agua potable, ha desencadenado una preocupación, por los potenciales riesgos que representan, como la disrupción endocrina, citotoxicidad y genotoxicidad (Delgado, 2011). Las características fisicoquímicas de los fármacos, su persistencia, su alta solubilidad en agua, los productos de su metabolismo y degradación; contaminan los acuíferos o se pueden acumular en el suelo afectando al ecosistema y al humano a través de la cadena trófica (Barceló *et al.*, 2009). Las plantas de tratamiento convencionales de aguas residuales no están diseñadas para eliminarlos, aunado a lo anterior, éste tipo de compuestos pueden sufrir transformaciones bióticas y abióticas generando metabolitos aún más nocivos que los compuestos originales (Gil *et al.*, 2012). Las concentraciones de fármacos en efluentes y aguas superficiales dependen de la eficiencia en los procesos de remoción, además de que dichas aguas se utilizan como fuente de agua potable (Farré *et al.*, 2008).

2.3.5. Fármacos hormonales

Son derivados del colesterol, producidos en el ovario. Diversos esteroides son mensajeros químicos y desencadenan diversas respuestas en los órganos, como es el caso de las hormonas sexuales. En los humanos, las hormonas sexuales se agrupan en tres categorías: estrógenos (femeninos), andrógenos (masculinos) y progestinas (embarazo) (Fox y Whitesell, 2000).

Los principales son la estrona (progesterona), el estradiol (testosterona) y el estriol (androsterona). La estrona (E1) y 17 β -estradiol (E2) son hormonas sexuales femeninas de origen natural. El 17 α -etinilestradiol (EE2) es una hormona sintética y principal componente de la píldora anticonceptiva.

E1 y E2 se derivan de las excreciones de humanos y del ganado (Lintelmann *et al.*, 2003). Los fármacos esteroideos son usados como métodos anticonceptivos y en terapia de reemplazo hormonal, sin embargo, su uso ha manifestado un mayor riesgo a cáncer de mama y de ovario (El Habachi *et al.*, 2015a).

Uno de los más comunes es el 17- β -estradiol (E2), el cual al ser metabolizado experimenta reacciones de hidroxilación, de reducción y oxidación por metilación, y conjugación por las enzimas del citocromo P450 del hígado, finalmente se elimina por vía renal en forma de estriol y estrona.

Estudios reportan que los conjugados de E2 liberados al ambiente, tienen actividad biológica directa, son repositorios hormonales debido a que pueden ser reconvertidos a E2 por ciertas bacterias (Heffron *et al.*, 2016).

Dichas hormonas presentan un coeficiente de partición octanol-agua elevado (log Kow= 3,6–4,0) por lo que permanecen retenidas en la materia orgánica. Son degradables bajo condiciones aerobias; más, son inalteradas bajo condiciones anaerobias. Las hormonas tienen cierta resistencia a la biodegradación (Lai *et al.*, 2000).

2.3.6. 17- β -estradiol

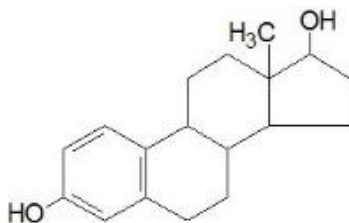


Figura 2. Estructura química del 17- β -estradiol

Nombre químico: Beta-Estradiol; 17-beta-estradiol; 50-282; Estradiol; Dihidrofoliculina

Fórmula química: C₁₈H₂₄O₂

Log Kow: 3.6 – 4.0

Log D (pH 7.4): 100 **pka:** 4.68

Solubilidad en agua (g/L):

Clasificación farmacológica: Hormona esteroidea

Clasificación terapéutica: Terapia de sustitución hormonal

2.3.7. Características generales del 17- β -estradiol

Hormona esteroide derivada del ciclopentanoperidrofenantreno, se forma de la división de la cadena lateral, usando las vías delta-5 o delta-4, utilizando androstenediona como intermediario. Una fracción de la androstenediona es convertida a testosterona; la androstenediona es aromatizada a estrona, que posteriormente es convertida a estradiol (Harris, 2000; Higashitani *et al.*, 2003). Es un esteroide de 18 carbonos, contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3) y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica, de la que depende la unión selectiva y alta afinidad a receptores de estrógenos (Jordan *et al.*, 1985; Duax *et al.*, 1988). El estradiol entra a las células e interactúa con el receptor estrogénico. Después de que el receptor estrogénico se une a su ligando, el estradiol entra al núcleo celular objetivo y regular la transcripción genética, que lleva a la formación del ARN mensajero. El ARNm interactúa con los ribosomas para producir púricas que expresan el efecto del estradiol. El estradiol es muy compatible con ambos receptores estrogénicos, Er α y Er β ; a diferencia de los estrógenos sintéticos que actúan en uno de estos receptores. Estos son llamados moduladores selectivos de los receptores estrogénicos, o por el acrónimo en inglés SERMs (Solé 2003; Lavado *et al.*, 2004).

2.3.8. Farmacodinamia del 17- β -estradiol

El estradiol (Figura 2) atraviesa la membrana celular para llegar al núcleo, donde activan o

desactivan determinados genes, regulan la síntesis de proteínas e inducen fenómenos de proliferación celular donde se une a receptores específicos (Dimogerontas, Liapi, 2014). Este complejo interactúa con el ADN genómico alterando la actividad transcripcional; lo que aumenta o disminuye la síntesis proteica. En consecuencia, disminuye el efecto en los niveles circulantes de renina sustrato (globulina que se une a la tiroides, globulina que se une a las hormonas sexuales y globulina que se une al cortisol). Los estrógenos son transportados a en la sangre, acceden a la célula mediante la unión con las proteínas SHBG (globulina fijadora de hormona sexual). Una vez que los estrógenos enlazados llegan a la membrana celular se disocian y entran a la célula. Se enlazan a sus receptores ER α y ER β , formando un complejo para entrar al núcleo, donde se ligan al ADN que regula genes respuesta a estrógenos (Hammond, 1995; Hileman, 1994). Tanto las hormonas naturales (E1 y E2) como la sintética (EE2) tienen un comportamiento descrito como disruptor endocrino, pudiendo ocasionar reducción de la fertilidad en algunos organismos acuáticos (Okamoto et al., 2002; Imming et al., 2006; Overington et al., 2006).

2.3.9. Farmacocinética del 17- β -estradiol

Absorción: después de la administración oral el estradiol es rápidamente absorbido por el tracto gastrointestinal y es extensamente metabolizado por la mucosa intestinal y el hígado durante el primer pasaje hepático. (Guyton, A.C., 2006).

Distribución: se distribuye en los tejidos del cuerpo con concentraciones séricas y tisulares adecuadas en la mayoría de los tejidos, y se une a la albúmina (60%) y a la globulina, que se une a las hormonas sexuales (40%) en suero. Penetra el Sistema Nervioso Central. Al tratarse de una sustancia poco lipofílica, su penetración intracelular también es escasa (Bermont *et al.*, 2001).

Biotransformación: la fracción que se une a las proteínas sanguíneas permanece inalterada después de la liberación transdérmica de estradiol. El estradiol es rápidamente eliminado de la circulación sistémica. La vida media de eliminación es de alrededor de 24 h de la administración. Es metabolizado en estrona farmacológicamente menos activa y sus conjugados. El estradiol, la estrona y la estrona-sulfato se interconvierten entre sí y son excretados en la orina como glucurónidos y sulfatos. La piel metaboliza el estradiol sólo en un menor grado. La vida media

sérica promedio de estradiol fue 5 a 11 horas después de la remoción del parche, lo que indica el efecto depot en la piel (Hewit *et al.*, 2005). El 17- β -estradiol experimenta un complejo metabolismo en los tejidos periféricos y en el hígado que comprende una oxidación reversible a estrona y una hidroxilación irreversible en C-2 y C-16 (Ruta 17) (Cavaliery *et al.*, 2000).

Excreción: la eliminación comienza en el hígado con el ataque de la 16 α -hidroxilasa al estradiol para producir estriol (Figura 3). Éste representa la reacción irreversible con la cual comienza la degradación del estradiol. Los metabolitos se conjugan con sulfatos a través de la ruta de sulfatación o glucurónico, y se excretan por vía renal (70%) o bien por vía biliar (27%) y por la lactancia (3%).

Los metabolitos biliares pueden sufrir más transformaciones metabólicas por acción de la flora intestinal siendo reabsorbidos en la circulación. Dentro de los metabolitos del estradiol, puede estar el derivado 2-hidroílico, derivado que en conjunto reciben el nombre de catecol-estrógenos.

La conversión en catecol-estrógenos tiene lugar en diferentes tejidos, entre ellos el cerebro (Cavaliery *et al.*, 2000; Lierth 2000, Thompson, 2000; Yager, 2000). La síntesis de estriol en el hígado por la acción de la 16 α -hidroxilasa representa el inicio de la degradación del estradiol y su posterior eliminación. Posteriormente el estriol es atacado por sulfatasas y glucuronidasas en los carbonos 3 y 16, dando lugar a los respectivos derivados solubles, que se excretan por vía biliar.

Parte de ellos es reabsorbida por la circulación enterohepática y finalmente son eliminados por la orina. La estrona sigue una ruta similar, con la salvedad de que antes o después es atacada por la 17-OH hidroxiesteroide deshidrogenasa y termina en los mismos productos (Cavaliery *et al.*, 2000).

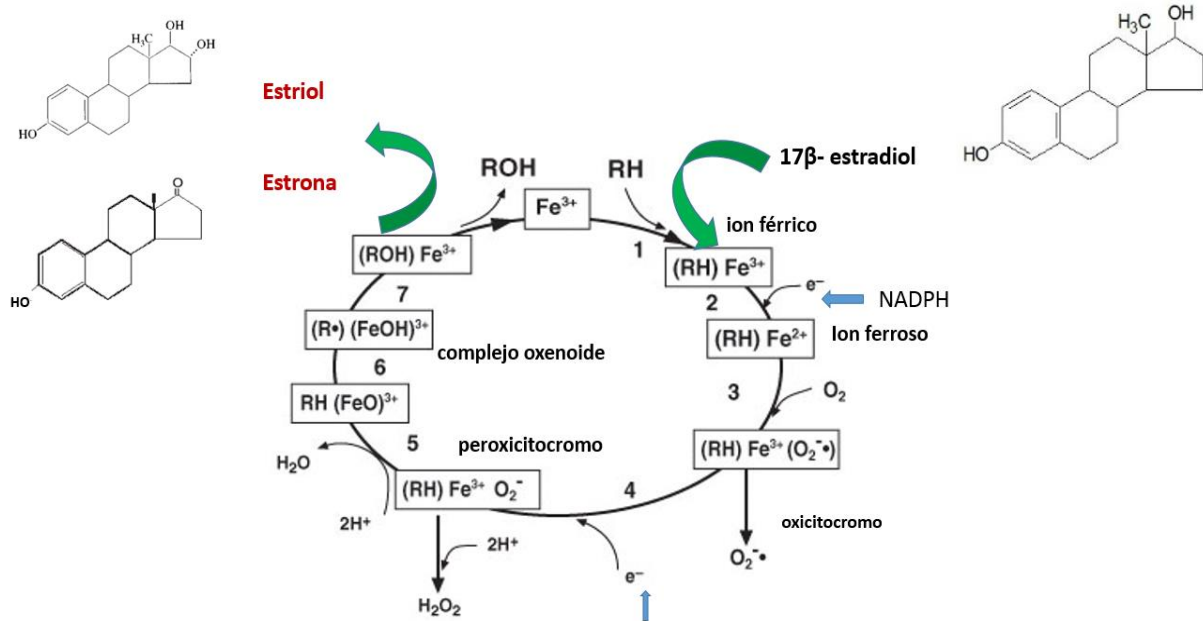


Figura 3. Metabolismo-oxidación de 17-β-estradiol (Thomson, 2000)

2.4. Coeficiente de Riesgo Ambiental para 17-β-estradiol

La División de Protección Pecuaria en 2011 mencionó que, el análisis de riesgo es la metodología utilizada para evaluar los efectos tóxicos sobre el medio ambiente, para el caso de los medicamentos de uso en humano y los de uso veterinario, como el 17-β-estradiol, establecida por la “International Cooperation and Harmonization of Technical Requirements for Registration for Veterinary Medicinal Products”. Permite determinar un coeficiente de riesgo ambiental, a través de la aplicación de dos guías:

GL 6: Environmental Impact Assessment (EIAs) for Veterinary Medical Products (VMPs) Phase I; y

GL 38: Environmental Impact Assessment (EIAs) for Veterinary Medical Products (VMPs) Phase II.

La guía GL 38 (Fase II) evaluación cuantitativa, que permite determinar un coeficiente de riesgo (RQ), obtenido entre la concentración ambiental estimada (PEC) y la concentración estimada sin efecto ecológico (PNEC)

RQ: PEC/PNEC; donde:

PEC: concentración ambiental estimada: es la estimación de la máxima cantidad de producto que se libera al medio ambiente en condiciones reales de aplicación.

PNEC: concentración sin efecto estimada: se obtiene de bioensayos toxicológicos, cuyo valor resultante es dividido por un factor de seguridad (AF), y se calcula de esta manera: **LC50/AF**

LC50: concentración de sustancia que genera mortalidad de 50% de la población expuesta en un bioensayo. **C50/AF ó NOEC/AF**

EC50: concentración de una sustancia que produce efectos adversos, tanto muertes como efectos subletales del 50% de los individuos expuestos en un bioensayo.

NOEC: concentración de efecto no observado. Concentración de una sustancia probada en un bioensayo que no produce efectos adversos.

AF: factor de seguridad, constantes que se aplican según el nivel de incertidumbre que se tenga en la variable estudiada.

Si el resultado de la evaluación, indique que el coeficiente de riesgo (RQ) es >1.000 ; se considera que los productos farmacéuticos de uso veterinario provocan daño al ambiente. En caso de estar bajo revisión no se podrían registrar. Por el contrario, si este coeficiente presenta un valor entre 100 y 1.000, dicho fármaco debería de entrar a un programa de monitoreo ambiental que permita aplicar medidas frente a situaciones de riesgo ambiental. Se considera que los productos farmacéuticos de uso veterinario son seguros para el medio ambiente, cuando el resultado de la evaluación de la ecotoxicidad en condiciones nacionales indique que el coeficiente de riesgo (RQ) es ≤ 100 (División de Protección Pecuaria, 2011).

Se ha sugerido futuras investigaciones para 17- β -estradiol; como un monitoreo ambiental continuo y futuras investigaciones toxicológicas.

Así mismo en 2013, la Unión Europea clasificó al 17- β -estradiol como "sustancia prioritaria" en el monitoreo ambiental y en la priorización de estudios toxicológicos (Park y Choi, 2008; Boxall *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos, no representan riesgo de efectos tóxicos agudos en el ambiente, sin embargo, no se excluye la posibilidad de efectos tóxicos crónicos en el ambiente. Las normas del CODEX para la hormona en cuestión contemplan "la ausencia de riesgos apreciables derivados de la exposición" (definición de IDA según la OMS, 1996, 2001 y el CVMP, 2005). Este criterio se basa en la conclusión del JECFA de que hay umbrales para todos los efectos adversos posibles de las hormonas. Ligado a esto nunca se ha cuantificado el posible nivel de riesgo residual, pero se considera aceptable. La norma del CODEX es equivalente al objetivo expreso por la Unión Europea

de "no asumir riesgos derivados de la exposición a residuos adicionales derivados del metabolismo hormonal" (Damstra T *et al.*, 2002).

2.4.1. Datos de ocurrencia del 17- β -estradiol en el ambiente

Gurr y Reinhard en 2006 reportaron que la concentración en el medio acuático de los contaminantes puede disminuir, debido a los diferentes procesos que sufren las sustancias farmacéuticas, dentro de ellos están la dispersión y dilución, volatilización, sorción, fotólisis, biodegradación, bioacumulación y biotransformación. Por otra parte, se menciona que la fotodegradación por radiación solar y la degradación biótica, fungen como los procesos principales en la degradación de contaminantes de los cuerpos de agua (Vincenzo y Rizzo, 2012). Los fármacos hormonales como el 17- β -estradiol, tiene una vida media de 96 h en los ambientes acuáticos. La estructura química del 17- β -estradiol se degrada por hidrólisis en ambientes ácidos y básicos, también se puede acumular un porcentaje en los lodos. La degradación del 17- β -estradiol en medio acuoso con la apertura del anillo fenólico, catalizada por la presencia de metales bivalentes como Ca^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} y Zn^{+2} o por la presencia de enzimas bacterianas, generando como producto final metabolitos de estriol y estrona (Vincenzo y Rizzo, 2009).

Desbrow *et al.* (1998) reportaron que en los efluentes de siete plantas de tratamiento que descargaban a ríos de Inglaterra hallaron estradiol, estrona y etinilestradiol, en concentraciones de 50, 80 y 7 ngL^{-1} respectivamente. Los estrógenos naturales y sintéticos E1 y E2 se han detectado con mayor frecuencia; la concentración media/mediana en los efluentes de las aguas residuales se encuentra en un intervalo de 20-55 ng/L para E1 y de 9-20 ng/L para E2. Mientras que en aguas superficiales las concentraciones reportadas en los últimos años para estos dos estrógenos han oscilado entre 0.7 y 143 ng/L para E1 y entre 1.4 y 34 ng/L para E2.

En México, encontraron la presencia, entre otros disruptores endocrinos, de estradiol y estrona en Xochimilco, Ciudad de México. Las concentraciones encontradas por estos autores fueron estradiol (1.68 $\text{ng}/\mu\text{L}$) y estrona (10.38 $\text{ng}/\mu\text{L}$). Pese a que las concentraciones encontradas no representan riesgo para el ecosistema, podría generar estrés a las especies presentes como el ajolote (*A. mexicanum*) y la codorniz de Moctezuma (*C. montezumae*) (Díaz-Torres *et al.*, 2013)

De igual forma el estradiol se detectó en muestras de agua subterránea a una concentración de 5 ng.L⁻¹ y en acuíferos en Arkansas en un rango de concentración de 6.66 ng.L⁻¹. Se asoció con los residuos de estiércol de aves de corral y ganado (Ying GG *et al*, 2009).

El estradiol se detectó en fuentes de agua potable tomadas de las empresas de agua de EE. UU., entre 2006 y 2007 a una concentración máxima de 17 ng.L⁻¹ (Benotti MJ *et al*, 2008).

Mientras que para agua superficial se reportaron concentraciones de 17-β-estradiol a una concentración de 0.093 µg.L⁻¹ en escorrentías de EE.UU. Se detectaron concentraciones 1.7 y 25 ng.L⁻¹ en muestras de agua de áreas de pastoreo en California. Entre abril de 2005 y Marzo de 2006, se detectó 17-β-estradiol, en muestras de granjas lecheras, con una concentración de 0.7 ng.L⁻¹ (Khanal SK *et al*, 2006a).

Existen reportes de concentraciones de estrógenos en leche entera y comercial; el rango de concentración de 17-β-estradiol fue de 4 a 14 pg.mL⁻¹. Las proporciones de estradiol activo en la grasa de la leche por el marcador radiactivo en la leche separada fueron del 65%. La diálisis de equilibrio de la leche desnatada con estrógenos, mostró que 84 a 85% del estradiol estaba unido a proteínas. Las proteínas del suero demostraron una mayor capacidad de unión que la caseína. Este resultado fue confirmado por un radioinmunoensayo de requesón seco y suero de leche. La concentración en cuajada fue de 11 pg.g⁻¹ y en suero 2 pg.mL⁻¹. La mantequilla fue más alta con una concentración de 82 pg.g⁻¹ (Khanal SK *et al*, 2006b)

Los estrógenos representan un riesgo toxicológico debido a su alto índice de persistencia y acumulación en los ecosistemas (Díaz-Torres, 2013). La excreción hormonal es de estradiol 1.6, estrona 3.9 y estriol 1.5 µg en hombres; y estradiol 3.5, estrona 8 y estriol 4.8 µg en mujeres (Petrovic, *et al.*, 2008).

Siendo las aguas residuales municipales la principal vía de estrógenos en los cuerpos receptores. En México, se han reportado concentraciones de estradiol (1.68 ngµL⁻¹) y estrona (10.38 ngµL⁻¹) en la zona de Xochimilco (Díaz-Torres *et al.*, 2013; Jarošová, 2014). Aunado a esto la EPA (2013) incorporó en su lista de evaluación de nuevos contaminantes al estradiol, estriol, estrona y etinilestradiol, debido a que hay evidencias que demuestran su actividad como disruptores endocrinos. El estradiol irradiado con una lámpara de xenón exhibió una vida media de 2 h en agua de río y de 41.7 h en agua purificada, por lo que el estradiol puede ser susceptible a

fotólisis directa de luz solar. Además si el estradiol es liberado al suelo, no tenga movilidad, así mismo no se adsorba a los sólidos suspendidos, sino en los sedimentos (Koc 30,000).

Un BCF de 200 sugiere que el potencial de bioconcentración en organismos acuáticos es alto. Los datos de monitoreo indican que la población puede estar expuesta a estradiol a través de la ingestión de agua potable y el contacto dérmico con sedimentos contaminados. Como parte de los procesos de biodegradación los estrógenos conjugados se hidrolizan en estrógenos libres y glucurónido/ácido sulfúrico en presencia de *Escherichia coli*.

2.4.2. Datos de toxicidad del 17- β -estradiol

Son escasos los estudios donde se reporten los efectos del 17- β -estradiol en los ambientes acuáticos, debido a que no está descrito como sustancia tóxica importante, sin embargo, existen reportes de sus efectos en algunas especies. Varios estudios han publicado la presencia de estrógenos en efluentes de plantas de tratamiento y aguas superficiales en concentraciones medias de 0,03 a 0,16 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Hewitt, *et al.*, 2005).

Uno de los primeros estudios sobre los efectos de los estrógenos en la vida silvestre, reportado por Hileman (1994), en huevos de lagarto. El estudio consistió en que algunos huevos fueron expuestos a estradiol y otros a un subproducto del DDT, controlando la temperatura de incubación, 80% de los huevos expuestos a estradiol generó hembras; mientras que los huevos con el subproducto de DDT produjeron 20% hembras y 40% machos. Se ha confirmado que los estrógenos son responsables de alteraciones endocrinas en ambientes acuáticos (Petrovic *et al.* 2008). Algunas de las alteraciones son hermafroditismo en peces, desarrollo de órganos sexuales deformados en lagartos y tortugas, comportamiento de anidación anormal, cascarones delgados, y disfunciones en el sistema inmune y reproductivo en focas grises (Dimogerontas & Liapi, 2014). El género en peces adultos ya está determinado. Sin embargo, cuando los peces machos son expuestos a hormonas, se inducen cambios hacia características sexuales típicas de hembras. Se ha observado que una forma de determinar la exposición de peces a estrógenos es con la medición de la vitelogenina (biomarcador). La vitelogenina se encuentra por lo regular en las hembras de peces y huevos. Sin embargo, cuando los peces machos son expuestos a estrógenos, pueden producir grandes cantidades de vitelogenina (Gilbert, 2012).

Hileman (1994) confinaron trucha arcoíris cerca de una descarga de agua residual en Inglaterra encontraron que la concentración de vitelogenina en los peces fue 500 veces mayor de lo normal. En estudios posteriores, Desbrow *et al.* (1998) sugirieron que los estrógenos estradiol, estrona y etinilestradiol podían ser los responsables de la síntesis de vitelogenina en los peces machos localizados corriente abajo de las descargas de aguas residuales.

Gilbert (2012) señaló que, en un muestreo en Inglaterra en 51 sitios, 86% de peces machos mostraba características intersexuales, lo cual fue atribuido principalmente al etinilestradiol descargado en efluentes de aguas municipales residuales.

En otro experimento, truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y rutilos (*Rutilus rutilus*) fueron expuestos durante 21 días a concentraciones de 1 a 10 ng.L⁻¹ de estradiol y estrona. Routledge *et al.* (1998) encontraron que dichas concentraciones eran suficientes para aumentar la síntesis de la proteína vitelogenina en los niveles observados en los peces del experimento de Desbrow *et al.* (1998).

La Unión Europea ha señalado efectos de los estrógenos en la población de peces por rangos de exposición al estradiol. Se encontró que para valores entre 0.1 y 0.2 ng.L⁻¹ hay efectos menores en los peces, en 1 ng.L⁻¹ hay expresión de vitelogenina en peces machos, en 4 ng.L⁻¹ se produce la expresión de características intersexuales y reducción de la fertilidad, y entre 5 y 6 ng.L⁻¹ se observa el colapso de la población de peces (Gilbert, 2012). Oetken *et al.* (2004) y Matozzo, et al., (2008) refieren que los efectos de los disruptores endocrinos (xenoestrógenos) en invertebrados no han recibido la atención suficiente.

Oetken *et al.* (2004) y Matozzo *et al.* (2008) reportaron efectos de estrógenos en invertebrados en el desarrollo y reproducción.

Prat, Rieradevall, Barata y Munné (2013), y Souza, Hallgren, Balseiro y Hansson (2013) investigaron el uso de invertebrados como biomarcadores de estrógenos en cuerpos de agua, midiendo el estrés oxidativo como biomarcador adicional a la vitelogenina en peces.

Expusieron trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y rutilos (*Rutilus rutilus*) durante 21 días a concentraciones de 1 a 10 ng.L⁻¹ de estradiol y estrona. Routledge *et al.* (1998) encontraron que dichas concentraciones eran suficientes para aumentar la síntesis de la proteína vitelogenina en los niveles observados en los peces del experimento de Desbrow *et al.* (1998).

De igual forma Swastika *et al*, (2015) reportaron que la exposición ovocitos de *Oryzias latipes* a una concentración de $470 \mu\text{g.L}^{-1}$ E2 durante 72 h produjo mortalidad, disminución de la eclosión, concentración inhibitoria del 50%.

Como resultado del análisis de los efluentes de varios tipos diferentes de plantas de tratamiento de desechos municipales en el centro de Michigan, se concluyó que las hormonas 17- β -estradiol es una sustancia con actividad estrogénica. Ocasionó en los peces machos la producción vitelogenina, un indicador aceptado de alteración endocrina (Geyer HJ *et al*, 2002).

2.4.3. Efectos de estrógenos como disruptores endocrinos

Los efectos como alteraciones en la membrana celular o en el contenido plasmático se producen cuando un receptor hormonal unido a un disruptor endócrino, se vincula con regiones específicas del ADN en el núcleo de la célula o durante la metabolización de los estrógenos (Hileman, 1994). Los efectos a nivel celular en humanos, cuando las concentraciones de estrógenos incrementan, se presenta el riesgo de producir cáncer de mama, de útero y testicular (Dimogerontas-Liapi, 2014).

Cavalieri *et al*. (2000) encontraron que el 17- β -estradiol, la estrona y el dietilbestrol inducen errores cromosomales y mutaciones de genes *in vitro* e *in vivo* en animales, por la generación de oxígeno reactivo durante la metabolización de los estrógenos. Describieron que las quinonas intermedias derivadas de la oxidación del 4-hidroxiestradiol o 4-hidroxiestrona pueden reaccionar con adenina y guanina del ADN para formar sitios mutagénicos.

El Programa de Toxicología de los Estados Unidos (National Toxicology Program, 2011) confirmó en 2002 que el 17- β -estradiol, estrona, 17- α -etinilestradiol y mestranol son potencialmente carcinógenos. De acuerdo con estudios epidemiológicos en humanos, el uso de estrógenos por mujeres en la etapa de posmenopausia y su uso como anticonceptivos está asociado con incrementos en el riesgo de cáncer de mama (Ramírez- Sánchez, 2015).

2.4.4. Procesos de oxidación avanzada

Los compuestos farmacéuticos son persistentes en los cuerpos de agua, e impactan negativamente en el ambiente. Debido a que son producidos cada vez más estables y resistentes a la biotransformación, es por ello que los tratamientos convencionales resultan ineficaces para su eliminación (Herrmann, J. 1999).

Los fármacos pueden permanecer invariables en las tratadoras de aguas residuales o pueden adsorberse en los fangos. La ineficiencia de los sistemas convencionales para remover sustancias tóxicas, desvela necesidad de desarrollar nuevos sistemas de tratamientos de aguas.

Los POAs son procesos fisicoquímicos en agua a presión y temperaturas cercanas a las condiciones ambientales; que generan radicales hidroxilos, que interaccionan con los compuestos orgánicos producen cambios en la estructura química de los contaminantes (Glaze *et al.*, 1987; Blesa, 2001).

Dentro de ellos, se tiene a la fotocatalisis heterogénea, que consiste en irradiar con luz natural o artificial, la suspensión de un semiconductor, con una energía igual o mayor que su ancho de banda (band gap), los electrones son promovidos a la banda de conducción (B.C.) dejando huecos positivos en la banda de valencia (B.V.) (Figura 4) (Gassim, F., 2007; Herrmann, J.M., 2010).

Doll *et al.*, 2005b, analizaron el desempeño de la fotocatalisis heterogénea con los catalizadores basados en TiO_2 (Hombikat UV100 y el Degussa P25) para degradar carbamezapina, imeprol, ácido clofibríco e iopromida. Los resultados demostraron que la fotocatalisis heterogénea eliminó satisfactoriamente estos contaminantes emergentes.

Investigaciones recientes han aplicado Procesos de Oxidación Avanzada (POAs) para eliminar estos contaminantes, como la fotocatalisis heterogénea con TiO_2 analizaron la pérdida de actividad hormonal del estradiol con fotocatalisis con TiO_2 (Coleman *et al.*, 2008).

Méndez-Arriaga en 2010 estudiaron el efecto de adicionar H_2O_2 en el desempeño de la fotocatalisis basada en TiO_2 , para degradar ibuprofeno. La adición de peróxido mejoró el desempeño de la fotocatalisis heterogénea.

Calza *et al.*, 2014, analizaron la degradación de diclofenaco con fotocatalisis basada en TiO_2 . La fotocatalisis mineralizó el sustrato medido a partir de la concentración de ión Cl^- , demostrando que la fotocatalisis podía degradar algunos intermediarios.

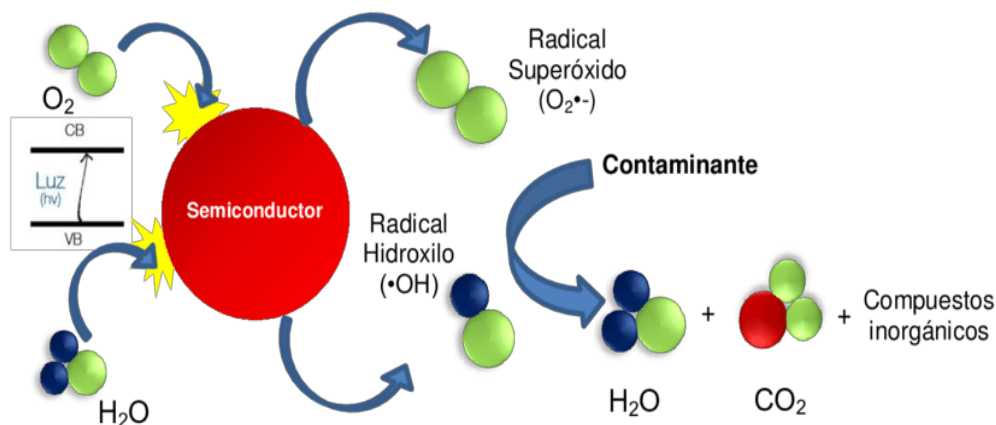


Figura 4. Esquema de reacción de fotocatalisis heterogénea (Homo & Fitzpatrick, 2013).

Un fotocatalizador es una sustancia que es activada con la adsorción de un fotón incrementando la rapidez de reacción sin consumirse. Algunos de los factores que pueden influenciar la actividad del fotocatalizador son: la estructura, tamaño de partícula, propiedades de la superficie, preparación y resistencia al esfuerzo mecánico (Schiavello *et al.*, 1988).

Se debe tomar en cuenta en un fotocatalizador aspectos como la capacidad de absorción de la energía luminosa, su estabilidad química con respecto a la iluminación, el valor del ancho de banda, la capacidad de separación de pares electrón-hueco, así como la capacidad de inhibición de recombinación de dichos pares y sin constituyentes tóxicos, para ser usados en estudios ambientales (Kryukova, G.N., *et al.*, 2007).

Los procesos fotocatalíticos en los cuales se utiliza dióxido de titanio (TiO₂) son los más utilizados, debido a la eficiente absorción de radiación de longitud de onda larga aunado a su alta estabilidad química (Robert, D. *et al.*, 1999).

Las reacciones de óxido-reducción que dan lugar al proceso fotoquímico dependen del semiconductor empleado como fotocatalizador. En función de la especie química que se desee oxidar o reducir, un determinado material puede coadyuvar al proceso. El uso de óxidos metálicos como fotocatalizadores debido a su naturaleza semiconductor resulta muy factible (Sasikala, R., *et al.*, 2010). Los átomos de O₂ presentes en la superficie del material confieren acidez al catalizador y en función de la disposición de estos átomos será la fuerza de dicha acidez (Dufour, F., *et al.*, 2015).

El dióxido de titanio (TiO₂) es un material no poroso, el material fotocatalítico de mayor uso es Degussa P25 que presenta un área superficial específica de 50±15 m²·g⁻¹ y un tamaño de partícula promedio de 21 nm (Anónimo, 2019).

Se ha considerado como el mejor fotocatalizador debido a su alto poder de oxidación con iluminación, aunado a su estabilidad y cero toxicidad (Fujishima, A., T.N. Rao, & D.A. Tryk, 2000). Dentro de los usos destacan, el de catalizador heterogéneo, sensor de gases, pigmento en pinturas, tintas, textiles y en celdas solares, como aditivo en cosméticos y alimentos (Fujishima, A. & X. Zhang, 2006). La actividad fotocatalítica de TiO₂ depende de su estructura cristalina y su área superficial. La fase anatasa es la más utilizada dada su abundancia y su facilidad de síntesis en comparación con la brookita además de su mayor actividad fotocatalítica con respecto a las otras dos fases (Schulte, K.L., 2010) (Figura 5).

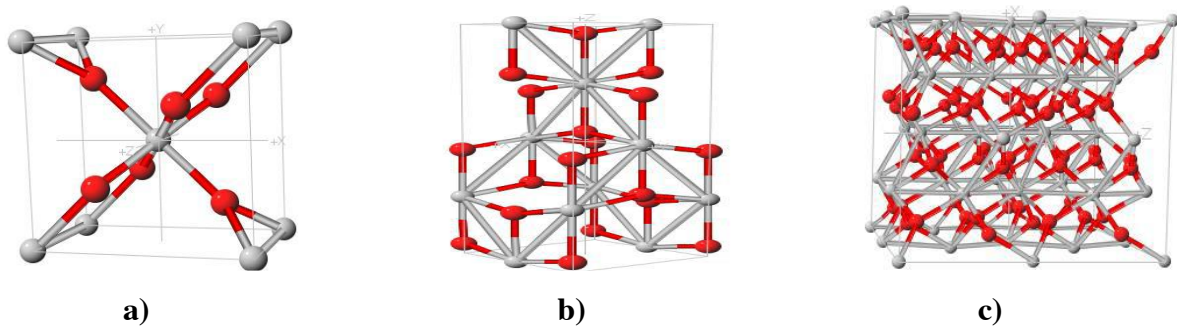


Figura 5. Estructuras cristalinas de TiO₂: a) Rutilo; b) anatasa y c) brookita

En el proceso fotocatalítico el TiO₂ es quien genera los radicales OH•, que tienen un alto poder oxidante y que degradan la totalidad de los compuestos orgánicos. El mecanismo de reacción reportado (Bauer R. et al., 1999) para la generación de radicales OH• por excitación de TiO₂ es el siguiente:

- a) Generación de un par electrón (e⁻)/hueco (h⁺) por inducción con luz ($\lambda < 390$ nm),

$$\text{TiO}_2 + h \rightarrow \text{TiO}_2 (h\nu_B^+ + e_{CB}^-)$$

Donde $h\nu_B^+$ representa un hueco en la banda de valencia y e_{CB}^- indica un electrón en la banda de conducción.

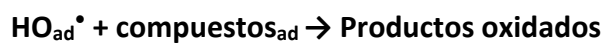
- b) La oxidación de agua o iones hidroxilo adsorbidos por huecos en la banda de valencia presentes en la superficie excitada producen radicales hidroxilo,



c) Reducción de oxígeno u otros receptores de electrones (H_2O_2 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) en la superficie del catalizador con protones (H^+) generados durante la adsorción del agua a la superficie del TiO_2 ,



d) Si el hueco h^+ , se encuentra libre y deslocalizado en la red cristalina puede difundirse hacia la superficie favoreciendo la oxidación y este proceso es conocido como fotocátalisis directa. En contraste, si la reacción oxidativa requiere la formación del grupo $^\bullet\text{OH}$ en la superficie del catalizador, el mecanismo es conocido como fotocátalisis indirecta (Curti, M., *et al.*, 2015):



La fotocátalisis directa es indicada en sistemas, donde los contaminantes se encuentren adsorbidos fuertemente a la superficie del fotocatalizador mientras que la fotocátalisis indirecta podría tener lugar en casos en donde la adsorción sea débil (Curti, M., *et al.*, 2015).

2.5. Ecotoxicología y bioensayos

La ecotoxicología es la ciencia que se encarga de estudiar el efecto de los agentes tóxicos en los ecosistemas, observando su contaminación, evaluación de posible daño, el destino final y sus posibles soluciones (Larrain, A., 1995). Las sustancias tóxicas presentes en los ecosistemas, generan distintos tipos de respuestas en los organismos (aguda, crónica, genotóxica), las cuales se evalúan con “bioensayos de toxicidad”. Considerados como técnicas de evaluación de sustancias y de muestras ambientales, cuyos objetivos son medir el efecto tóxico de los contaminantes sobre alguna especie, así como predecir los efectos tóxicos de los contaminantes. Describen la sensibilidad a los tóxicos de las especies utilizadas, ayudan a establecer la toxicidad y aportan elementos de las sustancias evaluadas para futuras regulaciones. Partiendo de la exposición de organismos a concentraciones de un agente tóxico, con la finalidad de detectar cambios en éstos en determinado tiempo (Larrain, A. 1995; Castillo *et al.*, 2000; Valdés Alanís *et al.*, 2009). Además de realizarse en condiciones controladas, coadyuvan a establecer una relación causal entre la exposición al agente y el efecto producido.

De igual forma es posible identificar el mecanismo de acción de los tóxicos (Moreno, 2003). Se utilizan especies de importancia ecológica y económica, tomando en cuenta su ciclo de vida, así como la sensibilidad de respuesta tóxica (O'Connor, 1994; Espina & Vanegas, 1996).

2.6. Bioindicadores

Utilizar bioindicadores simplifica las actividades de campo y de laboratorio, brinda información de las condiciones ambientales, por su presencia, ausencia o su comportamiento (Van der Oost *et al.*, 2003). Se considera indicador acuático, aquel que responde de manera tolerante a los efectos ocasionados por algún elemento perturbante en su hábitat. Por lo cual algunos peces son excelentes indicadores de contaminación acuática, debido a la interacción con el agua y sus sedimentos (De la Lanza *et al.*, 2000; Ondarza *et al.*, 2010; Moré Jaramillo, 2011).

La especie *Cyprinus carpio* es ampliamente distribuida alrededor del mundo. Es omnívoro, resistente a enfermedades y tolerante a un amplio rango de condiciones edafoclimáticas. En México es la especie de mayor consumo, 2.9 millones de toneladas (Balon, 2006; Zsigmond *et al.*, 2009; FAO 2011).

Posee proteínas de alto valor biológico, colesterol bajo y predominio de ácidos grasos monoinsaturados, contiene ácido omega 3; vitamina D y vitamina B12, fosforo, hierro y selenio (USDA 2013). Además, es de fácil mantenimiento bajo condiciones de laboratorio, presenta alta sensibilidad a diversos xenobióticos (Ondarza *et al.*, 2010; De la Lanza *et al.*, 2000).

2.6.1. Importancia de *Cyprinus carpio* en México

La pesca en aguas continentales es una fuente importante de proteína animal para gran parte de la población mundial. Las pesquerías que se desarrollan en las aguas continentales constituyen una parte integral del desarrollo socioeconómico de las regiones que cuentan con algún tipo de cuerpo de agua (Gaspar-Dillanes & Hernández Montaña, 2012).

De acuerdo con el Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2015 se produjeron en México 44 TON de carpa de las cuales los principales estados productores fueron: Estado de México (20.8%), Jalisco (16.5%), Hidalgo (12.51%), Tamaulipas (11.1%) y Michoacán (10%) (SAGARPA 2016).

Características generales de *Cyprinus carpio*:

Orden: Cypriniformes

Familia: Cyprinidae

Especie: *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758

Nombre común: Carpa común

Características: cuerpo robusto y alargado, boca grande y protráctil, con dos pares de barbillas aletas pectorales en posición casi ventral, aletas pélvicas, cuerpo cubierto de escamas.

Coloración: verde olivo y vientre amarillo.

Talla: 29 hasta 70 cm de longitud total.

Hábitat: vive en ríos, arroyos, estanques y embalses, cuerpos de agua lodosa con lirio acuático.

Biología: se reproducen casi todo el año, la hembra deposita los huevecillos adheridos a un sustrato vegetal, donde son cuidados por el macho.

Bioindicador: tolerante a las altas concentraciones de fosfatos, nitratos y turbidez.

Distribución: originaria de Asia, introducida a México (De la Lanza *et al.*, 2000) (Figura 6).



Figura 6. Bioindicador *Cyprinus carpio*

2.7. Biomarcadores

Son indicadores de cambios en un organismo a nivel molecular, celular o histopatológico, debidos a la exposición a xenobióticos. La palabra biomarcador se refiere a la respuesta biológica de un organismo frente a un xenobiótico (Arukwe y Gokoyr, 2003; Fossi *et al.*, 2002).

Serie de procedimientos de monitorización por medio de biomarcadores para cuantificar la exposición a xenobióticos y su posible impacto sobre las especies, (Hernández, 2011).

Son cambios cuantificables en la respuesta biológica, física o química, relacionados con los efectos tóxicos de la exposición a químicos ambientales, que indican la presencia de un contaminante biodisponible (Van der Oost *et al.*, 2003).

Conforman una herramienta de medición del efecto tóxico, útil en la evaluación de riesgo toxicológico y ecotoxicológico, ya que se pueden detectar como consecuencia del contacto con tóxicos, desde el nivel de organización molecular y celular (Schwaiger *et al.*, 2004). Se utilizan en estudios de toxicología ambiental para determinar consecuencias, detectar estados de un proceso patológico, identificar a los individuos sensibles, derivado de la exposición a contaminantes (Valdés Alanís *et al.*, 2009). De acuerdo con Organización Mundial de la Salud, los biomarcadores se subdividen en tres categorías:

a) De exposición: sirven para detección y cálculo de sustancias exógenas, sus metabolitos o el producto de una interacción entre un toxón y una molécula o célula blanco, se calcula dentro del organismo. Se utilizan para confirmar la exposición de individuos a una sustancia en particular.

b) De efecto: valoración bioquímica, fisiológica y otras alteraciones dentro de un tejido o fluidos corporales de un organismo, que puedan ser asociados con una deficiencia de salud.

c) De susceptibilidad: indican la habilidad adquirida por un organismo, de responder a los cambios producidos por la exposición a un contaminante, incluye factores genéticos y cambios en receptores que alteran la susceptibilidad del organismo. Describen variaciones en el grado de respuesta a la exposición, observando diferencias entre individuos (Van der Oost *et al.*, 2003).

La exposición a un contaminante y la determinación de sus efectos en peces, puede examinarse utilizando biomarcadores como: enzimas de biotransformación como el citocromo P-450; parámetros de estrés oxidativo a partir de la medición de la actividad de enzimas como superóxido dismutasa y catalasa; parámetros hematológicos; inmunológicos; reproductivos, endocrinos, genotóxicos, neuromusculares e histomorfológicos (Van der Ven *et al.*, 2003).

El uso de biomarcadores en el diagnóstico de la alteración del ecosistema por la exposición a contaminantes, por ejemplo, utiliza biomarcadores de estrés oxidativo usando peces como bioindicadores que pueden reflejar el daño producido a nivel bioquímico, sobre órganos y tejidos de distintas especies.

En el año de 1999 Ocampo, describió como un biomarcador haciendo mención en su estudio al estrés oxidativo, el cual es evaluado por el aumento o la disminución en algunas variables bioquímicas o modificaciones en las respuestas fisiológicas. Los cambios en todos estos niveles de organización biológica pueden indicar:

- a) Lesiones en la célula y pérdida de homeostasis
- c) Mostrar una respuesta compensatoria debido a la excitación o dolor
- d) Demostrar un aumento en la síntesis de proteínas específicas de efecto detoxificante
- e) Indicar una función inmune alterada o deprimida; en este sentido, los conocimientos de los métodos de evaluación de estas variables son de importancia, al relacionar los resultados con efectos clínicos o con efectos reproductivos.

2.8. Estrés Oxidativo

Los procesos metabólicos de los organismos aerobios, conlleva el riesgo de que sus defensas antioxidantes se vean sobrepasadas por sustancias oxidantes, a éste fenómeno se le denomina estrés oxidativo. Relacionado con el envejecimiento y las enfermedades (Mayor Oxilia, 2010). Definido como el desequilibrio que existe entre las sustancias oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas; por déficit de defensas o por incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno; alterando la estructura o función de cualquier órgano (Rodríguez *et al.*, 2001). Está relacionado con la patogénesis del cáncer, diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas, artritis reumatoide, isquemia, arterioesclerosis, entre otras. Vinculado con mecanismos de envejecimiento, derivado de un incremento en los procesos regulatorios intervenidos por los radicales libres que generan cambios en la expresión genética. Son compuestos extremadamente reactivos, capaces de oxidar biomoléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Valdés Alanís *et al.*, 2009).

2.8.1. Radicales Libres

Son especies químicas, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado en el orbital externo, confiriéndoles inestabilidad, alta reactividad, y una amplia capacidad de combinarse inespecíficamente con lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos.

Poseen una estructura birradicalaria, tienen una vida media corta, por lo que actúan cerca al sitio donde se forman (Venero & Justo, 2002; Rodríguez *et al.*, 2001).

Por otro lado, molecularmente hablando los RL, son moléculas ubicuarias y difusibles que se producen constantemente en el metabolismo celular; por mecanismos como la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena transportadora de electrones a nivel microsomal o en los

cloroplastos, y las reacciones de oxidación. Durante el proceso metabólico entre 2 y 3% de los RL pueden evadir el mecanismo redox y ocasionar daño oxidativo a los componentes celulares (Hansberg 2002; Venero & Justo, 2002). Por otra parte, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo participan en la fagocitosis, favorecen la síntesis de colágeno, y la síntesis de prostaglandinas, activan enzimas de la membrana celular, disminuyen la síntesis de catecolaminas, por las glándulas suprarrenales y favorecen la quimotaxis.

Dentro del grupo de células relacionadas con la producción de especies radicalarias se encuentran los neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos y células endoteliales. Las enzimas oxidantes involucradas son la xantina oxidasa, indolamindioxigenasa, triptófano dioxigenasa, mieloperoxidasa, galactosa oxidasa, ciclooxigenasa, lipooxigenasa, monoamino oxidasa y NADPH oxidasa. Mientras que para las sustancias es muy conocida la relación de los productos cíclicos de naturaleza redox como el paraquat, diquat alloxana, estreptozotocina, doxorubicina, etc.

Así mismo, agentes como el humo del cigarrillo, radiaciones ionizantes, la luz solar, el shock térmico y las sustancias que oxidan el glutati6n (GSH) son fuentes de radicales libres. Coligadamente existen circunstancias en las cuales también se generan radicales libres como: una alimentaci6n hipercal6rica, dieta carente de antioxidantes, procesos inflamatorios y traumatismos, isquemia, reperfusi6n, y ejercicio extenuante (Rodríguez *et al.*, 2001; Venero & Justo, 2002).

2.8.2. Especies reactivas de oxígeno

Existe un término que incluye a los radicales libres y a otras especies no radicalarias, pero que pueden participar en otras reacciones que llevan a cabo la elevaci6n de los agentes prooxidantes y son las especies reactivas del oxígeno (ERO). Las principales sustancias prooxidantes son (Venero & Justo, 2002):

- a) Radical Hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)
- b) Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- c) Anión superóxido (O_2^-)
- d) Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)
- e) Óxido nítrico (NO)
- f) Oxígeno atómico (O)

g) Ozono (O₃)

Las ERO juegan un rol fisiológico importante, y al mismo tiempo pueden ejercer efectos tóxicos. Son producidas como consecuencia del metabolismo y son esenciales para la producción de energía, síntesis de compuestos biológicamente esenciales y la fagocitosis, un proceso crítico para el sistema inmunológico; son vitales en la transducción de señales para la comunicación y función de las células (Helaine & Hagerman, 2006).

Por otro lado, existe evidencia que demuestra como las ERO pueden ser las causantes de distintos padecimientos, incluyendo enfermedades coronarias, cáncer y envejecimiento (Helaine & Hagerman, 2006). La doctora Rebeca Gerschman (1954) sugirió que las ERO eran agentes tóxicos y generadores de patologías, basada en tres postulados básicos: los RL constituyen un mecanismo molecular común de daño cuando los animales son sometidos a altas presiones de oxígeno a radicales ionizantes. El desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes produce efectos tóxicos. La producción de radicales libres es un fenómeno con implicaciones en envejecimiento y carcinogénesis. El O₃ reacciona con los ácidos nucleicos, las proteínas, rompe las olefinas en los lípidos insaturados, oxida el NADPH, el ácido ascórbico y el ácido úrico. También forma otras especies reactivas como él .OH (Konigsberg, 2008).

El O₂ reacciona con la mayoría de los compuestos celulares. El producido fuera de las células interacciona con la membrana plasmática; el producido dentro de las células reacciona con los ácidos nucleicos, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos, en el sitio donde se forma (Konigsberg, 2008). El O₂ ·· Es tóxico para la célula porque a partir de él se puede originar el O₂ y el .OH, es poco reactivo. Solo reacciona a una tasa importante con otros radicales, consigo mismo, con el hierro libre o el de los centros hierro-azufre de varias proteínas, con el NO·, los radicales fenoxilo, las semiquinonas, los quinoles y con los difenoles.

Oxida lentamente al glutatión y al ascorbato, pero no reacciona con el NADPH, con las bases nitrogenadas del ADN, con los aminoácidos de las proteínas ni con los lípidos (Konigsberg, 2008).

El H₂O₂ es aún menos reactivo que el O₂ ·· y no interacciona con los compuestos como el NADPH, los ácidos nucleicos, los aminoácidos de las proteínas, salvo algunos tioles particularmente reactivos, con los lípidos. No obstante el H₂O₂ es tóxico a concentraciones por arriba de 1μM debido, en parte a que puede formar O₂ y .OH. La toxicidad del H₂O₂ se debe a la reacción con

algunos metales de transición con los que se produce el radical .OH el cual interacciona de manera irreversible con el ADN y las proteínas (Konigsberg, 2008).

El .OH es uno de los compuestos más reactivos que existen, reacciona rápidamente con cualquier compuesto celular. Interacciona de manera irreversible con el ADN, puede oxidar las bases púricas como las pirimídicas y la desoxirribosa, produciendo rupturas en el ADN. Reacciona con cualquier aminoácido en el sitio donde se origina generando un daño irreversible en proteínas. Incluso es capaz de reaccionar con los ácidos grasos poliinsaturados (Konigsberg, 2008).

2.9. Efectos del estrés oxidativo en biomoléculas

2.9.1. Lipoperoxidación

La oxidación de ácidos grasos poliinsaturados, induce disfunción de los organelos, culminando en daño ultra estructural, se conoce como lipoperoxidación (LPX). La intervención de los radicales libres (RL) y otras especies reactivas de oxígeno (ERO) con los lípidos de las membranas biológicas genera la producción de compuestos tóxicos, altera su fluidez y permeabilidad, así como la actividad de las proteínas, las enzimas, los receptores o canales iónicos asociados a ellas, arriesgando la estructura y función celular (Konigsberg, 2008; Berthon 2002).

Las membranas celulares contienen fosfolípidos que contienen ácidos grasos con varias ligaduras dobles, estos ácidos grasos poliinsaturados son más lábiles a la oxidación que los saturados y los monosaturados, ya que los metilenos entre dos dobles ligaduras pueden perder un hidrógeno (Berthon 2002; Hansberg 2002).

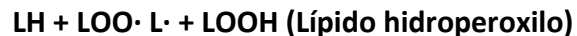
La peroxidación de lípidos de membrana puede ocurrir por vía enzimática y no enzimática. En la no enzimática las ERO inician el daño oxidativo en los lípidos de membrana; los RL de los lípidos resultantes propagan el proceso de peroxidación. En la lipoperoxidación enzimática los ácidos grasos oxidados son liberados de los lípidos de las membranas por fosfolipasas. El ácido araquidónico es un ácido graso liberado por la fosfolipasa A2, su metabolismo; es una fuente de ERO que puede generar estrés oxidativo mediante; la lipooxigenasa que hace posible la formación de derivados hidroxilados y leucotrienos; o bien por vía de la ciclooxigenasa que permite la formación de prostaglandinas y finalmente por la vía catalizada por el citocromo P450, que interviene en procesos de detoxificación de sustancias (Konigsberg, 2008).

El proceso de lipoperoxidación está compuesto por un conjunto de reacciones en cadena sobre los ácidos grasos poliinsaturados, transcurre en tres etapas (Valavanis *et al.*, 2006):

La Iniciación ocurre cuando un ácido graso poliinsaturado es atacado por una ERO que es capaz de absorber un átomo de hidrógeno de un grupo metileno. El metileno queda como radical libre que se estabiliza mediante un reacomodo molecular originando un dieno que no reacciona con el singulete de oxígeno, sino con oxígeno molecular y forma el radical piróxilo.



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



Terminación: es resultado de la interacción de los radicales lipídicos y la formación de especies no radicales por los radicales lipídoperoxilo, para formar un dímero que queda dentro de la membrana, alterando sus funciones como la permeabilidad. Las reacciones más comunes suelen ser de la siguiente manera (Konigsberg, 2008; Valavanidis *et al.*, 2006):



Al reaccionar los RL de ácidos grasos poliinsaturados entre sí, se pueden formar dímeros por entrecruzamiento o pueden ciclarse, generando aglomerados que conducen a la disminución de la permeabilidad de la membrana.

También de forma indirecta los productos de la peroxidación lipídica pueden reaccionar con otras moléculas y dañar a las células. La peroxidación lipídica es una de las principales razones del daño celular que puede conducir a la pérdida de las funciones celulares y desencadenando diversas patologías (Konigsberg, 2008).

2.9.2. Daño a proteínas

Las reacciones de oxidación de las proteínas resultan en la oxidación de las cadenas laterales de aminoácidos particularmente con grupos tiol los cuales son transformados a disulfuros, ácido sulfenílico y ciertos aminoácidos aromáticos. La oxidación de proteínas es una de las principales consecuencias del estrés oxidativo, conduce a cambios conformacionales que pueden interferir en su función, producir su fragmentación química o ser más susceptible al ataque proteolítico de los proteosomas (Shacter, 2000). Las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas son susceptibles a ser atacadas por el radical hidroxilo, algunas son más vulnerables como es el caso de tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína (Velázquez et al., 2004).

Por otra parte, existe una gran cantidad de agentes oxidantes que pueden dañar a las proteínas. Un signo que es utilizado como marcador de la oxidación de las proteínas, es su carbonilación, misma que se puede llevar a cabo por la oxidación directa de los residuos de lisina, arginina, prolina y treolina. También pueden generarse por reacciones con aldehídos (malondialdehído, 4-hidroxi-2-nonenal), producidos durante la lipoperoxidación o al incorporar un grupo carbonilo a la proteína al reaccionar con residuos de lisina, o azúcares reductores o productos de oxidación (Hansberg 2002; Konigsberg, 2008).

Dentro de las proteínas se oxidan los aminoácidos fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina y metionina; lo que genera la formación de entrecruzamientos de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos e impiden el normal desarrollo de sus funciones (Oteiza; 1995). Diversas proteínas soportan gran cantidad de oxidaciones sin que aparentemente se vea alterada su función.

En algunos casos la oxidación parcial y selectiva, produce proteínas modificadas que pueden actuar como moduladores en algunas reacciones, favoreciendo la homeostasis celular, en este caso la oxidación tiene una finalidad fisiológica. Aunado a esto existe una amplia variedad de agentes oxidantes que pueden dañar a las proteínas. Uno de los daños utilizado como marcador, es la oxidación directa de los residuos de lisina, arginina, prolina y treolina. A su vez esto ha propiciado cierto interés por estudiar la oxidación proteica con un enfoque tecnológico, ya que puede tener un impacto en la calidad de la carne y el valor nutricional. Estudios previos han contribuido al conocimiento sobre los mecanismos básicos de oxidación, proporcionado

información sobre las reacciones involucradas en los cambios oxidativos experimentados por las proteínas musculares; de igual forma han identificado una variedad de productos derivados de proteínas de músculo oxidado, incluyendo enlaces cruzados y carbonilos, así como el impacto de la oxidación en la funcionalidad de la proteína, influyendo en rasgos específicos de calidad de la carne (Lund *et al.*, 2011).

2.9.3. Daño a ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos son moléculas ricas en electrones que pueden unirse a contaminantes electrofílicos conduciendo a la oxidación, fragmentación de desoxirribosas, entrecruzamiento de las cadenas de ADN y modificación de las bases nitrogenadas (sitios apurínicos).

Las especies reactivas de oxígeno, las especies reactivas de nitrógeno y otros agentes están involucrados en los procesos de daño, ya que son capaces de modificar el ADN celular, también afectan la transducción de señales, la proliferación celular y la comunicación intracelular. La pérdida de bases, la desaminación de la citosina en uracilo y la 5-metilcitosina en timina, así como la ruptura de las hebras de ADN, son eventos que ocurren a una tasa de producción baja pero continua, la cual se puede elevar por la producción por efecto de las ERO.

Así por ejemplo el radical hidroxilo (OH) tiene gran reactividad y puede abstraer átomos de hidrógeno de la molécula de ADN, pegándose a las bases formando aductos. La heterogeneidad de la molécula de ADN permite al radical hidroxilo (OH) atacar tanto a las purinas como a las pirimidinas, así como a la desoxirribosa. El O₂ es más selectivo e interacciona con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos, siendo el producto principal el 8-hidroxiguanina.

La 8-hidroxiguanina forma puentes de hidrógeno con la adenina en vez con una citosina o con una guanina en lugar de con timina. Otros hidroxiradicales reaccionan con las uniones azúcar-fosfato del ADN causando diferentes lesiones, como sitios sin purinas, donde las bases han sido removidas, o fragmentación de desoxirribosa u oxidación del azúcar. El daño a ADN tiene consecuencias biológicas serias como mutaciones y transformaciones carcinogénicas, e incluso puede llevar a la muerte celular (Hansberg 2002; Valavanidis *et al.*, 2006; Konigsberg, 2008).

2.10. Defensas y enzimas antioxidantes

Las reacciones de oxidación son indispensables en los procesos metabólicos. Involucran la transferencia de electrones que producen RL. Lo cual es incompatible con la vida, a menos que existan en las células mecanismos de defensa que neutralicen los RL. Dichas defensas se les denominan antioxidantes; es cualquier sustancia que en concentraciones normales posea mayor afinidad que cualquier otra molécula para interactuar con un RL (Mayor Oxilia, 2010). El sistema de defensa antioxidante está constituido por sustancias que, al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan significativamente la oxidación de éste. La acción antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteración de moléculas (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos) funcionalmente vitales (Venero & Justo, 2002). Las defensas antioxidantes pueden subdividirse en antioxidantes enzimáticos y en no enzimáticos y estos a su vez se clasifican en endógenos (son sintetizados por las células) y exógenos (ingresan a través de la dieta) (Gregus & Klaassen, 2001; Mayor Oxilia, 2010).

Estas defensas actúan en 5 niveles (Rodríguez *et al.*, 2001):

1. Primer nivel: es la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva sin intermediarios parcialmente reducidos. Se logra por acción del citocromo oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, que es responsable de más del 90% de la reducción del oxígeno en el organismo.
2. Segundo nivel: constituido por enzimas especializadas en captar el anión superóxido. La Súper óxido dismutasa es una metaloenzima, que cataliza la disminución del radical anión superóxido para dar como productos de reacción oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno.
3. Tercer nivel: grupo de enzimas especializadas en neutralizar al peróxido de hidrógeno. Entre ellas está la catalasa, que se encuentra en los peroxisomas y la glutatión peroxidasa, que catalizan la reacción de dismutación.
4. Cuarto nivel: el radical hidroxilo puede ser neutralizado por la vitamina E, que es un antioxidante, así como la vitamina C, la cual es un agente reductor o donador de electrones.
5. Quinto nivel: los RL son capaces de provocar rupturas de la cadena de ADN y de inducir mutagénesis, pero existen mecanismos enzimáticos de reparación que permiten restablecer la información genética.

2.10.1. Superóxido dismutasa (SOD)

Es la enzima encargada de catalizar la dismutación del radical anión superóxido (O_2^-) en una especie de menor toxicidad y reactividad (H_2O_2), el cual a su vez es posteriormente transformado en agua por otras enzimas.

Su principal función es la protección contra el anión superóxido (O_2^-). Esta familia de enzimas está formada por un grupo de enzimas metaloides y su distribución es amplia en el organismo: La SOD1 que tiene en su centro catalítico Cu^{+2} y Zn^{+2} , se encuentra en el citoplasma y en el núcleo de las células; la SOD2 que se encuentra en la membrana interna de la mitocondria y en su centro catalítico tiene $Mn(III)$ y finalmente la SOD3 se encuentra en el exterior de la célula y también tiene Cu^{+2} y Zn^{+2} en su centro catalítico (Hansberg 2002; Venero & Justo, 2002; Konigsberg, 2008;).

2.10.2. Catalasa (CAT)

Son enzimas capaces de descomponer el H_2O_2 en H_2O y O_2 a pH entre 4 y 11. De amplia distribución en el organismo, alta concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y epitelios, y se localizan a nivel celular: mitocondrias, peroxisomas, citosol (eritrocitos); es catalítica y peroxidativas; forman parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en altas concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Están formadas por cuatro subunidades asociadas a un grupo hemo cada una. Emplean dos moléculas iguales de H_2O_2 , una como agente reductor y otra como agente oxidante, el H_2O_2 al entrar en el sitio activo de la enzima, toma un electrón del fierro y otro del hemo para generar una molécula de agua, una segunda molécula de H_2O_2 cede un electrón al ferroxilo y otro al hemo, restituyendo el estado inicial de la enzima y liberando una molécula de oxígeno y otra de agua (Hansberg 2002; Venero & Justo, 2002).

2.10.3. Glutación peroxidasa (GPx)

Es una selenoproteína que reduce el peróxido de hidrógeno a lipoperóxido (LOO-H) y requiere al glutatión como agente reductor del H_2O_2 . Existen cuatro tipos de GPx, la citosólica (GPx1), gastrointestinal (GPx2), plasmática (GPx3), y la de fosfolípidos (GPx4). Son homotetrámeros, exceptuando ésta última que es un monómero con un tamaño menor al de las subunidades de las otras. La GPx de hidroperóxidos de fosfolípidos puede actuar sobre los fosfolípidos de las

membranas celulares y de las lipoproteínas, además de los hidroperóxidos de timina y de ésteres de colesterol, son capaces de reducir el H_2O_2 y los hidroperóxidos de ácidos grasos (Hansberg 2002; Venero & Justo, 2002).

La reducción del oxígeno de electrón único genera al radical anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) que se mantiene a concentraciones intracelulares bajas por medio de dismutación o rompimiento catalítico por la enzima SOD para formar peróxido de hidrógeno. Pueden ocurrir fenómenos con el peróxido de hidrógeno formado: en presencia de $O_2^{\cdot -}$ o metales de transición, como el hierro o el cobre, se reduce hacia el radical hidroxilo (OH^{\cdot}); puede catalizarse por la CAT para formar agua y oxígeno; o puede detoxificarse mediante la GPx en presencia de glutatión (GSH) para formar agua y glutatión oxidado (GSSG) (Valdés Alanís *et al.*, 2009).

2.11. Cambios en la calidad de la carne de *C. carpio* por estrés oxidativo

La oxidación es una causa del deterioro de la calidad durante el procesamiento y almacenamiento de productos cárnicos. La pérdida en la calidad por procesos de oxidación se observa en la decoloración, destrucción de nutrientes y sabor, la formación de productos tóxicos (Kanner, 1994). Estudios reportan que las proteínas musculares pueden ser modificadas por especies reactivas de oxígeno originadas en la lipoperoxidación, reacciones enzimáticas catalizadas por metales y otros procesos químicos (Wolf *et al.*, 1986; Butterfield & Standtman, 1997) generando disminución de la solubilidad de proteínas debido a la polimerización intra-molecular, pérdida de actividad enzimática y destrucción de aminoácidos (Xiong, 2000).

El impacto negativo ocasionado por la oxidación en los alimentos, ha tenido creciente interés; actualmente la oxidación de proteínas en los tejidos desempeña un papel primordial en la calidad de la carne, así como en el valor nutricional de *C. carpio*. Diversos estudios han mencionado que las reacciones involucradas en las modificaciones oxidativas experimentadas por las proteínas musculares, además de que identificado una variedad de productos derivados de proteínas de músculo oxidado, incluyendo enlaces cruzados y carbonilos, y el impacto de la oxidación en la funcionalidad de la proteína y en rasgos específicos de calidad de la carne (Lund *et al.*, 2011). Como componente mayoritario del tejido muscular, las proteínas son primordiales en la calidad tecnológico-funcional de los productos cárnicos. Las modificaciones en la integridad de las proteínas musculares como consecuencia de la desnaturalización y/o proteólisis sufrida, pueden

afectar aspectos como la textura (Kemp *et al.*, 2010), color (Kazemi *et al.*, 2011), aroma y sabor (Toldrá, 1998), capacidad de retención de agua y solubilidad (Van Laack *et al.*, 2000) y su funcionalidad biológica y biodisponibilidad (Ahmed & Muguruma, 2010) (Figura 7).

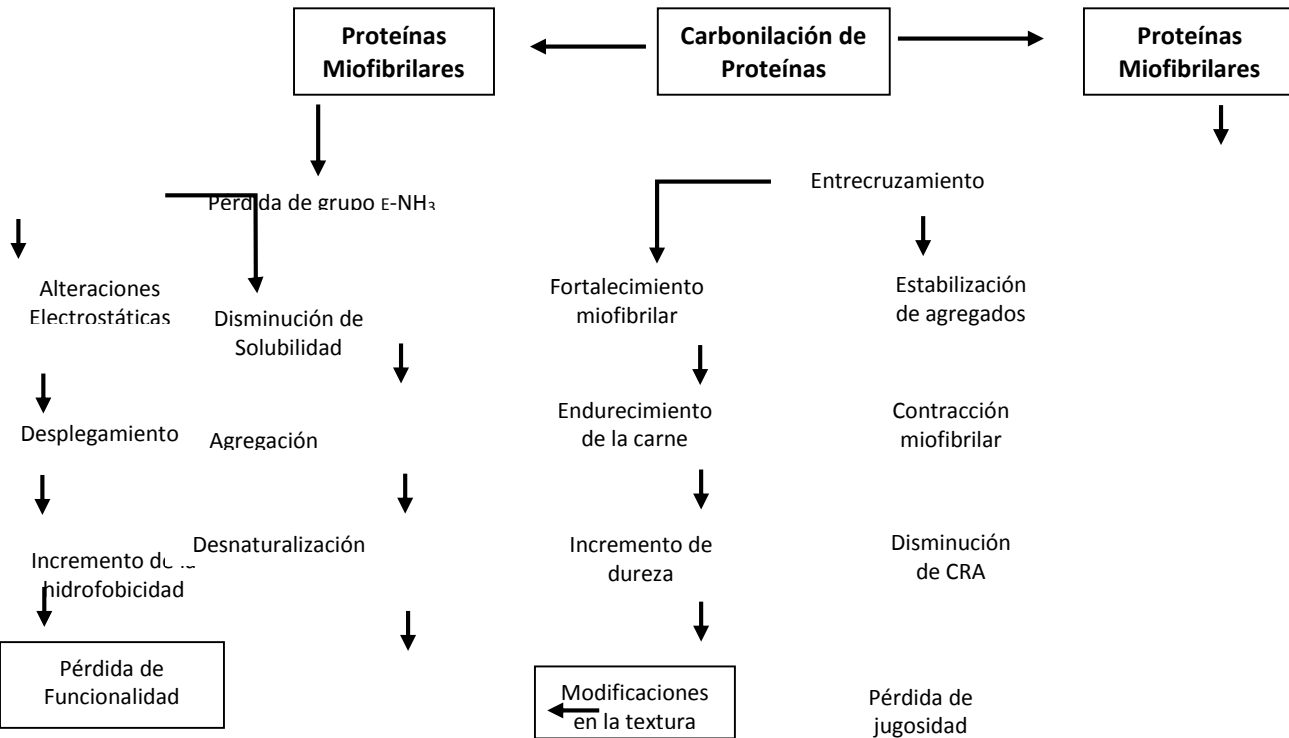


Figura 7. Posible mecanismo a través del cual la carbonilación de proteínas puede afectar la calidad de los productos cárnicos (Estévez, 2011)

2.12. Propiedades funcionales de las proteínas del músculo de pescado

Las proteínas musculares (miosina y actina) influyen sobre los atributos sensoriales de un alimento cárnico, como en las propiedades texturales y organolépticas. La funcionalidad de las proteínas alimentarias está determinada por las propiedades físicas y químicas que derivan del comportamiento de las proteínas en los sistemas alimenticios durante el procesado, almacenamiento y consumo (Vera, 2010).

Mismas que a concentración adecuada del componente respectivo o aditivos y en condiciones apropiadas, proveen de ciertas características deseables al producto. Dichas propiedades de las proteínas son el resultado de su interacción con el disolvente que las rodea, iones, otras proteínas, sacáridos, y lípidos, y en fenómenos de superficie (Miranda, 2011).

2.12.1 Solubilidad de las proteínas

Es la propiedad más importante en alimentos, se busca aumentarla o evitarla. De ella dependen propiedades como espesante, espumante, emulgente y gelificante. La proteína insoluble tiene poco uso en el procesamiento tecnológico de alimentos. La solubilidad depende de las interacciones iónicas e hidrófobas. Las interacciones hidrófobas promueven la asociación proteína-proteína y disminuyen la solubilidad, mientras que las iónicas promueven las interacciones proteína-agua y aumentan la solubilidad (Fennema, 2010). La solubilidad se ve influida por el pH, las fuerzas iónicas, la temperatura y la presencia de disolventes orgánicos.

Fennema (2010), menciona que al estar íntimamente relacionada la solubilidad de las proteínas con sus estados estructurales, esta se usa para medir el grado de desnaturalización durante los procesos de extracción, aislamiento y purificación. Por su tamaño, las proteínas no forman soluciones, sino suspensiones. Por ejemplo en los productos emulsificados, la proteína debe ser soluble para ser funcional (Hall, 1996). Dicha funcionalidad está determinada por los aminoácidos presentes en la superficie de la molécula y por el balance entre las interacciones energéticas dentro de la misma proteína, así como entre la proteína y el solvente. La superficie de una proteína soluble en agua, ésta cubierta de aminoácidos polares que favorecen la interacción con el agua; las proteínas insolubles en agua tiene más grupos hidrofóbicos en la superficie (Creighton, 1993). La solubilidad de las proteínas afecta la propiedad espesante, espumante, emulgente y gelificante; por lo cual una proteína insoluble tendrá muy poco uso en el procesamiento de alimentos. La solubilidad de las proteínas depende de las interacciones iónicas e hidrófobas. Las primeras promueven las interacciones proteína-agua y aumentan la solubilidad y las segundas promueven la interacción proteína-proteína y disminuyen la solubilidad. Existen factores como el pH, la temperatura y la fuerza iónica que pueden afectar la solubilidad de las proteínas, ya que alteran en los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, así como en las interacciones presentes en la estructura molecular de la proteína. La solubilidad de las proteínas se incrementa a temperaturas de entre 0 y 40-50°C; sin embargo, se da un incremento de la energía cinética, afectando las interacciones no covalentes que mantienen estable tanto las estructuras secundarias como terciarias de la proteína provocando con esto su desnaturalización, exponiendo los grupos hidrofóbicos que se encontraban en su interior los cuales interaccionan entre sí, provocando que se dé una disminución de la solubilidad y así precipitando (Miranda, 2011). La

fuerza iónica determina la capacidad de las proteínas (por ejemplo, miofibrilares) para ligar agua y así poder entrar en disolución.

Existen dos fenómenos que ocurren a diferentes fuerzas iónicas: la solubilización (salting-in) y la insolubilización (salting-out) (Miranda, 2011). La mayoría de las proteínas alimentarias son ácidas, por lo que exhiben una solubilidad mínima a pH 4-5 (punto isoeléctrico), debido a la ausencia de repulsión electrostática, y máxima a pH's alcalinos. La desnaturalización por calor modifica el perfil de solubilidad de las proteínas frente al pH. Asimismo, a pH y fuerza iónica constantes, la solubilidad de la mayor parte de las proteínas suele incrementar con la temperatura entre 0°C y 40°C, exceptuando a las muy hidrófobas. Por encima de los 40°C se presenta la desnaturalización de la proteína, lo cual provoca un descenso de la solubilidad (Fennema, 2010).

2.12.2. Propiedad gelificante

Se define como un sistema diluido que exhibe un flujo de estado no estacionario, está formado por un entrecruzamiento de gruesas moléculas (polímeros) reticuladas por las uniones transversales (enlaces covalentes o no covalentes) formando una red en un líquido. Esta propiedad depende de la interacción agua-proteína. En esta estructura, el líquido impide que la red se rompa y por otro parte, la red mantiene atrapado al líquido; por lo cual las proteínas no pueden moverse. Esta transformación se ve influenciada por el calor, las enzimas o los cationes divalentes, en condiciones adecuadas. El papel de polímero es asumido por las proteínas miofibrilares, y el del solvente por el agua y sales minerales (Bucharles *et al.*, 1991). La mayoría de geles se preparan calentando una disolución de proteína. En este procedimiento de gelificación, la proteína en estado de solución se transforma por desnaturalización en un "estado progel", el cual es un líquido viscoso que ya ha tenido lugar cierto grado de polimerización. En dicha etapa la proteína se despliega y se expone un número crítico de grupos funcionales (como grupos hidrófobos y grupos formadores de puentes de hidrógeno) de forma que permita la constitución de la red tridimensional proteica o segunda etapa.

La formación del progel es irreversible, porque tienen lugar diversas interacciones proteína-proteína entre las moléculas desplegadas. Cuando el progel se enfría el descenso de energía cinética térmica facilita la formación de enlaces no covalentes estables entre los grupos funcionales de las moléculas; esto es lo que constituye la gelificación. Las proteínas que contienen

cisteína y cistina pueden polimerizar vía intercambio sulfhidrilo-disulfuro durante el calentamiento, y formar una red covalente que continua al enfriarse. Las proteínas globulares con pesos moleculares menores a 23,000 Da, no pueden formar un gel a ninguna concentración de proteína a no ser que contengan, un grupo sulfhidrilo o un enlace disulfuro. El pH óptimo para la formación de geles es de 7-8, para la mayoría de las proteínas (Fennema, 2010).

2.12.3. Capacidad de retención de agua

Es una propiedad fundamental en la carne y sus derivados, ya que se relaciona con la jugosidad y ternura. El agua se asocia con la superficie de las proteínas por interacciones dipolo-dipolo y por puentes de hidrógeno, y forma una sola capa en la superficie de las proteínas. Esta agua, que representa 0.3 gramos de agua por gramo de proteína, tiene propiedades diferentes al agua libre, y está fuertemente ligada a la proteína (Chinachoti, 2000). El resto del agua está adsorbida en capilares, poros, células u otras estructuras y puede fluir libremente. La determinación de la retención de agua mide el agua libre y parte del agua adsorbida (Hui *et al.*, 2006).

La capacidad de retención de agua es la facultad de la carne de conservar el agua bajo el efecto de una tensión cualquiera (Bucharles *et al.*, 1991). El tejido muscular contiene un 75% de agua, siendo responsable de la retención del agua el componente proteico. El agua en el músculo está en las miofibrillas. Se ve afectada por factores ambientales como la concentración de iones, presencias de ATP, pH, temperatura, tipo de sales y la conformación proteica. Las proteínas exhiben su hidratación mínima a su punto isoeléctrico, al que las interacciones proteína-proteína minimizan la interacción con el agua (Fennema, 2010). La retención de agua de los concentrados proteicos aumenta en el intervalo de 20 a 100°C, en muchos casos, esto es debido a la formación de geles proteicos, en los que el agua se asocia con la superficie de las proteínas por puentes de hidrógeno y se atrapa dentro de los poros de la red proteica (Foegeding, 1989). Las proteínas en las fibras musculares se asocian por cargas en la superficie de las moléculas proteicas. Al aumentar la concentración de sal, los iones de sodio y cloro se unen a los grupos cargados de las proteínas debilitando las interacciones entre fibras, lo que permite que entre más agua debido a que hay menos interacciones proteína-proteína y más interacciones proteína-agua (Vojdani, 1996). La retención de sal tiene gran influencia en la retención de agua. En los homogeneizados musculares aumenta la concentración de sal de 0 a 2 M NaCl a pH 6.0, las muestras

homogeneizadas sin sal pierden agua, mientras que las homogeneizadas con 0.65M NaCl retienen su peso en agua (Matsumura y Mori, 1996). El pH de la solución también afecta a la retención de agua. Al igual que con la solubilidad, el pH influye en las cargas. En un homogeneizado muscular la retención de agua disminuye al mínimo en el punto isoeléctrico (pH 5). En este momento la interacción proteína-proteína entre aminoácidos cargados es dominante. Si el pH se retira del PI la proteína se hace cada vez más cargada y las interacciones proteína-proteína ceden su lugar a proteína-agua (Chinacti, 2000).

2.12.4. Perfil de textura

El análisis de perfil de textura (TPA) es un método objetivo correlacionado con el análisis sensorial de textura. Comprende la compresión de una muestra dos veces seguidas, imitando el proceso de masticación. Un cilindro de gel (2 cm de diámetro y 0.8 cm de altura) se coloca sobre la plataforma de un texturómetro prensa Instron. Sobre el mismo actúa un plato plano que lo comprime hasta una altura predeterminada. La determinación del perfil de textura involucra dos compresiones sucesivas del material a una velocidad constante durante las cuales se registra la evolución de la fuerza (Figura 8).

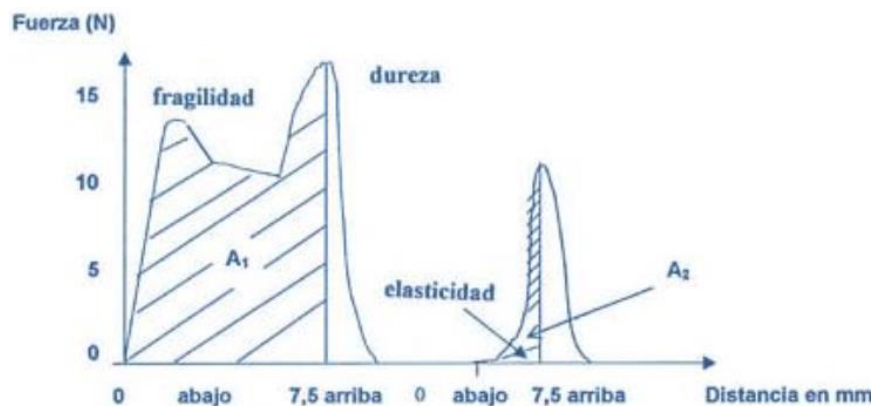


Figura 8. Curva patrón de análisis de perfil de textura en máquina Instron (Bourne, 1978)

Logrando cuatro parámetros texturales del análisis de las curvas (Figura 8)

- Dureza (hardness) es la fuerza pico logrado durante el primer ciclo de compresión.
- Cohesividad (cohesiveness) es la razón del área positiva lograda durante la segunda compresión y del área positiva de la primera compresión (A_2 / A_1).
- Elasticidad (springiness) es la altura que recupera el alimento durante el tiempo que transcurre entre la primera y la segunda compresión.

- Gomosidad (Gumminess) es el producto de dureza por cohesividad.

La textura se define por la forma en que los componentes estructurales de un material se arreglan en forma micro y macroscópica, y la manifestación externa de este arreglo. Por ejemplo, la cohesividad se refleja en la habilidad cementante de las proteínas miofibrilares en productos tales como jamones reestructurados (cocidos); el masajeo forma una película proteica alrededor de trozos de carne, la cual se torna cohesiva durante el calentamiento. El sabor es el resultado de una mezcla compleja de sensaciones percibidas por los sentidos del gusto y olfato, aunque en varias ocasiones se acompaña de estímulos visuales, táctiles y sonoros. El sabor y olor a la vez están generados por precursores, por las interacciones entre los componentes químicos de la carne, y directamente por algunos compuestos. Aunado a esto la interacción entre aminoácidos y la hormona 17- β -estradiol está relacionada con la calidad de la carne, estudios previos muestran que cuando ciertas especies acuáticas, al estar en contacto con medicamentos, presentan una licuefacción del cerebro, afectando las proteínas y también se afecta la calidad fisicoquímica, textural y sensorial de su carne.

3. JUSTIFICACIÓN

Existen numerosas evidencias de la entrada de contaminantes en el medio acuático. Dentro de estos contaminantes se incluyen los compuestos farmacéuticos, sustancias orgánicas a los que recientemente se les ha concedido la debida atención por su alta persistencia; además de que son empleados en grandes cantidades desde hace décadas.

Los compuestos farmacéuticos están diseñados para actuar sobre los organismos; su introducción en los ecosistemas puede generar alteraciones. Por otro lado dichos compuestos una vez liberados pueden reaccionar a través de diversas vías, como la fotólisis por acción de la radiación solar, que da lugar a distintos productos de degradación, cuyas características pueden diferir respecto a las del compuesto de original.

El conocimiento de los efectos tóxicos de dichos contaminantes y sus metabolitos, junto con el análisis de su persistencia medioambiental son elementos a valorar para una correcta determinación del impacto que provocan. Se vuelve necesario estudiar el comportamiento de estos contaminantes en el medio acuático, así como proponer técnicas de tratamiento que

puedan eliminarlos. Respecto a las técnicas de tratamiento de agua, se ha demostrado que la fotocatalisis heterogénea con TiO_2 es una alternativa eficaz en la eliminación de sustancias orgánicas en matrices acuosas. En los procesos de degradación fotocatalíticos es de interés el análisis de la influencia que ejercen los fenómenos de superficie. Por todo lo anterior, se ha diseñado el presente proyecto, donde uno de los objetivos fue realizar un estudio de fotodegradación del fármaco hormonal 17- β -estradiol, en condiciones de fotólisis directa con luz UV, en presencia de TiO_2 como fotocatalizador, así como comprobar su eficiencia biológica.

La actividad humana genera infinidad de residuos, que se desechan en los mantos acuíferos. La industria farmacéutica es uno de estos generadores, debido a que compuestos como el 17- β -estradiol, al ir disueltos en agua, pueden causar daños al ambiente y a los organismos que en él habitan, esto debido al estrés oxidativo que genera. Los procesos de oxidación avanzada, son eficaces en la remoción de contaminantes. Específicamente uso del TiO_2 , su eficacia aumenta al ser combinado con la irradiación de luz UV, generando disminuciones considerables y poco selectivas en los contaminantes. Sin embargo, se torna necesario demostrar la eficiencia biológica. Los biomarcadores, como las determinaciones de estrés oxidativo, permiten evaluar y comparar datos entre los efectos sufridos por los organismos de prueba en aguas contaminadas con 17- β -estradiol y organismos pero expuestos a aguas con tratamiento previo por POA's. El bioindicador *Cyprinus carpio* permite llevar a cabo las determinaciones antes mencionadas, debido su alta sensibilidad a contaminantes.

Actualmente, además de la necesidad de aplicar métodos para el tratamiento de aguas, se requiere evaluar los cambios en los efectos biológicos que sufren los organismos al ser expuestos a estas aguas, esto coadyuvará a dar una solución integral a los problemas de contaminación generados por las aguas residuales que cada día presentan mayor demanda.

4. HIPÓTESIS

El tratamiento de oxidación avanzada será útil en la remoción de contaminantes de agua, otorgando características idóneas para la vida de los organismos, basándose en los resultados obtenidos de las determinaciones de estrés oxidativo al exponer *Cyprinus carpio* a al agua tratada,

y/o alteraciones en las propiedades fisicoquímicas y texturales de la carne de carpa común (*Cyprinus carpio*).

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia de la remoción de 17- β -estradiol empleando un proceso de oxidación avanzada sobre la toxicidad, propiedades fisicoquímicas y texturales de la carne de *Cyprinus carpio*.

5.1. Objetivos específicos

- Evaluar indicadores de peroxidación, grado de lipoperoxidación, contenido de hidroperóxidos y de proteínas carboniladas en *Cyprinus carpio* expuesta en agua con 17- β -estradiol antes y después del tratamiento con proceso de oxidación avanzada.
- Determinar actividad antioxidante, mediante la actividad enzimática de superóxido dismutasa y catalasa en *Cyprinus carpio* expuesta en agua con 17- β -estradiol antes y después del tratamiento con proceso de oxidación avanzada.
- Evaluar la modificación de propiedades fisicoquímicas y texturales en carne de *Cyprinus carpio* expuestas en agua con 17- β -estradiol; antes y después del tratamiento con proceso de oxidación avanzada.

6. METODOLOGÍA

6.1. Tratamiento fotocatalítico

Este proceso se llevó a cabo en el Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable, UNAM-UAEMex, ubicado en la carretera Toluca-Ixtlahuaca, Km 15. Se efectuó con una tecnología relativamente nueva, en un reactor fotocatalítico de columna de burbujas de flujo descendente que permitió procesar 14L de agua por lote. Se evaluaron dos concentraciones de 17 β -estradiol [1ng/L (C1) y 1 μ g/L (C2)]. Estas concentraciones fueron seleccionadas por su relevancia ambiental, encontradas en diferentes partes del mundo (Nasu *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010; Díaz-Torres *et al.*, 2013; Oğuz y Kankaya, 2013; Valdés *et al.*, 2015). El pH inicial fue de 6,0. El catalizador empleado fue el TiO₂ Degussa P25 disponible en el mercado y la carga fue

de 100 mg/L. Es bien sabido que este catalizador presenta una superficie específica de 50 m²/g y que la principal fase cristalina es la anatasa.

La característica principal del reactor de columna de burbujas empleado es que el gas se inyecta concomitantemente con el líquido en la parte superior de la columna. Se aprovecha un efecto Venturi en la entrada para romper el gas y dispersarlo homogéneamente en forma de burbujas de 3,4 mm en el líquido. La lámpara de radiación se colocó en la parte inferior de la columna centrada radialmente. El líquido fue recirculado al reactor fotocatalítico por medio de una bomba de 1 HP. Sin embargo, se puede encontrar una descripción más detallada del reactor en Martín del Campo, *et al* (2011). En el transcurso de la reacción (60 minutos), se controlaron y mantuvieron constantes la temperatura (25 ± 3 ° C) y el caudal de oxígeno (50 mL/min). La potencia de la fuente de radiación UV era de 400 W y emitía radiación con una longitud de onda de 254 nm. Se tomaron muestras en diferentes momentos (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 y 60 minutos) durante la reacción para controlar la degradación de la molécula dentro del proceso de tratamiento. Se filtró el catalizador (TiO₂) y se colocó en botellas de plástico protegidas de la luz para su conservación y posterior uso en los sistemas de exposición.

6.2. Estudio de toxicidad

Se colectaron los organismos (*Cyprinus carpio*) de $16,42 \pm 1,61$ cm de longitud y peso 61.82 ± 7.6 g en el centro acuícola Tiacaque, Estado de México, se llevaron al laboratorio de Toxicología Ambiental de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Cristóbal Colón s/n, Toluca Estado de México; donde se aclimataron por tres semanas, previo a la realización del estudio, a oxigenación constante, se alimentaron cada 24 horas con alimento Wardley® (Domitrovic, 1997). Se formaron lotes de 10 organismos, los cuales fueron expuestos a dos concentraciones ambientales relevantes diferentes de E2 (1 ng/L (C1) y 1 µg/L (C2)) y por 12, 24, 48, 72 y 96 h de exposición con aireación constante y luz-oscuridad naturales. Un grupo se expuso al agua no tratada y otro grupo expuesto al agua tratada. Para la evaluación de las pruebas de toxicidad se utilizaron 6 sistemas por cada tiempo de exposición: 1) Control antes del tratamiento, 2) C1 antes del tratamiento, 3) C2 antes del tratamiento, 4) Control después del tratamiento, 5) C1 después del tratamiento y 6) C2 después del tratamiento. Cada sistema (tanques de 20 L de capacidad) contenía 10 L de agua tratada o no tratada y en ellos se colocaron

5 peces con las características antes mencionadas.

Al final del período de exposición, los peces fueron retirados de los sistemas y colocados en un tanque con 50 mg/L de esencia de clavo como anestésico. Posteriormente se colocaron en posición lateral y se recolectó sangre con una jeringa hipodérmica heparinizada de 1 mL mediante la punción del vaso caudal realizada lateralmente cerca de la base del pedúnculo caudal, a media altura de la aleta anal y ventral de la línea lateral. Se recogieron 600 microlitros de muestras de sangre en tubos heparinizados, colocados en 1 mL de solución tampón de Tris pH 7. Posteriormente se homogenizaron las muestras y se centrifugaron a 12000 rpm, con una centrifuga Hermle modelo z360k por 15 min a -4 °C. El sobrenadante se centrifugó a 12,500 × g durante 15 minutos a -4 °C. El suero obtenido se utilizó para las determinaciones de estrés oxidativo. Los biomarcadores evaluados fueron: nivel de peroxidación de lípidos (LPX), contenido de hidroperóxido (HPC) y contenido de carbonilo proteico (PCC), además de actividades de enzimas antioxidantes, SOD y CAT. Además se efectuaron pruebas con el fin de evaluar el posible daño a las proteínas de tipo tecnológico funcional ocasionado por el 17-β-estradiol, para ello se extrajo musculo de los mismos peces.

Se determinó pH, capacidad de retención de agua (CRA), solubilidad, determinación de grupos disulfuro, perfil electroforético. El estudio se realizó por triplicado. Todas las pruebas se efectuaron antes y después del tratamiento fotocatalítico.

6.3. Evaluación del estrés oxidativo

Las muestras se homogeneizaron con 2 mL de buffer salino de fosfatos (PBS pH 7) y se centrifugó a 12,500 rpm durante 20 minutos para obtener el sobrenadante, el cual fue empleado en las pruebas de estrés oxidativo.

6.3.1. Determinación del grado de lipoperoxidación

La prueba de LPX fue determinada con el método de Buege y Aüst (1979). A 50 µL del sobrenadante se le adicionó 1 mL de disolución reguladora tris-HCl 150 mM a pH 7.4 y se incubó a 37 °C por 30 min. Se adicionaron 2 mL de la solución de ácido tiobarbitúrico al 0.38% en ácido tricloroacético al 15% y se incubó a 37 °C por 45 min. Se centrifugó a 12,500 rpm por 15 min a -4

°C, finalmente se determinó la absorbancia a 535 nm. Los resultados se expresaron en mM de malondialdehído/mg proteínas usando el coeficiente de extinción molar de $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

6.3.2. Determinación del contenido de proteínas carboniladas

Para el CPC se determinó mediante el procedimiento de Levine *et al.* (1994) modificado. Se tomaron 100 μL del sobrenadante, se adicionaron 150 μL de dimetil-N-formamida 10mM en HCl 2M (Sigma) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora en la oscuridad.

Posteriormente se agregaron 500 μL de ácido tricloroacético al 20 % y se dejó reposar durante 15 minutos a 4 °C. Se centrifugó a 16 000 x g por 5 min. El botón se lavó varias veces con etanol–acetato de etilo 1:1, se disolvió en 150 μL de guanidina 6 M (Sigma) a pH 2.3 y fue incubado a 37 °C por 30 min. La absorbancia se determinó a 366 nm y los resultados se expresaron en nanomoles de carbonilos reactivos (C=O) formados/mg proteína basado en su coeficiente de extinción molar de $21\ 000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

6.3.3. Determinación de HPC (Jiang et al., método, 1992)

100 μL de sobrenadante (deprotonado con 10% de ácido tricloroacético) se mezcló con 900 μL de mezcla de reacción (0.25 mM FeSO_4 , 25 mM H_2SO_4 , 0.1 mM xilenol naranja y 4 mM 90% butilhidroxitolueno en metanol). La mezcla fue incubada durante 60 minutos a 25°C y preservada de la luz. Luego, la absorbancia fue leída a 565 nm. Los resultados se interpolaron en una curva de patrón y los resultados se expresaron en nanomol de hidroperóxido de cumeno por miligramo de proteína.

6.3.4. Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa

La actividad de la SOD se midió mediante el método de Misra y Fridovich (1972). A 20 μL del sobrenadante se agregaron 150 μL de la solución amortiguadora de carbonatos (50 mM de carbonato de sodio y 0.1 mM de EDTA) a pH 10.2 y 100 μL de adrenalina 30 mM, y se leyeron las absorbancias a 480 nm a los 30 seg y 5 min. La actividad de la SOD se determinó interpolando los datos en una curva tipo de SOD (SOD Zn/Cu de eritrocitos humanos, Sigma).

6.3.5. Determinación de la actividad de la catalasa

La actividad de CAT se determinó mediante el método de Radi *et al.*, (1991). A 20 μL del sobrenadante se agregó 1 mL de la disolución amortiguadora de aislamiento (0.3 M sucrosa, 1 mM

EDTA, 5 mM HEPES y 5 mM KH_2PO_4) y 0.2 mL de la solución de H_2O_2 20 mM.

Posteriormente se determinó la absorbancia a 240 nm, a 0 y 60 seg y se calculó la actividad de la CAT por minuto mediante el coeficiente de extinción molar del H_2O_2 ($0.093 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

6.4. Evaluación de la calidad alimentaria

6.4.1. Medición pH

Método NMX-F-317-S-1978 “Determinación de pH en Alimentos. Se tomó una porción de 10 g de músculo, se mezcló con 90 mL de agua destilada. Se licuó hasta obtener una pasta consistente y uniforme. Se ajustó la temperatura de la pasta a $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Finalmente se realizó la lectura de pH con un potenciómetro previamente calibrado.

6.4.2. Capacidad de retención de agua (CRA)

Método Honikel & Hamm (1994). Se tomaron 10 g de músculo y se trocearon. Se colocaron 5 g en un tubo de centrifuga y se añadieron 8 mL de una disolución de NaCl 0.6 M. Se agitó la muestra con varilla de vidrio durante 1 min en baño de hielo, se dejó reposar 30 minutos. Se agitó 1 minuto. Posteriormente se centrifugó durante 30 minutos a 2500 rpm.

Se decantó el sobrenadante y midió el volumen. Se reportó el volumen de NaCl retenido por 100 g de muestra.

6.4.3. Solubilidad

Para esta prueba se extrajeron las proteínas (5 mg/mL, a pH 7) y se centrifugó a una temperatura de 4°C para evitar su desnaturalización. Al sobrenadante extraído se le midió la concentración de proteínas mediante método Biuret.

Se reportó la solubilidad como la relación entre el contenido de proteínas del sobrenadante y el contenido de la proteína sin centrifugar por 100 (Pilosof, 2000).

6.4.4. Determinación de grupos disulfuro y sulfhídrido totales

Se utilizó el método Ellman (1959) reportado en Dublán *et al.* (2006). Se mezcló 1 mL de la disolución proteica (5 mg/mL a pH 7) y 9 mL de urea 8 M disuelta en un amortiguador de Tris-Glicina-EDTA (10.4 g/L Tris; 6.9 g/L Glicina; 1.2 g/L EDTA; pH 8). Se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min. Se tomaron 3 mL de la mezcla y se añadieron 50 mL de

una disolución del reactivo 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (4 mg/mL en la misma disolución amortiguadora). Se dejó reposar por 30 min en obscuridad. Se midió la absorbancia a 412 nm.

Así mismo se transformó el valor de absorbancia empleando la siguiente ecuación:

$$SS \text{ o } SH_T = (75.53) * (DO_1 - DO_2) 10 / C \text{ siendo:}$$

SS o SH_T: concentración de disulfuros o sulfhídricos totales/muestra (μM SH o SS/g proteína)

DO₁: la absorbancia a 412 nm de la muestra a los 15 min de agregarse el reactivo.

DO₂: la absorbancia a 412 nm del blanco de reactivos.

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

6.4.5 Formación de gel reportado (Dublán, 2006)

Las muestras de PM extraídas en el apartado 7.4.3 se transfirieron a viales de vidrio de 30 mm x 35 mm (diámetro x altura). Se colocó el contenedor en un baño de agua. Se sometió a calentamiento gradual de 1 °C/min hasta alcanzar una temperatura interna del gel de 80 °C para inducir la gelificación. Se retiraron los contenedores y se colocaron en baño de hielo para enfriar. Se almacenó en refrigeración a una temperatura no mayor a 4 °C para madurar la estructura del gel. Los cuales se emplearon en la prueba de Análisis de Perfil de Textura TPA.

6.4.6 Análisis de textura TPA Método García (Dublán, 2006)

El análisis de textura de los geles se realizó utilizando un analizador de textura TA-XT2, v2.63 (Texture Technologie Corporation, Scarsdale, Nueva York, EE.UU.) equipado con una célula de carga de 25 N. Los geles se equilibraron y se evaluaron a temperatura ambiente (20-25 °C).

Se prepararon tres muestras en forma de cilindro con una longitud de 2,5 cm y se sometieron a determinación. Las muestras se comprimieron dos veces hasta el 80% de su altura original. El TPA se midió utilizando el analizador de textura equipado con un émbolo esférico (diámetro 1,25 cm, velocidad de depresión de 1 mm/s, reposo de 5 seg entre primera y segunda compresión). Los datos se analizaron utilizando el software Texture Expert versión 1.20 (Stable Micro Systems, Surrey, U.K) y se calcularon dureza, cohesividad, elasticidad, gomosidad y resiliencia.

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A los resultados obtenidos se aplicó un ANOVA y a las diferencias significativas la comparación múltiple de Bonferroni con una ($p < 0.05$), con el programa Stat Graphics versión 2.3.

8. RESULTADOS

8.1. Degradación fotocatalítica de E2

La Figura 9 muestra el perfil de degradación de E2 bajo radiación UV y TiO_2 como fotocatalizador. Se observa una eliminación de aproximadamente el 85%. Cabe mencionar que este valor es el máximo alcanzado durante el proceso la concentración de E2 después de 60 minutos de tratamiento era menor y fuera del límite de detección del equipo. La eficiencia de remoción de la tecnología evaluada es aproximadamente al 85%. Para establecer el efecto de la luz se realizó un experimento sin catalizador y después de 60 minutos de reacción el E2 se eliminó 30%. Esto resalta el efecto del fotocatalizador sobre el proceso de eliminación. Además, se realizó un experimento de adsorción, es decir catalizador sin luz. Se determinó que la remoción máxima alcanzada de E2 por adsorción era del 5% después de 60 minutos de tratamiento.

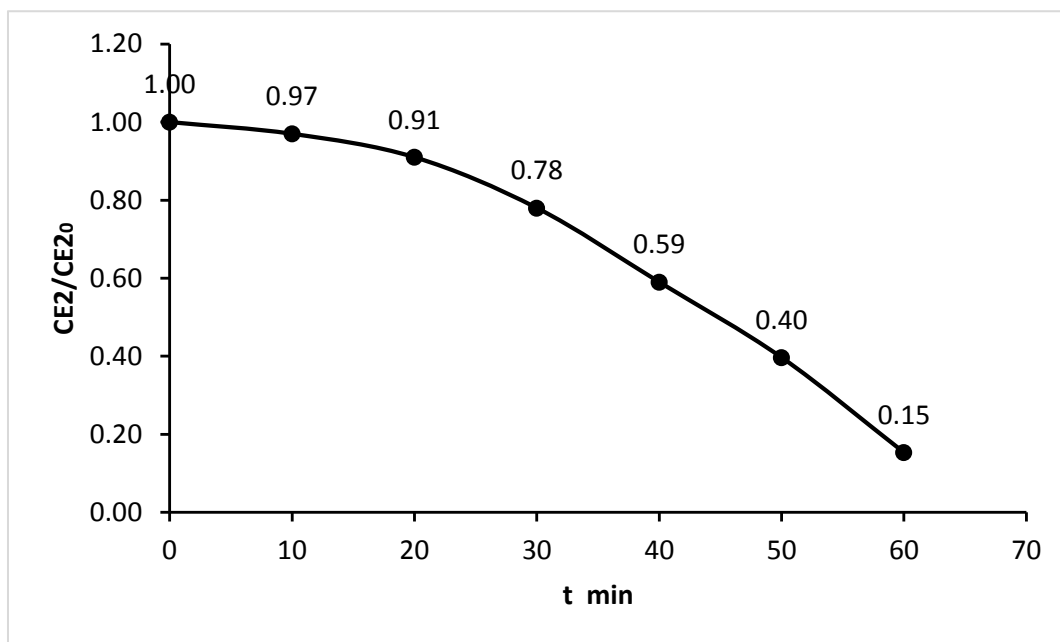


Figura 9. Evolución de la concentración de 17-β-estradiol con el tiempo.
 Volumen de reacción=14L, T= 298 K, QO2= 50 mL.min⁻¹

8.2. Estrés oxidativo

8.2.1. Concentración de 17-β-estradiol en sangre de carpa común

La Tabla 2 muestra los resultados del agua añadida con dos concentraciones ambientalmente relevantes de 17-β-estradiol y su cambio con el tiempo en el agua y en la sangre de la carpa común.

Se observa que tanto para C1 como para C2, la concentración de 17-β-estradiol disminuye en el agua y aumenta gradualmente en la sangre de los peces. Mientras que para las aguas tratadas fotocatalíticamente, tanto para la concentración C1 como C2, no se identificó 17-β-estradiol en ninguno de los tiempos de exposición, así mismo, este contaminante no se identificó en la sangre.

Tabla 1. Concentración de 17-β-estradiol en agua y sangre de *Cyprinus carpio* antes y después de tratamiento fotocatalítico

Tiem-po	Agua sin tratamiento fotocatalítico C1	17-β-estradiol en sangre de carpa común en agua sin tratamiento fotocatalítico C1	Agua con tratamiento fotocatalítico C1	17-β-estradiol en sangre de carpa común en agua con tratamiento fotocatalítico C1	Agua sin tratamiento fotocatalítico C2	C2 17-β-estradiol en sangre de carpa común en agua sin tratamiento fotocatalítico C2	Agua con tratamiento fotocatalítico C2	17-β-estradiol en sangre de carpa común en agua con tratamiento fotocatalítico C2
0 h	1 ± 0.0 ng/L	0 ± 0.0 ng/L	NI	NI	1 ± 0.0 µg/L	0 ± 0.0 µg/L	NI	NI
12 h	0,8 ± 0,02 ng/L	0,12 ± 0,03 ng/L	NI	NI	0,87 ± 0,03 µg/L	0,10 ± 0,01 µg/L	NI	NI
24h	0,7 ± 0,01 ng/L	0,23 ± 0,01 ng/L	NI	NI	0,81 ± 0,05 µg/L	0,16 ± 0,03 µg/L	NI	NI
48h	0.5 ± 0.03 ng/L	0.42 ± 0.02 ng/L	NI	NI	0.62 ± 0.04 µg/L	0.33 ± 0.02 µg/L	NI	NI
72h	0.42 ± 0.02 ng/L	0.54 ± 0.04 ng/L	NI	NI	0.53 ± 0.03 µg/L	0.41 ± 0.01 µg/L	NI	NI
96 h	0.4 ± 0.02 ng/L	0.76 ± 0.03 ng/L	NI	NI	0.35 ± 0.04 µg/L	0.58 ± 0.04 µg/L	NI	NI

8.2.2. Resultados LPX en sangre

La Figura 9 muestra los resultados relativos al nivel de lipoperoxidación en sangre de *Cyprinus carpio* expuesto a E2 en dos concentraciones C1 y C2; antes (AC1 y AC2) y después (DC1 y DC2) del tratamiento de fotocátalisis con TiO₂. En el cual se puede observar un aumento significativo (P < 0.05) de la lipoperoxidación con respecto al grupo de control en el agua sin tratamiento a las 12 h en AC1 (116%), a las 24 h en AC1 (110%) y en AC2 (112%), a las 48 h en AC1 (112%) y AC2 (117%), a las 72 h en AC1 (116%) y finalmente a las 96 h en AC1 (114%) y AC2 (122%). Cabe destacar la diferencia en el grado de lipoperoxidación observado en todo momento, excepto a las 12 h, en ambas concentraciones si se comparan los resultados obtenidos de la exposición al agua antes y después del tratamiento.

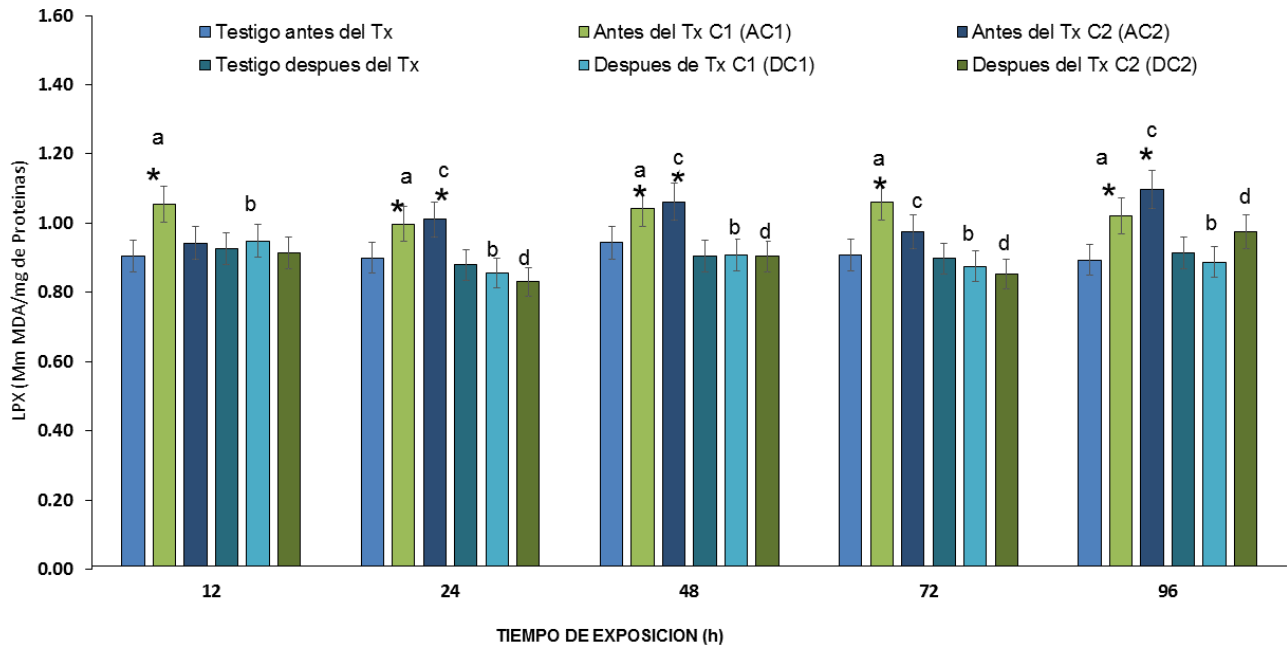


Figura 10. Comparación de grado de peroxidación lipídica (LPX) en sangre de *Cyprinus carpio* expuesta a agua contaminada con 17- β -estradiol (E2)[1ng (C1) y 1 μ g (C2)] antes del tratamiento y después de su tratamiento (TiO₂/UV, durante 12, 24, 48, 72 y 96 horas).

8.2.3. Resultados HPX

En la Figura 10 se muestran los resultados referidos al contenido de hidroperóxidos en sangre de *Cyprinus carpio* expuestos a E2 en dos concentraciones C1 y C2; antes (AC1 y AC2) y después (DC1 y DC2) del tratamiento fotocatalítico con TiO₂. Se observa un aumento significativo del contenido de hidroperóxido ($P < 0.05$) con respecto al control en ambas concentraciones probadas en el agua sin tratamiento, a 12 h AC1 (324%) AC2 (715%), a 24 h AC1 (209%) AC2 (826%) y a 48 h en AC1 (186%) AC2 (397%). Sin embargo, 72 h y 96 h se observa un aumento significativo del contenido de hidroperóxido ($P < 0.05$) con respecto al control en la concentración más alta; AC2 (244%) y AC2 (221%) respectivamente. Por otro lado, se observó una disminución significativa ($P < 0.05$) del contenido de hidroperóxido con respecto al control en las concentraciones más bajas probadas en el agua tratada a las 72 h y 96 h, en DC1 (24%) y DC1 (21%) respectivamente. Es importante

destacar que en todo momento de la exposición hay diferencias entre las dos concentraciones probadas antes y después del tratamiento; AC1 vs DC1 y AC2 vs DC2.

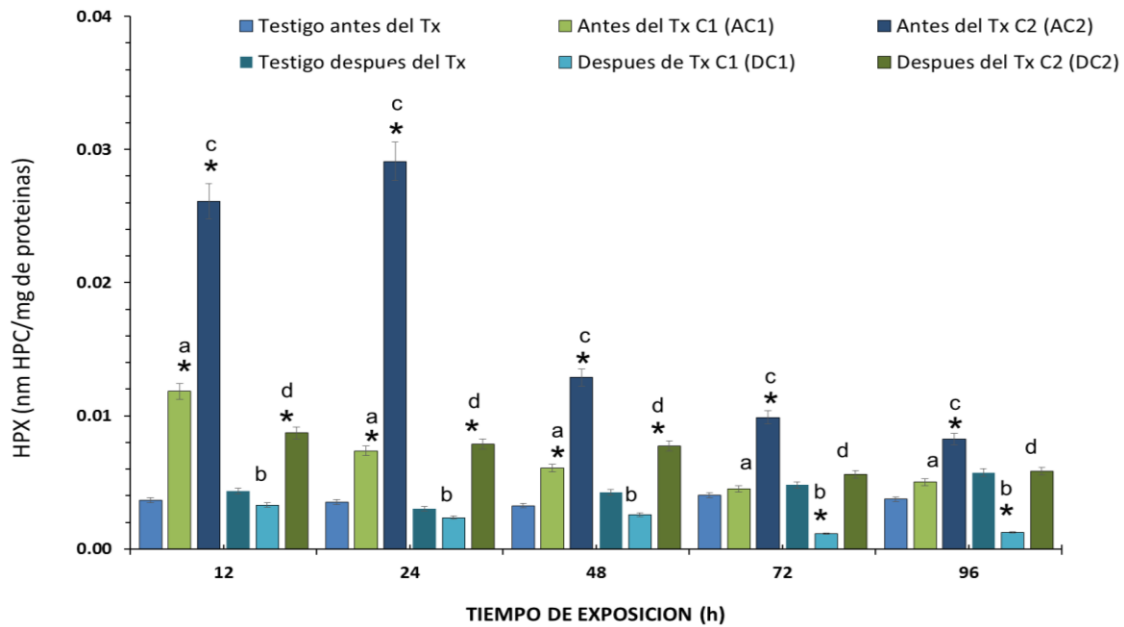


Figura 11. Comparación del contenido de hidroperóxido (HPC) en sangre de *Cyprinus carpio* expuesto a agua contaminada con 17- β -estradiol (E2)[1ng (C1) y 1 μ g (C2)] antes y después de su tratamiento (TiO₂/UV) durante 12, 24, 48, 72 y 96 h.

8.2.4. Resultados del PCC

En la Figura 11 se observan los resultados referentes al contenido de proteínas carboniladas en sangre de *Cyprinus carpio* expuestas a E2 en dos concentraciones C1 y C2; antes (AC1 y AC2) y después (DC1 y DC2) del tratamiento de fotocatalisis con TiO₂. En ella se puede apreciar un aumento significativo (P <0.05) del contenido en carbonilato proteico respecto al grupo control, tanto en las concentraciones probadas como en ambos grupos, con y sin tratamiento, a las 12 h en ambas concentraciones sin tratamiento AC1 (122%) y en AC2 (157%) así mismo en la concentración más alta después del tratamiento, DC2 (109%), a las 24 h en ambas concentraciones sin tratamiento AC1 (124%) y en AC2 (186%), y también en la concentración más baja después del tratamiento, DC1 (110%). Después de 48 horas, sólo se observó un aumento de la significación en los grupos sin tratamiento de agua, a las 48 h en AC2 (125%), a las 72 h en AC1 (123%) y AC2 (154%) y finalmente a las 96 h en AC1 (160%) y en AC2 (189%). Por otro lado, se

observó una disminución significativa ($P < 0.05$) con respecto al grupo control, a las 12 h DC1 (68%), 48 h AC1 (84%) y a las DC2 (72%) y finalmente a las 72 h en DC2 (87%). Es importante destacar la diferencia entre las dos concentraciones probadas antes y después del tratamiento a las 12, 72 y 96 h, y sólo en la concentración más alta a las 24 y 48 h.

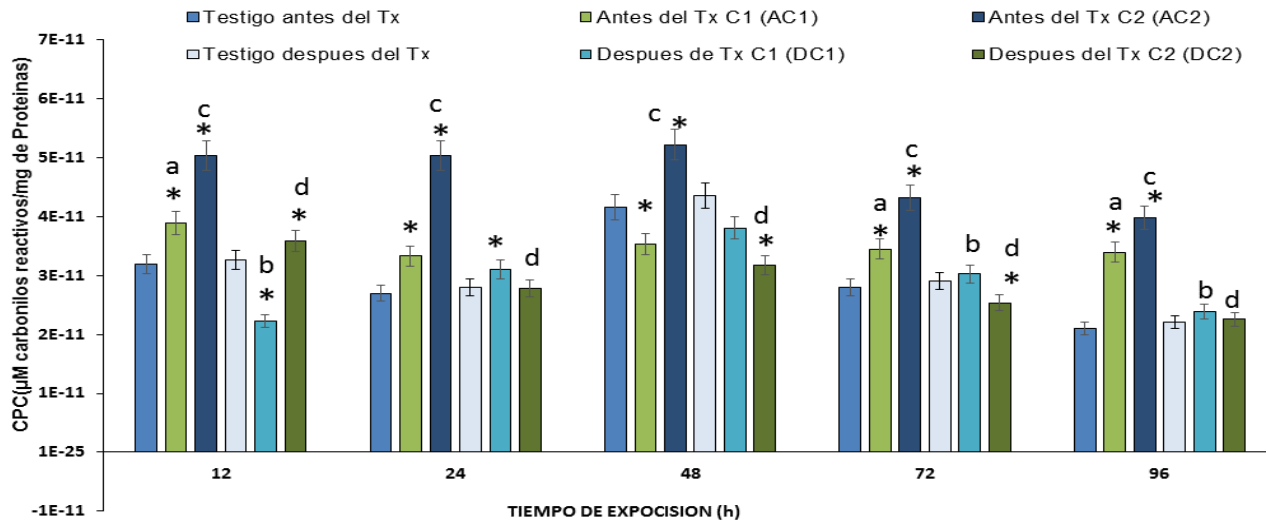


Figura 12. Comparación de contenido de proteínas carboniladas (PCC) en sangre de *Cyprinus carpio* expuesta a agua contaminada con 17- β -estradiol (E2)[1ng (C1) y 1 μ g (C2)] antes del tratamiento y después de su tratamiento (TiO₂/UV, durante 12, 24, 48, 72 y 96 horas)

8.3. Actividad de las enzimas antioxidantes

8.3.1. Actividad SOD

La Figura 12 muestra la actividad de la SOD en sangre de *Cyprinus carpio* expuesta a E2 en dos concentraciones C1 y C2; antes (AC1 y AC2) y después (DC1 y DC2) del tratamiento fotocatalítico con TiO₂. El gráfico muestra un aumento significativo de la actividad de la CÉSPED ($P < 0.05$ con respecto al grupo control en ambas concentraciones probadas en todos los tiempos de exposición para el grupo expuesto al agua sin tratamiento, a 12 horas AC1 (140%), AC2 (136%), a 24 horas AC1 (119%), AC2 (125%), a 48 horas AC1 (156%), AC2 (130%), a 72 horas AC1 (134%) AC2 (120%), finalmente a 96 horas AC1 (126%), AC2 (128%). Por otro lado, hubo una disminución significativa ($P < 0.05$) de la actividad de SOD con respecto al grupo de control respectivamente a las 12 h en DC2 (86%). Se observó en todo momento una diferencia en la actividad de la SOD entre las dos concentraciones probadas antes y después del tratamiento del agua.

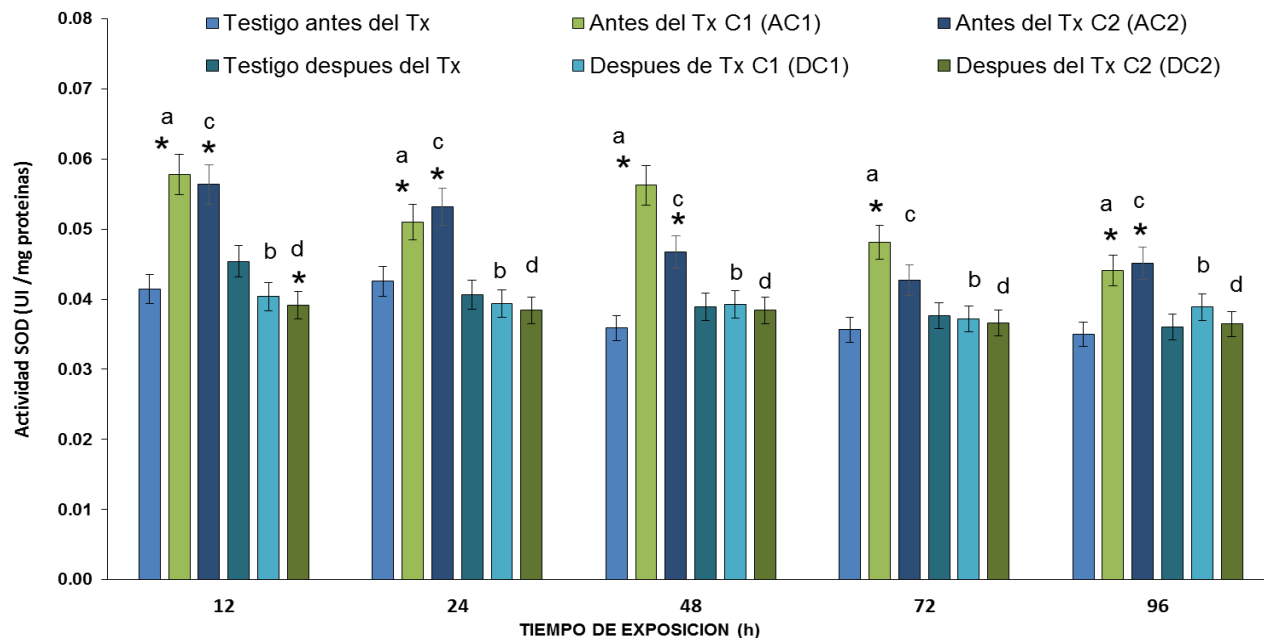


Figura 13. Comparación de Actividad de la superóxido dismutasa (SOD) en sangre de *Cyprinus carpio* expuesta a agua contaminada con 17- β -estradiol (E2)[1ng (C1) y 1 μ g (C2)] antes del tratamiento y después al tratamiento (TiO₂/UV, durante 12, 24, 48, 72 y 96 horas

8.3.2. Actividad del CAT

La Figura 13 muestra la actividad de CAT en sangre de *Cyprinus carpio* expuesto a E2 en dos concentraciones C1 y C2; antes (AC1 y AC2) y después (DC1 y DC2) del tratamiento de fotocatalisis con TiO₂. Se observó un aumento significativo ($P < 0.05$) con respecto al grupo control, a las 12 h AC1 (114%), AC2 (120%), a las 24 h AC1 (129%), AC2 (122%), a las 48 h AC1 (120%), AC2 (130%), a las 72 h AC1 (139%), AC2 (134%) y DC2 (119%) y, finalmente, a las 96 h AC1 (140%) y AC2 (173%). Por otro lado, hubo una disminución significativa ($P < 0.05$) de la actividad de la CAT con respecto al control a las 24 horas DC1 (55%), DC2 (85%), a las 48 horas DC1 (88%) y a las 96 horas DC1 (47%) y DC2 (85%). Finalmente, se encontraron diferencias en todas las concentraciones probadas antes y después del tratamiento del agua en todo momento.

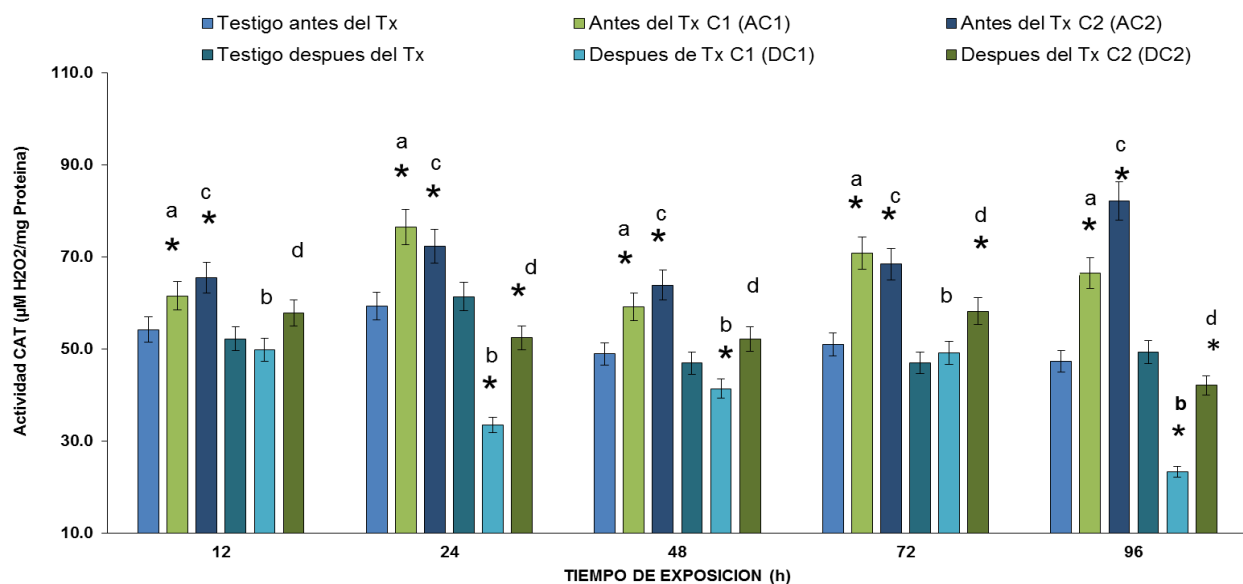


Figura 14. Comparación de la actividad de la catalasa (CAT) en sangre de *Cyprinus carpio* expuesta a agua contaminada con 17- β -estradiol (E2)[1ng (C1) y 1 μ g (C2)] antes de su tratamiento y después de su tratamiento (TiO₂/UV), durante 12, 24, 48, 72 y 96 horas;

8.4. Pruebas fisicoquímicas

8.4.1. pH

El efecto de 17- β -estradiol sobre el pH del musculo de *C. carpio*, generó variaciones en los tiempos de exposición. Un incremento con respecto al control, para la concentración de 1 ng/L a las 12 h de con un valor de 7.1 y un decremento significativo a las 48, 72 y 96 h (6.93, 6.57 y 6.53 respectivamente); con respecto a la concentración de 1 μ g/L se observó un comportamiento similar con respecto al control a la 12 h (7.13) y mientras que para 24 h (7.0). Se observó un decremento a las 48, 72 y 96 h con 6.8, 6.9 y 6.75 respectivamente. Al comparar los tiempos de exposición, para la C1 se observó un decremento significativo con respecto a las 48, 72 y 96 h con un 1.38, 1.64, 1.90% respectivamente. En el caso de la C2 (1.67 μ g/L), se observó a las 72 h un decremento estadísticamente significativo a las 48 y 96 h de 1.07, 1.79 y 1.63% ($p < 0.05$) (Figura 14).

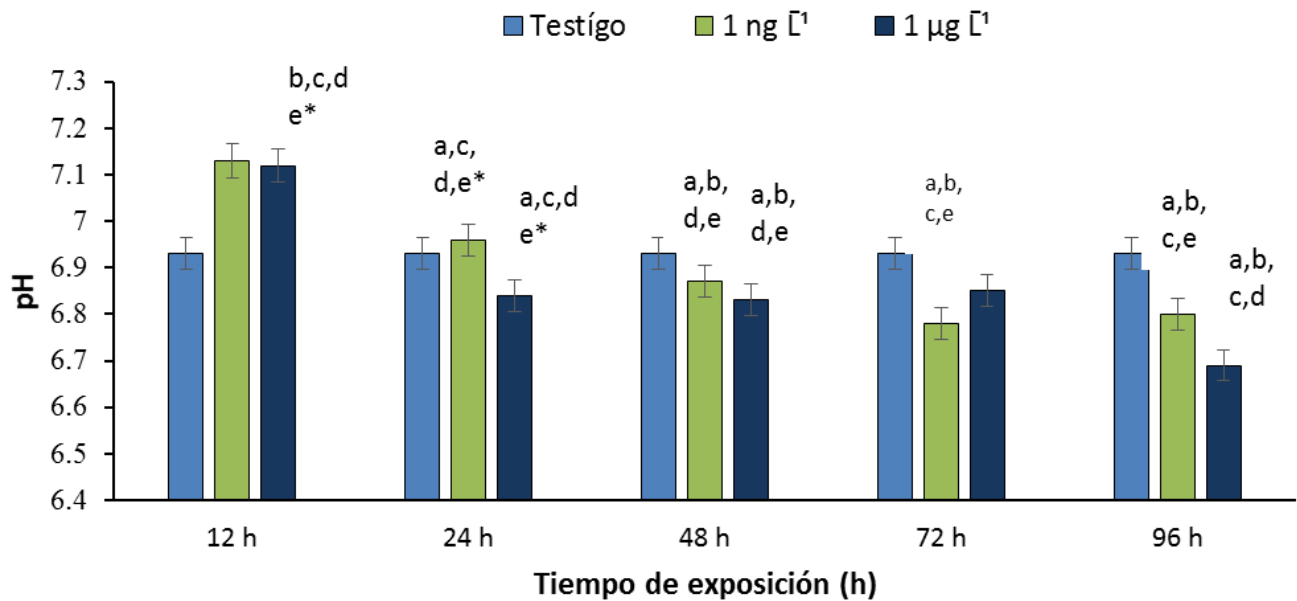


Figura 15. Determinación de pH en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a 17-β-estradiol [1ng (C1) y 1μg (C2)] por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la media de tres repeticiones ± SEM. Significativamente diferente de: * grupo control; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h. ($p < 0.05$), antes del tratamiento, durante 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los asteriscos representan diferencias significativas en comparación con el control ($p < 0.05$).

8.4.2. Capacidad de retención de agua

En el caso de la retención de agua (Figura 15), se observó un decremento significativo con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 1 ng/L a los tiempos de exposición 24, 48, 72 y 96 horas teniendo los siguientes valores (1.29, 2.58, 4.51 y 7.09% respectivamente). Mientras que para la concentración de 1 μg/L la cual mostró un incremento significativo con respecto al control a tres tiempos de exposición 12, 24 y 48 h (4.51, 2.58, 1.29% respectivamente). Por otra parte para las 72 y 96 h de exposición presento un decremento del 1.93 y 8.38 %. Y de igual forma los tiempos de exposición, en la C1 se observó un decremento significativo a las 12 h con respecto a las 24, 48, 72 y 96 h con un 1.92, 3.20, 5.12 y 7.69% respectivamente. En el caso de la C2, se observó un decremento significativo respecto a las 12 h, con un porcentaje de 1.85, 3.08, 6.17 y 12.34 % para los tiempos 24, 48, 72 y 96 h ($p < 0.05$).

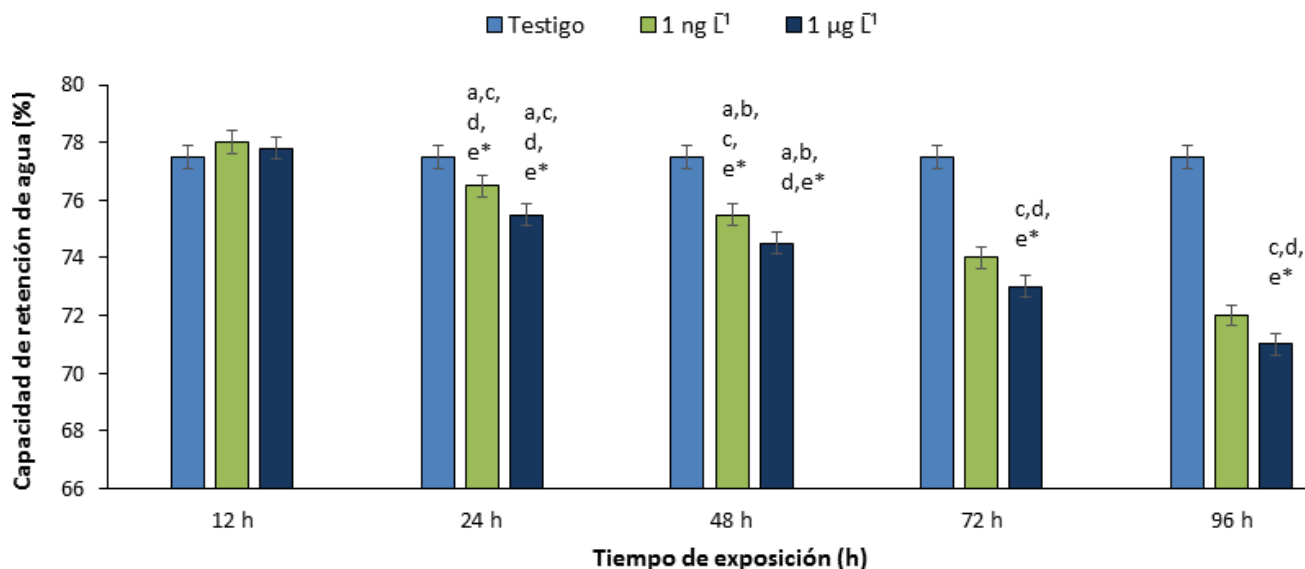


Figura 16. Determinación de capacidad de retención de agua en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a 17- β -estradiol [1ng (C1) y 1 μ g (C2)] durante 12, 24, 48, 72 y 96h. Los valores son la media de tres repeticiones \pm SEM. Significativamente diferente de: * grupo control; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h. (*Bonferroni post hoc*, $p < 0.05$).

8.4.3. Grupos sulfhidrilo

La exposición de *C. carpio* a 17- β -estradiol tuvo un efecto significativo en los enlaces disulfuro, ya que se observó un decremento (Figura 16) con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 1 ng/L a los cinco tiempos de exposición 12, 24, 48, 72 y 96 h (40.62, 12.5, 18.75, 25 y 34.37% respectivamente). Lo cual difirió con la concentración de 1 μ g/L, la cual presentó un incremento significativo con respecto al control a los cinco tiempos de exposición (28.12, 34.37, 75, 31.25 y 25% respectivamente). Al comparar los tiempos de exposición, para la C1 se observó un decremento significativo a las 12, 48, 72 y 96 h respecto a las 24 h con un 32.14, 7.14, 14.28 y 25% respectivamente. En el caso de la C2, se observó a las 12, 24, 72 y 96 h un decremento estadísticamente significativo de 26.78, 23.21, 25 y 28.57% respecto a las 48 h de exposición ($p < 0.05$).

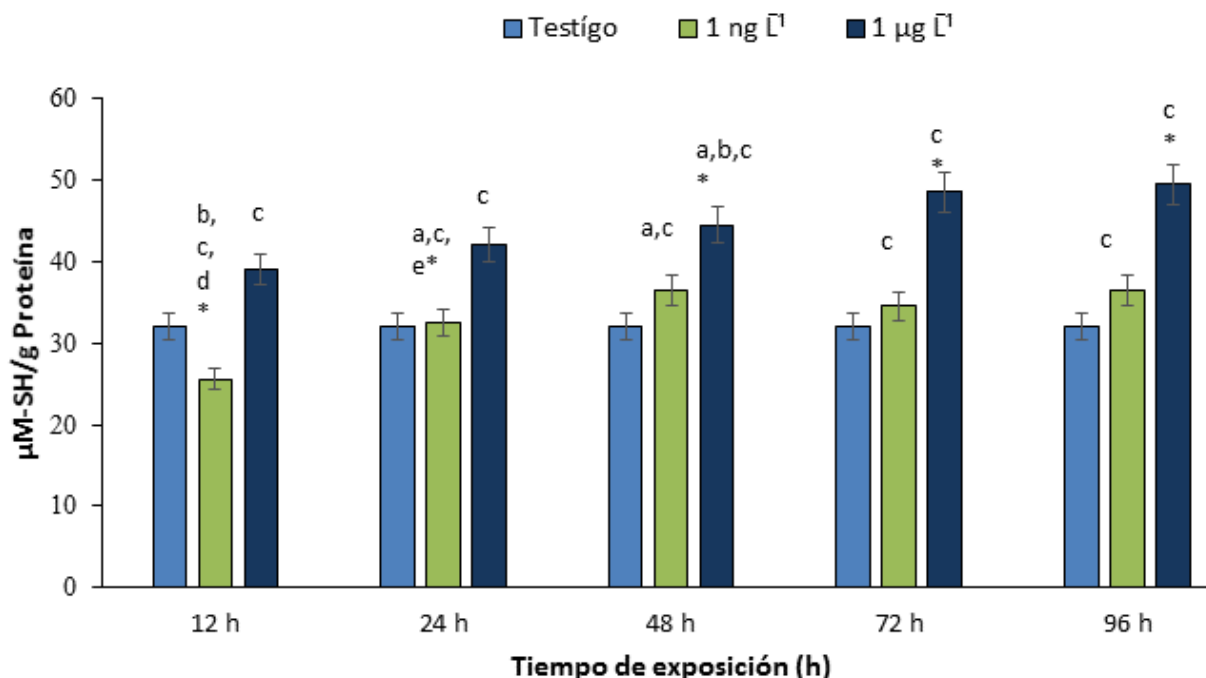


Figura 17. Contenido de grupos sulfhidrido en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a 17-β-estradiol, durante 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la media de tres repeticiones ± SEM. Significativamente diferente de: * grupo control; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h. (Bonferroni; $p < 0.05$).

8.4.4. Solubilidad

En el caso de la solubilidad (Figura 17), se observa un aumento con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 1 ng/L a las 12, 24 y 48 h (52.94, 58.82 y 17.64% respectivamente). Para 72 y 96 h produjo un incremento de 11.76 y 5.88% respectivamente; para la concentración de 1 μg/L se observó un incremento a las 12, 72 y 96 h (29.41, 5.88 y 11.76% respectivamente) y un decremento a las 24 y 48 horas de (23.52 y 11.76% respectivamente). Entre los tiempos de exposición, para la C1 se observó un decremento significativo a las 12, 24, 48 y 96 h con respecto a las 72 h con un 57.89, 63.15, 26.31 y 5.26% respectivamente. En el caso de la C2 se observó a las 12 h un decremento estadísticamente significativo a las 24, 48, 72 y 96 h de 40.90, 31.81, 18.18 y 13.63% ($p < 0.05$). La presencia de 17-β-estradiol puede actuar a nivel proteico, pudiendo generar un cambio en la conformación de la misma, por ejemplo inactivación de algunas proteasas. Dando

como consecuencia una menor solubilidad, ya que la solubilidad está relacionada con el grado de exposición de residuos hidrofóbicos, los cuales son más susceptibles a una desnaturalización (Swaisgood, 1982).

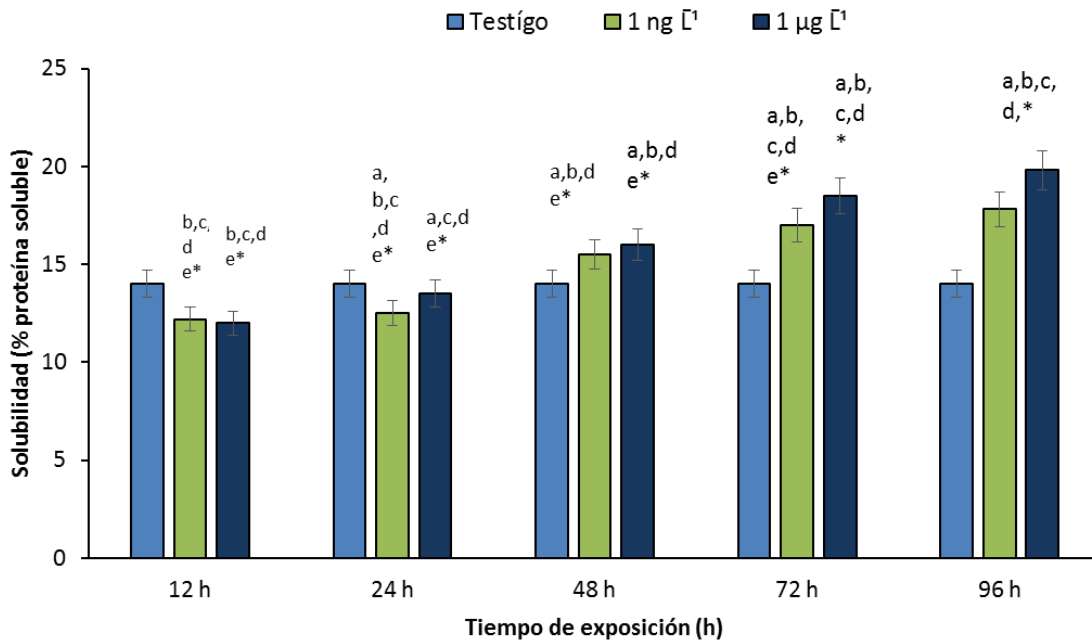


Figura 18. Comportamiento de la solubilidad en músculo de *Cyprinus carpio* expuesta a 17-β-estradiol, durante 12, 24, 48, 72 y 96 h. Los valores son la media de tres repeticiones ± SEM. Significativamente diferente de: * grupo control; ^a12 h; ^b24 h; ^c48 h; ^d72 h; ^e96 h. (Bonferroni; $p < 0.05$).

8.4.5. Análisis de perfil de textura

La Tabla 3 muestra el comportamiento del análisis de perfil de textura; mostrando un decremento en dureza con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 0.039 μg/L a las 12, 24, 48 y 72 horas teniendo los siguientes valores (6.61, 9.09, 10.74 y 3.30% respectivamente) a las 96 horas se mostró un incremento de 4.13%; para la concentración de 1.67 μg/L se observó un incremento a las 72 y 96 horas teniendo los siguientes valores (8.26 y 11.57% respectivamente) y un decremento a las 12, 24 y 48 horas de (2.47, 4.13 y 7.43 % respectivamente).

La cohesividad mostró un incremento con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 0.039 μg/L a los cinco tiempos de exposición 12, 24, 48, 72 y 96 horas teniendo los siguientes valores (123, 107, 92.30, 130.76 y 146.15% respectivamente), para la concentración de 1.67 μg/L se observó un incremento a los cinco tiempos de exposición 12, 24, 48, 72 y 96 horas

teniendo los siguientes valores (138.46, 161.53, 176.92, 192.30 y 223 % respectivamente).

La elasticidad mostró un decremento con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 1 ng/L a las 12, 24, 48, 72 y 96 h (12.76, 17.02, 25.53, 10.63 y 4.25 % respectivamente); para la concentración de 1 µg/L se observó un incremento a las 96 h de 6.38 %, y un decremento a las 12, 24, 48 y 72 h (6.38, 12.76, 17.02 y 2.12% respectivamente). Mientras que para la masticabilidad se observó un decremento significativo con respecto al control ($p < 0.05$) para la concentración de 1 ng/L a las 12, 24, 48 y 72 h (1.27, 1.69, 3.68 y 2.26% respectivamente). De igual forma para la concentración de 1 µg/L se observó un decremento a las 12, 24, 48 y 72 h (0.84, 1.27, 4.10 y 1.13 % respectivamente), y un incremento para las 96 horas de 0.56 %.

Finalmente se determinó la gomosidad mostrándose un incremento con respecto al control ($p < 0.05$) en el músculo a las 12, 24, 48, 72 y 96 h en la concentración de 1 ng/L obteniendo los siguientes valores (100, 78.57, 64.28, 114.28 y 171.42 % respectivamente) y a para la concentración de 1 µg/L a las 12, 24, 48, 72 y 96 horas de (128.57, 157.14, 142.85, 200 y 192.85% respectivamente).

Tabla 2. Análisis de perfil de textura en músculo de *Cyprinus carpio* expuesto a 17-β-estradiol en $C_1 = 1 \text{ ng/L}$ y $C_2 = 1 \text{ µg/L}$, durante 12, 24, 48, 72 y 96 h.

Parámetro	Muestra	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Dureza	Control	1.21	1.21	1.21	1.21	1.21
	1 ngL ⁻¹	1.13a	1.10a	1.08a	1.17a	1.26a
	1 µgL ⁻¹	1.18a	1.16a	1.12a	1.31a	1.35a
Cohesividad	Control	0.13	0.13	0.13	0.13	0.13
	1 ngL ⁻¹	0.29a	0.27a	0.25a	0.30a	0.32a
	1 µgL ⁻¹	0.31a	0.34a	0.36a	0.38a	0.42a
Elasticidad	Control	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47
	1 ngL ⁻¹	0.41a	0.39a	0.35a	0.42	0.45
	1 µgL ⁻¹	0.44a	0.41a	0.39	0.46	0.50
Masticabilidad	Control	706	706	706	706	706
	1 ngL ⁻¹	697	694	680	690	702
	1 µgL ⁻¹	700	697	677	698	710
Gomosidad	Control	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14

1 ngL ⁻¹	0.28	0.25	0.23	0.30	0.38
1 µgL ⁻¹	0.32	0.36	0.34	0.42	0.41

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se evaluó la respuesta toxicológica de *Cyprinus carpio* a través de biomarcadores de estrés oxidativo, después de su exposición en agua contaminada con E2 a dos concentraciones ambientales relevantes. El compuesto estrogénico E2 es conocido por ser metabolizado en el hígado por el sistema de la citocromo p450 monooxigenasa microsómica (Guengerich *et al.*, 1990) formando compuestos hidroxilados. Asimismo, la biotransformación de E2 genera semiquinonas, que con la ayuda del O₂ molecular producen quinonas, formando también el superóxido de anión radical que es capaz de producir oxidación celular (Cavalieri *et al.*, 2000).

En los resultados obtenidos se observa un aumento significativo en el nivel de lipoperoxidación en la sangre de los peces, para ambas concentraciones a las 24, 48 y 96 horas (Figura 9). Los ERO son responsables de iniciar el daño en los lípidos de la membrana celular; los radicales libres resultantes propagan el proceso de lipoperoxidación (LPX), generando una reacción en cadena donde los productos finales son aldehídos, cetonas, ésteres y alcoholes.

Permitiendo la acumulación de HPX que eventualmente se descomponen en una amplia variedad de productos como malondialdehído, hexanal y 4-hidroxinonanal (Konigsberg, 2008). Dicho proceso genera que la membrana pierda sus propiedades fisicoquímicas y finalmente la muerte celular (Velázquez y Vega, 2004).

De acuerdo con lo anterior los resultados (Figura 10) muestran un aumento significativo del contenido de hidroperóxido en la sangre de la carpa común tanto para las concentraciones probadas como en todos los momentos de exposición. Los hidroperóxidos se forman en la etapa de propagación de la LPX, cuando los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico, linolénico y araquidónico), son atacados debido a su baja energía de activación y alta reactividad, formando la peroxidación de los lípidos (Ela y Castillo, 2008).

Otras biomoléculas importantes susceptibles de daño oxidativo son las proteínas, en particular las cadenas laterales con residuos de cisteína y metionina, que son objetivos importantes para la acción oxidativa de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Stadtman, 2004). 4-hidroxi-2-

nonenal, un producto de peroxidación de lípidos, también puede reaccionar con cadenas laterales de proteínas resultando en la carbonilación de proteínas (Nadkarni y Sayre, 1995).

Los resultados (Figura 11) muestran un aumento significativo en el contenido de carbonilación proteica en la sangre de la carpa común, evidente para ambas concentraciones.

La exposición a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre los factores pro-oxidantes y los mecanismos antioxidantes responsables de la eliminación de estas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un aumento exagerado de la producción de ROS, se ha definido como estrés oxidativo (Venereo, 2002). Para la evaluación de la toxicidad también se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT, las cuales a su vez son dos biomarcadores principales del daño oxidativo que pueden ser inducidos por varios contaminantes ambientales bajo condiciones pro-oxidantes, inicialmente incrementados para contrarrestar el estrés oxidativo, sin embargo la exposición prolongada causa su agotamiento, llevando a un daño oxidativo a las macromoléculas, tales como la peroxidación de lípidos, daño a las proteínas y al ADN (Bebianno *et al.*, 2005). Los resultados (Figuras 12 y 13) muestran un aumento significativo en la actividad de la actividad de SOD y CAT en la sangre de la carpa común, observable para ambas concentraciones y en todos los tiempos de exposición.

Los resultados mencionados hasta ahora, como consecuencia de la exposición de los peces teleósteos a aguas contaminadas con E2, concuerdan con los estudios publicados anteriormente. Gutiérrez *et al.*, 2016 reportaron que E2 puede producir el fenómeno de estrés oxidativo en *C. carpio*, los órganos de los peces afectados con dicho proceso fueron, cerebro, branquias, riñón, hígado y sangre; Thilagam *et al.*, 2010 reportaron que el medicamento estrogénico E2 induce un incremento en el ROS, lo que consecuentemente induce alteración del ADN, peroxidación lipídica y un aumento de la enzima glutatión en el tejido hepático de la lubina japonesa *Lateolabrax japonicus*. Costa *et al.*, 2010, describieron un aumento en las actividades de SOD y CAT en el hígado del bagre plateado *Rhamdia quelen*; y Maria *et al.*, 2008 reportaron un aumento en la peroxidación de lípidos y una disminución en la integridad del ADN en las branquias, la sangre y el hígado de la lubina *Dicentrarchus labrax* después de su exposición a E2.

En una segunda etapa de este estudio, el agua contaminada con E2 fue tratada por 60 minutos con un proceso fotocatalítico heterogéneo, utilizando TiO₂ como catalizador en presencia de luz

ultravioleta para la oxidación y remediación del agua de este compuesto estrógeno.

Durante y después el tratamiento, se tomaron muestras y se analizaron mediante HPLC. Los resultados (Figura 7) demuestran que después de 60 minutos, el E2 fue eliminado en un alto porcentaje del agua. Estos resultados coinciden con estudios anteriores donde reportan una alta eficiencia para la eliminación de E2 utilizando procesos de oxidación avanzada como la cloración, ozonización y procesos fotocatalíticos heterogéneos (Coleman *et al.*, 2000; Ohko *et al.*, 2002; Hu *et al.*, 2003; Moriyama *et al.*, 2004; Snyder *et al.*, 2006; Kralchevska *et al.*, 2012; Álvarez-Corena *et al.*, 2016). Para los fines de la presente investigación se centró en la remediación de E2 en el agua y no se evaluó ningún metabolito en la técnica HPLC.

Aunque el proceso de oxidación avanzada probado demuestra ser eficiente para la eliminación de E2, se sabe que durante el proceso se pueden formar diversos subproductos secundarios (Álvarez-Corena *et al.*, 2016). En algunos casos los metabolitos todavía tienen actividad estrogénica, los cuales pueden ser más tóxicos que el compuesto inicial o las condiciones oxidativas del proceso en sí pueden ser dañinas para los organismos acuáticos (Zhang *et al.*, 2008; Irmak *et al.*, 2005; Alum *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 2004).

En este tratamiento la remoción máxima de E2 observada fue de aproximadamente 85%. La cinética de remoción de E2 es comúnmente reportada como primer orden. En este caso, se pueden distinguir dos etapas cinéticas principales en la Figura 7. Una lenta que domina durante los primeros 20 minutos de reacción. Después de este tiempo, la velocidad de reacción aumenta y se espera una nueva ralentización una vez que la concentración de E2 es mucho menor.

Esta tercera etapa no se observa debido a la limitación del equipo analítico para detectar la concentración de E2 más allá de los 60 minutos de tratamiento. La primera etapa puede estar relacionada con un período de inducción que puede depender del volumen de reacción (14 L en este caso) y por lo tanto no ha sido reportado previamente. Es plausible que debido al gran volumen tratado, al principio del tratamiento la luz actúe mientras que toma algún tiempo para que las especies oxidantes sean producidas en la superficie fotocatalítica y transferidas al agua donde la oxidación de E2 podría ocurrir.

Por lo tanto, fue importante probar su toxicidad para asegurarse de que el proceso no sólo es eficiente, sino también respetuoso con el medio ambiente.

Asimismo, se midió la concentración de E2 en agua y sangre de *C. carpio* en las dos concentraciones utilizadas y en los diferentes tiempos de exposición, se observó que la concentración de E2 en agua fue disminuyendo con respecto al tiempo y en sangre el fármaco está aumentando.

Además, se observa en la Tabla 1, que en las aguas tratadas con el método fotocatalítico no se identificó ninguna cantidad de E2 ni en agua ni mucho menos en sangre de la carpa. Cabe mencionar que en el cromatograma no se observó ningún pico adicional que hiciera sospechar la presencia de alguno de los metabolitos de E2.

Para la tercera y última parte de este estudio, se expuso la carpa común al agua tratada con el proceso fotocatalítico, y se midió los mismos biomarcadores que en el estudio. Como en la primera parte para su posterior contraste y comparación. Los resultados (Figura 9) muestran una disminución significativa en el grado de peroxidación de lípidos en la sangre de la carpa común en comparación con los resultados anteriores, evidente en ambas concentraciones en todos los tiempos. De acuerdo con lo anterior, o los resultados (Figura 10) también demuestra una disminución significativa del contenido de hidroperóxido en la sangre de la carpa común para ambas concentraciones probadas, en todos los tiempos de exposición en comparación con los resultados anteriores. Además, para C1 todos los valores de HPX calculados eran inferiores a los obtenidos para los controles y para C2, alcanza el mismo nivel de los controles sólo hasta las 96 horas. En cuanto a la carbonilación de proteínas (Figura 11), también se observa una disminución significativa del PCC en la sangre de la carpa común para ambas concentraciones probadas, en todos los tiempos de exposición en comparación con los resultados anteriores, excepto para C1 a las 48 h. De igual forma, la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT disminuyó en la sangre de la carpa común para ambas concentraciones probadas, en todos los tiempos de exposición comparados con los resultados anteriores. Los resultados descritos anteriormente concuerdan con informes anteriores en la literatura que utilizan otros biomarcadores y bajo diferentes procesos de oxidación avanzada. Hu *et al.*, 2003, describen una disminución en la actividad estrogénica de un agua contaminada después de su cloración acuosa usando NaClO, así mismo Ermawati *et al.*, 2007; Alum *et al.*, 2004 y Huber *et al.*, 2004, reportaron una disminución en la actividad estrogénica de agua contaminada después de un proceso de ozonización. Chen *et*

al., 2007, mencionan una disminución en la actividad estrogénica de un agua contaminada después de su tratamiento usando un proceso UV/H₂O₂. Aunque la actividad estrogénica y el estrés oxidativo son dos biomarcadores diferentes, ambos están interconectados. White *et al.*, 2010, Mobley y Brueggemeier, 2004 informan que el E2 induce cambios en el estado antioxidante al reducir la capacidad de las células para metabolizar especies reactivas de oxígeno a través de un mecanismo mediado por disruptores endocrinos.

9.1. Pruebas fisicoquímicas

En la figura 12 se muestran una disminución significativa de pH. Dicho decremento resulta de la acumulación de ácido láctico producido por glicólisis anaerobia que se lleva a cabo en el músculo, la cual disminuye los valores de pH. La cantidad de ácido láctico producido se relaciona con la cantidad del glucógeno almacenado en los tejidos, este último fungiendo como la fuente principal de energía en animales. Esta disminución del compuesto es una respuesta del estrés inducido por biocidas, metales y efluentes, así como de los contaminantes emergentes. (Gutiérrez *et al.*, 2016) corroboran que la carpa común presenta estrés oxidativo en presencia de 17- β -estradiol.

Como ya se ha mencionado anteriormente es la habilidad de la carne de mantener el agua propia o añadida después de aplicase una fuerza externa (Lun *et al.*, 2008; citado en Lu 2016). Es un parámetro cualitativo para la industria alimentaria en los atributos sensoriales, influye en el procesamiento o almacenamiento. En la Figura 13 se observa una disminución de la capacidad de retención de agua (CRA) a medida que incrementa el tiempo de exposición. Lu, Wang, Luo (2016), reportan que la oxidación proteica es un factor restrictivo importante en la capacidad de las miofibrillas de absorber agua, el incremento de la acción proteolítica y el entrecruzamiento de las proteínas miofibrilares puede afectar negativamente la CRA del músculo. Esto concuerda con lo reportado por Huff-lonergan y Lonergan en 2005, quienes mencionan una correlación negativa entre la capacidad de retención de agua y la dureza de músculo de pescado, donde se demuestra que la acción proteolítica y el entrecruzamiento disminuyen la capacidad de retención de agua. La exposición a 17- β -estradiol, tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) en los grupos SH, debido a que la conversión de los grupos SH en puentes disulfuro es uno de los primeros eventos observables durante la formación de radicales originados por oxidación de proteínas. La cisteína presente en el núcleo catalítico de la miosina, tal vez el residuo más susceptible a los radicales de

oxígeno y el primero en ser oxidado (Park *et al.*, 2006).

Es por esto que los enlaces disulfuro toman gran importancia en la conformación de la estructura terciaria de las proteínas, y de igual forma es termodinámicamente más estable cuando otras fuerzas de atracción son débiles confiriendo firmeza al músculo. Cuando se observa una mayor cantidad de enlaces disulfuro, las proteasas presentes son tal vez incapaces de llevar a cabo su función, disminuyendo así la degradación de las propiedades funcionales (Pilosoff, 2000).

Las propiedades funcionales de la carne de pescado como matriz alimentaria refleja las características bioquímicas de la miosina, que es el componente mayoritario de las proteínas miofibrilares, la estabilidad de las funciones del alimento en carne de pescado está asociada al comportamiento de la miosina (Maitena *et al.*, 2004). Así mismo se ha descrito que el punto isoeléctrico del lado ácido de la miosina se debe a la pérdida de la carga de lisina por reacciones de oxidación con malonaldehído (Estévez 2011).

En el caso de proteína soluble Figura 14, se observó diferencia significativa con respecto al control ($p < 0.05$) a las 12 horas en ambas concentraciones ($0.039 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $1.67 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Para los tiempos de exposición de 48, 72 y 96 horas, se puede apreciar un aumento en la solubilidad, en consecuencia, de la formación de nuevos agregados proteicos. Halliwell y Gutteridge (1999), reportaron que uno de los papeles esenciales de las defensas antioxidantes, en la desintoxicación de la producción de especies reactivas del oxígeno pueden inducir un daño oxidativo, que incluye la inactivación enzimática, degradación de las proteínas y oxidación de lípidos, en este caso se puede observar que el daño a las proteínas inducen a la formación de nuevos enlaces entre la proteína, de tal manera que la proteína soluble disminuye para el caso de la especie expuesta a la 12 y 24 horas, posiblemente llevando a cabo una conformación diferente de la estructura proteica.

La solubilidad de las proteínas (Figura 14) está correlacionada con la proteína soluble, debido a que la presencia de 17- β -estradiol puede actuar a nivel proteico, pudiendo generar un cambio en la conformación de la proteína, formando nuevos enlaces proteína-proteína, así como formación de nuevas redes, enlaces iónicos, enlaces hidrofóbicos y puentes disulfuro (Kinsella *et al.*, 1985). De igual forma también podría existir una degradación proteica dando como consecuencia una mayor solubilidad (Swaisgood, 1982).

La determinación de textura es una propiedad importante para el procesamiento tecnológico y

es un buen indicador de las propiedades texturales de las proteínas miofibrilares del músculo porque no sólo afecta a los atributos sensoriales, sino también a los texturales.

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

Wan-Ling *et al.* (2012) reportaron que dentro de las características sensoriales más importantes a evaluar en los productos cárnicos se encuentran la dureza, resiliencia, cohesividad, gomosidad, elasticidad, dentro de las cuales la dureza se considera el atributo principal cuando se habla de productos acuícolas y marinos. Zakrys *et al.* (2009) afirman la relación entre la oxidación de proteínas y la disminución de características sensoriales en músculo de res al disminuir la degradación proteolítica en la carne durante la maduración y al inducir el entrecruzamiento vía puentes disulfuro. Así mismo debido a que la μ -calpaína y la m-calpaína contienen ambas histidina y residuos de cisteína que contiene grupos tiol (SH) en sus sitios activos, la degradación de dichos grupos debido a las condiciones oxidantes puede generar inactivación enzimática. En este estudio no se observaron diferencias significativas en los parámetros de textura analizados en ningún tiempo de exposición y concentración de GSv con respecto a grupo control ($p < 0.05$), lo cual se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos en EO y las pruebas fisicoquímicas. La actina y la miosina son las principales proteínas que conforman el músculo de *C. carpio*. La integridad de estas proteínas se ve reflejada en las características texturales de la carne de dicha especie. La disminución significativa de los biomarcadores de EO tiene como consecuencia la preservación de la integridad de las fibrillas musculares y por lo tanto la capacidad de las proteínas miofibrilares para producir una buena gelificación del producto analizado.

10. CONCLUSIONES

- De acuerdo al estudio, existe un daño oxidativo con la exposición a las concentraciones de 17- β -estradiol en *Cyprinus carpio*.
- El proceso de fotocátalisis heterogénea es eficaz en el tratamiento de agua con 17- β -estradiol, ya que se refleja una modificación en la actividad de las enzimas antioxidantes en sangre de *Cyprinus carpio* dentro de los cuales se redujo la toxicidad por de estrés oxidativo. Existió un decremento de la enzima superóxido dismutasa.
- La presencia de 17- β -estradiol en cuerpos de agua en concentraciones de 1 ng.L⁻¹ a 1 μ g.L⁻¹ pueden causar efecto negativo en la calidad del músculo de *Cyprinus carpio*, provocando cambios fisicoquímicos de las proteínas, afectando su viabilidad tecnológica.
- La remoción de E2 bajo las condiciones usadas en el tratamiento fue buena, aproximadamente 85%. La toxicidad del agua añadida con E2 se redujo entre un 85-95% una vez tratada mediante fotocátalisis heterogénea con TiO₂. Esto se demostró con la reducción de los valores de los biomarcadores de oxidación celular y de las actividades antioxidantes, que prácticamente alcanzaron niveles basales.

11. BIBLIOGRAFÍA

Atilio de la Orden E., 2000 Contaminación: Guía didáctica. Ecología. Universidad de Catamarca: Científica Universitaria: 1-3.

Balon, E.K., 2006 "The oldest domesticated fishes, and the consequences of an epigenetic dichotomy in fish culture" *Journal of Ichthyology and Aquatic Biology*, 11, 47-86.

Barceló D., de Alda MJ., 2009. Contaminación y calidad química del agua: el problema de contaminantes emergentes. En: Panel Técnico-Científico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona: 1-27.

Bebianno, M.J., Serafim, A., Camus, L., Cosson, R.P., Fialamedoni, A., (2005). Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid- Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquatic Toxicology*. 75(4) 354-373.

Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F: 17-beta estradiol protege las neuronas de la muerte celular inducida por estrés oxidativo in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 13 de noviembre de 1995; 216 (2): 473-82. [PubMed](#) de DrugBank

Benotti MJ et al; *Environ Sci Technol* 43: 597-603 (2009) (2) Boyd GR et al; *Sci Total Environ* 311: 135-149 (2003) (3) Kuch HM, Ballschmiter K; *Environ Sci Technol* 35: 3201-206.

Bermont L, L.-M.F., Chezy E, Weisz A, Adessi GL., 2001. 17beta-estradiol inhibits forskolin-induced vascular endothelial growth factor promoter in MCF-7 breast adenocarcinoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 78(4): p. 343-9.

Bermúdez, M. 2010. Contaminación y Turismo Sostenible disponible en: <http://galeon.com/mauriciobermudez/contaminacion.pdf>. Consultado el: 13/02/2018.

Bernes KK, Kolpin DW., Furlong ET., Zaugg SD., Meyer MT., Barber LB., 2008. A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States. *Groundwater. Sci. Total Environ*: 402.

Berthon G. 2002. Aluminium speciation in relation to aluminium bioavailability, metabolism and toxicity. *Coordination Chemistry Reviews* 228: 319-341.

Bolong, V., Rizzo, L., Fatta, D., Della Rocca, C., Lofrango, G., Nikolaou, A., Naddeo, V., Meric, S., 2007 "Review on endocrine disrupting-emerging compounds in urban wastewater: occurrence and removal by photocatalysis and ultrasonic irradiation for wastewater reuse. *215*, 166-176.

Boxall, A.B.A., Fogg, L.A., Kay, P., Blackwell, P.A., Pemberton, E.J., Croxford, A., 2003 "Prioritisation of veterinary medicines in the UK environment" *Toxicology Letters*, 142, 207-218.

Cavaliere, E., Frenkel, K., Liehr, J. G., Rogan, E., & Roy, D. (2000). Chapter 4: Estrogens as Endogenous Genotoxic Agents-DNA Adducts and Mutations. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 27, 75-93. [[Links](#)]

Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS, Simpson ER: efecto de la testosterona y el estradiol en un hombre con deficiencia de aromatasa. *N Engl J Med*. 1997 10 de julio; 337 (2): 91-5. PubMed de DrugBank

Castillo, G., Vila y E. Neild, 2000 "Ecotoxicity Assessment of Metals and Wastewater using Multitrophic Assays" *Environmental toxicology*, 15, 370-375.

Coleman, J.W., 1990. Allergic reactions to drugs: current concepts and problems. *Allergy* 79-90.

De la Lanza E. G., Hernández, P.S., Carbajal, P.J., 2000 "Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (Bioindicadores)" Plaza y Valdés S.A. de C.V., México, 17-190.

Consuelo M., Bustos MC., Espinosa AJ., 2004. Pruebas de Toxicidad: fundamentos y métodos. *Universidad Nacional de Colombia*: 17-36.

Damstra T., Barlow S., Bergman A., Kavlock R. y Van der Kraak G. (2002). *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors (Evaluación mundial con respecto a la situación de la ciencia de los disruptores endocrinos)*. Publicación de la OMS que lleva la signatura WHO/PCS/EDC/02.2. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.

Delgado S., 2011. Evaluación de tecnologías potenciales de reducción de la contaminación de las aguas de canarias (Tecnología). Proyecto Universidad de La laguna.

Desbrow, C., Routledge, E. J., Brighty, G. C., Sumpter, J. P., & Waldock, M. (1998). Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in vitro Biological

Díaz-Torres, E., Gibson, R., González-Farías, F., Zarco-Arista, A. E., & Mazari-Hiriart, M. (2013). Endocrine Disruptors in the Xochimilco Wetland, Mexico City. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(1586), 1586.

Dimogerontas, G., & Liapi, C. (2014). Endocrine Disruptors (Xenoestrogens): An Overview. In T. Eliades & G. Eliades (Eds.). *Plastics in Dentistry and Estrogenicity*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. [[Links](#)]

Diniz MS., Salgado R., Pereira VJ., Carvalho G., Orhmen A., Reis MAM., Noronha JP., 2015. Ecotoxicity of ketoprofen, diclofenac, atenolol, and their photolysis byproducts in zebrafish (*Danio rerio*). *Science of the total Environment*; 505; 282-289.

División de Protección Pecuaria, 2011. "Evaluación de riesgo ambiental de productos farmacéuticos de usos veterinario" *Boletín Veterinario Oficial*, XIV, 1-9.

Domitrovic H A., 1997. El empleo de peces autóctonos para la realización de ensayos de toxicidad: evaluación de la especie *Aequidens portalerensis* (Hensel, 1870). *Rev. Ictiol*; 5: 37-42.

Duax, WL, Griffin, JF, Weeks, CM, y Wawrzak, Z. (1988). El mecanismo de acción de los antagonistas de esteroides: perspectivas de estudios cristalográficos. *Diario de bioquímica de esteroides*, 31 (4), 481-492. doi: 10.1016 / 0022-4731 (88) 90002-7

Desbrow, C., Routledge, E. J., Brighty, G. C., Sumpter, J. P., & Waldock, M. (1998). Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in vitro Biological

El Habachi, A., Duprey, S., Cheze, L., Dumas, R., 2015a. A parallel mechanism of the 334 shoulder—application to multi-body optimisation. *Multibody Syst. Dyn.* 33, 439–451.

El Habachi, A., Moissenet, F., Duprey, S., Cheze, L., Dumas, R., 2015b. Global sensitivity 337 analysis of the joint kinematics during gait to the parameters of a lower limb multi-body 338 model. *Med. Biol. Eng. Comput.* 655–667.

Espina, S., Vanegas, C., 1996 "Ecotoxicología y contaminación. En: Contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias. A. V."

EPA (2012). CCL 3 List Chemical Contaminants [en línea]. United States Environmental Protection Agency. Consultado el 5 de junio de 2018. Disponible en: <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/ccl3.cfm>.

EPA (2013). Endocrine Disruptor Research [en línea]. United States Environmental Protection Agency. Consultado el 16 de junio de 2018. Disponible en: <http://www.epa.gov/research/endocrinedisruption/faq.htm>. [[Links](#)]

Fan Z et al; *Chemosphere* 67: 886-895 (2007) (2) Khanal SK et al; *Environ Sci Technol* 40: 6537-

6546 (2006) Stumpe B, Marschner B; J Environ Biol 39: 907-916 (2010).

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2011 "Fisheries and Aquaculture Technical Paper" World aquaculture, 500/1, ISSN 20707010, 6-56.

Farré M., Pérez S., Kantiani L., Barceló D., 2008. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. Trends in Analytical Chemistry. 27 (11): 991-1007.

Fennema, O. R., Food Chemistry, 3rd Ed., New York, Marcel Dekker. 2010.

Galar Martínez M., Gómez Oliván LM., Amaya Chávez A., Razo Estrada C., García Medina S., 2010. Oxidative stress inducen on *Cyprinus carpio* by contaminants present in the whater and sediment of Madín reservoir. Journal of Environmental Science and Health Part A; 45: 155-160.

Gassim, F., A.N. Alkhateeb, and F.H. Hussein, 2007. Photocatalytic oxidation of benzyl alcohol using pure and sensitized anatase. Desalination. 209 (1-3): p. 342-349.

Geyer HJ et al, 2002. Bioacumulación y presencia de sustancias químicas disruptoras endocrinas (EDC), contaminantes orgánicos persistentes (COP) y otros compuestos orgánicos en peces y otros organismos, incluidos los seres humanos. En: Handb. Reinar. Chem., Vol. 2, pt. J, Beek B, ed., Berlín, Alemania: Spring-Verlag pp. 1-166

Gil, J.M., Soto, M.A., Usma, J.I., Gutierrez, O.D. 2012 "Emerging contaminants in water: effects and possible treatments (reviwe article)" Producción más limpia, 7(2), 52-73.

Gilbert, N. 2012. Drug-Pollution Law All Washed Up. Nature, 491, 503-504.

Gilbert, N. November, 22, 2012. Drug-Pollution Law All Washed Up. Nature, 491, 503-504. [[Links](#)]

Gurr, C., Reinhard, M., 2006 "Harnessing natural attenuation of pharmaceuticals and hormones in rivers" Environmental Science and Techmology, 272-276.

Guyton, A.C., 2006, in Textbook of Medical Physiology. Elsevier Saunders. p. 1016-1018.

Hammond, G. J. (1995). Potential Functions of Plasma Steroid-Binding Proteins. Trends in Endocrinology & Metabolism, 6(9/10), 298-304. [[Links](#)]

Hansberg, W., 2002 "Biología de las especies de oxígeno reactivas" Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 24, 19-54.

Harris, C., Henttu, P., Parker, M., y Sumpter, J. (1997). La actividad estrogénica de los ésteres de ftalato in vitro. Perspectivas de salud ambiental, 105, 802-811. [CrossRefGoogle Scholar](#)

Harris RM, Waring RH, Kirk CJ, Hughes PJ, 2000. Sulfation of bEstrogenicQ alkylphenols and 17 h-estradiol by human platelet phenol sulfotransferases. *Biol Chem* 275(1):159 – 66 [Issue of January 7].

Helaine M., Hagerman, E.A., 2006 “Oxidative Stress, Exercise and Aging” Imperial College Press, 171.

Herrmann, J.M., 2010. Fundamentals and misconceptions in photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology a Chemistry*. 216 (2-3): p. 85-93.

Hewitt, S.C., J.C. Harrell, and K.S. Korach, 2005. Lessons in estrogen biology from knockout and transgenic animals. *Annu Rev Physiol*, 67: p. 285-308.

Higashitani T, Tamamoto H, Takahashi A, Tanaka H. Study of estrogenic effects on carp (*Cyprinus carpio*) exposed to sewage treatment plant effluents. *Water Sci Technol* 2003; 47(9):93 – 100.

Hileman, B. (January, 31, 1994). Environmental Estrogens Linked to Reproductive Abnormalities, Cancer. *Chemical & Engineering News*, 72(5), 19-23. [[Links](#)]

Imming P, Sinning C, Meyer A, 2006 “Drugs, their targets and the nature and number of drug targets” *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(10), 821-834.

Jarošová, B., Bláha, L., Giesy, J. P., & Hilscherová, K. (2014). What Level of Estrogenic Activity Determined by In Vitro Assays in Municipal Waste Waters Can be considered as Safe? *Environment International*, 64, 98-109. [[Links](#)]

Jiang ZY, Hunt JV, Wolff SP., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem*; 202:384–389.

Jordan, V.C., Fritz, N.F., Tormey, D.C., 1987. Endocrine effects of adjuvant chemotherapy and long-term tamoxifen administration of node-positive patients with breast cancer. *Cancer Res*. 47, 624–630.

Kashiwada, Shosaku & Ishikawa, Hidenori & Miyamoto, Nobukazu & Ohnishi, Yuta & Magara, Yasumoto. (2002). Fish test for endocrine-disruption and estimation of water quality of Japanese rivers. *Water research*. 36. 2161-6. 10.1016/S0043-1354(01)00406-7.

Khanal SK et al, 2006a. Bioacumulación y presencia de sustancias químicas disruptoras endocrinas (EDC), contaminantes orgánicos persistentes (COP) y otros compuestos orgánicos en peces y otros organismos, incluidos los seres humanos. En: *Handb. Reinar. Chem.*, Vol. 2, pt. J, Beek B, ed., Berlín, Alemania: Spring-Verlag pp. 1-166

[Khanal SK](#)¹, [Xie B](#), [Thompson ML](#), [Sung S](#), [Ong SK](#), [Van Leeuwent J](#), 2006b. Destination, transport and biodegradation of natural oestrogens in the environment and engineering systems *[Environ Sci Technol](#)*. 1 de noviembre; 40 (21): 6537-46.

Kashiwada S., Ishikawa H., Miyamoto N., Ohnishi Y., Magara Y. Prueba de peces para la alteración endocrina y estimación de la calidad del agua de los ríos japoneses. *Agua res.* 2002; 36: 2161–2166. doi: 10.1016 / S0043-1354 (01) 00406-7. [PubMed](#) [CrossRef](#)

Kerdan, G.I. 2008. Contaminación del agua. UNAM. Disponible en: <http://www.profesores.fi-b.unam.mx> (citado 27/01/2015).

Konigsberg, M., 2008 “Radicales libres y estrés oxidativo: Aplicaciones Médicas” Editorial el Manual Moderno, México.

Kummerer, K., 2010 “The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use present knowledge and future challenges” *Journal of Environmental Manage*, 90, 2354-2366.

Lai KM, Johnson KL, Scrimshaw MD, Lester JN. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. *Environ Sci Technol* 2000; 34:3890 – 4.

Lavado, R., Ureña, R., Martin-Skilton, R., Torreblanca, A., del Ramo, J., Raldu’a, D., Porte, C., 2006. The combined use of chemical and biochemical markers to assess water quality along the Ebro River. *Environ. Pollut.* 139, 330–339.

Larrain, A., 1995 “Criterios ecotoxicológicos para evaluar alteraciones ambientales y establecer parámetros de control: Importancia de los Bioensayos de Toxicidad.” *Revista Ciencia y Tecnología del Mar. Cona (Nº Especial):*39-47.

Levine RL., Williams JA., Stadtman ER., Shacter E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*; 233: 346–357.

Lintelmann, Jutta and Katayama, Arata and KURIHARA, N and Shore, Laurence and Wenzel, Andrea, 2003, International Union of Pure and Applied Chemistry Division of Chemistry and the Environment Commission on Water and Soil. *Endocrine disruptors in the environment*, Vol. 75, journal, *Pure Appl. Chem.*

Li, P.Y., Chang, Y.C., Tzang, B.S., Chen, C.C., Liu, Y.C., 2007, “Antibiotic amoxicillin induces DNA lesions in mammalian cells possibly via the reactive oxygen species” *Mutation Research* 629 (2007) 133-139.

Lin AY-C, Reinhard M; *Environ Toxicol Chem* 24: 1303-1309 (2005).

Loganathan, B., Phillips, M., Mowery, H., and Jones-Lepp, T. L. (2009). Contamination profiles and mass loadings of macrolide antibiotics and illicit drugs from a small urban wastewater treatment plant. *Chemosphere* 75, 70–77. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.047

Mancera Rodríguez NJ., Álvarez León R., 2006. Estado del conocimiento de las concentraciones

de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia. *Acta Biológica Colombiana*; 11: 3-23.

Marye Anne Fox, James K. Whitesell 2000 *Chemistry, Organic* -Prentice Hall [et.], 1232 pages. Edition, 2. Publisher, Prentice Hall [et.]

Machordom, A., Doadrio, I., 2001. Evolutionary history and speciation modes in the cyprinid genus *Barbus*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268, 1297– 1306.

Maggi, A., Ciana, P., Belcredito S., 2004. Estrogens in the nervous system: Mechanisms and nonreproductive functions. *Annu. Rev. Physiol.* 66: p. 291-313.

Matozzo, V., Gagne, F., Marin, M. G., Ricciardi, F., & Blaise, C. (2008). Vitellogenin as a Biomarker of Exposure to Estrogenic Compounds in Aquatic Invertebrates: A Review. *Environment International*, 34, 531-545.

Mayor Oxila, R., 2010 “Estrés oxidativo y sistema de defensa antioxidante” *Revista del Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 5(2), 23-29.

Meyer, J.N., Wassenberg, D.M., Karchner, S.I., Hahn, M.E., Di Giulio, R.T., 2003. Expression and inducibility of aryl hydrocarbon receptor pathway

Miller, W.L., 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev*, 9(3): p. 295-318.

Misra HP, Fridovich I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem*; 247: 3170–3175.

Moeller, G. and J. Adamski, 2009. Integrated view on 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol.* 301(1-2): p. 7-19.

Mora-Pale, M., Sanchez-Rodriguez, S. P., Linhardt, R. J., Dordick, J. S., and Koffas, M. A. G. (2014). Biochemical strategies for enhancing the in vivo production of natural products with pharmaceutical potential. *Curr. Opin. Biotechnol.* 25, 86–94. doi: 10.1016/j.copbio.2013.09.009

Moré Jaramillo R., 2011. Curso sobre definición de indicadores ambientales. Disponible en: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358024/contLinea/leccin_28_indicadores_biolgicos_de_contaminacin_acutica.html. Fecha de consulta: 08/08/2018.

Monteiro, S.M., Mancera, J.M., Fonaínhas-Fernandes, A., Sausa, M., (2005). Cooper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 141, 375-383.

Moreno, G., 2003 “Toxicología ambiental evaluación del riesgo para la salud humana” Mc Graw

Hil, España. 370.

National Toxicology Program (2011). Report on Carcinogens: (499 pp.) (12th Edition). North Carolina, USA: U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service. [[Links](#)]

Occurrence (pp. 1-35). In O. Hutzinger, D. Barceló, & A. Kostianoy (Eds.). The Handbook of Environmental Chemistry. Berlin: Springer. [[Links](#)]

Ochoa DM, González JF., 2008. Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. Rev. Med. Vet. Zoot; 55: 115-126.

Oetken, M., Bachmann, J., Schulte-Oehlmann, U., & Oehlmann, J. (2004). Evidence for Endocrine Disruption in Invertebrates. International Review of Cytology, 236, 1-44. [[Links](#)]

Okamoto T, Yoshiyama H, Nakazawa T, Park ID, Chang MW, Yanai H, Okita K, Shirai M, 2002 "A change in PBP1 is involved in amoxicillin resistance of clinical isolates of Helicobacter pylori" Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 50(6), 849-856

Ondarza, P.M., Miglioranza, K.S.B., Gonzales, M., Shimabukuro, V.M., Aizpún, J.E., Moreno, V.J., 2010 "Organochlorine compounds in common carp (Cyprinus carpio) from Patagonia, Argentina" Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology, 5(1), 41-47.

Oteiza PA. Modificación activa de las proteínas. Antioxidante y Calidad de Vida 1995; 2: 12-20.

Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL., 2006 "How many drug targets are there?" Nature Reviews Drug Discovery, 5(12), 993-996.

Park, S., Choi, K., 2008. "Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems". Ecotoxicology" 17, 526-538.

Pérez S., Barceló D., 2007. Fate and occurrence of X-ray contrast media in the environment. Anual. Bioanal. Chem.; 387: 1235-1246.

Petrovic, M., Radjenovic, J., Postigo, C., Kuster, M., Farre, M., De Alda, M. L., & Barceló, D. (2008). Emerging Contaminants in Wastewaters: Sources and

Perez-Garcia O (2016) Degrading Organic Micropollutants: The Next Challenge in the Evolution of Biological Wastewater Treatment Processes. Front. Environ. Sci. 4:36. doi: 10.3389/fenvs.2016.00036

Poynton H C., Vulpe C D., 2009. Ecotoxicogenomics: Emerging Technologies for Emerging Contaminants. Journal of the American Water Resources Association; 45: 83-96.

Petrie, B., Barden, R., and Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* 72, 3–27. doi: 10.1016/j.watres.2014.08.053

Prat N., 1998. Bioindicadores de calidad de aguas. En: Manuscritos Curso de Bioindicadores de calidad de Agua. Universidad de Antioquia Medellín.

Prat, N., Rieradevall, M., Barata, C., & Munné, A. (2013). The Combined Use of Metrics of Biological Quality and Biomarkers to Detect the Effects of Reclaimed Water on Macroinvertebrate Assemblages in the Lower Part of a Polluted Mediterranean River (Llobregat River, NE Spain). *Ecological Indicators*, 24, 167-176. [[Links](#)]

Radi R., Turrens JF., Chang LY., Bush KM., Crapo JD., Freeman BA., 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J Biol Chem*; 266: 22028–22034.

Ramírez Romero P., Mendoza Cantú., 2008. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo: La experiencia en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Materiales (SEMARNAT). 1ra edición; México DF: 1-11.

Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent: 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol* 1998; 32:1549 – 58.

Richardson, S. D., and Kimura, S. Y. (2016). Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 88, 546–582.

Rodríguez J., Méndez J., Trujillo Y., 2001 “Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo” *Revista Médica Cubana Militar*, 30(1), 34-44.

Richardson ML, Bowron JM, 1985. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. En: *J Pharm Pharmacol*; 37: 1-12.

Routledge, E. J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G. C., Waldock, M., & Sumpter, J. P. (1998). Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2 In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environmental Science & Technology*, 32, 1559-1565.

Salonemi, T., 2009. Role of human hydroxysteroid (17b) dehydrogenase type 1 (HSD17B1) in steroid dependent disease in females. Novel indications for HSD17B1. *Universitatis Turkuensis*. Sanderson, J.T., 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrinedisrupting chemicals. *Toxicol Sci.* 94(1): p. 3-21.

Secretaria de Economía. Norma Oficial Mexicana NMX-AA-051-2001 para el Análisis de agua-Determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas-Método de prueba (cancela a la NMX-AA-051-1981).

SEMARNAT-CAN, 2005. Comisión Nacional del Agua. El agua en México: Estadísticas del agua en México. Disponible en: <http://www.fusda.org/profesores.fib.unam.mx> (citado 27/10/2016)

Sole', M., Raldu'a, D., Piferrer, F., Barcelo', D., Porte, C., 2003. Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment: plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotic metabolizing system. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 136, 145–156.

Schwarzenbach, RP, Egli, T., Hofstetter, TB, Von-Gunten, U., y Wehrli, B. (2010). Contaminación global del agua y salud humana. *Revisión anual de medio ambiente y recursos*, 35, 109–136, *ambiental*, 36, 1998-2004.

Solís, C., Sandoval, J., Pérez-Vega, H., y Mazari-Hiriart, M. (2006). Calidad del agua de riego en el sur de la Ciudad de México basada en análisis de bacterias y metales pesados. *Instrumentos y métodos nucleares en la investigación en física*, 249, 592–595.

Souza, M. S., Hallgren, P., Balseiro, E., & Hansson, L. (2013). Low Concentrations, Potential Ecological Consequences: Synthetic Estrogens Alter Life-History and Demographic Structures of Aquatic Invertebrates. *Environmental Pollution*, 178, 237-243. [[Links](#)]

Schmidt JW, Wollner D, Curcio J, Riedlinger J, Kim LS, 2006: Terapia de reemplazo hormonal en mujeres menopáusicas: problemas del pasado y posibilidades futuras. *Gynecol endocrinol*. 2006 Oct; 22 (10): 564-77. [PubMed](#) de DrugBank

Swastika Surujlal-Naicker, Sanjay Kumar Gupta & Faizal Bux (2015) Evaluating the Acute Toxicity of Estrogen Hormones and Wastewater Effluents Using *Vibrio fischeri*, *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 21:4, 1094-1108, DOI: [10.1080/10807039.2014.955767](https://doi.org/10.1080/10807039.2014.955767)

Tejada Tovar C., Villabona Ortiz A., Garcés Jaraba, 2015. Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Tecno Lógicas*; 18 (34): 109-123.

US EPA; Estimación de la interfaz de programa (EPI) Suite. Ver. 4.0. Enero de 2009. Consultado del 7 de febrero de 2019: <http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedi.htm>

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., y Scoullou, M. (2006). Biomarcadores moleculares del estrés oxidativo en organismos acuáticos en relación con contaminantes tóxicos ambientales. *Ecotoxicología y seguridad ambiental*, 64 (2), 178–189. doi: 10.1016 / j. ecoenv.2005.03.013

Valdés Alanís, A., Galar Martínez, M., Gómez Oliván, L.M., 2009 “Evaluación de la toxicidad producida por diclofenaco sobre *Daphnia magna*” IPN, México.

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.

Venero, G., Justo, R., 2002 "Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes" Revista Cubana de Medicina Militar, 31(2), 126-133.

Vincenzo, B., Rizzo, L., 2012 "Emerging contaminants into the environment contamination pathways and control" Italy, Manager Edition, 13-27.

Vioque Fernández A. Biomarcadores en cangrejo de río (*Procambarua clarkii*) para evaluar la contaminación del Parque de Doñana y el Estuario del Guadalquivir por metales y plaguicidas Universidad de Córdoba Depto. de Bioquímica y Biología Molecular; 2008.

W. KuhnzH. BlodeH. Zimmermann, 1993. Farmacocinética de exógenos naturales y sintéticos, estrógenos y antiestrógenos. En: estrógenos y antiestrógenos II. Springer, Berlín, Heidelberg. ISBN.

Williams, E. S., & Brooks, B. W. (2012). Human Health Risk Assessment for Pharmaceuticals in the Environment: Existing Practice, Uncertainty, and Future

Xie, W., et al., 2000. Transcriptional activation of thymidylate synthase by 17-beta-estradiol in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinology*. 141(7): p. 2439-49.

Yang, N.N., et al., 1996. Identification of an estrogen response element activated by metabolites of 17beta-estradiol and raloxifene. *Science*. 273(5279): p. 1222-5.

Ying GG et al; *Environ Int* 28: 545-551 (2002) (2) Thomas KV et al; *Environ Toxicol Chem* 20: 2165-70 (2001) de HSDB 978-3-642-60107-1 de DrugBank

Zhu, B.T. and A.H. Conney, Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis*, 1998. 19(1): p. 1-27.

12. ANEXOS



17β-Estradiol induces cyto-genotoxicity on blood cells of common carp (*Cyprinus carpio*)



Luis Orozco-Hernández^a, Adriana Andrea Gutiérrez-Gómez^a, Nely SanJuan-Reyes^a, Hariz Islas-Flores^a, Sandra García-Medina^b, Marcela Galar-Martínez^b, Octavio Dublán-García^a, Reyna Natividad^c, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{a,*}

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

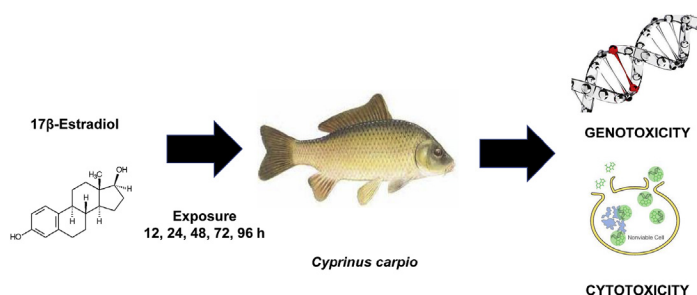
^b Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Av. Wilfrido Massieu S/n y Cerrada de Manuel Stampa, Col. Industrial Vallejo, C.P. 007700, Ciudad de México, Mexico

^c Chemical Engineering Lab., Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM, Carretera Toluca-Atlaconulco Km 14.5, Unidad San Cayetano, Toluca, Estado de México, 50200, Mexico

HIGHLIGHTS

- This study aimed to evaluate 17β-estradiol-induced cyto-genotoxicity in *Cyprinus carpio*.
- Increases in frequency of micronuclei, caspase-3 activity and TUNEL-positive cells were observed.
- The comet assay detected significant increases at 24 and 96 h with the 1 μg and 1 ng L⁻¹ of E2.
- 17β-Estradiol induces cyto-genotoxicity on *C. carpio*.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 July 2017

Received in revised form

18 September 2017

Accepted 5 October 2017

Available online 6 October 2017

Handling Editor: Jim Lazorchak

Keywords:

17 β-Estradiol

Cyprinus carpio

Comet assay

Micronucleus test

TUNEL

Caspase-3

ABSTRACT

17β-Estradiol, a natural hormone present at high concentrations in aquatic ecosystems, affects and modifies endocrine function in animals. In recent years research workers have expressed concern over its potential effects on aquatic organisms; however, little is known about its capacity to induce genetic damage or the pro-apoptotic effects of such damage on fish. Therefore, this study aimed to evaluate 17β-estradiol-induced cyto-genotoxicity in blood cells of the common carp *Cyprinus carpio* exposed to different concentrations (1 ng, 1 μg and 1 mg L⁻¹). Peripheral blood samples were collected and evaluated by comet assay, micronucleus test, determination of caspase-3 activity and TUNEL assay at 12, 24, 48, 72 and 96 h of exposure. Increases in frequency of micronuclei, TUNEL-positive cells and caspase-3 activity were observed, particularly at the highest concentration. In contrast, the comet assay detected significant increases at 24 and 96 h with the 1 μg and 1 ng L⁻¹ concentrations respectively. The set of assays used in the present study constitutes a reliable early warning biomarker for evaluating the toxicity induced by this type of emerging contaminants on aquatic species.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Col. Residencial Colón, Toluca, Estado de México, CP 50120, Mexico.

E-mail addresses: lmgomezo@uaemex.mx, lgolivan74@gmail.com (L.M. Gómez-Oliván).

1. Introduction

In recent years, water contamination has become a serious problem for public health and aquatic ecosystems due to domestic and industrial wastewater discharges which contain a large variety of environmental contaminants such as personal hygiene products, pharmaceuticals, and natural and synthetic hormones (Tetreault et al., 2011; Fang et al., 2012), all these are part of “emerging contaminants”, a group of compounds which do not have a clear regulation to date regarding their handling and discharge into ecosystems (Kümmerer, 2001; Petrie et al., 2015; Richardson and Kimura, 2016). These substances are biologically active and although some are not considered persistent, they are introduced constantly, so they can represent a risk to ecosystem (Galar-Martínez et al., 2015). In particular, concern has been expressed over the presence of steroid hormones (estrogens, progestagens and androgens), because it has been reported that members of this group can affect and modify endocrine function in animals, and are therefore known as endocrine disrupting compounds (EDCs) (Matozzo and Marin, 2008; Bolong et al., 2009; Ma et al., 2016). These chemicals can include natural estrogens (e.g., 17 β -estradiol), synthetic estrogens (e.g., 17 α -ethinylestradiol), and estrogen mimics (e.g., bisphenol A, 4-nonylphenol) (Sackett et al., 2015).

Estrogens are used in hormone replacement therapy, most often to overcome the basic symptoms associated with menopause; however, their use has made evident diverse complications, including a higher risk of developing breast, endometrial and ovarian cancer (El Habachi et al., 2014). One of the most extensively studied estrogens in mammals, and probably the most common one, is 17 β -estradiol, often abbreviated E2. It has two hydroxyl groups in its molecular structure and is a natural element formed in the body. Of the three forms of estrogen produced naturally by all vertebrates, E2 is the most potent one. It is the main estrogen secreted by the ovaries and is oxidized to estriol before being eliminated. E2 also undergoes reactions such as hydroxylation, reduction, oxidation by methylation, and conjugation by liver cytochrome P450 enzymes for subsequent elimination in urine. There are no reports of E2 conjugates released into the environment having direct biological activity, but they may be a storehouse of hormone precursors since they are transformed to E2 by bacterial action (Baronti et al., 2000; Yan et al., 2013a; Heffron et al., 2016).

EDCs enter the environment, through a variety of pathways such as municipal sewage, industrial wastewaters, landfill, agricultural run-off, wash-off from roadways and underground contamination. Detection of these compounds in water is at trace levels ($\mu\text{g L}^{-1}$ or even ng L^{-1}) (Bolong et al., 2009), because standard methods of sewage treatment are not completely effective in removing such substances (Zhang et al., 2007). E2 is among the most potent EDC having the potential to exert effects at extremely low concentrations (Bowman et al., 2002). In Mexico, there is only one study that reports the presence of E2 at concentrations from 0.11 ng L^{-1} to 1.72 ng L^{-1} in Xochimilco wetland (Díaz-Torres et al., 2013). Studies of aquatic wildlife that are directly exposed to contaminants, often provide early indications of potential environmental problems. A few studies report E2 can produce different harmful effects, for example, is an endocrine disrupter at concentrations above 200 ng L^{-1} in *O. mykiss* (Marlatt et al., 2006), affect the reproduction of *O. javanicus* at concentrations greater than 16 ng L^{-1} (Imai et al., 2005), can decrease the capacity of cellular antioxidant systems in *P. aibuhitensis* at concentrations greater than 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Lv et al., 2016) and can induce immunomodulatory changes and neurotoxicity in different organisms (Thilagam et al., 2014). On the other hand, *in vitro* assays have shown that at low concentrations (1–10 ng L^{-1}) of E2 induce feminization in some species of male wild fishes (Routledge et al., 1998), and changes the hepatic gene

expression of the vitellogenins and choriogenins in *P. flesus* (Williams et al., 2007). Other possible endocrine-disruption effects have been observed in fish, such as reduced ovary size, lower egg viability, and delayed sexual maturity (Munkittrick et al., 1992; Hontela et al., 1995). However, there are no reports of the cytotoxic effect of exposure to E2 on aquatic organisms, which is one of the objectives of this study.

Genotoxicity is toxicity against cell's genetic material affecting its integrity (DNA damage) and may lead to mutagenicity and carcinogenicity in some circumstances (Nesslany and Benameur, 2014). The genotoxic effects of physical and chemical agents/pollutants can be monitored using a broad range of both *in vivo* and *in vitro* biomarker assays (Kumar et al., 2017). A biomarker is a cellular, molecular, genetic or physiologic response altered in an organism or population in response to a chemical stressor (Costa et al., 2010). In a previous study it was reported that E2-induced oxidative damage (Gutiérrez-Gómez et al., 2016) which could be associated with genotoxicity (Maria et al., 2008). From an ecological viewpoint, genetic damage may lead to hereditary mutations compromising the physical condition integrity of fish populations and their capacity to confront stress (Brown et al., 2009). Also, damage to the DNA of aquatic animals has been associated with reduced growth, abnormal development and reduced survival of embryos, larvae and adults (Lee and Steinert, 2003; Reinardy et al., 2013). Analysis of DNA changes in aquatic organisms has proved an effective method for evaluating water body contamination, even when compounds are present at very low concentrations, as in the case of E2 (Frenzilli et al., 2009). Among the genotoxicity tests, comet assay and micronucleus (MNi) test are recognized due to their robustness and sensitivity to evaluate DNA damage. The MNi test measures a small subset of unrepaired DNA strand breaks, whereas the comet assay measures strand breaks and labile sites that may be removed subsequently by the DNA repair system, both studies complement each other and their methodology is easy and does not require sophisticated equipment (Końca et al., 2003; Heuser et al., 2008). On the other hand, certain genotoxic agents also induce cytotoxicity (Selvi et al., 2013), defined as the pre-lethal changes and events which occur in cells prior to necrosis (Vasquez, 2012). Lesions to DNA and inefficient repair mechanisms are crucial in the un-leashing of apoptosis (Roos and Kaina, 2006), which is a fundamental biochemical pathway of cellular death characterized by diverse morphologic changes and has a major role in the maintenance of tissue homeostasis (Simoes et al., 2013). There are two main pathways of apoptosis: extrinsic and intrinsic. The extrinsic pathway is produced in response to activation of death receptors on the cell surface, while the intrinsic pathway arises in response to extracellular signaling and internal lesions such as DNA damage (Fadeel and Orrenius, 2005). From a mechanistic perspective, apoptosis may be expected to contribute to the elimination of cells with some kind of damage, particularly that of pre-mutagenic/mutagenic lesions (Decordier et al., 2002). An assay that relies on detection of DNA strand breaks *in situ* by labeling them with fluorochromes has been developed to identify and quantify apoptotic cells by fluorescence microscopy. The assay is commonly called TUNEL, the acronym of Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP Nick End Labeling (Darzynkiewicz et al., 2008). TUNEL assay is certainly one of the more simple, reliable, objective, and cost-effective methods available for assessing DNA damage (Sharma et al., 2013).

The common carp *Cyprinus carpio*, a freshwater fish, has been introduced in Mexico in 80% of freshwater bodies and has become an economically and ecologically important specie (Galar-Martínez et al., 2015), and has been extensively used to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of substances in the aquatic environment (García-Nieto et al., 2014) and is therefore a good bioindicator for

evaluating E2-induced cyto-genotoxicity.

The present study aimed to evaluate whether E2 induces genotoxic effects by means of comet assay and micronucleus test and cytotoxic effects through caspase-3 activity and TUNEL assay as biomarkers of damage in blood cells of the common carp *C. carpio* at 12, 24, 48, 72 and 96 h. The nuclear anomaly or micronucleus test and comet assay, are methods which allows the investigation of DNA damage, and have been widely applied to the investigation of environmental genotoxin effects in several fish species (Nacci et al., 1996; Mitchelmore and Chipman, 1998), while cytotoxicity is an adverse effect or interference with structures or processes essential for cell survival, like caspase-3, an effector caspase in which both apoptosis pathways (intrinsic and extrinsic) converge. The detection of activated caspase-3 is a valuable and specific tool for identifying apoptotic cells, even before all the morphological features of apoptosis occur (Duan et al., 2003) and confirmed by the TUNEL assay.

For the detection of double-stranded DNA breaks, TUNEL assay has been used extensively as an indicator of apoptosis and/or caspase-mediated cell death (Zhu et al., 2000). Because of this, we aimed to select this parameters as biomarkers of early warning for evaluating the toxicity induced by this type of emerging contaminants on aquatic species.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and assay materials

The following reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO): 17 β -estradiol, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), ethidium bromide (EB), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate (CHAPS), low melting point (LMPA) and normal melting point agarose (NMPA), propidium iodide (PI), Triton X-100, dithiothreitol (DTT), DNase I, poly-L-lysine, NaHCO₃, MgSO₄, KCl, CaSO₄·2H₂O, NaCl, Trizma base and NaOH. The CaspACE™ Assay System, Colorimetric, was purchased from Promega (Madison, WI); proteinase K from Fluka (St Louis, MO); the ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Detection S7100 kit from Chemicon International (Billerica, MA); and the Liqui-PREP™ Cytology System kit from PBM (Mexico City, Mexico).

2.2. Specimen procurement and acclimation

Common carp (*Cyprinus carpio*) weighing 55.24 \pm 4.1 g and measuring 19.22 \pm 0.87 cm in length were obtained from the Tiacaque aquaculture center (State of Mexico), transported to the laboratory and acclimated for 30 days with synthetic culture medium (pH 7.4), at room temperature, with constant aeration, and three fourths of the tank water was replaced every 24 h to maintain a healthy environment. A natural light/dark photoperiod was maintained and the organisms were fed Purina™ fish food.

2.3. Sublethal toxicity assays

Test systems consisting in glass tanks (120 \times 80 \times 40 cm) filled of reconstituted water with NaHCO₃ (174 mg L⁻¹), MgSO₄ (120 mg L⁻¹), KCl (8 mg L⁻¹) and CaSO₄·2H₂O (120 mg L⁻¹) were maintained at room temperature with constant aeration and a natural light/dark photoperiod (Commission Directive 92/69/EEC). Static systems with six carp each were used and no food was provided to specimens during exposure. Three environmentally relevant concentrations of E2 were tested: 1 ng, 1 μ g, and 1 mg L⁻¹. The exposure times used were 12, 24, 48, 72 and 96 h. An E2-free

control system with six carp was set up for each exposure time, and a positive control group was set up for each test and exposure time; the assays were performed in triplicate using a total of 900 fish. After the exposure time is over, fish were removed from the systems and placed in a tank containing a xylocaine solution (0.02 mg mL⁻¹) to anesthetize specimens. Blood was collected from the caudal vein with a heparinized hypodermic syringe.

Blood samples (100 μ L) were diluted with 600 μ L PBS. These samples were used to perform the comet assay and one part of cell suspension was used to make smears to evaluate the presence of micronucleus. For the TUNEL assay, 100 μ L of cell suspension was mixed with 1 mL of preservation solution from the liquid-based cytology kit which had been kept refrigerated prior to mounting of the samples. For determination of caspase-3 activity, 100 μ L of cell suspension was frozen at -20 °C, centrifuged at 16 000 \times g and -4 °C for 15 min, and the supernatant used to evaluate activity.

2.4. Comet assay

The protocol described by Martínez-Tabche et al. (2004) and Cariño-Cortés et al. (2010) for rainbow trout and mouse cells was modified as follows: frosted slides were covered with a layer of 1% NMPA (100 μ L) and dried at room temperature, later a second layer of 10 μ L of cell suspension plus 0.75% LMPA (75 μ L) was placed on the same slide, spread, and solidified on ice. Slides were refrigerated at 4 °C for 30 min and placed in lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Trizma base, 10% DMSO and 1% Triton X-100, pH 10) for 1 h. Once the time has elapsed, slides were placed in the electrophoresis chamber which contained an alkaline solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13). Electrophoresis was performed at 300 mA and 25 V for 20 min. The process was halted by rinsing in Trizma base (0.4 M, pH 7.4) and slides were to dry at room temperature. Intraperitoneal (i.p.) injection with 20 mg cyclophosphamide per kg of fish weight was used in the positive control. Nucleoids from each slide were stained with 50 μ L EB. Scoring was done with an epifluorescence microscope (Zeiss Axiophot-1) fitted with digital camera (ZWS-47DE) and imaging software (Zeiss KS400 v3.01). We measured the total length containing the nucleus and the migrated DNA (T), and divided the result by the nucleus diameter (N) so as to obtain the T/N ratio in 100 nucleoids per fish, concentration and exposure time (Cariño-Cortés et al., 2010).

2.5. Micronucleus test

The cell suspension obtained from each specimen was fixed with pure ethanol on a slide for 3 min, then stained with a 10% solution of Giemsa in PBS (pH 6.7) for 10 min, and rinsed in tap water. 1000 erythrocytes per fish were analyzed in a light microscope. MNi frequency was expressed as the percentage of micronucleated cells per 1000 cells (Cavas and Ergene-Gözükara, 2005). Intraperitoneal (i.p.) injection with 20 mg cyclophosphamide per kg of fish weight was used as a positive control.

2.6. Determination of Caspase-3 activity

The substrate [N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp *p*-nitroanilide (Ac-DEVD-pNA)] in the CaspACE™ colorimetric assay kit used to determine Caspase-3 activity, binds to the enzyme, releasing the chromophore pNA. A blank was prepared using 54 μ L deionized water and the reaction mixture, which includes: 32 μ L caspase buffer (312.5 mM HEPES pH 7.5, 31.25% saccharose, 0.3125% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate)), 2 μ L DMSO and 10 μ L dithiothreitol (DTT, 100 mM). For the control group and groups exposed to E2 (1 ng L⁻¹, 1 μ g L⁻¹ and

1 mg L⁻¹), the following were used: 20 µL blood, reaction mixture and 54 µL deionized water; for the positive control was used: reaction mixture, 20 µL cellular extract [Jurkat cells (ATCC#TIB-152) treated with anti-Fas mAb (50 ng mL⁻¹, MBL International) in fetal bovine serum (FBS)] and 34 µL deionized water. Finally, for inhibited apoptosis samples: reaction mixture, 20 µL cellular extract [Jurkat cells (ATCC#TIB-152) treated with anti-Fas mAb (50 ng mL⁻¹, MBL International) in FBS and 125 µL of the inhibitor Z-VAD-FMK (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-(O-methyl)-fluoromethylketone, 20 mM)] and 34 µL deionized water.

After all solutions had been transferred, 2 µL of substrate DEVD-pNA was added to each well. Absorbance was read at 405 nm and the specific activity of caspase-3 was calculated. Results were expressed as nM free pNA h⁻¹ µg protein⁻¹. Protein content as determined by the Bradford (1976) method was used to normalize the results of enzymatic activity.

2.7. TUNEL assay

For this test, the ApopTag Fluorescein S7110 kit was used. Samples (100 µL) of the cell suspension diluted 1:15 in preservative solution were centrifuged at 800 × g for 5 min at 4 °C, and the cell pellet was resuspended in 50 µL mounting solution from the cytology system kit. Later, 1 µL of this suspension was placed on a microscope slide with poly-L-lysine, dried for 5 min at 60 °C. After drying, fixed with cold acetone for 10 min, and hydrated in successive changes (from 100% to 50%) of xylene, ethanol and water. The cells were next treated with proteinase K (20 µg mL⁻¹) for 10 min, then washed with PBS. After, 60 µL equilibrium buffer was added, and incubation with 65 µL TdT enzyme at 37 °C for 60 min. Finally, the cells were rinsed in PBS prior to adding anti-FITC conjugate that was used as a cell marker, and were maintained at room temperature for 30 min, then were again rinsed in PBS, stained with PI (1.5 µg mL⁻¹), and observed under an epifluorescence microscope equipped with a digital camera. In our assay, a negative control sample was included, consisting of cells treated as described above but without addition of TdT, while the positive control sample consisted of cells loaded with DNase I (1 µg mL⁻¹). Rate of apoptosis was expressed as the percentage of TUNEL-positive cells in 100 cells per sample.

2.8. Pearson's correlation between geno and cytotoxicity biomarkers

Pearson's correlation analysis was used to find potential correlations between geno (comet assay and micronucleus test)- and cytotoxicity (TUNEL assay and Caspase-3 activity) biomarkers. The Sigmastat v2.03 program was used.

2.9. Statistical analysis

All variables were expressed as the mean ± SEM. To compare the means for each variable, a one-way repeated measures ANOVA was performed, followed by Dunn's test. Results of Cas-3 activity were subjected to a Friedman repeated measures ANOVA by ranks, followed by Student-Newman-Keuls *post hoc* multiple comparison tests. The significance level was set at $p < 0.05$, and SigmaPlot v12.3 software was used.

3. Results

A tendency towards increased DNA damage compared to the control group was seen at most exposure times with the 1 ng L⁻¹ concentration of E2, but was significant only at 96 h ($p > 0.05$). A similar behavior was found with 1 µg L⁻¹, the highest significant increase occurring at 24 h. Damage index values with the 1 mg L⁻¹ concentration did not differ from control group values at any exposure time, but a peak was observed at 12 h. The positive control was increased significantly in approximately 27–30% respects to control group in all exposure times (Fig. 1).

Low percentages of MNi were found in control group cells at all exposure times (0.100 ± 0.014), while test concentrations showed significant increases at all exposure times, and a concentration-dependent peak at 48 h. The positive control showed significant difference in approximately 100–110% respects to control group in all exposure times (Fig. 2).

Increases in activity of Cas-3 with respect to the control group were found with all concentrations at all exposure times, except with the 1 µg L⁻¹ concentration where a 1% reduction relative to the control group was found at 96 h. Activity levels were observed to be similar at all exposure times, except at 48 h when the group exposed to 1 mg L⁻¹ had a significant, more than four-fold higher

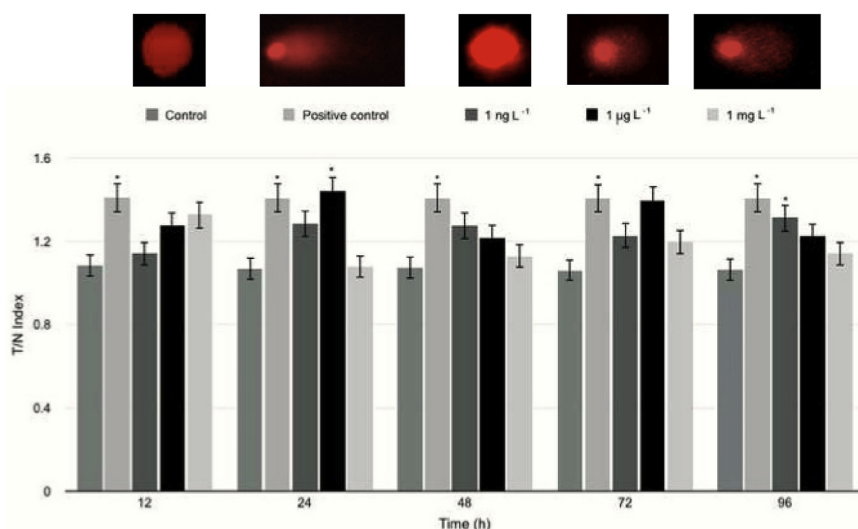


Fig. 1. Comet assay determination of DNA damage in blood of *Cyprinus carpio* exposed to E2. Bars represent the mean ± SEM of damage index values from six specimens per concentration and exposure time (100 nucleoids per fish). The assay was performed in triplicate. *Significantly different from the control group ($p \leq 0.05$).

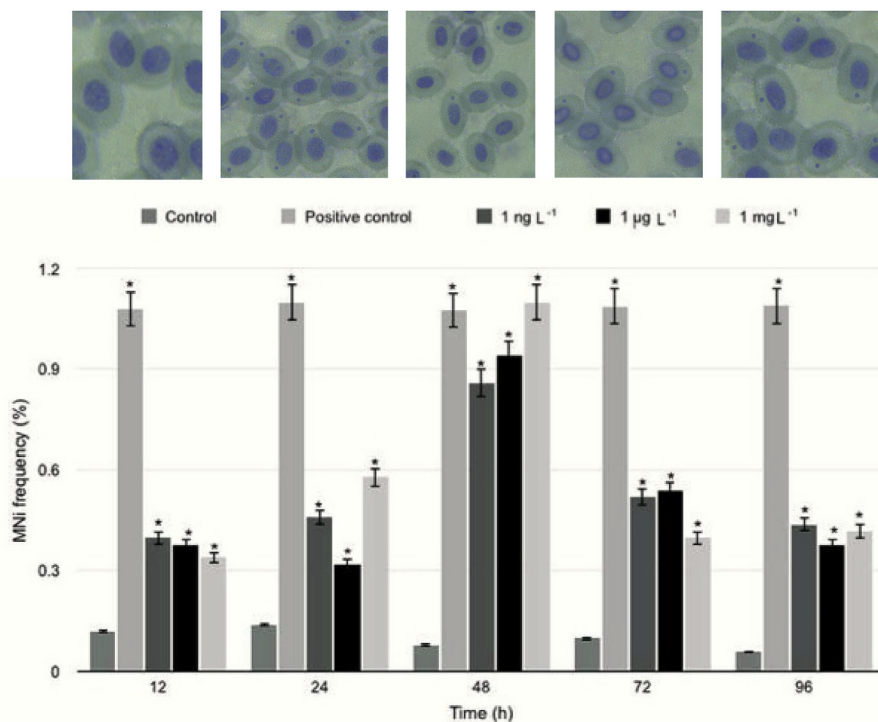


Fig. 2. Frequency of micronuclei (MNI) in blood of *Cyprinus carpio* exposed to E2. Bars represent the mean \pm SEM of six specimens per concentration and exposure time. The test was performed in triplicate. *Significantly different from the control group ($p \leq 0.05$).

increase with respect to the control group and all other concentrations and exposure times. The positive control was increased significantly in approximately 100% respects to control group in all exposure times (Fig. 3).

The percentage of TUNEL-positive cells in the control group was within 27–35% at all exposure times. Groups exposed to the 1 ng and 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ concentrations showed a significant increase from 48 h on and up to 72 h that was approximately 9% and 12% respectively above mean values in the control group. A similar behavior was observed in the group exposed to 1 mg L^{-1} , but beginning at 12 h. The positive control showed significance in approximately 100–110% respects to control group in all exposure times (Fig. 4).

Table 1 shows, respectively, the correlations observed between the geno- and cytotoxicity biomarkers respectively at the different exposure times, as can be seen, there is a higher correlation in the concentration of 1 ng at 48 h in the biomarkers of genotoxicity, while this correlation is observed in the concentration of 1 μg in cytotoxicity case.

4. Discussion

The aquatic environment is the ultimate recipient of the increasing amount and range of contaminants, which could be potentially genotoxic and carcinogenic (Claxton et al. 1998). Studies regarding E2 effects on fish have been focused on endocrine aspects. It is known that it may alter gonadosomatic index in males, reduce egg production in females, induce vitellogenesis in males and juveniles as well as decrease fertility (Mills et al., 2001; Kang et al., 2002). However, it has also been reported that E2 can stimulate the production of reactive oxygen species (ROS), which results in oxidative damage to aquatic organisms (Gutiérrez-Gómez et al., 2016). Biomarkers for monitoring environmental health are informative tools for detecting exposure and effects of chemical

pollutants, including EDCs (Adeogun et al., 2016). Among the techniques to detect genotoxic effects, the comet assay detects DNA single-strand breaks (strand breaks and incomplete excision repair sites), alkali-labile sites and cross-linking, with the single-cell approach typical of cytogenetic assays (Kumaravel and Jha, 2006; Kumaravel et al., 2007). The positive control that was used was cyclophosphamide, an alkylating agent, it has been shown to possess various genotoxic and carcinogenic effects (Wang et al., 2006). In our study, comet assay found a significant increase in 1 ng and 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ of E2 (Fig. 1). This increase was time-dependent, occurring at 24 h with the higher concentration and 96 h with the lower one. In fish exposed to 1 mg L^{-1} , a non-significant maximum increase of approximately 24% above control group values was seen at 12 h. The damage found in blood cells of *C. carpio* may be explained by the E2 biotransformation in which are formed 2- and 4-hydroxyestradiol (2-OH-E2 and 4-OH-E2) (Mauras et al., 2015). In fishes, E2 metabolism occurs predominantly in the liver (Butala et al., 2004). Free-radical intermediates and ROS formed during biotransformation of xenobiotics can initiate macromolecular changes, namely DNA damage, necrosis and apoptosis (Van der Oost et al., 2003). In humans, also the liver is the primary site of E2 metabolism, where the rate of 2-hydroxylation catalized by P450 1A2, P450 3A3 y P450 3A4, greatly exceeds that of 4-hydroxylation (Hayes et al., 1996), both metabolites can directly or indirectly damage DNA, proteins, and lipids through the generation of reactive free radicals by the reductive-oxidative cycling of these catechol estrogens between their semiquinone and quinone forms (Liehr and Roy, 1990; Dwivedy et al., 1992; Nutter et al., 1994). Quinone intermediates may react with purine bases of DNA to form depurinating adducts that generate highly mutagenic apurinic sites. Several types of indirect DNA damage are caused by estrogen-induced oxidants, such as oxidized DNA bases, DNA strand breakage, and adduct formation by reactive aldehydes derived from lipid hydroperoxides (Cavlieri et al., 2000). On the other hand,

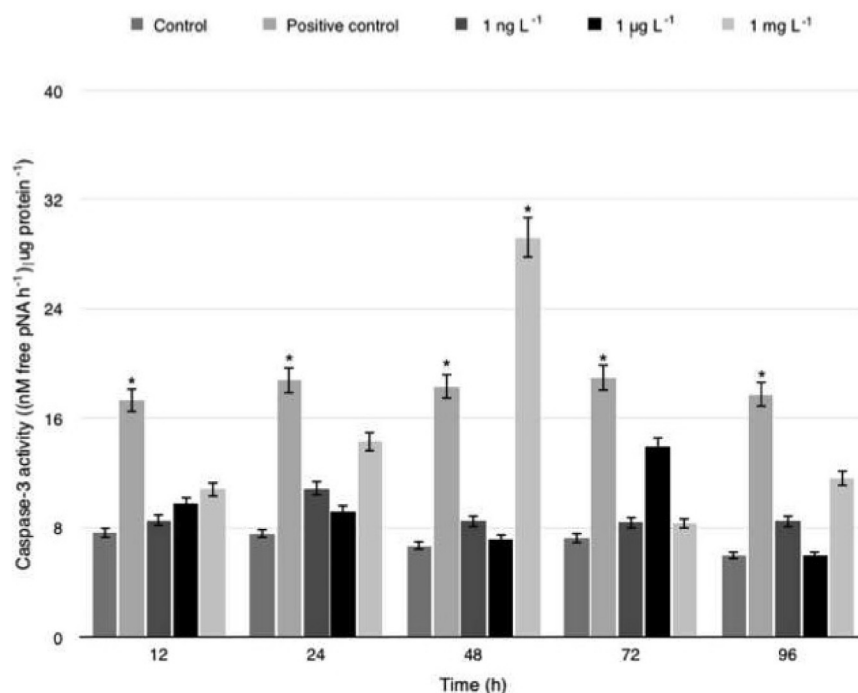


Fig. 3. Relative activity of caspase-3 in blood of *Cyprinus carpio* exposed to E2. Bars represent the mean \pm SEM of six specimens per concentration and exposure time. The test was performed in triplicate. *Significantly different from the control group and all other test concentrations ($p \leq 0.05$).

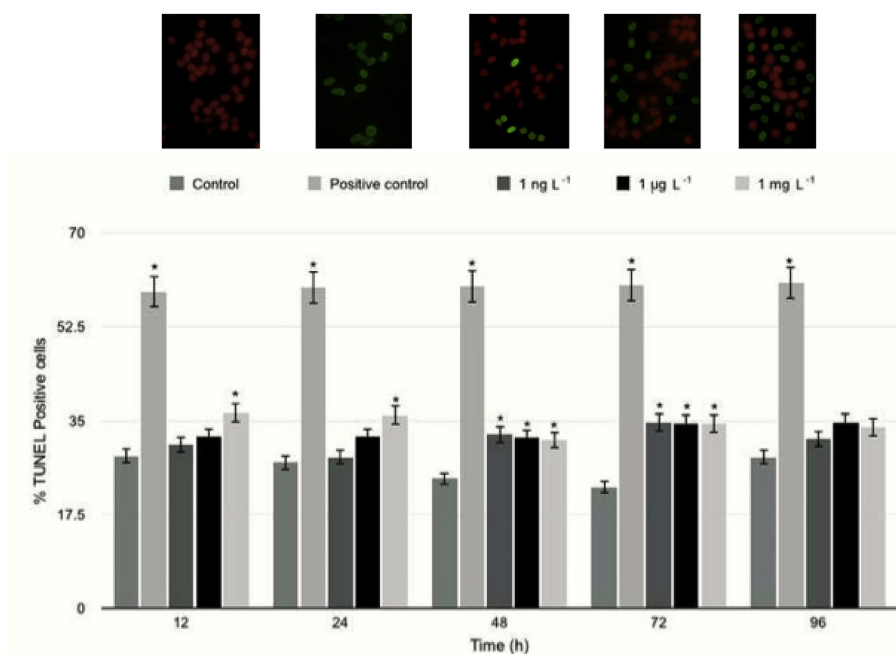


Fig. 4. Percentage of TUNEL-positive cells in blood of *Cyprinus carpio* exposed to E2. Bars represent the mean \pm SEM of six specimens per concentration and exposure time (100 cells per fish). The assay was performed in triplicate. *Significantly different from the control group ($p \leq 0.05$).

enzymes, such as glutathione, a major endogenous antioxidant, which plays a crucial role in protecting cells from exogenous and endogenous toxins, and which exists in the glutathione reduced (GSH) and glutathione disulphide (GSSG), was reported by [Lv et al. \(2016\)](#) an increased dose dependent, specifically the activity of GSSG of *P. aibuhitensis* exposed to E2; in addition to this, [Gutiérrez-Gómez et al. \(2016\)](#) also found a significant increase in the activity

of the antioxidant enzymes superoxide dismutase, the first defense and the main enzyme responsible for the conversion of superoxide anion to hydrogen peroxide, and glutathione peroxidase in blood of *C. carpio* exposed to concentration of 1 mg L^{-1} E2 at 96 h; the increase of these enzymes could explain the results in the comet assay that demonstrated less damage to concentration of 1 mg L^{-1} , evidencing a greater activity as a mechanism to counteract

Table 1Pearson's correlation between A. Genotoxicity and B. Cytotoxicity biomarkers in blood of *C. carpio*.

A.

Biomarkers		Micronucleus Test															
Concentrations		1 ng					1 µg					1 mg					
Time		12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	
Comet Assay	1 ng	12 h	0.986	0.829	0.966	0.52	0.793	-0.164	0.267	0.484	-0.591	0.471	-0.311	-0.155	0.11	0.809	0.704
		24 h	0.922	0.92	0.876	0.685	0.752	0.027	0.103	0.598	-0.372	0.262	-0.243	-0.275	-0.127	0.938	0.478
		48 h	-0.674	-0.444	-0.64	-0.824	-0.935	0.304	-0.205	-0.761	0.332	0.051	-0.391	-0.285	-0.252	-0.7	-0.327
		72 h	0.262	-0.243	0.283	0.472	0.572	-0.304	0.528	0.278	-0.415	0.021	0.776	0.822	0.676	0.151	0.147
		96 h	0.395	-0.143	0.418	0.527	0.601	-0.206	0.629	0.25	-0.517	0.142	0.743	0.821	0.687	0.266	0.203
	1 µg	12 h	-0.338	0.022	-0.336	-0.473	-0.788	0.629	-0.228	-0.572	0.323	0.101	-0.502	-0.529	-0.528	-0.209	-0.334
		24 h	0.158	0.012	0.188	0.029	-0.406	0.839	0.544	-0.573	-0.269	0.473	0.109	0.189	0.038	0.187	-0.192
		48 h	0.924	0.7	0.904	0.728	0.704	0.162	0.441	0.412	-0.554	0.395	0.07	0.101	0.145	0.891	0.419
		72 h	-0.444	-0.275	-0.484	0.177	0.218	-0.498	-0.525	0.534	0.527	-0.784	0.396	0.068	-0.101	-0.215	-0.306
		96 h	0.981	0.743	0.971	0.475	0.852	-0.311	0.321	0.487	-0.663	0.497	-0.27	-0.053	0.244	0.73	0.785
	1 mg	12 h	0.269	-0.316	0.317	0.129	0.568	-0.639	0.551	0.149	-0.587	0.234	0.485	0.773	0.85	-0.092	0.463
		24 h	-0.6	-0.344	-0.624	0.132	-0.641	0.822	-0.151	-0.266	0.607	-0.491	0.52	0.083	-0.415	-0.103	-0.948
		48 h	0.694	0.443	0.732	-0.098	0.103	0.199	0.555	-0.323	-0.714	0.882	-0.5	-0.079	0.229	0.338	0.615
		72 h	-0.392	-0.791	-0.305	-0.765	-0.279	-0.547	0.332	-0.566	-0.311	0.304	0.043	0.504	0.691	-0.867	0.269
		96 h	0.368	-0.074	0.373	0.644	0.636	-0.169	0.498	0.382	-0.381	-0.013	0.781	0.742	0.554	0.348	0.1

B.

Biomarkers		Caspase-3															
Concentrations		1 ng					1 µg					1 mg					
Time		12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	
TUNEL Assay	1 ng	12 h	-0.579	-0.160	-0.593	-0.330	-0.326	0.429	0.283	0.856	0.477	0.046	-0.566	0.786	-0.495	-0.647	0.319
		24 h	0.545	-0.186	0.402	0.300	-0.769	0.374	0.804	-0.328	0.466	-0.621	-0.327	-0.097	0.123	0.167	0.505
		48 h	0.541	0.432	-0.556	-0.381	-0.238	0.409	0.415	0.096	0.419	-0.887	-0.247	-0.359	0.709	-0.659	0.106
		72 h	0.309	0.026	-0.387	-0.250	-0.735	0.631	0.855	0.317	0.720	-0.869	-0.645	0.148	0.216	-0.611	0.546
		96 h	0.146	0.329	-0.307	-0.529	0.763	-0.561	-0.513	-0.120	-0.623	-0.270	0.296	-0.604	0.630	-0.159	-0.350
	1 µg	12 h	0.496	0.080	-0.153	0.054	-0.844	0.729	0.870	0.061	0.805	-0.763	-0.485	0.034	0.241	-0.391	0.457
		24 h	0.518	0.022	0.136	-0.211	-0.007	-0.227	0.264	-0.360	-0.188	-0.742	-0.072	-0.535	0.557	0.057	0.198
		48 h	-0.011	-0.469	0.953	0.727	-0.251	-0.166	0.067	-0.523	-0.133	0.500	0.185	0.120	-0.512	0.908	0.122
		72 h	0.241	-0.018	0.807	0.565	0.418	-0.532	-0.522	-0.826	-0.596	0.517	0.700	-0.513	0.065	0.922	-0.422
		96 h	-0.388	-0.496	-0.393	-0.862	-0.115	-0.256	0.494	0.652	-0.124	-0.749	-0.824	0.399	-0.136	-0.508	0.749
	1 mg	12 h	-0.349	-0.225	0.424	0.598	-0.133	0.111	-0.179	-0.055	0.092	0.847	0.201	0.427	-0.663	0.463	-0.128
		24 h	-0.243	0.521	-0.727	-0.198	0.340	0.279	-0.471	0.439	0.178	0.370	0.207	0.103	0.093	-0.578	-0.511
		48 h	-0.738	-0.464	0.264	0.173	0.144	-0.263	-0.301	0.253	-0.254	0.817	0.009	0.618	-0.826	0.347	0.024
		72 h	-0.701	-0.902	0.448	0.051	-0.353	-0.218	0.347	0.340	-0.092	0.283	-0.529	0.836	-0.978	0.351	0.665
		96 h	-0.497	-0.181	0.328	0.395	0.276	-0.213	-0.521	-0.024	-0.262	0.966	0.350	0.323	-0.598	0.465	-0.304

oxidative DNA damage induced by E2. However, occasionally, such damage is not effectively repaired or is erroneously repaired, eliciting changes in the original DNA sequence (Cavaliere and Rogan, 2014), for this reason, and to evidence the damage, the comet assay is often applied in conjunction with the MNi test, that due to its simplicity, is one of the most applicable techniques to identify genomic alterations in environmental animals. MNi are formed in the process of cell division and their expression can occur at different times after the DNA damage event, depending on the cell cycle kinetics and the mechanism of induction (Bolognesi and Hayashi, 2011). Their presence in a cell population such as circulating erythrocytes is indicative of the end of such lesions (Canistro et al., 2012). In the present study, significant increases in MNi frequency occurred with all concentrations from 12 h on, reaching a peak at 48 h and declining thereafter (Fig. 2). In the literature,

appearance of MNi in aquatic organisms is said to take place approximately 5 or 10 days after exposure, even though shorter periods averaging 2–3 days have been reported in most fish species (Udroiu, 2006). E2 can also induce damage at the chromosome level. This compound is said to induce clastogenic and aneugenic effects detectable by micronucleus test. Such damage is generally considered an indicator of genomic instability (Kabil et al., 2008; Kumar et al., 2015). Among the potential targets for induction of numerical chromosomal aberrations or chromosome breakage are the mitotic spindle (microtubules and centrioles), DNA and proteins regulating it, and centromeres. Alterations in these cell components are induced by E2 metabolites directly via covalent bonding or indirectly by free radical formation, as discussed above. Similar results regarding the genotoxicity of E2 have been found in other fish species. For instance, this compound has been reported to

induce nuclear anomalies in erythrocytes of *S. aurata* exposed to 4000 ng L⁻¹ for 10 days (Teles et al., 2005). The same effect was observed in *D. labrax* juveniles treated with 200 and 2000 ng L⁻¹ for 10 days (Teles et al., 2006). In the latter species, using identical concentrations, Maria et al. (2008) found loss of DNA integrity in liver, gill, kidney and blood. At the same concentrations, loss of DNA integrity was found in liver of Japanese sea bass after 5, 10 and 15 days of exposure (Thilagam et al., 2010). Similarly, in gonad of *Carassius auratus* exposed to a range of concentrations from 38 to 145 ng L⁻¹ for 3, 7, 10 and 14 days, genetic damage increased as determined by comet assay (Yan et al., 2013b). In the review, most authors agree that E2-induced genotoxicity is related to oxidative stress. Pearson's correlation about the genotoxicity data showed that there is a high correlation between the comet assay and micronucleus test in the concentration of 1 ng at 48 h. Kim and Hyun (2006) found a concordance between the comet assay and the micronucleus test, their results shows that the sensitivity of the comet assay seemed to be higher than the micronucleus test using *C. carpio*.

Therefore, combining the use of the comet assay and micronucleus test in the present study enabled detection of multiple damage at different levels in a much shorter time period than the ones used by other authors. Both techniques are preferred in aquatic toxicology studies due to their high sensitivity and their are also an excellent tool for evaluating environmental contaminants with diverse molecular targets, as in the case of E2 (Kumar et al., 2015).

The organisms respond to the presence of DNA lesions by activating cell cycle checkpoint and repair mechanisms, and have the possibility of eliminating the damaged cells by triggering their death. Induction of apoptosis has been recognized as a possible outcome of DNA damage (Norbury and Zhivotovsky, 2004). Estradiol promotes cell survival or death depending on the context of the cells or tissue in question (Williams et al., 2007). In mammalian cells, these antagonistic effects are mediated by different estrogen receptors: ER α , which promote cell cycle progression and apoptosis prevention, and ER β , which stimulate Fas ligand expression (extrinsic pathway) and promote caspase activation (Acconcia et al., 2005). On the other hand, in eukaryotic cells, when a large number of DNA lesions are present, the cell cycle is arrested at G1 to prevent DNA replication, allowing time for errors to be repaired or apoptosis to be initiated (intrinsic pathway). In rat spermatogenic cells, both the extrinsic pathway, mediated by Fas receptors, and the intrinsic pathway where the mitochondrion is involved, have been shown to be implicated in cell death following exposure to E2 (Mishra and Shaha, 2005).

Irrespective of the pathway, the signaling cascades converge on activation of Caspase-3, an inactive proenzyme located in the cytosol of non-apoptotic cells which is activated during early apoptosis and acts as an effector protease that cleaves cellular substrates and produce morphological alterations characteristic to apoptosis (Hirata et al., 1998), this test detect membrane and protein alterations associated with apoptosis and allows the observation of early levels and effects associated with xenobiotic exposure (Sweet et al., 1999); for that reason, determination of the activity of caspase-3 has been extensively used as an indicator of apoptosis (Dahmer, 2005). The monoclonal antibodies (mAbs) that bind to the cell surface receptor Fas, are apoptosis inducer (Fisher et al., 1995). In this assay anti-Fas mAb was used as the positive control. A significant increase ($p < 0.05$) in specific activity of caspase-3 was observed in the positive control with respect to the control group at all exposure times. Activity levels with the lowest concentration were similar at most exposure times, while the 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ concentration produced a peak at 72 h that was not significant with respect to other exposure times, and a slight reduction (to 99%) at

96 h. In carp exposed to 1 mg L⁻¹, the highest significant activity was evidenced at 48 h (Fig. 3). The compound E2 modulates the regulation of apoptotic signaling pathways. In oocytes of teleost fishes, it induces cell proliferation, interrupting cell death and steroidogenesis as long as estrogen concentrations are at normal physiological levels. In contrast, at higher concentrations, E2 promotes increased apoptosis (Nadzialek and Kestemont, 2010), as seen in the present study.

During apoptosis, after caspases have been activated by the cells, chromatin condensation occurs, followed by activation or synthesis of diverse calcium-dependent nucleases that cleave both strands of the double helix at nucleosome binding sites, resulting in specific fragmentation (Vazzana et al., 2014). TUNEL is an assay based on incorporation of biotinylated nucleotides conjugated to bromodeoxyuridine (BrdU) at the 3' OH ends of the DNA fragments that form during apoptosis. TUNEL assay may be considered generally as a method for the detection of DNA damage (DNA fragmentation), and under the appropriate circumstances, more specifically as a method for identifying apoptotic cells (Lawry, 2004).

Therefore, this assay should be performed in combination with another method of apoptotic cell detection, such as Cas-3 activity determination. In the present study, significant increases in TUNEL-positive cells in the highest concentration and both 1 ng and 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ at 48 and 72 h (Fig. 4) were found despite the fact that the relative activity of Caspase 3 was elevated but did not differ significantly. These results suggest that a potential inhibition of apoptosis was not carried out completely. When damage is such that the cell is unable to repair itself, mechanisms directing the cell to die are activated (Zhou and Elledge, 2000). Pearson's correlation about the cytotoxicity data showed that there is a high correlation between TUNEL assay and caspase-3 activity in the concentration of 1 μg at 48 h.

Due to all the above, the cytotoxicity and genotoxicity data found in this study, could be related to the ability of E2 to generate oxidative stress. This was proven in a previous study already published in which it was demonstrated that E2 is capable of generating oxidative stress in gill, brain, liver, kidney and blood of common carp (*Cyprinus carpio*) at the same concentrations used in this study (Gutiérrez-Gómez et al., 2016). The significant increase in damage index values represents accumulation of DNA damage but, as evidenced by the biomarkers of apoptosis used in the study, the cell death process may mask this effect. For instance, in fish exposed to 1 mg L⁻¹ no significant increase was found by comet assay, yet this concentration had the highest increases in TUNEL-positive cells and relative activity of Caspase-3. Results in the present work to comet assay showed less damage to the concentration of 1 mg L⁻¹. Possibly at the highest concentration, repair mechanisms were overexpressed.

5. Conclusions

E2 induced cyto-genotoxicity in blood cells of *Cyprinus carpio* at the concentrations used. This may favor disease development and affect species survival in aquatic ecosystems. The set of assays used in the study constitutes a reliable early warning biomarker for evaluating the toxicity induced on aquatic species by this type of emerging contaminants. The results show that E2 poses a risk to the animals as common carp to induce cyto and genotoxicity and represents a latent risk to community.

Acknowledgments

This study was made possible by financial support from the Programa para el Desarrollo Profesional Docente (PRODEP-México, Project 1039503).

References

- Acconcia, F., Totta, P., Ogawa, S., Cardillo, I., Inoue, S., Leone, S., Trentalancia, A., Muramatsu, M., Marino, M., 2005. Survival versus apoptotic 17 β -estradiol effect: role of ER α and ER β activated non-genomic signaling. *J. Cell Physiol.* 203, 193–201. <https://doi.org/10.1002/jcp.20219>.
- Adeogun, A.O., Ibor, O.R., Adeduntan, S.D., Arukwe, A., 2016. Intersex and alterations in reproductive development of a cichlid, *Tilapia guineensis*, from a municipal domestic water supply lake (Eleyele) in Southwestern Nigeria. *Sci. Total Environ.* 541, 372–382. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.061>.
- Baronti, C., Curini, R., D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Samperi, R., 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ. Sci. Technol.* 34, 5059–5066. <https://doi.org/10.1021/es001359q>.
- Bolognesi, C., Hayashi, M., 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26, 205–213. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq073>.
- Bolong, N., Ismail, A.F., Salim, M.R., Matsuura, T., 2009. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination* 239 (1–3), 229–246. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>.
- Bowman, C.J., Kroll, K.J., Gross, T.G., Denslow, N.D., 2002. Estradiol-induced gene expression in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Mol. Cell Endocrinol.* 196 (1), 67–77. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00224-1](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00224-1).
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72 (1), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Brown, A.R., Hosken, D.J., Balloux, F., Bickley, L.K., LePage, G., Owen, S.F., Hetheridge, M.J., Tyler, C.R., 2009. Genetic variation, inbreeding and chemical exposure—combined effects in wildlife and critical considerations for ecotoxicology. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 364 (1534), 3377–3390. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0126>.
- Butala, H., Metzger, C., Rimoldi, J., Willett, K.L., 2004. Microsomal estrogen metabolism in channel catfish. *Mar. Environ. Res.* 58 (2), 489–494. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.034>.
- Claxton, L.D., Houk, V.S., Hughes, T.J., 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res.* 410, 237–243. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(98\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(98)00008-8).
- Canistro, D., Melega, S., Ranieri, D., Sapone, A., Gustavino, B., Monfrinotti, M., Rizzoni, M., Paolini, M., 2012. Modulation of cytochrome P450 and induction of DNA damage in *Cyprinus carpio* exposed in situ to surface water treated with chlorine or alternative disinfectants in different seasons. *Mutat. Res.* 729 (1–2), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.09.008>.
- Carino-Cortés, R., Álvarez-González, I., Martino-Roaro, L., Madrigal-Bujaidar, E., 2010. Effect of naringin on the DNA damage induced by daunorubicin in mouse hepatocytes and cardiocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 33, 697–701. <https://doi.org/10.1248/bpb.33.697>.
- Cavaliere, E., Rogan, E., 2014. The molecular etiology and prevention of estrogen-initiated cancers: Ockham's Razor: pluralitas non est ponenda sine necessitate. Plurality should not be posited without necessity. *Mol. Asp. Med.* 36, 1–55. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2013.08.002>.
- Cavas, T., Ergene-Gözükara, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.06.001>.
- Cavlieri, E., Frenkel, K., Liehr, J.G., Rogan, E., Roy, D., 2000. Estrogens as endogenous genotoxic agents—DNA adducts and mutations. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 27, 75–94.
- Commission Directive 92/69/EEC, Annex Part C, C.1. “Acute Toxicity for Fish”.
- Costa, D.M., Neto, F.F., Costa, M.D.M., Morais, R.N., Garcia, J.R.E., Esquivel, B.M., Ribeiro, C.O., 2010. Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17 β -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 151 (2), 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.11.002>.
- Dahmer, M.K., 2005. Caspases-2, -3, and -7 are involved in thapsigargin-induced apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* 80, 576–583. <https://doi.org/10.1002/jnr.20471>.
- Darzynkiewicz, Z., Galkowski, D., Zhao, H., 2008. Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods* 44 (3), 250–254. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.11.008>.
- Decordier, I., Dillen, L., Cundari, E., Kirsch-Volders, M., 2002. Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. *Mutagenesis* 17, 337–344. <https://doi.org/10.1093/mutage/17.4.337>.
- Díaz-Torres, E., Gibson, R., González-Farías, F., Zarco-Arista, A.E., Mazari-Hiriari, M., 2013. Endocrine disruptors in the Xochimilco wetland, Mexico city. *Water Air Soil Poll.* 224 (6), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1586-1>.
- Duan, W.R., Garner, D.S., Williams, S.D., Funckes-Shippy, C.L., Spath, I.S., Blomme, E.A., 2003. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J. Pathol.* 199 (2), 221–228. <https://doi.org/10.1002/path.1289>.
- Dwivedy, I., Devanesan, P., Cremonesi, P., Rogan, E., Cavlieri, E., 1992. Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 828–833. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10937>.
- El Habachi, N.M., Maklad, H.M., Sharara, G.M., Allam, E.A., Fawzy, E.M., 2014. A comparative study between the effect of 17 β -estradiol and antioxidants combination on some menopausal changes in oophorectomised rats. *Middle East Fertil. Soc. J.* 19, 303–313. <https://doi.org/10.1016/j.mefs.2014.02.003>.
- Fadeel, B., Orrenius, S., 2005. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J. Intern. Med.* 258, 479–517. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2005.01570.x>.
- Fang, Y.X., Ying, G.G., Zhao, J.L., Chen, F., Liu, S., Zhang, L.J., Yang, B., 2012. Assessment of hormonal activities and genotoxicity of industrial effluents using *in vitro* bioassays combined with chemical analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1273–1282. <https://doi.org/10.1002/etc.1811>.
- Fisher, G.H., Rosenberg, F.J., Straus, S.E., Dale, J.K., Middleton, L.A., Lin, A.Y., Strober, W., Lenardo, M.J., Puck, J.M., 1995. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81 (6), 935–946. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90013-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90013-6).
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat. Res.* 681 (1), 80–92. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.001>.
- Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Gómez-Oliván, L.M., Pérez-Coyotl, I., Mendoza-Monroy, D.J., Arrazola-Morgani, R.E., 2015. Oxidative stress and genotoxicity induced by ketorolac on the common carp *Cyprinus carpio*. *Environ. Toxicol.* <https://doi.org/10.1002/tox.22113>.
- García-Nieto, E., Juárez-Santacruz, L., García-Gallegos, E., Tlalmis-Zempoalteca, J., Romo-Gómez, C., Torres-Dosal, A., 2014. Genotoxicological response of the common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to spring water in Tlaxcala, Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 93, 393–398. <https://doi.org/10.1007/s00128-014-1318-2>.
- Cutiérrez-Gómez, A.A., San Juan-Reyes, N., Galar-Martínez, M., Dublán-García, O., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Pérez-Alvárez, I., Gómez-Oliván, L.M., 2016. 17 β -Estradiol induced oxidative stress in gill, brain, liver, kidney and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Electron J. Biol.* 12, 53–63.
- Hayes, C.L., Spink, D.C., Spink, B.C., Cao, J.Q., Walker, N.J., Sutter, T.R., 1996. 17 β -Estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9776–9781.
- Heffron, K.T., Gaines, K.F., Novak, J.M., Canam, T., Collard, D.A., 2016. 17 β -Estradiol influent and effluent concentrations in wastewater: demographic influences and the risk to environmental health. *Environ. Monit. Assess.* 188, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5292-5>.
- Heuser, V.D., de Andrade, V.M., Peres, A., de Macedo Braga, L.M.G., Chies, J.A.B., 2008. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by micronucleus test and comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell Biol. Int.* 32 (10), 1223–1229. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.07.005>.
- Hirata, H., Takahashi, A., Kobayashi, S., Yonehara, S., Sawai, H., Okazaki, T., Yamamoto, K., Sasada, M., 1998. Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 187 (4), 587–600. <https://doi.org/10.1084/jem.187.4.587>.
- Hontela, A., Dumont, P., Duclos, D., Fortin, R., 1995. Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River. *Environ. Toxicol. Chem.* 14 (4), 725–731. <https://doi.org/10.1002/etc.5620140421>.
- Imai, S., Koyama, J., Fujii, K., 2005. Effects of 17 β -estradiol on the reproduction of Java-medaka (*Oryzias latipes*), a new test fish species. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 708–714. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.02.018>.
- Kabil, A., Silva, E., Kortenkamp, A., 2008. Estrogens and genomic instability in human breast cancer cells— involvement of Src/Raf/Erk signaling in micronucleus formation by estrogenic chemicals. *Carcinogenesis* 29, 1862–1868. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn138>.
- Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Imada, N., Tadokoro, H., Honjo, T., 2002. Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 47 (1), 71–80. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00205-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00205-3).
- Kim, I.Y., Hyun, C.K., 2006. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.05.019>.
- Końca, K., Lankoff, A., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gózdź, S., Koza, Z., Wojcik, A., 2003. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* 534 (1), 15–20. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00251-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00251-6).
- Kumar, M.P., D'Costa, A., Shyama, S.K., 2017. Genotoxic biomarkers as indicators of marine pollution. In: *Mar Pollu Microb Remed.* Springer, Singapore, pp. 263–270.
- Kumar, P.M.K., Soorambail, S.K., Harisingh, S.B., D'Costa, A., Chandra, C.R., 2015. The effect of gamma radiation on the common carp (*Cyprinus carpio*): *In vivo* genotoxicity assessment with the micronucleus and comet assays. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* 792, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.08.005>.
- Kumaravel, T.S., Jha, A.N., 2006. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* 605 (1), 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.03.002>.
- Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., Jha, A.N., 2007. Comet assay measurements: a perspective. *Cell Biol. Toxicol.* 25 (1), 53–64. <https://doi.org/10.1007/s10565-007-9043-9>.
- Kümmerer, K., 2001. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources — a

- review. *Chemosphere* 45, 957–969. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00144-8).
- Lawry, J., 2004. Detection of apoptosis by the TUNEL assay. In: Langdon, S.P. (Ed.), *Cancer Cell Culture: Methods in Molecular Medicine*. Springer, New York, pp. 183–190.
- Lv, L., Dong, X., Gu, Lv, Yu, Y., Zhao, W., Liu, F., 2016. Antioxidant enzymes responses of polychaete *Perinereis aiubihitensis* following chronic exposure to 17 β -estradiol. *Ital. J. Anim. Sci.* 15 (3), 552–557. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2016.1194172>.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/Comet Assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* 544 (1), 43–64. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00017-6).
- Liehr, J.G., Roy, D., 1990. Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radic. Biol. Med.* 8 (4), 415–423. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90108-U](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90108-U).
- Ma, L., Yates, S.R., Ashworth, D., 2016. Parent and conjugated estrogens and progestagens in surface water of the Santa Ana River: determination, occurrence and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* <https://doi.org/10.1002/etc.3447>.
- Maria, V.L., Ahmad, I., Santos, M.A., 2008. Juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) DNA strand breaks and lipid peroxidation response following 17 β -estradiol two mode of exposures. *Environ. Int.* 34, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.06.008>.
- Marlatt, V., Hewitt, M., Van Der Kraak, G., 2006. Utility of in vitro test methods to assess the activity of xenoestrogens in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 3204–3212. <https://doi.org/10.1897/05-686R.1>.
- Martínez-Tabche, L., Madrigal-Bujaidar, E., Negrete, T., 2004. Genotoxicity and lipoperoxidation produced by paraquat and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73, 146–152. <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0406-0>.
- Matozzo, V., Marin, M.G., 2008. Can 17 β -estradiol induce vitellogenin-like proteins in the clam *Tapes philippinarum*? *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2008.01.001>.
- Mauras, N., Santen, R.J., Colón-Otero, G., Hossain, J., Wang, Q., Mesaros, C., Blair, I.A., 2015. Estrogens and their genotoxic metabolites are increased in obese pre-pubertal girls. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100, 2322–2328. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1495>.
- Mills, L.J., Gutjahr-Gobell, R.E., Haebler, R.A., Horowitz, D.J.B., Jayaraman, S., Pruell, R.J., McKinney, R.A., Gardner, G.R., Zarogian, G.E., 2001. Effects of estrogenic (o,p'-DDT; octylphenol) and anti-androgenic (p,p'-DDE) chemicals on indicators of endocrine status in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquat. Toxicol.* 52 (2), 157–176. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00139-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00139-9).
- Mitchellmore, C.L., Chipman, J.K., 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Aquat. Toxicol.* 41, 161–182. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00252-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00252-2).
- Mishra, D.P., Shaha, C., 2005. Estrogen-induced spermatogenic cell apoptosis occurs via the mitochondrial pathway: role of superoxide and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 280, 6181–6196. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405970200>.
- Munkittrick, K.R.M., Van Der Kraak, G.J., McMaster, M.E., Portt, C.B., 1992. Response of hepatic MFO activity and plasma sex steroids to secondary treatment of bleached kraft pulp mill effluent and mill shutdown. *Environ. Toxicol. Chem.* 11 (10), 1427–1439. <https://doi.org/10.1002/etc.5620111008>.
- Nacci, D.E., Cayula, S., Jackim, E., 1996. Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquat. Toxicol.* 35, 197–210. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(96\)00016-1](https://doi.org/10.1016/0166-445X(96)00016-1).
- Nadzialek, S., Kestemont, P., 2010. 17 α -Ethinylestradiol induces an imbalance between apoptosis and cell proliferation to sex steroid disruption in a testis culture of gudgeon, *Gobio gobio*. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 881–886. <https://doi.org/10.1002/etc.100>.
- Nessler, F., Benamer, L., 2014. Genotoxicity of nanoparticles. *Encycl. Nanotechnol.* 1–11. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6178-0_335-2.
- Norbury, C.J., Zhivotovskiy, B., 2004. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 23 (16), 2797.
- Nutter, L.M., Wu, Y.Y., Ngo, E.O., Sierra, E.E., Gutierrez, P.L., Abul-Hajj, Y.J., 1994. An o-quinone form of estrogen produces free radicals in human breast cancer cells: correlation with DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 23–28. <https://doi.org/10.1021/tx00037a004>.
- Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2015. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* 72, 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>.
- Reinardy, H.C., Syrett, J.R., Jeffrey, R.A., 2013. Cobalt-induced genotoxicity in male zebrafish (*Danio rerio*), with implications for reproduction and expression of DNA repair genes. *Aquat. Toxicol.* 126, 224–230. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.007>.
- Richardson, S.D., Kimura, S.Y., 2016. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 88, 546–582. <https://doi.org/10.1021/ac900801>.
- Roos, W.P., Kaina, B., 2006. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol. Med.* 12, 440–450. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.007>.
- Routledge, E.J., Sheahan, D., Desbrow, C., Brighty, G.C., Waldock, M., Sumpter, J.P., 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1559–1565. <https://doi.org/10.1021/es970796a>.
- Sackett, D.K., Pow, C.L., Rubino, M.J., Aday, D.D., Cope, W.G., Kullman, S., Rice, J.A., Kwak, T.J., Law, M., 2015. Sources of endocrine-disrupting compounds in North Carolina waterways: a geographic information systems approach. *Environ. Toxicol. Chem.* 34 (2), 437–445. <https://doi.org/10.1002/etc.2797>.
- Sharma, R., Masaki, J., Agarwal, A., 2013. Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay. In: *Spermatogenesis: Methods and Protocols*. Springer, New York, pp. 121–136.
- Selvi, M., Çavaş, T., Çağlan Karasu Benli, A., Koçak Memmi, B., Çinkiliç, N., Dinçel, A.S., Vatan, O., Yılmaz, D., Sarıkaya, R., Zorlu, T., Erkoç, F., 2013. Sublethal toxicity of esbiothrin relationship with total antioxidant status and in vivo genotoxicity assessment in fish (*Cyprinus carpio* L., 1758) using the micronucleus test and comet assay. *Environ. Toxicol.* 28, 644–651. <https://doi.org/10.1002/tox.20760>.
- Simoes, V.L., Alves, M.G., Martins, A.D., Dias, T.R., Rato, L., Socorro, S., Oliveira, P.F., 2013. Regulation of apoptotic signaling pathways by 5 α -dihydrotestosterone and 17 β -estradiol in immature rat Sertoli cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 135, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2012.11.019>.
- Sweet, L.L., Passino-Reader, D.R., Meier, P.G., Omann, G.M., 1999. Xenobiotic-induced apoptosis: significance and potential application as a general biomarker of response. *Biomarkers* 4 (4), 237–253. <https://doi.org/10.1080/135475099230778>.
- Teles, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2005. *Sparus aurata* L. liver EROD and GST activities, plasma cortisol, lactate, glucose and erythrocytic nuclear anomalies following short-term exposure either to 17 β -estradiol (E2) or E2 combined with 4-nonylphenol. *Sci. Total Environ.* 336, 57–69. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.05.004>.
- Teles, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2006. Biotransformation, stress and genotoxic effects of 17 β -estradiol in juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Environ. Int.* 32 (4), 470–477. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.11.006>.
- Tetreault, G.R., Bennett, C.J., Shires, K., Knight, B., Servos, M.R., McMaster, M.E., 2011. Intersex and reproductive impairment of wild fish exposed to multiple municipal wastewater discharges. *Aquat. Toxicol.* 104, 278–290. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.008>.
- Thilagam, H., Gopalakrishnan, S., Bo, J., Wang, K.J., 2014. Comparative study of 17 β -estradiol on endocrine disruption and biotransformation in fingerlings and juveniles of Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*. *Mar. Pollut. Bull.* 85, 332–337. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.05.024>.
- Thilagam, H., Gopalakrishnan, S., Qu, H.D., Bo, J., Wang, K.J., 2010. 17 β estradiol induced ROS generation, DNA damage and enzymatic responses in the hepatic tissue of Japanese sea bass. *Ecotoxicology* 19, 1258–1267. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0510-3>.
- Udroiu, I., 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat. Toxicol.* 79, 201–204. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.013>.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13 (2), 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6).
- Vasquez, M.Z., 2012. Recommendations for safety testing with the in vivo comet assay. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* 747, 142–156. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.05.002>.
- Vazzana, M., Celi, M., Tramati, C., Ferrantelli, V., Arizza, V., Parrinello, N., 2014. In vitro effect of cadmium and copper on separated blood leukocytes of *Dicentrarchus labrax*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 102, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.018>.
- Wang, Z., Zheng, Q., Liu, K., Li, G., Zheng, R., 2006. Ginsenoside Rh2 enhances antitumor activity and decreases genotoxic effect of cyclophosphamide. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98 (4), 411–415. https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2006.pto_348.x.
- Williams, T.D., Diab, A.M., George, S.G., Sabine, V., Chipman, J.K., 2007. Gene expression responses of European flounder (*Platichthys flesus*) to 17 β -estradiol. *Toxicol. Lett.* 168, 236–248. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.10.020>.
- Yan, Z., Lu, G., Wu, D., Ye, Q., Xie, Z., 2013a. Interaction of 17 β -estradiol and ketoconazole on endocrine function in goldfish (*Carassius auratus*). *Aquat. Toxicol.* 132, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.015>.
- Yan, Z.H., Lu, G.H., Yang, X.F., 2013b. Single and combined effects of estrone and 17 β -estradiol on male goldfish. *Biomed. Environ. Sci.* 26, 176–184. <https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.03.004>.
- Zhang, Y., Zhou, J.L., Ning, B., 2007. Photodegradation of estrone and 17 β -estradiol in water. *Water Res.* 41 (1), 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.09.020>.
- Zhou, B.B.S., Elledge, S.J., 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408 (6811), 433–439.
- Zhu, C., Wang, X., Hagberg, H., Blomgren, K., 2000. Correlation between Caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *J. Neurochem.* 75 (2), 819–829. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0750819.x>.



17-β-Estradiol: Significant reduction of its toxicity in water treated by photocatalysis

Luis Orozco-Hernández^a, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{a,*}, Armando Elizalde-Velázquez^a, Reyna Natividad^b, Lucio Fabian-Castoño^a, Nely SanJuan-Reyes^a

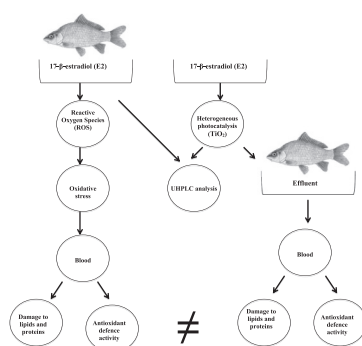
^a Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Col. Residencial Colón, 50120 Toluca, Estado de México, Mexico

^b Chemical Engineering Lab., Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEM-UNAM, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Toluca-Atacomulco Km 14.5, Unidad San Cayetano, Toluca, Estado de México 50200, Mexico

HIGHLIGHTS

- Water with E2 induces oxidative stress in *C. carpio*.
- This study confirms the efficiency of the heterogeneous photocatalysis to remove E2 from water.
- Treated water significantly reduces the oxidative stress in *C. carpio*.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2019

Received in revised form 13 March 2019

Accepted 13 March 2019

Available online 14 March 2019

Editor: Damia Barcelo

Keywords:

17-β-Estradiol

Cyprinus carpio

Oxidative stress

Advanced oxidation process

Photocatalysis

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the efficiency of photocatalysis by TiO₂ on the removal of 17-β-estradiol (E2) (at environmentally relevant concentrations) and the toxicity caused by this emerging pollutant. After 60 min of TiO₂/UV treatment at pilot scale (14 L), E2 was removed from water approximately 85%. The toxicity was established by using *Cyprinus carpio* as bioindicator organism and oxidative stress biomarkers (OSB): [lipid peroxidation level (LPX), hydroperoxide content (HPC) and protein carbonyl content (PCC)] and enzymes [superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT)]. It was found that the photocatalytic treatment led to significantly reduce OSB in approximately 85–95%. Thus, it can be concluded that heterogeneous photocatalysis by TiO₂ is an efficient process to eliminate the toxicity caused by E2 and thus to remediate water polluted with this molecule.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: AOPs, advanced oxidation processes; CAT, catalase; CHP, cumene hydroperoxide; E2, 17-β-estradiol; HPC, hydroperoxide content; LPX, lipid peroxidation; MDA, malondialdehyde; PCC, protein carbonyl content; OSB, oxidative stress biomarkers; ROS, Reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase.

* Corresponding author at: Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Colón intersección Paseo Tollocan s/n. Col. Residencial Colón, Toluca, Estado de México 50120, Mexico.

E-mail address: lmgomezo@uaemex.mx (L.M. Gómez-Oliván).

1. Introduction

Photocatalysis has been proven to be a highly efficient Advanced Oxidation Process (AOP) (Avilés-García et al., 2018; Rosales et al., 2019; Yap et al., 2019; Hurtado et al., 2018; Mirzaei et al., 2017). The most widely used photocatalyst has been TiO₂, because of its capability to oxidize drugs dissolved in water, non-toxicity, low-cost and its long-term photostability, also this photocatalyst can carry out the degradation of up to 75% of some organic compounds (Tran et al., 2019; Durán et al., 2018). Although this method is effective for the removal of contaminants it can also generate metabolites, sometimes even more toxic than the original compound (Murgolo et al., 2018; Šojić Merkulov et al., 2018), hence it is necessary to evaluate this type of methodology to secure its safety use, mainly on the removal of emerging contaminants like endocrine disruptors. These substances are known to produce negative impacts to the human reproductive system, increase the risk of cancer and cause disturbances in the immune and nervous system, (Sumpster and Johnson, 2005), even at very low concentrations. In this context, 17-β-estradiol (E2) is an estrogen considered as a priority pollutant by the Water Framework Directive (WFD) of the European Union (Dai and Liu, 2017). E2 reaches the environmental waters from different sources but mainly from the animal and human urine, either by natural excretion or increased by the consumption of synthetic hormonal products for birth control or for the massive production of milk in the dairy industry. Estrogenic compounds are not completely removed by the wastewater facilities, and have been released in the effluents (Ferguson et al., 2001), reaching environmental waters between the ranges of ng/L to µg/L (Valdés et al., 2015; Díaz-Torres et al., 2013; Oğuz and Kankaya, 2013; Singh et al., 2010; Nasu et al., 2001). Furthermore, some negative outcomes have been reported in aquatic organisms at the same range of concentrations; reduced fertility, induce male feminization, reduced sperm count, induce the production of vitellogenin and vitelline envelope proteins, induce oxidative stress and so on (Lei et al., 2013; Moura Costa et al., 2010; Thilagam et al., 2010; Ahmad et al., 2009; Robinson et al., 2007; Jobling et al., 2004; Thomas-Jones et al., 2003; Kang et al., 2002; Rose et al., 2002). Thus, it is critical the development of new and effective methodologies for the efficient removal of this type of compounds from the water, but at the same time these new methodologies must also be friendly with the environment and the organisms that inhabit them.

The removal of E2 by photocatalysis with TiO₂ has already been reported (Alvarez-Corena et al., 2016; Arlos et al., 2016; Zhang et al., 2007), however, such works have focused mainly on the E2 degradation at either non-relevant environmental concentration or without an assessment of the produced metabolites. Thus, although E2 removal is efficient by photocatalysis, from a toxicological point of view it is of paramount importance to establish whether or not the treated water by such a technology can be discharged or not.

Therefore, the aim of this study was to assess the reduction of toxicity exerted by photocatalysis applied for the removal of 17-β-estradiol using *Cyprinus carpio* as bioindicator. This was achieved by evaluating the prooxidant effect and the antioxidant effect induced in the blood of the common carp after its exposure to water contaminated with E2; and comparing it against the exposure to the same water after its photocatalytic treatment with TiO₂. The prooxidant effect was evaluated by the determining the following biomarkers: lipid peroxidation level (LPX), hydroperoxide content (HPC) and protein carbonyl content (PCC); and the antioxidant effect will be evaluated by the determination of the activities of the SOD and catalase.

2. Materials and methods

2.1. Test substances

17β- estradiol (CAS number 50-28-2, >98.0% purity) C₁₈H₂₄O₂, 272.38 MW, was purchased from Sigma-Aldrich. All solvents used

were HPLC grade. 17β- estradiol was dissolved first in acetonitrile to prepare stock solution from which all working concentrations were obtained. Unless otherwise stated, reagents in this section were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis MO).

2.2. Specimen procurement and conservation

Bioindicator, *Cyprinus carpio* of 14.83 ± 1.42 cm in length and weight 53.09 ± 6.4 g were used. The specimens came from the Tiacaque carp center, in the Mexico State. Fish were brought to the aquarium in plastic containers with oxygenated water and subsequently stocked in 15 L tanks with dechlorinated tap water added with salts and adapted to test conditions for 40 days before to the experiment. Carps were fed with Pedegral Silver™ fish food once daily and water was changed every 24 h so that the tanks were in healthy conditions. The characteristics of the tap water were determined daily and their values were maintained in the following intervals: temperature 21 ± 1.5 °C, O₂ concentrations >90%, pH 7.4–8.0, total alkalinity 16.3 ± 4.1 mg/L, total hardness 19.1 ± 0.3 mg/L. Natural photoperiod was used during the whole experiment.

2.3. Water treatment

This process was carried out in a relative new technology, a photocatalytic downflow bubble column reactor that allowed to process 14 L of water per batch. Two concentrations of the 17β- estradiol [1 ng/L (C1) and 1 µg/L (C2)] were assessed. These concentrations were selected because they were environmentally relevant, found in different parts of the world (Valdés et al., 2015; Díaz-Torres et al., 2013; Oğuz and Kankaya, 2013; Singh et al., 2010; Nasu et al., 2001). The initial pH was 6.0. The employed catalyst was the commercially available TiO₂ Degussa P25 and the loading was 100 mg/L. It is well known that this catalyst exhibits a specific surface area of 50 m²/g and the main crystalline phase is Anatase.

The main feature of the employed bubble column reactor is that the gas is concomitantly injected with the liquid at the top of the column. A Venturi effect at the inlet is exploited to break up the gas and homogeneously disperse it as 3.4 mm bubbles into the liquid. The radiation lamp was placed in the lower part of the column radially centred. The liquid was recirculated to the photocatalytic reactor by means of a 1 HP pump. Nevertheless, a more detailed description of the reactor can be found in Martín del Campo et al. (2011).

During the reaction time (60 min), temperature (25 ± 3 °C) and oxygen flowrate (50 mL/min) were monitored and kept constant. The power of the UV radiation source was 400 W and emitted radiation with a wavelength of 254 nm. Samples were taken at different times (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 and 60 min) during the reaction to control the degradation of the molecule within the treatment process. At the end of reaction, water was recovered and filtered to separate the catalyst (TiO₂) and it was placed in plastic bottles protected from light for its conservation and later use in the exposure systems.

2.4. HPLC methodology

Specific determination of 17β-estradiol in the samples of water withdrawn from the reactor was made using high performance liquid chromatography equipped with a multiple UV wavelength detector (Vanquish Thermoscientific UHPLC 1100). UV detector was set at 200 nm for all analysis. Separations was performed with a C18 column 5 µm, 120 Å (4.6 × 150 mm) which was maintained at 40 °C with a flow rate of 1 mL/min; run time was 8 min; injection volume was 50 µL; elution was achieved under isocratic conditions, 50:50 (v/v) mixture of water [pH adjusted to 2.6 with 99% phosphoric acid (spectrophotometric grade)]; acetonitrile (HPLC grade).

The determination of the 17β-estradiol concentration in carp blood was also carried out at 12, 24, 48, 72 and 96 h before and after the

treatment at the two environmentally relevant concentrations referred to in Section 2.3.

Plasma samples underwent the following extraction procedure for separation of 17 β -estradiol from binding proteins prior to analysis. The plasma samples were extracted with diethyl-ether and quick frozen. The resulting supernatant (ether phase) contains the steroid and was placed in a 30 °C water bath for evaporation under nitrogen. The steroid residues were then reconstituted in PBSG (phosphate buffered saline pH 7.0 with 1% gelatin) and stored at –20 °C until assayed. 17 β -estradiol concentration was followed by using high performance liquid chromatography equipped with a multiple UV wavelength detector (Vanquish ThermoScientific UHPLC 1100), using the afore mentioned conditions.

2.5. Toxicity studies

Adult organisms (*Cyprinus carpio*) of 16.42 ± 1.61 cm in length and weight 61.82 ± 7.6 g were exposed at two different environmental relevant concentrations of E2 (1 ng/L (C1) and 1 μ g/L (C2)) and at different exposure times (12, 24, 48, 72 and 96 h). One group was exposed to the untreated water and other group was exposed to the treated water. For the evaluation of toxicity tests, 6 systems were used for each exposure time: 1) Control before treatment, 2) C1 before treatment, 3) C2 before treatment, 4) Control after treatment, 5) C1 after treatment and 6) C2 after the treatment. Each system (20 L capacity tanks) contained 10 L of treated or untreated water and in them 5 fish of the above-mentioned characteristics were placed. Water composition and physicochemical characteristics similar to the acclimatization period were used in this study. The systems were made in quintuplicate. A total of 150 carp specimens were used in the experiment.

At the end of the exposure period, fish were removed from the systems and placed in a tank with 50 mg/L of clove oil as an anesthetic. Anesthetized specimens were placed in a lateral position and blood was collected with a heparinized 1-mL hypodermic syringe by puncture of the caudal vessel performed laterally near the base of the caudal peduncle, at mid-height of the anal fin and ventral to the lateral line. Six hundred microliters of blood samples were collected in heparinized tubes, placed in 1 mL of Tris buffer solution pH 7. The supernatant was centrifuged at 12, 500 \times g for 15 min at –4 °C. The serum obtained was used to determine the oxidative stress determinations. The biomarkers evaluated were: lipid peroxidation level (LPX), hydroperoxide content (HPC) and protein carbonyl content (PCC), in addition to activities of antioxidant enzymes, SOD and CAT. All evaluated biomarkers were analyzed using the supernatant.

2.6. Oxidative stress evaluation

2.6.1. Determination of LPX (Buege and Aust, method 1979)

50 μ L of supernatant liquid were added with 450 μ L of Tris HCl solution (150 mM) and 1 mL of TCA-TBA solution (0.375% thiobarbituric in 15% trichloroacetic acid). Subsequently, the mixture was incubated at 37 °C for 35 min and then vortexed, immediately samples were placed in boiling water for 45 min and suddenly cooled down in a fridge at –20 °C to cause a thermal shock. Following this, samples were centrifuged at 3500 rpm for 10 min and finally the absorbance was measured at 535 nm. The obtained data were reported as millimole of malondialdehyde per milligram of protein. This calculation was made using the molar extinction coefficient (MEC) of $1.56 \times 105/\text{M}/\text{cm}$.

2.6.2. Determination of HPC (Jiang et al., method, 1992)

100 μ L of supernatant (deprotonated with 10% trichloroacetic acid) was mixed with 900 μ L of reaction mixture (0.25 mM FeSO₄, 25 mM H₂SO₄, 0.1 mM xylenol orange and 4 mM 90% butylhydroxytoluene in methanol). The mixture was incubated for 60 min at 25 °C and preserved from the light. Then, the absorbance was read at 565 nm. Results

were interpolated in a pattern curve and results were expressed in nanomole of cumene hydroperoxide per milligram of protein.

2.6.3. Determination of PCC (Levine et al., 1994, Parvez and Raisuddin, 2005, Burchman, method 2007)

Precipitate was mixed with 150 μ L of 2,4 -dinitrophenyl hydrazine (10 mM in 2 M HCl). Then, the solution was incubated at 25 °C for 1 h in the dark. After incubation, 500 μ L of trichloroacetic acid (20%) were placed and the sample was allowed to stand for 15 min at 4 °C. Subsequently, the solution was centrifuged at 11,000 rpm for 5 min.; supernatant was discarded and the button was washed three times with 1 mL of ethanol:ethyl acetate (1:1). Immediately, precipitate was dissolved in 1 mL of guanidine (6 M), pH 2.3, and incubated for 30 min at 37 °C. Finally, absorbance was read at 366 nm, and expressed as micromolar reactive carbonyls formed (C=O) per milligram of protein, using the MEC of 21,000 M /cm.

2.7. Determination of the antioxidant enzymes

2.7.1. Determination of SOD activity (Misra and Fridovich, 1972)

40 μ L of supernatant was added with 260 μ L of carbonate buffer solution (50 mM sodium carbonate and 0.1 mM EDTA) at pH 10.2, and with 200 μ L of adrenaline (30 mM). Absorbance was read at 480 nm, at 30 s and 5 min. The enzyme activity was measured by interpolating the data in a pattern curve and results were expressed as SOD UI per milligram of protein.

2.7.2. Determination of CAT activity (Radi et al., method 1991)

30 μ L of supernatant was added with 420 μ L of buffer solution (0.3 M sucrose, 1 mM EDTA, 5 mM HEPES, and 5 mM KH₂PO₄) and 300 μ L of H₂O₂ solution (20 mM). Subsequently, the absorbance was measured at 240 nm, at 0 and 60 s. Results were expressed as millimole of H₂O₂ per milligram of protein.

2.7.3. Determination of total proteins (Bradford method 1976)

50 μ L of supernatant was added with 150 μ L of H₂O distilled and 2.5 mL of Bradford's reagent, then vortexed and allowed to stand protected from light for 5 min at 25 °C. Finally, the absorbance of the solution was measured at 595 nm.

2.8. Considerations used for animal welfare in this study

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-ZOO, 1999) were also taken into account.

2.9. Statistical analysis

The data obtained from the oxidative stress determinations were analyzed by the one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Bonferroni multiple comparison ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. Photocatalytic degradation of E2

Fig. 1 shows the E2 degradation profile under UV radiation and using TiO₂ Degussa P25 as photo-catalyst. It should be noticed that the maximum removal of E2 observed in Fig. 1 is about 85%. It is worth pointing out that by any means this value is the maximum achieved during the process but the concentration of E2 after 60 min of treatment was lower and out of the equipment detection limit. Therefore, it can be assured that the removal efficiency of the assessed technology is higher

than 85%. Also, as consequence of the detection limit of the used HPLC, a degradation profile when using C1 could not be produced and therefore is not included in fig. 1. Nevertheless, such solution was also treated at the same reaction conditions than C2 solution and used to conduct toxicology tests.

It is also worth noticing that, in the context of E2 removal by photocatalysis with TiO_2 , the catalyst loading employed in this work is about 10 times less than that reported by other authors and the reaction volume is approximately 20–30 times higher than previous works (Álvarez-Corena et al. 2016; Arlos et al., 2016; Zhang et al., 2007). In order to establish the effect of light an experiment without catalyst was conducted and after 60 min of reaction the removed E2 was only 30%. This highlights the effect of the photo-catalyst on the E2 removal rate. In addition, an adsorption experiment, i.e. catalyst without light, was also performed. The maximum attained E2 removal by adsorption was determined to be 5% after 60 min of treatment.

3.2. 17 β -estradiol concentration in blood of common carp

Table 1 shows the results of the water added with two environmentally relevant concentrations of 17- β -estradiol and its change with time in water and in blood of common carp. As can be seen for both, C1 and C2, the concentration of 17- β -estradiol decreases in water and gradually increases in common carp blood. In the photocatalytically treated waters, for both C1 and C2 solutions, 17- β -estradiol was not identified in any of the exposure times, likewise, this contaminant was not identified in blood.

3.3. Oxidative stress

3.3.1. LPX results

Fig. 2 shows the results regarding the lipoperoxidation level in blood of *Cyprinus carpio* exposed to E2 at two concentrations C1 and C2; before (AC1 and AC2) and after (DC1 and DC2) of the photocatalysis treatment with TiO_2 . Graph in Fig. 2, shows a significant increase ($P < 0.05$) of lipoperoxidation with respect to the control group in the water without treatment at 12 h in AC1 (116%), at 24 h in AC1 (110%) and in AC2 (112%), at 48 h in AC1 (112%) and AC2 (117%), at 72 h in AC1 (116%)

and finally at 96 h in AC1 (114%) and AC2 (122%). Noteworthy, is the difference in the grade of lipoperoxidation observed at all times, except at 12 h, in both concentrations if we compare the results obtained from the exposure to water before and after treatment.

3.3.2. HPX results

Fig. 3 shows the results referring to the content of hydroperoxides in blood of *Cyprinus carpio* exposed to E2 at two concentrations C1 and C2; before (AC1 and AC2) and after (DC1 and DC2) of the photocatalysis treatment with TiO_2 . Graphic shows a significant increase of hydroperoxide content ($P < 0.05$) with respect to the control in both concentrations tested in the water without treatment, at 12 h AC1 (324%) AC2 (715%), at 24 h AC1 (209%) AC2 (826%) and at 48 h in AC1 (186%) AC2 (397%). However, 72 h and 96 h only show a significant increase of hydroperoxide content ($P < 0.05$) with respect to the control at the highest concentration; AC2 (244%) and AC2 (221%) respectively. On the other hand, a significant decrease ($P < 0.05$) of the hydroperoxide content with respect to the control was observed at the lowest concentrations tested in the treated water at 72 h and 96 h, in DC1 (24%) and DC1 (21%) respectively. Important to remark that at all times of exposure there are differences between the two concentrations tested before and after the treatment; AC1 vs DC1 and AC2 vs DC2.

3.3.3. PCC results

Fig. 4 shows the results concerning the protein carbonylated content in blood of *Cyprinus carpio* exposed to E2 at two concentrations C1 and C2; before (AC1 and AC2) and after (DC1 and DC2) of the photocatalysis treatment with TiO_2 . Graphic shows a significant increase ($P < 0.05$) on the protein carbonylated content with respect to the control group, in both concentrations tested and in both groups, with treatment and without treatment, at 12 h in both concentrations without treatment AC1 (122%) and in AC2 (157%), and also in the highest concentration after the treatment, DC2 (109%), at 24 h in both concentrations without treatment AC1 (124%) and in AC2 (186%), and also in the lowest concentration after the treatment, DC1 (110%). After 48 h, a significance increase only were observed in the groups without the water treatment, at 48 h in AC2 (125%), at 72 h in AC1 (123%) and AC2 (154%) and finally at 96 h in AC1 (160%) and in AC2 (189%). On the other hand, a

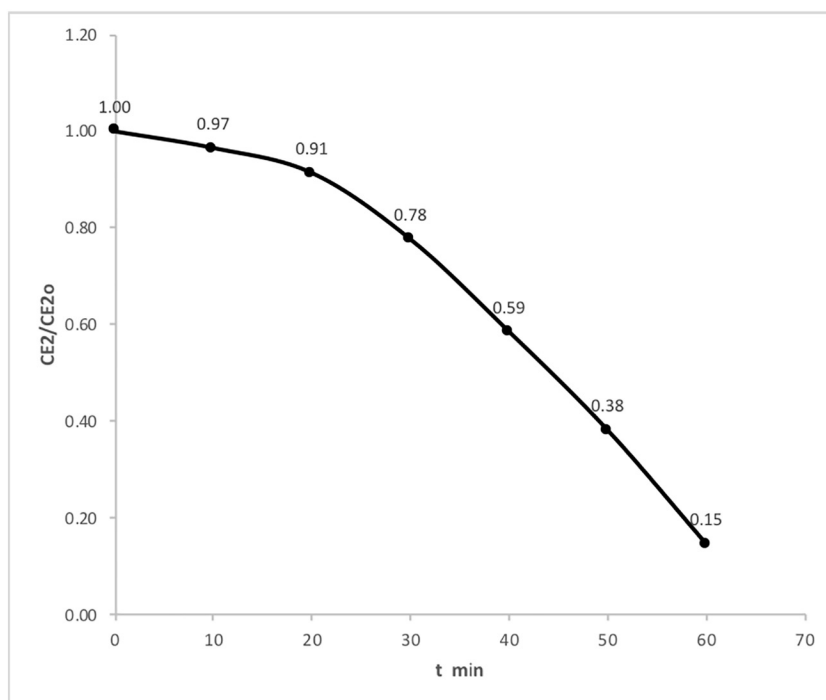


Fig. 1. 17- β -Estradiol concentration evolution profile with time. Reaction volume = 14 L, $T = 298$ K, $Q_{O_2} = 50$ mL/min.

Table 1Concentration of 17- β -estradiol in water and blood of *Cyprinus carpio* before and after photocatalytic treatment.

Time	Water without photocatalytic treatment C1	17- β -Estradiol in blood of common carp in water without photocatalytic treatment C1	Water with photocatalytic treatment C1	17- β -Estradiol in blood of common carp in water with photocatalytic treatment C1	Water without photocatalytic treatment C2	17- β -Estradiol in blood of common carp in water without photocatalytic treatment C2	Water with photocatalytic treatment C2	17- β -Estradiol in blood of common carp in water with photocatalytic treatment C2
0 h	1 \pm 0.0 ng/L	0 \pm 0.0 ng/L	NI	NI	1 \pm 0.0 μ g/L	0 \pm 0.0 μ g/L	NI	NI
12 h	0.8 \pm 0.02 ng/L	0.12 \pm 0.03 ng/L	NI	NI	0.87 \pm 0.03 μ g/L	0.10 \pm 0.01 μ g/L	NI	NI
24 h	0.7 \pm 0.01 ng/L	0.23 \pm 0.01 ng/L	NI	NI	0.81 \pm 0.05 μ g/L	0.16 \pm 0.03 μ g/L	NI	NI
48 h	0.5 \pm 0.03 ng/L	0.42 \pm 0.02 ng/L	NI	NI	0.62 \pm 0.04 μ g/L	0.33 \pm 0.02 μ g/L	NI	NI
72 h	0.4 \pm 0.02 ng/L	0.54 \pm 0.04 ng/L	NI	NI	0.53 \pm 0.03 μ g/L	0.41 \pm 0.01 μ g/L	NI	NI
96 h	0.2 \pm 0.01 ng/L	0.76 \pm 0.03 ng/L	NI	NI	0.35 \pm 0.04 μ g/L	0.58 \pm 0.04 μ g/L	NI	NI

NI = Unidentified.

significant decrease ($P < 0.05$) with respect to the control group was observed, at 12 h DC1 (68%), 48 h AC1 (84%) and at DC2 (72%) and finally at 72 h in DC2 (87%). It's important to remark a difference between the two concentrations tested before and after the treatment at 12, 72 and 96 h, and only in the highest concentration at 24 and 48 h.

3.4. Antioxidant enzymes activity

3.4.1. SOD activity

Fig. 5 shows SOD activity in blood of *Cyprinus carpio* exposed to E2 at two concentrations C1 and C2; before (AC1 and AC2) and after (DC1 and DC2) of the photocatalysis treatment with TiO₂. Graphic shows a significant increase of SOD activity ($P < 0.05$) with respect to the control group in both concentrations tested at all exposure times for the group exposed to the water without treatment, at 12 h AC1 (140%), AC2 (136%), at 24 h AC1 (119%), AC2 (125%), at 48 h AC1 (156%), AC2 (130%), at 72 h AC1 (134%) AC2 (120%), and finally at 96 h AC1 (126%), AC2 (128%). On the other hand, there was a significant decrease ($P < 0.05$) of SOD activity with respect to the control group respectively at 12 h in DC2 (86%). A difference in the SOD activity between the two concentrations tested before and after the water treatment was observed at all times.

3.4.2. CAT activity

Fig. 6 shows CAT activity in blood of *Cyprinus carpio* exposed to E2 at two concentrations C1 and C2; before (AC1 and AC2) and after (DC1 and DC2) of the photocatalysis treatment with TiO₂. A significant increase was observed ($P < 0.05$) with respect to the control group, at 12 h AC1 (114%), AC2 (120%), at 24 h AC1 (129%), AC2 (122%), at 48 h AC1 (120%), AC2 (130%), at 72 h AC1 (139%), AC2 (134%) and DC2 (119%)

and finally at 96 h AC1 (140%) and AC2 (173%). On the other hand, there was a significant decrease ($P < 0.05$) of the CAT activity with respect to the control at 24 h DC1 (55%), DC2 (85%), at 48 h DC1 (88%) and at 96 h DC1 (47%) and DC2 (85%). Finally differences were found in all concentrations tested before and after the water treatment at all times.

4. Discussion

The toxicological response of *Cyprinus carpio* was assessed using oxidative stress biomarkers, after its exposure to water contaminated with E2 at two different environmental relevant concentrations. The estrogenic compound E2 it is known for being metabolized in the liver by the microsomal cytochrome p450 monooxygenase system (Guengerich, 1990) forming hydroxylated compounds. Likewise, the biotransformation of E2 generates semiquinones, which with the help of molecular O₂ produce quinones, forming also the radical anion superoxide that is capable of producing cellular oxidation (Cavaliere et al., 2000).

Our results (Fig. 2) show a significant increase in the lipidperoxidation level in common carp blood, evident for both concentrations at 24, 48 and 96 h. ROS are responsible for initiating damage in the lipids of the cell membrane; the resulting free radicals lipids propagate lipidperoxidation process (LPX), generating a chain reaction where the final products are aldehydes, ketones, esters, and alcohols. Allowing the accumulation of HPX that eventually decompose into a wide variety of products such as malondialdehyde, hexanal and 4-hydroxynonenal (Konigsberg, 2008). This repetitive process leads the membrane to lose its physicochemical properties and culminates with the cell death (Velázquez and Vega, 2004). In accordance with the above, or results

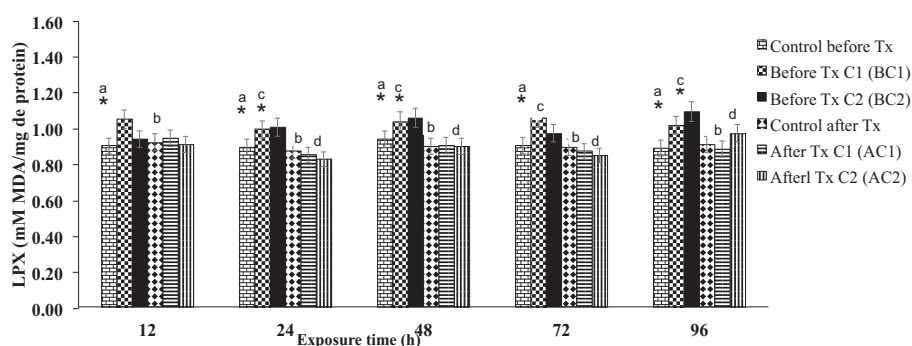


Fig. 2. Lipid peroxidation (LPX) in blood of *Cyprinus carpio* exposed to water contaminated with 17- β -estradiol (E2) [1 ng (C1) and 1 μ g (C2)] before its treatment, for 12, 24, 48, 72 and 96 h; and after its treatment (TiO₂/UV) at the same exposure times. The bars represent the average of three repetitions \pm standard deviation. MDA is malondialdehyde. Asterisk represent significantly different compared with the control ($*P < 0.05$, ANOVA and Bonferroni multiple comparison).

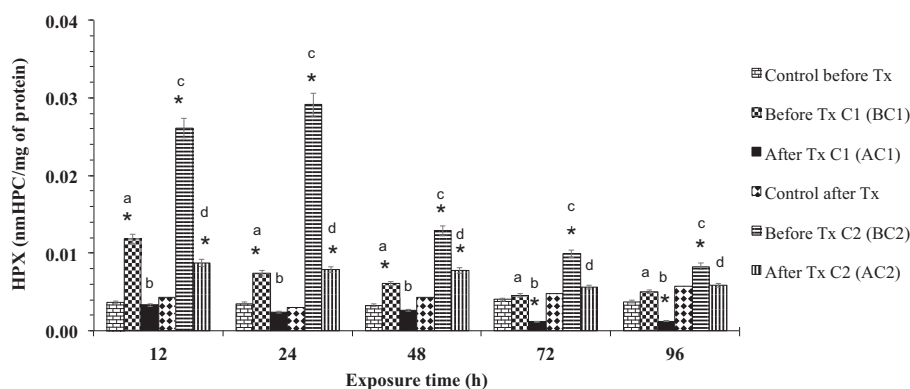


Fig. 3. Hydroperoxide content (HPC) in blood of *Cyprinus carpio* exposed to water contaminated with 17- β -estradiol (E2) [1 ng (C1) and 1 μ g (C2)] before its treatment, for 12, 24, 48, 72 and 96 h; and after its treatment (TiO₂/UV) at the same exposure times. The bars represent the average of three repetitions \pm standard deviation. CHP is cumene hydroperoxide. Asterisk represent significantly different compared with the control (* $p < 0.05$, ANOVA and Bonferroni multiple comparison).

(Fig. 3) also demonstrates a significant increase of hydroperoxide content in the blood of the common carp for both concentrations tested and at all exposure times. Hydroperoxides are formed at the stage of propagation of the LPX, when polyunsaturated fatty acids (linoleic, linolenic and arachidonic), are attacked due to its low energy of activation and high reactivity, forming the peroxidation of the lipids (Céspedes and Castillo, 2008). Other important biomolecules susceptible for oxidative damage are proteins, particularly side chains with cysteine and methionine residues are major targets for the oxidative action of reactive oxygen and nitrogen species (Stadtman, 2004). 4-Hydroxy-2-nonenal, a lipid peroxidation product, can also react with side chains of proteins resulting in the carbonylation of proteins (Nadkarni and Sayre, 1995). Our results (Fig. 4) show a significant increase in the protein carbonylation content in the blood of the common carp, evident for both concentrations.

Oxidative stress has been defined as the exposure of living matter to various sources that produce a rupture of the balance that must exist between pro-oxidant factors and antioxidant mechanisms responsible for eliminating these chemical species, either by a deficit of these defences or for an exaggerated increase in the production of ROS (Venero, 2002). For the toxicity assessment we also evaluate the activity of two antioxidant enzymes. SOD and CAT enzymes are two major biomarkers of oxidative damage that can be induced by various environmental pollutants under pro-oxidant conditions, initially increased to counter-attack oxidative stress but prolonged exposure causes their depletion, leading to oxidative damage to macromolecules, such as lipid peroxidation, protein and DNA damage (Bebiano et al., 2005). Our results (Figs. 5 and 6) show a significant increase in the activity of SOD and

CAT activity in the blood of the common carp, evident for both concentrations and at all exposure times.

The results obtained and mentioned until now, as a result of the exposure of the teleost fish to contaminated water with E2 are in accordance with previous published studies. Gutiérrez-Gómez et al. (2016) said that E2 can produce the phenomenon of oxidative stress in *C. carpio*, the organs of the fish affected with this process were, blood, brain, gills, kidney and liver; Thilagam et al., 2010 reported that estrogenic drug E2 induce an increment in the ROS, which consequently induce DNA alteration, lipid peroxidation and an increase of the glutathione enzyme in the hepatic tissue of the Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus*; Moura Costa et al., 2010, reported an increase in SOD and CAT activities in the liver of the silver catfish *Rhamdia quelen*; and Maria et al., 2008 reported an increase in lipid peroxidation and a decrease in DNA integrity in gills, blood and liver of the sea bass *Dicentrarchus labrax L* after its exposure to E2.

On a second part of this study, contaminated water with E2 was treated during 60 min with a heterogeneous photocatalytic process, using TiO₂ as a catalyst in ultraviolet light presence for the oxidation and remediation of the water from this estrogenic compound. After and during the treatment, samples were taken and analyzed by HPLC. Our results (Fig. 1) demonstrate that after 60 min, E2 was removed in a high percentage from the water. These results are in accordance with the previous studies which also report a high efficiency for the removal of E2 using advanced oxidation process as chlorination, ozonation and heterogeneous photocatalytic process (Alvarez-Corena et al., 2016; Kralchevska et al., 2012; Snyder et al., 2006; Moriyama et al., 2004; Hu et al., 2003; Ohko et al., 2002; Coleman et al., 2000). For the

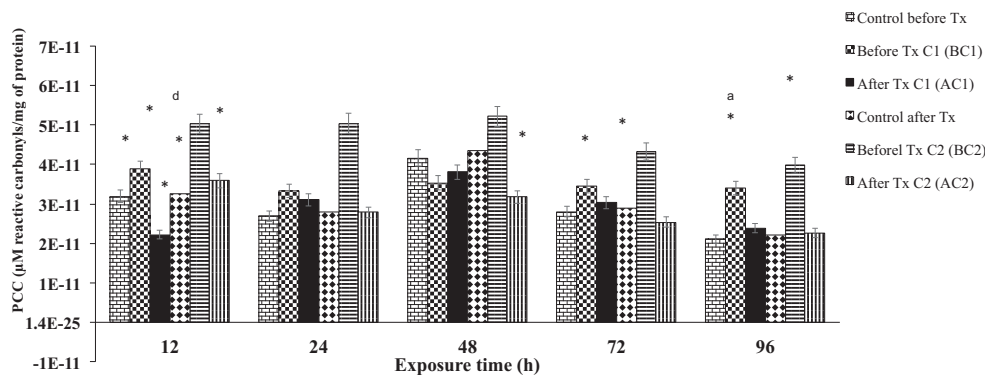


Figure 4. Protein carbonylated content (PCC) in blood of *Cyprinus carpio* exposed to water contaminated with 17- β -estradiol (E2) [1 ng (C1) and 1 μ g (C2)] before its treatment, for 12, 24, 48, 72 and 96 h; and after its treatment (TiO₂/UV) at the same exposure times. The bars represent the average of three repetitions \pm standard deviation. Asterisk represent significantly different compared with the control (* $p < 0.05$, ANOVA and Bonferroni multiple comparison).

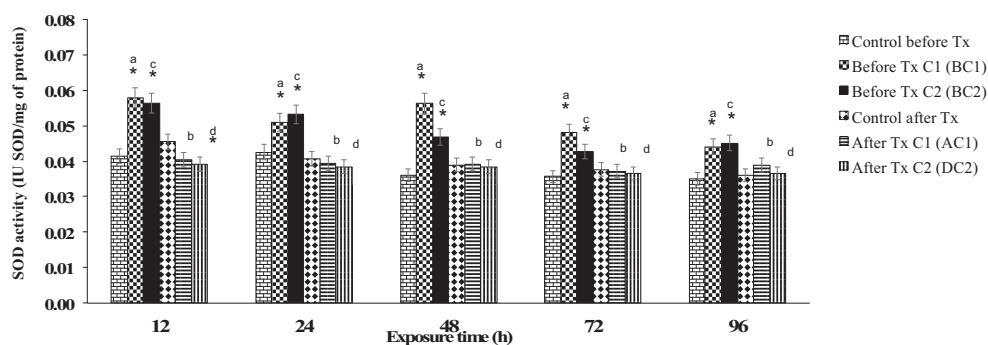


Figure 5. Superoxide dismutase (SOD) activity in blood of *Cyprinus carpio* exposed to water contaminated with 17- β -estradiol (E2) [1 ng (C1) and 1 μ g (C2)] before its treatment, for 12, 24, 48, 72 and 96 h; and after its treatment (TiO_2/UV) at the same exposure times. The bars represent the average of three repetitions \pm standard deviation. Asterisk represent significantly different compared with the control ($*p < 0.05$, ANOVA and Bonferroni multiple comparison).

purposes of our investigation we just focused on the remediation of E2 in the water and no metabolites were assessed on the HPLC technique.

Even though the advanced oxidation process we tested demonstrates to be efficient for the removal of E2, it is well known that during the process many secondary byproducts could be formed (Alvarez-Corena et al., 2016), even more, in some cases metabolites still have estrogenic activity and could be more toxic than parent compound or the oxidative conditions of the process per se could be harmful for aquatic organisms (Zhang et al., 2008; Irmak et al., 2005; Alum et al., 2004; Huber et al., 2004).

In this treatment, the maximum removal of E2 observed is about 85%. E2 removal kinetics it is typically reported to be of pseudo first order. In this case, however, two main kinetic stages can be distinguished in Fig. 1. A slow one that dominates during the first 20 min of reaction. After this time, reaction rate increases and a new slow down would be expected once E2 concentration is much lower. This third stage is not observed due to the analytical equipment limitation on detecting the E2 concentration beyond 60 min of treatment. The first stage can be related to an induction period that might depend on the reaction volume (14 L in this case) and therefore has not been reported previously. It is plausible that because of the large treated volume, at the beginning of treatment is the light acting while it takes some time for the oxidant species to be produced at the photocatalytic surface and transferred to the water where the E2 oxidation might be occurring. Hence, it is important to test its toxicity to be sure that the process is not only efficient but also friendly with the environment.

Likewise, we measured the concentration of E2 in water and blood of *C. carpio* at the two concentrations used and the different times of exposure and we observed that the concentration of E2 in water is decreasing with respect to time and in blood the drug is increasing. Also, it is observed in Table 1, that in the waters treated with the photocatalytic method no amount of E2 was identified neither in water and much

less in blood of the carp. It should be mentioned that in the chromatogram no additional peak was observed that made us suspect the presence of any of the metabolites of E2.

For the third and final part of this study, we exposed the common carp to the water treated with the photocatalytic process, and we measure the same biomarkers as in the first part for its subsequent contrast and comparison. Our results (Fig. 2) show a significant decrease in the degree of lipid peroxidation in the blood of the common carp compared with the previous results, evident for both concentrations at all times. In accordance with the above, or results (Fig. 3) also demonstrates a significant decrease of hydroperoxide content in the blood of the common carp for both concentrations tested, at all exposure times compared with the previous results. Furthermore, for C1 all HPX values calculated were below to the obtained for the controls and for C2, it reach the same level of the controls only until 96 h. Regarding with the protein carbonylation (Fig. 4), it is also evident a significant decrease of PCC in the blood of the common carp for both concentrations tested, at all exposure times compared with the previous results, except for C1 at 48 h. In like manner, the activity of the antioxidant enzymes SOD and CAT decreased in the blood of the common carp for both concentrations tested, at all exposure times compared with the previous results.

Results described above are in accordance with previous reports in literature using other biomarkers and under different advanced oxidation processes. Hu et al., 2003, report a decrease in estrogenic activity of a contaminated water after its aqueous chlorination using NaClO , likewise Ermawati et al., 2007; Alum et al., 2004 and Huber et al., 2004, reported a decrease in the estrogenic activity of a contaminated water after an ozonation process, finally Chen et al., 2007, reported a decrease in estrogenic activity of a contaminated water after its treatment using an $\text{UV}/\text{H}_2\text{O}_2$ process. Even though estrogenic activity and oxidative stress are two different biomarkers, both of them are interconnected, White et al., 2010, Mobley and Brueggemeier, 2004 report that

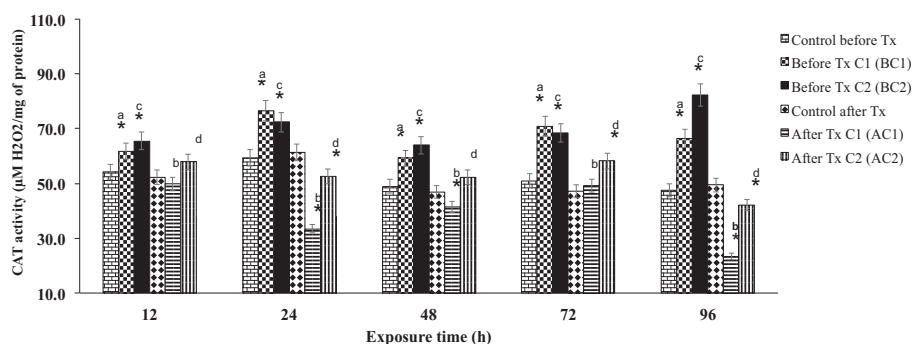


Fig. 6. Catalase (CAT) activity in blood of *Cyprinus carpio* exposed to water contaminated with 17- β -estradiol (E2) [1 ng (C1) and 1 μ g (C2)] before its treatment, for 12, 24, 48, 72 and 96 h; and after its treatment (TiO_2/UV) at the same exposure times. The bars represent the average of three repetitions \pm standard deviation. Asterisk represent significantly different compared with the control ($*p < 0.05$, ANOVA and Bonferroni multiple comparison).

E2 induce changes in antioxidant status by reducing the ability of cells to metabolize reactive oxygen species via an endocrine disruptor mediated mechanism.

5. Conclusions

The removal of E2 under the conditions used in the treatment was good, approximately 85%. The toxicity of the water added with E2 was reduced between 85 and 95% once it was treated by heterogeneous photocatalysis using TiO₂. This was demonstrated by the reduction of the values of the biomarkers of cellular oxidation and antioxidant activities, which practically reached basal levels.

References

- Ahmad, I., Maria, V.L., Pacheco, M., Santos, M.A., 2009. Juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses following 17 β -estradiol exposure. *Ecotoxicology* 18, 974–982.
- Alum, A., Yoon, P., Westerhoff, M., Abbaszadegan, M., 2004. Oxidation of bisphenol A, 17 β -estradiol, and 17 α -ethynylestradiol and byproduct estrogenicity. *Environ. Toxicol.* 19, 257–264.
- Alvarez-Corena, J.R., Bergendahl, J.A., Hart, F.L., 2016. Advanced oxidation of five contaminants in water by UV/TiO₂ reaction kinetics and byproducts identification. *J. Environ. Manag.* 181, 544–551.
- Arlos, M.J., Liang, R.T., Hatat-Fraile, M.M., Bragg, L.M., Zhou, N.Y., Servos, M.R., Andrews, S.A., 2016. Photocatalytic decomposition of selected estrogens and their estrogenic activity by UV-LED irradiated TiO₂ immobilized on porous titanium sheets via thermal-chemical oxidation. *J. Hazard. Mater.* 318, 541–550.
- Avilés-García, O., Espino-Valencia, J., Romero-Romero, R., Rico-Cerda, J.L., Arroyo-Albiter, M., Solís-Casados, D.A., Natividad-Rangel, R., 2018. Enhanced photocatalytic activity of titania by co-doping with Mo and W. *Catalysts* 8 (12), 631.
- Bebiano, M.J., Company, R., Serafim, A., Camus, L., Cosson, R.P., Fiala-Médoni, A., 2005. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol.* 75 (4), 354–373.
- Cavaliere, E., Frenkel, K., Liehr, J.G., 2000. Estrogens as endogenous genotoxic agents—DNA adducts and mutations. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 27, 75–93.
- Céspedes, M.E., Castillo, H.J., 2008. Lipid peroxidation for the diagnosis of oxidative stress on hypertensive patient. Reality or myth? *Rev. Cuba. Investig. Biomed.* 27 (2), 1–13.
- Chen, P.J., Rosenfeldt, E.J., Kullman, S.W., 2007. Biological assessments of a mixture of endocrine disruptors at environmentally relevant concentrations in water following UV/H₂O₂ oxidation. *Sci. Total Environ.* 376, 18–26.
- Coleman, H.M., Eggins, B.R., Byrne, J.A., Palmer, F.L., King, E., 2000. Photocatalytic degradation of 17 β -oestradiol on immobilised TiO₂. *Appl. Catal. B Environ.* 24 (1), L1–L5.
- Dai, Y., Liu, C.C., 2017. Detection of 17 β -estradiol in environmental samples and for health care using a single-use, cost-effective biosensor based on differential pulse voltammetry (DPV). *Biosensors* 7 (2), 15.
- Díaz-Torres, E., Gibson, R., González-Farías, Zarco-Arista, A.E., Mazari-Hiriari, M., 2013. Endocrine disruptors in the Xochimilco Wetland, Mexico City. *Water Air Soil Pollut.* 224, 1–11.
- Durán, A., Monteagudo, J.M., San Martín, I., 2018. Operation costs of the solar photocatalytic degradation of pharmaceuticals in water: a mini-review. *Chemosphere* 211, 482–488. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.170>.
- Ermawati, R., Morimura, S., Tang, Y.Q., Liu, K., Kida, K., 2007. Degradation and behavior of natural steroid hormones in cow manure waste during biological treatments and ozone oxidation. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 27–31.
- Ferguson, P., Iden, C., McElroy, A., Brownawell, B., 2001. Determination of steroid estrogens in wastewater by immunoaffinity extraction coupled with HPLC-electrospray-MS. *Anal. Chem.* 73 (16), 3890–3895.
- Guengerich, F.P., 1990. Metabolism of 17 α -ethynylestradiol in humans. *Life Sci.* 47, 1981–1988.
- Gutiérrez-Gómez, A.A., San Juan-Reyes, N., Galar-Martínez, M., Dublán-García, O., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Pérez-Alvárez, I., Gómez-Oliván, L.M., 2016. 17 β -Estradiol induced oxidative stress in gill, brain, liver, kidney and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Electron. J. Biol.* 12 (1), 53–63.
- Hu, J., Cheng, S., Aizawa, T., Terao, Y., Kunikane, S., 2003. Products of aqueous chlorination of 17 β -estradiol and their estrogenic activities. *Environ Sci Technol.* 37 (24), 5665–5670.
- Huber, M.M., Ternes, T., Gunten, U.V., 2004. Removal of estrogenic activity and formation of oxidation products during ozonation of 17 α -ethynylestradiol. *Environ Sci Technol.* 38 (5), 177–186.
- Hurtado, L., Romero, R., Mendoza, A., Brewer, S., Donkor, K., Gómez-Espinosa, R.M., Natividad, R., 2018. Paracetamol mineralization by photo Fenton process catalyzed by a Cu/Fe-PILC under circumneutral pH conditions. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 373, 162–170.
- Irmak, S., Erbarut, O., Akgerman, A., 2005. Degradation of 17 β -estradiol and bisphenol A in aqueous medium by using ozone and ozone/UV techniques. *J. Hazard. Mater.* 126, 54–62.
- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, T., Turner, A.P., 2004. Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquat. Toxicol.* 65, 205–220.
- Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Yamaguchi, T., Maeda, M., Nobuyoshimada, Tadakoro, H., Honjo, T., 2002. Effect of 17 β -estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 47, 71–80.
- Konigsberg, M., 2008. Free radicals and oxidative stress. *Aplicaciones Médicas*. 1. Editorial El Manual Moderno, pp. 501–524.
- Kralchevska, R., Milanova, M., Bistan, M., Pintar, A., Todorovsky, D., 2012. The photocatalytic degradation of 17 α -ethynylestradiol by pure and carbon nanotubes modified TiO₂ under UVC illumination. *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (4), 1137–1148.
- Lei, B., Kang, J., Yu, Y., Jimmiao, Z., Li, W., Wang, Z., 2013. 17 β -estradiol-valerate affects embryonic development and sexual differentiation in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 134, 128–134.
- Martín del Campo, E., Valente, J., Pavón, T., Romero, R., Mantilla, A., Natividad, R., 2011. 4-chlorophenol oxidation photocatalyzed by a calcined Mg-Al-Zn layered double hydroxide in a concurrent downflow bubble column. *Ind. Eng. Chem. Res.* 50 (20), 11544–11552.
- Mirzaei, A., Chen, Z., Haghighat, F., Yerushalmi, L., 2017. Removal of pharmaceuticals from water by homo/heterogeneous Fenton-type processes – a review. *Chemosphere* 174, 665–688.
- Mobley, J.A., Brueggemeier, R.W., 2004. Estrogen receptor-mediated regulation of oxidative stress and DNA damage in breast cancer. *Carcinogenesis* 25 (1), 3–9.
- Moriyama, K., Matsufuji, H., Chino, M., Takeda, M., 2004. Identification and behavior of reaction products formed by chlorination of ethynylestradiol. *Chemosphere* 55 (6), 839–847.
- Moura Costa, D.D., Filipak Neto, F., Costa, M.D.M., Morais, R.N., García, J.R.E., Esquivel, B.M., Oliveira Ribeiro, C.A., 2010. Vitellogenesis and other physiological responses induced by 17 β -estradiol in males of freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 151, 248–257.
- Murgolo, S., Moreira, I.S., Piccirillo, C., Castro, P.M.L., Ventrella, G., Cocozza, C., Mascolo, G., 2018. Photocatalytic degradation of diclofenac by hydroxyapatite-TiO₂ composite material: identification of transformation products and assessment of toxicity. *Materials* 11 (9). <https://doi.org/10.3390/ma11091779>.
- Nadkarni, D.V., Sayre, L.M., 1995. Structural definition of early lysine and histidine adduction chemistry of 4-hydroxynonenal. *Chem. Res. Toxicol.* 8 (2), 84–291.
- Nasu, M., Goto, M., Kato, H., Oshima, Y., Tanaka, H., 2001. Study on endocrine disrupting chemicals in wastewater treatment plants. *Water Sci. Technol.* 43 (2), 101–108.
- NOM-062-Z00, 1999. Official Norm Setting the Technical Specifications for the Production, Care and Use of Laboratory Animals. Ministry of Agriculture, Livestock, Rural Development, Fisheries and Food. *Diario Oficial de la Federación, Mexico DF* (09 October 2001).
- Oğuz, A.R., Kankaya, E., 2013. Determination of selected endocrine disrupting chemicals in Lake Van, Turkey. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 91, 283–286.
- Ohko, Y., Iuchi, K.I., Niwa, C., Tatsuma, T., Nakashima, T., Iguchi, T., Kubota, Y., Fujishima, A., 2002. 17 β -Estradiol degradation by TiO₂ photocatalysis as a means of reducing estrogenic activity. *Environ Sci Technol.* 36 (19), 4175–4181.
- Robinson, C.D., Brown, E., Craft, J.A., Davies, M., Colin, M., Colin, M., Colin, F.M., 2007. Bioindicators and reproductive effects of prolonged 17 β -oestradiol exposure in a marine fish, the sand goby (*Pomatoschistus minutus*). *Aquat. Toxicol.* 81, 397–408.
- Rosales, E., Díaz, S., Pazos, M., Sanromán, M.A., 2019. Comprehensive strategy for the degradation of anti-inflammatory drug diclofenac by different advanced oxidation processes. *Sep. Purif. Technol.* 208, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2018.04.014>.
- Rose, J., Holbech, H., Lindholm, C., Norum, U., Povlsen, A., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., 2002. Vitellogenin induction by 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol in male zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 131, 531–539.
- Singh, S.P., Azua, A., Chaudhary, A., Khan, S., Willett, K.L., Gardinal, P.R., 2010. Occurrence and distribution of steroids, hormones and selected pharmaceuticals in South Florida coastal environments. *Ecotoxicology* 19, 338–350.
- Snyder, S., Wert, E., Rexing, D., Zegers, R., Drury, D., 2006. Ozone oxidation of endocrine disruptors and pharmaceuticals in surface water and wastewater. *Ozone Sci. Eng.* 28 (6), 445–460.
- Šojić Merkulov, D.V., Despotović, V.N., Banić, N.D., Armaković, S.J., Finčur, N.L., Lazarević, M.J., Četojević-Simin, D.D., Orčić, D.Z., Radoičić, M.B., Šaponjić, Z.V., Čomor, M.I., Abramović, B.F., 2018. Photocatalytic decomposition of selected biologically active compounds in environmental waters using TiO₂/polyaniline nanocomposites: kinetics, toxicity and intermediates assessment. *Environ. Pollut.* 239, 457–465. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.039>.
- Stadtman, E.R., 2004. Role of oxidant species in aging. *Curr. Med. Chem.* 11 (9), 1105–1112.
- Sumpter, J.P., Johnson, A.C., 2005. Lessons from endocrine disruption and their application to other issues concerning trace organics in the aquatic environment. *Environ Sci Technol.* 39 (12), 4321–4332.
- Thilagam, H., Gopalakrishnan, S., Qu, H.D., Bo, J., Wang, K.J., 2010. 17 β estradiol induced ROS generation, DNA damage and enzymatic responses in the hepatic tissue of Japanese sea bass. *Ecotoxicology* 19 (7), 1258–1267.
- Thomas-Jones, E., Thorpe, K., Harrison, N., Thomas, G., Morris, C., Hutchinson, T., Woodhead, S., Tyler, C., 2003. Dynamics of estrogen biomarker responses in rainbow trout exposed to 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol. *Environ. Technol.* 22, 3001–3008.
- Tran, M.L., Fu, C.C., Juang, R., 2019. Effects of water matrix components on degradation efficiency and pathways of antibiotic metronidazole by UV/TiO₂ photocatalysis. *J. Mol. Liq.* 276, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.11.155>.
- Valdés, M.E., Marino, D.J., Wunderlin, D.A., Somoza, G.M., Ronco, A.E., Carriquiriborde, P., 2015. Screening concentration of E1, E2 and EE2 in sewage effluents and surface waters of the “Pampas” region and the “Río de la Plata” estuary (Argentina). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94 (1), 29–33.

- Velázquez, V.E., Vega, C.M., 2004. Fish as bioindicators of the health of the aquatic environment. *Biodiversitas*. 57, 12–15.
- Venero, G.J.R., 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev. Cuba. Med. Mil.* 31 (2), 126–133.
- White, R., Gerrity, R., Barman, S., Han, G., 2010. Estrogen and oxidative stress: a novel mechanism that may increase the risk for cardiovascular disease in women. *Steroids* 75 (11), 788–793.
- Yap, H.C., Pang, Y.L., Lim, S., Abdullah, A.Z., Ong, H.C., Wu, C., 2019. A comprehensive review on state-of-the-art photo-, sono-, and sonophotocatalytic treatments to degrade emerging contaminants. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 16 (1), 601–628. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1961-y>.
- Zhang, Y., Zhou, J.L., Ning, B., 2007. Photodegradation of estrone and 17beta-estradiol in water. *Water Res.* 41 (1), 19–26.
- Zhang, H., Yamada, H., Tsuno, H., 2008. Removal of endocrine-disrupting chemicals during ozonation of municipal sewage with brominated byproducts control. *Environ Sci Technol.* 42 (9), 3375–3380.