



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO**

---

**“ Influencia de la exposición de acesulfame potásico en  
Carpa Común (*Cyprinus Carpio*) y su relación con las  
modificaciones de las propiedades fisicoquímicas y texturales de la  
carne de la carpa ”.**

**TESIS**

**Que para obtener el título de  
Doctorado en Ciencias Químicas**

**Presenta:**

**M. en C.Q Claudia Cruz Rojas**

**Asesor académico: Dr. Leobardo Manuel Gómez Olivan**

**Asesor adjunto: Dr. Octavio Dublán García**

**Asesor adjunto: Dra. Ma. Paulina Aideé Gracia Fuentes Benites**

## Índice

Índice .....	4
RESUMEN .....	6
Abstract .....	7
1 Antecedentes.....	8
1.1 Edulcorantes .....	8
1.2 Radicales libres .....	13
1.3 Fuentes biológicas de RL.....	15
1.4 Toxicidad de los RL.....	17
1.5 Sistemas de defensa biológica contra los RL.....	18
2 Antioxidantes .....	20
2.1 Métodos de evaluación del estrés oxidativo.....	22
2.2 Determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre biomoléculas.....	23
2.3 Medición de la concentración de antioxidante .....	23
2.4 Medición del estado oxidativo .....	23
3 Introducción .....	30
4 Justificación .....	33
5 Objetivos .....	36
5.1 General.....	36
5.2 Específicos .....	36
6 Hipótesis.....	37
7 Materiales y métodos.....	38
7.1 <i>Colecta y mantenimiento de la carpa (Cyprinus carpio)</i> .....	38
7.2 Medición pH (Método NMX-F-317- S-1978 "Determinación de pH en Alimentos").....	38
7.3 Capacidad de retención de agua (CRA). Método Honikel&Hamm (1983), reportado en (Dublán- G O.; 2006). .....	38
7.4 Solubilidad.....	39
7.5 Determinación de grupos disulfuro y sulfhídrido totales. ....	39

7.6	Identificación de proteínas.....	39
7.6.1	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Método Laemmli (1970), reportado en (Dublán- G O.; 2006).....	39
7.6.2	Concentración de proteína. ....	40
7.6.3	Formación de gel. ....	40
7.6.4	Capacidad emulgente (CE). Método Zorba, reportado en (Dublán- G O.; 2006).40	
7.7	Análisis de textura. Método García (Dublán- G O.; 2006). ....	40
7.8	Estrés oxidativo.....	41
7.9	Colecta y mantenimiento de la carpa (Cyprinus carpio) .....	41
7.10	Evaluación del estrés oxidativo.....	41
7.11	Determinación de LPX.....	42
7.12	Determinación de HPC .....	43
7.13	Determinación de PCC .....	43
7.14	Determinación de la actividad de SOD.....	44
7.14.1	Deslipidación de la muestra .....	44
7.14.2	Preparación del blanco .....	44
7.14.3	Muestra .....	45
7.15	Determinación de la actividad de CAT .....	45
8	Conclusiones generales.....	46
	ARTICULOS.....	48
	Carta de envío .....	49
	Conclusiones generales .....	75
	Perspectivas.....	76
	Referencias .....	77

## Agradecimientos

A Dios por que sin él nada de esto hubiera sido posible.

A mis padres, quienes a lo largo de toda mi vida han apoyado y motivado mi formación académica, a mis hermanos por su apoyo incondicional

## Dedicatoria

A mis tutores, a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias por prepararme para un futuro competitivo no solo como los mejores profesionales sino también como mejores personas

Dedico este trabajo de tesis a Dios y a mis padres, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación porque han estado siempre a mi lado en cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar, siendo en cada momento mi soporte.

## RESUMEN

El acesulfame de potasio (ACS) es un edulcorante ampliamente utilizado en todo el mundo. Su presencia ha sido demostrada en diversos cuerpos de agua. Sin embargo, los efectos perjudiciales que esto causa en los organismos acuáticos aún no se han identificado, lo que genera controversia con respecto a los riesgos que representa ACS después de su eliminación en los cuerpos de agua. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar si la exposición de ACS en concentraciones ambientalmente relevantes era capaz de producir estrés oxidativo en sangre, hígado, branquia, cerebro y músculo de carpa común (*Cyprinus carpio*). Con esta finalidad, la carpa se expuso a dos concentraciones ambientalmente relevantes (0.05 y 149  $\mu\text{gL}^{-1}$ ) a diferentes tiempos de exposición (12, 24, 48, 72 y 96 h), teniendo controles en las mismas condiciones para cada tiempo de exposición. Posteriormente, se evaluaron los siguientes biomarcadores de daño: contenido de hidroperóxido (HPC), nivel de lipoperoxidación (LPX) y contenido de proteína carbonilo (PCC), así como la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Los resultados mostraron que el SCA produce un aumento significativo en los biomarcadores de daño evaluados en todos los órganos, principalmente en las branquias, el cerebro y el músculo, así como cambios significativos en la actividad de las enzimas antioxidantes en los mismos órganos. Por lo tanto, se concluye que ACS es capaz de producir estrés oxidativo en la carpa común (*Cyprinus carpio*).

## Abstract

Acesulfame potassium (ACS) is a widely-used sweetener worldwide. Its presence has been demonstrated in diverse bodies of water. However, the deleterious effects this causes in aquatic organisms has not yet been identified, which generates controversy concerning the risks that ACS represents after its disposal into the bodies of water. Thus, the objective of this work was to evaluate if the exposure of ACS in environmentally-relevant concentrations was capable of producing oxidative stress in blood, liver, gill, brain and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). With this finality, the carp were exposed to two environmentally-relevant concentrations (0.05 and 149  $\mu\text{gL}^{-1}$ ) at different exposure times (12, 24, 48, 72 and 96 h), having controls in the same conditions for each exposure time. Posteriorly, the following biomarkers of damage were evaluated: hydroperoxide content (HPC), level of lipoperoxidation (LPX) and protein carbonyl content (PCC), as well as the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). The results showed that ACS produces significant increase in damage biomarkers evaluated in all organs, mainly in gill, brain and muscle, as well as significant changes in the activity of antioxidant enzymes in the same organs. Thus, it is concluded that ACS is capable of producing oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*).

# 1 Antecedentes

## 1.1 Edulcorantes

Los edulcorantes, hacen referencia a aquel aditivo alimentario que es capaz de mimetizar al efecto dulce del azúcar y que, habitualmente, aporta menos energía. Algunos de ellos son extractos naturales mientras que otros son sintéticos (Anderson y col., 2012). Son utilizados como sustitutos de azúcar en cantidades considerables y cada vez más en los alimentos y bebidas, especialmente para aquellos que son diabéticos o padecen obesidad. También se han utilizado en otro tipo de productos como farmacéuticos y productos de cuidado personal tales como las pastas dentales. Aunque desde el comienzo de su uso, ha habido controversias sobre sus riesgos como carcinógenos potenciales (Weihrauch y Diehl, 2004), estos edulcorantes son generalmente considerados como seguros para su uso en los productos alimenticios (Kroger y col., 2006). Parte de la baja en calorías los edulcorantes actualmente autorizados por las diferentes autoridades internacionales como aditivos alimentarios directos incluyen al acesulfame y la sucralosa (EU, 2008; EE.UU. FDA, 2007).

En 1967 Karl Class y Harold Jensen del Laboratorio Hoechst A.G., trabajando con acetileno en la reacción de fluorosulfonilisocianato obtuvieron un producto con características dulces al que llamaron acesulfamo. La sal de potasio de este compuesto es conocida como acesulfamo-K y en el mercado lleva el nombre "Sunette" (Sunett Div., Hoechst Celanese Corp, Semerst N.J.) Presenta sabor metálico y amargo a altas concentraciones, pero el umbral de percepción del sabor amargo puede depender del contenido particular del sistema alimenticio en que se encuentra. Se ha informado que la población es heterogénea con



respecto a la sensibilidad del resabio amargo y metálico del acesulfamo K de la misma forma como se ha notado para la sacarina. En 1988 el acesulfamo fue aprobado en Estados Unidos para su uso en tabletas, en goma de mascar y mezcla de bebidas deshidratadas. Es 200 veces más dulce que la sacarosa, presenta una gran estabilidad en el tiempo, temperatura y pH, es fácilmente soluble en agua y de uso efectivo en varios alimentos. Es empleado en conjunción con otros edulcorantes, mezclas acesulfamo: aspartamo 1:1, acesulfamo: ciclamato 1:1, observándose efecto sinergista en la percepción del sabor. La FDA estableció un valor de IDA de 15 mg/Kg de peso corporal. La JECFA, luego de una revisión, estableció un valor de IDA de 9 mg/Kg de peso corporal. La diferencia entre los valores de IDA se deben a que JECFA utiliza un valor de NOEL de 900 mg/Kg, para la cual la especie más sensible es la rata, mientras que la FDA usa un valor de 1500 mg/Kg empleando al perro como especie más sensible. La seguridad del acesulfamo-K ha sido investigada en más de 50 estudios internacionales, los que muestran que este producto no produce efectos tóxicos. El acesulfamo-K cuya denominación química es *5,6 dimetil 1,2,3 oxatiacina-4(3H) uno 2-2 dióxido* presenta gran estabilidad en el tiempo, temperatura y pH, siendo además fácilmente soluble en agua. Sin embargo, la degradación del acesulfamo K incluye al ácido acetoacetarnida N-sulfónico, la acetoacetarnida, el ácido acetoacético y la acetona.

Los azúcares epidemiológicamente se asocian con obesidad, diabetes, enfermedades cardiovasculares, etc. (Malik y col., 2011). El consumo elevado de carbohidratos lleva a una sobreproducción crónica de insulina, y esto conduce a resistencia a la misma y subsecuentemente hiperglicemia, inflamación y estrés oxidativo crónico (Monnier 2006 y Hu F.B. y col., 2001), que desemboca en síndrome metabólico

(hipertrigliceridemia, hipertensión, hiperinsulinemia, hiperglicemia) y finalmente en diabetes.

Los edulcorantes artificiales suelen ser subproductos químicos de algún aminoácido, cuya particularidad es ser mucho más endulzantes que el azúcar (la sacarina tiene 300 veces más poder endulzante y la sucralosa 600)

A nivel práctico, el exponencial aumento de su consumo ha ido paralelo al aumento de peso de la población. Esta asociación se analiza desde dos perspectivas: relación causal por efecto bioquímico, o relación de efecto debida al comportamiento. Epidemiológicamente, se ha relacionado el consumo de edulcorantes con obesidad, diabetes, enfermedad cardiovascular, tumores, osteoporosis, fallo renal, hipertensión, mayor mortalidad entre sus consumidores, erosión dental, etc. Estudios en modelos animales muestran un aumento de distintos tipos de cáncer. A nivel de laboratorio, se ha mostrado que distintos edulcorantes tienen capacidad clastogénica induciendo daño en el ADN en cultivos de células. Y en ensayos clínicos en humanos, se ha encontrado que los edulcorantes son insulínogénicos y elevan los niveles de glucosa en sangre.

Los edulcorantes son insulínogénicos y elevan los niveles de azúcar en sangre. (Ferland, Brassard y col., 2007) investigaron el efecto del aspartame en los niveles sanguíneos de glucosa en diabéticos tipo II. El desayuno endulzado con aspartame indujo una subida en los niveles de azúcar e insulina similares a los de la comida endulzada con azúcar. Se encontró en ratas que el consumo de sucralosa, aspartamo y sacarina aumentan la secreción de insulina. Lo mismo se ha encontrado con Acesulfame K y con sacarina. En la Convención anual de la Asociación Americana de

Diabetes, se presentó recientemente un estudio en el que se muestra que casi el 70% de los ratones que consumieron aspartamo en su dieta desarrollaron hiperglicemia en pocas semanas, más del doble que los ratones que consumieron comida sin aspartame. Y epidemiológicamente, Nettleton 2009, encontró que la gente que consume un refresco light diario tiene un 67% de riesgo mayor de padecer diabetes.

(Mohamad Al-Saleh y col., 2011) informó que el receptor del gusto dulce T1R2/R3 se encuentra en la superficie de las células beta pancreáticas, por lo que investigaron los efectos de los edulcorantes artificiales en la secreción de insulina, especies reactivas de oxígeno (ERO's), y consumo de oxígeno. La sucralosa, aspartamo, y sacarina aumentó la secreción de insulina basal en islotes de rata después de 30 min de incubación estática en soluciones que contienen edulcorante 2,5 mM.

Debido a las actividades antropogénicas estos compuestos pueden ingresar al medio ambiente a través de descargas municipales e industriales. El incremento de éstos en ambientes acuáticos ocasiona muchos efectos deletéreos en los organismos como: alteraciones en el ciclo de vida, el crecimiento y la reproducción además de diversas manifestaciones en organismos centinelas y endémicos de los ambientes señalados. Existe evidencia de que muchos de estos productos son persistentes en el ambiente y pueden llegar a las aguas superficiales y subterráneas, produciendo impactos en los organismos acuáticos. Muchas de estas sustancias son encontradas en aguas superficiales y en el subsuelo en concentraciones que van en magnitudes microgramos por litro ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

La principal forma de eliminar estos residuos es a través de una eficiente remoción durante el tratamiento de las aguas residuales haciendo uso de combinaciones de procesos de oxidación avanzada, es importante resaltar que los métodos convencionales empleados en el tratamiento de

aguas residuales, no eliminan estos contaminantes.

Cabe hacer mención que los contaminantes emergentes, como los productos farmacéuticos, productos de cuidado personal y aditivos alimentarios, están recibiendo una atención considerable con respecto a su destino ambiental y propiedades toxicológicas (Brooks y col., 2009; Ankley y col., 2007). Mientras que tener una larga tradición de aditivos alimentarios seguros, los edulcorantes artificiales son una nueva clase reconocida de contaminantes ambientales debido a su persistencia extrema y presencia en todas partes en diversos ecosistemas acuáticos. Resistente a la depuración de procesos de aguas residuales, que se introducen continuamente en los ambientes acuáticos. Hasta la fecha, su comportamiento medioambiental, el destino, así como las contribuciones ecotoxicológicas a largo plazo en nuestros recursos hídricos sigue siendo en gran parte desconocido (Ziye y col., 2013). Esta exposición constante al medio ambiente sugiere que se necesitan estudios ecotoxicológicos para evaluar plenamente los riesgos ambientales de los contaminantes emergentes. Además muchos de estos productos químicos han sido probados extensamente en los sistemas mamíferos, en los que los datos pueden ser utilizados como guía para los estudios de los sistemas en peces (Winter y col, 2009; Huggett y col, 2005.; Huggett y col., 2003).

Ziye en 2013 estudió los edulcorantes artificiales como: acesulfame, ciclamato, sacarina y sucralosa en un sistema de costa abierta. Presentándose mayor incidencia de acesulfame (0.22mg/L) y la sucralosa (0.05mg/L) en verano, mientras que la sacarina (0.11mg/L) y ciclamato (0.10mg/L) en invierno. Observaciones estacionales de los cuatro edulcorantes sugieren fuertes conexiones con la resistencia química variables entre los diferentes edulcorantes. Su investigación demuestra que tanto el acesulfame como la sucralosa resisten la fotodegradación, por lo

que proyecta aún más el impacto potencial de estos dos compuestos, que son persistentes bajo una exposición de irradiación solar intensiva. El acesulfame es uno de los productos más persistentes a la fotodegradación de 575mg/L y la sucralosa de 17.1mg/L. la comparación de los resultados por fotodegradación directa sugiere que la fototoxicidad puede afectar los ecosistemas acuáticos. Por lo que su presencia podría causar la formación de los radicales libres.

## 1.2 Radicales libres

Se consideran Radicales Libres (RL) aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Es una entidad química que contrario a la normal tendencia espontánea de los electrones localizados en los átomos y moléculas a la formación de parejas es desapareado. Esto lo hace muy inestable, extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de estructura celular; carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos. (Halliwell B y col., 1989)

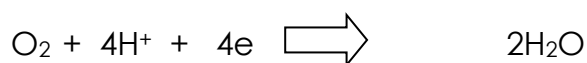
Los RL son elaborados continuamente como un producto del metabolismo normal de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de atrapamiento). Son componentes normales de células y tejidos, existiendo una poza de RL particular en cada estirpe celular y en algunos tipos celulares permiten la mejor adaptación de su hábitat.

Al elevarse o disminuir las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno (EROS) puede acarrear importantes alteraciones

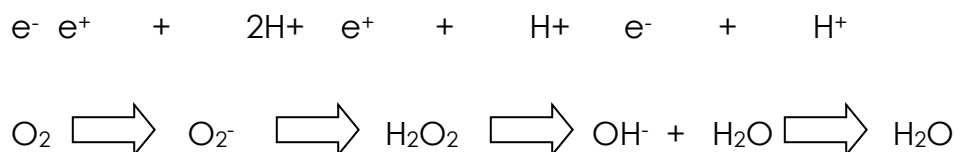
funcionales. La aterosclerosis, el envejecimiento y el cáncer por citar algunos ejemplos, son un tercio de la enorme lista de problemas fisiológicos y padecimientos que de alguna manera se asocia con una elevada poza histórica de RL. (Freeman B Ay col., 1982)

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es fundamentalmente birradical ya que tiene 2 electrones no apareados en su orbital externo, ambos con el mismo giro paralelo impidiendo que capte 2 electrones simultáneamente en las reacciones que interviene. El oxígeno solo puede intervenir en reacciones univalentes y aceptar los electrones de uno en uno.

La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua por acción del complejo citocromo-oxidasa (citocromo A+a3) de la cadena respiratoria mitocondrial, según la reacción global siguiente:



Por razones anteriores, la reacción se hace en 4 pasos univalentes:



$e^-$  = electrón

$H^+$  = hidrogenoides

$O_2^-$  = radical anión superóxido

Estos intermediarios señalados quedan unidos al sitio activo de la

citocromo-oxidasa y no difunden al resto de la célula en condiciones normales. En la molécula de  $O_2$  se genera por su reducción parcial las especies reactivas siguientes: (Reilly PM y col., 1989)

$O_2^-$  = anión superóxido

$OH\cdot$  = radical hidroxilo

$H_2O_2$  = peróxido de hidrógeno

$*O_2$  = oxígeno singlete

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) no es estrictamente un RL pero por su capacidad de generar el  $OH\cdot$  en presencia de metales como el hierro, se le incorpora como tal.

La sangre, fluido biológico compuesto por eritrocitos, leucocitos y plaquetas como elementos celulares, cumple entre otras funciones la de transportar el oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos, es aquí donde este actúa como sustrato en diversas reacciones bioquímicas intracelulares y como resultado se desencadena una gran producción de  $H_2O_2$  y superóxido, entre otras ERO's.

### 1.3 Fuentes biológicas de RL

La **mitocondria** constituye la fuente principal de RL. Este fenómeno se efectúa a nivel de la cadena de transporte de electrones, que es la última etapa de producción de protones de alta energía, y cuyo pasaje a través de la membrana interna mitocondrial genera un gradiente eléctrico que aporta la energía necesaria para formar el ATP o adenosina trifosfato.

En este proceso de fosforilación oxidativa el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, adquiriendo en más del 95% de estas reacciones un total de 4 electrones de moléculas con producción de 2 moléculas de agua. Una consecuencia directa de este proceso es que entre los nutrientes iniciales y la generación de energía al final del proceso, se forman varias moléculas con diferente grado de oxidación. Algunas de ellas pueden entregar 1 ó 2 electrones al oxígeno y producir intermediarios parcialmente reducidos que son los RL. (Turrens J., 1994)

Otras fuentes son los **peroxisomas**, organelas del citosol muy ricas en oxidasas y que generan  $H_2O_2$ , el cual es depurado por enzimas específicas (catalasas) y transformado en agua.

Los **leucositos** poliforonucleares constituyen una fuente importante, cuando se activan por diversas proteínas que actúan específicamente sobre ellas (complemento, interleukinas, etc). Los leucocitos poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa generadora de  $O_2^-$  que en presencia de hierro se transforma en el altamente tóxico  $OH^-$ . Esta situación se da particularmente en los procesos inflamatorios. (Market M. y col., 1984)

La enzima xantina deshidrogenasa predomina en los endotelios, normalmente depura las xantinas (isquemia, estimulación del  $Ca^{+2}$ , etc), genera  $O_2^-$ .

Se puede apreciar, por lo tanto, que los RL se forman en condiciones fisiológicas en proporciones controlables. En situaciones patológicas esta producción se incrementa sustancialmente, ingresándose al estado de estrés oxidativo.



Los factores que llevan a esta situación son:

**Químicos:** aumento de metales pesados, xenobioticos, componentes del tabaco.

**Drogas:** adrimicina

**Físicos:** radiaciones ultravioleta, hiperoxia

**Orgánicos y metabolitos:** dieta hipercalórica, dieta insuficiente en antioxidantes, diabetes, procesos inflamatorios y traumatismo, fenómenos de isquemia – reperfusión y ejercicios extenuantes.

#### 1.4 Toxicidad de los RL

En 1954 una investigación argentina, Rebeca Gerschman, sugirió por primera vez que los RL eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades. (Gerschman R., 1954)

Por la alta inestabilidad atómica de los RL colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. Si se trata de los lípidos ácidos grasos poliinsaturados), se dañan las estructuras ricas en ellas como las membranas celulares y las lipoproteínas. En las primeras se altera la permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular y en la segunda, la oxidación de la LDL, génesis de la placa ateromatosa.

Las características de la oxidación lipídicas por los RL, tratan de una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse, se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina.

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

el estrés oxidativo.

En caso de las proteínas se oxidan preferentemente los aminoácidos (fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina) y como consecuencia se forman entrecruzamiento de cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos e impiden el normal desarrollo de sus funciones (transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares, enzimas que regulan el metabolismo celular, etc). (Oteisa P.A., 1995)

Otra molécula que es dañada por los RL es el ADN; el daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, lo que tiene serias consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte, o la pérdida de expresión por daño al gen específico.

El daño a biomoléculas que determinan los RL se haya implicado en la génesis o exacerbación de numerosos procesos:

**Aparato cardiovascular:** aterosclerosis, infarto del miocardio, cirugía cardíaca, diabetes, cardiopatía alcohólica.

**Sistema neurológico:** enfermedad de Parkinson, Alzheimer, neuropatía alcohólica, hiperoxia, isquemia o infarto cerebral, traumatismo craneales.

**Aparato respiratorio:** distrés respiratorio (síndrome de dificultad respiratorio del adulto), tabaquismo, cáncer de pulmón, enfisema.

**SOMA:** artritis reumatoidea

**Riñón:** síndrome autoinmune, nefrotoxicidad por metales.

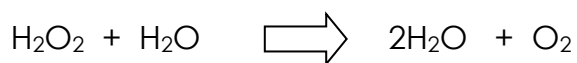
## 1.5 Sistemas de defensa biológica contra los RL

La vida en presencia del oxígeno molecular exige contar con una batería múltiple de defensa contra los diversos RL de oxígeno, que por un lado tiendan a impedir su formación y por otro, los neutralicen una vez formados. Estas defensas se efectúan en cinco niveles:

**Primer nivel:** consiste en editar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar la reducción tetravalente consecutiva sin liberar los intermediarios parcialmente reducidos. Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo – oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial responsable de más de 90% de la reducción del oxígeno en el organismo humano.

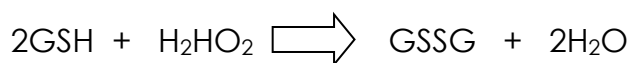
**Segundo nivel:** lo constituyen enzimas especializadas en captar el radical anión superóxido ( $O_2^-$ ). Estas son las superóxido dismutasa (SOD), metaloenzima que catalizan la dismutación del radical anión superóxido para dar oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, con una eficiencia tan grande que se acerca al límite teórico de difusión. En las células de los organismos eucarióticos existen dos; una es citoplasmática y la otra mitocondrial. La SOD fue descubierta por *Fridovich* en 1975. (Tzu Chen Yen y col., 1994; Sohal RS, y col 1995; Orr WC y col., 1994)

**Tercer nivel:** dado por un grupo de enzimas especializadas en neutralizar el peróxido de hidrógeno. Entre ellas está la catalasa (CAT), que se encuentran en los peróxisomas y que catalizan la reacción de dismutación siguiente: (Tosaki A y col., 1993)



También en los mamíferos, la glutatión-peroxidasa (Gpx) (enzimas citoplasmáticas que contienen selenio), es la más importante y catalasa la reacción siguiente: (Stepanik TM y col., 1993)

(glutatión - peroxidasa)



GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

**Cuarto nivel:** aquí el radical hidroxilo producido en el ciclo de Haber–Weiss puede ser neutralizado por la vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol, que es un antioxidante efectivo y que por su hidrofobicidad se encuentra en las membranas biológicas donde su protección es particularmente importante.

También la vitamina C o ácido ascórbico es un agente reductor o donador de electrones y reacciona rápidamente con el radical  $\text{OH}^\cdot$  y el anión superóxido.

**Quinto nivel:** una vez producido el daño molecular, existe un quinto nivel de defensa que consiste en la reparación. Está demostrado que los RL son capaces de provocar rupturas de la cadena de ADN y aun de inducir mutagénesis, pero existen mecanismos enzimáticos de reparación que permiten restablecer la información genética. (Salonen JJ. Y col., 1985; Black G., 1992; Burr ML., 1994; Esterbauer H. y col., 1992)

## 2 Antioxidantes

Halliwell define como a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retardado previene la oxidación de dicho sustrato.

El antioxidante al colisionar con el RL le cede un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil no tóxico y que en algunos casos como la vitamina E, puede regenerarse a su forma primitiva por la acción de otros antioxidantes. No todos los antioxidantes actúan de esta manera, los llamados enzimáticos catalizan o aceleran reacciones químicas que utilizan sustratos que a su vez reaccionan con los RL.

De las numerosas clasificaciones de los antioxidantes, se recomienda adoptar al que los divide en: exógenos o antioxidantes que ingresan a través de la cadena alimentaria y endógena que son sintetizados por la célula. Cada antioxidante posee una afinidad hacia un determinado RL o hacia varios, como por ejemplo:

- **Exógenos:** Vitamina E, Vitamina C, Beta caroteno, Flavonoides.

La vitamina E, el beta caroteno y el licopeno actúan en el medio liposoluble de la célula y su absorción y transporte se hallan muy vinculados con el de los lípidos. La vitamina E es considerada el más importante protector de las moléculas lipídicas.

Vitamina C: neutraliza el oxígeno singlete, captura radicales hidroxilos, captura anión hidroperóxidos y regenera la forma oxidada de vitamina E.

Betacaroteno: neutraliza el oxígeno singlete.

- **Endógenos:** Glutación, coenzima Q, Ácido tiocico.

- **Cofactor**

- a) Cobre
- b) Cinc
- c) Hierro
- d) Manganeso

### **Enzimas**

- Catalasa
- Licopenos
- Superóxido dismutasa
- Glutación-peroxidasa

Es necesaria la incorporación al organismo de ciertos oligoelementos como el cobre, zinc, selenio y manganeso, pues forman parte del núcleo activo de las enzimas antioxidantes.

La deficiencia de antioxidantes en el organismo puede obedecer entre otras razones a:

- Dieta deficiente en antioxidantes
- Enfermedades que reducen la absorción de antioxidantes de la dieta (ej. Enfermedad de Cronh)
- Nutrición estrictamente parenteral
- Diálisis renal

## 2.1 Métodos de evaluación del estrés oxidativo.

El desbalance entre la producción de EROS y la defensa antioxidante provoca un daño orgánico conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular. (Seddon JM. y col., 1994; AejmelausnRT. y col., 1997)

Se puede medir este daño mediante métodos directos e indirectos. (Wei YH. y col., 1996; Luscesoli F. y col., 1996; Motchnik PA. y col., 1994). Entre los primeros tenemos la medición de agentes antioxidantes, lo cual es muy difícil por su corta vida media y lo caro de los equipos; lo que obliga a medirlos indirectamente mediante:

## 2.2 Determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre biomoléculas

Los métodos para medir peróxidos lipídicos son el patrón de oro cuando se trata de probar el papel de los oxidantes en algún tipo de daño celular. Ej. Malondialdehído (MDA)

## 2.3 Medición de la concentración de antioxidante

Que se realiza con las técnicas de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), sobre material biológico que puede ser plasma, orina o tejido. A fines prácticos solo se determinan niveles plasmáticos de los antioxidantes siguientes: vitaminas E, BC, coenzima Q (ubiquinol), glutatión y vitamina C.

## 2.4 Medición del estado oxidativo

Refleja el balance entre el sistema oxidante y prooxidante y es beneficioso en muchas enfermedades.

El desbalance entre la producción de RL y la defensa antioxidante provoca un daño orgánico conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular (Aejmelaus- R T. et al., 1997 y Wei- Y y Mojsov- S. 1995). Se puede medir este daño mediante métodos directos e indirectos. Entre los indirectos, los cuales son más indicados, se encuentran los

siguientes: a) determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre biomoléculas, como el grado de lipoperoxidación a través de la cuantificación del malondialdehído (MDA); b) medición de la concentración de antioxidantes como vitaminas E, C y coenzima Q, que se realiza mediante cromatografía líquida de alta resolución, sobre material biológico que puede ser plasma, orina o tejido; c) medición del estado oxidativo, que refleja el balance entre el sistema oxidante y pro-oxidante y es beneficioso en muchas enfermedades.

De todos estos métodos el más empleado por su sencillez y bajo costo es la determinación plasmática de MDA, uno de los subproductos de la peroxidación lipídica, la determinación del daño oxidativo constituye aún un terreno poco desarrollado y se realizan esfuerzos a nivel mundial para el desarrollo de nuevos y sencillos métodos de evaluación.

El estrés oxidativo es responsable de los eventos fisiológicos de las enfermedades inflamatorias intestinales, hepatopatías, desórdenes neurológicos y envejecimiento entre otras afecciones. Por otra parte es vital el conocimiento de que se dispone en la práctica médica de antioxidantes con eficacia demostrada en la prevención y atenuación de los efectos negativos conocidos por el estrés oxidativo, permitiendo que estos agentes formen parte del arsenal terapéutico de muchas enfermedades (ej.: el uso de la vitamina E como neurodegenerativos operados en la enfermedad de Alzheimer)

Las especies reactivas derivadas del oxígeno es un término colectivo ampliamente empleado, que comprende todas aquellas especies reactivas que, siendo o no radicales libres, centran su reactividad en un átomo de oxígeno. No obstante, a menudo, bajo la denominación ERO se incluyen otras especies químicas cuya actividad se centra o se deriva en



átomos distintos al oxígeno. En rigor, sin embargo, las especies cuya reactividad deriva, o se centra en átomos como Nitrógeno o cloro deben referirse como ERNs.

En analogía al término "estrés oxidativo" (Hausladen- A et al., 1996) se ha denominado "estrés nitrosativo" a la excesiva o desregulada formación del radical óxido nítrico (NO) y especies reactivas del nitrógeno (ERNs) derivadas del mismo.

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

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) tiene 2 electrones no apareados en su orbital externo. La mayor parte del oxígeno utilizado por el organismo humano es reducido a agua por acción del complejo citocromo-oxidasa (citocromo A+a3) de la cadena respiratoria mitocondrial. En la molécula de  $O_2$  se generan por su reducción parcial las especies reactivas siguientes:  $O_2^-$  = anión superóxido, OH = radical hidroxilo,  $H_2O_2$  = peróxido de hidrógeno y  $^*O_2$  = oxígeno singulete (Reilly- P M & Bulkley- G B.; 1990 y Witztum- E. y col., 1990).

Por la alta inestabilidad atómica de los RL colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. Si se trata de los lípidos (ácidos grasos poliinsaturados), se dañan las estructuras ricas en ellas como las membranas celulares, alterando la permeabilidad conduciendo al edema y la muerte celular.

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

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

Otra molécula que es dañada por los RL es el ADN; el daño a los ácidos nucleicos produce bases modificadas, promoviendo el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte, o la pérdida de expresión por daño al gen específico.

La vida en presencia del oxígeno molecular exige contar con una batería múltiple de defensa contra los diversos RL de oxígeno, que por un lado tiendan a impedir su formación y por otro, los neutralicen una vez formados.

El posible destino celular bajo condiciones de estrés, dependerá de varios factores: el contenido endógeno de defensas antioxidantes, el grado de estimulación de las mismas bajo la condición de estrés, la reversibilidad de las modificaciones a macromoléculas producidas, la magnitud del estrés oxidativo y sus consecuencias funcionales. Existen varios sistemas de reparación de daño al ADN, y a nivel de proteínas hay muchas reacciones que son reversibles, en tanto que los lípidos quizás sean las macromoléculas más establemente afectadas y con consecuencias más directas sobre la

integridad celular, (Berlett- B S. y Stadtman- E R.; 1997) de allí la gran atención que se ha puesto en ellos.

Estos daños se pueden medir a través del uso de biomarcadores, los cuales poseen características como: resistente a cambios climáticos, sensibles a los compuestos..., donde se ha observado que la presencia de metales, fármacos, etc, causan estrés oxidativo y para ello se han utilizando a *Hyallola*, trucha, y *cyprinus carpio*, éste último es conocido como carpa común *Cyprinus carpio* (Linnaeus- C.; 1758), es un organismo natural de Asia, pero su extensa introducción a diversos cuerpos de agua lo hace actualmente uno de los más distribuidos a nivel mundial. En México, las referencias de introducción de la especie para acuicultura datan de la década de 1960 proveniente de Brasil, aunque la información más antigua data de la época de la Colonia. La carpa se caracteriza por tener ojos pequeños, labios gruesos con dos barbas en cada esquina de la boca, escamas grandes y espinas dorsales fuertemente serradas en las aletas dorsales y anales. Su color es verde variable, pero a menudo del verde oliva al gris plateado dorsal, decolorándose al amarillo plateado en el vientre. Son organismos omnívoros con predominancia bentófaga, aspiran y filtran fango del fondo, así como insectos y plantas de la superficie. En su etapa juvenil se alimenta principalmente de algas, rotíferos y crustáceos microscópicos. Las primeras etapas de su ciclo de vida (embriones, larvas y juveniles) son los más vulnerables a la contaminación, a las fluctuaciones de la temperatura, a la concentración de oxígeno, a la salinidad y a la depredación.

Con lo mencionado anteriormente, se sugiere que puede existir un cambio en la proteínas derivado del estrés oxidativo, además podría afectar la calidad de las proteínas de la especie a nivel textura, éste es un parámetro importante en los productos alimenticios, ya que la calidad de la proteína dará como consecuencia un producto con características texturales y

funcionales adecuadas para su consumo ya sea directo o a nivel tecnológico.

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

formación de geles. La temperatura, el pH y las sales, al modificar la estructura cuaternaria o la distribución de la carga neta de las proteínas, afectan el grado de unión de las proteínas, alteran la naturaleza y la estructura de un gel.

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

Por lo anterior, es necesario llevar a cabo un estudio del efecto de este tipo de edulcorante sobre la calidad de la carne, en especies acuícolas, carpa común para éste estudio, ya que es de consumo humano, y de esta forma evaluar la calidad de las proteínas a un nivel básico y tecnológico.

El propósito de la investigación será Evaluar la toxicidad inducida por acesulfame potasico en (*Cyprinus carpio*) y su relación con la modificación de las propiedades fisicoquímicas, texturales y funcionales.

### 3 Introducción

Actualmente, las instituciones de salud están enfatizando la importancia de reducir el consumo de azúcares, monosacáridos y disacáridos libres como medida preventiva para enfermedades que afectan a gran parte de la población, como la diabetes y la obesidad. En este sentido, se están desarrollando nuevos productos alimenticios que ofrecen menos ingesta calórica a la dieta. Una alternativa a estos requisitos es el uso de edulcorantes. Los edulcorantes son cualquier sustancia, natural o artificial, que se utilizan como aditivos alimentarios para dar un sabor dulce a un alimento o producto. En estos días, los edulcorantes son consumidos por millones de personas en todo el mundo. Sin embargo, existen algunas controversias acerca de si estos productos constituyen un riesgo para la salud o no, y más recientemente, si constituyen riesgo para el medio ambiente. De la variedad de edulcorantes artificiales, que se utilizan actualmente en todo el mundo, se encuentran el acesulfamo de potasio (ACS) el cual se ha identificado en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, aguas superficiales y subterráneas. Estos compuestos son reconocidos como una nueva clase de contaminantes ambientales debido a su extrema persistencia y presencia en diversos ecosistemas acuáticos. También son resistentes a los procesos de tratamiento de agua. Hasta ahora, su comportamiento ambiental y sus efectos ecotoxicológicos a largo plazo en los recursos hídricos son aún desconocidos. Las evidencias indican que estos agentes contaminantes, una vez que alcanzan los cuerpos de agua, pueden desencadenar un proceso de estrés oxidativo responsable de los efectos sobre las células y tejidos asociados a la mutagénesis y Carcinogénesis, así como la oxidación muscular.

La oxidación de las macromoléculas es una de las principales causas del deterioro de la calidad de la carne. Se vuelve susceptible al deterioro oxidativo debido a las altas concentraciones de lípidos insaturados, pigmentos hemo, catalizadores metálicos y una gama de agentes oxidantes en el tejido muscular. Así, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto oxidativo del acesulfamo de potasio en dos concentraciones ambientalmente relevantes ( $0.05$  y  $149\mu\text{gL}^{-1}$ ) en sangre, hígado, branquias, cerebro y sobre las características fisicoquímicas y texturales de la carne de *Cyprinus carpio*.

# CAPITULO I



## 4 Justificación

Las bebidas que contienen azúcares añadidos (sacarosa, jarabe de maíz rico en fructosa [JMRF]) se asocian con un mayor riesgo de aumentar de peso y, por lo tanto, de desarrollar sobrepeso y obesidad, así como diabetes (World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer. A Global perspective. Washington, D.C.: World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research; 2007). Igualmente, la ingestión de azúcares libres o bebidas azucaradas es un determinante del peso corporal y su consumo ha sustituido al de la leche, lo que ha disminuido el aporte de calcio y otros nutrientes (Te Moranga L, Man J. 2012; Vartanian LR, Brownell KD. 2006).

México es el primer consumidor de refrescos del mundo, con 163 L por persona al año. Un estudio de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO., julio 2013), reveló que México ocupa la tasa más alta de obesidad entre los países de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE). Expuestas las cifras y la gravedad de la cuestión, la OPS/OMS reconoce al Estado Mexicano su preocupación y voluntad política para combatir el problema de la obesidad en el país, reflejada en su Estrategia Nacional de Prevención y Control del Sobrepeso, la Obesidad y la Diabetes, lanzada en octubre de 2013. Una regulación en esta estrategia es el establecimiento de un Impuesto Especial sobre Producción y Servicios a las bebidas azucaradas como medida de reducción de la demanda. Este logro se debe a un trabajo coordinado y complementario realizado entre la Secretaría de Salud, la Secretaría de Hacienda y Crédito Público (SHCP) y el poder legislativo con el propósito de proteger la salud pública.

Los resultados revelan un aumento de alrededor de 7% en las compras de bebidas sin impuesto (bebidas con edulcorantes artificiales, agua mineral

carbonatada, agua simple, jugos sin azúcares adicionados y leche sin azúcares adicionados) y, dentro de esta categoría, un incremento de cerca de 4% en la compra de agua simple durante el mismo período. (México, Instituto Nacional de Salud Pública. Resultados preliminares sobre los efectos del impuesto de un peso a bebidas azucaradas en México. México, D.F.: INSP; 2014. Disponible en: <http://www.insp.mx/epppo/blog/preliminares-bebidas-azucaradas.html> Acceso el 11 de septiembre de 2014.)

De acuerdo con la analista de mercado Mintel, un total de 3920 productos que contienen endulzantes artificiales fueron lanzados en los Estados Unidos entre 2000 y 2005. Sólo en 2004, 1649 productos endulzados artificialmente fueron lanzados. De acuerdo al analista de mercado Freedoniasino, el mercado americano de endulzantes artificiales creció alrededor de 8% por año hasta llegar a 189 millones de dólares en 2008. (Sugar demand rising at expense of sweeteners, claims sugar industry)

Debido a las actividades antropogénicas estos compuestos pueden ingresar al medio ambiente a través de descargas municipales e industriales. Estos compuestos se encuentran diseminados en el ambiente y se han detectado en fuentes de abastecimiento de agua, aguas subterráneas e incluso en agua potable que van en magnitudes microgramos por litro ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), es importante resaltar que los métodos convencionales empleados en el tratamiento de aguas residuales, no eliminan estos contaminantes. Los edulcorantes son compuestos de los que relativamente se conoce poco (FDA), asimismo, su presencia, impacto y tratamiento; a pesar de que están regulados para su consumo por la FDA, en la mayoría de los casos se podrían considerar como contaminantes no regulados por su presencia en los cuerpos de agua, por lo que pueden ser candidatos a regulación futura, esto dependiendo de investigaciones sobre sus efectos potenciales en la salud y los datos de monitoreo con

respecto a su incidencia y su efecto en organismos acuáticos que habitan estos cuerpos y el impacto que tienen sobre las propiedades fisicoquímicas y texturales de la carne de estos, por esta razón, son susceptibles de investigación.

## 5 Objetivos

### 5.1 General

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

### 5.2 Específicos

- Determinar la toxicidad aguda inducida por acesulfame en *Cyprinus carpio*.
- Determinar el estrés oxidativo inducido por acesulfame en *Cyprinus carpio* a través de la determinación del grado de lipoperoxidación, contenido de hidroperóxidos, contenido de proteínas carboniladas y actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPx.
- Determinar las características fisicoquímicas, texturales y funcionales de la carne de carpa común expuesta a acesulfame.

## 6 Hipótesis

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

## 7 Materiales y métodos

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

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

### 7.2 Medición pH (Método NMX-F-317- S-1978 "Determinación de pH en Alimentos").

Se tomará una porción de 10g de músculo, se mezclará con 90ml de agua destilada. Se licuará hasta obtener una pasta consistente y uniforme. Se ajustará la temperatura de la pasta a  $20$  °C  $\pm$   $0.5$ °C. Finalmente se realizará la lectura de pH con un potenciómetro previamente calibrado.

### 7.3 Capacidad de retención de agua (CRA). Método Honikel&Hamm (1983), reportado en (Dublán- G O.; 2006).

Se tomarán 10g de músculo y se picarán. Se colocarán 5g en un tubo de centrifuga y se añadirán 8mL de una disolución de NaCl 0.6 M. Se agitará con varilla de vidrio durante 1 min en baño de hielo, se dejará reposar 30 minutos. Se agitará 1 minuto. Se centrifugará durante 30 minutos a 2500 rpm. Se decantará el

sobrenadante y medir volumen. Se reportará el volumen de NaCl retenido por 100 g de muestra.

#### 7.4 Solubilidad.

Método (Dublán- G O.; 2006). Se extraerán las proteínas (5 mg/mL, a pH 7) y se centrifugará a una temperatura de 4 °C para evitar su desnaturalización. Al sobrenadante extraído se le medirá la concentración de proteínas mediante método biuret. Se reportará la solubilidad como la relación entre el contenido de proteínas del sobrenadante y el contenido de la proteína sin centrifugar por 100.

#### 7.5 Determinación de grupos disulfuro y sulfhídrido totales.

Método Ellman (1959), reportado en (Dublán- G O.; 2006). Se mezclará 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 dejará reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min. Se tomarán 3 mL de la mezcla y se añadirán 50 mL de una disolución del reactivo 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzónico (4 mg/mL en la misma disolución amortiguadora). Se dejará reposar durante 30 min en oscuridad. Se Medirá la absorbancia a 412 nm. Se transformará el valor de absorbancia empleando la siguiente ecuación. SS o ecuación 1.  $SH_T = (75,53(DO_1 - DO_2) / 10) / C$ .

Siendo:

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

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

$DO_2$  la absorbancia a 412 nm del blanco de reactivos.

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

#### 7.6 Identificación de proteínas

##### 7.6.1 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Método Laemmli (1970), reportado en (Dublán- G O.; 2006).

Se realizará extracción de proteínas. Se mezclará en una relación 1:4 muestra: amortiguador muestra (disolución de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% + mercaptoetanol al 5% + azul de bromofenol al 0.05%+ glicerol, 0.5M Tris-HCl pH 6.8)

y se calentará en un baño maría a 97°C durante 2 minutos, antes de su aplicación. Se inyectará 20 µL de muestra en cada carril de gel separador de 12% de poliacrilamida y concentrador 4%. Se inyectará 20 µL de un marcador que contenga proteínas de interés, tratar en las mismas condiciones de la muestra. Se verterá un buffer de corrida (9.0 g base tris, 43.2 g de glicina y 3.0 g de SDS se adicionarán 600 mL de agua desionizada). Para una corrida electroforética se diluirán 60 mL de buffer con 240 mL de agua desionizada. se conectará a una fuente de poder con un voltaje de 200 y una temperatura de 4±1°C, para evitar así el efecto Joule. Una vez terminado el proceso de separación se teñirá empleando una disolución de azul de Coomassie R-250 al 0.1%, metanol 40% y ácido acético al 10% durante 30 min. Se desteñirá empleando una disolución al 40% de metanol y 10% de ácido acético.

### 7.6.2 Concentración de proteína.

Método biuret reportado en (Dublán- G O.; 2006). Utilizando tubos de ensayo se procederá a medir 1mL de las disoluciones de proteína y se agregarán 3 mL del reactivo de biuret. Se homogeneizará y se dejará en reposo durante 30 minutos en la sombra sin contacto directo con la luz. Se medirá la absorbancia de la muestra a una  $\lambda = 540$  nm. Los datos obtenidos se relacionarán con respecto a una curva patrón de Seroalbúmina-bovina de concentración 0-10 mg/mL. Reactivo de biuret de acuerdo a Gornall (1948) Disolver 1.5 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 6 g de tartrato de sodio y potasio ( $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), se transferirá a un matraz volumétrico de 1000mL se disolverá con 500 mL de agua destilada, se agregarán 300 mL de hidróxido de sodio 10 % y se llevará a volumen con agua destilada.

### 7.6.3 Formación de gel.

Extraídas las proteínas, se verterán en un contenedor adecuado. Se colocará el contenedor en un baño de agua. Se someterá a calentamiento gradual de 1 °C/min hasta alcanzar una temperatura interna del gel de 80 °C para inducir la gelificación (Dublán- G O.; 2006). Se retirarán los contenedores y se colocarán en baño de hielo para enfriar. Se almacenará en refrigeración no mayor a 4 °C para madurar la estructura del gel. Se realizará prueba de penetración de geles de acuerdo a método<sup>34</sup>. Se penetrará la superficie del gel con un vástago de acrílico de 8 mm de diámetro a una velocidad de 25 mm/s.

### 7.6.4 Capacidad emulgente (CE). Método Zorba, reportado en (Dublán- G O.; 2006).

Se picará la carne en trozos pequeños de 5 mm de diámetro. Se mezclarán 25 g de carne con 100 mL de disolución NaCl 0.4 M estandarizada a pH de 6.6 (2-4 °C), se licuará por 1 minuto. Se tomarán 12.5 g del homogeneizado y 37.5 mL de la disolución de NaCl, se mezclará por 5s a baja velocidad y se agregarán 50 mL de aceite de maíz. Se adicionará aceite de maíz en un rango de 0.9-1.0 mL/s hasta



que la emulsión se rompa. La capacidad emulgente CE es expresada como el promedio de mL de aceite necesarios para afectar el cambio de fase.

### 7.7 Análisis de textura. Método García (Dublán- G O.; 2006).

Se realizará en geles elaborados a partir de carne de carpa los cuales serán medidos instrumentalmente con un texturoméetro. Se definirán los parámetros de la muestra como tamaño, temperatura y aplicación de la fuerza con respecto a la muestra. Se definirán los procesos de evaluación de textura estos pueden ser:

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

## 7.8 Estrés oxidativo

### 7.9 Colecta y mantenimiento de la carpa (*Cyprinus carpio*)

Se utilizaron carpas con una longitud de  $18.39 \pm 0.31$  cm y un peso de  $50.71 \pm 7.8$  g que fueron traídas del Centro Carpícola de Tiacaque, Estado de México. Este centro, garantiza tener carpas sanas y con las condiciones idóneas para realizar los experimentos de toxicidad, además en dicho centro se cultivan las carpas libres de contaminantes ambientales. Las carpas fueron transportadas al laboratorio en bolsas de polietileno que fueron provistas con oxígeno y fueron perfectamente etiquetadas. En el laboratorio las carpas fueron colocadas en peceras de 120 L de capacidad que contenía agua de grifo libre de cloro y se aclimataron a las condiciones del ensayo, durante 45 días, previas a su utilización. Durante este periodo los peces fueron alimentados con el alimento especial para peces Pedregal Silver Corp<sup>MR</sup>. Tres cuartas partes del agua fueron remplazadas diariamente, para mantener el medio ambiente en buenas condiciones. Las características fisicoquímicas del agua de aclimatación fueron las siguientes: [temperatura ( $21 \pm 2.1$  ° C), la concentración de oxígeno de 80-90%, pH de

7.0 a 8.0, la alcalinidad total fue de  $17.9 \pm 6.9 \text{ mg L}^{-1}$  y la dureza total de  $18.7 \pm 0.6 \text{ mg L}^{-1}$ . Las carpas fueron mantenidas en fotoperiodos luz-oscuridad normal.

### 7.10 Evaluación del estrés oxidativo

Se montaron 20 sistemas de prueba, que consistieron de agua que tenía las mismas características y condiciones empleadas en el periodo de aclimatación y manutención de la carpas. El ACS fue utilizado en dos concentraciones ( $0.05$  y  $165 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), los periodos de exposición fueron 12, 24, 48, 72 y 96 h y un sistema control que no contenía ACS fue utilizado para cada periodo de exposición. Cada sistema de prueba contenía seis peces y los ensayos fueron realizados por triplicado (360 peces fueron utilizados para las pruebas de estrés oxidativo). Los sistemas de prueba utilizados fueron estáticos, sin renovación de medio y durante el experimento los organismos de prueba no fueron provistos con alimento. Las concentraciones empleadas para evaluar el estrés oxidativo fueron seleccionadas considerando concentraciones relevantes para el ambiente acuático reportadas por Arbeláez et al. (2015), tomando que en cuerpos de agua mexicanos no se han reportado en la literatura científica estudios de la presencia de edulcorantes en el ambiente.

Una vez cumplido el tiempo de exposición, los organismos fueron anestesiados con aceite de clavo a una concentración de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  durante 2-5 min y se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena caudal de la carpa y por otro lado fueron disectadas las muestras de órganos como branquias, músculo, hígado y branquias, en todos los organismos empleados. Posteriormente, los órganos y tejidos fueron colocado en un buffer de fosfatos con pH 7.4 y fueron centrifugados a  $12,500 \text{ g} \times 15 \text{ min}$  a una temperatura de  $-4^{\circ}\text{C}$ . Los biomarcadores de estrés oxidativo evaluados fueron: HPC, LPX, PCC y la actividad antioxidante de las enzimas SOD y CAT. Todos los análisis bioquímicos fueron hecho

empleando el sobrenadante y únicamente el grado LPX en el cual el sedimento fue utilizado. Además de terminó el contenido de proteínas totales por el método de Bradford (1976), para expresar todos los resultados de estrés oxidativo en referencia a la concentración de proteínas. Los experimentos fueron realizados por triplicado. Para la evaluación del estrés oxidativo las siguientes técnicas fueron empleadas:

### 7.11 Determinación de LPX

Para evaluar el LPX se utilizó el método descrito por Beuge & Aust (1979). En un tubo de ensaye se colocaron 50  $\mu$ L de sobrenadante que fueron adicionados con 450  $\mu$ L de solución de Tris-HCL mM y con 1 mL de una mezcla de ácido tiobarbitúrico y ácido tricloroacético en una proporción (0.375% del primero in 15% del segundo), las muestras fueron mezcladas y agitadas en vórtex durante dos minutos. Posteriormente, se indujo choque térmico sumergiendo los tubos en agua a ebullición durante 50 minutos e inmediatamente enfriadas a  $-5^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Los tubos se centrifugaron a 3500 g x 10 min. Las muestras fueron leídas a una absorbancia de 535 nm, empleando como blanco una solución de buffer de fosfatos (PBS) 1.0 M, pH 7.4 el cual fue tratado de la misma manera que las muestras problema. Los resultados obtenidos fueron expresados como milimoles de MDA por mg de proteína.

### 7.12 Determinación de HPC

El contenido de hidropéroxido fue determinado por el método de oxidación de color naranja-xilenol ferroso descrito por Jiang et al. (1992). En un tubo de ensaye se colocaron 200  $\mu$ L del sobrenadante y se les adicionaron 1800  $\mu$ L de la mezcla de reacción que consistía en 0.25 mM  $\text{FeSO}_4$ , 25 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0.1 mM xilenol orange and 4 mM butyl hydroxytoluene in 90% (v/v) de metanol. Los tubos fueron perfectamente

mezclados por 3 minutos y posteriormente, se dejaron reposar por un periodo de una hora a temperatura ambiente. Los tubos fueron protegidos de la luz. Una vez transcurrido el periodo de reposo se leyó la absorbancia a 560 nm y se usó como blanco PBS que tuvo el mismo tratamiento que las muestras. Los resultados fueron expresados en nanomoles de hidróxido de cúmeno por mg de proteína.

### **7.13 Determinación de PCC**

El método empleado para la determinación de proteínas carboniladas fue el descrito por Levine et al. (1994), modificado por Parvez y Raisuddin (2005) y Burcham (2007). En un tubo de ensaye se colocaron 100  $\mu$ L de sobrenadante y se les añadió 150  $\mu$ L de una solución 10 mM disuelto en HCl 2 M. Los tubos de ensaye fueron perfectamente mezclados por 3 minutos y se dejaron reposar a temperatura ambiente por un periodo de una hora y protegidos de la luz. Posteriormente, se les añadieron 500  $\mu$ L de una solución de ácido tricloroacético al 20% y se dejaron en reposo durante 15 minutos a 4°C. La mezcla se centrifugó a 1, 100 g x 5 min. Se desechó el sobrenadante y el botón fue lavado 3 veces con una mezcla etanol: acetato de etilo (1:1) y posteriormente fue disuelto empleando un mL de una solución de guanidina 6M (pH= 2.4) e incubado a 37°C durante 35 minutos. Posteriormente, se leyó la absorbancia a 366 nm. Los resultados se expresaron como micro moles de carbonilos reactivos formados micro molaes por miligramo de proteína, utilizando el MEC de 21.000 M / cm.

### **7.14 Determinación de la actividad de SOD**

#### **7.14.1 Deslipidación de la muestra**

En un tubo de ensaye, se colocaron 100  $\mu$ L de muestra y se adicionaron con 30  $\mu$ L de cloroformo y 50  $\mu$ L de metanol. Las muestras fueron mezcladas

durante un minuto utilizando vórtex. Posteriormente, se centrifugaron a 6000 g x 15 min y se separó el sobrenadante.

#### 7.14.2 Preparación del blanco

Se colocó una mezcla de 2.8 mL de solución amortiguadora Tris-HCL, 100  $\mu$ L de agua destilada y 50  $\mu$ L de la solución de EDTA (1 mM), se adicionaron 50  $\mu$ L de la solución de Pirogallol (0.124 mM). La mezcla se dejó reaccionar por 10 segundos y se midió a partir de este momento la diferencia de densidades ópticas en un minuto a 420 nm. El procedimiento se realizó por triplicado.

#### 7.14.3 Muestra

Se colocaron 100  $\mu$ L de la muestra deslipidada y se adicionó con 2.8 mL de solución amortiguadora Tris - HCl pH 8.2 y 50  $\mu$ L de la solución de EDTA, en una celda de cuarzo, se mezcló perfectamente. A continuación se adicionaron 50  $\mu$ L de la solución de Pirogallol y después de 10 segundos de reacción se determinó la diferencia de densidades ópticas en un minuto a 420 nm.

Cálculos

La actividad enzimática se calcula mediante el empleo de la ecuación siguiente:

$$V.M.\Delta DO \text{ muestra} \times 100 - 100 \times 0,6$$

$$V.M.\Delta \text{ Blanco}$$

Dónde:

$\Delta$  D.O.m: Diferencia de D.O de la muestra.

$\Delta$  D.O.b: Diferencia de D.O de la blanco.

V.M: valor medio

### 7.15 Determinación de la actividad de CAT

Para evaluar la actividad de la catalasa se empleó el método referido por Radi et al. (1991). Se colocaron 30  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y se adicionaron 420  $\mu\text{L}$  de la solución tampón de aislamiento [0.3 M sacarosa, 1 mM de EDTA, 5 mM de HEPES y 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ], y 0.2 mL de una solución de peróxido de hidrógeno (20 mM). Se leyó la absorbancia a 240 nm después de 0 y 60 s. Los resultados de la actividad de la CAT fueron expresados como micro moles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por miligramo de proteína.

## 8 Conclusiones generales

ACS induce estrés oxidativo en carpa común (*Cyprinus carpio*) a las dos concentraciones de relevancia ambiental (0.05 y 149  $\mu\text{g/L}$ ), ya que se observaron aumentos significativos en HPC, grado de LPX y PCC en todos los órganos estudiados, así como cambios significativos en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT. Sin embargo, se requieren más estudios para realizar una evaluación del riesgo de daños artificiales y naturales.

ACS produce un aumento significativo en los biomarcadores de daño evaluados en todos los órganos, principalmente en las branquias, el cerebro y los músculos, así como cambios significativos en la actividad de las enzimas antioxidantes en los mismos órganos. Por lo tanto, se concluye que el SCA es capaz de producir estrés oxidativo en la carpa común (*Cyprinus carpio*)

# CAPITULO II



## ARTICULOS

### **Acesulfame potassium: its ecotoxicity measured through oxidative stress biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio*)**

Claudia Cruz-Rojas<sup>a</sup>, Nely SanJuan-Reyes<sup>a,c</sup>, María Paulina Aideé Gracia Fuentes-Benites<sup>b</sup>, Octavio Dublan-García<sup>a</sup>, Marcela Galar-Martínez<sup>c</sup>, Hariz Islas-Flores<sup>a</sup>, Leobardo Manuel Gómez-Oliván<sup>a\*</sup>

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

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

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

\*Corresponding author:

#### **Dr. Leobardo Manuel Gómez-Oliván**

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

## ABSTRACT

Acesulfame potassium (ACS) is a widely-used sweetener worldwide. Its presence has been demonstrated in diverse bodies of water. However, the deleterious effects this causes in aquatic organisms has not yet been identified, which generates controversy concerning the risks that ACS represents after its disposal into the bodies of water. Thus, the objective of this work was to evaluate if the exposure of ACS in environmentally-relevant concentrations was capable of producing oxidative stress in blood, liver, gill, brain and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). With this finality, the carp were exposed to two environmentally-relevant concentrations (0.05 and 149  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) at different exposure times (12, 24, 48, 72 and 96 h), having controls in the same conditions for each exposure time. Posteriorly, the following biomarkers of damage were evaluated: hydroperoxide content (HPC), level of lipoperoxidation (LPX) and protein carbonyl content (PCC), as well as the activity of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). The results showed that ACS produces significant increase in damage biomarkers evaluated in all organs, mainly in gill, brain and muscle, as well as significant changes in the activity of antioxidant enzymes in the same organs. Thus, it is concluded that ACS is capable of producing oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*).

**Keywords:** Sweetener, damage, antioxidant enzymes, HPLC-MS/MS

**Abbreviations:** ACS, acesulfame potassium; ANOVA, analysis of variance; CAT, catalase; CYC, cyclamate; CHP, cumene hydroperoxide; DNPH, di-nitro phenyl hydrazine; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; ESI, electrospray ionization; HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2'-ethanesulfonic acid; HPC, hydroperoxide content; HPLC-MS/MS, high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LPX, lipid peroxidation; MDA, malondialdehyde; MRM, multiple reaction monitoring; OS, oxidative stress; PBS, phosphate buffered saline; PCC,

protein carbonyl content; PT, total proteins; ROS, reactive oxygen species; SAC, saccharin; SOD, superoxide dismutase; SUC, sucralose; TBA, thiobarbituric acid; TCA, trichloroacetic acid; WWTPs, wastewater treatment plants.

## 1. INTRODUCTION

Currently, health institutions are emphasizing the importance of reducing the consumption of free sugars, monosaccharides and disaccharides as a preventive measure for illnesses that impact a large part of the population such as diabetes and obesity (Kokotou and Thomaidis, 2013; Zygler et al., 2009). In this sense, new food products are being developed, which offer less caloric intake to a diet. An alternative to these requirements is the use of sweeteners. Sweeteners are any substance, natural or artificial, those are used as food additives in order to give a sweet taste to a food or product (Bassoli and Merlini, 2003). These days, sweeteners are consumed by millions of people worldwide. However, there are some controversies about whether these products constitute a health risk or not, and more recently, about they constitute a risk to the environment. These compounds are recognized as a new class of environmental contaminants due to their extreme persistence and presence in diverse aquatic ecosystems. They are also resistant to water treatment processes. Until now, its environmental behavior and long-term ecotoxicological effects in water resources are still very much unknown (Sang et al., 2014).

Of the variety of artificial sweeteners, which are currently used worldwide, only acesulfame potassium (ACS), cyclamate (CYC), sucralose (SUC) and saccharin (SAC) have been identified in effluents of wastewater treatments plants, surface and ground waters (Arbeláez et al., 2015; Lange et al., 2012).

Of the aforementioned compounds, one of special interest is ACS since it is one of the most consumed worldwide. It is known that by 2001, the demand for ACS in tons in different parts of the world was 2500 tons, of which Asia consumed 375 (15%), America consumed 1175 (47%), Africa and Oceania 100 (4%) and Europe 850 (34%) (Bahndorf and Kienle, 2004). By 2005, the demand

for this sweetener had increased worldwide by 62.5%, reaching 4000 tons (Celanese, 2014). It is estimated that the high-intensity sweetener market (in which ACS is found) reached US\$ 1.9 billion by 2017 (Leatherhead Food Research, 2014).

As previously mentioned, studies of ACS occurrence have demonstrated its presence in bodies of water. A study carried out in Spain demonstrated the presence of this sweetener in concentrations ranging from 49-149  $\mu\text{g L}^{-1}$  in an influent of a wastewater treatment plant. After treatment, concentrations of 48-88  $\mu\text{g L}^{-1}$  were found; these same authors determined concentrations of 0.12-1.62  $\mu\text{g L}^{-1}$  in rivers (Arbeláez et al., 2015). Other studies report concentrations from 28  $\text{ng L}^{-1}$  to 2  $\text{mg L}^{-1}$  of ACS in diverse bodies of water (Scheurer et al., 2014; Kokotou et al., 2012; Lange et al., 2012; Müller et al., 2011; Buergue et al., 2009) and in groundwater, ranging from 4.7 to 34  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Perkola and Sainio, 2014; Kokotou et al., 2012; Lange et al., 2012; Buergue et al., 2011).

Little is known of the toxicity that ACS has caused in aquatic species, and from this lack of knowledge rises the interest in the present study to demystify or corroborate the effects this compound may have on aquatic life. However, there are some studies that have demonstrated that other sweeteners such as SUC, have generated deleterious effects in aquatic organisms. For example, Wiklund et al. (2014) demonstrated that at SUC concentrations ranging from 0.0001 to 5  $\text{mg L}^{-1}$ , an increase in the swimming speed of *Daphnia magna* was produced, and that in the family of gammarid amphipods, an increase in the time required to reach food and shelter was seen. These authors demonstrated that sucralose can induce neurologic and oxidative mechanisms with potentially important consequences in the behavior and physiology of *Daphnia magna*. More recently, Saucedo-Vence et al. (2017) observed alterations in antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT), also in cell oxidation biomarkers among which are hydroperoxide content (HPC), lipid peroxidation (LPX) and protein carbonyl content (PCC) in brain, gill and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ecotoxicologically-relevant concentrations of SUC, demonstrating that this sweetener is capable of inducing oxidative stress. This biomarker has been considered as a significant mechanism of toxicity over the organisms it

affects and has allowed for its use as a diagnostic tool, with the predictive capacity of evidencing the impact of the environmental contaminants over the organisms (Kelly et al., 1998).

The main result of this phenomenon of oxidative stress is seen in organisms as the oxidation of biomolecules such as lipids, proteins and nucleic acids, and alteration of the cell redox status (Marcon and Filho, 1999), as well as modification in antioxidant enzyme mechanisms of defense (Valavanidis et al., 2006).

Fish are ideal indicator organisms, since they are usually abundant in aquatic ecosystems, easy to capture and to identify and are well-studied (Nelson, 1994). They are also considered good indicators of water quality (Huidobro et al., 2000). Common carp (*Cyprinus carpio*) are commonly used as a “bioindicator” species (Huang et al., 2007), since cyprinids are quantitatively the most important group of teleost fish in the world for commercial purposes. It has adapted to different environments, tolerates low concentrations of oxygen, very high temperatures and significant organic contamination, is an organism easy to obtain, maintain, and has a relevant response to toxic compounds (sensitivity to low concentrations, to a wide variety of toxins).

Thus, the objective of this study was to evaluate if the exposure to ACS at two environmentally-relevant concentrations (0.05 and 149  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) produces oxidative stress in blood, liver, gills, brain and muscle of common carp (*Cyprinus carpio*).

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Test substances**

All the reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), unless indicated otherwise in the “material and methods” section of this work.

An analytical standard of ACS (6-Methyl-1,2,3-oxathiazin-4(3H)-one 2,2-dioxide potassium salt) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). The purity of the ACS standard was  $\geq 99\%$

(C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNO<sub>4</sub>S, molecular weight: 201.24 g mol<sup>-1</sup> (CAS Number 55589-62-3)). All reagents were HPLC-grade. Nitrogen gas was sourced from INFRA, S.A. de C.V. (DF, Mexico). Ultrapure water was obtained using an ultrapure water purification system provided by Merck Millipore.

## **2.2. Collection and maintenance of common carp (*Cyprinus carpio*)**

The carp employed in this study were obtained from the certified aquaculture center located in Tiacaque, State of Mexico. This center is one of the most important in the country dedicated to the massive breeding of common carp and the herbivore subtype. These are organisms free of contaminants and possess the ideal conditions in order to guarantee reproducible, repeatable and reliable results. The carps utilized had a length of 19.3 ± 0.3 cm and a weight of 51.4 ± 5.3 g. Once collected, the carps were placed in polyethylene bags, which contained previously oxygenated water and were transported to the laboratory. In the aquarium, the carps were placed in fish tanks with a 120 L capacity, which contained previously dechlorinated tap water. They were maintained in said conditions for 45 days prior to their use. During this period, the carps were fed with Pedregal Silver Corp<sup>MR</sup> special fish feed. Within the fish tanks, each day, three quarters of water were replaced in order to maintain the environment in good conditions. The characteristics of the water during the period of acclimatization were always the same: temperature of 21 ± 2.1 °C, oxygen concentration of 80-90%, pH of 7.0 to 8.0, total alkalinity of 18.3 ± 6.5 mg L<sup>-1</sup> and total water hardness of 19.1 ± 0.5 mg L<sup>-1</sup>. The light-darkness photoperiod was normal.

## **2.3. Exposure procedure the common carp (*Cyprinus carpio*) to ACS**

All the test systems contained water with the same physicochemical characteristics, and conditions utilized during the acclimatization and maintenance periods described in section 2.2 were used. The systems were static, with no renovation of the medium and no feeding of the fish was done during the exposure periods of the test organisms.

Two concentrations of ACS (0.05 and 149  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) were employed in the different test systems. These concentrations were deemed “environmentally relevant” considering the study carried out by Sang et al. (2014) and Arbaláez et al. (2015), and that in Mexican bodies of water, no presence of sweeteners has been reported in scientific literature.

After the exposure times, the organisms were anesthetized with clove oil at a concentration of 50  $\text{mg L}^{-1}$  for a period of 2 to 5 min and blood samples were obtained via puncture of the caudal vein of the. The carps were also dissected and gill, muscle, liver and brain samples were obtained. The organs and tissues were placed in phosphate buffered saline (PBS) with a 7.4 pH and centrifuged at 12 500-x g for 15 min at a temperature of 4 °C.

It was decided that the study would involve work with blood, organs and tissues, considering the following aspects: gills, because they play an important role in the transport of oxygen and other ions such as  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and  $\text{Cl}^-$ , in order to maintain the acid-base equilibrium, osmotic pressure of the body and regulation of the entry and exit of ions and being the first contact organ; the liver was selected due to the fact that this organ plays a determinant role in the biotransformation of xenobiotics; muscle was selected because of its high protein content; brain was selected because it is one of the most important organs, where motor activity is determined and because of its high lipid content; blood was selected because it is the main reservoir of the contaminants in the organism. Also, all of the aforementioned organs have demonstrated to be sensible to oxidative damage.

#### **2.4. Water**

Water samples (10 mL) were collected from the different test systems in glass vials. Samples were acidified with 1 M HCl and ACS was extracted from 1 mL water samples with 5 mL of methanol: water (1:1). The mixture was centrifuged at 1800-x g for 10 min, and the upper organic layer was used for the analysis by HPLC–MS/MS.

## **2.5. Plasma**

5 mL of ice-cold acetone were added to the plasma samples and then centrifuged at 2500-x g for 5 min. The supernatant was separated and analyzed for ACS by HPLC–MS/MS.

## **2.6. Tissues**

0.2 g of tissue were homogenized in 4 mL of methanol: water (1:1), followed by centrifugation at 2500-x g for 5 min. The top layer was carefully placed into a clean 10 mL glass vial for its further analysis by HPLC–MS/MS.

## **2.7. Quantification of ACS by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)**

The stock solution of the ACS standard was prepared by dissolving the compound in methanol and ultrapure water (50:50) at a 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  concentration. Posteriorly, it was stored at -20 °C until analysis. The high-performance liquid chromatography (HPLC)–MS/MS system used was an Agilent 1290 Infinity HPLC unit coupled to an Agilent 6430 Triple Quadrupole MS equipped with electrospray ionization (ESI). The RRHD Eclipse Plus C18 chromatography column (2.1  $\times$  50 mm, 1.8- $\mu\text{m}$ ) was maintained at 40 °C. The mobile phase was composed of ultrapure water (A) and acetonitrile (B), both containing 5 mM ammonium acetate and 1 mM TRIS. The mobile phases were filtered before use. Gradient elution was carried out at a flow rate of 0.4 mL min<sup>-1</sup>, and the mobile phase gradient was ramped linearly from 0% to 75% B over 8 min, held for 1 min, returned back to 10% B over 1 min, ramped again to 70% B within 0.5 min, and held for 1.9 min. Eluent B was then lowered back to 0% within 0.5 min, and the system was allowed to equilibrate for 10 min before the next injection. The injection volume was 20  $\mu\text{L}$ , and injection was performed by an autosampler. HPLC-MS/MS analyses were conducted in negative ionization mode using multiple reaction monitoring (MRM). The standard, without a column, was injected to optimize the conditions of ESI-MS/MS. These conditions were as follows: nebulizer pressure of 45 psi, drying



gas (N<sub>2</sub>) flow rate of 11 L min<sup>-1</sup>, drying gas temperature of 350 °C and capillary voltage of 4000 V.

## **2.8. Oxidative stress evaluation**

The biomarkers of oxidative stress that were evaluated in this work: HPC, LPX, PCC and the antioxidant activity of SOD and CAT enzymes. All bioassays were performed with the supernatant. Likewise, in order to normalize the results of the oxidative stress biomarkers evaluated and to express the results, the content of total proteins (PT) was determined via the Bradford method (1976). The study was carried out in triplicate. To analyze oxidative stress in different organs and systems, the methodologies described next were employed.

### **2.8.1. Determination of HPC**

The method described by Jiang et al. (1992) was used. One hundred microliters of supernatant were mixed with 900 µL of the reaction mixture, which contained 0.25 mM FeSO<sub>4</sub>, 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 mM xylene orange and 4 mM butyl hydroxytoluene in 90% methanol (v/v). The resulting solution was mixed for 1 min using a vortex and was posteriorly left to rest for 1 h at room temperature and protected from the light. Once the rest period had concluded, absorbance was determined at 560 nm. The results were expressed in nm of cumene hydroperoxide (CHP) per mg of PT.

### **2.8.2. Determination of LPX**

The method described by Buege and Aust (1978) was employed. Fifty microliters of supernatant were mixed with 450 µL of Tris-HCl solution (150 mM, pH 7.4). Posteriorly, 1 mL of a mixture of thiobarbituric acid (TBA) and trichloroacetic acid (TCA) in a 0.375% proportion of the first in 15% of the second, was added. The resulting solution was shaken for 1 min using a vortex. Afterwards, a thermal shock to the samples was induced by submerging the vials in boiling water for 15 min and immediately cooling them 5 °C for 3 min. Finally, the samples were incubated for

30 min at 37 °C and then centrifuged at 3500-x g for 10 min. The samples were read at 535 nm. The results obtained were expressed as mM of malondialdehyde (MDA) per mg of PT.

### **2.8.3. Determination of PCC**

The method described by Levine et al. (1994), modified by Parvez and Raisuddin (2005) and Burcham (2007), was used. One hundred microliters of supernatant were mixed with 150 µL of a solution of di-nitro phenyl hydrazine (DNPH) (10 mM dissolved in 2 M HCl). The samples were perfectly mixed for 1 min with a vortex and were left to rest at room temperature for 1 h, protected from light. Once the rest period had concluded, 500 µL of a solution of 20% TCA were added to the samples and were left to rest for 15 min at 4 °C. The mixture was centrifuged at 1100-x g for 5 min. The supernatant was disposed of and the button was rinsed three times with a mixture of ethanol: ethyl acetate (1:1). After the rinses, the button was dissolved using 2 mL of a solution of 6 M guanidine (pH 2.4) and the mixture was incubated at 37 °C for 30 min. Posteriorly, the absorbance was determined at 366 nm. The results were expressed as mM of reactive carbonyls (C=O) per mg of PT.

### **2.8.4. Determination of SOD activity**

SOD activity was analyzed via the Marklund and Marklund method (1974), as modified by Magnani et al. (2000).

#### **2.8.4.1. Delipidation of the sample**

To one hundred microliters of the sample, 30 µL of chloroform and 50 µL of methanol were added. The samples were mixed for 1 min using a vortex. Posteriorly, the samples were centrifuged at 6000-x g for 15 min and the supernatant was removed

#### **2.8.4.2. Samples**

To 100 microliters of the delipidated sample, 2.8 mL of a Tris-EDTA buffer solution (pH 8.2) were added. The resulting solution was mixed with a vortex for 1 min. Next, 50  $\mu$ L of a 0.2 mM Pirogallol solution were added and the difference in optical density (OD) at 10 and 60 s, at a wavelength of 420 nm, was determined. The results were expressed as UI of SOD per mg of PT.

#### **2.8.5. Determination of CAT activity**

In order to evaluate the activity of catalase, a method referred to by Radi et al. (1991) was employed. Twenty microliters of supernatant were mixed with 1000  $\mu$ L of isolation buffer solution (0.3 M saccharose, 1 mM of EDTA, 5 mM of HEPES and 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Posteriorly, 200  $\mu$ L of a solution of hydrogen peroxide (20 mM) were added. Finally, absorbance was read at 240 nm at 0 and 60 s. The results of CAT activity were expressed as  $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$  per mg of PT.

#### **2.8.6. Determination of PT**

The method described by Bradford (1976) was employed. Twenty-five microliters of supernatant were mixed with 75  $\mu$ L of deionized water and 2.5 mL of Bradford reagent. The mixture was placed over a vortex for 1 min and was left to rest for 5 min. The absorbance was read at 595 nm and the results were interpolated in a bovine serum albumin curve. The total protein content was expressed as mg protein wet tissue.

### **2.9. Statistical analysis**

Results of the oxidative stress biomarkers were statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni *post-hoc* multiple comparisons test, with  $P$  set at  $<0.05$ . Pearson's correlation analysis was used to find potential correlations between ACS concentrations and biomarkers of oxidative stress. Statistical determinations were performed with SPSS v10 software (SPSS, Chicago IL, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Quantification of ACS in water and tissues of common carp (*Cyprinus carpio*)

Table 1 shows the concentration of ACS in the different matrices involved. The highest concentration in water is found at 12 h and diminishes as exposure time increases. On the other hand, in the organs and tissues evaluated, the concentration of ACS increases as exposure time increases. The organs with highest uptake of ACS were gill and blood; in muscle, a lesser uptake of the sweetener was observed.

#### 3.2. HPC

Fig. 1 shows the results of HPC. For the *concentration of 0.05 µg L<sup>-1</sup>*, significant increases with regard to the control group ( $p < 0.05$ ) were observed at all exposure times in blood and brain. In liver, significant decreases were observed at 12 and 24 hours, as well as a significant increase at 72 h. In gills, significant increases with regard to the control group at 12, 24 and 48 h, were observed. Finally, in muscle, no significant differences were observed with regard to the control group. In the case of the *concentration of 149 µg L<sup>-1</sup>*, significant increases were observed at 12, 48, 72 and 96 h of exposure for the liver. Likewise, significant increases with regard to the control group ( $p < 0.05$ ) at all exposure times in blood, gills, brain and muscle, were observed. The percentages of increase and decrease are shown in Table 2.

#### 3.3. LPX

The level of lipoperoxidation (LPX) is shown in Fig. 2. For the lowest *concentration (0.05 µg L<sup>-1</sup>)*, significant increases were observed with regard to the control group ( $p < 0.05$ ) at the five exposure times for blood and gill; in liver, a significant increase was also observed at 12 h; in brain, a significant increase with regard to the control group was seen at 12, 72 and 96 h and in muscle, at 12, 24 and 48 h. As for the *concentration of 149 µg L<sup>-1</sup>*, significant increases were obtained with

regard to the control group ( $p<0.05$ ), in blood at 12, 48, 72 and 96 h; in brain and muscle at 24 and 96 h; in gill, significant increases were also observed at all exposure times.

### 3.4. PCC

PCC results are shown in Fig. 3. As for the *concentration of 0.05  $\mu\text{g L}^{-1}$* , a significant increase is observed with regard to the control group ( $p<0.05$ ) in blood and gill at the 5 exposure times; in liver, an increase is observed at 24, 72 and 96 h. Finally, in brain and muscle, significant increases are seen at 24, 48, 72 and 96 h of exposure. For the *concentration of 149  $\mu\text{g L}^{-1}$* , significant increases with regard to the control group ( $p<0.05$ ) were observed in blood, gill and muscle at all exposure times. At 24, 48, 72 and 96 h, significant increases were found in liver and brain.

### 3.5. SOD

Figure 4 shows the results of SOD activity. For the *concentration of 0.05  $\mu\text{g L}^{-1}$* , significant increases were observed with regard to the control group ( $p<0.05$ ) in blood at 12, 48, 72 and 96 h; in liver, at 12 and 72 h; in gill, at 12, 24 and 72 h; in muscle, at 12, 24, 48 and 72 h. However, in the brain, no significant differences were observed at any of the exposure times. As for the *concentration of 149  $\mu\text{g L}^{-1}$* , significant increases with regard to the control group were observed ( $p<0.05$ ) in blood at 12, 24 and 96 h; in liver, at 48, 72 and 96 h; in gill, at 12, 24 and 72 h; in muscle, at 12, 24, 48 and 72 h; in brain, at 12 and 24 h. However, a significant decrease was also observed in the brain at 72 h of exposure.

### 3.6. CAT

The results of CAT antioxidant activity are shown in Fig. 5. Significant increases with regard to the control group were observed ( $p<0.05$ ) at the *concentration of 0.05  $\mu\text{g L}^{-1}$*  at all exposure times for blood, gill and muscle. In liver, a significant increase was observed at 96 h of exposure and in brain at 72 h. As for the *concentration of 149  $\mu\text{g L}^{-1}$* , significant increases with regard to the control group ( $p<0.05$ ) were observed at all exposure times in blood, gill and muscle, while in the brain an increase was observed at 12, 24, 72 and 96 h. Finally, in liver, a significant decrease was observed

at 12 h.

### 3.7. Pearson Correlation

Table 3 shows the correlations found between the oxidative stress biomarkers, exposure times and ACS concentration in the different organs. The values in bold letter indicate a higher degree of correlation between the variables analyzed. All the biomarkers used show a correlation at both exposure concentrations.

## 4. DISCUSSION

Recently, artificial sweeteners have been identified in the environment as emerging contaminants (Lange et al., 2012) and the environmental levels strictly depend on their use in different countries and their degradability. ACS is not eliminated in wastewater treatment plants (WWTPs) and is very persistent in surface waters and even in groundwater due to the fact that it is a highly-hydrophilic compound and is stable at room temperature (Buerge et al., 2011). For this reason, it is considered an ideal chemical marker of domestic wastewaters in the environment. Concentrations of ACS in waste and surface waters have been monitored in multiple studies and show relatively high concentrations (Buerge et al., 2009). The results suggest that ACS is ingested by *Cyprinus carpio*, being detected in decreasing order, in blood, gill, liver, brain and muscle. While the organism does not metabolize this sweetener, ACS is an amphipathic molecule that does not necessarily require specific transport mechanisms in order to penetrate or spread across the phospholipid bilayer of the membrane (Schiffman, 2012; Szakacs et al., 2008). Because of the aforementioned and due to its high stability and resistance to hydrolysis (Lange et al., 2012), this sweetener can bioconcentrate itself in different organs and tissues. Diverse studies which report the presence of sweeteners in fish, such as the study carried out by Saucedo-Vence et al. (2017), who report the presence of SUC in blood, gill, liver and muscle of *Cyprinus carpio*. Lillicrap et al. (2011) also reported an accumulation of the same sweetener in *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* y *Danio rerio*. Despite that the US Food and Drug Administration (FDA) and the public protection agencies

in the European Union and China have demonstrated that ACS is safe for human consumption, diverse studies have demonstrated that this sweetener can generate toxicity (Subedi and Kannan, 2014; Bandyopadhyay et al., 2008). ACS contains, within its structure, the chemical methylene chloride, a known carcinogen. Also, one of its decomposition subproducts within the organism is acetoacetamide, which is toxic at high doses (Findikli and Türkoglu, 2014). Oxidative stress (OS) is a mechanism in which an imbalance exists between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant systems, altering cell metabolism and its regulation, thereby damaging cell components (Lushchak, 2011). The reaction between ROS and lipids is considered one of the most frequent mechanisms of cellular damage and is known as lipid peroxidation, a process of autopropagation in which the peroxy radical is formed when an ROS such as the hydroxyl radical (OH•) has sufficient reactivity to abstract a hydrogen atom from an intact lipid (Halliwell and Gutteridge, 1999). Hydroperoxides are the main products of lipid peroxidation, which afterwards degrade into products of low molecular weight, including MDA (Niki et al., 2005). In this study, an increase in the content of hydroperoxides and MDA is observed (Fig. 1 and 2). This could be explained by the fact that ACS can suffer a photolytic transformation, generating subproducts such as hydroxylated acesulfame, isoacesulfame and amidosulfonic acid (Scheurer et al., 2014).

Hydroxylation is one route of common degradation in photolysis (Salgado et al., 2013). This type of reaction requires oxygen as a substrate, for which the stage of hydroxylation is a process dependent on oxygen (Brunelle et al., 2005). During this process, ROS can be created, which could have generated the damage to lipids, as observed in this study. In addition to the aforementioned, methylene chloride is metabolized by cytochrome P-450 (CYP2E1) (Schlosser et al., 2015; EPA, 2011), also contributing to the generation of ROS in this study. In addition, acetoacetamide has a toxic effect on its own. Our results are consistent with those of others, such as Wiklund et al., 2014, who concluded that SUC induces lipid peroxidation in *Daphnia magna* after its exposure.

Free amino acids and amino acid residues in proteins are highly susceptible to oxidation by one or more ROS (Stadtman and Levine, 2003). In this study, the damage to proteins is evidenced by an

increase in PCC (Fig. 3). The formation of carbonyl compounds has been employed as a protein oxidation marker *in vitro* as well as *in vivo* (Davies, 2005). Damage to the proteins include sulfhydryl group oxidation, reduction of disulfides, the fragmentation of peptides, the modification of prosthetic groups and the nitration of proteins. All these modifications lead to the loss of protein function (Cabisco et al., 2000). The generation of ROS by ACS has been reported by Kim et al. (2015), who reported a major production of ROS in zebra fish embryo and a higher embryo mortality rate when the fish were exposed to a low dose of ACS ( $\text{mg mL}^{-1}$ ). While the mechanism by which ACS generates toxicity is not yet clear, studies have demonstrated that this sweetener generates DNA damage (Findikli and Türkoglu, 2014; Bandyopadhyay et al., 2008; Mukherjee and Chakrabarti, 1997) and a mechanism that induces damage to this macromolecule in aquatic organisms through OS (SanJuan-Reyes et al., 2015; Valavanidis et al., 2006).

The antioxidant defenses may be induced by environmental contaminants in peroxidant conditions, as in the case of SOD and CAT enzymes. In this study, an increase in both enzymes is observed (Fig. 4 and 5), this as a consequence of ROS action. The SOD enzyme participates in the conversion of the superoxide anion ( $\text{O}_2\bullet$ ) into hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Posteriorly, the CAT enzyme converts  $\text{H}_2\text{O}_2$  into water and oxygen (SanJuan-Reyes et al., 2013). However, some decreases in enzyme activity are also observed, which could be explained due to the fact that antioxidant levels initially increase in order to offset oxidative stress, but prolonged exposure leads to their depletion (Bebianno et al., 2005). Diverse authors have reported an increase in antioxidant enzymes SOD and CAT in response to different environmental contaminants (Cortes-Diaz et al., 2017; Saucedo-Vence et al., 2017; San Juan-Reyes et al., 2013; Oviedo-Gómez et al., 2010). Finally, all the biomarkers used in this study showed a correlation at both exposure concentrations (Table 3), for which damage induced by ACS is countered by the defense systems of *Cyprinus carpio*.

#### 4. Conclusions

ACS induces oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*) at the two concentrations of



environmental relevance (0.05 and 149  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), since significant increases were observed in HPC, degree of LPX and PCC in all the organs studied, as well as significant changes in the activity of SOD and CAT antioxidant enzymes. However, more studies are required in order to carry out an evaluation of risk of artificial and natural sweeteners, in particular of ACS, and implement more strict regulations in order to protect the environment.

### **Acknowledgments**

This study was supported by the Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados of the UAEM (SIEA-UAEM, project UAEM 4339/2017/CI)

### **Conflict of interest**

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

### **5. References**

- Arbeláez, P., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M., 2015. Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1393 (1), 106-114.
- Bahndorf, D., Kienle, U., 2004. World Market of Sugar and Sweeteners. [https://www.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/stevia/downloads/World\\_Market\\_Sugar.pdf](https://www.uni-hohenheim.de/fileadmin/einrichtungen/stevia/downloads/World_Market_Sugar.pdf).
- Bandyopadhyay, A., Ghoshal, S., Mukherjee, A., 2008. Genotoxicity testing of low-calorie sweeteners: aspartame, acesulfame-K, and saccharin. *Drug Chem. Toxicol.* 31 (4), 447-457.
- Bassoli, A., Merlini, L., 2003. Sweeteners. In: Caballero, B. (Ed.), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, 2nd ed. Academic Press, Oxford, pp. 5688-5695.
- Bebianno, M.J., Serafim, A., Camus, L., Cosson, R.P., Fiala-Medoni, A., 2005. Antioxidant systems

- and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields. *Aquat. Toxicol.* 75 (4), 354-373.
- 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.
- Brunelle, J.K., Bell, E.L., Quesada, N.M., Vercauteren, K., Tiranti, V., Zeviani, M., Scarpulla, R.C., Chandel, N.S., 2005. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 1 (6), 409-414.
- Büege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52 (1), 302-310.
- Buerge, I.J., Buser, H.R., Kahle, M., Muller, M.D., Poiger, T., 2009. Ubiquitous occurrence of the artificial sweetener acesulfame in the aquatic environment: an ideal chemical marker of domestic wastewater in groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 43 (12), 4381-4385.
- Buerge, I.J., Buser, H.R., Poiger, T., 2011. The artificial sweetener acesulfame as marker of domestic wastewater in groundwater. *IAHS-AISH Publ.* 342 (1), 103-106.
- Burcham, P.C., 2007. Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: a new tool for assessing drug- and chemically-induced oxidative cell injury. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 56 (1), 18-22.
- Cabiscol, E., Tamarit, J., Ros, J., 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* 3 (1), 3-8.
- Cortes-Diaz, M.J.A., Rodríguez-Flores, J., Castañeda-Peñalvo, G., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., Dublán-García, O., Gómez-Oliván, L.M., 2017. Sublethal effects induced by captopril on *Cyprinus carpio* as determined by oxidative stress biomarkers. *Sci. Total Environ.* 605 (1), 811-823.
- Celanese, 2014. Annual report pursuant to section 13 or 15(d) of the securities exchange act of 1934. [http://corpdocs.gmianalyst.com/annual/ar\\_2014\\_105299.pdf](http://corpdocs.gmianalyst.com/annual/ar_2014_105299.pdf).
- Davies, M.J., 2005. The oxidative environment and protein damage. *BBA-Proteins Proteomics* 1703 (2), 93-109.

- EPA, 2011. Toxicological Review of Dichloromethane (Methylene Chloride). [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris\\_documents/documents/toxreviews/0070tr.pdf](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/0070tr.pdf).
- Findikli, Z., Türkoglu, S., 2014. Determination of the effects of some artificial sweeteners on human peripheral lymphocytes using the comet assay. *J. Toxicol. Env. Health Sci.* 6 (8), 147-153.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free radicals in medicine and biology*. Oxford University Press. Clarendon, Oxford.
- Huang, D.J., Zhang, Y.M., Song, G., Long, J., Liu, J.H., Ji, W.H., 2007. Contaminants-induced oxidative damage on the carp *Cyprinus carpio* collected from the upper Yellow River, China. *Environ. Monit. Assess.* 128 (1-3), 483-488.
- Huidobro, A., Pastor, A., Tejada, M., 2000. Quality index method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *J. Food Sci.* 65 (7), 1202-1205.
- Jiang, Z.Y., Hunt, J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202 (2), 384-389.
- Kelly, K.A., Havrilla, C.M., Brady, T.C., Abramo, K.H., Levin, E.D., 1998. Oxidative stress in toxicology: established mammalian and emerging piscine model systems. *Environ. Health Perspect.* 106 (7), 375-384.
- Kim, J.Y., Park, K.H., Kim, J., Choi, I., Cho, K.H., 2015. Modified high-density lipoproteins by artificial sweetener, aspartame, and saccharin, showed loss of anti-atherosclerotic activity and toxicity in zebrafish. *Cardiovasc. Toxicol.* 15 (1), 79-89.
- Kokotou, M.G., Asimakopoulos, A.G., Thomaidis, N.S., 2012. Artificial sweeteners as emerging pollutants in the environment: analytical methodologies and environmental impact. *Anal. Methods* 4 (10), 3057-3070.
- Kokotou, M.G., Thomaidis, N.S., 2013. Determination of eight artificial sweeteners in wastewater by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal.*

Methods 5 (16), 3825-3833.

Lange, F.T., Scheurer, M., Brauch, H.J., 2012. Artificial sweeteners—a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (9), 2503-2518.

[Leatherhead Food Research Association](#), 2014. Future Directions for the Global Functional Foods Market. Unknown Publisher.

Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233 (1), 346-357.

Lillicrap, A., Langford, K., Tollefsen, K.E., 2011. Bioconcentration of the intense sweetener sucralose in a multitrophic battery of aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 30 (3), 673-681.

Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101 (1), 13-30.

Magnani, L., Gaydou, M., Jean, C.H., 2000. Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. *Anal. Chim. Acta* 411 (1-2), 209-216.

Marcon, J.L., Filho, W.D., 1999. Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminidae) from the Amazon. *Comp. Biochem. Physiol. C-Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 123 (3), 257-263.

Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 47 (3), 469-474.

Mukherjee, A., Chakrabarti, J., 1997. *In vivo* cytogenetic studies on mice exposed to acesulfame-K—a non-nutritive sweetener. *Food Chem. Toxicol.* 35 (12), 1177-1179.

Müller, C.E., Gerecke, A.C., Alder, A.C., Scheringer, M., Hungerbühler, K., 2011. Identification of perfluoroalkyl acid sources in Swiss surface waters with the help of the artificial sweetener acesulfame. *Environ. Pollut.* 159 (5), 1419-1426.

- Nelson, J.S., 1994. Fishes of the world. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N., 2005. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 (1), 668-676.
- Oviedo-Gómez, D.G.C., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Razo-Estrada, C., Gómez-Oliván, L.M., 2010. Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 29 (1), 39-43.
- Parvez, S., Raisuddin, S., 2005. Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20 (1), 112-117.
- Perkola, N., Sainio, P., 2014. Quantification of four artificial sweeteners in Finnish surface waters with isotope-dilution mass spectrometry. *Environ. Pollut.* 184 (1), 391-396.
- Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D., Freeman, B.A., 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266 (32), 22028-22034.
- Salgado, R., Pereira, V. J., Carvalho, G., Soeiro, R., Gaffney, V., Almeida, C., Cardoso, V.V., Ferreira, E., Benoliel, M.J., Ternes, T.A., Oehmen, A., Reis, M.A.M., Noronha, J.P., 2013. Photodegradation kinetics and transformation products of ketoprofen, diclofenac and atenolol in pure water and treated wastewater. *J. Hazard. Mater.* 244 (1), 516-527.
- Sang, Z., Jiang, Y., Tsoi, Y. K., Leung, K.S.Y., 2014. Evaluating the environmental impact of artificial sweeteners: a study of their distributions, photodegradation and toxicities. *Water Res.* 52 (1), 260-274.
- SanJuan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Islas-Flores, H., González-González, E.D., Cardoso-Vera, J.D., Jiménez-Vargas, J.M., 2015. NSAID-manufacturing plant effluent induces geno-and cytotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*). *Sci. Total Environ.* 530 (1), 1-10.
- SanJuan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., García-Medina, S., Islas-Flores, H., Neri-Cruz, N., 2013. Effluent from an NSAID-manufacturing plant in

- Mexico induces oxidative stress on *Cyprinus carpio*. *Water Air Soil Pollut.* 224 (9), 1-14.
- Saucedo-Vence, K., Elizalde-Velázquez, A., Dublán-García, O., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., SanJuan-Reyes, N., García-Medina, S., Hernández-Navarro, M.D., Gómez-Oliván, L.M., 2017. Toxicological hazard induced by sucralose to environmentally relevant concentrations in common carp (*Cyprinus carpio*). *Sci. Total Environ.* 575 (1), 347-357.
- Scheurer, M., Schmutz, B., Happel, O., Brauch, H.J., Wülser, R., Storck, F.R., 2014. Transformation of the artificial sweetener acesulfame by UV light. *Sci. Total Environ.* 481 (1), 425-432.
- Schiffman, S.S., 2012. Rationale for further medical and health research on high-potency sweeteners. *Chem. Senses* 37 (8), 671-679.
- Schlosser, P.M., Bale, A.S., Gibbons, C.F., Wilkins, A., Cooper, G.S., 2015. Human health effects of dichloromethane: key findings and scientific issues. *Environ. Health Perspect.* 123 (2), 114-119.
- Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acids* 25 (3-4), 207-218.
- Subedi, B., Kannan, K., 2014. Fate of artificial sweeteners in wastewater treatment plants in New York State, USA. *Environ. Sci. Technol.* 48 (23), 13668-13674.
- Szakacs, G., Varadi, A., Özvegy-Laczka, C., Sarkadi, B., 2008. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov. Today* 13 (9-10), 379-393.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotox. Environ. Safe.* 64 (2), 178-189.
- Wiklund, A.K.E., Adolfsson-Erici, M., Liewenborg, B., Gorokhova, E., 2014. Sucralose induces biochemical responses in *Daphnia magna*. *PloS one* 9 (4), e92771.
- Zyglis, A., Wasik, A., Namieśnik, J., 2009. Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. *TrAC Trends Anal. Chem.* 28 (9), 1082-1102.

## Figure captions

**Fig. 1.** HPC in blood, liver, gill, brain and muscle of *C. carpio* exposed for 12, 24, 48, 72 and 96 h to ACS concentrations of 0.05  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 149  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Values are the mean of three replicates  $\pm$  SEM. CHP = cumene hydroperoxide. Significantly different ( $p < 0.05$ ) from: \*control group; <sup>a</sup>12 h; <sup>b</sup>24 h; <sup>c</sup>48 h; <sup>d</sup>72 h; <sup>e</sup>96 h;. ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test.

**Fig. 2.** LPX in blood, liver, gill, brain and muscle of *C. carpio* exposed for 12, 24, 48, 72 and 96 h to ACS concentrations of 0.05  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 149  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Values are the mean of three replicates  $\pm$  SEM. MDA = malondialdehyde. Significantly different ( $p < 0.05$ ) from: \*control group; <sup>a</sup>12 h; <sup>b</sup>24 h; <sup>c</sup>48 h; <sup>d</sup>72 h; <sup>e</sup>96 h;. ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test.

**Fig. 3.** PCC in blood, liver, gill, brain and muscle of *C. carpio* exposed for 12, 24, 48, 72 and 96 h to ACS concentrations of 0.05  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 149  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Values are the replicates  $\pm$  SEM. C=O = reactive carbonyls. Significantly different ( $p < 0.05$ ) from: \*control group; <sup>a</sup>12 h; <sup>b</sup>24 h; <sup>c</sup>48 h; <sup>d</sup>72 h; <sup>e</sup>96 h;. ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test.

**Fig. 4.** SOD activity in blood, liver, gill, brain and muscle of *C. carpio* exposed for 12, 24, 48, 72 and 96 h to ACS concentrations of 0.05  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 149  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Values are the mean of three replicates  $\pm$  SEM. IU = international units. Significantly different ( $p < 0.05$ ) from: \*control group; <sup>a</sup>12 h; <sup>b</sup>24 h; <sup>c</sup>48 h; <sup>d</sup>72 h; <sup>e</sup>96 h. ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test.

**Fig. 5.** CAT activity in blood, liver, gill, brain and muscle of *C. carpio* exposed for 12, 24, 48, 72

and 96 h to ACS concentrations of 0.05  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 149  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Values are the mean of three replicates  $\pm$  SEM. Significantly different ( $p < 0.05$ ) from: \*control group; <sup>a</sup>12 h; <sup>b</sup>24 h; <sup>c</sup>48 h; <sup>d</sup>72 h; <sup>e</sup>96 h; <sup>\*</sup> ANOVA and Bonferroni *post-hoc* test.



## Carta de envío

**De:** Journal of Food Measurement and Characterization (SEIN) <[em@editorialmanager.com](mailto:em@editorialmanager.com)>

**Para:** Octavio Dublán-García <[octavio\\_dublan@yahoo.com.mx](mailto:octavio_dublan@yahoo.com.mx)>

**Enviado:** lunes, 21 de enero de 2019 23:08:50 GMT-6

**Asunto:** SEIN-D-19-00127 - Submission Confirmation

Dear Dr Dublán-García,

Thank you for submitting your manuscript, Impact of exposure of Acesulfame potassium on physicochemical and textural properties of *Cyprinus carpio*, to Journal of Food Measurement and Characterization.

The submission id is: SEIN-D-19-00127

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal website.

Your username is: octavio\_dublan

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/sein/>.

Should you require any further assistance please feel free to e-mail the Editorial Office by clicking on "Contact Us" in the menu bar at the top of the screen.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office

Journal of Food Measurement and Characterization

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on [www.springer.com/openchoice](http://www.springer.com/openchoice)). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to [www.springer.com/oafunding](http://www.springer.com/oafunding). Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please email our publication office, stating the journal name(s) and your email address(es): [PublicationOfficeSPS@springernature.com](mailto:PublicationOfficeSPS@springernature.com)

**Impact of exposure of Acesulfame potassium on physicochemical and textural properties of *Cyprinus carpio***

**Running title: acesulfame-K effect on the quality of the muscle of *Cyprinus carpio***

Claudia Cruz-Rojas<sup>a</sup>, Leobardo Manuel Gómez-Oliván<sup>a</sup>, María Paulina Aideé Gracia Fuentes-Benites<sup>b</sup>, Hariz Islas-Flores<sup>a</sup>, María Dolores Hernández-Navarro<sup>a</sup>, Octavio Dublan-García<sup>a\*</sup>

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

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

\*Corresponding author:

**Octavio Dublán-García;** Email: octavio\_dublan@yahoo.com.mx; odublang@uaemex.mx. Corresponding Author's Address: Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Km. 15 Carr. Toluca-Ixtlahuaca. El Cerrillo Piedras Blancas, C. P. 50200 Toluca, México. Telephone +(52) 7222965514; fax +(52) 7222173890

## ABSTRACT

Acesulfame-K is an artificial sweetener used in America and Europe, and has been detected in a great variety of aquatic environments. This product is considered as safe for human use, but the effects on the species that are present in the ecosystems have not yet been well-studied. The artificial sweetener such as acesulfame-K produce oxidizing agents that can damage proteins. Carbonylation is one of the markers used for determining damage to oxidized proteins, which could be carried out by direct oxidation of lysine, arginine, proline and treonine residues. They could also be introduced by aldehyde reactions (malonaldehyde, 4-hydroxy-2-nonenal) produced during lipoperoxidation or the incorporation of a carbonyl group to a protein when making lysine residues react with reductive sugars or with their oxidation products. In addition to the changes produced by the oxidizing agents in the proteins, there may also be alterations in the physicochemical and textural characteristics of the common carp muscle (*Cyprinus carpio*), therefore, it is necessary to carry out a study to evaluate the effect of acesulfame-k on these characteristics.

**Keywords:** Acesulfame-K; *Cyprinus carpio*; oxidizing agents; physicochemical properties; texture.

**Abbreviations:** emerging contaminants (EC), low-calorie sweeteners (LCS), sucralose (SCL), neohesperidin dihydrochalcone (NHDC), neotame (NEO), cyclamate (CYC), aspartame (ASP), potassium acesulfame (ACE K), reactive oxygen species (ROS), carbonylated protein content (PCC), malondialdehyde (MDA), lipoperoxidation (LPX), dinitrophenylhydrazine (DNPH).

## Introduction

Due to the elevated consumption of processed, cheap foods, with high caloric content and low nutritional value, the Imperial College London and WHO [1] report that in the last four decades, worldwide, the number of children and adolescents with obesity, with ages between 5 and 19 years of age, indicating that, if these tendencies were maintained, by year 2022, this number would increase; reason for which, in recent years, the food industry has taken interest in low-calorie sweeteners (LCS) as an aid in weight loss, use in persons with diabetes mellitus, for improvement in flavor and reduction in caloric intake [2], for which LCSs are found in common form in products such as soda, snacks, cereals and dairy personal care products and drugs [3], in all the world, it is expected that the LCS market will reach 2.2 billion by 2020, with a compound annual growth rate (CAGR) of 5.1% [4]. LCSs can be divided in two categories: natural sweeteners and artificial sweeteners, being the latter employed since the 1950s, it introduced the first generation of artificial sweeteners which were saccharine, cyclamate and aspartame. Later on, the so-called "new generation" was synthesized, which were sucralose (SCL), alitame, neotame (NEO) and potassium acesulfame (ACE K). Nonetheless, there is no type of sweetener legislation with regard to the environment. Of all artificial sweeteners, the scientific studies carried out up to this moment had been especially centered around cyclamate (CYC), sucralose (SCL) and potassium acesulfame (ACE K), due to two reasons: the first, its high concentrations in water and land, and the second, its limited elimination in waste waters.

ACE K (5, 6 dimethyl 1, 2, 4 oxathiacine-4(3H) one 2-2 dioxide), is an artificial sweetener free of calories, commonly known as Sunett® and Sweet One®, which was discovered in 1967. It has a white crystalline structure and is approximately 180-200 times more sweet than saccharose [5], present great stability with the passing of time, temperature (225 °C) and pH (pH of 3.0-3.5 at 20 °C). Besides, it is also easily soluble in water (270g/L) [6]. This compound is not metabolized by the human body, for which its excretion in urine and feces happens without alterations [7]. After being excreted by human beings, it reaches city discharges from

industrial activities. This sweetener, as well as others, present resistance to conventional treatments carried out in water treatment plants and, as a consequence, reaches soils and river waters [8]. The presence of ACE K has been reported in superficial waters, from effluents of water treatment plants, and in sub-soil water. On a global scale, concentrations from 10 µg / L in effluents and waste water treatment plants (PTAR), have been reported in more than 20 countries to a maximum concentration of 2.5 mg/L [9, 10]. As a consequence, ACE K can be ubiquitously detected in rivers and subterranean waters with anthropogenic influence, with two-digit concentrations in superficial waters [11]. ACE K was also found in tap water in Switzerland, Germany, China and Canada with concentrations of 2.6 µg / L, 7 µg / L, 0.8 µg / L y 1.6 µg / L, respectively [12-15].

Despite the fact that ACE K concentrations are amongst the highest for anthropogenic contaminant traces which are found in superficial waters, subterranean waters and tap water, the levels are at least three orders of magnitude less than the values of organoleptic detection [16]. These contaminants are not called "emerging" for being new in terms of discovery, but because they had previously not been recognized and lacked the standards and directives for their environmental monitoring and have recently gained scientific attention due to its effects over health [17] of humans as well as aquatic organisms, including hormonal interference in fish, genotoxicity, carcinogenicity in laboratory animals, endocrine interruption and immunotoxicity [18]. Evidences indicate that these contaminating agents, once having reached bodies of water, can unleash a process of oxidative stress through the production of reactive oxygen species (ROS) in organisms that live there, and are responsible for effects over cells and tissues associated to mutagenesis and carcinogenesis, as well as muscle oxidation [19, 20].

The oxidation of macromolecules is one of the main causes of meat quality deterioration. It becomes susceptible to oxidative deterioration due to high concentrations of unsaturated lipids, heme pigments, metallic catalyzers and a gamma of oxidizing agents in muscle tissue. Oxidative deterioration in any type of meat manifests itself in the form of discoloration, development of an unsavory

taste, formation of toxic compounds, reduction of shelf-life and nutrients, as well as losses from leaks [21]. It has been found that the myofibrillar protein is affected by ROS during maturation and the storage of meat [22], affecting the tenderness of the meat and the acceptance on behalf of the consumer. Thus, the objective of the present study was to evaluate the oxidative effect of potassium acesulfame on the physicochemical and textural characteristics of the meat of *Cyprinus carpio*.

## **METHODOLOGY**

### **MATERIALS AND METHODS**

#### **Collection and maintenance of the carp (*Cyprinus carpio*)**

The carps with a length of  $18.39 \pm 0.31$  cm and a weight of  $50.71 \pm 7.8$  g were obtained from the Tiacaque aquatic center, in Estado de México, and were transported to the laboratory in polyethylene bags, which contained oxygenated water. Posteriorly, it was acclimatized to the test conditions during 45 days prior to experimentation, being fed with Pedregal Silver Corp <sup>MR</sup>. Three quarters of the water was replaced every 24 hours in order to maintain a healthy environment. The physicochemical characteristics of tap water were kept at the following conditions [temperature of  $20 \pm 2$  °C; oxygen concentration of 80-90%; pH of 7.5-8.0, total alkalinity of  $17.8 \pm 7.3$  mg/L; total hardness of  $18.7 \pm 0.6$  mg/L]. The carp was kept in natural cycles of light and darkness.

Fifteen test systems were mounted, which consisted of water which had the same characteristics and conditions employed in the acclimatization and maintenance of the carp. The ACE K was used at two concentrations ( $0.05$  and  $155 \mu\text{g L}^{-1}$ ), relevant concentrations for the aquatic environment were reported by Arbeláez et al. [23]. The exposure periods were 12, 24, 48, 72 and 96 h and a control system which did not contain ACE K was used for each exposure period.

### **Obtention of the muscle of common carp**

Once the exposure time had transpired, a common carp muscle extraction with no scales or fish bones were carried out. A mixture composed of the muscle of five organisms was prepared. Subsequently, it was stored at -70 °C for its posterior physicochemical and textural evaluation.

### **Determination of total protein**

The total protein was determined by the Bradford method [24]. At 25 µL of supernatant, 75 µL of deionized water and 2.5 mL of Bradford reagent were added [0.05 g of Coomassie Blue colorant (Sigma-Aldrich), 25 mL of 96% ethanol (Sigma-Aldrich) and 50 mL of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich), in 500 mL of deionized water]. The sample was stirred and was left to rest for 5 minutes. Posteriorly, an absorbance reading at 595 nm was obtained, for the interpolation of a bovine albumin curve (Sigma-Aldrich). All determinations were carried out in triplicate.

### **Determination of carbonylated proteins (PCC)**

PCC was determined by the Levine et al. [25], with modifications from Burcham [26]. To 100 µL of supernatant, 150 µL of 10 mM DNPH (Sigma-Aldrich) in 2 M HCl was added. The solution obtained was left to rest at room temperature for 1 h in darkness. Afterwards, 500 µL of a solution of 20% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich) were added, leaving it to rest for 15 minutes at 4 °C. The mixture was centrifuged at 1, 100 g x 5 min. The button was washed 3 times with a mixture of ethanol: ethyl acetate (1:1) and was afterwards dissolved in 1 mL of a 6 M guanidine solution (Sigma-Aldrich) (pH = 2.4) and incubated at 37 °C/35 min. The absorbance was determined at 366 nm. The results were expressed as micromoles of reactive carbonyls (C=O) formed per milligram of protein, using 21 M MEC/cm. All determinations were carried out in triplicate.

### **Determination of Lipoperoxidation (LPX)**

In order to evaluate LPX, the method described by Beuge and Aust [27] was used. Briefly, to 100 µL of sample (without centrifuging) were added with 9000 µL of Tris-

HCl and with 2 mL of a mixture of thiobarbituric acid and trichloroacetic acid in a 0.375% proportion of the first and 15% of the second. Thermal shock was induced by submerging the tubes in boiling water and leaving it to rest in a water bath at 37 °C for 30 min. The tubes were centrifuged at 3500 g x 10 min. The samples were read with an absorbance of 535 nm, using a 1.0 M, pH 7.4 phosphate-buffered saline solution (PBS), which was treated in the same manner as the test samples. The results obtained are expressed as mM of malonaldehyde/mg proteins, using the molecular extinction coefficient (MEC) of  $1.56 \times 10^5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . All determinations were carried out in triplicate.

### **Total sulfhydryl content (-SH)**

The total sulfhydryl content (-SH) was determined by the method reported by Ellman [28]. At aliquots of 1 mL of dissolution of myofibrillar proteins (MP) (5 mg/mL), 9 mL of Tris-glycine buffer (10.4 g of Tris-HCl, 6.9 g of glycine, 480 g of urea and 1.2 g of EDTA/l at pH 8.0) at room temperature for 30 min. A volume of 0.05 mL of Ellman reagent, which contained 4 mg of 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (DTNB) / mL and were made to react in darkness for 30 min. The mixture was determined at 412 nm, using a TU-1800 spectrophotometer (Beijing Purkinje General Instrument Co. Ltd., Beijing, China). The -SH concentration was expressed as  $\mu\text{M}$  of SH /mg total protein. All determinations were carried out in triplicate.

**pH measurement.** Was determinate by Fennema [29]. Ten grams of muscle were mixed in 90 mL of distilled water. They were liquefied until obtaining a consistent and uniform paste. The temperature of the past was adjusted to  $20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Finally, pH was determined with a previously-calibrated potentiometer. All determinations were carried out in triplicate.

**Water Holding Capacity (WHC).** WHC was determined by modified method by Dublán-García et al. [30]. Briefly, 20 g of muscle were diced, placing 5 g if the mixture separately in centrifuge tubes. Eight milliliters of a 0.6 M NaCl solution, stirring with a glass rod for 1 minute in an ice bath. It was left to cool for 30 min.



Afterwards, it was once again stirred for 1 min. It was posteriorly centrifuged for 20 min at 3500 rpm at 4 °C in an Eppendorf 5810R (15Amp, USA version). It was decanted and the supernatant was measured, reporting the volume of NaCl retain in 100 g of sample.

**Solubility.** Solubility was determined through the technique proposed by Pilosof [32]. Samples of myofibrillar proteins (5 mg/mL, at pH 7) were centrifuged for 15 min at 3500 rpm at 4 °C, in order to avoid denaturalization. The supernatant obtained was analyzed for protein concentration by the biuret method cited by Dublán-García et al. [31], reporting the solubility as a relationship between the protein content of the supernatant and the protein content of the sample without centrifuging, and multiplied by 100).

### **Extraction of myofibrillar proteins**

The extraction of myofibrillar proteins (MP) was carried out using the technique reported by Ngapo et al. [33], with slight modifications. One-hundred grams of common carp muscle were homogenized in 100 mL of 25 mM phosphate buffer (pH 7) and 0.9% of NaCl at 4 °C and 200 mL of distilled water. The extract obtained was poured into a 1L beaker in an ice bath. It was kept under continuous stirring for 15 min. Afterwards, it was filtered to remove connective tissue. The homogenized sample was centrifuged (Eppendorf 5810 R-centrifuge, Germany) at 3500 rpm for 15 min at 4 °C. Protein concentration by the biuret method was used on the precipitate obtained.

### **Textural Profile Analysis (TPA)**

Myofibrillar protein solution obtained as previously described was placed in test tubes (30-mm diameter, 35-mm height) and heated in a H<sub>2</sub>O bath. Temperature was gradually increased at 1 °C/min up to 70 °C. The samples were then placed on ice for 30 min and stored at 4 °C for 12 h. The test tubes with gelled proteins

were penetrated 70% of their height with an 8-mm cylindrical probe at 1 mm/s. Analysis was carried out on a TA-XT2 texture analyzer (Texture Technologies) fitted with a 49-N load cell and Texture Expert version 1.20 software (Stable Micro Systems) According to Dublán-García et al. [31]. All determinations were carried out in at least 10 replicates.

## **Electrophoresis**

The samples of the gels obtained were analyzed by SDS-PAGE, using the technique reported by Garcia-Carreño and Haard [34], with modifications. Fifteen-microliter sample volumes were used, as well as markers of molecular weight. The analysis was carried out under a constant current of 200 volts, using a Mini-PROTEAN® Tetra Cell electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) The samples were fixed with a 20% methanol and 0.5% formaldehyde solution for 30 min. A solution of 40% methanol, 15% acetic acid and 0.1% Coomassie® brilliant blue R-250 was used for the stain.

## **Statistical analysis**

The results were evaluated statistically through one-directional variance analysis (ANOVA), and the differences between the means were compared through the Bonferroni test of multiple comparisons, with  $p < 0.05$ . The differences with regard to time were the blanks. A Pearson correlation analysis was also carried out. The statistical analysis were carried out via the SPSS v10 software (SPSS, Chicago IL, USA).

## **RESULTS**

In figure 1, the carbonylated protein content can be observed, showing a significant increase with regard to the control ( $p < 0.05$ ) in muscle at 12, 24, 48, 72 and 96 h at the concentration of 0.05 µg/L ACE K (116.24, 119.1, 175.2, 241.2 and 325.7% respectively) and for the concentration of 155 µg/L ACE K at 12, 24, 48 y 72

h (123, 240.3, 335.6, 337.9 and 565.9%, respectively), presenting a significant increase with regard to the control.

In figure 2, the degree of lipoperoxidation can be observed, showing a significant increase with regard to the control ( $p < 0.05$ ) in muscle at 12, 24, 48, 72 y 96 h at a concentration of 0.05  $\mu\text{g/L}$  (16.5, 19.8, 25.01, 27.32 and 33.92%, respectively), and for the concentration of 155  $\mu\text{g/L}$  at 12, 24, 48 y 72 h (31.2, 44.1, 59.5, 67.09 and 77.6%, respectively), presenting a significant increase with regard to the control.

Figure 3 shows the content of sulfhydryl groups, observing a significant decrease with regard to the control ( $p < 0.05$ ) for the concentration of 0.05  $\mu\text{g/L}$  at the five exposure times (12, 24, 48, 72 and 96 h), having the following values: 58.4, 54.6, 49.6, 41.1 and 39%, respectively, as well as for the concentration of 155  $\mu\text{g/L}$ , in which a significant decrease with regard to the control of the five exposure times gave the following values: 31.6, 29.4, 28.6, 22.8 and 19.5%, respectively.

In figure 4, a decrease in pH at the five exposure times (12, 24, 48, 72 and 96 h) can be observed for both concentrations with regard to the control, having a dropping percentage for concentration 0.05  $\mu\text{g/L}$ , of 0.6, 1.3, 3.9, 5.3 and 8.2, respectively, and for the concentration of 155  $\mu\text{g/L}$ , the values of 0.9, 2.6, 4.2, 6.4 and 8.9% respectively.

In figure 5, the water retention capacity is shown; showing a significant decrease with regard to the control ( $p < 0.05$ ) for the concentration of 0.05  $\mu\text{g/L}$  at 12, 24, 48, 72 and 96 h, having the following values: 98.12, 88.51, 83.21, 79.68 and 71.5 %, respectively); for the concentration of 155  $\mu\text{g/L}$ , the following values were observed at different exposure times: 96.58, 83.54, 81.23, 76.21 and 65.42 %, respectively).

Figure 6 shows the solubility behavior, presenting a significant decrease with regard to the control ( $p < 0.05$ ) at the five exposure times (12, 24, 48, 72 and 96 h), having a percentage for 0.05  $\mu\text{g/L}$ , of 0.427, 0.81, 19.07, 51.75 and 52.75%, respectively, and for the concentration of 155  $\mu\text{g/L}$ , with 0.83, 0.51, 35.64, 59.69 y 56.47%, respectively.

In figure 7, the effect induced by ACE K over the homogenized muscle proteins of *Cyprinus carpio*, is shown, exposed and non-exposed. For both concentrations, it is observed through SDS-PAGE, where the intensity of the protein bands of the portion of the MHC (which is the main protein responsible for the formation of the protein network) and of actin diminished at 96 hours of exposure for both concentrations, being most notable at the concentration of 155 µg/L.

Table 1 shows the behavior of the texture profile analysis, exhibiting a significant increase in hardness, cohesivity and gumminess with regard to the control ( $p < 0.05$ ) for both concentrations at the different exposure times (12, 24, 48, 72 and 96 h). For the elasticity and chewability, a significant decrease with regard to the control ( $p < 0.05$ ) for both concentrations (0.05 µg/L and 155 µg/L) at the different exposure times (12, 24, 48, 72 and 96 h).

## **Discussion of results**

### **Chemical and functional properties**

#### **PCC and LPX content**

Carbonylated proteins have been used as biomarkers for xenobiotic effects in fish [19-20, 36-39]. Bagnyykova et al. [40] have quantified these in goldfish exposed to iron and arsenite, Likewise, Carrillo et al. [41] measured proteic carbonyls in zebrafish exposed to copper and to different types of nanoparticles. In the present study, *Cyprinus carpio* exposed to ACE K at both concentrations (0.05 y 155 µg/L) showed that during the exposure time, there was protein and lipid oxidation, with an increase in the exposure time (12 to 96 h), being dose-dependent. Studies carried out by Tkachenko and Grudniewska [42] observed that when rainbow trout were exposed (*Oncorhynchus mykiss walbaum*) to xenobiotics, it provoked oxidative stress in organs of this species, which is the same behavior observed in the presence of diclofenac [19] and for emerging contaminants [20] in common carp (*Cyprinus carpio*). The carbonylation of proteins in this study, provoked by ACE K, could imply the formation of carbonyl residues (-C=O) in the side chains of

the amino groups, being the residues of aminoacids such as leucine, valine, isoleucine and proline, the most susceptible to this type of oxidation, as is mentioned by Grune [43]. Carbonylation has also been observed in lysine and arginine, for which an increase in the quantity of carbonyl groups has a correlation with damage in the protein, caused by the presence of xenobiotics [36-39], as can be seen in figure 1. The carbonyl groups can be introduced into the proteins through different means, such as catalyzed oxidation by metals, through the adduction of oxidized lipids, or through sugars which contain carbonyls [44]. The carbonylated proteins can also be formed through secondary mechanisms resulting from reactions of the free radicals with other cell components such as lipids, carbohydrates and nucleic acids [43]. It has been described that the final product of lipid peroxidation is a cytotoxic compound which is a result of oxidative stress, is 4-hydroxynonenal (4-HNE), which is rapidly formed in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, can react with functional groups such as lysyl, histidyl or sulfhydryl of proteins in order to form derivatives with functions of an aldehyde, as has been reported by Stadtman and Levine [45]. Likewise, malonaldehyde (MDA), which is an oxidation product of poly-unsaturated fatty acids (PUFA)s [46], which contain two aldehyde groups which can react with α-amino groups from the lysine of proteins in order to produce carbonylated proteins (reason for which, in this study, the increases seen in results with regard to the PCC and LPX content, induced by ACE K in both concentrations for different exposure times in common carp (figures 1 and 2, respectively) could show the effects of this xenobiotic over the physicochemical and textural properties of the muscle. Some studies on oxidative stress and environmental contaminants by the xenobiotics derived from anthropogenic activities of human beings, include drugs and their metabolites [39]. Sweeteners such as saccharose [47] and exposure to heavy metals [20], [48] could lead to oxidative stress through the action of enzymes, such as CYP (CYP3A, CYP2D) NAD (P) H oxidases and flavoprotein oxidases, through oxidation systems catalyzed by metal or via cyclical redox [45, 49], for which, as xenobiotics come into contact with the aquatic environment, the toxic effects could increase, which could provoke changes in the structural properties of the proteins, including modification of the side chains of aminoacids, formation of polymeric proteins, increase in the

carbonyl group content, proteolytic susceptibility, loss of solubility and probably decrease in its nutritional contribution [50].

### **Total sulfhydryl content (-SH)**

In the present study, it was observed that ACE K had a significant effect on sulfhydryl groups ( $p < 0.05$ ), observing a decrease in the same for both concentrations at different exposure times (Figure 3), having a greater decrease for the concentration of 155 µg/L. This effect could be due to oxidation and, as a consequence, the decrease in sulfhydryl groups this probably being due to the fact that during the exposure time of this sweetener, as an oxidizing system, induced the conversion of the sulfhydryls to disulfide bonds, since Park et al. [51] mention that this is one of the earliest observable events during radical oxidation of the proteins, the thiol group of the cysteine localized at the catalytic center of the myosin head is perhaps the most susceptible residue to radical oxygen and hydrogen peroxide, being the first in being oxidized [52], leading to the formation of a series of oxidized products such as sulfenic acid (CysSOH), sulfinic acid (CysSO<sub>2</sub>H), and sulfonic acid (CysSO<sub>3</sub>H) [53]. Likewise, a fragmentation of proteins [54] (Fig. 7); reason for which, in this study, oxidation of the protein could lead to conformational changes, which could affect its biological functions [50], [55], the formation of disulfide bonds in the tertiary configuration of the proteins being relevant, provoking muscle rigidity, for which an oxidation due to ACE K after 12 h of exposure could lead to extensive structural changes, aggregation and degradation of proteins and proteolytic susceptibility [56].

### **pH and WHC**

Figure 4 shows a significant decrease in pH for both concentrations of ACE K. This decrease could be due to the accumulation of lactic acid produced by anaerobic glycolysis, which is carried out in muscle, which decreases pH values. The quantity of lactic acid produced is related to the quantity of glycogen stored

in tissues, being the main source of energy in animals; however, [57, 20], observed that the decrease of this compound is also a response of oxidative stress induced by pesticides, metals and effluents, including emerging contaminants. The WHC is defined as the ability of meat to maintain its own and added water after an external force is applied [50], is a qualitative parameter important to the food industry for sensorial attributes, as well as the influence of the product during its processing or storage. In figure 5, a decrease in WHC can be observed as an increase over exposure time. This could be due to protein oxidation being an important restricting factor for the capability of myofibrils to absorb water, according to [58, 59] thus, there is a decrease in this parameter.

### **Solubility**

The functional properties of fish as a food matrix, reflects the biochemical characteristics of the myosin, being this the main component of myofibrillar proteins, for which the functional stability of the fish meat is related to the behavior of myosin [60], for which its oxidation causes multiple physicochemical changes, including the destruction of aminoacids, the decrease in solubility due to polymerization of the proteins [58], the hydrophobicity, the capability of water retention and the functions of jellification [61]. For this study, the solubility of the proteins (Fig. 6) did not have a significant difference with regard to the control at 12 h in both concentrations (0.05 $\mu$ g/L and 155  $\mu$ g/L), but starting from the exposure times of 24, 48, 72 and 96 hours ( $p < 0.05$ ). In this case, the damage of the proteins by ACE K, could causes multiple physicochemical changes in proteins including amino acid destruction, decreases in protein solubility due to protein polymerization be leading to the formation of new bonds [54], in the same way, a direct consequence of these physicochemical modifications, a shift of the balance between protein intramolecular interactions and protein–water interactions would take place, causing a loss of protein solubility having [22].

### **Electrophoresis**

SDS-PAGE exhibits a decrease in myosin once exposure time had transpired, as can be seen in figure 7, as well as the appearance of bands of low molecular weight. This could be due to the fact that myosin is perhaps one of the most susceptible to the oxidation process, being generally the first in being oxidized. The decrease of sulfhydryl groups and the formation of disulfide bonds could be the cause of the textural changes, observed in the electrophoretic profile, which can be owed to the presence of ACE K, which proved to be an oxidizing factor, independently from the concentration used. The observed changes are similar to the behavior of the carp fillet stored at freezing temperatures for extended times [22], or in the presence of an oxidizing agent in carp [64].

## **TPA**

The determination of texture is an important property for the technological processing and is a good indicator of the textural properties of the myofibrillary proteins of the muscle, because it not only affects the sensory attributes, but also the textural. TPA was carried out for both concentrations at different exposure times, showing significant differences ( $p < 0.05$ ) with regard to the control for: hardness, cohesiveness, elasticity, chewability and gumminess. Badii et al. [64] reported a decrease in hardness, elasticity and chewability during the first 48 hours of exposure and suggested these could be related to the denaturation of the protein due to a greater number of hydrogen bonds in the protein matrix, which also explains the decrease in the water retention capacity [58, 59]. By 72 hours, there was an increase in cohesiveness and chewability, which would be indicating the formation of disulfide bonds [51-53].

## **Conclusions**

A great number of xenobiotics which are present in the environment as a result of anthropogenic activity of human beings can lead to an increase in the production of reactive oxygen species (ROS) in the cells of the species exposed, for which, as



xenobiotics come into contact with the aquatic environment, the toxic effects could increase, which could provoke changes in the structural properties of the proteins, including modification of the aminoacid side chains, formation of polymeric proteins, increase in the carbonyl group content, proteolytic susceptibility, loss of solubility and probably decrease in its nutritional value, therefore, the presence of ACE k in bodies of water diminishes the quality of the carp meat, inducing changes in the functionality of the proteins, with physicochemical and textural parameters being affected, due to the process of oxidation. The totality of variables analyzed in the present study could be used as an indicator of the quality of the meat and the effect in the applications of the food industry for the freshwater fish exposed to this class of contaminants. It is suggested that more profound studies be carried out in order to determine if there is a direct correlation between those changes with a loss in its nutritional value.

### **Acknowledgments**

Claudia Cruz-Rojas is grateful to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-Mexico) for a graduate scholarship.

This study was supported by the Secretaría de Investigación y Estudios Avanzados of the UAEM (SIEA-UAEM, project UAEM 4339/2017/CI).

### **Conflict of Interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **References:**

[1] Tenfold increase in childhood and adolescent obesity in four decades: new study by Imperial College London and WHO (2017)

<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/increase-childhood-obesity/en/>. Accessed 16 January 2019

[2] Carocho, Má., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R, Food Chem. Toxicol. **107**, 302–317 (2017) <http://doi: 10.1016/j.fct.2017.06.046>.

[3] Sylvetsky Allison C., Rother Kristina I., *Physiol. & Behav.* **164**(Pt B):446-450 (2016)  
<http://doi:10.1016/j.physbeh.2016.03.030>

[4] Research and Markets, *Global Food Sweetener Market- Growth, Trends, Forecast for the Period (2015-2020)* 2015.

[5] Sandrou, D. K. & Arvanitoyannis, I. *Cri. Rev. Food Sci Nutr.* **40**, 427-447 (2000)  
<http://doi:10.1080/10408690091189211>

[6] Abreu, MB. *Food Analysis by HPLC. Intense Sweeteners and Synthetic Colorants.* Ed. ML, Nollet. 2 ed. Bélgica. (CRC Press,2000), p. 1072

[7] von Rymon Lipinski, G.-W and Hanger, L.Y., "Acesulfame-K." In: *Alternative Sweeteners, Third Edition.* L. O'Brien Nabors, ed., Marcel Dekker, Inc., (New York, 2001).

[8] Kokotou, M.G. and Thomaidis, N.S., *Anal. Methods* (16), 3825 (2013) <http://doi:10.1039/C3AY40599K>

[9] Loos, R., Gawlik, B., Boettcher, K., Locoro, G., Contini, S., & Bidoglio, G. *J Chromatogr. A* **1216**, 1126-1131 (2009) <http://doi:10.1016/j.chroma.2008.12.048>

[10] Scheurer, M., Schmutz, B., Happel, O., Brauch, H.-J., Wülser, R., Storck, F.R., *Sci. Total Environ.* **481**, 425–432 (2014) <http://doi:10.1016/j.scitotenv.2014.02.047>

[11] Voloshenko-Rossin, A., Gasser, G., Cohen, K., Gun, J., Cumbal-Flores, L., Parra-Morales, W., Sarabia,F., Lev, O., *Environ Sci Processes Impacts*, **17**, 41–53 (2015)  
<http://doi:10.1039/c4em00394b>

[12] Buerge, I.J., Buser, H.R., Kahle, M., Muller, M.D., Poiger, T., *Environ. Sci. Technol.* **43**, 4381–4385 (2009)

- [13] Prasse C., Wagner M., Schulz R., Ternes T.A., Environ. Sci. Technol. **45**, 2761–2769 (2011) <http://doi:10.1021/es900126x>
- [14] Gan ZW, Sun HW, Wang RN, Feng BT., J Chromatogr. A. **1274**, 87–96 (2013) <http://doi:10.1016/j.chroma.2012.11.081>.
- [15] Sandro Castronovo, S., Wick, A., Scheurer, M., Nödler, K., Schulz, M., Ternes, T.A., Water Res. **110**, 342–353 (2017) <http://doi:10.1016/j.watres.2016.11.041>
- [16] Lange, F.T., Scheurer, M., Brauch, H.-J., Anal. Bioanal. Chem. **403**, 2503-2518 (2012) <http://doi:10.1007/s00216-012-5892-z>
- [17] Nosek, K., Styszko, K., Goals, J., Int. J Environ. Anal. Chem. **94**, 961-974 (2014) <https://doi.org/10.1080/03067319.2014.900680>
- [18] Mortensen, A., Granby, K., Eriksen, F. D., Cederberg, T. L., Friis-Wandall, S., Simonsen, Y., Broesbøl-Jensen, B., Bonnichsen, R., J Environ. Sci. Health B, **49**, 797–810 (2014) <http://doi:10.1080/03601234.2014.938546>
- [19] Saucedo-Vence, K., Dublán-García, O., López-Martínez, L. X., Morachis-Valdes, G., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., & Gómez-Oliván, L. M., Ecotoxicology, **24**, 527-39 (2015) <http://doi:10.1007/s10646-014-1401-9>.
- [20] Morachis-Valdez G, Dublán-García O, López-Martínez LX, Galar-Martínez M, Saucedo-Vence K, Gómez-Oliván LM., Environ. Sci. Pollut. Res. **22**(12):9159-9172 (2015) <http://doi:10.1007/s11356-014-4061-7>.
- [21] Contini, C., Álvarez, R., O'Sullivan, M., Dowling, D. P., Gargan, S. Ó., & Monahan, F. J., Meat Sci. **96**, 1171–1176 (2014) <http://doi:10.1016/j.meatsci.2013.11.007>

- [22] Estévez, M., Meat Sci. **89**, 259-279 (2011)  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.025>.
- [23] Arbeláez, P., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M., J Chromatogr. A **1393**, 106–114 (2015) <http://doi:10.1016/j.chroma.2015.03.035>
- [24] Bradford, M., Anal. Biochem. **72**, 248-254 (1976) [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- [25] Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E., Methods Enzymol. **233**, 346-357 (1994) [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).
- [26] Burcham, P. C., J pharmacol. Toxicol. methods. **56**, 18-22. (2007)  
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.02.015>
- [27] Buege, J. A., & Aust, S. D., Method Enzymol. **52**, 302-310 (1978)  
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
- [28] Ellman, G.L., Arch. Biochem. Biophys. **82**, 70-77 (1959)  
<https://doi.org/10.1006/abio.1993.1457>
- [29] Fennema, O.R., Parkin, K.L., Damodaran, S., Fennema's Food Chemistry, 15th edn. (Taylor & Francis, CRC Press, Fl., 2017), pp 995-1016
- [30] Honikel, K. O., Roncales, P., & Hamm, R., Meat Sci., **8**, 221-241 (1983)  
[https://doi.org/10.1016/0309-1740\(83\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0309-1740(83)90046-3).
- [31] Dublán-García, O. , Cruz-Camarillo, R. , Guerrero-Legarreta, I. And Ponce-Alquicira, E., J Muscle Foods, **17**, 291-310 (2006) <http://doi:10.1111/j.1745-4573.2006.00051.x>

[32] Pilosof, A. M. Solubilidad. Caracterización funcional y estructural de proteínas, (2000), pp 31-40.

[33] Ngapo, T., Wilkinson, B., Chong, R., Haisman, D. Gelation of bovine myofibrillar protein induced by 1,5-Gluconolactone, in: Proceedings of the 38th International Congress of Meat Science and Technology. (Clermont Ferrand, France, 1992), pp. 1095-1098.

[34] García-Carreño, F.L., Dimes, L.E., Haard, N.F., Anal. Biochem. **214**, 65-69 (1993) <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1993.1457>

[35] Klettner, P.G., Fleischwirtschaft **75**, 1216–1218 (1995)

[36] Adriana Andrea Gutiérrez-Gómez, Nely San Juan-Reyes, Marcela Galar-Martínez, Octavio Dublán-García, Hariz Islas-Flores, Sandra García-Medina, Itzayana Pérez-Alvárez, Leobardo Manuel Gómez-Oliván., Electronic J Biol. **12**, 53-63 (2016)

[37] Luis Gerardo Bernadac-Villegas, Dora Alicia Solís-Casados, Alba Yadira Corral-Avitia, Marcela Galar-Martínez, Hariz Islas-Flores, Octavio Dublán-García, Leobardo Manuel Gómez-Oliván. Electronic J Biol. **12**, 64-72 (2016)

[38] Azalea Cortés-Díaz, M.C., Rodríguez-Flores, J., Castañeda-Peñalvo, G., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., Dublán-García, O., Gómez-Oliván, L.M., Sic Total Environ. **605-606**, 811-823 (2017) <http://doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.208>

[39] Martínez-Viveros EMG, Islas-Flores H, Dublán-García O, Galar-Martínez M., SanJuan-Reyes N, García-Medina S, Hernández-Navarro MD, Gómez-Oliván LM., Chemosphere. **197**, 105-116 (2018) <http://doi:10.1016/j.chemosphere.2018.01.020>.

[40] Bagnyukova, T. V., Luzhna, L. I., Pogribny, I. P. and Lushchak, V. I., Environ. Mol. Mutagen. **48**, 658-665 (2007) <http://doi:10.1002/em.20328>

- [41] Carrillo, W., Gómez-Ruiz, J. A., Miralles, B., Ramos, M., Barrio, D., & Recio, I., *Eur. Food Res Technol.* **242**, 1777–1785 (2016) <http://doi:10.1007/s00217-016-2677-1>
- [42] Tkachenko, H., Grudniewska, J., Pękala, A., & Terech-Majewska, E. *J. Vet. Res.* **60**, 25–33 (2016) <http://doi:10.1515/jvetres-2016-0005>
- [43] Grune, T., *Biogerontol.* **1**, 31-40 (2000)
- [44] Requena, J. R., Levine, R. L. and Stadtman, E. R., *Amino Acids.* **25**, 221-226 (2003) <http://doi:10.1007/s00726-003-0012-1>
- [45] Stadtman, E. R., & Levine, R. L., *Ann. N Y Acad. Sci.* **899**, 191–208 (2006) <http://doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x>
- [46] Lovell M.A. Ehmann W.D. Mattson M.P. Markesbery W.R., *Neurobiol Aging.* **18**, 457–461 (1997) [http://doi:10.1016/S0197-4580\(97\)00108-5](http://doi:10.1016/S0197-4580(97)00108-5)
- [47] Saucedo-Vence, K., Elizalde-Velázquez, A., Dublán-García, O., Galar-Martínez, M., Islas-Flores, H., SanJuan-Reyes, N., García-Medina, S., Hernández-Navarro, M.D., Gómez-Oliván, L. M., *Sci. Total Environ.* **575**, 347–357 (2017) <http://doi:10.1016/j.scitotenv.2016.09.230>
- [48] Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., *Free Radic. Res.* **31**, 261-272 (1999) <http://dx.doi.org/10.1080/10715769900300841>
- [49] Livingstone, D. ., Mitchelmore, C. ., O'Hara, S. C. ., Lemaire, P., Sturve, J., & Förlin, L., *Mar. Environ. Res.* **50**, 57–60 (2000) [http://doi:10.1016/s0141-1136\(00\)00043-x](http://doi:10.1016/s0141-1136(00)00043-x)
- [50] Lund, M. N., Heinonen, M., Baron, C. P., & Estévez, M., *Mol. Nutr. Food Res.* **55**, 83–95 (2011) <http://doi:10.1002/mnfr.201000453>
- [51] Park, D., Xiong, Y. L., Alderton, A. L., Ooizumi, T., *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4445–4451 (2006) <http://doi:10.1021/jf0531813>

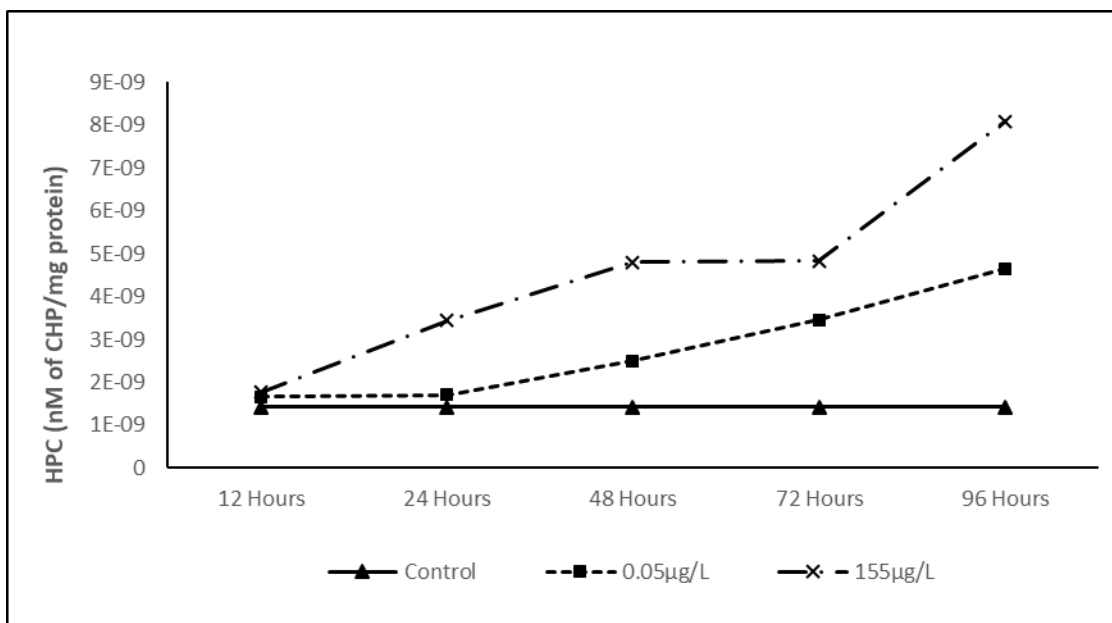
- [52] Turell, L., Botti, H., Carballal, S., Ferrer-Sueta, G., Souza, J. M., Duran, R., Freeman, B. A., Radi, R. and Alvarez, B., *Biochem.* **47**:358–367 (2008) <http://doi:10.1021/bi701520y>
- [53] Claiborne, A., Yeh, J. I., Mallett, T. C., Luba, J., Crane, E. J. III, Charrier, V. and Parsonage, D., *Biochem.* **38**:15407–15416 (1999) <http://doi:10.1021/bi992025k>
- [54] Xiong, Y. L. Protein oxidation and implications for muscle foods quality. In E. A. Decker, C. Faustman, & C. J. Lopez-Bote (Eds.), *Antioxidants in muscle foods* (Wiley, New York, 2000), pp. 85–111
- [55] Bekhit, A. E-D. A., Hopkins, D. L., Fahri, F. T., Ponnampalam E.N., *Compr. Rev Food Sci. Food Saf.* **12**, 565–97 (2013) <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12027>
- [56] Liu, Z., Xiong, Y. L., & Chen, J., *J Agric. Food Chem.* **57**, 10999–11007 (2009) <http://doi:10.1021/jf902722j>
- [57] Pretto A, Loro VL, Silva VMM, Salbego J, De Menezes CC, Souza CD, Gioda CR, Baldisserotto B., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **92**, 399–403 (2014) <http://doi:10.1007/s00128-014-1215-8>
- [58] Xiong, Y.L., in *Antioxidants in muscle foods: nutritional strategies to improve quality*, ed. Decker, E., Faustman, C., and Lopez-Bote, C. Protein oxidation and implications for muscle food quality. (Wiley, New York, 2000), pp. 85-111
- [59] Lu, H., Wang, H., & Luo, Y., *J. Aquatic Food Prod. Technol.* **26**, 566–577 (2016) <http://doi:10.1080/10498850.2016.1238860>
- [60] Maitena, U., Katayama, S., Sato, R., & Saeki, H., *Fish. Sci.* **70**, 896–90 (2004) <http://doi:10.1111/j.1444-2906.2004.00884.x>
- [61] Rowe, L. J., Maddock, K. R., Lonergan, S. M., & Huff-Lonergan, E., *J. Anim. Sci.* **82**, 785–793 (2004) <http://doi:10.2527/2004.823785x>
- [62] Papuc, C., Goran, G. V., Predescu, C. N., & Nicorescu, V., *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **16**, 96–123 (2016) <http://doi:10.1111/1541-4337.12241>

[63] Morachis-Valdez, A. G., Gómez-Oliván, L. M., García-Argueta, I., Hernández-Navarro, M. D., Díaz-Bandera, D., & Dublán-García, O., *Int. J. Food Sci.* **2017**, 1–10 (2017) <http://doi:10.1155/2017/2812483>

[64] Badii, F., & Howell, N. K. *Food Hydrocoll.* **16**, 313–319 (2002) [http://doi:10.1016/s0268-005x\(01\)00104-7](http://doi:10.1016/s0268-005x(01)00104-7)

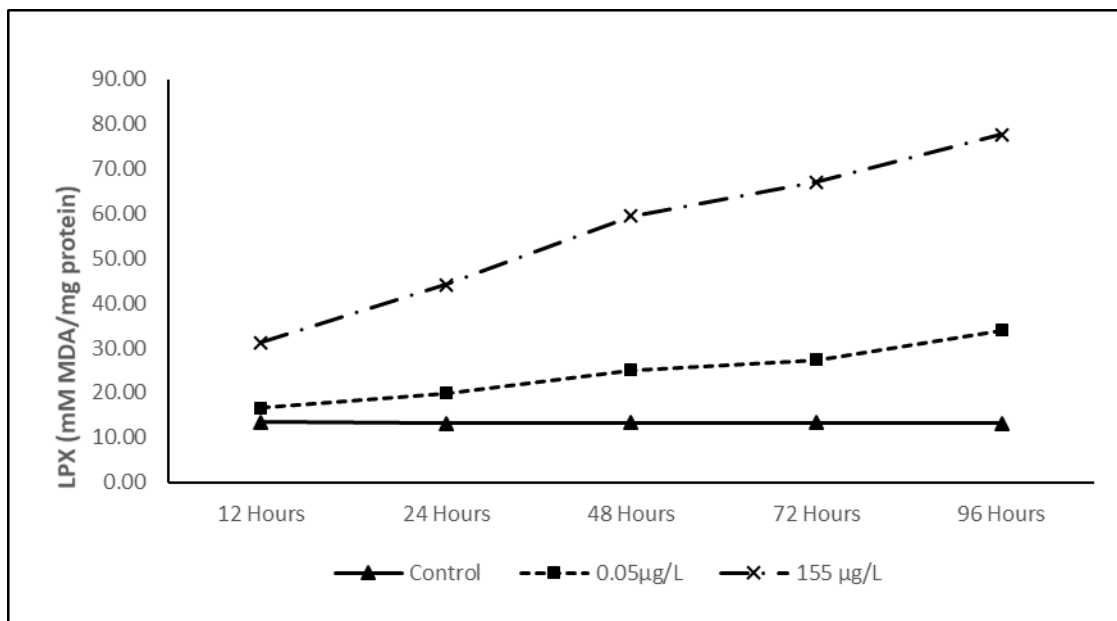
[64] Sompongse, W., Itoh, Y., & Obatake, A. *Fisheries Sci.*, **62**, 473–477 (1996). <http://doi:10.2331/fishsci.62.473>

### Figure Captions

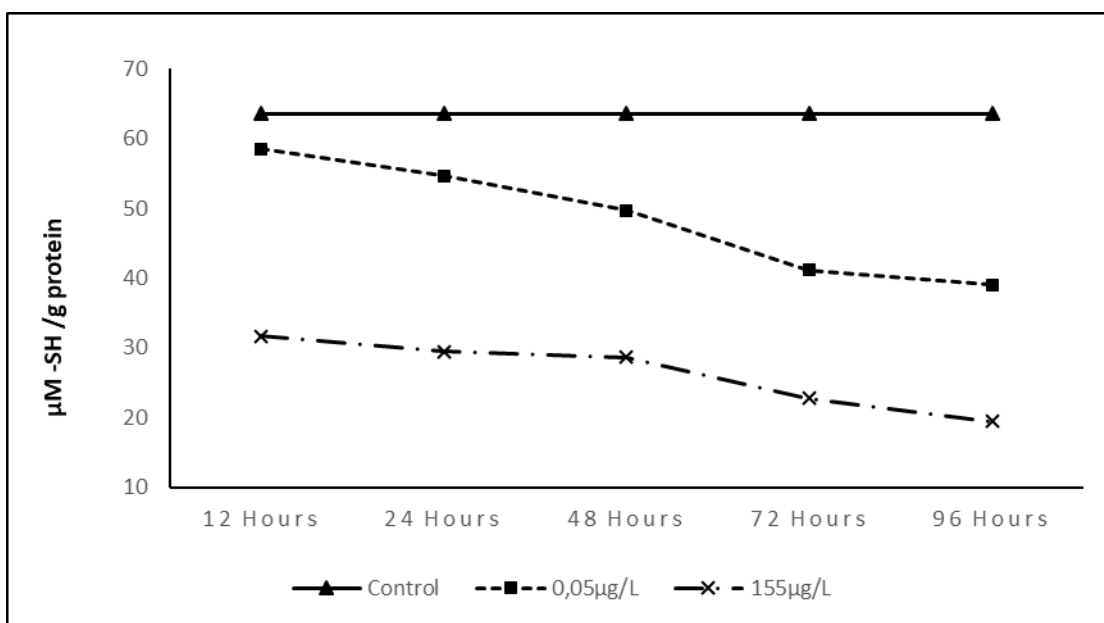


**Fig 1** Determination of protein carbonyl content (PCC) in muscle of *Cyprinus carpio* in control and exposed to two concentrations of acesulfame-k (0.05 µg/L and 155 µg/L) for 12, 24, 48, 72 and 96 h

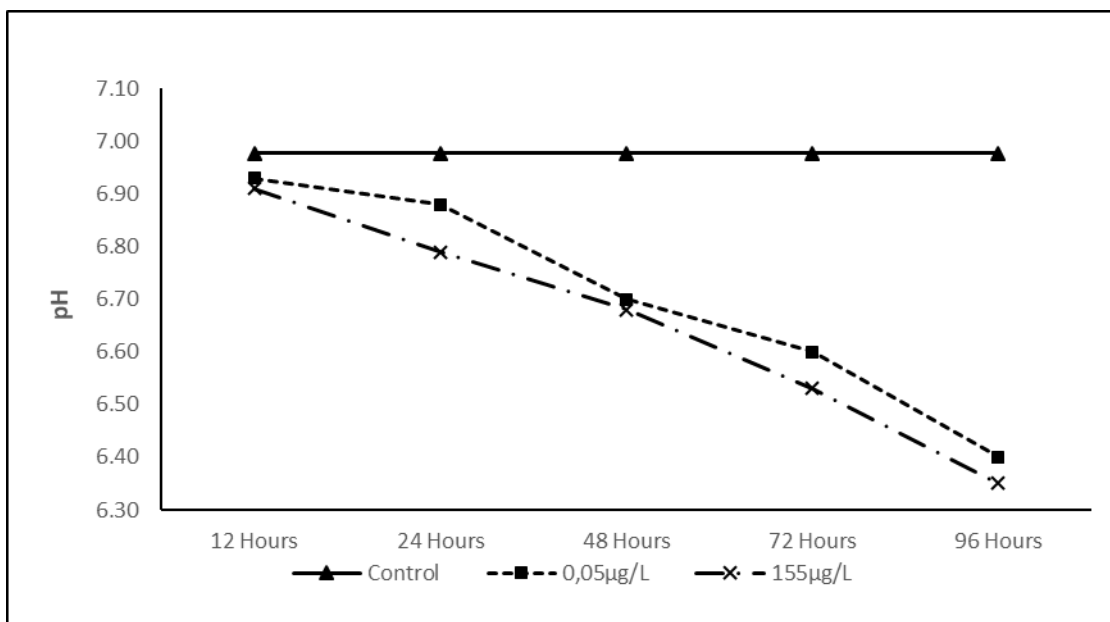




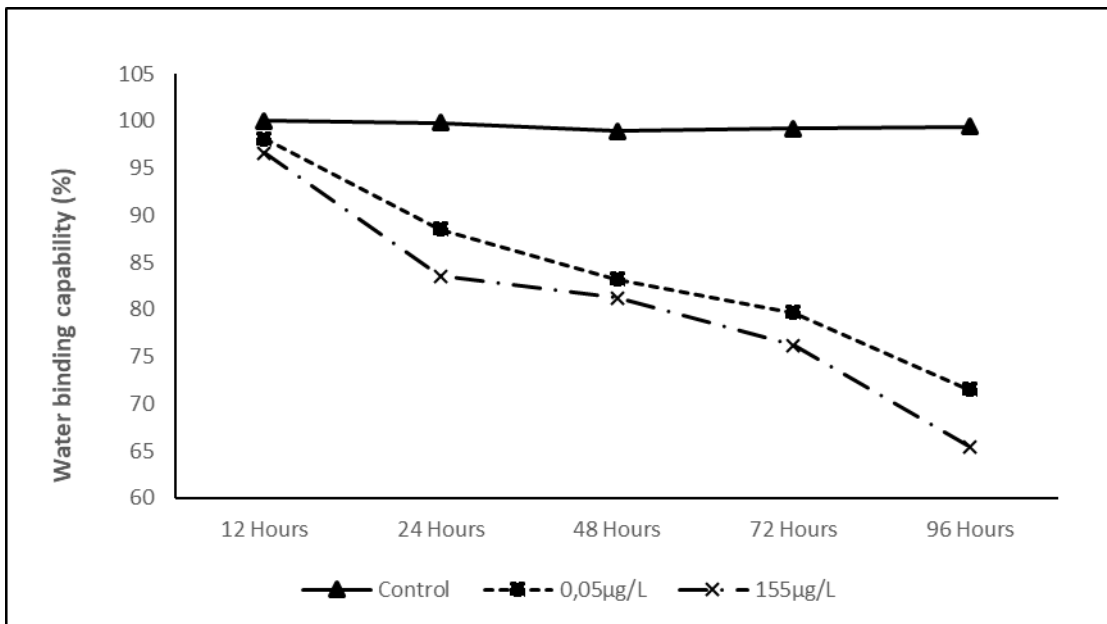
**Fig 2** Determination of lipid peroxidation (LPX) in muscle of *Cyprinus carpio* in control and exposed to two concentrations of acesulfame-k (0.05 µg/L and 155 µg/L) for 12, 24, 48, 72 and 96 h. MDA = malondialdehyde



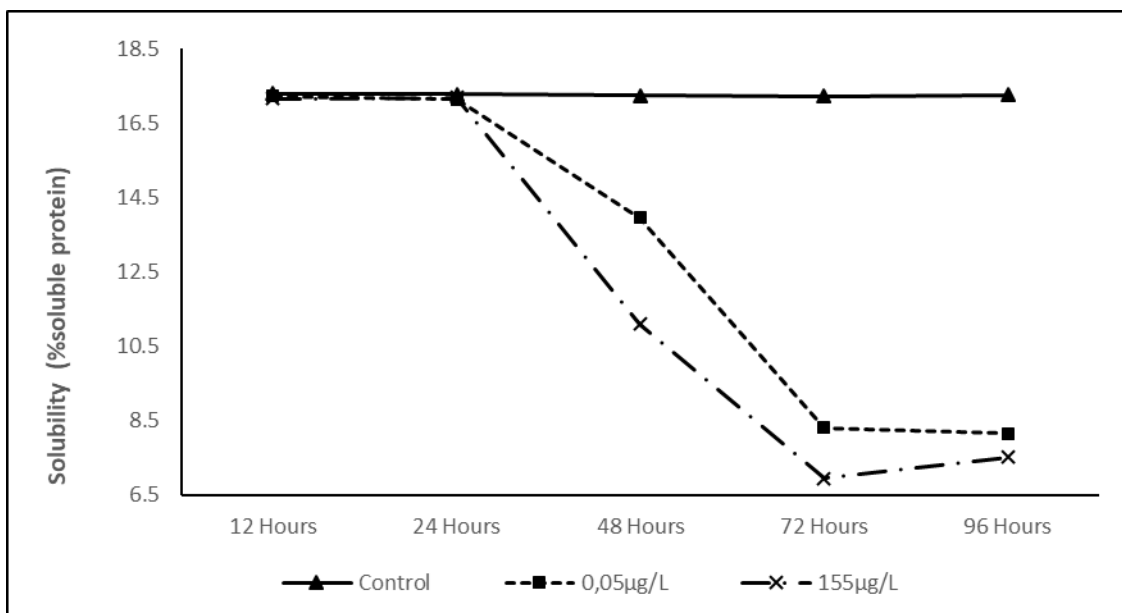
**Fig 3** Determination of total sulfhydryl (SH) content in muscle of *Cyprinus carpio* in control and exposed to two concentrations of acesulfame-k (0.05  $\mu\text{g/L}$  and 155  $\mu\text{g/L}$ ) for 12, 24, 48, 72 and 96 h



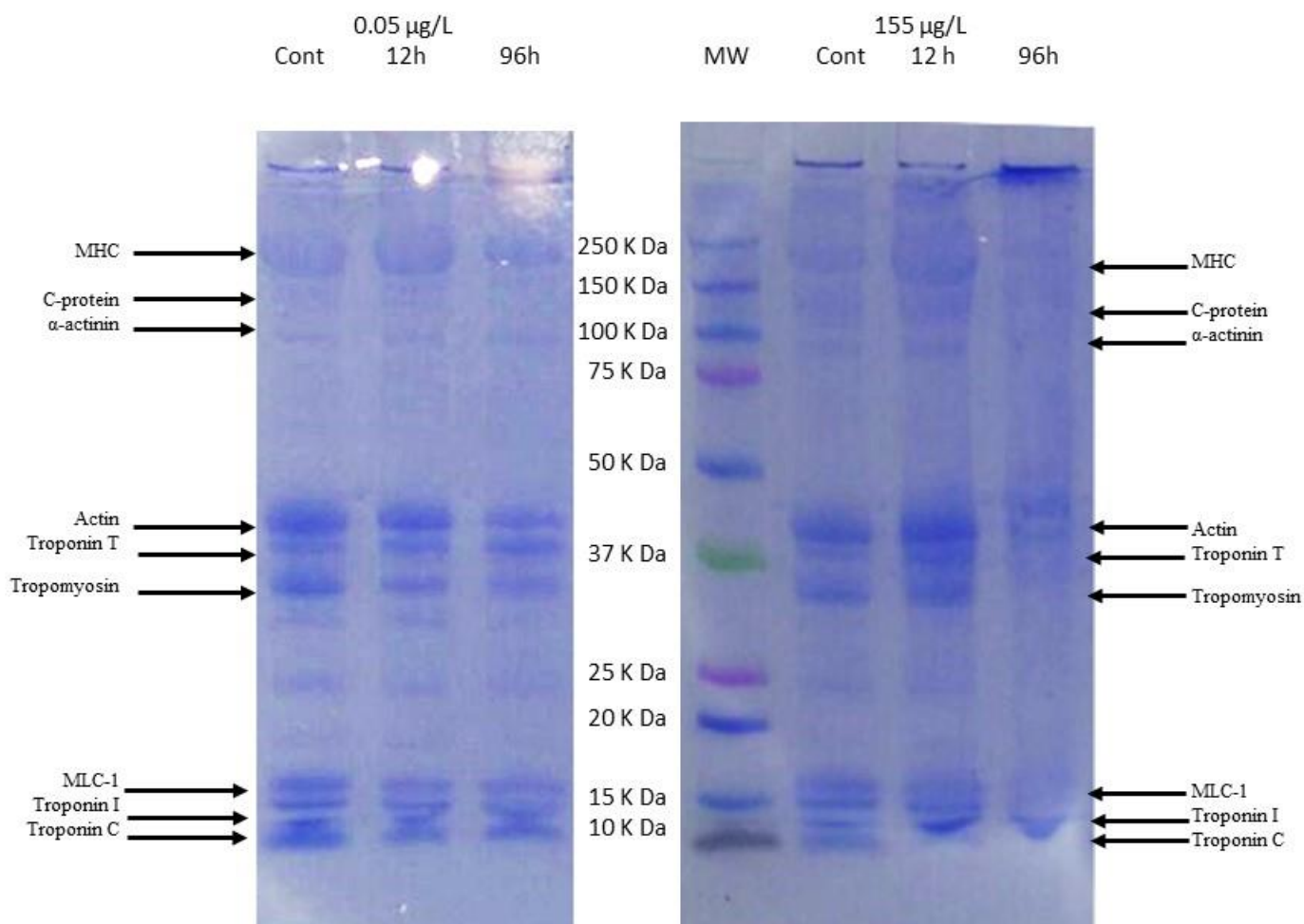
**Fig 4** Determination of pH in muscle of *Cyprinus carpio* in control and exposed to two concentrations of acesulfame-k (0.05  $\mu\text{g/L}$  and 155  $\mu\text{g/L}$ ) for 12, 24, 48, 72 and 96 h



**Fig 5** Determination of water holding capacity (WHC) in muscle of *Cyprinus carpio* in control and exposed to two concentrations of sucralose (0.05 µg/L and 155 µg/L) for 12, 24, 48, 72 and 96 h



**Fig 6** Determination of solubility in muscle of *Cyprinus carpio* in control and exposed to two concentrations of sucralose (0.05  $\mu\text{g/L}$  and 155  $\mu\text{g/L}$ ) for 12, 24, 48, 72 and 96 h



**Fig 7** SDS-PAGE profile of muscle of *Cyprinus carpio* in control and exposed to two concentrations of sucralose (0.05  $\mu\text{g/L}$  and 155  $\mu\text{g/L}$ ) for 12 and 96 h. C1 = concentration 1 (0.05  $\mu\text{g/L}$ ); C2 = concentration 2 (155  $\mu\text{g/L}$ ).

**Table 1** Results of texture profile analysis in muscle of *Cyprinus carpio* in control and exposed to two acesulfame-k concentrations (0.05 µg/L and 155 µg/L) for 12, 24, 48, 72 and 96 h.

		Exposure time				
		12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Hardness	Control	1.52	1.49	1.51	1.48	1.49
	0.05 µg/L	1.55	1.58	1.62	1.65	1.69
	155 µg/L	1.60	1.62	1.69	1.72	1.75
Cohesiveness	Control	0.31	0.32	0.31	0.33	0.32
	0.05 µg/L	0.32	0.33	0.34	0.35	0.34
	155 µg/L	0.35	0.36	0.38	0.39	0.39
Elasticity	Control	0.21	0.21	0.20	0.20	0.20
	0.05 µg/L	0.20	0.19	0.17	0.14	0.09
	155 µg/L	0.19	0.12	0.10	0.09	0.07
Chewiness	Control	0.10	0.10	0.09	0.10	0.09
	0.05 µg/L	0.10	0.10	0.09	0.08	0.05
	155 µg/L	0.11	0.07	0.06	0.06	0.05
Gumminess	Control	0.47	0.48	0.47	0.49	0.48
	0.05 µg/L	0.50	0.52	0.55	0.58	0.57
	155 µg/L	0.56	0.58	0.64	0.67	0.68

## Conclusiones generales

La presencia de ACS en cuerpos de agua induce estrés oxidativo en la carpa común (*Cyprinus carpio*) en las dos concentraciones de relevancia ambiental (0.05 y 149  $\mu\text{gL}^{-1}$ ), disminuyendo así la calidad de la carne de la carpa, induciendo cambios en la funcionalidad de las proteínas, con parámetros fisicoquímicos y texturales afectados, debido al proceso de oxidación, ya que se observaron aumentos significativos en el HPC, grado de LPX y PCC en todos los órganos estudiados, así como cambios significativos en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT. La totalidad de las variables analizadas en el presente estudio podría utilizarse como un indicador de la calidad de la carne y el efecto en las aplicaciones de la industria alimentaria para los peces de agua dulce expuestos a esta clase de contaminantes. Se sugiere que se realicen estudios más profundos para determinar si existe una correlación directa entre esos cambios y una pérdida en su valor nutricional, así como también llevar a cabo una evaluación del riesgo de edulcorantes artificiales y naturales, en particular de ACS, e implementar regulaciones más estrictas para proteger el medio ambiente.

## Perspectivas

## Referencias

1. Dublán-García, O. , Cruz-Camarillo, R. , Guerrero-Legarreta, I. And Ponce-Alquicira, E., *J Muscle Foods*, **17**, 291-310 (2006) <http://doi:10.1111/j.1745-4573.2006.00051.x>
2. Nelson, J.S., 1994. *Fishes of the World*. John Wiley & Sons, New York, USA.
3. Arbeláez, P., Borrull, F., Pocurull, E., Marcé, R.M., *J Chromatogr. A* **1393**, 106–114 (2015) <http://doi:10.1016/j.chroma.2015.03.035>
4. Bekhit, A. E-D. A., Hopkins, D. L., Fahri, F. T., Ponnampalam E.N., *Compr. Rev Food Sci. Food Saf.* **12**, 565–97 (2013) <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12027>
5. Buege, J. A., & Aust, S. D., *Method Enzymol.* **52**, 302-310 (1978) [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(78\)52032-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(78)52032-6).
6. Carrillo, W., Gómez-Ruiz, J. A., Miralles, B., Ramos, M., Barrio, D., & Recio, I., *Eur. Food Res Technol.* **242**, 1777–1785 (2016) <http://doi:10.1007/s00217-016-2677-1>  
Grune, T., *Biogerontol.* **1**, 31-40 (2000)
7. Claiborne, A., Yeh, J. I., Mallett, T. C., Luba, J., Crane, E. J. III, Charrier, V. and Parsonage, D., *Biochem.* **38**:15407–15416 (1999) <http://doi: 10.1021/bi992025k>
8. Contini, C., Álvarez, R., O'Sullivan, M., Dowling, D. P., Gargan, S. Ó., & Monahan, F. J., *Meat Sci.* **96**, 1171–1176 (2014) <http://doi:10.1016/j.meatsci.2013.11.007>
9. Fennema, O.R., Parkin, K.L., Damodaran, S., *Fennema's Food Chemistry*, 15th edn. (Taylor & Francis, CRC Press, Fl., 2017), pp 995-1016
10. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., *Free Radic. Res.* **31**, 261-272 (1999) <http://dx.doi.org/10.1080/10715769900300841>
11. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/increase-childhood-obesity/en/>. Accessed 16 January 2019
12. Klettner, P.G., *Fleischwirtschaft* **75**, 1216–1218 (1995)
13. Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E., *Methods Enzymol.* **233**, 346-357 (1994) [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).
14. Loos, R., Gawlik, B., Boettcher, K., Locoro, G., Contini, S., & Bidoglio, G. *J Chromatogr. A* **1216**, 1126-1131 (2009) <http://doi:10.1016/j.chroma.2008.12.048>



15. Lu, H., Wang, H., & Luo, Y., J. Aquatic Food Prod. Technol. **26**, 566–577 (2016) <http://doi:10.1080/10498850.2016.1238860>
16. Luis Gerardo Bernadac-Villegas, Dora Alicia Solís-Casados, Alba Yadira Corral-Avitia, Marcela Galar-Martínez, Hariz Islas-Flores, Octavio Dublán-García, Leobardo Manuel Gómez-Oliván. Electronic J Biol. **12**, 64-72 (2016)
17. Marklund, S., Marklund, G., 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur. J. Biochem. 47 (3), 469–474.
18. Martínez-Viveros EMG, Islas-Flores H, Dublán-García O, Galar-Martínez M., SanJuan-Reyes N, García-Medina S, Hernández-Navarro MD, Gómez-Oliván LM., Chemosphere. **197**, 105-116 (2018) <http://doi:10.1016/j.chemosphere.2018.01.020>.
19. Morachis-Valdez, A. G., Gómez-Oliván, L. M., García-Argueta, I., Hernández-Navarro, M. D., Díaz-Bandera, D., & Dublán-García, O., Int. J. Food Sci. **2017**, 1–10 (2017) <http://doi:10.1155/2017/2812483>
20. Mukherjee, A., Chakrabarti, J., 1997. In vivo cytogenetic studies on mice exposed to acesulfame-K—a non-nutritive sweetener. Food Chem. Toxicol. 35 (12), 1177–1179.
21. Müller, C.E., Gerecke, A.C., Alder, A.C., Scheringer, M., Hungerbühler, K., 2011. Identification of perfluoroalkyl acid sources in Swiss surface waters with the help of the artificial sweetener acesulfame. Environ. Pollut. 159 (5), 1419–1426.
22. Ngapo, T., Wilkinson, B., Chong, R., Haisman, D. Gelation of bovine myofibrillar protein induced by 1,5-Gluconolactone, in: Proceedings of the 38th International Congress of Meat Science and Technology. (Clermont Ferrand, France, 1992), pp. 1095-1098.
23. Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N., 2005. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. Biochem. Biophys. Res. Commun. 338 (1), 668–676.
24. Nosek, K., Styszko, K., Goals, J., Int. J Environ. Anal. Chem. **94**, 961-974 (2014) <https://doi.org/10.1080/03067319.2014.900680>

25. Oviedo-Gómez, D.G.C., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Razo-Estrada, C., Gómez-Oliván, L.M., 2010. Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 29 (1), 39–43.
26. Park, D., Xiong, Y. L., Alderton, A. L., Ooizumi, T., *J. Agric. Food Chem.* **54**, 4445–4451 (2006) <http://doi:10.1021/jf0531813>
27. Parvez, S., Raisuddin, S., 2005. Proteincarbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20 (1), 112–117.
28. Perkola, N., Sainio, P., 2014. Quantification of four artificial sweeteners in Finnish surface waters with isotope-dilution mass spectrometry. *Environ. Pollut.* 184 (1), 391–396.
29. Prasse C., Wagner M., Schulz R., Ternes T.A., *Environ. Sci. Technol.* **45**, 2761–2769 (2011) <http://doi:10.1021/es900126x>
30. Pretto A, Loro VL, Silva VMM, Salbego J, De Menezes CC, Souza CD, Gioda CR, Baldisserotto B., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **92**, 399–403 (2014) <http://doi:10.1007/s00128-014-1215-8>
31. Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D., Freeman, B.A., 1991. Detection of catalase in rat heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 266 (32), 22028–22034.
32. Rowe, L. J., Maddock, K. R., Lonergan, S. M., & Huff-Lonergan, E., *J. Anim. Sci.* **82**, 785–793 (2004) <http://doi:10.2527/2004.823785x>
33. Salgado, R., Pereira, V.J., Carvalho, G., Soeiro, R., Gaffney, V., Almeida, C., Cardoso, V.V., Ferreira, E., Benoliel, M.J., Ternes, T.A., Oehmen, A., Reis, M.A.M., Noronha, J.P., 2013. Photodegradation kinetics and transformation products of ketoprofen, diclofenac and atenolol in pure water and treated wastewater. *J. Hazard. Mater.* 244 (1), 516–527.
34. San Juan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Islas-Flores, H., González-González, E.D., Cardoso-Vera, J.D., Jiménez-

Vargas, J.M., 2015. NSAID-manufacturing plant effluent induces geno-and cytotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*). *Sci. Total Environ.* 530 (1), 1–10.

35. San Juan-Reyes, N., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., García-Medina, S., Islas-Flores, H., Neri-Cruz, N., 2013. Effluent from an NSAID-manufacturing plant in Mexico induces oxidative stress on *Cyprinus carpio*. *Water Air Soil Pollut.* 224 (9), 1–14.

36. Sandro Castronovo, S., Wick, A., Scheurer, M., Nödler, K., Schulz, M., Ternes, T.A., *Water Res.* **110**, 342–353 (2017) <http://doi:10.1016/j.watres.2016.11.041>

37. Sandrou, D. K. & Arvanitoyannis, I. *Cri. Rev. Food Sci Nutr.* **40**, 427-447 (2000) <http://doi:10.1080/10408690091189211>

38. Sang, Z., Jiang, Y., Tsoi, Y.K., Leung, K.S.Y., 2014. Evaluating the environmental impact of artificial sweeteners: a study of their distributions, photodegradation and toxicities. *Water Res.* 52 (1), 260–274. Sarasquete, C., Segner, H., 2000. Cytochrome P4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohisto- chemical studies. *Sci. Total Environ.* 247 (2), 313–332.

39. Saucedo-Vence, K., Elizalde-Velázquez, A., Dublán-García, O., Galar-Martínez, M., IslasFlores, H., San Juan-Reyes, N., García-Medina, S., Hernández-Navarro, M.D., GómezOliván,L.M.,2017.Toxicological hazard induced by sucralose to environmentally relevant concentrations in common carp (*Cyprinus carpio*). *Sci. Total Environ.* 575 (1), 347–357.

40. Scheurer, M.,Schmutz, B., Happel, O., Brauch, H.J., Wülser,R.,Storck, F.R.,2014.Transformation of theartificial sweeteneracesulfame by UVlight.*Sci. Total Environ.* 481(1), 425–432. Schiffman, S.S., 2012. Rationale for further medical and health research on high-potency sweeteners. *Chem. Senses* 37 (8), 671–679.

41. Schlosser, P.M., Bale, A.S., Gibbons, C.F., Wilkins, A., Cooper, G.S., 2015. Human health effects of dichloromethane: key finding sands cientificissues. *Environ.HealthPerspect.* 123 (2), 114–119.

42. Stadtman, E. R., & Levine, R. L., *Ann. N Y Acad. Sci.* **899**, 191–208 (2006) <http://doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187>.

43. Stadtman, E.R., Levine, R.L., 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25 (3–4), 207–218.
44. Stegeman, J.J., Livingstone, D.R., 1998. Forms and functions of cytochrome P450. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 121 (1), 1–3.
45. Subedi, B., Kannan, K., 2014. Fate of artificial sweeteners in wastewater treatment plants in New York State, USA. *Environ. Sci. Technol.* 48 (23), 13668–13674.
46. Sylvestry Allison C., Rother Kristina I., *Physiol. & Behav.* **164**(Pt B):446-450 (2016) <http://doi:10.1016/j.physbeh.2016.03.030>
47. Szakacs, G., Varadi, A., Özvegy-Laczka, C., Sarkadi, B., 2008. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discov. Today* 13 (9–10), 379–393.
48. Tenfold increase in childhood and adolescent obesity in four decades: new study by Imperial College London and WHO (2017)
49. Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Rev. Fish. Sci.* 11 (2), 107–184.
50. Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64 (2), 178–189.
51. Voloshenko-Rossin, A., Gasser, G., Cohen, K., Gun, J., Cumbal-Flores, L., Parra-Morales, W., Sarabia, F., Lev, O., *Environ Sci Processes Impacts*, **17**, 41–53 (2015) <http://doi:10.1039/c4em00394b>
52. von Rymon Lipinski, G.-W and Hanger, L.Y., "Acesulfame-K." In: *Alternative Sweeteners*, Third Edition. L. O'Brien Nabors, ed., Marcel Dekker, Inc., (New York, 2001).
53. Wiklund, A.K.E., Adolfsson-Erici, M., Liewenborg, B., Gorokhova, E., 2014. Sucralose induces biochemical responses in *Daphnia magna*. *PLoS One* 9 (4),

e92771. Zygler, A., Wasik, A., Namieśnik, J., 2009. Analytical methodologies for determination of artificial sweeteners in foodstuffs. *TrAC Trends Anal. Chem.* 28 (9), 1082–1102.