



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Química

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Evaluación de las características fisicoquímicas, texturales y nutrimentales de carpa común (Cyprinus carpio) por exposición a diversos contaminantes presentes de presa Madín”

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Químicas

P R E S E N T A

Q.A. Ana Gabriela Morachis Valdez

Tutores

Dr. Octavio Dublán García
Dr. Leobardo M. Gómez Oliván
Dra. Leticia Xochitl López Martínez

Toluca, Estado de México a 16 julio de 2014



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

3° (EV. DE GRADO)
OFICIO NO 296/2014

Toluca, México, 20 de Junio de 2014

**P. DE MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
ANA GABRIELA MORACHIS VALDEZ
FACULTAD DE QUIMICA
P R E S E N T E**

La que suscribe Directora de la Facultad de Química, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de México, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación de Grado estará formado por:

Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván
PRESIDENTE

Dra. Hariz Islas Flores
SECRETARIO

Dr. Octavio Dublán García
PRIMER VOCAL

Dra. Imelda García Argueta
SEGUNDO VOCAL

Dra. Baciliza Quintero Salazar
TERCER VOCAL

Dr. Juan Orozco Villafuerte
SUPLENTE

Dra. Miriam Fabiola Fabela Morón
SUPLENTE

FIRMA

**ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2014, 70 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM"**

**M. en A.P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARIA GONZALEZ
DIRECTORA**



c.c.p.Archivo

www.uaemex.mx

A Eduardo, mi amor.

A Carolina y Mariana, mi luz y mi fuerza.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	3
3. Antecedentes.....	4
3.1. Contaminantes.....	4
3.2. Estrés oxidativo.....	8
3.3. Presa Madín.....	12
3.4. Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>).....	15
3.5. Función de las proteínas en el pescado	18
4. Justificación.....	24
5. Hipótesis.....	25
6. Objetivos.....	25
7. Metodología.....	26
7.1. Colecta y mantenimiento de la muestra.....	26
7.2. Evaluación del estrés oxidativo.....	27
7.3. Análisis fisicoquímicos y estructurales.....	28
7.3.1. Análisis fisicoquímicos.....	28
7.3.2. Análisis estructurales.....	30
7.4. Análisis proximal.....	32
7.5. Análisis estadístico.....	33
8. Referencias.....	34
9. Artículo enviado.....	40
Anexo 1. Discusión y Resultados.....	89
Anexo 2. Reporte de Microscopía Electrónica de Barrido.....	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de ERO y sus implicaciones en el funcionamiento celular.....	10
Tabla 2. Antioxidantes enzimáticos	12
Tabla 3. Volumen de la producción pesquera por especie en México en toneladas....	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Presa Madín.....	13
Figura 2. Carpa común (<i>Cyprinus carpio L.</i>) variedades con escamas (a) y espejo (b).....	16
Figura 3. Volumen de la producción de carpa en peso vivo por litoral 1999 a 2009 (Miles de toneladas).....	17
Figura 4. Ejemplo generalizado de gráfica de TPA.....	20
Figura 5. Microscopía óptica, corte longitudinal 10 micras de espesor con lente 10x, Madín vs Control.	89
Figura 6. Microscopía óptica, corte transversal, 10 micras con lente 10x, Madín vs Control.....	89
Figura 7. Imagen músculo Madín por Microscopía Electrónica de Barrido.....	90
Figura 8. Composición química de <i>C. carpio</i>	91

1 Resumen

La presa Madín (PM) es alimentada por el río Tlalnepantla, este embalse recibe las descargas de Viejo Madín, en los municipios de Naucalpan de Juárez, Atizapán de Zaragoza y Tlalnepantla de Baz (Estado de México). Estudios previos han identificado contaminantes en este sitio, mostrando que el agua de PM contiene una carga considerable de metales, medicamentos anti-inflamatorios no esteroides (AINEs), pesticidas e hidrocarburos, a concentraciones mayores a las consideradas como adecuadas para la vida acuática. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la exposición crónica a los contaminantes presentes en PM inducen a modificaciones en estrés oxidativo, alterando las propiedades fisicoquímicas y texturales en músculo (calidad alimentaria) de *Cyprinus carpio*. Las carpas fueron capturadas de una estación de muestreo (descargas del pueblo de Viejo Madín) y se evaluaron los siguientes biomarcadores en músculo: contenido de hidroperóxido (CHP), lipoperoxidación (LPX), contenido de proteínas carboniladas (CPC), y la actividad enzimática antioxidante, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y glutatión peroxidasa (GPx). Así como, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas y texturales en el músculo de la carpa. Los resultados muestran que los contaminantes (metales y AINEs) presentes en PM inducen el estrés oxidativo y alteran las propiedades fisicoquímicas y texturales en el músculo de *C. carpio*. Por lo tanto, el agua de éste embalse está contaminado con xenobióticos considerados como peligrosos para *C. carpio*, especie consumida por la población local.

Abstract

Madín Reservoir (MR) is located on the Río Tlalnepantla, its dam being downstream from the town of Madín, in the municipalities of Naucalpan de Juárez, Atizapán de Zaragoza and Tlalnepantla de Baz (State of Mexico). Previous studies conducted to identify pollutants at this site show that water in MR contain a considerable metal load, nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs), pesticides, hydrocarbons at concentrations higher than those determined to be suitable for aquatic life. The objective of this work was to evaluate whether chronic exposure to pollutants present in MR induce modification on oxidative stress status and they alter the physicochemical and textural properties in muscle (food quality) of *Cyprinus carpio*. Carp were captured from one sampling station (discharge from the town of Viejo Madín) and the following biomarkers were evaluated in muscle: hydroperoxide content (HPC), lipid peroxidation (LPX), protein carbonyl content (PCC), and activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). Also, the physicochemical and textural properties were evaluated in muscle of carp. Results show that contaminants (metals and nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals) present in water of MR induce oxidative stress and alter the physicochemical and textural properties in muscle of *C. carpio*. Thus, water in this reservoir is contaminated with xenobiotics that are hazardous to *C. carpio*, species consumed by the local human population.

2 Introducción

En estudios recientes, realizados en el Laboratorio de Toxicología Ambiental de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, se encontraron concentraciones significativamente superiores a las establecidas como adecuadas para la vida acuática de metales: aluminio, mercurio, hierro, níquel y cobre entre otros, así como principios activos de medicamentos en la presa Madín, ubicada en Atizapán de Zaragoza en el Estado de México, embalse donde se llevan a cabo actividades recreativas como canotaje y la pesca de diversas especies, entre ellas la carpa común (*Cyprinus carpio*) (González-González et al, 2014). Estudios sobre agua y sedimentos de este reservorio muestran diversos efectos tóxicos en especies centinelas como *Daphnia magna* y *Hyallela azteca*, destacando estrés oxidativo, condición observada en carpa común (*Cyprinus carpio*) expuesta a aluminio en concentraciones menores a las encontradas en la presa, así como por presencia de anti-inflamatorios no esteroideos, por lo que se requiere llevar a cabo estudios del efecto oxidante de dichos contaminantes, la actividad enzimática antioxidante, así como las características fisicoquímicas y texturales en el músculo.

3 Antecedentes

3.1 Contaminantes

La contaminación de alimentos por elementos tóxicos se está convirtiendo en un problema mundial tanto ambiental como para los seres humanos. Los productos químicos presentes en el agua son generados de forma natural, por procesos biogeoquímicos o por las actividades antropogénicas, es decir resultado directo o indirecto de las actividades del hombre. Ejemplos de éstos son los subproductos de la desinfección del agua potable, o bien el geosmin, un alcohol bicíclico que confiere un sabor desagradable al agua y que lo producen ciertas algas (Becerril, 2009).

Los contaminantes antropogénicos se han dispersado ampliamente en el ambiente y se encuentran en las aguas superficiales y subterráneas, como resultado de las emisiones industriales, la ineficiente disposición de residuos sólidos, los derrames accidentales, la aplicación de plaguicidas, la disposición de los lodos de las plantas de tratamiento de aguas residuales en suelo agrícola, así como artículos de uso diario como shampoos, cremas y lociones (Becerril, 2009; Chen et al., 2011)

La preocupación de dirigentes, población e investigadores se está incrementando a nivel mundial, pero especialmente en los países con economías emergentes debido al rápido y poco organizado desarrollo urbano e industrial (Chen et al., 2011).

Cuando una especie acuática se ve expuesta a una mezcla de xenobióticos, definidos como químicos no presentes normalmente en un sistema vivo (Bhattacharya, 2001), es importante considerar las interacciones entre químicos así como los efectos biológicos múltiples, ya que diferentes químicos pueden ocasionar diferentes mecanismos de acción a nivel celular e incluso una molécula puede ejercer diferentes efectos por más de una vía (Benedetti et al., 2007).

Las dioxinas, bifenilos policlorinados (PCBs) y residuos de plaguicidas, son ejemplos de compuestos orgánicos persistentes (COPs) los cuales son considerados como los productos químicos más problemáticos ya que resisten la degradación fotolítica, biológica y química. Se trata con frecuencia de productos halogenados, la mayor parte de las veces clorados que se caracterizan por su toxicidad y liposolubilidad elevada que da lugar a una bioacumulación en el tejido adiposo, son semivolátiles lo que le permite recorrer grandes distancias en la atmósfera antes de su deposición, en el caso de los PCBs su principal vía de ingreso es la alimentaria (90%) ya que existen muchos tipos de alimentos con tendencia a la contaminación, como es el caso de los peces (Rimblas, 2004). La toxicidad y carcinogénesis de los hidrocarburos policíclicos aromáticos pueden tener una consecuencia directa de la activación metabólica por el citocromo P450 o indirecta por el incremento en la producción de las especies reactivas de oxígeno (EROs por sus siglas en español) (Benedetti et al., 2007).

Los detergentes son ampliamente empleados en productos para el hogar, tienen adicionalmente una amplia variedad en usos industriales, como resultado, grandes cantidades de estos productos son comúnmente desechadas al drenaje o bien de forma directa a los ambientes acuáticos donde no se llevan a cabo un tratamiento de aguas de drenaje. Solamente una parte de estos productos de limpieza es biodegradable, por lo que la mayoría de los detergentes sintéticos son contaminantes persistentes. Los surfactantes perturban el metabolismo celular, a bajas concentraciones causan cambios en la membrana celular, alterando la función del sistema respiratorio en especies acuáticas, los surfactantes aniónicos pueden solubilizar y romper la estructura proteica, adicionalmente pueden producir EROs y causar el fenómeno de estrés oxidativo en los organismos acuáticos como el pez cebra *Danio rerio* (de la familia *Cyprinidae*) (Mei-Hui, 2008; Sobrino-Figueroa, 2013).

Diversos estudios han mostrado un incremento considerable en las concentraciones de fármacos en cuerpos de agua, identificándose como contaminantes emergentes de los ecosistemas acuáticos. Dentro de éstos se han detectado los anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs por sus siglas en español) (diclofenaco, paracetamol, ibuprofeno,

naproxeno), los cuales han mostrado efectos tóxicos en organismos acuáticos como *Daphnia magna* y *Hyalella azteca*, observándose estrés oxidativo en éstos evidenciado por alteración en la actividad enzimática (Oviedo-Gómez et al., 2010; Wassmur, 2010; Gómez-Oliván et al., 2012)

Otros contaminantes con motivo especial de preocupación en el aspecto ambiental son los metales, debido a sus efectos tóxicos potenciales y su habilidad para bioacumularse, bioconcentrarse y biomagnificarse en diversos ecosistemas acuáticos, se les encuentra en forma soluble en la columna de agua o bien acumulados en los sedimentos, por lo que pueden ser monitoreados midiendo su concentración en agua, sedimentos y biota (Carrera, 1990). Se ha encontrado la presencia As, Cd, Cu, Pb y Zn en invertebrados provenientes del Río Clark Fork, EUA; As, Cu, Zn y Pb en estuarios, al sur de Inglaterra, Ag y Cu en la bahía de San Francisco (Dang et al., 2012), y Al, Hg y Fe en Presa Madín, México (Galar-Martínez et al., 2010), As, Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, and Zn en productos marinos del mercado de Malasia (Mok et al., 2012), en la mayoría de los casos las concentraciones encontradas en los organismos acuáticos son bajas y sólo causan decesos por efectos crónicos o subletales; sin embargo, en algunos casos en los que la especie química causa efectos agudos en los organismos, se puede presentar la muerte (Salánki et al., 2003).

El consumo a largo plazo de alimentos contaminados (como pescado) por estos elementos tóxicos, pueden conducir a la acumulación crónica en riñón e hígado causando la alteración de numerosos procesos bioquímicos, originando enfermedades cardiovasculares, nerviosas, en riñones o en huesos, mientras que algunos son carcinogénicos, otros como el mercurio afectan al desarrollo infantil o a mujeres embarazada (Chen et al., 2011).

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuados para determinar el efecto de gentes físicos y químicos sobre organismos de prueba, como peces, bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Exeley (1996) reportó en trucha arcoíris expuestos a aluminio, mostraron daños en branquias alterando los procesos respiratorios, generando hipoxia y acidosis metabólica, así como fragilidad en citoesqueleto y defectos en la membrana proteica, adicionalmente se ha encontrado que este metal tiene

efectos neurotóxicos y se ha encontrado una histopatología del tejido cerebral similar a la de humanos expuestos a éste y que sufren de la enfermedad de Alzheimer (Exeley, 1996, Ward et al., 2006). El aluminio forma complejos con los grupos sulfhidrilo (SH) dañando biomoléculas tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, es también capaz de sustituir iones de calcio, potasio y magnesio entre otros en las células, y es reconocido como un agente potencial pro-oxidante, generando EROs (García-Medina et al., 2012). Este metal es capaz de incrementar los niveles de lipoperoxidación, en diversos tejidos disminuye la actividad enzimática de glutatión S-transferasa, glutatión peroxidasa, superóxido-dismutasa y aspartatoamino-transferasa (Yokel, 2000; Yousef, 2005).

El hierro, un metal de interés por su presencia en concentraciones elevadas en reservorios de agua, se encuentra en forma de hierro reducido (Fe^{2+}), al mezclarse con las unidades sulfhidrilo de las enzimas, genera sistemas estables como el $\text{R-S-Fe}^{2+}\text{-S-R}$, los cuales modifican la estructura de la membrana celular evitando su actividad normal, por lo que la salud de los organismos queda afectada al igual que la supervivencia (Baird, 2001). En 1995, Stohs y Bagchi, encontraron que el hierro experimentaba ciclos de óxido-reducción, durante los cuales se producían especies reactivas de oxígeno, contribuyendo a la formación exógena del estrés oxidativo. Confirmándose con estudios que demuestran un incremento en los niveles de lipoperoxidación en el intestino, hígado y branquias de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas con una dieta elevada en hierro (Carriquiriborde, 2004).

Otro metal presente en los cuerpos de agua es el mercurio, el cual es transformado en metilmercurio gracias a microorganismos presentes en los sedimentos, refiriéndose en peces mayor toxicidad que su forma original, siendo este metal un ejemplo característico de la bioacumulación, en la cual se ve incrementado la concentración de sustancias tóxicas y sus derivados en los diversos estratos de la escala trófica (Boudere, 1990; Ward et al., 2010; Wang, 2012). El mercurio entra en el ambiente mediante dos vías, por fuentes naturales y por deposición atmosférica resultado de la contaminación antropogénica siguiendo un camino hacia los cuerpos de agua, incluso en áreas de deposición elevada, la concentración en peces puede variar significativamente (Ward et al., 2010); es además un

agente neurotóxico que en humanos se manifiesta como excitabilidad, trastornos emocionales y alteraciones en la memoria. En casos graves produce retraso psicomotor, incoordinación, ataxia, parálisis, sordera o ceguera.

Se observó que en los peces *Pimephales promelas* expuestos a $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ de éste metal, se produce un decremento en la síntesis de proteínas. De igual forma, en diversas especies acuáticas y en sus depredadores se han observado cambios en la producción enzimática, decremento de la función vascular, cambios en parámetros sanguíneos, respuesta inmune y renal, así como cambios en el comportamiento (Boening, 2000; Devlin, 2006).

Por lo que debido al incremento contaminantes presentes en los reservorios de agua y por lo tanto en los organismos acuáticos se ha observado un incremento en las EROs y radicales libres en los mismos, supeditando la respuesta defensiva, teniendo consecuencias a nivel celular y con ello alteraciones de las moléculas que los conforman (Lushchak, 2011).

3.2 Estrés oxidativo

Se conoce como estrés oxidativo al desequilibrio entre la concentración de EROs y radicales libres (iones o moléculas con electrones desapareados y por lo tanto altamente reactivas) presentes en los organismos y los sistemas de defensa ante éstas, es decir los sistemas antioxidantes, se conoce como *estrés oxidativo*, el cual es un estado estacionario específico debido a condiciones ambientales. Las especies reactivas; el ión superóxido ($\text{O}_2\bullet$), radicales hidroxilo ($\text{OH}\bullet$), y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son producidas como resultado del proceso metabólico de la célula, debido a la reducción parcial del oxígeno molecular, éstas sustancias altamente reactivas inducen al daño celular mediante la promoción de lipoperoxidación (LPX) de la membrana celular (Rios-de-Molina, 2003; Arabi, 2004; Lushchak, 2011).

En analogía al término “estrés oxidativo”, Hausladen y Stambler (1999) han denominado “estrés nitrosativo” a la excesiva o desregulada formación del radical óxido nítrico ($\text{NO}\bullet$) y a las especies reactivas de nitrógeno (ERNs) derivadas del mismo, como el peroxinitrito

(ONOO-) el cual se forma por la reacción del ión superóxido con el óxido nítrico. 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 (Rios-de-Molina, 2003).

En la tabla 1 se muestran las diferentes especies oxidantes y radicales libres, presentes en los organismos y se hace mención el efecto en las diferentes moléculas estructurales.

Para protegerse frente a la producción de EROs los organismos aerobios disponen de una batería de defensas antioxidantes. Un antioxidante puede definirse como cualquier sustancia que presente a bajas concentraciones comparadas con las del sustrato, retrasa significativamente o previene la oxidación de dicho sustrato. El término "sustrato oxidable" incluye todo tipo de biomoléculas: glúcidos, lípidos, proteínas y DNA (Montero, 1999).

Esencialmente, las defensas antioxidantes, se dividen en dos grandes grupos: los no enzimáticos y los enzimáticos. Dentro del primer grupo se encuentran moléculas que se unen a los radicales libres, y los transfieren de sitios donde pueden provocar graves daños (como las membranas celulares) a compartimentos celulares donde sus efectos sean menos drásticos (el citoplasma), o bien, los transforman en radicales menos agresivos. Ejemplos de este tipo de antioxidantes son: α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C), glutatión, urato, bilirrubina y flavonoides entre otros. La vitamina E, el β -caroteno y la vitamina C son los únicos nutrientes esenciales que atrapan directamente radicales libres. La vitamina C es soluble en agua y se ubica en el citoplasma celular, mientras que la vitamina E y el β -caroteno son solubles en lípidos (González-Torres, Betancourt-Rule & Ortiz-Muñiz, 2000).

Tabla 1. Descripción de ERO y sus implicaciones en el funcionamiento celular

Especie oxidante	Descripción	Reacciones en las que interviene
O_2^-	Ión superóxido, formado por la reducción del O_2 .	Es muy reactivo en medio hidrofóbico, pero no puede atravesar libremente las membranas biológicas, en condiciones fisiológicas puede transformarse en peróxido de hidrógeno.
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno, formado por dismutación de ion superóxido.	Soluble en lípidos, y por lo tanto capaz de difundir por membranas.
$-OH$	Radical hidróxilo, Formado por la reacción de Fenton en presencia de Fe y Cu.	Es la especie más reactiva, y tiene acción sobre la mayoría de los componentes celulares.
$ONOO^-$	Peroxinitrito, se forma a partir de la reacción del radical superóxido con el ácido nítrico.	De naturaleza liposoluble, se le ha relacionado directamente con la patología de varios desordenes Neurodegenerativos como Alzheimer.
$RO\cdot, ROO\cdot$	Radicales orgánicos, formados por oxidación de grasas.	De naturaleza liposoluble, forman especies más estables entre ellos.
O_2^{\cdot}	Oxígeno singulete. Se forma como producto de la reacción del glutatión reducido y el radical superóxido, y durante la lipoperoxidación.	Juega un papel importante en procesos de mutagénesis, carcinogénesis, envejecimiento y desórdenes degenerativos.

Fuente: Condensado de: González-Torres et al., 2000 y Lushchak, 2011.

Las defensas enzimáticas están presentes en el organismo de los seres vivos y protegen a éste frente a los EROs producidos durante el metabolismo. Dentro de éstos, tenemos 3 principales: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX).

La **SOD** (E.C. 1.15.1.1) cataliza la dismutación del anión superóxido, originando peróxido de hidrógeno. Existen distintas formas, dependiendo del metal del centro catalítico: 12Zn, Cu-SOD citosólica, la Mn-SOD mitocondrial y la EC-SOC extracelular.

La **CAT** (E.C. 1.11.1.6) es una enzima tetramérica que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua. Está presente en la mayoría de las células eucariotas, localizándose a nivel de los peroxisomas.

Por último, está la **GPX** (E.C. 1.11.1.9), que también contribuye a la eliminación del peróxido de hidrógeno pero, a diferencia de la CAT, que usa el peróxido de hidrógeno como dador de electrones, utiliza el glutatión reducido. Existen dos formas: la selenio dependiente y la selenio independiente y, en vertebrados, se encuentran en el citosol y en las mitocondrias. Además está la glutatión reductasa (GR, E.C. 1.6.4.2), que se encarga de mantener la proporción GSH/GSSG (Montero, 1999; López et al., 2012). En la tabla 2, se ha resumido la ubicación celular y la función que desempeñan estas enzimas.

Las consecuencias de las reacciones de las especies oxidantes con diferentes materiales celulares pueden ser muy variadas. Frecuentemente el ADN, los lípidos en las membranas, así como los carbohidratos y las proteínas son atacados. En las proteínas, los aminoácidos aromáticos, la cisteína, los enlaces disulfuro y los enlaces peptídicos son fragmentados por los radicales libres alterando su estructura y su función. El radical hidroxilo es muy reactivo con las proteínas y puede causar modificaciones en casi todos los residuos de aminoácidos, pero en particular ataca a tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina, metionina y cisteína, forma entrecruzamientos de tipo covalente e induce la fragmentación de la cadena polipeptídica, lo que se traduce en una pérdida de la función, o en mayor susceptibilidad a las enzimas proteolíticas. Datos experimentales muestran que el radical peroxinitrito oxida

a las proteínas membranales y citoplásmicas afectando su naturaleza física y química (González-Torres, 2000; Lushchak, 2011).

Tabla 2. ANTIOXIDANTES ENZIMATICOS

Antioxidante	Ubicación celular	Función fisiológica
Superóxido dismutasa	Citoplasma (SOD-1) Mitocondria (SOD-2) Extracelular (SOD-3)	Dismutación de radicales superóxido
Glutation peroxidasa	Citoplasma y mitocondria	Elimina el peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos
Catalasa	Citoplasma y mitocondria	Elimina el peróxido de hidrógeno

Fuente: López et al., 2012

3.3 Presa Madín

El agua superficial de la Cuenca del Valle de México contribuye sólo con alrededor del 2% (1.4 m³/s) al abastecimiento de agua de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM). El río Magdalena proporciona el agua para el Distrito Federal, mientras que la presa Madín, en el río Tlalnepantla, abastece al Estado de México con una cantidad de 0.5 m³/s. Cuando se encuentran disponibles, se emplean los pequeños arroyos y manantiales naturales, fuentes que también ingresan directamente al sistema de distribución.

La presa Madín provee de agua a Atizapán de Zaragoza, Naucalpan y Tlalnepantla. En esta zona se ubica un sistema hidrológico que se compone por ríos y arroyos vinculados con dos presas, 1) la Presa Madín, la cual es alimentada por el río Tlalnepantla y los arroyos; El Polvorín, El Sifón, El Aguaje, La Nopalera, Paso Hondo y El Pozo, y 2) la Presa de

Guadalupe por los siguientes arroyos Xinte, La Bolsa y Plan de Guadalupe, como se observa en la figura 1. (Galar-Martínez et al, 2010)

El abasto de agua potable en el municipio de Atizapán se realiza a través de una red de 27 pozos profundos, con una extracción diaria de 35,202.04 m³, de la presa Madín y del Sistema Cutzamala.

Ésta presa se construyó a los 99° 15' 33'' longitud Oeste y 19° 31' 37'' latitud Norte para satisfacer varios propósitos, como regular los caudales (avenidas) del río Tlalnepantla y potabilizar parte de su volumen almacenado. Fue inaugurada en 1980 y tiene una capacidad límite de 25,000,000 m³, aunque solo almacena 13,000,000 m³, previendo caudales mayores. Una parte mínima de dicho volumen aproximadamente de 540 a 600 L/s se bombea a la planta potabilizadora para ser distribuida a la red municipal.



Figura 1. Presa Madín. Fuente: González-González et al, 2014.

Dos plantas para tratamiento de agua procesan las fuentes de agua superficial en la Cuenca de México antes de enviarla a la ZMVM. En el Distrito Federal opera la planta del Río Magdalena, la cual aplica un proceso a base aluminio, coagulación/floculación, sedimentación por gravedad, filtración de arenas rápidas y desinfección con cloro. La Comisión Nacional del Agua opera una planta de aguas superficiales en la presa Madín, que abastece al área de servicio del Estado de México y emplea un proceso de tratamiento similar al de la planta Magdalena (García-Medina, et al 2012).

Una de las principales fuentes de contaminación del agua la constituye el nivel de acidez de las precipitaciones pluviales, cuyo pH varía de 5 a 5.4 en este municipio. Este fenómeno se presenta principalmente por las altas emisiones de contaminantes, SOX, NOx y Cl₂ generados por fuentes fijas y móviles (industria y automotores).

Como el municipio no cuenta con el equipo necesario para el tratamiento adecuado de sus aguas residuales, la presa Martín que es un cuerpo de agua que se destina para el consumo humano se encuentra contaminada con descargas sanitarias directas, provenientes de los asentamientos humanos localizados en la zona.

Las aguas residuales, especialmente las de tipo industrial, contienen elementos nocivos como lo son: sustancias químicas diversas, metales pesados, solventes, ácidos, grasas y aceites, entre otros. Asimismo, en las casas - habitación se tiene el uso extendido de detergentes en lugar de jabones y los talleres mecánicos comúnmente arrojan aceites quemados a las alcantarillas (González-González et al, 2014).

En estudios realizados en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México y el Laboratorio de Toxicología Acuática de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, se detectaron diversos contaminantes, dentro de los metales encontrados destacan el aluminio (239,43 mg.L-1), el mercurio (397,78 mg.L-1) y el hierro (138,13 mg.L-1), hidrocarburos y medicamentos, en presa Martín, embalse que sirve tanto para actividades de recreo como medio de producción de alimentos para la comunidad, pruebas posteriores evidenciaron que dichos contaminantes producen un notable incremento del estrés oxidativo (elevación del grado de lipoperoxidación y catalasa), así como daños a nivel de proteínas en carpa común (*Cyprinus carpio*) por exposición aguda, incluso en las concentraciones consideradas como adecuadas para el desarrollo de la vida (González-Torres, 2000; Galar-Martínez et al., 2010; García-Medina et al, 2012; González-González et al, 2014).

Pese a estos factores, dentro de las especies acuáticas presentes en ésta presa, es posible encontrar tilapia, mojarra, carpa común y carpa espejo.

3.4 Carpa común (*Cyprinus carpio*)

La carpa común (*Cyprinus carpio*) es un pez omnívoro usado comúnmente en acuicultura comercial, y ha sido propuesto como un organismo de prueba en ensayos toxicológicos debido a su importancia económica y distribución geográfica (García-Medina et al., 2012). Vive en las corrientes medias y bajas de los ríos, en áreas inundadas y en aguas confinadas poco profundas, tales como lagos, meandros lacunares y embalses de agua. Las carpas son principalmente habitantes del fondo, pero buscan alimento en las capas media y superior del cuerpo de agua (FAO, 2013).

El espectro ecológico de la carpa es amplio. El mejor crecimiento se obtiene cuando la temperatura del agua está en el intervalo 23 °C y 30 °C. Los peces pueden sobrevivir períodos de inviernos fríos. Salinidades hasta alrededor de 5% son toleradas. La gama de pH óptimo es 6,5-9,0. La especie puede sobrevivir bajas concentraciones de oxígeno (0,3-0,5 mgL⁻¹) así como súper saturación. Las carpas son omnívoras, con una gran tendencia hacia el consumo de alimento animal, tal como insectos acuáticos, larvas de insectos, gusanos, moluscos y zooplancton. El consumo de zooplancton es dominante en estanques de peces donde la densidad de siembra es alta. Adicionalmente, la carpa consume los tallos, hojas y semillas de plantas acuáticas y terrestres, plantas acuáticas en descomposición, etc. El cultivo de la carpa en estanques se basa en la habilidad de la especie para aceptar y utilizar cereales proporcionados por los granjeros. El crecimiento diario de la carpa puede llegar a ser 2 a 4 por ciento del peso corporal. Las carpas pueden alcanzar 0,6 a 1,0 kg de peso corporal dentro de una estación en los estanques de cría de peces en policultivo de áreas subtropicales/tropicales. El crecimiento es mucho más lento en la zona temperada: ahí los peces alcanzan pesos corporales de 1 a 2 kg después de dos a cuatro estaciones de crianza (FAO, 2013)

Su historia en México se remonta a finales del siglo XIX con la introducción de las primeras especies originarias de Asia: *Cyprinus carpio* y *Carassius auratus*. La rápida adaptación de estos peces a las condiciones del país favoreció su dispersión exitosa en los lagos y presas de la meseta central, propiciando la introducción en 1956 de la carpa de

Israel o espejo (*C. carpio specularis*), y más tarde en el año de 1965 la de las carpas herbívora (*Ctenopharyngodon idellus*), plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) y de la barrigona (*C. carpio rubrofuscus*), procedentes también de la República Popular China; posteriormente en 1979 se importaron las carpas cabezona (*Aristichthys nobilis*), negra (*Mylopharyngodon piceus*) y la brema (*Megalobrama amblycephala*) (Ceballos y Velázquez, 1988)

Las principales especies de carpas que se cultivan en nuestro país son la común, la espejo (figura 2), también llamada "carpa de Israel", la dorada, la herbívora, la plateada y la cabezona.

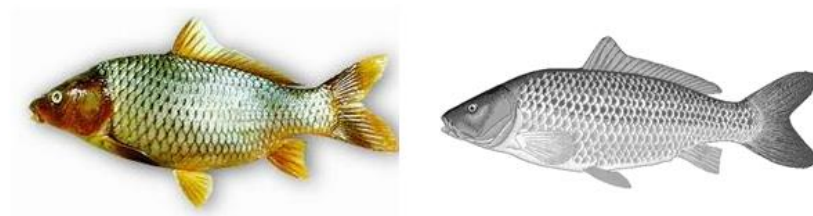


Figura 2. Carpa común (*Cyprinus carpio L.*) variedades con escamas (a) y espejo (b). Fuente: FAO, 2014

Dada la gran capacidad de la carpa para desarrollarse en las condiciones ambientales de los diferentes sistemas acuíferos del país, esta se encuentra presente en el 80% de la superficie de cuerpos de agua de México, siendo los más relevantes: Hidalgo, Michoacán, Guanajuato, Durango y el Estado de México, en donde ya se ha constituido como un recurso de consumo popular cuyo impacto socioeconómico en los últimos años se ha incrementado derivado del aumento en la producción de carne y de crías (FAO, 2013).

En la tabla 3 se puede observar el volumen de la producción pesquera por especie en México desde el 2006, siendo la carpa el segundo pescado más producido en México, sin embargo es importante considerar que la mojarra, especie que ocupa el primer lugar se obtiene en estados con y sin litoral, mientras que la carpa se produce principalmente en estados sin litoral (SAGARPA, 2011).

Tabla 3. Volumen de la producción pesquera por especie en México en toneladas

AÑO	TOTAL	ATUN	CARPA	MOJARRA	TRUCHA
2006	259,664	3,806	22,504	69,214	4,232
2007	266,538	2,923	21,798	73,580	4,345
2008	282,404	2,762	24,147	71,018	4,917
2009	283,660	2008	22,620	73,373	6,065
2010	269,363	3,638	24,231	76,986	6,919
2011	261,811	2,929	18,528	71,135	8,480

Fuente: SAGARPA, 2011.

En comparación del volumen de producción por entidad federativa, el Estado de México, es la entidad con mayor producción acuícola (INEGI, 2010), con un promedio en los últimos 6 años (hasta 2011) de 10,430 toneladas. En el estado se encuentran tres piscifactorías las cuales se consideran los principales productores de pies de cría de trucha, carpa y tilapia. Siendo la carpa, la principal especie producida. En la figura 3, se puede observar el volumen de la producción de carpa en peso vivo por litoral 1999 a 2009 (Miles de toneladas), se puede observar que la carpa, es producida principalmente por las entidades sin litoral (INEGI, 2010; SAGARPA, 2011).

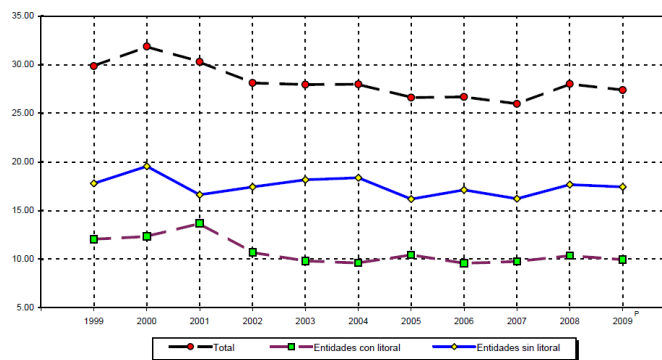


Figura 3. Volumen de la producción de carpa en peso vivo por litoral 1999 a 2009 (Miles de toneladas), INEGI 2010

3.5 Función de las proteínas en el pescado

La carpa se considera una fuente de proteína de alta calidad, la cual constituye aproximadamente el 20% de su parte comestible, (Carrera, 1990). Las proteínas constituyen el componente mayoritario de la materia seca del músculo estriado, cuya función es determinante en la calidad sensorial y nutricional de las carnes rojas, pescados y mariscos (Arizmendi, 2012), las proteínas del músculo del pez se pueden dividir en tres grupos:

1. *Proteínas estructurales* (actina, miosina, tropomiosina y actomiosina), que constituyen el 70-80 % del contenido total de proteínas (comparado con el 40 % en mamíferos) también llamadas proteínas contráctiles, son responsables de la contracción muscular, son solubles en disoluciones de alta fuerza iónica pero insolubles en agua. En los organismos acuáticos, las proteínas miofibrilares son más susceptibles al calor que aquellas de animales terrestres (Huss, 1988; Arizmendi, 2012).
2. *Proteínas sarcoplasmáticas solubles* (mioalbúmina, globulina y sistemas enzimáticos) esta fracción constituye el 25-30 % el total de proteínas. Los compuestos presentes en el sarcoplasma o miógeno de organismos de origen marino incluyen proteínas solubles en agua y en disoluciones salinas; péptidos, aminoácido, aminos, granadina purinas y urea. Todos ellos regulan el metabolismo celular y son presuntamente responsables de las características sensoriales como aroma, sabor y textura del tejido fresco y procesado. Este grupo de proteínas se caracteriza por ser buenos agentes emulsificantes y retener una gran cantidad de agua, lo que evita pérdida de humedad en el proceso de cocción de las carnes; además tiene la capacidad de coagular y formar geles (Huss, 1988; Fennema, 2010; Arizmendi, 2012).
3. *Proteínas insolubles* o del tejido conectivo (colágeno), que constituyen aproximadamente el 3 por ciento del total de las proteínas en teleósteos y cerca del 10 % en elasmobranquios (comparado con el 17 % en mamíferos). El contenido de colágeno y la formación de enlaces cruzados influyen en la solubilidad y dureza del tejido muscular. En los animales terrestres y marinos el número de enlaces cruzados aumenta con la edad

incrementando la dureza del músculo, sin embargo las especies acuáticas poseen alrededor de una décima parte del colágeno presente en mamíferos y aves (Huss, 1988; Dublán, et al., 2006).

Propiedades funcionales de las proteínas

La funcionalidad del tejido muscular depende de la fracción proteica; ya que los cambios suscitados a nivel molecular modifican las características microestructurales y reológicas del tejido muscular; así como de factores extrínsecos del medio que los rodea como pH, fuerza iónica, temperatura, actividad acuosa, constante dieléctrica, entre otros (Price, 1994; Sirkoski, 1994; Fennema, 2010).

Las proteínas miofibrilares son las principales contribuyentes de la textura y de las propiedades funcionales en el músculo, siendo la textura uno de los factores determinantes de la evaluación sensorial por parte del consumidor, ésta evaluación puede llevarse a cabo mediante un análisis sensorial, empleando para ello un panel de evaluadores entrenados o bien pruebas destructivas con un texturómetro, el cual cuantifica la fuerza necesaria para llevar a cabo desde la compresión hasta la penetración de la muestra, éstos valores se grafican obteniéndose los siguientes parámetros:

- *Dureza*, valor correspondiente a la fuerza máxima en la primera compresión.
- *Elasticidad*, capacidad de un cuerpo para recuperar su forma original, al ser retirada de él una fuerza deformante.
- *Cohesividad*, definida como la resistencia del producto a una segunda deformación, en relación al comportamiento que tuvo debido a la primera compresión.
- *Gomosidad*, fuerza necesaria para destruir un producto semisólido, es calculada como $\text{dureza} \times \text{cohesividad}$.
- *Adhesividad*, capacidad de un producto a adherirse a un objeto, está determinada por la energía total requerida para que el punzón se retire de la muestra después de la primera compresión, representados en la siguiente figura (Figura 4) (Dublán et al., 2006; Huss)

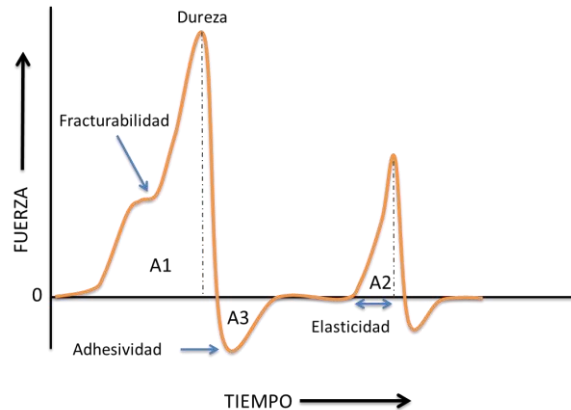


Figura 4. Ejemplo generalizado de gráfica de TPA. Fuente: Arizmendi, 2012.

La relación entre propiedades funcionales y características estructurales explica la variación en el comportamiento funcional de los miosistemas cárnicos (Dublán et al., 2006; Arizmendi, 2012).

La funcionalidad de las proteínas alimentarias se define como aquellas propiedades físicas y químicas que derivan del comportamiento de las proteínas en los sistemas alimenticios durante el procesado, el almacenamiento, la preparación y el consumo (Price, 1994).

En los productos cárnicos destacan cuatro principalmente: solubilidad, gelificantes, capacidad emulgente y capacidad de Retención de agua.

La solubilidad de las proteínas afectan su capacidad espesante, espumante, emulgente y gelante, y ésta a su vez está determinada por las interacciones iónicas e hidrofóbicas de las proteínas. Las primeras promueven las interacciones proteína-agua y aumentan la solubilidad, en tanto que las segundas promueven la asociación proteína-proteína y disminuyen la solubilidad.

De acuerdo con sus características de solubilidad, las proteínas se clasifican en cuatro categorías:

Albúminas, que son solubles en agua, a pH 6,6 (por ejemplo, seroalbúmina y ovoalbúmina), *globulinas*, solubles en disoluciones salinas diluidas, a pH 7, *glutelinas*, solubles en disoluciones ácidas (pH 2) y alcalinas (pH 12) y *prolaminas*, solubles en etanol al 70% (Fennema, 2010).

Las proteínas tienen la capacidad de formar geles, un gel es una fase intermedia entre un sólido y líquido y técnicamente se define como un sistema sustancialmente diluido que exhibe un flujo de estado no estacionario. Se obtiene por entrecruzamiento de polímeros mediante enlaces covalentes o no covalentes, para formar una red capaz de atrapar el agua y otras sustancias de bajo peso molecular. Esta transformación se ve facilitada por el calor, las enzimas o los cationes divalentes, en condiciones adecuadas. Todos estos agentes inducen la formación de una estructura en red tridimensional (Pilosof, 2000).

La mayor parte de los geles proteicos alimentarios se preparan calentando una disolución de proteína. En este procedimiento de gelificación, la proteína en estado de sol se transforma primero en un “estado progel”, por desnaturalización. El progel suele ser un líquido viscoso en el que ya ha tenido lugar un cierto grado de polimerización. En esta etapa la proteína se despliega y se expone un número crítico de grupos funcionales (como grupos hidrófobos y grupos formadores de puentes de hidrógeno) de forma que permita el inicio de la segunda etapa, es decir, la constitución de la red tridimensional proteica. La formación del progel es irreversible, porque tienen lugar muchas interacciones proteína-proteína entre las moléculas desplegadas.

Cuando el progel se enfría a temperatura ambiente o de refrigeración, el descenso de energía cinética térmica facilita la formación de enlaces no covalentes estables entre los grupos funcionales expuestos de las diversas moléculas; esto es lo que constituye la gelificación.

Las fuerzas implicadas en la formación de la red son, fundamentalmente, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas.

Las proteínas que contienen cisteína y cistina pueden polimerizar vía reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro durante el calentamiento, y formar una red covalente continua al enfriarse.

Los geles proteicos son sistemas muy hidratados, que contienen hasta un 98% de agua. El agua es atrapada en estos geles, tiene un potencial químico similar al del agua de las disoluciones acuosas, pero carece de fluidez y no puede ser expulsada fácilmente por estrujamiento.

Cuando las proteínas son desnaturalizadas bajo condiciones controladas, sus propiedades pueden ser utilizadas con propósitos tecnológicos. Un buen ejemplo es la producción de productos a partir de surimi, en los cuales se emplea la capacidad de las proteínas miofibrilares de pescado para formar geles. Las proteínas forman un gel muy resistente cuando se añade sal y estabilizadores a una preparación de proteínas musculares (carne finamente picada), que posteriormente se somete a un proceso de calentamiento y enfriamiento controlado (Fennema, 2010; Huss, 1995).

La capacidad de retención de agua (CRA) se puede definir como la aptitud de la carne para mantener ligada su propia agua o, fijar agua adicionada bajo la influencia de fuerzas externas (presión, calor, etc.), y ésta se influida por varios factores como pH, fuerza iónica, tipo de sales, temperatura y por la conformación proteica. Las proteínas exhiben su hidratación mínima a su punto isoeléctrico, al que las interacciones proteína-proteína minimizan la interacción con el agua.

A bajas concentraciones (0,2 M), las sales aumentan la capacidad de fijación de agua de las proteínas, debido a que los iones salinos hidratados se fijan (débilmente) a los grupos cargados de las proteínas, debido a que en este punto existe una competencia entre la proteína y la sal por el agua, incrementándose las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas proteicas. Sin embargo, a concentraciones salinas altas, gran parte del agua presente en el medio se fija a los iones salinos, lo que determina la deshidratación de las proteínas. En el pescado, que tiene estructuras proteicas fibrosas, así como en los productos

texturizados es un factor decisivo para los aspectos sensoriales y texturales, reflejándose en la jugosidad y masticabilidad (Fennema, 2000; Gil, 2010).

Calidad nutrimental de las proteínas.

Dentro de las propiedades de las proteínas se debe considerar también su valor como componentes de la dieta humana y su parte esencial en los componentes estructurales y funcionales de los sistemas vivos. Las proteínas proveen de aminoácidos, los cuales sirven como los bloques de construcción de los órganos vitales, músculos (incluyendo el cardíaco), hormonas y fluidos biológicos como la sangre (Boye, 2012).

Composición química de *Cyprinus carpio*

El pescado y sus productos se caracterizan por contener los componentes necesarios de una dieta adecuada, ya que satisface los requerimientos de energía y de componentes nutritivos, los cuales incluyen; proteínas con buena digestibilidad y aporte biológico, ácidos grasos poli-insaturados, componentes minerales, grasa, vitaminas lipo e hidrosolubles, (Usydus, Szlinder-Richert & Adamczyk, 2009).

4 Justificación

Los problemas ecológicos ocasionados en medios acuáticos son debidos, entre otros factores, a la introducción de contaminantes en el agua tales como metales, medicamentos y compuestos orgánicos (Mok et al., 2012). Muchos de estos compuestos son tóxicos a los organismos acuáticos y dependiendo de su naturaleza y concentración, pueden causar daños crónicos o letales en los mismos (Salánki et al., 2003).

Estudios recientes de identificación de contaminantes en la presa Madín, muestran concentraciones elevadas de medicamentos, hidrocarburos y metales especialmente; aluminio, mercurio y hierro (239,43 mg.L⁻¹, 397,78 mg.L⁻¹ y 13,13 mg.L⁻¹, respectivamente) (González-González et al, 2014), contra las establecidas como adecuadas para el desarrollo de vida acuática de agua dulce de 0,005 mg.L⁻¹ para aluminio, 0,001 mg.L⁻¹ para mercurio y 0,3 mg.L⁻¹ para hierro (Hickman, Thomann & Murdoch, 1998). En carpa común (*Cyprinus carpio*), se encontró que incluso a concentraciones de 0,05 mg.L⁻¹ el aluminio induce, tanto estrés oxidativo como alteraciones en la actividad de las enzimas antioxidantes en linfocitos (García-Medina et al., 2012), induciendo daños celulares debido a alteraciones en ADN, membranas y proteínas (Bellasoued et al., 2012).

El daño oxidativo a las proteínas tiene una química muy compleja, las especies oxidantes actúan preferentemente en los aminoácidos fenilalanina, tirosina, triptófano, histidina y metionina, formando consecuentemente el entrecruzamiento de las cadenas peptídicas, fragmentación de la proteína y formación de grupos carbonilos, lo que impide el desarrollo normal de sus funciones (Bhattacharya, 2001; Usyduš et al., 2009), las cuales podrían ser enzimáticas, texturales y sensoriales así como el aporte nutrimental cuando estas son parte de la dieta.

Es decir, la oxidación específica de proteínas debido a la presencia de metales, puede afectar la calidad de éstas, lo que presumiblemente tendrá implicaciones en la calidad final de la carne, tanto en la parte sensorial y textural como en la parte nutrimental, lo que conlleva a un impacto tanto en la salud del consumidor como en el aspecto económico.

5 Hipótesis

Se sabe que la exposición crónica a mezclas de contaminantes en especies acuáticas generan estrés oxidativo y consecuentemente daño proteico evidenciado en las características fisicoquímicas, texturales y nutrimentales del músculo de esto como en el caso de la carpa común (*Cyprinus carpio*).

6 Objetivos

6.1 Objetivo General

Evaluar la alteración en las características fisicoquímicas, texturales, y nutrimentales en carpa común (*Cyprinus carpio*) por la exposición a efluentes con la presencia de contaminantes d la presa Madín.

6.2 Objetivos Específicos

- Determinar estrés oxidativo inducido por la exposición crónica mediante la presencia de actividad enzimática cuantificando el grado de lipoperoxidación, catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en especies de presa Madín y en especies con crecimiento en condiciones consideradas como aptas para las mismas.
- Determinar el efecto de exposición crónica con los parámetros de calidad fisicoquímicas de músculo en carpa común (*C. carpio*) de presa Madín.
- Determinar el efecto de la exposición crónica en las características texturales de la especie acuática mediante un Análisis del Perfil de Textura (TPA), microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (MEB).
- Determinar el efecto de exposición crónica sobre la calidad nutrimental mediante análisis proximal de la carne.

7 Metodología

Se llevó a cabo un estudio comparativo de carpa expuesta crónicamente a concentraciones elevadas de xenobióticos procedentes de presa Madín, contra especies criadas para consumo humano bajo condiciones controladas de calidad de agua y alimento para éste fin, se cuantificaron enzimas antioxidantes y productos de oxidación, se llevaron a cabo las pruebas fisicoquímicas, texturales, nutrimentales. Se analizaron los resultados estadísticamente, determinando las diferencias mediante análisis de varianza de una vía, seguido de pruebas de comparación múltiple de Bonferroni, con un intervalo de confianza de 95%.

7.1 Colecta y mantenimiento de la carpa

Para las muestras control, del centro acuícola Tiacaque, se obtuvieron muestras de $41 \text{ cm} \pm 2.5 \text{ cm}$ de largo y peso de $2.64 \pm 0.3 \text{ Kg}$. Se transportarán al laboratorio en condiciones seguras con bolsas de polietileno con agua oxigenada. Se almacenaron en un tanque de contención, con agua libre de cloro en caso, y se aclimataron hasta su uso en la prueba. Durante la climatización los peces fueron alimentados con Wardley Premium pellets. El agua (tres cuartos del total) del blanco fue remplazada cada 24 horas para mantener un ambiente sano. Las características fisicoquímicas del agua corriente fueron de; temperatura $20 \pm 2^\circ\text{C}$, concentración de oxígeno 80-90%, alcalinidad total de $(17,8 + 7,3 \text{ mg.L}^{-1})$, dureza total $(18,7 + 0,6 \text{ mg.L}^{-1})$, manteniendo ciclos de luz-obscuridad.

De presa Madín se obtuvieron total carpas de $40 \pm 1.5 \text{ cm}$ de largo, $2.4 \pm 0.3 \text{ Kg}$ de peso, capturados del punto de muestro 5, delimitado como descarga del pueblo de Viejo Madín (Figura 1) correspondiente a uno de los sitios de muestreo más impactados del embalse, determinado por estudios previos. Las peces, tanto control como de prueba, fueron sacrificados, el músculo obtenido se congeló en una disolución CO_2 :acetona, y se almacenaron a -40°C hasta su análisis.

7.2 Evaluación del estrés oxidativo

Determinación del grado de lipoperoxidación: Método de Buege y Aust, 1979. 100 μL de la muestra (sin centrifugar) se completó a 1 mL con solución reguladora tris-HCl 150 mM a pH 7.4 y se le adicionó 2 mL de TCA-TBA (ácido tiobarbitúrico al 0.375% en ácido tricloroacético al 15%) se indujo a choque térmico con agua en ebullición y se dejó en reposo en un baño maría incubándose a 37 °C por 30 min. Concluido el tiempo se centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. y se determinó la absorbancia a 535 nm. Los resultados se expresaron en mM de malondialdehído / mg proteínas, usando el coeficiente de extinción molecular (CEM) $1.56 \times 10^5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Determinación de proteínas oxidadas: (Método de Levine et al., 1994). Se tomaron 100 μL del sobrenadante y se adicionaron 150 μL de 10 mM de DNPH/2M HCl. Se incubó durante 1 h a oscuridad. Después se adicionó 500 μL de tricloroacético al 20% y se dejó reposar durante 15 min a 4°C. El precipitado de las proteínas se colectó por centrifugación a 11 000 rpm por 3 min. El botón obtenido se lavó tres veces con etanol-acetato de etilo 1:1 y posteriormente se disolvió en 150 μL de una solución de 6 M guanidina, pH 2.3, e incubó a 37 °C por 30 min. La absorbancia se determinó a 366 nm. Los resultados se expresaron en mM o nM de carbonilos reactivos (C=O)/mg proteínas usando el coeficiente de extinción (CE) el cual es de $21\ 000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Determinación del contenido de hidroperóxidos: (Método de Jiang, Hunt & Wulff, 1992). A 100 mL de la muestra (previamente desproteinizada con ácido tricloroacético al 10%) se le agregaron 900 mL de mezcla de reacción (FeSO_4 0.25 mM, H_2SO_4 25 mM, naranja de xilenol 0.1 mM e hidroxitolueno butilado 4 mM en metanol al 90%). Se incubó a temperatura ambiente durante 60 min. La absorbancia se determinó a 560 nm. Los resultados se expresaron en nmol de hidroperóxido de cumeno (CHP)/mg de proteínas/g de tejido, usando el CEM de $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa: Método de Misra y Fridovich, 1972. Se colocaron 40 μL del homogeneizado de músculo en una celda de cuarzo y se

adicionaron 260 μL de la solución amortiguadora de carbonatos (50 mM de carbonato de sodio y 0.1 mM EDTA) a pH 10.2. Se agregaron 200 μL de adrenalina 30 mM, y se determinó la absorbancia a 480 nm, a los 30 s y 5 min. Los resultados se expresaron en M adrenalina /mg proteínas, se utilizará el coeficiente de extinción molecular (CEM) de 21 M-1 cm-1.

Determinación de la actividad de la catalasa: Método de Radi y colaboradores (1991). 20 μL del sobrenadante de la muestra fueron colocados en una celda de cuarzo, se le agregaron 280 μL de disolución amortiguadora de aislamiento (0.3 M sucrosa, 1 mM EDTA, 5 mM HEPES y 5 mM KH_2PO_4) y 200 μL de disolución de H_2O_2 20 mM. Posteriormente se realizaron lecturas a 240 nm, a 0 y 60 seg. Los resultados se obtuvieron aplicando la siguiente fórmula: Concentración de catalasa = $(A_0 - A_{60}) / \text{CEM}$. Donde el CEM del H_2O_2 = 0.043 mM-1 cm-1; los datos se expresarán en mM de H_2O_2 /min/g tejido

Determinación de Glutation peroxidasa: Método de Gunzler y Flohe-Clairborne (1985) modificado por Stephensen et al. (2000). A 100 μL del sobrenadante se le adicionaron 10 μL de glutacion reductasa (2 U glutacion reductasa) más 290 μL del buffer de reacción [50 mM K_2HPO_4 , 50 mM KH_2PO_4 , pH 7.0, 3.5 mM glutación reducido, 1 mM azida de sodio, 0.12 mM NADPH] y 100 μL H_2O_2 (0.8 mM). Se leyó absorbancia a 340 nm a los 0 y 60 s. Se estimó la actividad de GPX usando la siguiente ecuación: $\text{GPX} = (A_0 - A_{60}) / \text{CEM}$, donde el CEM de NADPH = 6.2 mM/cm. Los resultados se expresaron como mM NADPH/mg proteína.

7.3 Análisis fisicoquímicos y estructurales

7.3.1 Análisis fisicoquímicos

Medición pH: se tomaron 10 g de músculo, se homogenizó con 90 mL de agua destilada, ajustando la temperatura de la pasta a $20\text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5\text{ }^\circ\text{C}$, se realizó la lectura de pH con un potenciómetro previamente calibrado, esto de acuerdo con el método reportado por Owen y colaboradores, 1982.

Capacidad de retención de agua (CRA): De acuerdo con el método Honikel y Hamm (1975), reportado en Dublán y colaboradores (2006). 10 g de músculo se picó finamente, de los cuales 5 g se colocaron en un tubo de centrifuga y añadieron 8 mL de una disolución de NaCl 0,6 M. Se agitó con varilla de vidrio durante 1 min en baño de hielo y dejó reposar 30 minutos, se agitó nuevamente por 1 minuto y se centrifugó por 15 minutos a 3500 rpm. Se decantó el sobrenadante y midió volumen. Se reportó el volumen de NaCl retenido por 100 g de muestra.

Concentrado proteínico: Se prepare de acuerdo con la metodología descrita por Ngapo y colaboradores (1992), con pequeñas modificaciones: Se homogeneizaron 100g de músculo mediante licuado por 10 min con una mezcla de hielo- agua fría 1:1:1 (p/p/v) y se agitó magnéticamente en baño de hielo. La suspensión miofibrilar se filtró a través de dos capas de manta de cielo para remover tejido conectivo, la agitación y filtrado se llevó a cabo por triplicado. El músculo homogeneizado se centrifugó a $3000 \times g$ a 4°C por 25 min, se eliminó el sobrenadante. Parte del precipitado proteínico se reservó para formar geles y el resto para determinar concentración de proteínas y solubilidad.

Concentración de proteína: Se empleó el método biuret reportado por Miller (2001) en Dublán y colaboradores (2006). A 1 mL de las disoluciones de proteína y se agregaron 3 mL del reactivo de biuret (Se disolvieron 1.5 g de sulfato de cobre y 6 g de tartrato de sodio y potasio en 500 mL de agua destilada, en matraz volumétrico de 1 L. Se adicionaron 300 mL de hidróxido de sodio al 10% y aforó a 1L con agua destilada). Se homogeneizó y dejó en reposo durante 30 minutos en la sombra sin contacto directo con la luz, se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 540 nm, los datos obtenidos se relacionaron con una curva patrón de seroalbúmina-bovina de concentración 0-10 mg.mL⁻¹.

Solubilidad: Se utilizará el método Pilosof (2000). A una muestra de concentrado proteínico de concentración 5 mg.mL⁻¹, a pH 7, se centrifugó a 4°C para evitar su desnaturalización. Al sobrenadante extraído se le determinó la concentración de proteínas

mediante el método biuret. La solubilidad se reportó como la relación entre el contenido de proteínas del sobrenadante y el contenido de la proteína sin centrifugar por 100.

Determinación de sulfhidrilos totales: Se llevó a cabo el método Ellman (1959). Se mezclaron 1 mL del concentrado proteínico (5 mg/mL a pH 7) y 9 mL de urea 8 M disuelta en un amortiguador de Tris-Glicina-EDTA (10,4 gL⁻¹ Tris; 6,9 gL⁻¹ Glicina; 1.2 gL⁻¹ EDTA; pH 8). Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min, posteriormente a 3 mL de la mezcla se añadieron 50 mL de una disolución del reactivo 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzónico (4 mg.mL⁻¹ en la misma disolución amortiguadora) y se dejó reposar durante 30 min en obscuridad, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 412 nm, y se determinó la concentración de -SH por el coeficiente de extinción.

Formación de gel: Método reportado por Dublán, 2006. Extraídas las proteínas, se vertieron en un frasco de vidrio con tapón rosca, se colocaron en baño para calentamiento gradual de 1 °C por minuto hasta alcanzar una temperatura interna del gel de 80 °C para inducir la gelificación. Se retiraron los contenedores y colocaron en baño de hielo, se almacenaron en refrigeración, a temperatura no mayor de 4 °C para madurar la estructura del gel, hasta realizar las pruebas de textura.

7.3.2 Análisis estructurales

Microscopía electrónica de barrido: Preparación de las muestras. Se cortaron trozos pequeños del pescado longitudinalmente a las fibras musculares, firmemente en un sólo paso, usando navajas de afeitar nuevas. Fijación primaria: Los cortes se sumergieron en glutaraldehído disuelto al 5% en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7.4, hasta que las muestras tuvieran color anaranjado oscuro (24 h aproximadamente). Posteriormente, los cortes se colocaron en viales de 2.5 mL con disolución de glutaraldehído durante 24 h a 4°C. Después se lavaron con amortiguador de fosfatos pH 7.4, hasta eliminación del olor a glutaraldehído. Fijación secundaria; Después de los lavados, los cortes se colocaron en una disolución de tetraóxido de osmio (OsO₄) durante 2 h; al finalizar se lavó utilizando etanol a las siguientes concentraciones 30, 40, 50, 70, 80, 90% y etanol absoluto, durante 20 min cada vez. Desecación: Terminados los lavados, las muestras se colocaron en

microcápsulas de tipo poroso, se etiquetaron y situaron en contacto con etanol absoluto. Se llevó a desecación en un desecador de punto crítico Samdri-780 B (Sample Drying at the critical point, E.U.A.) arriba del punto crítico del CO₂: 1070 psi, 31°C. Las muestras secas se almacenaron en desecador. Se colocaron en portaobjetos, con cinta de carbón para recubrimiento con carbón y oro. Recubrimiento: Se empleó un recubridor de posición por ionización (BAL-TEC SCD, Liechteinstein). Una primera cobertura mediante vaporación al vacío de carbón, y una segunda con mezcla de oro-paladio por ionización al vacío. Una vez listas las muestras, se observaron en el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 LV, Japón) a 8 KV de aceleración, con una resolución de 1000x y 4000x.

Microscopía óptica: Para la técnica de microscopía se tomó una muestra representativa de 1 cm³ aproximadamente (orientación perpendicular y transversal de la hebra), con criomicrotomo se cortaron secciones de 10 µm de espesor, colocando los cortes sobre un portaobjetos y fijando en una solución acuosa de glutaraldehído al 2.5% durante 5 minutos y se enjuagaron con agua destilada. Las muestras se tiñeron con disolución acuosa de Azul de metileno (0.1 g/100mL) durante 5 minutos (para teñir proteínas), se enjuagó con agua destilada y con TEP (trietil fosfato acuoso: 60 g/100 mL) durante 30 segundos, se dejaron escurrir las preparaciones sobre papel absorbente hasta que estuvieron completamente secos los portaobjetos. Una vez secos los portaobjetos se sumergieron en una solución de Sudan IV (1 g/100 mL de TEP) recién preparada durante 8 minutos (para teñir la grasa), se enjuagó con agua destilada. Se tomaron las imágenes de la observación al microscopio óptico con objetivos 10, 40 y 100x.

Análisis de perfil de textura: Se llevó a cabo según lo reportado en Dublán y colaboradores, 2006 en texturómetro TA-XT2, versión 2.63, (Texture Technologie Corporation, Scarsdale, Nueva York, USA) el cual se equipó con una celda de carga de 25 N. Antes de las pruebas de textura los geles se atemperaron a temperatura ambiente (25°C, 1 h). Se retiró el sobrenadante, el cual se midió, considerándose esto como agua liberada. Cada muestra se comprimió mediante una punzón cilíndrico de acrílico con 1.25 cm de diámetro. Las mediciones de textura se realizaron en ciclos de dos compresiones de 50%, a

una velocidad de 1 mms-1 y un tiempo de reposo de 5 s entre la primera y la segunda compresión.

Se determinó: Dureza, valor correspondiente a la fuerza máxima en la primera compresión. Elasticidad, capacidad de un cuerpo para recuperar su forma original, al ser retirada de él una fuerza deformante, calculada como el cociente entre distancia 2 y distancia 1 ($L2/L1$). Cohesividad, definida como la resistencia del producto a una segunda deformación, en relación al comportamiento que tuvo debido a la primera compresión, ($A2/A1$). Gomosidad, fuerza necesaria para destruir un producto semisólido, es calculada como dureza*cohesividad. Adhesividad, la capacidad de un producto a adherirse a un objeto, está determinada por la energía total requerida para que el punzón se retire de la muestra después de la primera compresión (Dublán et al., 2006)

7.4 Análisis Proximal

Se realizó de acuerdo con los métodos oficiales de AOAC (2002); Humedad por el método de secado de horno a 103 °C por 5 horas, proteína por macro kjeldahl, grasa por extracción etérea con el método Soxhlet y cenizas por incineración en mufla a 580°C por 8h.

7.5 Análisis estadístico

Se llevó a cabo Análisis de Varianza (ANOVA), para determinar diferencias significativas entre las muestras se analizaron mediante la prueba de Bonferroni. Los análisis se considerarán significativas a un nivel de ($p < 0.05$), empleándose el programa SPSS versión 17 (USA).

8 Referencias

- AOAC International. 2002. Official methods of analysis of AOAC International. 17th edition current through 1st revision. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities.
- Arabi, M. (2004) Analyses of Impact of Metal Ion Contamination on Carp (*Cyprinus carpio L.*) Gill Cell Suspensions. *Biological Trace Element Research*, 100 (3), 229-245.
- Arizmendi Coteró, D. (2012) Efecto de antioxidantes de zarzamora (*Rubus spp*) y mezclas de proteínas de tres especies acuáticas, sobre las características fisicoquímicas y texturales de un gel prototipo tipo surimi. Tesis Maestría. Ciencias agropecuarias y recursos naturales. México: Universidad Autónoma del Estado de México UAEM
- Baird, C. (2001) *Química ambiental*. 1 ed. México: Editorial Reverté.
- Becerril, J.E. (2009) Contaminantes emergentes en el agua [en línea] disponible en <http://www.revista.unam.mx/vol.10/num8/art54/art54.pdf> [16 Mayo 2013].
- Bellasoued, K., Hamza, A., Van Pelt, J., Elfecki, A. (2012) Seasonal variation of Sarpasalpa fish toxicity, as related to phytoplankton consumption, accumulation of heavy metals, lipids peroxidation level in fish tissues and toxicity upon mice. *Environmental Monitoring Assessment* [en línea] disponible en <http://rd.springer.com/article/10.1007/s10661-012-2621-1/fulltext.html> [23 Octubre 2012].
- Benedetti, M., Martuccio, G., Fattorini, Daniele., Canapa, A., Barucca, M., Nigro, M. Regoli, F. (2007) Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Aquatic Toxicology*.85, 167-175.
- Bhattacharya, S. (2001) Stress Response to pesticides and heavy metals in fish and other vertebrates. *P Indian National Science Academy*.67 (5), 215-246.
- Boening, D.W. (2000) Ecological effects, transport and fate of mercury: a general review. *Chemosphere*. 40(12), 1335-1351.

- Boudere, C.I. (1990) Toxicidad de metals. En: Derache R. Toxicología y Seguridad de alimentos. Barcelona: Omega, 129.
- Büege, J.A., Aust, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods of Enzymology*. 52, 302-310.
- Carrera, G. (1990) Requerimientos nutricionales. En: Derache R. Toxicología y Seguridad de alimentos. Barcelona: Omega, 29.
- Carriguirborde, R., Handy, D., Davies, S.J. (2004) Physiological Modulation of Iron Metabolism in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fed Low and High Iron Diets. *Journal of Experimental Biology*. 207,75-86.
- Ceballos, M.L. y Velazquez, M.A. (1988) *Perfiles de la alimentación de peces y crustáceos en los centros y unidades de producción acuícola en México*. México: Secretaría de Pesca, Dirección General de Acuicultura.
- Chen, C., Qian, Y., Chen, Q., Li, C. (2011) Assessment of Daily Intake of Toxic Elements Due to Consumption of Vegetables, Fruits, Meat, and Seafood by Inhabitants of Xiamen, China. *Journal of Food Science*. 76(8), 181-188.
- Devlin, E.W. (2006) Acute toxicity, uptake and histopathology of aqueous methyl mercury to fathead minnow embryos. *Ecotoxicology*. 15 (1), 97-110.
- Dublán, G. O., Cruz, C. R., Guerrero, L. I., & Ponce, A. E. (2006). Effect of refrigerated storage on proteolytic activity and physicochemical and microstructural properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *Muscle Foods*. 17, 291-310.
- Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82, 70-77.
- Exeley, C. (1996) Aluminum in the brain and heart of the rainbow trout. *Journal of Fish Biology*. 48, 706-713.
- FAO 2013. Programa de información de especies acuáticas. *Cyprinus carpio*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Peteri, A. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Actualizado 1 January 2004. [Citado 5 April 2013]. http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/es.
- Fennema, O. R., Parkin, K. L., & Domodaran, S. (2010). *Química de los alimentos* (3a ed.). España: Acribia.

- Galar-Martínez, M., Gómez-Oliván, L., Amaya-Chávez, A., Vega-López, A., López-López, E., Sedeño-Díaz, E. (2010) Oxidative stress induced on *Cyprinus carpio* by contaminants present in the water and sediment of Madín Reservoir. *Journal of Environmental Science and Health*. 45(2), 155-160.
- García-Medina, S., Razo-Estrada, A., Gómez-Oliván, L., Amaya-Chávez, A., Madrigal-Bujaidar, E., Galar-Martínez, M. (2012) Aluminum-induced oxidative stress in lymphocytes of common carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 36, 845-882.
- Gómez-Oliván, L.M., Neri-Cruz, N., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., García-Medina, S., Razo-Estrada, C., Dublán-García, O., Corral-Avitia, A.Y. (2012) Assessing the oxidative stress induced by paracetamol spiked in artificial sediment on *Hyalella azteca*. *Water Air Soil Pollution*. 223, 5097-5104.
- González-Torres, M.C., Betancourt-Rule, M., Ortiz-Muñiz, R. (2000) Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica*. 1(25), 3-9
- Gunzler, W., Flohe-Clairborne, A. (1985) Glutathione peroxidase, in: Green-Wald RA (ed) Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, pp 285–290
- Hickman, R., Thomann, R.V., Murdoch, D. (1988) Criterios de calidad del agua. En: Salas HJ (ed) Manual de evaluación y manejo de sustancias tóxicas en aguas superficiales. Organización Mundial de la Salud y Organización Panamericana de la Salud. Lima, pp 2.A.II.16
- Huss, H., 1995. Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries technical paper No. 348, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, pp. 202.
- INEGI. (2010) 'El sector alimentario en México, 2010. Serie Estadísticas Sectoriales'[en línea] Disponible en http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sociodemografico/SAM/2010/sam2010.pdf
- 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. *Analysis of Biochemistry*. 202, 384-389.

- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E. (1994) Carbonyl assays for determination of oxidative modified proteins. *Methods of Enzymology*. 233, 346-357.
- López, A., Fernando, C., Lazarova, Z., Bañuelos, R., Sánchez, H. (2012) 'Antioxidantes, un paradigma en el tratamiento de enfermedades' *Revista ANACEM*. 6, 1.
- Lushchak, V.I. (2011) 'Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals' *Aquatic Toxicology*, 101, 13-30.
- Mei-Hui, L. (2008) 'Effects of nonionic and ionic surfactants on survival, oxidative stress, and cholinesterase activity of planarian'. *Chemosphere*, 70, 1796-1803.
- Misra, H.P., Fridovich, I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biology and Chemistry*. 247, 3170-3175
- Mok, W.J., Senoo, S., Itoh, T., Tsukamasa, Y., Kawasaki, K., Ando, M. (2012) Assessment of concentrations of toxic elements in aquaculture food products in Malaysia. *Food Chemistry*. 133, 1326-1332.
- Montero, M. (1999) 'Los radicales libres y las defensas antioxidantes' *Anales de la Facultad de Medicina de Universidad Mayor de San Marcos*. 57, 4
- Ngapo, T., Wilkinson, B., Chong, R., Haisman, D. (1992) Gelation of bovine myofibrillar protein induced by 1,5 Gluconolactone, in: 38th International Congress of Meat Science and Technology, Clermont Ferrand, France. pp. 1095-1098.
- 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*". *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 29, 39-43
- Owen, J.E., Nuñez, F.A., Arias, M.T., De Cano, Rios, O. (1982) Manual De Prácticas de Cursos de Tecnologías de la Carne. Facultad de Zootecnia, Universidad de Chihuahua, Chihuahua, Mexico.
- Pilosof, M.R.A. (2000) 'Caracterización Funcional y Estructural de Proteínas'. Argentina: Editorial Universitaria de Buenos Aires, p 175-179.
- Rios-de-Molina, C. (2003) El estrés oxidativo y el destino celular. *Química viva*. 12 (2), 17-28.

- Radi, R., Turrens, J.F., Chang, L.Y., Bush, K.M., Crapo, J.D., Freeman, B.A. (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biology and Chemistry*. 266, 22028-22034.
- Rimblas, M.E. (2004) *Los compuestos químicos en los alimentos, desde la perspectiva de la seguridad alimentaria*. 1 edn. España: Imprenta Regional.
- Salánki, J., Farkas, A., Kamardi, a T., Rozsa, K.S. (2003) Molluscs in biological monitoring of water quality. *Toxicology letters*. 140-141, 403-410.
- SAGARPA (2011) Infografía cultural 2011. [en línea] Disponible en http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/infografia_acuacultura_2011[8 de Abril de 2013].
- SEMARNAT (2006). Política Ambiental Nacional para el Desarrollo Sustentable de océanos y costas de México [en línea] Disponible en <http://www.encuentra.gob.mx/resultsAPF.html?q=carpa&client=semarnat3>.
- Sobrino-Figueroa, A.S. (2013) “Evaluation of oxidative stress and genetic damage caused by detergents in the zebrafish *Daniorerio* (Cyprinidae)”. *Compilation Biochemistry Physiology* [on line] disponible en <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.026> [9 Abril 2013].
- Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Ena, M., Forlin, L. (2000) Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest of Iceland. *Aquatic Toxicology*. 48, 431–442.
- Usydus, Z., Szlinder-Richert, J., Adamczyk, M. (2009) Protein quality and amino acid profiles of fish products available in Poland. *Food Chemistry*. 119, 139-145.
- Wang, R., Wang, W. (2012) Contrasting mercury accumulation patterns in tilapia (*Oreochromis niloticus*) and implications on somatic growth dilution. *Aquatic Toxicology*. 114–115, 23–30.
- Ward, R.J., McCrohan, C.R., White, K.N. (2006) Influence of aqueous aluminium on the immune system of the freshwater crayfish (*Pacifasticus leniusculus*). *Aquatic Toxicology*. 77, 222-228.

- Ward, D.M., Nislow, K.H., Chen, C.Y., Folt, C.L. (2010) Rapid, Efficient Growth Reduces Mercury Concentration in Stream-Dwelling Atlantic Salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*. 139(1), 1-10.
- Wassmur, B., Grans, J., Kling, P., Celander, M.C. (2010) Interactions of pharmaceuticals and other xenobiotics on hepatic pregnane Xreceptor and cytochrome P450 3A signaling pathway in rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*100, 91-100.
- Yokel, R.A. (2000) The toxicology of aluminum in the brain: a review. *Neurotoxicology*. 5, 813.
- Yousef, M.I., El-Morsy, A.M., Hassan, M.S. (2005) Aluminium-induced deterioration in reproductive performance and seminal plasma biochemistry of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicology*. 215(1-2), 97-107.

De: Food and Chemical Toxicology <fct@elsevier.com>

Asunto: Submission Confirmation

Fecha: 3 de junio de 2014 18:34:48 GMT-5

Para: Leobardo Manuel Gomez Oliván <lmgomezo@uaemex.mx>, "lgolivan74@gmail.com" <lgolivan74@gmail.com>

Dear Dr Gómez-Oliván,

Your submission entitled "Chronic exposures to pollutants of Madín Reservoir (Estado de México) alter oxidative stress status in muscle and the food quality of common carp *Cyprinus carpio*" has been received by Food and Chemical Toxicology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/fct/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Food and Chemical Toxicology

Chronic exposures to pollutants of Madín Reservoir (Estado de México) alter oxidative stress status in muscle and the food quality of common carp *Cyprinus carpio*

Gabriela Morachis-Valdez^{ab}, Octavio Dublán-García^b, Leticia Xochitl López-Martínez^b,
Marcela Galar-Martínez^c, Karinne Saucedo-Vence^{ab}, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{a*}

^a Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, México

^b Laboratorio de Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, México

^c Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México

* Corresponding author:

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

Abstract

Madín Reservoir (MR) is located on the Río Tlalnepantla, its dam being downstream from the town of Madín, in the municipalities of Naucalpan de Juárez, Atizapán de Zaragoza and Tlalnepantla de Baz (State of Mexico). Previous studies conducted to identify pollutants at this site show that water in MR contain a considerable metal load, nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs), pesticides, hydrocarbons at concentrations higher than those determined to be suitable for aquatic life. The objective of this work was to evaluate whether chronic exposure to pollutants present in MR induce modification on oxidative stress status and they alter the physicochemical and textural properties in muscle (food quality) of *Cyprinus carpio*. Carp were captured from one sampling station (discharge from the town of Viejo Madín) and the following biomarkers were evaluated in muscle: hydroperoxide content (HPC), lipid peroxidation (LPX), protein carbonyl content (PCC), and activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). Also, the physicochemical and textural properties were evaluated in muscle of carp. Results show that contaminants (metals and nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals) present in water of MR induce oxidative stress and alter the physicochemical and textural properties in muscle of *C. carpio*. Thus, water in this reservoir is contaminated with xenobiotics that are hazardous to *C. carpio*, species consumed by the local human population.

Keywords: *Oxidative stress, muscle, Cyprinus carpio, physicochemical and textural properties*

1. Introduction

Madín Reservoir (MR) is located at 19° 31' 37"N and 99° 15' 33"W on the Río Tlalnepantla, its dam being downstream from the town of Madín, in the municipalities of Naucalpan de Juárez, Atizapán de Zaragoza and Tlalnepantla de Baz (State of Mexico). It has a full capacity of 25 million m³, but normally stores no more than 13 million m³ as a precaution against larger flows. This reservoir is used for multiple purposes: it supplies potable water to the municipalities of Naucalpan and Atizapán and is the site of diverse recreation activities including sailing and fishing of diverse species such as the common carp *Cyprinus carpio*.

MR has a maximum capacity of 25 million m³, but usually stores only 13 million m³ in order to be able to anticipate larger flows. A small part of this volume, approximately 540-600 l/s, is pumped to the Madín water purification plant for distribution through the municipal water supply. This plant is operated by the National Water Commission and uses an Al-based treatment to coagulate organic matter.

A major source of water contamination is the acid content of rain, which in this region ranges in pH between 5.0 and 5.4. This occurrence is mainly due to high emissions of contaminants such as SO_x, NO_x and Cl₂ produced by both fixed (industry) and mobile (motor vehicle) sources. Furthermore, both municipalities lack the equipment necessary to treat their wastewater and MR is contaminated with direct sanitary discharges from human settlements in the area, such as Viejo Madín and Nuevo Madín, as well as contaminants from different zones along the Río Tlalnepantla and garbage (Galar-Martínez et al., 2010).

Previous studies conducted to identify contaminants at this site show that water in MR contain a considerable metal load, especially for iron and aluminum, both exceed the permissible levels for aquatic life protection, while NSAIDs (nonsteroidal anti-inflammatory drug) such as DCF (diclofenac), IBP (ibuprofen) and NPX (naproxen) are present at $\mu\text{g/l}$ levels. Pesticides, hydrocarbons and surfactants originating in anthropogenic activities have also been qualitatively detected (González-González et al., 2014 *In press*).

The proliferation of pollutants such as pesticide residues, metals, detergents, and drugs in water reservoirs have been associated with an increase in reactive oxygen species and nitrogen (ROS and RNS) (Rimblas, 2004; Ward et al., 2010; Lushchak, 2011; Wang and Wang, 2012; Sobrino-Figueroa, 2013).

Oxidative stress occurs through alteration of the balance between ROS and antioxidant systems in the body. ROS, such as hydrogen peroxide (H_2O_2), the superoxide anion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) and the hydroxyl radical (HO^{\cdot}), are formed in cells as a result of metabolic processes. Hydroxyl radicals may initiate LPX (lipid peroxidation) in body tissues (Arabi, 2004; Lushchak, 2011). To mitigate the negative effects of ROS, fish and other vertebrates possess an antioxidant defense system that uses enzymatic and non-enzymatic mechanisms. The most important antioxidant enzymes are SOD (superoxide dismutase), CAT (catalase), GPx (glutathione peroxidase) and GST (glutathione S-transferase). Antioxidants protect the body against oxyradical-induced damage such as breaks in the DNA chain, protein oxidation and LPX induction. An increase in the active form of molecular oxygen species due to overproduction and/or inability to destroy them can lead to damage of DNA structure and may therefore induce mutations, chromosomal aberrations and carcinogenesis. A change towards increased oxidant status or any imbalance between

ROS production and degradation in animal tissues may induce LPX, plasma membrane alterations, or enzyme deactivation.

Previous studies in our laboratory (May, 2007) have shown that contaminants in water and sediments of MR induced oxidative stress in liver and gills of *Cyprinus carpio* in biomarkers as LPX and activity of antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx (Galar-Martínez et al., 2010). Six years later (February, 2013) another study was conducted in order to determine MR deterioration with respect to time. In this study was observed oxidative stress in gill, blood and muscle of *Cyprinus carpio* in biomarkers as LPX, hydroperoxides content (HPC) and protein carbonyl content (PCC) as well as in the activity of antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx by acute exposure (96 h) to pollutants in different sampling sites of MR (González-González et al., 2014 *In Press*).

Several studies report that oxidative changes during processing of meat products or by previous exposure to environmental pollutants induce reducing their quality. The observed changes include discoloration, loss of taste, forms toxic compounds, decreased nutritional content and reduced consumer acceptability (Kanner, 1994; Estevez, 2011). Therefore, we may assume that the change in the structure of myofibrillar proteins induced by ROS alters the function of these, because the protein structures is strongly linked to their functionality (Li et al., 2013).

The present study aimed to evaluate whether chronic exposure to pollutants present in MR induce modification on oxidative stress status and they alter the physicochemical and textural properties in muscle of *Cyprinus carpio*.

2. Material and methods

2.1 Study area

MR is located at 19° 31' 37"N and 99° 15' 33"W on the Río Tlalnepantla, its dam being downstream from the town of Madín, in the municipalities of Naucalpan de Juárez, Atizapán de Zaragoza and Tlalnepantla de Baz (State of Mexico) (Fig. 1). It has a full capacity of 25 million m³, but normally stores no more than 13 million m³ as a precaution against larger flows.

2.2. Collection of water in Madín Reservoir

Water samples were collected during the cold dry season (December 2013) using the procedure stipulated in the Mexican Norm for wastewater sampling (NMX-AA-003-1980). Sampling was done at surface level at discharge from the town of Viejo Madín (Fig. 1). Plastic bottles were used to collect water. Water samples were placed in plastic flasks previously rinsed with 10% nitric acid and transported to the laboratory.

In previous studies in the laboratory (Galar-Martinez et al., 2010; González-González et al., 2014 *In press.*), five sampling stations were selected corresponding to: 1 = discharge from the town of Nuevo Madín, 2 = entry point of Río Tlalnepantla tributary, 3 = lateral branch, 4 = dam, and 5 = discharge from the town of Viejo Madín. However, in this study we selected only the sampling site 5 (discharge from the town of Viejo Madín). This was because in previous studies, the sampling site 5 was the most impacted, which had

higher load of pollutants and which had a higher induction of oxidative stress in common carp.

2.3 Physicochemical characterization

After sampling, the physicochemical characterization of water at discharge from the town of Viejo Madín was realized. Physicochemical characteristics (temperature, dissolved oxygen, conductivity, pH, chlorides, fluorides and hardness) were measured as stipulated in the official Mexican norm (NOM-002-SEMARNAT-1996) and APHA, AWWA, WPCF, 1995. This official norm establishes the maximum permissible limits of pollutants in wastewater discharges to sewer systems or municipal urban. The APHA establish the standard methods for the examination of water and wastewater

2.4. Metal quantification in water

Metals (Fe, Hg and Al) were quantified as method proposed by Eaton et al. (1995). Concentrated nitric acid (2 ml) was added to 0.5 ml of sample (water). After digestion for 1 h in an autoclave at 120 °C and 15-lb pressure, samples were filtered and diluted with deionized water, then read on a Varian AA1475 atomic absorption spectrophotometer (Melbourne, Australia) and results were interpolated on a Fe, Hg or Al type curve, a Fe, Hg or Al atomic absorption standard solution (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) were used for each one (1 mg/ml). The percentage of recovery for all metals ranged between 97% and 100% (100% for Fe, 97% for Hg and 97% for Al). The absorption wavelength, detection

limit (DL) and quantification limit (QL) were 248.3 nm, 0.0019 ± 0.0003 mg/l and 0.007 ± 0.001 mg/l for Fe; 254.7 nm, 0.0025 ± 0.0004 and 0.008 ± 0.001 mg/l for Hg; 309.3 nm, 0.0016 ± 0.0008 and 0.005 ± 0.003 mg/l for Al. Metals were quantified in their total forms. Results were expressed as mg/l.

Calibration curves of each of the metals were performed using standard solutions at concentrations containing 1, 2, 5, 10 and 25 mg/ml for Fe; 1, 2, 5, 10 and 50 mg/ml for Al; 0.1, 0.5, 1, 2 and 5 mg/ml for Hg were prepared. Linear regression coefficients (R²) were > 0.99 for Fe, Al and Hg.

2.5. DCF, IBP and NPX quantification (LC-MS/MS) in water

Standard solutions were prepared in a 60:40 mix acetonitrile and ammonium formate at pH 6 (pH was regulated using 1M HCl). Standards of concentration of 10 µg/ml of DCF, IBP and NPX were prepared. All standards were stored in the dark at -18°C. Solution of 1000 µg/ml was used for MS tuning, a 200 µg/ml solution for recovery studies and solutions containing 1, 2, 10, 50 and 250 µg/ml of NSAIDs for calibrations.

The HPLC-MS/MS system consisted of an Agilent 1290 Infinity HPLC unit (Santa Clara CA). The RRHD Eclipse Plus C18 (2.1 x 50 mm, 1.8 µm) chromatography column was maintained at 40 °C. The mobile phase was a 60:40 v/v mixture of acetonitrile and ammonium formate (10 mM). Flow rate was 0.3 ml/min, run time 1.8 min, and injection volume 2 µl. DCF, IBP and NPX were identified and quantified by means of a mass spectrometer (Triple quadrupole 6430, Agilent, Santa Clara, CA. USA) fitted with electrospray ionization (ESI). The ESI positive mode was used throughout. Electrospray

voltage operated at 4000 V as the MS collected data in the negative ion mode. The retention time, base peak, m/z and fragmentor voltage were: 24.9, [M-Na]-1, 294 and 80 V for DCF; 25.6, [M-H]-1, 205 and 80 V for IBP; 20.1, [M-H]-1, 229 and 70 V for NPX.

Mass spectrometer optimization was conducted by direct infusion of a $\mu\text{g/ml}$ standard solution of DCF, IBP and NPX; thereafter the ionization mode and precursor ion mode were selected. These pharmaceuticals were selected since they are one of the most commonly used drugs in México (Gómez- Oliván et al., 2009).

The method detection limit (MDL) and method quantitation limit (MQL) were defined and determined as the minimum detectable amount of DCF, IBP and NPX with a signal to noise ratio of 3:1 and 10:1, respectively, discharge from the town of Viejo Madín waters spiked extract. These data (MDL and MQL) were 30 and 84 ng/l for DCF; 31 and 86 ng/l for IBP; 26 and 72 ng/l for NPX. Instrumental detection limits (IDL) were determined by direct injection of decreasing amounts of the standard mixture. The IDL were 27 pg/injected for DCF, 22 pg/injected for IBP and 26 pg/injected for NPX.

Calibration curves of each of the NSAIDs were performed using standard solutions at concentrations of 1, 3, 10, 50 and 250 $\mu\text{g/ml}$ prepared in 60:40 mix acetonitrile and ammonium formate at pH 6. Linear regression coefficients (R^2) were > 0.99 for DCF, IBP and NPX. The MS/MS detector was maintained according to manufacturer's specifications and cleaned regularly, but when changes in the slopes of the calibration curves were observed more than 50%, the detector received additional cleaning.

2.5.1 Water

Upon reception, samples were vacuum filtered through 1-0 μm glass microfibers filters (GF/C Whatman, UK), followed by 0.45 μm nylon membrane filters (Whatman, UK). Water samples (5 ml) were collected in glass vials and refrigerated at 4 °C for subsequent test concentration measurements. Results were expressed as time-weighted average concentrations of DCF, IBP and NPX. A liquid/liquid extraction with 5 ml (1+1) (v/v) hexane/ethyl acetate was conducted to extract DCF, IBP and NPX from 1-ml water samples. These samples were centrifuged at 1, 800 x g for 10 min, and then the upper organic layer was re-extracted. The extraction was repeated, and organic layers were combined and evaporated to dryness. The water samples of discharge from the town of Viejo Madín were extracted the same form

2.6. Specimen collection and maintenance

Adult common carp (*Cyprinus carpio*) one year old, 41 cm \pm 2.5 cm in length and weighing 2.64 \pm 0.3 kg were obtained from the aquaculture facility in Tiacaque, State of Mexico. Fish were safely transported to the laboratory in well-sealed polyethylene bags containing oxygenated water, then stocked in a large tank with dechlorinated tap water (previously reconstituted with salts) and acclimated to test conditions for 30 days prior to beginning of the experiment. During acclimation, carp were fed Pedregal Silver™ fish food, and three-fourths of the tank water was replaced every 24 h to maintain a healthy environment. The physicochemical characteristics of tap water reconstituted with salts were

maintained, i.e. temperature 20 ± 2 °C, oxygen concentration 80-90%, pH 7.5-8.0, total alkalinity 17.8 ± 7.3 mg/l, total hardness 18.7 ± 0.6 mg/l. A natural light/dark photoperiod (12:12) was maintained. These carps were used as controls test systems.

During aquaculture period the fish were not exposed to any metals and pharmaceuticals. Fe, Hg and Al concentrations were determined using atomic absorption spectrophotometry and DCF, IBP and NPX concentrations were determined by LC-MS/MS and in both pond water from the aquaculture facility in Tiacaque neither metals (Fe, Hg and Al) and pharmaceuticals (DCF, IBP and NPX) were not detected in water.

2.7 Specimen collection of the fish chronically exposed

Adult *C. carpio* were used (total length: 40 ± 1.5 cm, body weight: 2.4 ± 0.3 kg (means \pm SD, n = 12). Fish were captured of the discharge from the town of Viejo Madín (SS5) of MR, corresponding to sampling site most polluted of the reservoir.

The fish were assigned into two subgroups:

(a) Carps used immediately to determine biomarkers. These were placed in glass jars with ice-cold tap-water and transported on ice to the laboratory for processing within a period no longer than 2 h and,

(b) Carps placed in containers and frozen in a mixture of CO₂:acetone, for analyzing the physicochemical and textural properties.

2.8. Evaluation of oxidative stress

The fish (controls and obtained of the discharge from the town of Viejo Madín) were placed in a tank containing 50 mg/l of clove oil as an anaesthetic (Yamanaka et al., 2011). Anesthetized specimens were placed in a lateral position.

These fish were placed in an ice bath and sacrificed. One part of muscle was removed, placed in phosphate buffer [NaCl (Sigma-Aldrich, Toluca, MX) 0.138 M; KCl (Vetec, Sigma-Aldrich, Toluca, MX) 0.0027 M] solution pH 7.4 and homogenized. The supernatant was centrifuged at 12,500 x g and -4°C for 15 min. The muscle samples were stored at -70°C prior the analysis.

The following biomarkers were then evaluated: HPC, LPX, PCC and activity of the antioxidant enzymes SOD, CAT and GPx. All bioassays were performed on the supernatant.

2.8.1. Determination of HPC

HPC was determined by the Jiang et al. (1992) method (FOX—ferrous oxidation-xynlenol orange). To 100 μl of supernatant (previously deproteinized with 10% trichloroacetic acid) (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA) was added 900 μl of the reaction mixture [0.25 mM FeSO_4 (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA), 25 mM H_2SO_4 (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA), 0.1 mM xynlenol orange (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA) and 4 mM butyl hydroxytoluene (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA) in 90% (v/v) methanol (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri,

USA)]. The mixture was incubated for 60 min at room temperature and absorbance was read at 560 nm against a blank containing only reaction mixture. Results were interpolated on a type curve and expressed as nM CHP (cumene hydroperoxide) (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA)/mg protein.

2.8.2. Determination of LPX

LPX was determined by the Buege and Aust (1978) method (TBARS—thiobarbituric acid-reactive substances). To 100 μ l of supernatant was added Tris-HCl buffer solution pH 7.4 (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA) to attain a volume of 1 ml. Samples were incubated at 37 °C for 30 min; 2 ml TBA-TCA reagent [0.375% thiobarbituric acid (TBA, Fluka, Sigma-Aldrich, Toluca, MX) in 15% trichloroacetic acid (TCA, Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA)] was added and samples were shaken in a vortex. They were then heated to boiling for 45 min, allowed to cool, and the precipitate removed by centrifugation at 3,000 x g for 10 min. Absorbance was read at 535 nm against a reaction blank. Malondialdehyde (MDA) content was calculated using the molar extinction coefficient (MEC) of MDA (1.56×10^5 M/cm). Results were expressed as mM MDA/mg protein.

2.8.3. Determination of PCC

PCC was determined using the method of Levine et al. (1994) as modified by Parvez and Raisuddin (2005) and Burcham (2007). To 100 μ l of supernatant was added 150

μl of 10 mM DNPH (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA) in 2 M HCl (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA) and the resulting solution was incubated at room temperature for 1 h in the dark. Next, 500 μl of 20% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA) was added and the solution was allowed to rest for 15 min at 4 °C. The precipitate was centrifuged at 11,000 x g for 5 min. The bud was washed several times with 1:1 ethanol:ethyl acetate (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA), then dissolved in 1 ml of 6 M guanidine (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA) solution (pH 2.3) and incubated at 37 °C for 30 min. Absorbance was read at 366 nm. Results were expressed as nM reactive carbonyls formed (C=O)/mg protein, using the MEC of 21,000 M/cm.

2.8.4. Determination of SOD activity

SOD activity was determined by the Misra and Fridovich (1972) method. To 40 μl of supernatant in a 1-cm cuvette was added 260 μl carbonate buffer solution [50 mM sodium carbonate (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA) and 0.1 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA)] pH 10.2, plus 200 μl adrenaline (30 mM, Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA). Absorbance was read at 480 nm after 30 s and 5 min. Enzyme activity was determined using the MEC of SOD (21 M/cm). Results were expressed as IU/mg protein.

2.8.5. Determination of CAT activity

CAT activity was determined by the Radi et al. (1991) method. To 20 μl of supernatant was added 1 ml isolation buffer solution [0.3 M saccharose (Vetec, Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA), 1 mL EDTA (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA), 5 mM HEPES (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA) and 5 mM KH_2PO_4 (Vetec, Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA)], plus 0.2 ml of a hydrogen peroxide solution (20 mM, Vetec, Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA). Absorbance was read at 240 nm after 0 and 60 s. Results were derived by substituting the absorbance value obtained for each of these times in the formula: $\text{CAT concentration} = (A_0 - A_{60})/\text{MEC}$, where the MEC of H_2O_2 is 0.043 mM/cm, and were expressed as $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}$.

2.8.6 Determination of GPx activity

GPx activity was determined by the Gunzler and Flohe-Clairborne (1985) method as modified by Stephensen et al. (2000). To 100 μl of supernatant was added 10 μl glutathione reductase (2 U glutathione reductase, Sigma-Aldrich) plus 290 μl reaction buffer [50 mM K_2HPO_4 (Vetec), 50 mM KH_2PO_4 (Vetec) pH 7.0, 3.5 mM reduced glutathione (Sigma-Aldrich), 1 mM sodium azide (Sigma-Aldrich), 0.12 mM NADPH (Sigma-Aldrich)] and 100 μl H_2O_2 (0.8 mM, Vetec). Absorbance was read at 340 nm at 0 and 60 s. Enzyme activity was estimated using the equation: $\text{GPx concentration} = (A_0 - A_{60})/\text{MEC}$, where the MEC of NADPH = 6.2 mM/cm. Results were expressed as mM NADPH/mg protein.

2.9 Physicochemical and textural evaluation of common carp muscle

The other part of the common carp muscle was cut into cubes of about a centimeter, frozen and stored at -70°C and then proceeded to its physicochemical and textural evaluation.

2.9.1. pH

Ten grams of muscle was 1 min blended with 90 ml of distilled H_2O ; connective tissue was removed with a cheese-cloth as described by Owen et al. (1982). The pH was measured on a digital pH meter (Conductronic pH 120). All determinations were carried out in triplicate.

2.9.2 Water holding capacity (WHC)

Described by Hamm (1975). Five grams of finely ground sample were homogenized with 8-ml 0.6 M NaCl. The homogenate was placed in ice bath and stirred with glass rod for 1 min. Tubes were left on ice for 30 min, stirred again for 1 min and centrifuged at $8000 \times g$ for 15 min. Supernatant volume was measured. WHC was reported by difference as milliliters of 0.6 M NaCl held/100 g of muscle. All determinations were carried out in triplicate.

2.9.3. *Myofibrillar protein extraction*

Myofibrillar protein (MP) was prepared from common carp muscle according to the methodology described by Ngapo y col. (1992), with slight modifications. 100 g common carp muscle was homogenized by blending for 10 min with ice-cold water 1:1:1 (w/w/v) and then 10 min magnetic stirred in iced bath. The myofibril suspension was filtered through two layers of cheese-cloth to remove connective tissues, stirred and filtered was carried out twice. The muscle homogenate was centrifuged at $3000 \times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 25 min, and supernatant was discarded. Part of the myofibril pellet was capped glass stored to immediately gel forming. The protein concentration content of the myofibril pellet was determined using biuret method.

2.9.4. *Solubility*

According to Pilosof (2000), 2 g MP was centrifuged at $2500 \times g$ at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min. Protein contents in the supernatant were determined using biuret method. Total protein content in the MP sample was determined before centrifugation.

$$\text{Solubility} = \text{protein content in supernatant} / \text{total protein content in sample} \times 100$$

2.9.5. *Total sulfhydryl content*

Total sulfhydryl (SH) content was measured according to the procedure described by Ellman (1959). One-millilitre aliquots of MP solution (5 mg/ml) were reacted with 9 ml

Tris–glycine buffer (10.4 g Tris–HCl, 6.9 g glycine, 480 g urea and 1.2 g EDTA/l at pH 8.0) at room temperature for 30 min. 0.05 ml of Ellman’s reagent (containing 4 mg DTNB/ml) were added to 3 ml aliquots and reacted in the dark for 30 min. The reaction mixture was assayed at 412 nm using a TU-1800 spectrophotometer (Beijing Purkinje General Instrument Co. Ltd., Beijing, China). The SH concentration was expressed as μM total SH/mg of protein.

2.9.6. Texture profile analysis (TPA)

MP samples were transferred into 30 mm \times 35 mm (diameter \times height) glass vials. The gels were formed by heating at 70 °C for 30 min in a water bath. After heating, the gels were cooled in ice water for 10 min and stored overnight at 4 °C prior to TPA and color analysis.

Texture analysis of the gels was performed using a TA-XT2, v2.63, texture analyser (Texture Technologie Corporation, Scarsdale, Nueva York, USA) fitted with a 25-N load cell. Gels were equilibrated and evaluated at room temperature (20-25 °C). At least three cylinder-shaped samples with a length of 2.5 cm were prepared and subjected to determination. Samples were compressed twice to 80% of their original height. TPA was measured using the texture analyser equipped with a spherical plunger (diameter 1.25 cm, depression speed of 1 mm/s, 5s rest between first and second compression). Data were analyzed using the Texture Expert version 1.20 software (Stable Micro Systems, Surrey, U.K.) and hardness, cohesiveness, springiness, fibrousness, resilience, gumminess and chewiness were calculated.

2.9.8. Color

Color of gels was measured by colorimeter (CROMA METER CR-400, D25-PC2, Tokio, Japan). L*, a* and b* parameters indicate lightness, redness and yellowness, respectively.

2.10. Statistical analysis

The results are presented as the means (\pm SEM). After replication of normality test, data differences were determined by one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test with a 95% confidence limit whenever the data difference was significant. Pearson's correlation analysis was used to examine possible associations between pollutants concentration, oxidative stress biomarkers, physicochemical and texture characteristics in *Cyprinus carpio* muscle. Statistical determinations were performed with SPSS v10 software (SPSS, Chicago IL, USA).

3.0 Results

3.1. Madín Water Physicochemical characterization

The results regarding the physicochemical characterization are shown in table 1. The physicochemical characteristics at the discharge from the town of Viejo Madín did not

exceed the limits established in the official Mexican norm (NOM-002-SEMARNAT-1996) for the maximum permissible limits of pollutants in wastewater discharges to sewer systems or municipal urban. The dissolved oxygen concentration and conductivity were 5.3 mg/l and 111.6 $\mu\text{s}/\text{cm}$, respectively. pH was below the Mexican norm.

3.2. *Quantification of metals*

In regards to the chemical characterization of metals, Fe and Al concentrations (Table 2) exceed the limits established in the Official Mexican Norms on the permissible limits of pollutants in wastewater discharges and domestic goods and the permissible levels of heavy metals for aquatic life protection and human consumption (NOM-001-ECOL-1996 and NOM-127-SSA1-1994, respectively).

3.3. *DCF, IBP and NPX quantification in water*

As regards the chemical characterization of NSAIDs, DCF, IBP and NPX concentrations range from 0.18 to 3.73 $\mu\text{g}/\text{l}$.

3.4. *Evaluation of oxidative stress*

Fig. 2 shows oxidation products results, as can be observed common carp exposed to the discharge from the town of Viejo Madín show a significant increase of 9.77%, 69.33% and 220% with respect to controls ($p < 0.05$) in HPC, LPX and PCC biomarkers,

respectively. Fig 3 shows a significant increase ($p < 0.05$) with respect to controls of 80.82% in SOD activity, 98.03% in CAT activity and 49.76% in GPx activity.

3.5. Physicochemical and textural evaluation of muscle of common carp

In reference to physicochemical analysis, results are shown in Fig. 4A, as can be observed a significant decrease with respect to controls of 5.4%, 14.9% and 54.9% in pH, WCH and total sulfhydryl respectively. While the solubility increased significantly by 59% compared to control.

TPA analysis (Fig 4B) shows a significant increase ($p < 0.05$) with respect to controls of 112, 40.38, 74.90, 111.43 and 76.78% in hardness, fibrousness, resilience, gumminess and chewiness respectively. The color showed an increase in a^* of 115% giving a reddish color, and b^* increased by 27%, giving a difference in the color yellow, being more intense for Madín samples.

In Table 3, it shows the results of the Pearson's correlation among pollutants concentration, oxidative stress biomarkers, physicochemical and texture characteristics in *Cyprinus carpio* muscle. As shown, there are very close correlations between pollutants in MR and oxidative stress biomarkers, physicochemical and texture characteristic.

4. Discussion

4.1 Physicochemical characterization

Most of the water quality conditions measured in this study (Table 1) appeared to be adequate for supporting common carp culture. Distribution and transport of metals in water depends on the species of these metals that are present in the water column as well as on environmental characteristics. The metals are most soluble to pH below 6.5 (Coz et al. 2004). The pH of to the discharge from the town of Viejo Madín was below 6.5, so that the Al and Fe were in their soluble forms being available for uptake by *C. carpio*.

4.2 Evaluation of oxidative stress

The increases in LPX and HPC observed in Fig. 2 may be due to the fact that metal concentrations (Al and Fe) exceed those established by official Mexican norms on permissible levels of heavy metals for aquatic life protection and human consumption (NOM-001-ECOL-1996 and NOM-127-SSA1-1994 respectively).

Iron catalyzes the reaction of the superoxide anion with hydrogen peroxide to produce hydroxyl radicals via the Fenton reaction (Winston and Di Giulio, 1991).

Different mechanisms have been proposed as the means through which Al induces ROS formation, for example, that Al displaces the iron present in various biomolecules, thereby increasing intracellular iron content and promoting the Fenton reaction (Amador et al., 2001; Dua and Gill, 2001; Yousef, 2004). This metal is also able to damage the mitochondrion directly and affect electron transport in the respiratory chain (García-Medina et al., 2010). In both cases ROS production is increased, which explains the increases in LPX and HPC in our study.

NSAIDs toxicity is mediated by ROS formation as a result of biotransformation of these compounds through redox cycling (Ahmad et al., 2000; Abdollahi et al., 2004). CYP is known to produce an oxygenated intermediate — the oxy-cytochrome P450 complex [P450 (Fe³⁺) O₂⁻] — during the biotransformation of NSAIDs such as DCF, IBP and NPX, with subsequent release of the superoxide anion by reaction decoupling (Doi et al., 2002). In the present study, increased production of the superoxide anion radical is likely responsible for increases in LPX and HPC in carp exposed to water from discharge from the town of Viejo Madín.

Formation of carbonyl groups results from the direct oxidation of amino acid side chains by metals or ROS as well as from protein modification by oxidation-derived secondary products such as LPX products (Pantke et al., 1999; Requena et al., 2003; Estevez, 2011). As can be seen in Figure 2, PCC increased in muscle of common carp.

Asensio et al. (2007) reported NSAIDs-induced inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase elicits damage through oxidation of protein thiols. This may not be the only process of protein carbonyl production: formation of free radicals during the biotransformation of these pharmaceuticals may be one of the sources of oxidation of this biomolecule.

NSAIDs (DCF, IBP and NPX) are known to enter in contact with the vasculature, where they acetylate the enzyme COX-2 present in endothelium or circulating leukocytes, to produce 15-epi-lipoxin A4 which promotes NO synthesis mediated by endothelial (eNOS) and inducible (iNOS) nitric oxide synthase (Paul-Clark et al., 2004). When the superoxide anion and NO bind they may form a RNS (peroxynitrite) through a diffusion-limited reaction (Huie and Padmaja, 1993). The oxidant peroxynitrite is known to induce

protein oxidation and nitration in the absence of GSH, eliciting mitochondrial dysfunction and eventually leading to irreversible damage and severe loss of cellular ATP (Jaeschke et al., 2003).

Levels of protein carbonylation were significantly higher in our study (220% with respect to control), indicating that fish sustained oxidative stress as a result of exposure to metals. Metals are known to directly induce the formation of protein carbonyls via metal-catalyzed oxidation reactions (Stadtman and Oliver, 1991).

ROS and RNS can remove protons from methylene groups in amino acids, leading to the formation of carbonyls that tend to ligate protein amines and also induce damage to nucleophilic centers, sulfhydryl group oxidation, disulfide reduction, peptide fragmentation, modification of prosthetic groups, and protein nitration. These modifications lead to loss of protein function (Cabisco et al., 2000; van der Oost et al., 2003; Gluszcak et al., 2007) and therefore also of body integrity (Parvez and Raisuddin, 2005).

Diverse environmental contaminants can induce antioxidant defenses (Vlahogianni et al., 2007). SOD is the first mechanism of antioxidant defense and the main enzyme responsible for offsetting the effects of ROS, particularly the superoxide ion (van der Oost et al., 2003) which is converted to hydrogen peroxide by SOD, H_2O_2 being subsequently sequestered and degraded to H_2O by CAT and GPx.

As stated above, SOD activity increased in the present study in *C. carpio* exposed to metals and NSAIDs, the main contaminants in Madín Reservoir, leading to increased hydrogen peroxide formation that may act as a signal for CAT bioactivation in order to convert this highly toxic free radical to less toxic compounds. Similar responses have been

found in different aquatic organisms exposed to other NSAIDs (Oviedo-Gómez et al., 2010, Gómez-Oliván et al., 2012, Islas-Flores et al., 2013, Islas-Flores et al., 2014).

Valko et al. (2005) mention that increased SOD activity may be a means to compensate the effect of some xenobiotics such as heavy metals, i.e. an adaptive response of the organism to induced stress.

SOD increase may be due to the fact that during the CYP-mediated biotransformation of NSAID in carp, the superoxide anion radical $O_2^{\cdot-}$, responsible for increased SOD activity, is released (Doi et al., 2002).

Significant increases with respect to the control group ($p < 0.05$) also occurred in both CAT and GPx activity (Fig. 3). Bagnyukova et al. (2006) stated that LPX products appear to be involved in the up regulation of several antioxidant enzymes such as SOD, CAT and GPx. Thus, LPX increases in the present study may also be explain by the observed increased activity of antioxidant enzymes. CAT and GPx activities increased in muscle. These increases can be attributed to the antioxidant capacity of organisms to offset H_2O_2 -induced oxidative damage. Present results are consistent with those obtained by Oviedo-Gómez et al. (2010), who reported increases in the activity of CAT and GPx in *H. azteca* exposed to DCF drug.

4.3 Physicochemical evaluation of common carp muscle

Figure 4 shows a significant decrease of pH (5.4%). This decrement is due to *post mortem* glycolysis results in the accumulation of lactic acid which in turn lowers the pH of the muscle. The amount of lactic acid produced is related to the amount of stored carbohydrate

(glycogen) in the living tissue (Huss, 1995). Glycogen is the main reserve source of energy for animals during normal metabolism and their content in liver and muscle may indicate the health condition of the fish. Glycogen depletion is a stress-induced response by exposure to wastewater effluent, metals, pesticides, provoked a reduction in liver and muscle glycogen content, decrease was greater in liver than in muscle, as liver is the principal site of glycogen synthesis and storage (Rao, 2006; Lefevre et al., 2008; De Boeck, 2010; Cazenave et al., 2014; Pretto, 2014).

A significant decrease was observed in WHC (14.9%). The reduction in the pH of fish muscle has an effect on the physical properties of the muscle. As the pH drops, the net surface charge on the muscle proteins is reduced, causing them to partially denature and lose some of their water-holding capacity. Muscle tissue in the state of rigor mortis loses its moisture when cooked and is particularly unsuitable for further processing which involves heating, since heat denaturation enhances the water loss. Loss of water has a detrimental effect on the texture of fish muscle and it has been shown that there is an inverse relationship between muscle toughness and pH, unacceptable levels of toughness (and water-loss on cooking) occurring at lower pH levels (Huss, 1995; Dublán et al., 2006; Wang et al., 2011). These findings are consistent with our results (Fig. 4A).

The significant increase of PCC in this study (Fig. 3) may be associated to solubility increment. The protein stability can be modified because of their oxidation, affecting van der Waals forces, hydrogen bonding and electrostatic and hydrophobic interactions, thereby minimizing the free energy of stabilization, orienting the hydrophilic amino acids to the molecular surface and exposing the most of the hydrophobic amino acids into the molecule

(Vojdani, 1996; Lund et al., 2011; Li et al., 2013), resulting in a decrease in protein stability and thus the loss of the solubility.

The conversion of sulfhydryl groups into disulfides is one of the earliest observable events during the radical-mediated oxidation of proteins. In this study a significant decrease of total sulfhydryl (54.9%) was observed. The cysteine located at the catalytic centre of the myosin head is perhaps the most susceptible residue to oxygen radical and is usually one of the first to be oxidized. The loss of sulfhydryl groups may be due to the formation of disulfide bonds either within or between polypeptides

Ocaño-Higuera et al. (2011) reported that color is one of the most important parameters used to evaluate the quality of fishing products. The initial color of fishing products changed during storage in ice, affecting the quality. With respect to storage time, for “a” and “b” a significant change was detected indicating that the fillet acquired a more yellowish hue at the end of storage. These findings are similar to Madín fresh samples.

4.4 Textural evaluation of common carp muscle

The textural characteristics of muscle foods include hardness, fracturability, springiness, cohesiveness, chewiness and resilience of which hardness is the most important feature in fish (Wan-Ling et al., 2012).

Textural characteristics, hardness in particular, are associated with the intrinsic structure and properties of components of the flesh. Fish muscle is rapidly degraded during post-mortem storage, due to proteolytic enzymes acting probably both on muscle cells and connective tissue. There are several proteolytic systems present in fish muscle tissue, which

may be involved in post-mortem muscle degradation. These include the proteasome, a heat-stable alkaline proteinase, matrix metalloproteinases (MMPs), the calpains and the lysosomal cathepsins.. It has been suggested that cathepsins B, L and/or D could have major roles in degradations of proteins in post-mortem fish muscle (Delbarre-Ladrat et al., 2004; Dublán et al., 2006; Wang et al., 2011)

Bondareva et al. (2007) mention that calpain activity in fish from Hg²⁺ contaminated lakes are substantially lower than in control, and autolytic activity were suppressed as well. Primary Hg²⁺ effect is caused by its affinity to SH-groups in calpain active site. Therefore, the pollutants present in Madín reservoir may contribute to enzyme modification restricting tenderness.

5. Conclusions

The pollutants (metals and nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals) present in water of MR induce oxidative stress and alter the physicochemical and textural properties in muscle of *C. carpio*. Thus, water in this reservoir is contaminated with xenobiotics that are hazardous to *C. carpio*, a species consumed by the local human population.

Acknowledgments

This study was made possible through support from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-Mexico, project 151665).

6. References

Abdollahi, M., Mostafalou, S., Pournourmohammadi, S., Shadnia, S., 2004. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 137, 29-34.

Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M., Chand, H.S., Jain, S.K., Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus Bloch*) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochem. Biophys. Acta.* 1523, 37-48.

Amador, F.C., Santos, M.S., Oliveira, C.R., 2001. Lipid peroxidation and aluminium effects on the cholinergic system in nerve terminals. *Neurotox. Res.* 3, 223-233.

APHA, AWWA, WPCF, 1995. *Standard Methods. Examination of Water and Wastewater.* 19 th. Edition. Washington D.C. 2005. U.S.A

Arabi, M., 2004. Analyses of Impact of Metal Ion Contamination on Carp (*Cyprinus carpio* L.) Gill Cell Suspensions. *Biol. Trace Elem. Res.* 100, 229-245.

Asensio, C., Levoine, N., Guillaume, C., Guerquin, M.J., Rouguie, K., Chrétien, F., Chapleur, Y., Netter, P., Minn, A., Lapique, F., 2007. Irreversible inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by the coenzyme A conjugate of ketoprofen: a key to oxidative stress induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem. Pharmacol.* 73, 405-416.

Bagnyukova, T.V., Chahrak, O.I., Lushchak, V.I. 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquat. Toxicol.* 78, 325-331.

Bondareva, L., Nemova, N., Kaivarainen, H. 2007. Effect of heavy metals on calcium-dependent proteases in fish. In *Abstr. Toxicol Letts 172S*: S1–S240.

Büege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302-310.

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. Met.* 56, 18–22.

Cabisco, E., Tamarit, J., Ros, J., 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int. Microbiol.* 3, 3-8.

Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossia, A., Aleb, A., Campanaa, M., Parmaa, M.J., 2014. Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: A field caging study. *Ecol. Indicators.* 38, 104-112.

Coz, A., Andres, A., Irabien, A., 2004. Ecotoxicity assessment of stabilized/solidified foundry sludge. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1897-1900.

De Boeck, G., Smolders, R., Blust, R., 2010. Copper toxicity in gibel carp *Carassius auratus gibelio*: Importance of sodium and glycogen. *Comparative Biochem. and Phys.* 152, 332–337.

Delbarre-Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noel, J., Fleurence, J., 2004. Proteolytic potential in white muscle of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) during postmortem storage on ice. time-dependent changes in the activity of the components of the calpain system. *Food Chem.* 84(3), 441–446.

Doi, H., Iwasaki, H., Masubuchi, Y., Nishigaki, R., Horie, T., 2002. Chemiluminescence associated with the oxidative metabolism of salicylic acid in rat liver microsomes. *Chem Biol. Interact.* 140, 109-119.

Dua, R., Gill, K.D., 2001. Aluminum phosphide exposure: implications on rat brain lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Pharmacol. Toxicol.* 89, 315-319.

Dublán-García, O, Cruz-Camarillo, R., Guerrero-Legarreta, I., Ponce-Alquicira, E., 2006. Effect of refrigerated storage on proteolytic activity, physicochemical and microstructural properties of giant squid (*Dosidicus Gigas*) mantle muscle. *J. Muscle Foods.* 17, 142-159.

Eaton, D.A., Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, nineteenth ed., Washington, DC.

Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77.

Estevez, M., 2011. Protein carbonyls in meat systems: A review. Meat Sci. 89, 259–279.

Galar-Martínez, M., Gómez-Oliván, L.M., Amaya Chávez, A., Razo-Estrada, C., García-Medina, S., 2010. Oxidative stress induced on *Cyprinus carpio* by contaminants present in the water and sediment of madín reservoir. J Environ. Sci. Health. A. 45(2), 155-160.

García-Medina, S., Razo-Estrada, A.C., Gómez-Oliván, L.M., Amaya-Chávez, A., Madrigal-Bujaidar, E., Galar-Martínez, M., 2010. Aluminum-induced oxidative stress in lymphocytes of common carp (*Cyprinus carpio*). Fish Physiol. Biochem. 36, 875-882.

Gluszczak, L., Miron, D.S., Morales, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 146, 519-524.

Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., Téllez, L.A., Carmona-Zepeda, F., Amaya-Chávez, A., 2009. Estudio de automedicación en una farmacia comunitaria de la ciudad de Toluca. Rev. Mex. Cienc. Farm. 40(1), 5-11.

Gómez-Oliván, L.M., Neri-Cruz, N., Galar-Martínez, M., Vieyra-Reyes, P., García-Medina, S., Razo-Estrada, C., Dublán-García, O., Corral-Avitia, A.Y., 2012. Assessing the oxidative stress induced by paracetamol spiked in artificial sediment on *Hyaella azteca*. *Water Air Soil Pollut.* 223, 5097-5104.

González-González, E.D., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez M, Vieyra-Reyes, P., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Jiménez-Vargas, J.M., Razo-Estrada, A.C., Pérez-Pasten, B.R., 2014. Metals and nonsteroidal anti-inflammatory pharmaceuticals drugs present in wáter from Madín Reservoir (Mexico) induce oxidative stress in gill, blood an muscle of common carp (*Cyprinus carpio*). *Archives of Environ. Contam. and Toxicol.*

Gunzler, W., Flohe-Clairborne, A., 1985. Glutathione peroxidase, in: Green-Wald RA (Ed), *Handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, Boca Raton, pp 285–290.

Hamm, R., 1975. Water holding capacity of meat, in: *Meat*. D.J.A. (Eds), Cole, R.A. Lawrie. Butterworths. London, United Kingdom, pp. 321-337.

Huie, R.E., Padmaja, S., 1993. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* 18, 195-199.

Huss, H., 1995. Quality and quality changes in fresh fish. *FAO Fisheries technical paper No. 348*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, pp. 202.

Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., Colín-Cruz, A., Neri-Cruz, N., García-Medina, S., 2013. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotox. Environ. Saf.* 9, 32-38.

Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Neri-Cruz, N., Dublán-García, O., 2014. Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21(7), 5157-5166.

Jaeschke, H., Knight, T.R., Bajt, M.L., 2003. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* 144, 279-288.

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, 384-389.

Kanner, J., 1994. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Sci.* 36, 169–89.

Lefevre, F., Bugeon, J., Aupérin, B., Aubin, J., 2008. Rearing oxygen level and slaughter stress effects on rainbow trout flesh quality. *Aquacult.* 284, 81–89.

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

Li, Y., Konga, B., Xiaa, X., Liua, Q., Diaoc, X., 2013. Structural changes of the myofibrillar proteins in common carp (*Cyprinus carpio*) muscle exposed to a hydroxyl radical-generating system. *Process Biochem.* 48, 863–870.

Lund, M., Heinonen, M., Baron, C., Estévez, M., 2011. Protein oxidation in muscle foods: A review. *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 83–95

Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aq. Toxicol.* 101, 13-30.

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

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

Norma Mexicana (NMX-AA-003-1980). Aguas residuales, muestreo. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. Diario Oficial de la Federación 25-03-1980. México.

Norma Oficial Mexicana (NOM-127-SSA1-1994). Agua para uso y consumo humano límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. Diario Oficial de la Federación 16-11-1999. Mexico.

Norma Oficial Mexicana (NOM-001-ECOL-1996). Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. Diario Oficial de la Federación 06-01-1997. Mexico.

Norma Oficial Mexicana (NOM-002-ECOL-1996). Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. Diario Oficial de la Federación 03-06-1998. Mexico.

Ocaño-Higuera, V.M., Maeda-Martínez, A.N., Marquez-Ríos, E., Canizales-Rodríguez, D.F., Castillo-Yáñez, F.J., Ruíz-Bustos, E., Graciano-Verdugo, A.Z., Plascencia-Jatomea, M., 2011. Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. *Food Chem.* 125, 49–54.

Oviedo-Gómez, D.G., 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, 39-43.

Owen, J.E., Nuñez, F.A., Arias, M.T., De Cano, Rios, O., 1982. Manual De Prácticas de Cursos de Tecnologías de la Carne. Facultad de Zootecnia, Universidad de Chihuahua, Chihuahua, Mexico.

Pantke, U., Volk, T., Schmutzler, M., Kox, W.J., Sitte, N., Grune, T., 1999. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 1080-1086.

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, 112-117.

Paul-Clark, M.J., Van Cao, T., Moradi-Bidhendi, N., Cooper, D., Gilroy, D.W., 2004. 15-epi-lipoxin A4-mediated induction of nitric oxide explains how aspirin inhibits acute inflammation. *J. Exp. Med.* 200, 69-78.

Pilosof, A.M., 2000. Solubilidad, in: A.M.R and Barholomai, G.B. (Edirs). Caracterización funcional y estructural de proteínas. Edit. Ceudeba CYTED (Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo). p.p. 60-75.

Pretto, A., Loro, V.A., Morsch, V.M., Moraes, B.S., Menezes, C., Santi, S., Toni, C., 2014. Alterations in carbohydrate and protein metabolism in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 100,188–192.

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, 22028-22034.

Rao, J.V., 2006. Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Pest. Biochem. and Physiol.* 86,78–84.

Requena, J.R., Levine, R.L., Stadtman, E.R., 2003. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino Acids.* 25, 221-226.

Rimblas, M.E., 2004. Los compuestos químicos en los alimentos, desde la perspectiva de la seguridad alimentaria. 1st ed. Imprenta Regional. España p.p. 74.

Sobrino-Figueroa, A.S., 2013. Evaluation of oxidative stress and genetic damage caused by detergents in the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae). *Comp. Biochem. Physiol.* [on line] available in: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.03.026> [April, 9, 2013].

Stadtman, E.R., Oliver, C.N., 1991. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* 266, 2005-2008.

Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Ena, M., Forlin, L., 2000. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus*

scorpius), caught in four harbours on the southwest of Iceland. *Aquat. Toxicol.* 48, 431–442.

Valko, M., Morris, H., Cronin, M.T., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161-1208.

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57-149.

Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M.J., Valavanidis, A., 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1361-1371.

Vojdani, F., 1996. Solubility, in: Hall, G.M. (Ed.). *Methods of testing protein functionality*, St Edmundsbury Press, Bury St. Edmunds, UK. pp. 11-60.

Wan-Ling, L., Qing-Xiao Z., Zhi-Wei, Z., Guo-Sheng, S., 2012. Relation between protein characteristics and TPA texture characteristics of crisp grass carp (*ctenopharyngodon idellus* c. et v) and grass carp (*ctenopharyngodon idellus*). *J. of Texture Studies.* 43, 1–11.

Wang, P., Vang, B., Pedersen, A., Martinez, I., Olsen, R., 2011. Post-mortem degradation of myosin heavy chain in intact fish muscle: Effects of pH and enzyme inhibitors. *Food Chem.* 124, 1090–1095.

Wang, R., Wang, W., 2012. Contrasting mercury accumulation patterns in tilapia (*Oreochromis niloticus*) and implications on somatic growth dilution. *Aquatic Toxicol.* 114–115, 23–30.

Ward, D.M., Nislow, K.H., Chen, C.Y., Folt, C.L., 2010. Rapid, Efficient Growth Reduces Mercury Concentration in Stream-Dwelling Atlantic Salmon. *Transactions of the American Fisheries Soc.* 139(1), 1-10.

Winston, G.W., Di Giulio, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquat. Toxicol.* 1, 137-161.

Yamanaka, H., Sogabe, A., Handoh, I.C., Kawabata, Z., 2011. The effectiveness of clove oil as an anaesthetic on adult common carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Anim. Vet. Adv.* 10, 210-213.

Yousef, M.I., 2004. Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: protective role of ascorbic acid. *Toxicol.* 199, 47-57.

Figure captions

Fig. 1. Madín Reservoir, sampling stations corresponding to: 1 = discharge from the town of Nuevo Madín, 2 = entry point of Río Tlalnepantla tributary, 3 = lateral branch, 4 = dam, and 5 = discharge from the town of Viejo Madín.

Fig. 2. Oxidation cellular biomarkers in *Cyprinus carpio* muscle obtained from Madín Reservoir. Values are the mean of three replicates \pm SE. *Significantly different from control values, ANOVA and Bonferroni's ($P<0.05$).

Fig. 3. Antioxidants activities in *Cyprinus carpio* muscle obtained from Madín Reservoir. Values are the mean of three replicates \pm SE. *Significantly different from control values, ANOVA and Bonferroni's ($P<0.05$).

Fig. 4. Physicochemical and textural analysis of *Cyprinus carpio* muscle. Values are the mean of three replicates \pm SE. *Significantly different from control values, ANOVA and Bonferroni's ($P<0.05$).

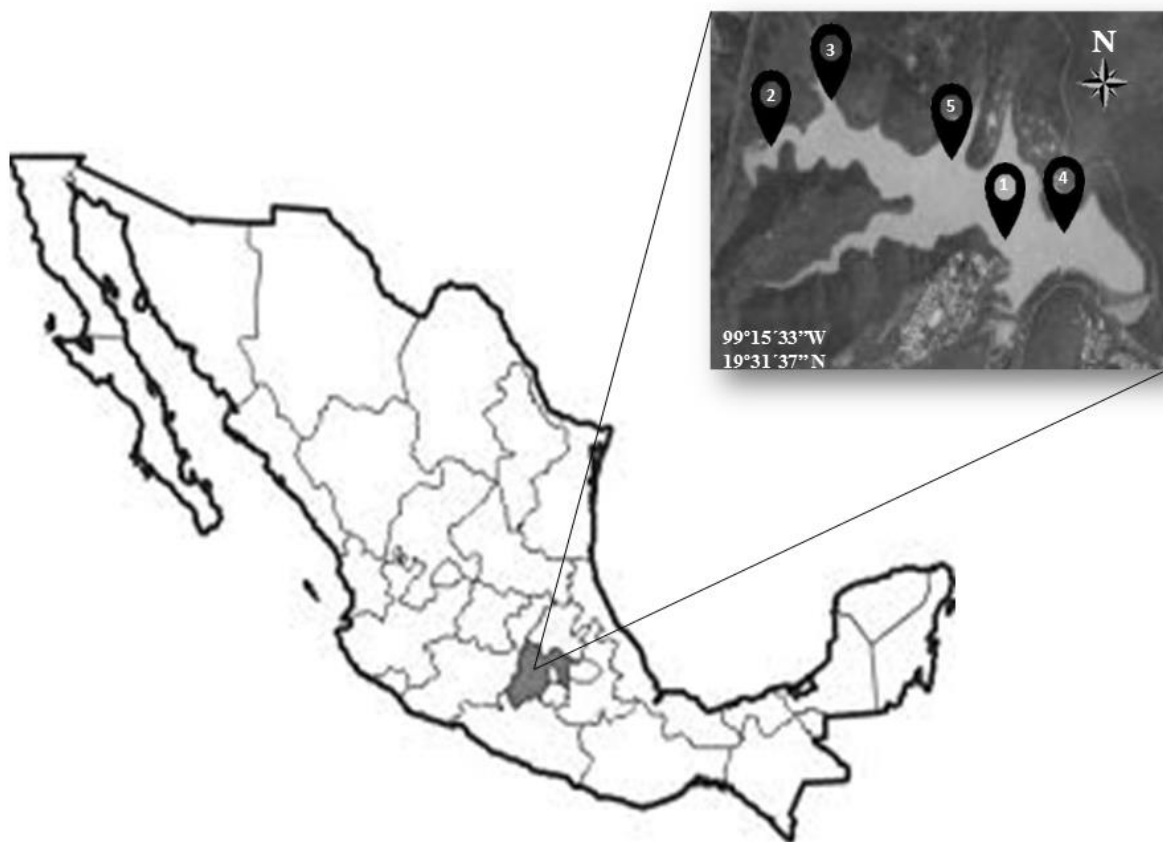


Fig. 1. Madín Reservoir, sampling stations corresponding to: 1 = discharge from the town of Nuevo Madín, 2 = entry point of Río Tlalnepantla tributary, 3 = lateral branch, 4 = dam, and 5 = discharge from the town of Viejo Madín.

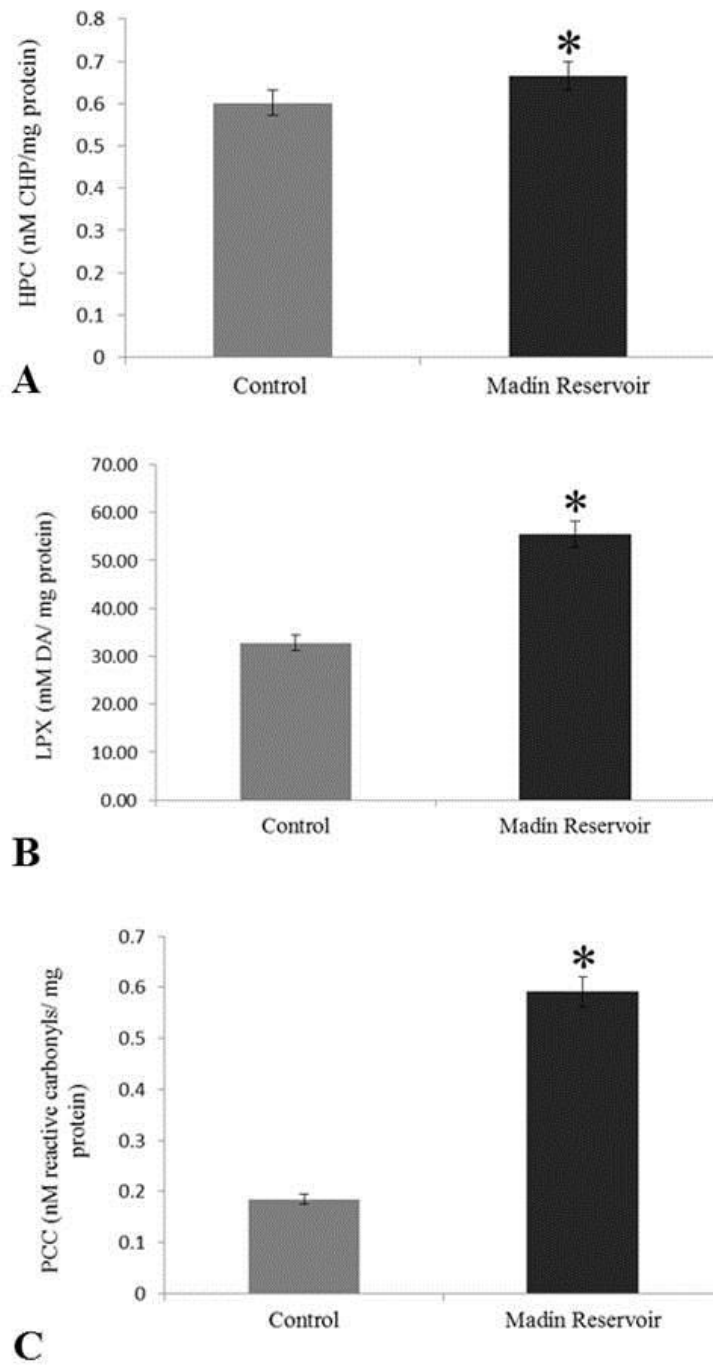


Fig. 2. Oxidation cellular biomarkers in *Cyprinus carpio* muscle obtained from Madín Reservoir. Values are the mean of three replicates \pm SE. *Significantly different from control values, ANOVA and Bonferroni's ($P < 0.05$).

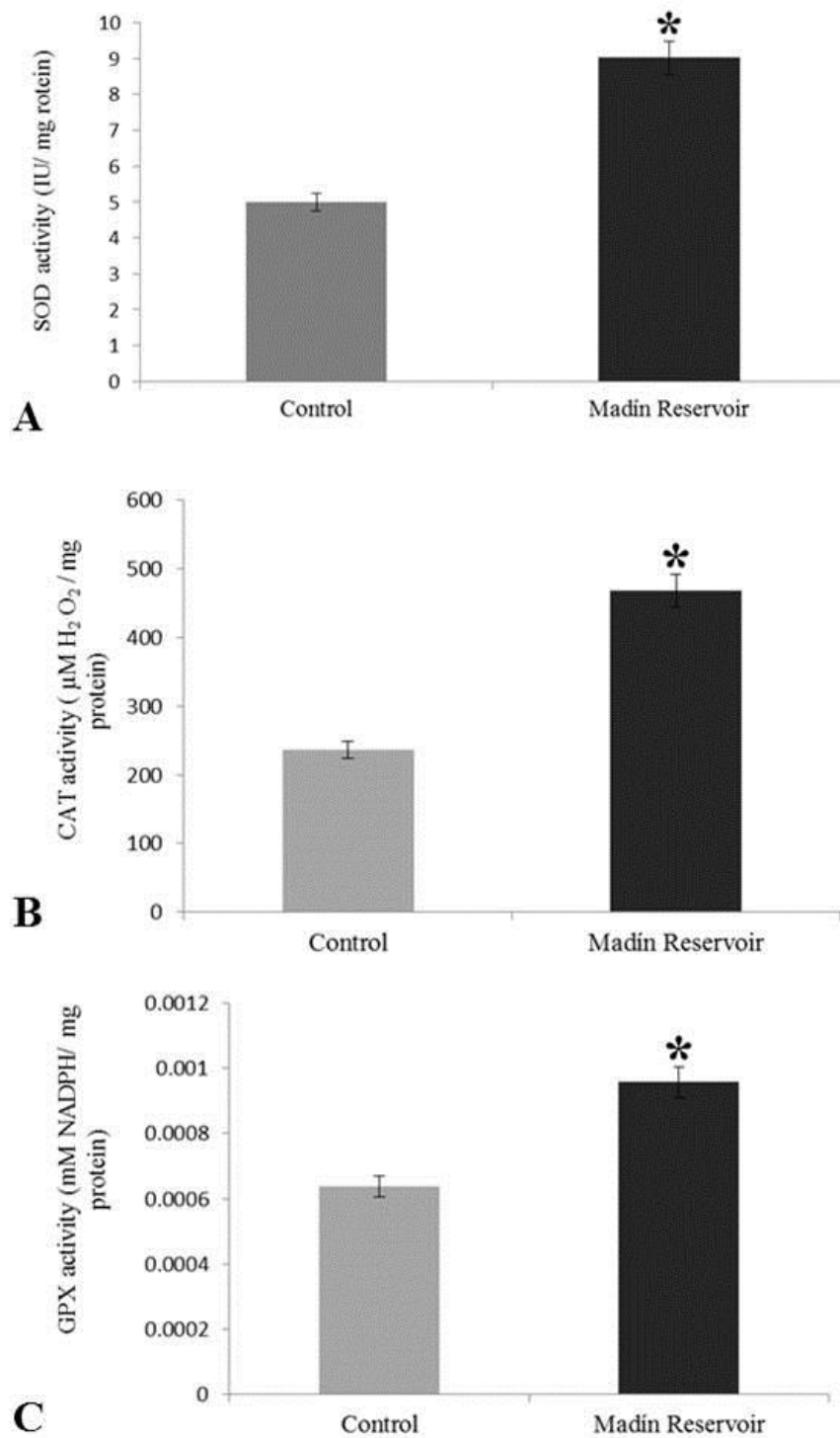


Fig. 3. Antioxidants activities in *Cyprinus carpio* muscle obtained from Madín Reservoir.

Values are the mean of three replicates \pm SE. *Significantly different from control values, ANOVA and Bonferroni's ($P < 0.05$).

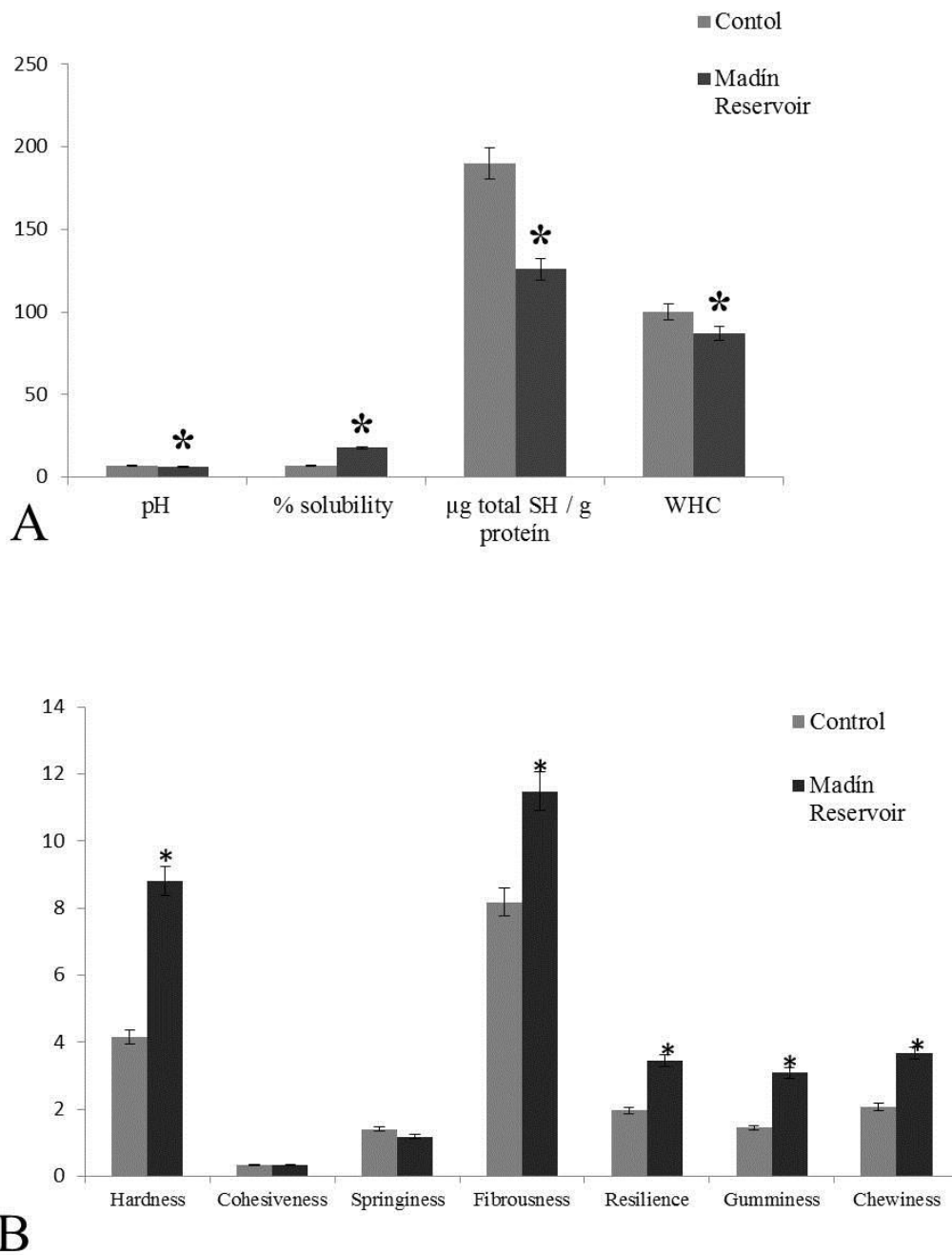


Fig. 4. Physicochemical and textural analysis of *Cyprinus carpio* muscle. Values are the mean of three replicates \pm SE. *Significantly different from control values, ANOVA and Bonferroni's ($P < 0.05$).

Table 1. Physicochemical characteristics of water from Madín Reservoir (State of Mexico), Mexico. * The official Mexican norm (NOM-002-SEMARNAT-1996) establishes the maximum permissible limits of pollutants in wastewater discharges to sewer systems or municipal urban. NI = Not included

Physicochemical characteristic	NOM-002-SEMARNAT-1996*	Discharge from the town of Viejo Madín
Temperature ($^{\circ}$ C)	Maximum 40	18.6
Dissolved oxygen (mg/L)	NI	5.3
Conductivity (μ s/cm)	NI	111.6
pH	6.5-8.5	6.3
Chlorides (mg/L)	Maximum 250	186
Fluorides (mg/L)	0-15	4.1
Hardness (mg/L)	Maximum 500	128.7

Table 2. Metal and NSAID concentrations in water from Madín Reservoir (State of Mexico), Mexico. Values are the mean of three replicates. * The Official Mexican Norms on the permissible limits of pollutants in waste water discharges and domestic goods and ** The Official Mexican Norms on the permissible levels of heavy metals for aquatic life protection and human consumption. NI= not included.

Pollutant	NOM-001- ECOL-1996*	NOM-127-SSA1- 1994**	Discharge from the town of Viejo Madín
Fe (mg/l)	0.3	0.3	5.10 ± 0.01
Hg (mg/l)	0.01	0.001	<0.001
Al (mg/l)	0.5	0.2	24.45 ± 0.04
DFC (µg/l)	NI	NI	0.31 ± 0.01
IBP (µg/l)	NI	NI	3.73 ± 0.04
NPX (µg/l)	NI	NI	0.18 ± 0.02

Table 3. Pearson's correlation among pollutant concentrations, oxidative stress biomarkers, Physicochemical and Texture characteristics in *Cyprinus carpio* muscle.

<i>Biomarker</i>	Pollutants					
	Fe	Al	DCF	IBP	NPX	
<i>Oxidative stress</i>	LPX	-0.891	0.891	0.891	0.891	0.891
	CPC	-0.062	0.062	0.062	0.062	0.062
	CHP	-0.444	0.444	0.444	0.444	0.444
	SOD	0.719	-0.719	-0.719	-0.719	-0.719
	CAT	-0.152	0.152	0.152	0.152	0.152
	GPX	0.936	-0.936	-0.936	-0.936	-0.936
<i>Physicochemical</i>	pH	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
	WHC	1.000	-1.000	-1.000	-1.000	-1.000
	% solubility	0.725	-0.725	-0.725	-0.725	-0.725
	total sulfhydryls	0.881	-0.881	-0.881	-0.881	-0.881
	color L*	0.124	-0.124	-0.124	-0.124	-0.124
	color a*	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
color b*	-0.105	0.105	0.105	0.105	0.105	
<i>Texture</i>	hardness	0.740	-0.740	-0.740	-0.740	-0.740
	Cohesiveness	0.321	-0.321	-0.321	-0.321	-0.321
	Springiness	-0.094	0.094	0.094	0.094	0.094
	Fibrousness	-0.245	0.245	0.245	0.245	0.245
	Resilience	0.988	-0.988	-0.988	-0.988	-0.988
	Gumminess	0.643	-0.643	-0.643	-0.643	-0.643
	Chewiness	0.576	-0.576	-0.576	-0.576	-0.576

ANEXO 1

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1. Microscopía óptica

Mediante el microscopio óptico Olympus BX41 TF, se observaron diferencias en las estructuras de muestras teñidas provenientes de Madín con respecto al control (Figuras 4 y 5), observándose poca continuidad en la matriz en las primeras, tanto en el corte longitudinal como transversal

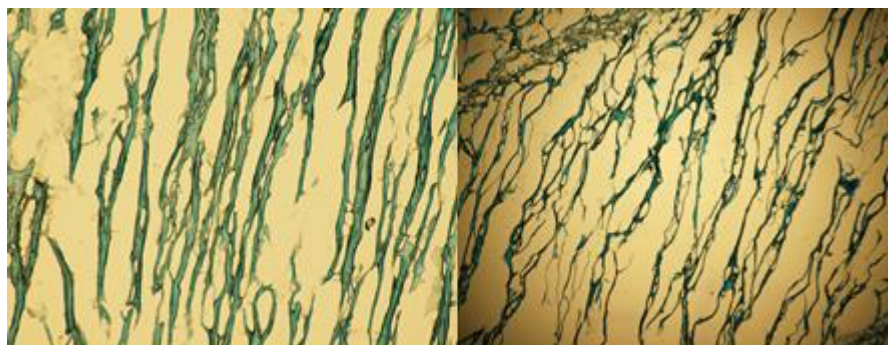


Figura 5 . Microscopía óptica, corte longitudinal 10 micras de espesor con lente 10x,
Madín vs Control.

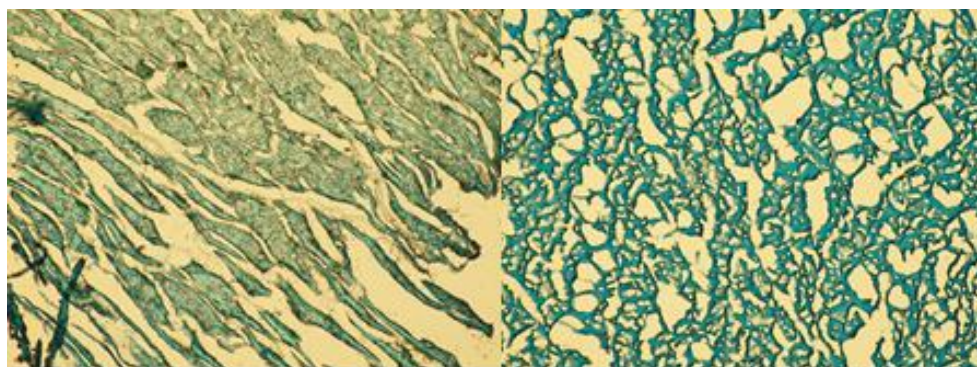


Figura 6. Microscopía óptica, corte transversal, 10 micras con lente 10x
Madín vs Control.

1.2. Microscopía electrónica de barrido

Mediante éste tipo de microscopía se detectó la presencia de metales: Al, Hg, Fe, Ni y Cd en la muestra proveniente de presa Madín (ver Anexo 2. Reporte de MEB). Mientras que la imagen muestra daño en la estructura, observándose las fibras sin estructura continua (Figura 7).

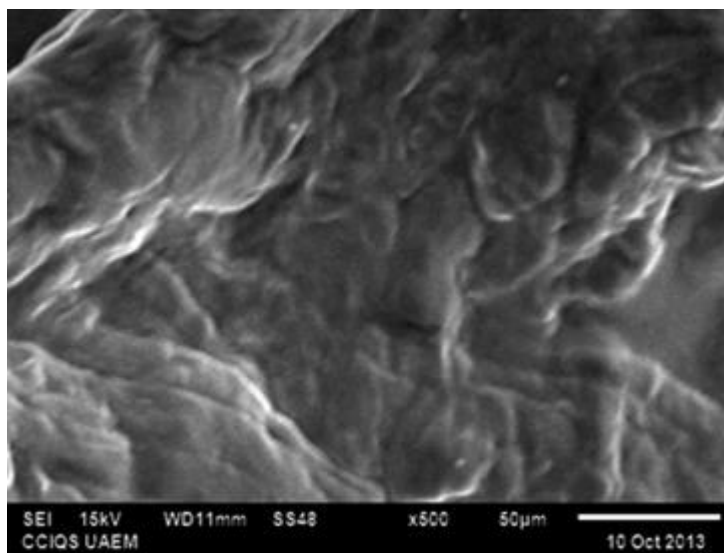


Figura 7. Imagen músculo Madín por Microscopía Electrónica de Barrido

1.3. Composición química

Se observó un incremento en cenizas, grasa y proteína de 457, 27 y 0.38 % respectivamente, encontrándose únicamente diferencias significativas en el contenido de cenizas, mientras que el contenido de humedad disminuyó 0.9%. Las muestras del control como de Madín con respecto a humedad y proteína, se encuentran dentro de los límites máximos establecidos para *Cyprinus carpio* por la FAO, como se observa en la figura 8, sin embargo el contenido graso y de cenizas muestra concentración superior con respecto a este valor.

La variación en el contenido químico en el músculo de pescado puede deberse a la alimentación, sexo y maduración sexual, variación estacional, y calidad el agua, asimismo, se ha demostrado que la presencia de determinados minerales como Na, Ca, Zn, Cu y Pb entre otros, en el pescado puede depender de la concentración de estos en el agua así como

su disponibilidad y grado de acumulación, el cual también dependerá de la especie, por lo que un elevado contenido de cenizas podría implicar un contenido elevado de minerales en el agua (Fawole et al., 2007; Ravichandra 2011). Mientras que la concentración superior de grasa puede explicarse a la variación estacional, ya que durante la sequía el pez, tenderá a almacenar energía en forma de grasa, estación en la que tanto el control como la muestra de presa Madín fueron recolectados (Huss, 1995).

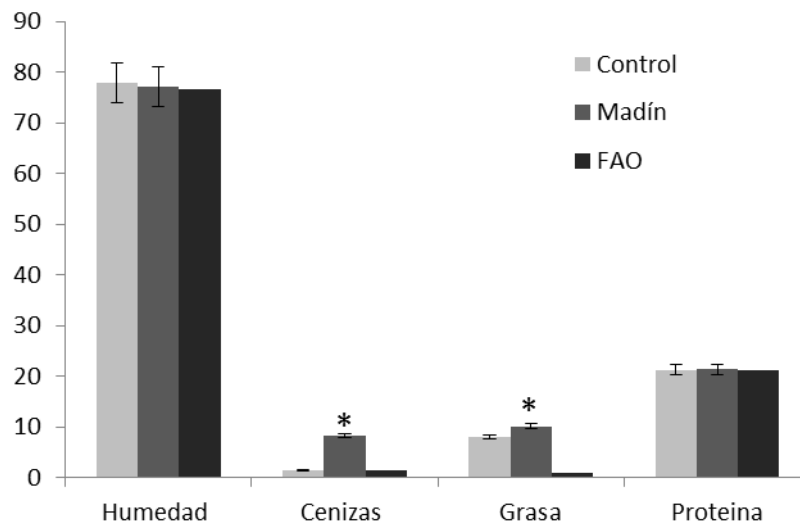


Figura 8. Composición Química de *C. carpio*

ANEXO 2

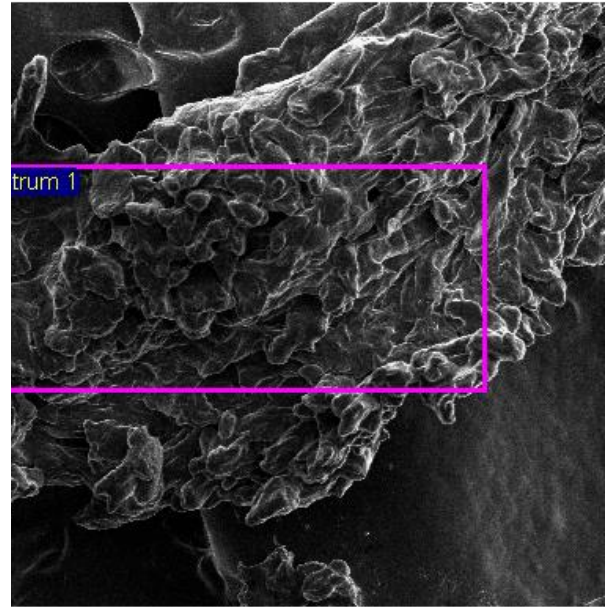
REPORTE MEB

Spectrum processing :
No peaks omitted

Processing option : All elements analyzed (Normalised)
Number of iterations = 4

Standard :

C CaCO3 1-Jun-1999 12:00 AM
O SiO2 1-Jun-1999 12:00 AM
Al Al2O3 1-Jun-1999 12:00 AM
P GaP 1-Jun-1999 12:00 AM
S FeS2 1-Jun-1999 12:00 AM
Fe Fe 1-Jun-1999 12:00 AM
Ni Ni 1-Jun-1999 12:00 AM
Hg HgTe 1-Jun-1999 12:00 AM



Electron Image 1

Element	Weight%	Atom ic%
C K	61.15	69.61
O K	33.44	28.57
Al K	0.53	0.27
P K	0.77	0.34
S K	1.48	0.63
Fe K	0.27	0.07
Ni K	2.14	0.50
Hg M	0.22	0.02

