



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE GLICÓSIDOS DE STEVIOL SOBRE LAS
CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y TEXTURALES DE LA CARNE Y ESTRÉS OXIDATIVO EN
CARPA COMÚN (*CYPRINUS CARPIO*)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

Presenta:

Q.A. Livier Mireya Sánchez Aceves

Tutor académico

Dr. Leobardo Manuel Gómez Oliván

Tutores adjuntos

Dr. Octavio Dublán García

Dra. Leticia Xochitl López Martínez

Toluca, México. 2017

ÍNDICE

	<u>Pág</u>
1. Resumen	8
1.1 Abstract	9
2. Introducción	10
3. Generalidades y Antecedentes	11
3.1 Contaminación	11
3.1.1 Contaminación del agua	12
3.1.2 Contaminantes de preocupación emergente	14
3.1.3 Contaminación del agua por edulcorantes	14
3.2 Edulcorantes	20
3.2.1 Consumo de stevia en México y el mundo	24
3.2.2 Glicósidos de steviol	25
3.2.3 Características de los principales GSv: steviósido y rebaudiósido A	27
3.2.4 Metabolismo de los principales GSv	29
3.3 Bioensayos	30
3.4 Bioindicadores	31
3.5 <i>Cyprinus carpio</i> (Linnaeus, 1758)	32
3.5.1 Importancia de la carpa común en México	32
3.5.2 Estadísticas de producción de carpa común en México	32
3.5.3 Características generales de <i>Cyprinus carpio</i> carpa común	34
3.5.4 Composición nutrimental de la carpa común	36
3.6 Biomarcadores	37
3.7 Estrés oxidativo	38
3.7.1 Radicales libres	39
3.7.2 Especies reactivas de oxígeno	41
3.7.3 Efectos del estrés oxidativo sobre biomoléculas	43
3.7.4 Antioxidantes	50
3.8 Carne de pescado	53
3.8.1 Generalidades del pescado	54
3.8.2 Composición del músculo de pescado	55
3.8.3 Cambios en la calidad de la carne de pescado	56

3.9 Propiedades funcionales de las proteínas	59
3.9.1 Propiedades de Solubilidad.....	59
3.9.2 Propiedades emulsificantes.....	60
3.9.3 Propiedades de gelificación.....	61
3.9.4 Capacidad de retención de agua (CRA)	63
3.9.5. Perfil de Textura.....	64
4. JUSTIFICACIÓN	68
5. HIPÓTESIS	70
6. OBJETIVOS	70
6.1 Objetivo General	70
6.2 Objetivos Específicos	70
7. MATERIALES Y MÉTODOS	71
7.1 Sustancias de ensayo	71
7.2 Colecta y mantenimiento de la carpa común (Cyprinus Carpio)	71
7.3 Ensayos de toxicidad	72
7.4 Evaluación del estrés oxidativo	72
7.4.1 Determinación de hidroperóxidos.....	73
7.4.2 Determinación del grado de lipoperoxidación TBARS	73
7.4.3 Determinación de los niveles de oxidación de proteínas	73
7.4.4 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa	74
7.4.5 Determinación de la actividad de la catalasa.....	74
7.4.6 Determinación de la concentración de proteínas	75
7.5 Análisis Fisicoquímicos	75
7.5.1 Medición pH	75
7.5.2 Capacidad de retención de agua (CRA)	76
7.5.3 Concentrado proteínico.....	76
7.5.4 Concentración de proteína	76
7.5.5 Determinación de Solubilidad	77
7.5.6 Determinación de grupos disulfuro y sulfhidrilo totales	77
7.5.7 Formación de gel	78
7.5.8 Análisis de textura TPA.....	78
7.5.9 Perfil de pesos moleculares SDS-PAGE.....	79
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	80

8.1 Estrés oxidativo	80
8.1.1 Contenido de Hidroperóxidos (CHP)	80
8.1.2 Análisis TBARS (Concentración de malondialdehído MDA).....	83
8.1.3 Contenido de proteínas carboniladas (CPC)	86
8.1.4 Superóxido dismutasa (SOD)	89
8.1.5 Catalasa (CAT)	91
8.2 Evaluación fisicoquímica del músculo de carpa común <i>Cyprinus carpio</i>	94
8.2.1 Determinación de pH.....	94
8.2.2 Determinación de Acidez	95
8.2.3 Capacidad de Retención de Agua (CRA).....	97
8.2.4. Determinación de solubilidad.....	99
8.2.5 Determinación de grupos sulhidrilo (SH) y disulfuro totales (SS).....	102
8.3 Análisis de Perfil de Textura	103
8.4 Perfil electroforético SDS-PAGE	107
9. CONCLUSIONES	109
10. REFERENCIAS	110

ÍNDICE DE TABLAS

	<u>Pág</u>
Tabla 1 Clasificación de los edulcorantes.....	21
Tabla 2 Características químicas de los Glicósidos de steviol.....	26
Tabla 3 Principales características de rebaudiósido A	27
Tabla 4 Principales características de steviósido	28
Tabla 5 Composición química de la carpa común en 100 g de porción comestible.....	37
Tabla 6 Análisis de Perfil de Textura (TPA)	66
Tabla 7 Curva tipo para la prueba de proteínas totales	75
Tabla 8 TPA de músculo de <i>C. carpio</i>	104

ÍNDICE DE FIGURAS

	<u>Pág</u>
Figura 1 Rutas de ingreso de edulcorantes artificiales y PT.....	18
Figura 2 Estructura química de edulcorantes	22
Figura 3 Gráfica de Producción de carpa en México 2016.....	33
Figura 4 Gráfica de Valor económico de carpa en México 2015.....	34
Figura 5 Carpa común <i>Cyprinus carpio</i>	34
Figura 6 Posibles mecanismos de carbonilación de proteínas.....	58
Figura 7 Ejemplo generalizado de gráfica de TPA.....	68
Figura 8 CHP en sangre, hígado y músculo de <i>C. carpio</i> expuestos a GS.....	81
Figura 9 LPX en sangre, hígado y músculo de <i>C. carpio</i> expuestos a GS.....	84
Figura 10 CPC en sangre, hígado y músculo de <i>C. carpio</i> expuestos a GS.....	87
Figura 11 SOD en sangre, hígado y músculo de <i>C. carpio</i> expuestos a GS	90
Figura 12 CAT en sangre, hígado y músculo de <i>C. carpio</i> expuestos a GS	92
Figura 13 pH en músculo de <i>C. carpio</i> expuesto a GS.....	94
Figura 14 Porcentaje de acidez en músculo de <i>C. carpio</i> expuesto a GS.....	96
Figura 15 CRA en músculo de <i>C. carpio</i> expuesto a GS.....	98
Figura 16 Solubilidad de músculo de <i>C. carpio</i> expuesto a GS.....	100
Figura 17 Grupos sulhidrido y disulfuro totales en músculo de <i>C. carpio</i> expuesto a GS.....	102
Figura 18 Perfil electroforético de músculo de <i>C. carpio</i> expuesto a GS.....	107
ANEXOS	<u>Pág</u>
Artículo Reduction of the oxidative stress status using steviol glycosides in a fish model (<i>Cyprinus carpio</i>).....	139

ABREVIATURAS

ACE	Acesulfame
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ASP	Aspartame
ATP	Adenin trifosfato
ANOVA	Análisis de varianza
CAT	Catalasa
CCl ₄	Tetracloruro de carbono
CEM	Coefficiente de extinción molar
CHP	Contenido de hidroperóxidos
CPC	Contenido de proteínas carboniladas
CRA	Capacidad de retención de agua
CYC	Ciclamatos
CYP450	Citocromo P450
C1	Concentración 1mg/L
C2	Concentración 1µg/L
C3	Concentración 1ng/L
DNPH	2,4- dinitrofenilhidracina
EAI	Edulcorantes de alta intensidad
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EO	Estrés oxidativo
ERO's	Especies reactivas de oxígeno
FBC	Factor de bioconcentración

GPX	Glutación peroxidasa
GSv	Glicósidos de steviol
HEPES	4(2-hidroxietil)-1 ácido piperazina etano sulfónico
HPC	Hidroperóxido de cumeno
LPX	Lipoperoxidación
MDA	Malondialdehído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NO	Óxido nítrico
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
PCP's	Productos de cuidado personal
pH	Potencial de hidrógeno
PT	Proteínas totales
PTAR's	Plantas de tratamiento de aguas residuales
RL	Radicales libres
SAC	Sacarina
SOD	Superóxido dismutasa
SUC	Sucralosa
STE	Steviósido
TPA	Análisis de perfil de textura
TBARS	Especies reactivas de ácido tiobarbitúrico
UI	Unidades internacionales

1. Resumen

Los glicósidos de steviol son metabolitos secundarios generados en las hojas de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni, un arbusto perenne perteneciente a la familia Asteraceae originaria de Paraguay y Brasil. El steviósido y el rebaudiósido A han sido identificados como los principales metabolitos acumulados en las hojas de la planta. Los glicósidos de steviol (GSv) son hasta 300 veces más dulces que la sacarosa y son ampliamente utilizados en las industrias farmacéutica, química y de alimentos. Los glicósidos de steviol son considerados seguros para el consumo humano pero sus efectos en el ecosistema no han sido estudiados a profundidad debido a la falta de información ecotoxicológica en la literatura actual. El presente estudio tuvo por objetivo evaluar el efecto de la exposición de *C. carpio* a tres concentraciones de glicósidos de steviol y el efecto sobre las características fisicoquímicas y texturales de la carne. Los especímenes de *C. carpio* fueron expuestos a concentraciones de 1 mg/L, 1 µg/L and 1 ng /L de GSV durante 12, 24, 48, 72 y 96 h. Para cada tiempo de exposición se analizaron los siguientes biomarcadores en sangre, hígado y músculo: lipoperoxidación (LPX), contenido de hidroperóxidos (HPC) y contenido de proteínas carboniladas (PCC), así como actividad antioxidante de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT). Los resultados mostraron una disminución estadísticamente significativa ($P < 0.05$) en los biomarcadores analizados en los órganos estudiados principalmente para la concentración de 1 mg/L Posteriormente se llevaron a cabo análisis fisicoquímicos de pH, acidez, capacidad de retención de agua, solubilidad, grupos sulfhidrilo y disulfuro totales y electroforesis SDS-PAGE, así como análisis de perfil de textura TPA al músculo expuesto a concentraciones de 1 mg/L, 1 µg/L and 1 ng /L de GSV durante 12, 24, 48, 72 y 96 h . No se encontraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a grupo control en los parámetros analizados ($P < 0.05$). Los resultados de este estudio demuestran que las concentraciones de glicósidos de steviol

utilizadas no son capaces de generar estrés oxidativo o efectos deletéreos en la carne de *C. carpio* y, por el contrario, parece inducir un efecto antioxidante.

1.1 Abstract

Steviol glycosides are secondary metabolites generated in the leaves of the *Stevia rebaudiana* Bertoni plant, a perennial shrub belonging to the *Asteraceae* family native to Paraguay and Brazil. Stevioside and rebaudioside A have been identified as the major metabolites accumulated in the leaves of the plant. Steviol glycosides (SvGs) are up to 300 times sweeter than sucrose and are widely used in the pharmaceutical, chemical and food industries. Steviol glycosides are considered safe for human consumption but their effects on the ecosystem have not been yet studied in depth due to the lack of ecotoxicological information in the current literature. The present study aimed to evaluate the effect of the exposition of *C. carpio* to three concentrations of steviol glycosides and the effect on the physicochemical and textural characteristics of the meat. The following biomarkers were analyzed: lipoperoxidation (LPX), hydroperoxide content (HPC), and protein carbonyl content (PCC), as well as antioxidant activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). Physicochemical analysis were carried, pH, acidity, water holding capacity, solubility, free sulfhydryl and disulfide groups and SDS-PAGE electrophoresis as well as textural analysis profile TPA. The results of this study demonstrate that the concentrations of SGs used (1 mg/L, 1 µg/L and 1 ng /L) are not capable of generating oxidative stress or deleterious effects on the meat of *C. carpio* and, on the contrary, would appear to induce an antioxidant effect.

2. Introducción

Los grandes avances tecnológicos, agrícolas y médicos desarrollados en los últimos años, sin duda han mejorado de forma significativa el estilo de vida de los seres humanos, sin embargo los problemas en las matrices ambientales se han vuelto cada vez más críticos y frecuentes. El incremento en las actividades antropogénicas, el desarrollo industrial y la imperiosa necesidad de satisfacer las demandas del mundo moderno han tenido como consecuencia efectos catastróficos en el medio ambiente, que van desde pérdida de la biota hasta modificaciones en los patrones climáticos. Actualmente existe una amplia variedad de estudios que demuestran la ubicua presencia de nuevas sustancias xenobióticas en el medio acuático (Thomaidis *et al.*, 2012).

Barceló & López (2008) han mencionado que el desarrollo de nuevos métodos con mayor sensibilidad han permitido alertar a la comunidad científica de la presencia de contaminantes, potencialmente peligrosos, denominados emergentes. Dentro de estos se encuentran un amplio grupo de sustancias como: productos farmacéuticos y de cuidado personal (PCPs), drogas ilícitas, hormonas y esteroides, benzotiazoles, benzotriazoles, naftalenos policlorados, químicos perfluorados (PFCs), alcanos policlorados, bisfenoles, plaguicidas, productos veterinarios, nano materiales y aditivos alimentarios, entre otros (Lapworth *et al.*, 2012).

Richardson & Termes (2011) sugieren que la sucralosa y otros edulcorantes han sido identificados como contaminantes emergentes persistentes. Diversos estudios alrededor del mundo han demostrado que edulcorantes como sucralosa, acesulfame, sacarina, ciclamatos y sus productos de transformación son ampliamente encontrados en cuerpos de agua contaminados con aguas residuales y tratadas (Scheurer *et al.*, 2009; Richardson & Termes, 2011), lo que indica su alta persistencia y la baja tasa de eliminación en las plantas de tratamiento de aguas residuales cuando son empleados los métodos convencionales. Dichas características los convierten en candidatos

ideales para convertirse en marcadores de contaminación de aguas domésticas en ambientes acuáticos, particularmente en aguas subterráneas (Burgue *et al.*, 2009; Oppenheimer *et al.*, 2011).

El concepto de bioindicador aplicado a la evaluación de la calidad del agua, es definido como: “especie (o ensamble de especies) que poseen requerimientos particulares en relación a uno o a un conjunto de variables físicas o químicas, tal que los cambios de presencia/ausencia, número, morfología o de conducta de esa especie en particular, indiquen que las variables físicas o químicas consideradas, se encuentran cerca de sus límites de tolerancia” (Rosenberg & Resh, 1993). Metodológicamente es recomendable llevar a cabo bioensayos con especies que se encuentren en diversos niveles de la cadena trófica; dentro de estos se pueden mencionar los peces teleósteos, organismos ampliamente empleados en ensayos de toxicidad. La carpa común *Cyprinus carpio* es comúnmente utilizado como especie bioindicadora (Huang *et al.*, 2007) debido a que los cyprinidos son el grupo más importante y numeroso de los peces teleósteos cultivados alrededor del mundo con propósitos comerciales. La carpa común posee características que la convierten en un bioindicador ideal tales como resistencia a condiciones adversas del medio, facilidad de contención y fuente importante de proteína ya que una carpa de 250 g cubre en un 86% los requerimientos proteicos en niños y el 67% en adolescentes (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2006).

3. Generalidades y Antecedentes

3.1 Contaminación

La contaminación se define como la presencia en el medio ambiente, biótico o abiótico, de cualquier forma de energía o sustancia de naturaleza química, física o biológica que dañe o altere la calidad de vida, el bienestar de cualquier ser vivo o las condiciones del medio ambiente. La

contaminación es una consecuencia negativa de los procesos productivos que afectan a la salud humana y a la integridad de los ecosistemas, ocasionando daños generalmente irreversibles, entre los que se destaca la pérdida de biodiversidad (Barrera & Nahimira, 2004).

Hasta hace unos años, las investigaciones y regulaciones sobre sustancias químicas y su impacto en el medio ambiente se centraba en la acción de metales pesados, sustancias activas de los plaguicidas y los contaminantes orgánicos persistentes. Hoy día, las emisiones industriales, la ineficiente disposición de residuos, los derrames accidentales y las actividades de consumo están repercutiendo de manera significativa e insostenible en el medio ambiente, impactado de forma severa en uno de los recursos más escasos y de mayor importancia para la supervivencia humana, el agua (Becerril, 2009).

3.1.1 Contaminación del agua

La contaminación del agua se puede definir como cualquier cambio derivado de la introducción de agentes biológicos, químicos o físicos externos que tiene lugar en detrimento de la composición, contenido o calidad de los cuerpos de agua como resultado de actividades naturales o antropogénicas (Novotny, 2003). Los principales contaminantes del agua se clasifican en ocho grupos: (1) microorganismos patógenos, (2) desechos orgánicos, (3) sustancias químicas inorgánicas, (4) nutrientes vegetales inorgánicos, (5) compuestos orgánicos, (6) sedimentos y materiales suspendidos, (7) sustancias que proveen olor, color, sabor, (8) contaminación térmica (Novotny, 2003). Las fuentes de contaminación del agua se atribuyen generalmente a tres sectores: social, debido a la generación de residuos de origen doméstico y público; agropecuario, principalmente por el uso de insecticidas y abonos químicos; e industrial, por la existencia de desechos directos a los sistemas de drenaje, la lluvia ácida entre otros (Hernández, 2002).

De acuerdo con el ciclo del agua, las principales vías de entrada de compuestos contaminantes en el medio ambiente acuático son las aguas residuales, en las que se incluyen las descargas urbanas, hospitalarias, industriales y las provenientes de actividades primarias como agricultura y ganadería (Barceló & López, 2008). Se sabe que el punto en que confluyen distintos compartimientos ambientales y actividades humanas, es donde se produce la contaminación del agua o el deterioro en su calidad.

Algunos efectos derivados de la contaminación química del agua en los diferentes ecosistemas son (Barceló & López, 2008):

1. Efectos mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos, citotóxicos, entre otros, producidos por la acción tóxica en los componentes bióticos.
2. La limitación del agua para fines recreativos
3. La reducción de su uso para actividades de sectores primarios y secundarios.

Los contaminantes emergentes se caracterizan por causar efectos negativos a pesar de tratarse de sustancias de baja persistencia en el medio ambiente puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente (Barceló, 2003).

Actualmente es complejo precisar los riesgos derivados de la presencia de sustancias tóxicas en los cuerpos de agua debido a la diversidad de su naturaleza química, bajas concentraciones ambientales y al hecho de que se encuentran formando parte de una mezcla heterogénea de sustancias por lo que los efectos deletéreos en todos los niveles difícilmente pueden ser imputados a un contaminante en específico.

3.1.2 Contaminantes de preocupación emergente

Los contaminantes emergentes son compuestos de distinto origen y naturaleza química cuya presencia en el medio ambiente, o las posibles consecuencias de la misma, han pasado en gran parte inadvertidas. La *US Environmental Protection Agency* (USEPA) define a un contaminante emergente como un químico o material que representa una amenaza percibida, potencial o real a la salud humana para la cual los estándares de calidad publicados son escasos o inexistentes (USEPA, 2008). Los contaminantes emergentes en agua se clasifican en los siguientes rubros (Gil *et al.*, 2012): (1) Productos farmacéuticos, (2) Drogas ilícitas, (3) Compuestos “estilo de vida”, (4) Productos de cuidado personal, (5) Surfactantes, (6) Aditivos industriales y subproductos, (7) Aditivos alimentarios. Por su naturaleza, las principales fuentes de ingreso al ecosistema de este tipo de compuestos son las descargas de aguas no tratadas (municipales, industriales, hospitalarias) y los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR’s) (Henríquez, 2012). Estos compuestos se encuentran en bajas concentraciones (generalmente en partes por millón o partes por trillón) y la mayoría no se encuentran regulados o reglamentados por la mayoría de los países (Kuster *et al.*, 2008).

Kokotou *et al.*, (2012) & Lange *et al.*, (2012) han mencionado que los sustitutos de azúcar producidos, consumidos y globalmente liberados al ambiente pueden ser considerados contaminantes emergentes.

3.1.3 Contaminación del agua por edulcorantes

Diversos estudios de contaminantes ambientales alrededor del mundo han confirmado la extendida distribución de EAI en aguas subterráneas, superficiales y residuales a niveles que se encuentran entre los más altos dentro de los contaminantes antropogénicos (Stolte *et al.*, 2013). En el año 2015, Arbeláez y colaboradores estudiaron ocho EAI en aguas de ríos y aguas residuales

de Cataluña, encontrando que las concentraciones más altas 1.62 µg/L y 3.57 µg/L pertenecían a sucralosa y acesulfame respectivamente, lo que indica ocurrencia y obicua presencia de EAI en cuerpos de agua.

3.1.3.1 Ocurrencia y comportamiento de los edulcorantes en el medio ambiente

A partir del año 2009 los EAI han sido identificados como contaminantes emergentes en el ambiente acuático. La clave para la detección de sustancias edulcorantes en el medio ambiente ha sido la aplicación de diferentes técnicas analíticas de identificación y extracción de fase sólida (solid-phase extraction SPE) combinadas con cromatografía líquida por electrospray acoplada a espectrometría de masas (LC-ESI-MS/MS). Los nuevos métodos de análisis desarrollados permiten la detección en niveles traza de la mayoría de los edulcorantes artificiales existentes en intervalos de ng/L en el ambiente acuático. Principalmente, acesulfame (ACE), ciclamatos (CYC), sacarina (SAC) y sucralosa (SUC) y un producto de transformación (PT) de ASP han sido detectados en aguas residuales, aguas superficiales y subterráneas. Todos los edulcorantes artificiales son compuestos químicos altamente solubles en agua y algunos edulcorantes altamente estables como ACE y SUC, pueden ser detectados en aguas de abastecimiento y agua de grifo en concentraciones mayores de µg/L. A pesar de que las concentraciones en agua de grifo son relativamente altas comparadas con otros compuestos antropogénicos, tales como plaguicidas o productos farmacéuticos, la presencia en cantidades traza en estos compuestos toxicológicamente poco estudiados genera menor preocupación (Lambropoulou & Nollet, 2014).

En Alemania, en el año 2009 Scheurer y colaboradores detectaron la presencia de siete edulcorantes artificiales de alta intensidad en aguas residuales tratadas en dos PTARs y aguas superficiales al llevar a cabo una extracción en fase sólida de los compuestos y realizando el análisis por Cromatografía de líquidos-Electrospray- Espectrometría de masas (LC/MS). Ferrer & Thurman (2010) llevaron a cabo un estudio sobre la detección de edulcorantes artificiales en diversas

muestras de agua utilizando LC/TOF-MS (*chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry*) así como la extracción automática de los edulcorantes en aguas residuales, superficiales y subterráneas utilizando la estación de extracción GX-271 ASPEC™ - Gilson recuperando cerca del 73% de sucralosa de las muestras, presentando un límite de detección para la técnica LC/TOF-MS de 0,05 µg/L de sucralosa y concluyendo que dicho edulcorante es el más detectado en muestras de agua de diversas fuentes en comparación con otros EAI ampliamente consumidos como aspartame y sacarina.

Años más tarde Spoelstra *et al.* (2013) llevaron a cabo un estudio en 23 sitios a lo largo del Gran Río, Ontario, Canadá, encontrando una máxima concentración de sucralosa de 21 µg/ L convirtiéndose en una de las mayores reportadas en el mundo. Dicho edulcorante había sido detectado con anterioridad en ríos de países europeos en concentraciones máximas de 3.56 µg/ L y diversos puntos en América del Norte a niveles máximos de 10 µg/ L (Brorström-Lundén *et al.*, 2008; Buerge, *et al.*, 2009; Scheurer *et al.*, 2009; Ferrer, 2010; Van Steempvoort *et al.*, 2011; Mawhinney *et al.*, 2011; Oppenheimer *et al.*, 2011).

El edulcorante artificial acesulfame puede ser considerado como un eficiente marcador de contaminación en la detección de trazas de aguas residuales domésticas en los cuerpos de agua debido a que se ha encontrado que no es eliminado por las PTAR's y presenta una alta persistencia en cuerpos de agua como lagos, ríos y lagunas (Buerge *et al.*, 2011). Ha demostrado ser altamente móvil y recalcitrante en aguas subterráneas (Buerge *et al.*, 2009; Van Steempvoort *et al.*, 2011; Robertson *et al.*, 2013) por lo que puede ser considerado un marcador de contaminación fiable en aguas del subsuelo. En la **Fig. 1** se muestran posibles rutas de ingreso de los edulcorantes y sus productos de transformación en el medio acuático. Los edulcorantes contenidos en alimentos, productos farmacéuticos, de cuidado personal y plaguicidas presentan

posibles rutas de ingreso al medio acuático; a través de la excreción de forma casi inerte del cuerpo humano , limpiezas en equipos que han sido utilizados para la fabricación de productos que contienen edulcorantes, los ineficientes tratamientos de remoción de edulcorantes en las plantas de tratamiento de agua residuales, filtración a través del suelo a los diferentes mantos freáticos así como las aguas de riego.

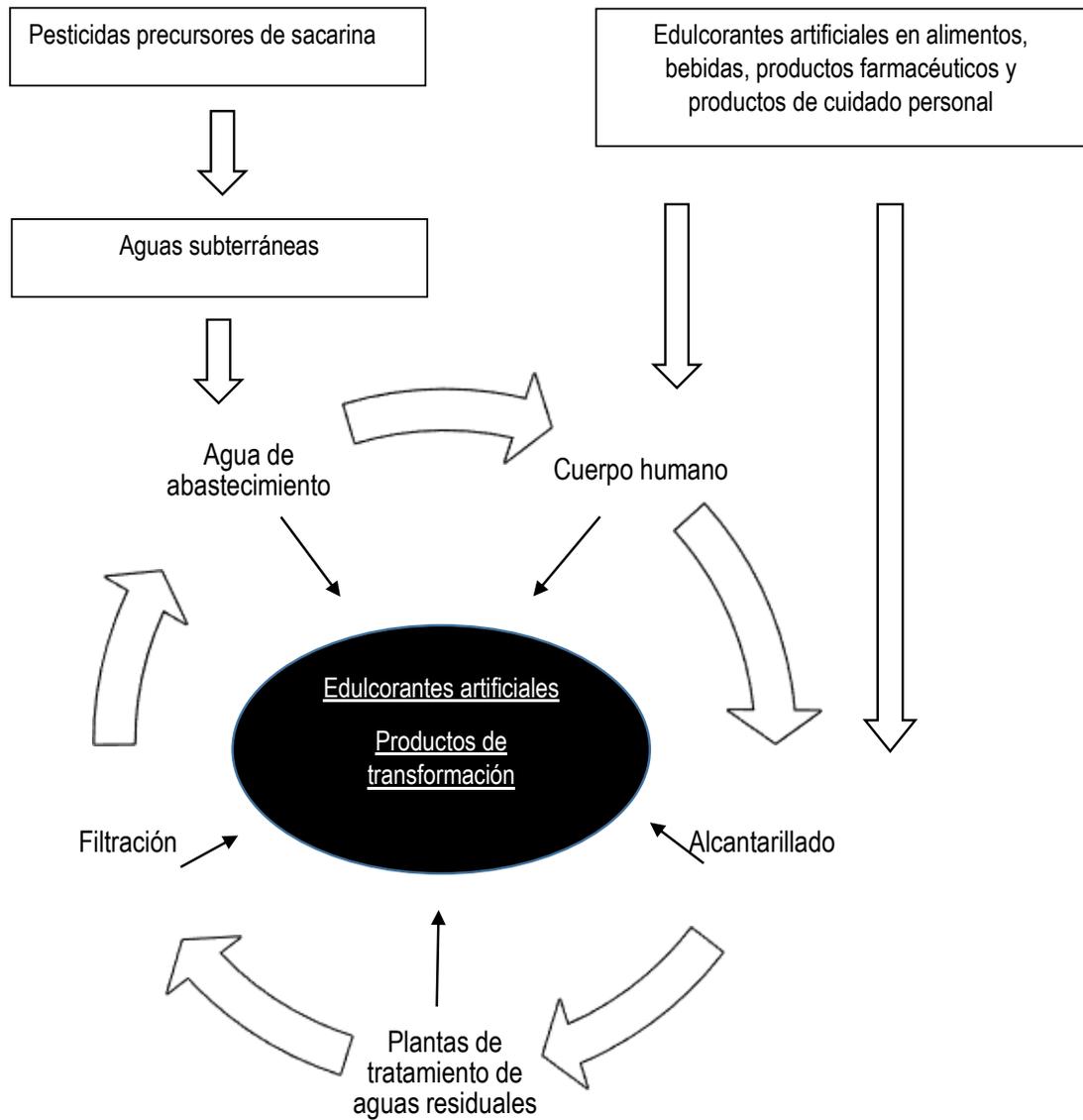


Figura 1. Rutas de ingreso de edulcorantes artificiales y sus productos de transformación en el ambiente acuático adaptada de una imagen de Thomas A. Ternes, Federal Institute of Hydrology, Koblenz, Germany Copyright (2013) encontrado en Lambropoulou & Nollet (2014).

3.1.3.2 Estudios toxicológicos de los edulcorantes de alta intensidad sobre la biota

Hjorth *et al.* (2010) estudiaron los efectos de sucralosa en dos especies de copépodos del ártico. En dicho estudio encontraron que la ingesta de alimento incrementó de forma dependiente de las concentraciones de sucralosa en el copépodo marino *Calanus glacialis* no así en *Calanus finmarchicus*, mientras que la producción de huevos no fue afectada.

Lillicrap *et al.*, (2011) realizaron estudios de factores de bioconcentración (FBC) usando diferentes especies, algas de agua dulce *Pseudokirchneirella subcapita*, el microcrustáceo *Daphnia magna* y pez zebra *Danio rerio*, encontrando valores de (FBC) <1 para algas y peces y valores mayores de FBC (1.6-2.2) para dáfidos. Aún cuando estos estudios indican que la sucralosa posee una baja toxicidad y no se bioacumula en grado significativo en organismos acuáticos, su persistencia combinada con el incremento en el consumo del edulcorante demanda una evaluación ecotoxicológica más detallada, llevando a cabo análisis de toxicidad subletal.

En los ambientes acuáticos las señales químicas son la principal ruta de comunicación (Hay, 2009). El sentido del gusto es el regulador dominante y la fuerza motora del comportamiento de alimentación, y los principios fundamentales del sistema gustativo son los mismos en diversos organismos, como mamíferos e insectos (Yarmolinsky *et al.*, 2009) lo que puede significar que los receptores de sabores dulces que se encuentran en humanos podrían estar presentes en otros grupos taxonómicos. Estudios recientes proveen evidencias de receptores gustativos de sabores dulces en crustáceos (Peñalva-Arana *et al.*, 2009).

Estudios de quimiorreceptores en crustáceos demuestran que las especies carnívoras tienen la capacidad de detectar aminoácidos, mientras que las especies herbívoras y omnívoras son también sensibles a los carbohidratos (Corotto & O'Brien, 2002). La persistencia de la sucralosa

en combinación con su alta solubilidad en agua, su semejanza estructural con el azúcar y su perfil de dulzor hacen de esta sustancia un reto para la evaluación del riesgo en los ambientes acuáticos. Es muy improbable que la sucralosa pueda acumularse en los sedimentos debido a su naturaleza hidrofílica.

La sucralosa no exhibe efectos adversos en la tasa de crecimiento de *Lenma gibba* (7d) a concentraciones <1000 mg/L (Soh *et al.*, 2011). Huggett & Stoddard (2011) investigaron la toxicidad crónica de SUC no encontrando reducción significativa en la supervivencia o reproducción a concentraciones hasta de 1800 mg/L para *Daphnia magna* (21 d) o 93 mg/L para *Americamysis bahia* (28d).

Saucedo-Vence *et al.* (2016) encontraron que sucralosa a concentraciones ambientales relevantes (155 y 0.05 µg/ L) modifica los niveles enzimáticos normales e induce daño oxidativo en lípidos y proteínas en *Cyprinus carpio* afectando principalmente a branquias, músculo, cerebro e hígado.

3.2 Edulcorantes

El término edulcorante, hace referencia a aquel aditivo alimentario que es capaz de mimetizar el efecto dulce del azúcar y que, habitualmente, aporta menor energía. Algunos de ellos son extractos naturales mientras que otros son sintéticos, en este último caso se denominan edulcorantes artificiales. En la Tabla 1 se recoge la clasificación diferentes clasificaciones de edulcorantes por su naturaleza (García-Almeida *et al.*, 2013).

Tabla 1. Clasificación de los edulcorantes

<u>CALÓRICOS</u>	Naturales	Azúcares	Sacarosa, glucosa, dextrosa, fructosa, lactosa, maltosa, galactosa y trehalosa, tagatosa
		Edulcorantes naturales calóricos	Miel, jarabe de arce, azúcar de palma o de coco, jarabe de sorgo
	Artificiales	Azúcares modificados	Jarabe de maíz de alto fructosa, caramelo, azúcar invertido
		Alcoholes del azúcar	Sorbitol, xilitol, manitol, eritritol maltitol, isomaltulosa, lactitol, glicerol.
<u>NO CALÓRICOS</u>	Naturales	Edulcorantes naturales sin calorías	Luo Han Guo, <u>stevia</u> , taumatina, pentadina, monelina, brazzeína
	Artificiales	Edulcorantes artificiales	Aspartame, sucralosa, sacarina, neotame, acesulfame K, ciclamato, neohesperidina DC, alitame, advengamos

Fuente (García-Almeida *et al.*, 2013)

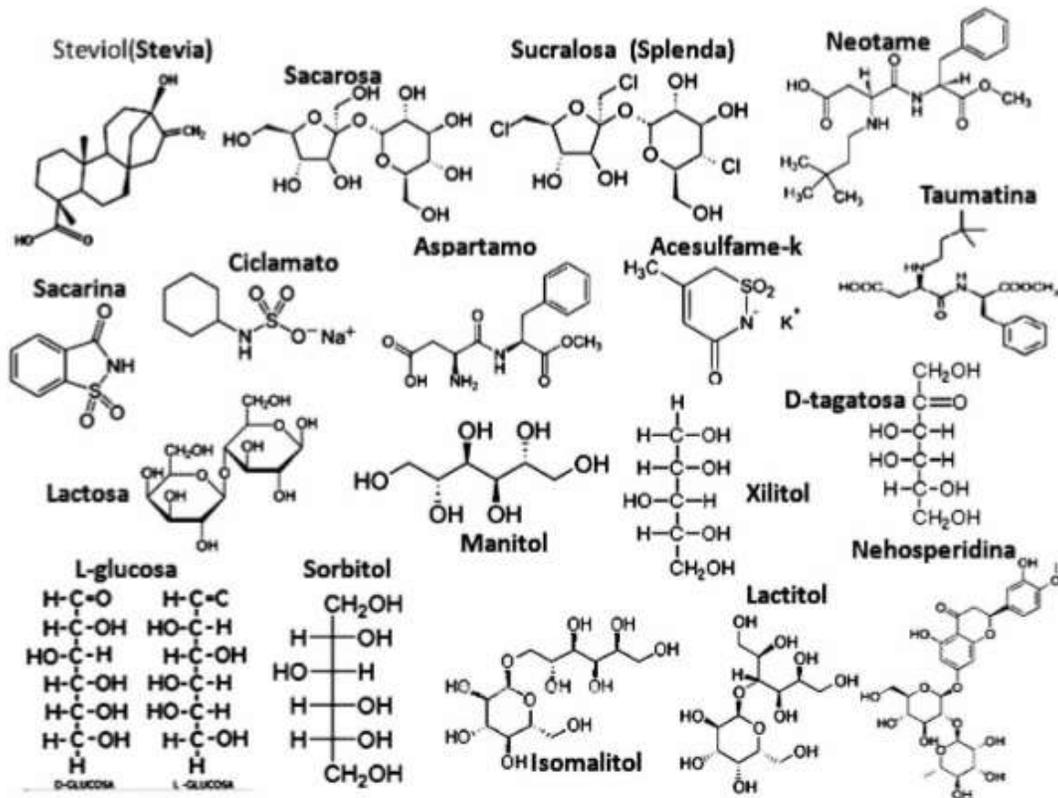


Figura 2. Estructura química de edulcorantes

Fuente (García-Almeida *et al.*, 2013)

En la **Fig. 2** se muestran las estructuras químicas de los principales edulcorantes calóricos y no calóricos consumidos alrededor del mundo de acuerdo a García-Almeida *et al.* (2013)

Los edulcorantes nutritivos proporcionan 4 kcal g⁻¹, teniendo así un efecto en la glucosa sanguínea. Los más comunes son: sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, dextrosa, miel y miel de maíz, así como también los polioles o azúcar de los alcoholes, que aportan 2 kcal g⁻¹, siendo menos dulces que el azúcar y no producen caries; entre ellos está el sorbitol, xilitol, manitol, maltitol, isomaltitol, lactitol y eritritol (Sánchez, 2013).

Los edulcorantes no nutritivos no aportan energía o aportan una mínima cantidad, que no es considerable. Tienen un alto poder endulzante y basta una cantidad muy pequeña para obtener el sabor dulce. Actualmente se encuentran en el mercado mexicano: aspartame, sacarina, acesulfame K, sucralosa, ciclamato, alitame y glicósidos de steviol (stevia) (Sánchez, 2013).

Al tratarse de aditivos alimentarios, el consumo de edulcorantes está permitido por diversas agencias de seguridad alimentaria en más de 70 países alrededor del mundo:

El uso de los edulcorantes es regulado por cada país; antes de ser permitidos para su consumo, la seguridad de éstos es evaluada por diferentes comités mundiales, como el Comité Científico para la Alimentación (SCF, *Scientific Committee on Food*), el Comité de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, *Food and Agriculture Organization*), el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*), la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, *Food and Drugs Administration*), las Autoridades Europeas de Seguridad en Alimentos (EFSA, *European Food Safety Authority*), y en el caso de México, la Secretaría de Salud, a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) (Sánchez, 2013).

Seis EAI han recibido aprobación por parte de la FDA en los Estados Unidos: sacarina, aspartame, acesulfame potásico (Ace-K), sucralosa, neotame y advantame (FDA, 2014)

Las notificaciones GRAS (*Generally Recognized As Safe*) han sido aprobadas por la FDA a dos tipos de edulcorantes de alta intensidad EAI (ciertos glicósidos de steviol GSv obtenidos de las hojas de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni y los extractos obtenidos de la fruta *Siraitia grosvenorii* Swingle también conocida como fruta Luo Han Guo). Los extractos crudos de la hoja de stevia son sujetos de una alerta de importación y no está aprobado su uso como edulcorante (FDA, 2014)

Basados en las evidencias científicas existentes, las agencias de seguridad alimentaria alrededor del mundo han concluido que los edulcorantes aprobados como aditivos alimentarios son seguros para la población en general bajo ciertas condiciones de uso, ya que, a las dosis de consumo admisible no representan daños para la salud humana.

3.2.1 Consumo de stevia en México y el mundo

Diversos estudios de consumo demuestran que el edulcorante stevia es el ingrediente natural que presenta los mayores índices de crecimiento dentro del sector de alimentos y bebidas en todo el mundo (Consejo Internacional de Stevia, 2012) con proyecciones de crecimiento de 7150 toneladas para el año 2017, equivalente a US\$ 578 millones (Zenith International, 2014) y de 565 millones de dólares provenientes de un consumo aproximado de 8507 toneladas al ser incorporado en productos de empresas como Nestlé S.A., Coca –Cola, PepsiCo Inc y comercializado por Cargill Inc., Evolva Holding S.A., PureCircle Ltd., Stevia Corp., Ingredion Inc., GLG Life Tech Corp. and Tate & Lyle Plc.

En el mercado doméstico el consumo de edulcorantes no calóricos representa 5% del mercado de endulzantes, pero en los próximos 5 a 10 años podrían tener una penetración entre 10% y 15%. Por ejemplo podemos mencionar que en junio del año 2015 grupo Bimbo anunció la reducción entre 5% y 35% del contenido de azúcar en pan dulce para un proceso de reformulación incorporando stevia en diversas líneas de productos a causa del Impuesto Especial sobre Producción y Servicios (IEPS) que se aplicó a alimentos con alto contenido calórico en la reforma fiscal del año 2013 (El Universal, 2015) lo cual implicará un aumento significativo en el consumo de este edulcorante a causa de una mayor penetración en el mercado de alimentos envasados.

3.2.2 Glicósidos de steviol

La creciente incidencia de enfermedades como obesidad, diabetes, trastornos metabólicos y factores de riesgo cardiovasculares han conducido a la búsqueda de edulcorantes naturales que puedan ser consumidos como sustitutos de sacarosa (Geeraert *et al.*, 2010). Es por esta razón que en los últimos años se ha prestado especial atención al estudio de bioedulcorantes como stevia, Luo Han Guo, taumatina y brazzeína, los cuales poseen la valiosa característica de no proveer calorías significativas a las cantidades consumidas habitualmente para edulcorar. Estos no son carbohidratos, por tanto no tienen índice glicémico y son considerados edulcorantes de alta intensidad (EAI).

Probablemente uno de los edulcorantes que mayor interés ha suscitado en foros científicos y divulgativos en los últimos años es stevia proveniente de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni. Esta planta es un pequeño arbusto perenne perteneciente a la familia *Asteraceae* (Yadav & Guleria, 2012) originaria de Sudamérica particularmente Brasil y Paraguay es conocida por su poder edulcorante derivado de la presencia de GSv sintetizados en las hojas. Los GSv son diterpenos que comprenden un esqueleto químico común denominado steviol (aglicona) y diferentes residuos de carbohidratos (glucosa y/o ramnosa/xilosa) enlazados en las posiciones C13 y C19 (Brandle & Telmer, 2007).

Los principales compuestos GSv son cuatro: steviósido, rebaudiósido A, dulcósido y rebaudiósido C, entre los cuales destacan en cantidad los dos primeros. El STE (4–13% en peso seco) es 250–300 veces más dulce que el azúcar aunque con un sabor ligeramente amargo, mientras que el Rebaudiósido A (2–4% en peso seco) tiene mayor capacidad edulcorante (350–450 veces más que el azúcar) y sin resabio amargo (Goyal *et al.*, 2010). En menor cantidad, se pueden encontrar el rebaudiósido C (1–2%) y dulcósido A (0.4–0.7%), junto con steviolbiósido, rubusósido,

rebaudiósido B, D, E y F (<0,4% cada uno de ellos) (Goyal *et al.*, 2010; Jackson *et al.*, 2009; Woelwer-Rieck *et al.*, 2010). En la **tabla 2** se muestran las características químicas de los principales GSV encontrados en extractos de hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

Tabla 2. Características químicas de los GSV

Compuesto	Fórmula	Peso molecular	Número CAS
Dulcósido A	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₇	788.875	64432-06-0
Steviol	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	318.4504	471-80-7
Steviolbíosido	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	642.7316	41093-60-1
Steviósido	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	804.88	57817-89-7
Rebaudiósido A	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	967.01	58543-16-1
Rebaudiósido B	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈	804.8722	58543-17-2
Rebaudiósido C o Dulcósido B	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₂	951.03	63550-99-2
Rebaudiósido D	C ₅₀ H ₇₈ O ₂₈	1129.17	63279-13-0
Rebaudiósido E	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃	966.43	63279-14-1

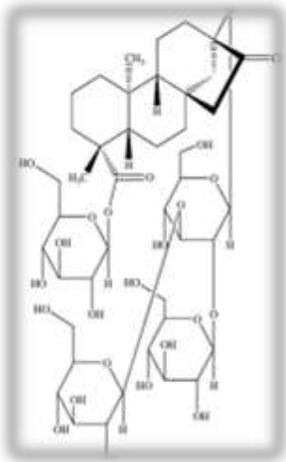
Fuente (Gardana *et al.*, 2003)

Un gran número de estudios han sugerido que, además de su poder edulcorante, el STE junto con otros compuestos relacionados, los cuales incluyen al rebaudiósido A (segundo componente más abundante en la hoja de *S. rebaudiana*), steviol, isosteviol (componentes metabólicos de STE) también pueden ofrecer efectos terapéuticos ya que presentan actividad hipoglicémica, anti-hipertensiva, anti-inflamatoria, anti-tumoral, anti-diarreica, diurética e inmunomoduladora entre otros (Chatsudhipong & Muanprasat 2009).

3.2.3 Características de los principales GSV: steviósido y rebaudiósido A

Rebaudiósido A y su compuesto relacionado STE son los mayores compuestos diterpenos glicosídicos de las hojas de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni (Gardana *et al.*, 2003). Las principales características del compuesto edulcorante rebaudiósido A se muestran en la **tabla 3**.

Tabla 3. Principales características de rebaudiósido A

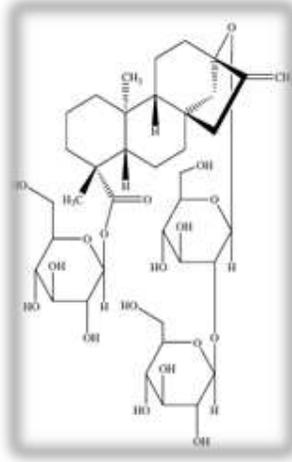
CARACTERÍSTICAS	DESCRIPCIÓN
Nombre IUPAC	ácido 19-O-beta-glucopiranosil-13-O-(beta-glucopiranosil(1-2)-beta-glucopiranosil(1-3))-beta-glucopiranosil-13-hidroxikaur-16-en-19-oico
Otro nombre	(4 α)-13-[(2-O- β -D-Glucopiranosil-3-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosil)-oxy]kaur-6-en-8-carboxil β -D-glucopiranosilester
Fórmula estructural	
Fórmula molecular	C ₄₄ H ₇₀ O ₂₃
Apariencia	Polvo blanco
Densidad	3.71 g cm ⁻³
Masa molar	966 g mol ⁻¹

Punto de fusión	242-244 °C
Solubilidad en agua	0.80%, también es soluble en etanol y metanol
Dulzor	200-400 veces mayor que la sacarosa

Fuente (Gardana *et al.*, 2003)

El STE es un glicósido diterpeno que comprende una aglicona (steviol) y tres moléculas de glucosa. Su presencia representa del 5-10% del peso seco total de las hojas de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni (Chatsudthipong & Muanprasat, 2009). En la tabla 4 se recogen sus principales características.

Tabla 4. Principales características de steviósido

CARACTERÍSTICA	DESCRIPCIÓN
Nombre IUPAC	13-[(2-O-beta-D-Glucopiranosil-alfa-D-glucopiranosil)oxi]kaur-16-en-18-oico ácido beta-D-glucopiranosil éster
Fórmula estructural	

Fórmula molecular	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₈
Apariencia	Polvo blanco
Densidad	3.54 g cm ⁻³
Masa molar	804.87 g mol ⁻¹
Punto de fusión	196-198°C
Solubilidad en agua	0.13% también es soluble en metanol y etanol
Dulzor	100-250 veces mayor que la sacarosa

Fuente (Gardana *et al.*, 2003)

3.2.4 Metabolismo de los principales GSv

Exposición: Oral, los glicósidos de steviol se ingieren en diferentes formas, como polvo (edulcorante comercial), concentrado líquido y como hoja seca en infusión.

Absorción: El STE tiene un alto PM (804.9 g/mol) al igual que rebaudiósido A PM (966 g/mol) por lo cual no pueden ser absorbidos en el intestino. Las enzimas digestivas de animales y humanos no tienen la capacidad de degradarlo (Koyama *et al.*, 2003a). Por otra parte la flora intestinal bacteriana (*Bacteroides* spp.) de ratas, ratones, cerdos (Gauns *et al.*, 2003) y humanos (Gardana *et al.*, 2003) tienen la capacidad de convertir el STE en su aglicona, el steviol.

Distribución: Steviol parece ser el mayor metabolito de GSV que aparece en la circulación sanguínea posterior la ingestión del producto. La circulación entero hepática de los metabolitos de steviol ocurre casi inmediatamente después de la ingesta oral del producto (Koyama *et al.*, 2003b).

Metabolismo: Estudios de metabolismo de stevia en animales y humanos demuestran que los GSV son pobremente absorbidos después de exposición oral siendo hidrolizados por la microflora en el colon a la aglicona de steviol (Awney *et al.*, 2011). Gran cantidad del steviol es absorbido, el resto es excretado vía fecal. Estudios posteriores llevados a cabo *in vivo* en ratas mostraron

productos conjugados de steviol en bilis, lo que sugiere que puede llevarse a cabo un proceso de conjugación (Fase II) en el hígado. Roberts & Renwick (2008) reportaron que el steviósido y rebaudiósido A son metabolizados a glucurónido de steviol en sistemas murinos.

Excreción: Las principales rutas de excreción del steviol glucurónido parecen ser los tractos biliar y urinario, aunque con diferencias si se trata de humanos o ratas. En ratas, la principal ruta de excreción es por vía biliar y fecal mientras que en humanos parece ser que se eliminan principalmente por vía renal como conjugados glucurónicos y/o sulfato (Geuns *et al.*, 2007).

3.3 Bioensayos

El efecto de los contaminantes en los organismos se valora mediante pruebas controladas de laboratorio conocidas como ensayos biológicos o "bioensayos", los cuales consisten en medir la toxicidad de los contaminantes ya sea en forma individual o en mezcla, sometiendo a algún ser vivo a distintas concentraciones de éstos (Eissa *et al.*, 2003; Moreno, 2003). Los ensayos en animales tienen múltiples ventajas. Una de ellas es que son realizados bajo condiciones rigurosamente controladas y se puede establecer una relación causal entre la exposición al agente y el efecto producido de forma concluyente (relación concentración- respuesta). Además, es posible identificar el mecanismo de acción de los tóxicos por el análisis del daño producido tanto a los animales de ensayo como a sus tejidos (Moreno, 2003). Los bioensayos se llevan a cabo frecuentemente en especies aisladas que se eligen considerando su distribución geográfica, su importancia ecológica y económica, la duración de su ciclo de vida, su talla máxima así como la sensibilidad de su respuesta (O'Connor, 1994; Espina & Vanegas, 1996). Los objetivos principales de los bioensayos son:

- 1) Predecir los efectos tóxicos agudos y subletales de los contaminantes en los ambientes acuáticos.

- 2) Comparar la sensibilidad de una o más especies a varios tóxicos o al mismo.
- 3) Establecer la toxicidad de las sustancias y de los efluentes.
- 4) Proporcionar elementos para la regulación de las sustancias evaluadas.

3.4 Bioindicadores

Los ecosistemas son complejos, multivariados y, simultáneamente, están expuestos a una variedad de estresores con efectos acumulativos que son pobremente entendidos; condiciones difíciles de reproducir en pruebas con animales de laboratorio para determinar la calidad del agua de distintas procedencias. En cambio, un indicador biológico es característico de un medio ambiente que cuando mide, cuantifica la magnitud del estrés, las características del hábitat y el grado de exposición del estresor o el grado de respuesta tóxica a la agresión (Lanza *et al.*, 2000).

El concepto de bioindicador aplicado a la evaluación de la calidad del agua, es definido como: "especie (o ensamble de especies) que poseen requerimientos particulares con relación a uno o a un conjunto de variables físicas o químicas, tal que los cambios de presencia/ausencia, número, morfología o de conducta de esa especie en particular, indiquen que las variables físicas o químicas consideradas, se encuentran cerca de sus límites de tolerancia" (Rosenberg & Resh, 1993). Es decir, que un bioindicador es aquel cuyas respuestas biológicas son observadas frente a una perturbación ecológica y están referidos como organismos o sistemas biológicos que sirven para evaluar variaciones en la calidad ambiental. El empleo de bioindicadores en diversos países está enfocado no sólo a medir la salud del ecosistema acuático, sino también para determinar el impacto potencial al ámbito humano, especialmente el económico (Lanza *et al.*, 2000).

Los cambios en la composición química de los ambientes acuáticos naturales pueden afectar a los organismos no-objetivo, particularmente los peces. Es por ello que estos organismos han sido ampliamente utilizados para evaluar la calidad de los ambientes acuáticos como bioindicadores de

contaminantes en el medio ambiente, empleándose por lo general especies de importancia comercial y amplia distribución geográfica (Peakall *et al.*, 1993; Adams & Greeley, 2000), tales como *Cyprinus carpio*.

3.5 *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758)

3.5.1 Importancia de la carpa común en México

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

En México el sector pesquero continental ha sufrido cambios a lo largo de los años; insaturación de centros federales de producción de crías, inversión privada, construcción de presas, impulso a la investigación, introducción y/o explotación de nuevas especies, desarrollo e implementación de instrumentos normativos para la administración de recursos, organización y capacitación de pescadores, entre otros (Rojas-Carrillo & Fernández- Méndez, 2006).

3.5.2 Estadísticas de producción de carpa común en México

De acuerdo con el Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2015 se produjeron en México cerca de 44 TON de carpa siendo los principales estados productores: Estado de México (20.8%), Jalisco (16.5%), Hidalgo (12.51%), Tamaulipas (11.1%) y Michoacán (10%). En la figura 3 se muestra la producción de carpa común en los principales estados productores del país en el año 2015 de acuerdo al Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca.

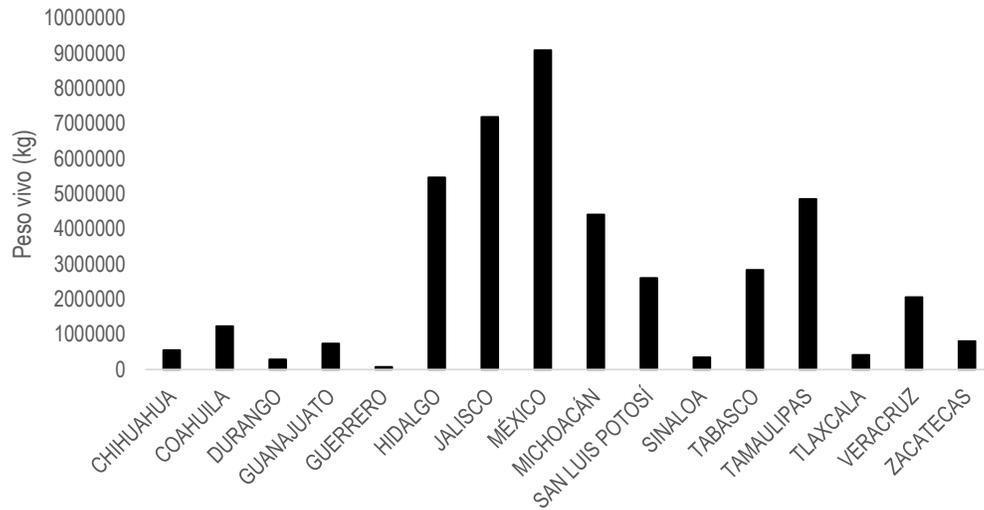


Figura 3. Gráfica de producción de carpa en México 2016, Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2016

Fuente: (SAGARPA, 2016)

En el año 2016 el Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca reportó la producción nacional de carpa común con un valor comercial total de 350 millones de pesos situándola como una de las especies dulceacuícolas de mayor importancia económica en el país. En la **figura 4** se observan los principales estados productores y su aportación económica en términos de producción.

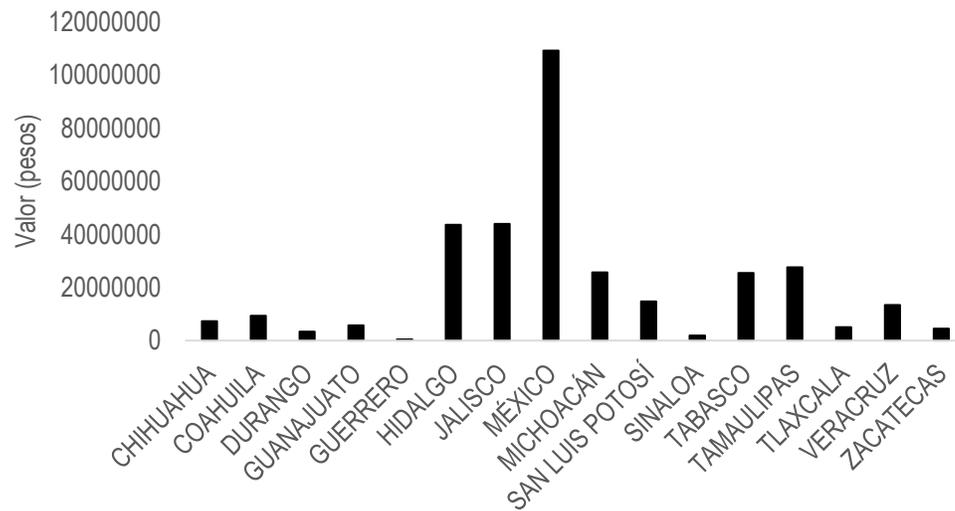


Figura 4. Gráfica de valor económico de carpa en México 2016, Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca 2016.

Fuente: (SAGARPA, 2016)

3.5.3 Características generales de *Cyprinus carpio* carpa común (Lanza *et al.*, 2000; Arredondo-Vargas *et al.*, 2009)

Orden Cypriniformes

Familia *Cyprinidae*

Especie *Cyprinus carpio*

Nombre común: Carpa común

Origen: Introducida

Características: peces de cuerpo robusto, poco comprimido, ligeramente curvado en el vientre boca grande y protráctil con dos pares de barbillas en la boca, uno sobre el labio superior y el otro



Figura 5. Carpa común *Cyprinus carpio*

en las comisuras de los labios, posee dientes faríngeos. Aletas pectorales en posición casi ventral, aletas pélvicas en posición posterior a estas. Cuerpo cubierto por escamas gruesas, grandes y lisas.

Coloración: la coloración es variable, los adultos son generalmente de color verde olivo y blanco-amarillento en el vientre.

Talla: alcanza de 29 cm hasta 70 cm de longitud total y un peso máximo de 9 kg.

Hábitat: Dulceacuícola, vive en aguas templadas de ríos, arroyos, estanques y embalses, generalmente en cuerpos de agua con fondo fangoso, abundante vegetación sumergida del tipo lirio acuático.

Biología: las carpas alcanzan su madurez sexual entre los 18 meses y dos años de vida, dependiendo de la temperatura de la región. Es un desovador parcial, tiene dos o tres desoves en intervalos de 14 días. Su fecundidad relativa es de 100,000 huevos a 300,000 huevos por kilogramo de peso. Se reproducen durante casi todo el año, madurando primero los machos. En condiciones naturales la hembra deposita los huevos, que son transparentes o amarillos, en varias capas adheridas a un sustrato vegetal, donde son cuidadas por el macho. Los adultos habitan zonas templadas, profundas, de flujo lento, lagos y ríos con gran cantidad de vegetación. Altamente tolerantes a una variedad de condiciones pero en general tienden a encontrarse en un hábitat idóneo cuando se encuentran en grandes cuerpos de agua

Tipo de alimentación: omnívoro, con predominancia bentófago. Por su forma de alimentación, basada en la remoción de sedimentos, incrementa la turbidez en el medio, pudiendo causar serios problemas en el sistema.

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

Distribución: es una especie originaria de Asia, introducida a México, actualmente se encuentra en casi todos los cuerpos de agua dulce.

Importancia: es importante por su alta producción y buen alimento a bajo precio. Se consume de manera local y regional.

Arte de pesca: chimorro, red de arrastre, anzuela, antarraya y red agallera.

3.5.4 Composición nutricional de la carpa común

La carpa presenta un contenido graso de algo más de 5 g 100 g⁻¹ de porción comestible, por lo que se engloba dentro del grupo de pescados semigrasos; además de poseer proteínas de alto valor biológico. Su contenido vitamínico (algunas del complejo B: B2, B6, B12 y Vitamina E) representa cantidades poco significativas; sin embargo, la vitamina A está presente en cantidades destacadas en relación con el resto de pescados. En cuanto a los minerales, la carpa es uno de los pescados más ricos en hierro, aunque su valor se encuentra por debajo del valor presentado por carnes de animales terrestres. En relación con el fósforo, es el pescado más rico en este mineral, sólo por debajo del pez espada (Miranda, 2011). La composición química de la carne de carpa común se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Composición química de la carpa común en 100 g de porción comestible

Elemento	Porcentaje (%)
Humedad	77.7
Grasa	4.2
Proteína	15.1
Cenizas	1.2

Fuente (Miranda, 2011)

3.6 Biomarcadores

Un método para cuantificar la exposición a xenobióticos y su posible impacto en las diferentes especies es el uso de procedimientos de monitorización biológica por medio de biomarcadores (Gil, 2000). Los biomarcadores son parámetros morfológicos, fisiológicos o bioquímicos que se pueden medir en los organismos y que varían cuando un determinado organismo se expone a un tóxico particular. Los biomarcadores se pueden clasificar en tres tipos principales (van der Oost *et al.*, 2003; Magnarelli, 2015):

1) Biomarcador de exposición se trata de la detección y medición de sustancias exógenas, sus metabolitos o los productos de interacción entre agentes xenobióticos y algunas moléculas o células objetivo medidos en un compartimiento dentro de un organismo.

2) Biomarcador de efecto indica cambios a nivel celular, tales como la expresión alterada de enzimas (estrés oxidativo EO) y marcadores de cambios patológicos, inespecíficos para el agente en cuestión. Incluye la determinación de alteraciones bioquímicas, fisiológicas u otro tipo dentro de los tejidos o fluidos corporales de un organismo que pueden ser asociadas con una posible causa de deterioro de la salud o enfermedad.

3) Los biomarcadores de susceptibilidad indican una capacidad constitutiva de un individuo para responder a exposiciones específicas. Indican la capacidad inherente o adquirida de un organismo para responder a la exposición a sustancias xenobióticas específicas, incluyendo factores genéticos y cambios en receptores que alteran la susceptibilidad de un organismo a una exposición.

Los ambientes acuáticos son uno de los más afectados por la contaminación ambiental debido a la descarga continua de tóxicos a los cuerpos de agua, ya sea por proximidad al sitio de uso, derrames accidentales o deriva de agroquímicos. Existen numerosas evidencias que indican que muchos de estos agentes contaminantes, al llegar a los cuerpos de agua, son absorbidos por los organismos que allí habitan y pueden desencadenar en ellos el proceso de EO (Fassiano *et al.*, 2013). Algunos contaminantes (hidrocarburos aromáticos policíclicos y halogenados, metales pesados, herbicidas y disolventes) son capaces de originar un daño oxidativo en el organismo. En respuesta a dicho EO, se desencadenan mecanismos adaptativos a través de sistemas de protección cuantificados habitualmente en plasma que incluyen la razón glutatión oxidado (GSSG)/glutatión reducido (GSH) y las actividades glutatión reductasa, catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa. Las macromoléculas que pueden resultar afectadas incluyen a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Di Giulio *et al.*, 1989).

3.7 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo (EO) es el resultado de una disparidad entre las especies reactivas de oxígeno (ERO's) tales como los **radicales** hidroxilo o las especies reactivas de nitrógeno (ERN's) como el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y la habilidad de las células para detoxificar los **RL** reactivos. Los **RL** son moléculas altamente reactivas que producen daño oxidativo. El EO es generado por especies químicas que contienen un electrón desapareado en su capa de valencia generadas como resultado de lisis celular, respiración oxidativa o por la presencia de un exceso de metales de

transición libres (Fang *et al.*, 2009). Gran cantidad de xenobióticos pueden causar EO llevando a la generación de ERO's y alteraciones en los sistemas enzimáticos eliminadores de **RL** en organismos acuáticos (Livingstone, 2001).

El EO es un estado alterado de la homeostasis intracelular de óxido-reducción, esto significa la existencia de un desbalance entre sustancias prooxidantes y las defensas antioxidantes tanto endógenas como exógenas. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de ERO's y/o por la deficiencia en los mecanismos antioxidantes (Ríos, 2003), teniendo como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado, pudiendo generar con ello daño celular (Venero, 2002).

3.7.1 Radicales libres

Los RL son moléculas electrofílicas que poseen en su estructura atómica uno o más electrones no apareados (ocupan una órbita atómica o molecular por sí mismos), pueden existir de forma independiente y debido a la inestabilidad de su configuración electrónica, aumentan su reactividad como consecuencia de la tendencia del electrón desapareado a adquirir un segundo electrón en su orbital y con ello conseguir una configuración electrónica estable (Casado, 2006). Dicha reactividad es la base de su toxicidad, baja especificidad y su corta vida media (del orden de microsegundos) (Rendón, 2005; Boots *et al.*, 2008; Mitjavila *et al.*, 2012).

Una de las principales características de los RL es que debido a su inestabilidad tienden a iniciar reacciones en cadena, reacciones autopropagadoras, en las cuales un radical reactivo origina un producto que también posee cierto grado de inestabilidad (reactividad) y que a su vez reacciona para producir más radicales. Este tipo de reacciones se componen de tres fases principales, **iniciación** generada a partir del contacto de un RL con una molécula oxidable, **propagación** en

la cual se generan especies radicales a partir de la oxidación de las moléculas y una última fase, **terminación**, en la cual dos compuestos radicales reaccionan entre sí para generar una especie no radical (Casado, 2006).

Los RL, compuestos electrofílicos que se forman *in vivo* dentro de la célula son altamente oxidantes, poseen la capacidad de oxidar macromoléculas biológicas nucleofílicas como carbohidratos, aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos produciendo con ello alteraciones estructurales y/o funcionales que en casos extremos pueden llevar a la muerte celular (Venero, 2002). Los RL tienen la propiedad de reaccionar con una gran variedad de especies químicas, ya que participan en un amplio rango de funciones biológicas, en especial en la señalización celular (NO), muerte celular programada (apoptosis), proliferación celular, diferenciación celular, metabolismo, reacciones inflamatorias, enzimología (unidos a proteínas en el mecanismo de una variedad de reductasas, peroxidasas, catalasas y oxidasas) (Casado, 2006; Konigsberg, 2008; Quintanar & Calderón, 2009).

Los RL más importantes de las células aerobias son el oxígeno singulete, el anión súper óxido, los radicales de hidroxilo y los metales de transición (Venero, 2002).

Por su importancia biológica los radicales libres se pueden clasificar en (Rendón, 2005; Quintanar & Calderón, 2009)

- A) Especies reactivas de oxígeno: Oxígeno molecular (O_2), oxígeno singulete (O_2^1) y ozono (O_3), así como especies parcialmente reducidas, anión superóxido (O_2^-), radical hidropéroxilo (HO_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($\cdot OH$). Dichas especies se generan a partir de la ruptura y/o excitación del oxígeno molecular y por su naturaleza altamente electrofílica son más reactivos que este.
- B) Metales de transición: los metales de transición como (Fe, Mn, Co, Ni y Cu) poseen la característica de alcanzar la estabilidad por sí mismos sin reaccionar con otro elemento al

utilizar a los electrones que se encuentran en las capas de valencia internas en un fenómeno llamado transición electrónica. Por su naturaleza este tipo de elementos poseen electrones desapareados por lo que pueden desencadenar reacciones de óxido-reducción funcionando como radicales libres.

- C) Otros radicales libres: radicales libres de nitrógeno ($\text{NO} \cdot$), dióxido nítrico ($\text{NO}_2 \cdot$), los primeros de importancia fisiológica como neurotransmisión y neuroregulación, agregación plaquetaria y coagulación sanguínea pueden ser altamente oxidantes cuando se encuentran en concentraciones mayores que las defensas antioxidantes, al encontrarse en presencia de anión superóxido genera el peroxinitrito ($\text{ONOO} \cdot$)

Las ERO's y los NO_x son generados y regulados de forma estricta por enzimas entre las que podemos encontrar la NADPH oxidasa y la NO sintasa respectivamente. Cantidades excesivas de ERO's pueden producirse por fuentes poco reguladas como la cadena de transporte de electrones en la mitocondria celular o por estimulación enzimática (Dröge, 2012). Dicha producción de ERO's se genera por la reducción parcial del oxígeno. Estudios alrededor del mundo han apuntado a la generación de ERO's como consecuencia de la exposición a contaminantes ambientales tales como plaguicidas, metales, bifenilos policlorados, hidrocarburos, entre otros.

3.7.2 Especies reactivas de oxígeno

En los sistemas vivos, se genera una gran variedad de RL, siendo los más conocidos los radicales de oxígeno. El nombre colectivo Especies Reactivas de Oxígeno (ERO's) es utilizado para referirse a las especies derivadas del oxígeno, incluyendo tanto a las especies radicales como a las especies no radicalarias, que son moléculas oxidantes y/o fácilmente convertibles en radicales.

De forma análoga existen Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN's), cloro (ERCl) y Bromo (ERBr) (Halliwell, 2006).

Las principales especies reactivas de oxígeno son el radical superóxido $O_2^{\cdot-}$, el peróxido de hidrógeno H_2O_2 , y el radical hidroxilo $\cdot OH$. Una de las principales fuentes de producción de ERO's es la cadena respiratoria. En ella aproximadamente el 3% de los electrones provenientes de NADH, debido a la incompleta reducción del oxígeno, se desvían a la producción de ERO's. Por otra parte el H_2O_2 puede reaccionar con metales divalentes libres o unidos a proteínas para producir $\cdot OH$ a través de la reacción de Fenton. Los compuestos o especies de oxígeno reactivo son moléculas altamente reactivas que interactúan con macromoléculas esenciales tales como DNA, proteínas y lípidos lo cual conduce a la alteración en distintos procesos fisiológicos (Cnubben *et al.*, 2001).

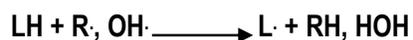
Otras fuentes endógenas de ERO's en las células son las enzimas oxidativas como triptófano dioxigenasa, xantino oxidasa y la CYP450 reductasa, que pueden producir ($O_2^{\cdot-}$), mientras que la enzima guanidinciclasa y glucosa oxidasa generan peróxido de hidrógeno. Los contaminantes son una fuente importante para la generación de ERO's en los organismos, tal es el caso de los metales de transición, herbicidas, quinonas y compuestos nitroaromáticos., conocidos ampliamente por la generación de EO (Valavanidis *et al.*, 2006).

3.7.3 Efectos del estrés oxidativo sobre biomoléculas

3.7.3.1 Daño a lípidos

Las membranas fosfolipídicas de los organismos aerobios se encuentran continuamente sujetas a condiciones oxidantes generadas a partir del contacto con agentes endógenos y/o exógenos, dicho contacto genera pérdida de su estructura y funcionalidad, representando una constante amenaza para la integridad celular. El proceso de oxidación lipídica se compone de una serie de reacciones en cadena, especialmente para los ácidos grasos insaturados (Valavanidis *et al.*, 2006) cuyo hidrógeno alílico presenta una menor energía de enlace con el carbono y por lo tanto una mayor facilidad de abstracción por parte de ERO's.

Etapas de iniciación: etapa primaria durante la cual un ácido graso poliinsaturado es atacado por una ERO capaz de abstraer un átomo de hidrógeno de un grupo metileno (carbono alílico). El metileno a su vez se convierte en un radical centrado al carbono que se estabiliza mediante un rearrreglo molecular que da origen a un dieno que reacciona con oxígeno molecular formando así el radical peroxilo



Etapas de propagación: en presencia de oxígeno molecular, la molécula que ha sufrido la abstracción del hidrógeno convirtiéndose en un radical buscará estabilizarse a partir de la abstracción de un hidrógeno de una molécula de ácido graso adyacente generando con ello una reacción en cadena a través de la membrana celular



Etapas de terminación: esta etapa es resultado de la interacción de los radicales lipídicos y/o la formación de especies no radicales a partir de los radicales peroxilo. Los peróxidos lipídicos

(LOOH) pueden descomponerse generando aldehídos y cetonas, especialmente malondialdehído (Valavanidis *et al.*, 2006)

3.7.3.2 Efectos de lipoperoxidación

In vivo la reacción de RL generados a partir de la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados entre sí pueden formar dímeros por entrecruzamiento o pueden ciclarse, creando aglomerados que conducen a la disminución de la fluidez y de la permeabilidad de la membrana, modificando su estructura y con ello la función de las células y de los tejidos. De manera indirecta los productos de lipoperoxidación pueden reaccionar con otras biomoléculas y generar todo tipo de daños a la célula (Konigsberg, 2008).

La especies reactivas de oxígeno generadas a partir de la oxidación de lípidos como los radicales peroxilo (ROO·) son iniciadores potenciales de la carbonilación de proteínas (Estévez, 2011). Estudios llevados a cabo por Park *et al.* (2006) demuestran que al incubar proteínas miofibrilares (PM) con ácido linoleico y lipooxidasas se generan una serie de cambios bioquímicos entre ellos la formación de compuestos carbonilados. La oxidación lipídica inicia con mayor velocidad que la oxidación proteica por lo tanto es más probable que los productos radicales derivados de lípidos y los hidroperóxidos promuevan la oxidación de proteínas que el fenómeno contrario (Estévez, 2011). Estévez *et al.* (2008) han concluido que la pérdida de la fluorescencia del triptófano de las proteínas miofibrilares como resultado de un proceso de oxidación se considera como una de las etapas primarias de dicho fenómeno, coincidiendo con la máxima producción de hidroperóxidos. Los productos de lipoperoxidación pueden producir aductos con ADN aumentando con ello la posibilidad de generar mutaciones y alteraciones en la expresión genética.

3.7.3.4 Daño a proteínas

El EO se produce a raíz de un desequilibrio entre la formación y la destrucción de las especies reactivas del oxígeno. Una forma indirecta de determinar la existencia de EO es la medida de los productos derivados de la reacción de las especies reactivas del oxígeno con biomoléculas (Irazusta *et al.*, 2008). Se cree que la oxidación de proteínas se genera vía reacciones en cadena de RL similares a las presentadas durante la oxidación de lípidos sin embargo en las primeras se presenta un mayor grado de complejidad en las rutas y un número mayor y más complejo de productos de oxidación (Hagerman, 2003)

En este sentido, la formación de grupos carbonilo en las proteínas ha sido uno de los marcadores de EO más estudiados debido a su estabilidad y fácil detección (Irazusta *et al.*, 2008). La carbonilación es generalmente reconocida como una de las modificaciones químicas más importantes en las proteínas oxidadas. Las proteínas se modifican oxidativamente al ser uno de los blancos principales de las ERO's. Ello conlleva modificaciones estructurales que, en general, suponen la pérdida total o parcial de su función (Levine *et al.*, 1994; Tamarit *et al.*, 1998; Dalle-Donne *et al.*, 2006).

La oxidación de proteínas es un fenómeno complejo ya que los mecanismos y la naturaleza de los productos dependen tanto de las proteínas objetivo como la forma en la que comienza dicha oxidación.

Yeh *et al.*, (2000) mencionan los siguientes potenciales precursores y/o catalizadores iniciadores de la oxidación de proteínas:

A) ERO's

- B) Presencia de pigmentos heme
- C) Metales de transición
- D) Productos de oxidación de lípidos
- E) Enzimas oxidasas

La cadena peptídica y los grupos funcionales localizados en las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos son objetivos comunes de las ERO's (Estévez, 2011).

Etapas del proceso general de oxidación de proteínas (Stadtman & Levine, 2003):

Iniciación: como consecuencia directa de la abstracción de un átomo de hidrógeno de una proteína susceptible (PH), se forma un radical de proteína centrado al carbono (P·)



Propagación: el radical de proteína P· es consecuentemente convertido en un radical peroxilo POO· en presencia de oxígeno, y en un radical alquilperóxido (POOH) debido a la abstracción de un átomo de hidrógeno adyacente de una molécula susceptible.



Reacciones posteriores con ERO's como el radical hidroperoxilo HO₂· o con formas reducidas de metales de transición (Mⁿ⁺) como Fe²⁺ o Cu⁺ forman el radical alcóxido (PO·) y su derivado hidroxilado (POH)



Las rutas específicas y la naturaleza química de los productos finales de oxidación dependen de la molécula objetivo, el sistema de oxidación y la intensidad de las condiciones de oxidación (Davies, 2003)

3.7.3.5 Efectos de la oxidación de proteínas

Formación de grupos carbonilo

La oxidación proteica llevada a cabo por ERO's tiene su origen en el daño provocado por los RL como superóxido (O_2^*), hidroxilo (OH^*), peróxido (RO_2^*), alcóxido (RO^*), hidroperoxilo (HO_2^*) y especies no radicalarias como peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO), ozono (O_3), oxígeno singulete (1O_2) y peroxinitrito ($ONOO^-$) (Berlett, 1997; Halliwell, *et al.*, 2006). Los grupos carbonilo (CO), son producidos en las cadenas laterales de las proteínas (especialmente Pro, Arg, Lys y Thr) cuando son oxidadas. Los derivados de proteínas carboniladas pueden ser originados mediante la oxidación de las proteínas ya sea por la vía de la α -amidación o por la oxidación de las cadenas laterales de los aminoácidos, llevando a la formación de un péptido en el cual el grupo N-terminal del aminoácido se presenta bloqueado por un derivado α -cetoacil (Berlett, 1997). Adicionalmente, los grupos CO pueden ser introducidos a las proteínas por la reacción secundaria de las cadenas laterales nucleofílicas de los residuos de cisteína, histidina y lisina con aldehídos (4-hidroxi-2-nonenal, malondialdehído, 2-propenal (acroleína) producidos durante la peroxidación lipídica o con derivados carbonilo reactivos (cetoaminas, cetoaldehídos, deoxisonas) generadas como consecuencia de la reacción de azúcares reductores, o la oxidación de productos con residuos de lisina de las proteínas (reacciones de glicación y glicooxidación), con la eventual formación de productos finales de glicación/lipoperoxidación avanzada (AGE's/ALE's), esto es, los productos de glicooxidación, tales como carboximetilisina y pentosidina, y productos de lipoperoxidación como malondialdehído-lisina y el aducto de proteína 4-hidroxi-nonenal (Berlett *et al.*, 1997; Stadtman *et al.*, 1997; Uchida, 2000; Halliwell *et al.*, 2006). El contenido de proteínas carboniladas es el mayor indicador y por mucho el marcador más común del proceso de oxidación de proteínas y su acumulación se ha observado en enfermedades como

Alzheimer, diabetes, inflamación intestinal, artritis, entre otros (Chevion, 2000; Halliwell *et al.*, 2006).

Pérdida de grupos sulfhidrilo

El grupo tiol (SH) de algunos aminoácidos es altamente susceptible a la oxidación en presencia de peróxido de hidrógeno el cual se forma en las células como consecuencia de procesos enzimáticos antioxidantes (ej. superóxido dismutasa) o en los procesos *post mortem* (Lund, 2011). La oxidación de los grupos tiol genera una serie de reacciones complejas que resultan en la formación de productos como ácido sulfénico (RSOH), ácido sulfínico (RSOOH) y productos de entrecruzamiento como cistina (RSSR) los cuales pueden modificar la estructura proteica así como su funcionalidad y digestibilidad.

Formación de entrecruzamientos de proteínas

El entrecruzamiento intra e intermolecular de las proteínas del músculo involucra la formación de una variedad de productos de entrecruzamiento derivados del proceso de oxidación y la subsecuente polimerización de proteínas. Dentro de estos productos de entrecruzamiento se pueden encontrar la cistina producto de la unión de dos cisteínas con la consecuente pérdida del grupo tiol y la ditirosina (Lund *et al.*, 2008) formada a partir de la oxidación de la tirosina a través de la formación de un radical tirosil fenoxilo estabilizado por resonancia (Davies, 2003).

3.7.3.6 Daño a ADN

El daño oxidativo al ADN se refiere a las alteraciones funcionales o estructurales provocadas por ERO's al material genético. Modificaciones en las bases púricas y pirimídicas, así como ruptura de la cadena de ADN son las principales formas de daño oxidativo a esta biomolécula. Generalmente el daño celular es precedido por alteraciones bioquímicas que afectan a los mecanismos o sistemas básicos de supervivencia de la célula. Dicha alteración puede generar modificaciones o anomalías en los tejidos, que a su vez integran órganos, cuya función se verá seriamente comprometida, como ejemplo de esto se encuentran las alteraciones en la síntesis de proteínas provocadas por el deterioro en el material genético (Vindas *et al.*, 2004)

De forma natural y continua, se producen en la célula fenómenos como la desaminación de la citosina y su conversión en uracilo, la conversión de la 5-metilcitosina en timina, pérdida de bases, ruptura de una o las dos hebras del ADN, entrecruzamiento de proteínas-ADN, intercambio de cromátidas hermanas y daño a la estructura de desoxirribosa-fosfato, sin embargo dichos eventos ocurren a tasas muy bajas y la célula cuenta con mecanismos de reparación para dicho daño (Hansberg, 2002). El radical hidroxilo OH^* se presenta como una de las moléculas que representa el mayor peligro para el material genético debido a su gran reactividad, su corta vida media que lo obliga a actuar en el sitio de formación, su capacidad de abstraer los átomos de hidrógeno de la molécula de ADN y la facilidad que posee para unirse a la bases para formar aductos (Königsberg, 2008).

La lesión más importante observada en el ADN después del ataque de una especie radical ampliamente utilizada como biomarcador de estrés oxidativo celular y genotoxicidad es la presencia de 8-hidroxi-2'- desoxiguanosina y su producto de oxidación 8-oxo-2'- desoxiguanosina (Irie *et al.*, 2003).

3.7.4 Antioxidantes

Mecanismos de defensa antioxidantes

De manera natural, durante los procesos metabólicos celulares normales se generan especies radicales debido al principio fundamental del funcionamiento celular basado en reacciones de óxido- reducción, dichas reacciones involucran la transferencia de electrones de una especie a otra produciendo RL que supondrían un verdadero peligro para las células si éstas no contaran con sistemas de defensa antioxidante. Un antioxidante se define como una molécula que posee una mayor afinidad que cualquier otra para interaccionar con un radical libre, es decir, se trata de una molécula capaz de prevenir la oxidación de otras moléculas (Hamid *et al.*, 2010). El antioxidante que interacciona con la especie radical cede un electrón oxidándose y transformándose en un radical libre no tóxico. Por su procedencia se pueden clasificar en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos y estos a su vez se clasifican en primarios o naturales, secundarios y terciarios (Oxilia, 2010)

Los antioxidantes primarios o naturales son aquellos que interrumpen reacciones en cadena generadas a partir de la oxidación de biomoléculas como lípidos o proteínas al reaccionar con los radicales formados como productos intermediarios o finales de dichas reacciones y convertirlos en productos más estables, se consideran el primer nivel de protección (Oxilia, 2010). Cuando el nivel de antioxidantes primarios ha sido rebasado, el organismo tiene un segundo nivel de protección. El papel de los antioxidantes secundarios es atrapar a los RL que se han formado, impidiendo así la iniciación de la cadena oxidativa o interrumpiendo su propagación, entre ellos se encuentran el ácido ascórbico, ácido úrico, bilirrubina, α -tocoferol, carotenoides, melatonina, estrógenos, entre otros. Cuando los dos sistemas anteriores no han sido suficientes y las biomoléculas ya han sufrido

un daño, las células cuentan con sistemas de reparación que incluyen enzimas encargadas de reparar de manera directa las biomoléculas a su conformación nativa.

Los antioxidantes más representativos incluyen los siguientes (Hurrell, 2003)

- a) Antioxidantes minerales: actúan como cofactores de enzimas antioxidantes. Entre ellos podemos encontrar selenio, cobre, hierro, zinc, magnesio, manganeso, etc.
- b) Vitaminas antioxidantes: tales como ácido ascórbico (vitamina C) y tocoferoles (vitamina E)
- c) Fitoquímicos: compuestos de naturaleza fenólica. Incluye a los flavonoides cuyos compuestos más representativos son las catequinas, carotenoides, licopenos, zeaxantinas y diterpenos encontrados en té verde, zanahorias, tomates, espinacas y ajo respectivamente.
- d) Endógenos: sistemas antioxidantes superóxido dismutasa SOD, catalasa CAT, glutatión transferasa GPxt, glutatión peroxidasa GPx.

En cuanto a su función, los antioxidantes se pueden clasificar en: antioxidantes de prevención, antioxidantes eliminadores de sustancias reactivas y sistemas enzimáticos de reparación. Los mecanismos de defensa ante las sustancias reactivas del oxígeno tienen dos procedencias: interna (enzimas antioxidantes) y externa (antioxidantes administrados mediante la dieta)

Como consecuencia de los procesos metabólicos normales en la célula, se produce una cantidad limitada de ERO's como productos de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Debido a esto, las células han desarrollado mecanismos de protección con base en un sistema de defensa muy complejo constituido por diversas enzimas (Formigari *et al.*, 2007).

Entre las primeras enzimas que brindan una defensa contra el O_2^- y H_2O_2 están la superóxido dismutasa SOD, la catalasa CAT y la glutatión peroxidasa GPx. La presencia y ubicuidad de dichas enzimas las cuales se encargan de eliminar productos secundarios de la vía univalente en las células aeróbicas sugieren que los aniones superóxido y el peróxido de hidrógeno son productos importantes del metabolismo oxidativo (Rybczynska, 1994).

Superóxido dismutasa (SOD)

La enzima superóxido dismutasa (SOD) es la primera línea de defensa antioxidante ya que cataliza la conversión del anión superóxido a peróxido de hidrógeno, esta enzima es una metaloenzima ya que tiene un metal de sitio activo para tener un mecanismo redox y de esa manera poder participar en las reacciones de dismutación. El zinc actúa como un estabilizador de la enzima y en su variedad mitocondrial contiene manganeso en el sitio activo.



Reacción de superóxido dismutasa

El producto de la reacción es el peróxido de hidrógeno, compuesto que resulta ser extremadamente tóxico para la célula (Voet *et al.*, 2002).

Catalasa (CAT)

El peróxido de hidrógeno H_2O_2 es considerado un oxidante fuerte y potencialmente dañino que reacciona de forma casi inmediata con la enzima CAT (Nelson & Cox, 2005). Esta enzima se

localiza en los peroxisomas y ejerce una función doble, la primera de ellas consiste en la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua H₂O y oxígeno O₂, la segunda consiste en la oxidación de donadores de protones como el metanol, etanol, ácido fórmico, fenoles, entre otros. La enzima contiene hematina la cual facilita la conversión del peróxido de hidrógeno H₂O₂ (Valko *et al.*, 2006; Formigari *et al.*, 2007).

3.8 Carne de pescado

El papel del pescado como parte de nuestra dieta sana estriba en su aporte de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA), en sus proteínas con alto contenido de aminoácidos esenciales y de minerales, vitaminas y compuestos nitrogenados, que contribuyen a su alta calidad nutricional. Desde el punto de vista tecnológico, ciertos componentes del pescado, como las proteínas, presentan una mayor funcionalidad que los hace altamente deseables al elaborar determinados tipos de productos transformados. El contenido de proteína de pescado está influenciado por el contenido de grasa y agua. En general la carne magra tiene un mayor contenido de proteína, mayor valor culinario y mejores condiciones cualitativas de mantenimiento, debido al bajo nivel de grasas insaturadas. El contenido de proteínas en el pescado también varía con el contenido de agua; por eso, es deseable expresar el contenido de proteína de pescado en términos de materia seca (Guerrero *et al.*, 2009)

3.8.1 Generalidades del pescado

Tejido muscular del pescado

El **músculo** de pescado se clasifica en dos tipos principales, el **músculo** oscuro (rojo) y el **músculo** blanco dependiendo del ciclo de vida de la especie en cuestión. Peces como el atún o la caballa que poseen un tipo de nado intensivo tienen una porción de **músculo** oscuro relativamente mayor a aquellas especies como la carpa común o bacalao cuyo tipo de nado es lento. Ambos tipos de **músculo** son esencialmente similares en su composición, sin embargo, el **músculo** rojo posee un mayor contenido de pigmentos heme (mioglobina) encargada del transporte de O₂ y mayor cantidad de lípidos no estructurales, características que permiten un mayor aporte de energía necesaria para la actividad natatoria de los organismos.

El tejido muscular del pez está compuesto por (Guerrero *et al.*, 2009; Hall, 2012):

A) **Músculo estriado** cuya unidad funcional es la célula o fibra muscular. La disposición de las fibras obedece a su necesidad de flexionar el cuerpo para la propulsión en el agua.

La masa muscular de cada lado del pez forma un filete, la parte superior del filete se denomina músculo dorsal y la parte inferior es el músculo ventral.

Las fibras musculares de pescado tienen los componentes típicos: sarcolema, miofibrillas contráctiles, fluido celular o sarcoplasma y organelos.

Las miofibrillas ocupan un volumen considerable de la célula y son responsables de los cambios en la capacidad de retención de agua del músculo.

B) **Musculo esquelético** se encuentra formado por fibras musculares, células alargadas y estrechas.

C) **Músculo liso** tejido que rodea los órganos internos como los vasos sanguíneos, intestino, vesícula biliar que no están bajo el control voluntario.

3.8.2 Composición del músculo de pescado

Tipos de proteínas (Estrada, 2005; Guerrero *et al.*, 2009; Hall, 2012):

De acuerdo a su solubilidad en soluciones salinas las proteínas de pescado se dividen en:

- 1) **Proteínas sarcoplásmicas:** solubles en agua o soluciones de baja fuerza iónica, se encuentran en el plasma celular (citoplasma) y actúan como acarreadores de oxígeno (hemoglobina), globulinas o enzimas. Comprenden cerca del 18-20% del total de la proteína del músculo.
- 2) **Proteínas del tejido conectivo:** compuestas principalmente por colágeno y elastina, se encuentran rodeando a las fibras musculares y la piel como parte de una estructura denominada estroma, se trata de proteínas termolábiles que tienen una fuerte influencia en la textura de la carne de pescado. Representan del 3-10% de las proteínas totales y se solubilizan en soluciones de alta fuerza iónica.

- 3) **Proteínas miofibrilares:** también llamadas proteínas estructurales, representan entre 65-80% del total de proteína, proveen al músculo de su estructura fibrilar y permiten que se lleve a cabo el movimiento muscular. Se compone de cuatro estructuras proteínicas principales: actina, miosina, troponina y tropomiosina. Pueden solubilizarse a concentraciones salinas 0.3 M.

3.8.3 Cambios en la calidad de la carne de pescado

Como componente mayoritario del tejido muscular, las proteínas juegan un papel decisivo en cuanto a la calidad funcional desde el punto de vista tecnológico y nutricional de los productos cárnicos. Las modificaciones en la estructura nativa y/o integridad de las proteínas musculares como resultado de la desnaturalización y/o proteólisis sufrida en las diferentes etapas de procesamiento de cárnicos desde la obtención de la materia prima hasta su transformación pueden afectar de forma decisiva a la calidad del producto modificando aspectos como la textura (Kemp *et al.*, 2010), color (Kazemi *et al.*, 2011), aroma y sabor (Toldrá, 1998), capacidad de retención de agua y solubilidad (Van Laack *et al.*, 2000) y su funcionalidad biológica y biodisponibilidad (Ahmed & Muguruma, 2010).

La oxidación es una causa importante del deterioro de la calidad durante el procesamiento y almacenamiento de productos cárnicos. Las pérdidas en la calidad de la carne que sufre procesos de oxidación se caracterizan principalmente por deterioro en el sabor, decoloración, destrucción de nutrientes y la posible formación de productos tóxicos (Kanner, 1994).

Diversos estudios han puesto en evidencia que las proteínas musculares pueden ser modificadas por especies reactivas de oxígeno generadas vía lipoperoxidación, reacciones enzimáticas catalizadas por metales y otros procesos químicos y biológicos (Wolf *et al.*, 1986; Butterfield & Standtman, 1997) causando múltiples cambios fisicoquímicos como destrucción de aminoácidos, disminución en la solubilidad de las proteínas debido a la polimerización inter e intra-molecular, pérdida de actividad enzimática y disminución de la digestibilidad (Xiong, 2000).

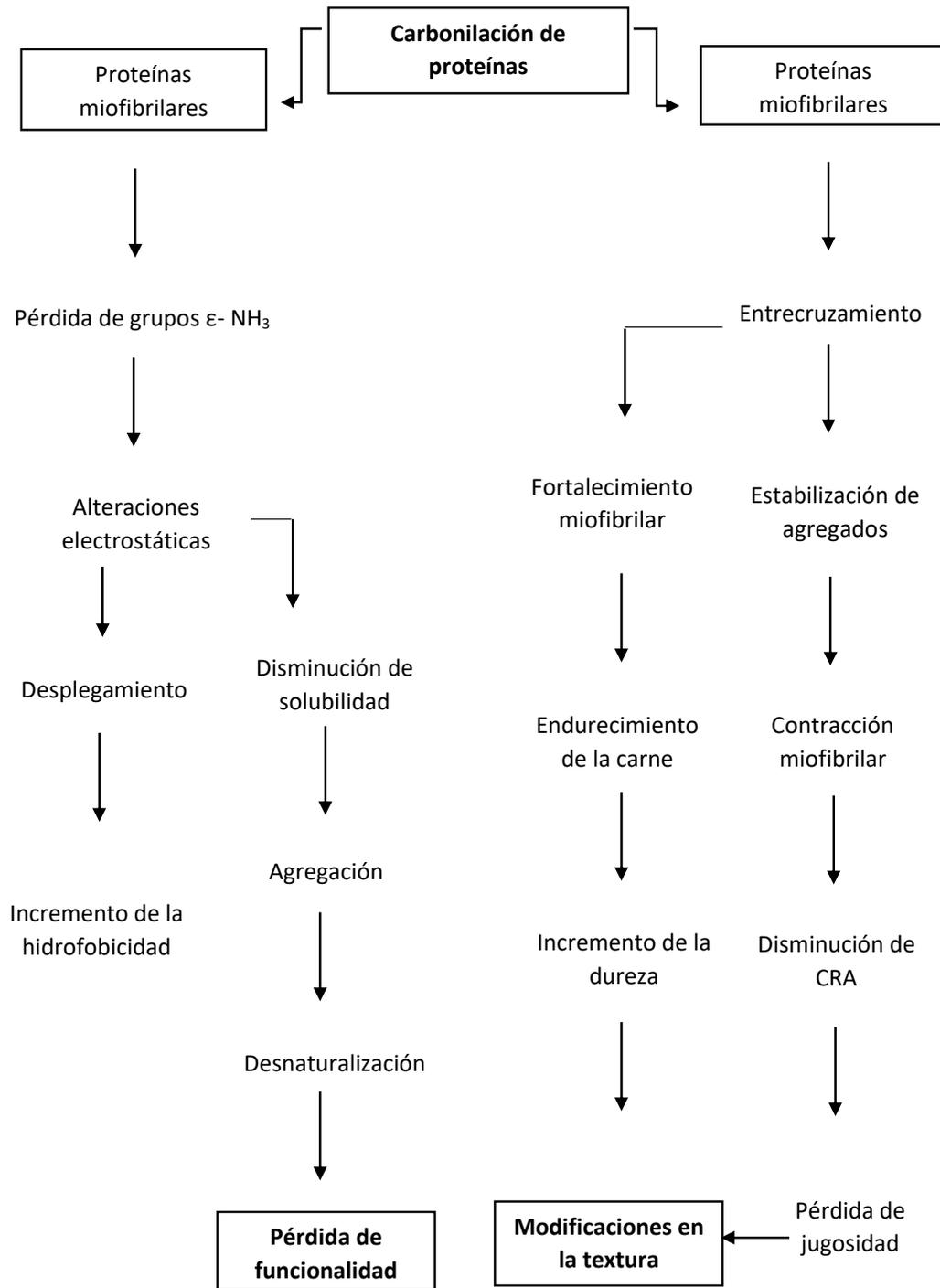


Figura 6. Posibles mecanismos a través de los cuales la carbonilación de proteínas puede afectar la calidad de los productos cárnicos

Fuente (Estévez, 2011)

Como se muestra en la Figura 6, las consecuencias de la oxidación de proteínas en la calidad de la carne ha sido asociada con cambios en la solubilidad, viscosidad y la funcionalidad de la proteína como propiedades de gelificación y emulsificación, así como capacidad de retención de agua (Lund, 2011).

3.9 Propiedades funcionales de las proteínas

La funcionalidad se refiere a las propiedades fisicoquímicas y de textura de las principales macromoléculas que constituyen el músculo de pescado, es decir, las proteínas miofibrilares. La calidad proteica puede ser determinada mediante el estudio de propiedades como solubilidad, capacidad de formación de geles, reacciones de intercambio sulfhidrido-disulfuro, capacidad de retención de agua, textura, entre otros (Guerrero, 2009).

Las propiedades de las proteínas se generan como resultado de la interacción de éstas con los demás componentes de la matriz alimenticia (iones, carbohidratos, lípidos, agua) y diversos fenómenos de superficie (Miranda, 2011). Las propiedades funcionales que son requeridas para un cierto tipo de proteínas varía dependiendo de las aplicaciones y los sistemas alimenticios en los que es requerida.

3.9.1 Propiedades de Solubilidad

La solubilidad se puede describir como el equilibrio existente entre las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas en una matriz alimenticia. Una definición más precisa de solubilidad indica que esta propiedad representa el porcentaje total de proteína muscular que permanece en solución bajo condiciones específicas y no es sedimentable bajo fuerzas moderadas de centrifugación, representando con ello el equilibrio entre el soluto (proteína) y el disolvente (Miranda, 2011). La

solubilidad de las proteínas está relacionada con otros parámetros como el pH (mínima en el punto isoeléctrico), haciendo del pH del entorno en el que se desempeña la proteína uno de los parámetros más importantes en cuestión de solubilidad. Gran cantidad de proteínas alimentarias son ácidas, por lo que exhiben una solubilidad mínima a pH de 4-5 (punto isoeléctrico), debido a la ausencia de repulsión electrostática. A pH alcalinos se presenta el pico de solubilidad (Fennema, 2000). La solubilidad también se ve influenciada por la temperatura y la fuerza iónica (Bolontrade *et al.*, 2013). Dichas variables afectan la solubilidad de las proteínas al causar modificaciones en las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas así como las interacciones presentes en la estructura molecular de la proteína (Miranda, 2011).

Las proteínas que han perdido sus propiedades naturales de solubilidad no son idóneas para ser utilizadas en alimentos y por lo tanto es importante que las alteraciones llevadas a cabo durante el procesamiento (por ejemplo la temperatura) sean altamente controlados para no modificar de forma negativa la calidad del producto (Raikos *et al.*, 2007)

3.9.2 Propiedades emulsificantes

La capacidad de **emulsión** de una proteína se define como la cantidad de aceite en mililitros, que es **emulsificado** bajo condiciones específicas por 1 gramo de proteína (Vera, 2010). Las **emulsiones** consisten en dos líquidos inmiscibles, donde uno de los líquidos es dispersado en el otro en forma de pequeñas gotas. Las **emulsiones** pueden clasificarse de acuerdo a la distribución de la fase oleosa y la fase acuosa. Un sistema donde las gotitas de aceite se dispersan en la fase acuosa es llamado **emulsión** aceite en agua (O/W). Sistemas alimenticios como la mayonesa, leche, crema, salsas y sopas son ejemplos de dichas **emulsiones**. Por otro lado existen las **emulsiones** agua en aceite (W/O), **emulsiones** libres de agua y **emulsiones** múltiples.

Las gotas en la **emulsión** son llamadas la fase dispersante o interna, mientras que el medio líquido circundante se refiere a la fase continua o externa (McClements, 2005). La propiedad emulgente forma parte de un conjunto de propiedades funcionales, reagrupadas con el nombre de propiedades de “superficie” refiriéndose a la habilidad de la proteína de participar en la formación de una **emulsión** y su estabilización (Vera, 2010).

Es necesario que las proteínas cárnicas interactúen con el disolvente en el cual se encuentran, el cual es un sol, para que puedan desenvolverse como agentes **emulsificantes** frente a las grasas; es por esto que la existencia de la **emulsión** este subordinada a que las proteínas sean solubles en la fase dispersante (agua y sales disueltas) y que las proteínas sarcoplásmicas y miofibrilares jueguen un papel muy importante en la estabilidad de la emulsión (Fennema, 2000).

Es importante mencionar que las moléculas que permiten la formación y estabilización de las **emulsiones** son esencialmente anfifílicas ya que poseen partes hidrofílicas e hidrofóbicas; si existe una modificación o alteración proteica no será idónea la interacción entre la proteína y las fases que forman la **emulsión** (Soderberg, 2013).

3.9.3 Propiedades de gelificación

De acuerdo a Ikeda & Nishiari (2001) la gelificación de proteínas es una de las propiedades funcionales más importantes cuando se trata de realizar modificaciones en la estructura o textura de los alimentos. Un gel se define como un sistema sustancialmente diluido que exhibe un flujo de estado no estacionario, formado por un entrecruzamiento de gruesas moléculas (polímeros) reticuladas por las uniones transversales (enlaces covalentes o no covalentes) formando una red inmersa en un líquido.

Para que se lleve a cabo la formación del gel es importante que los grupos funcionales (por ejemplo los grupos hidrofóbicos) dentro de la proteína se encuentren expuestos. Dicha exposición facilita la interacción de los grupos para formar la red tridimensional. La formación de los geles es un proceso complicado que se ve afectado por la concentración de proteína, la cantidad de agua, fuerza iónica, tiempo, temperatura, pH, así como las interacciones con los otros componentes del alimento (Raikos *et al.*, 2007)

El calor genera que la proteína nativa se desnaturalice pasando de estado sol a estado progel. 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 que continua al enfriarse (Fennema, 2000).

Después de la desnaturalización de la proteína y el calentamiento posterior las proteínas tienden a agregarse y a interactuar con otras proteínas para formar ya sea el gel o un coágulo

(dependiendo del peso molecular, el tiempo de calentamiento y la concentración de proteína)
(Raikos *et al.*, 2007)

Las proteínas globulares con pesos moleculares menores a 23 kDa, no pueden formar un gel inducido por tratamiento térmico, a ninguna concentración razonable de proteína, a no ser que contengan, por lo menos, un grupo sulfhidrilo o un enlace disulfuro. El pH óptimo para la formación de geles es de 7-8, para la mayor parte de las proteínas (Fennema, 2000).

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 (Fennema, 2000).

3.9.4 Capacidad de retención de agua (CRA)

La capacidad de retención de agua se define como la facultad que posee un producto cárnico de conservar el agua que le es propia o el agua añadida, bajo el efecto de una tensión cualquiera (Daudin & Bucharles *et al.*, 1991). El tejido muscular contiene un 75% de agua, en donde el principal responsable de la retención del agua es el componente proteico. La mayor parte de agua en el músculo se encuentra atrapada dentro de las miofibrillas.

Esta propiedad se ve afectada por varios factores ambientales como la concentración de iones, presencias de ATP, pH, temperatura, tipo de sales y la conformación proteica. Las proteínas exhiben su hidratación mínima a su punto isoeléctrico, al que las interacciones proteína-proteína

minimizan la interacción con el agua. Su importancia radica en estar directamente relacionada con la suavidad, la jugosidad y el color; depende del pH, los cambios postmortem y la presencia de sales (Fennema, 2000). Muchas de las propiedades sensoriales de la carne como son el color, la textura y la firmeza, están relacionadas con la cantidad de agua que se tiene contenida o retenida en la carne. Desde el punto de vista nutricional, una CRA baja resulta en pérdidas importantes de proteínas, minerales y vitaminas hidrosolubles contenidas en el agua que se pierde. Desde el punto de vista tecnológico, la capacidad de una carne para retener el agua originalmente contenida, así como el agua añadida durante el procesamiento, influye en la eficiencia del sistema y dicta en parte el rendimiento final del producto.

La CRA es influenciada (hasta cierto punto) por el pH del músculo, mientras más alejado este el pH del punto isoeléctrico de las proteínas del músculo, más agua se retendrá. Por ejemplo, en valores superiores a 5.8 de pH, se favorece la capacidad de las proteínas para ligar las moléculas de agua. Además del pH, otros factores que afectan la CRA, son la especie de la que proviene la carne, el tipo de fibra, la estabilidad oxidativa de sus membranas, el proceso de maduración, entre otros (Braña *et al.*, 2011)

3.9.5. Perfil de Textura

La totalidad de los productos acuícolas y marinos se encuentran íntimamente relacionados con aspectos gastronómicos, nutrimentales, de seguridad alimentaria, valor tecnológico y características sensoriales idóneas. En el comercio de carne de pescado existen dos aspectos esenciales para determinar la adquisición de un producto; la seguridad y la calidad sensorial medida a través de parámetros organolépticos como el aroma, sabor, color y la textura (Alasalvar

et al., 2011). La textura se define como la respuesta primaria de los sentidos táctiles a los estímulos físicos que resultan del contacto entre alguna parte del cuerpo y el alimento; dicha respuesta es medida a través de un grupo de propiedades físicas cuantificadas de acuerdo a diversos parámetros mecánicos y reológicos (Bourne, 2002). La organización estructural a nivel molecular, microscópico y macroscópico de la carne son los principales determinantes de la calidad textural del producto (Bourne, 2002). La textura del músculo de pescado puede pasar de suave, húmeda y succulenta a inaceptablemente firme, dura y seca. Las características negativas e inaceptables en el músculo de pescado pueden ser causadas por alteraciones sufridas en las proteínas miofibrilares (fragmentación, entrecruzamiento, entre otros) (Hui & Shekrat, 2005). Para que la textura sea evaluada correctamente se requiere de panelistas altamente entrenados. Cuando no se cuenta con panelistas entrenados, se puede hacer uso de análisis instrumentales alternativos (Alasalvar *et al.*, 2011)

El Análisis de perfil de textura (TPA) es un método útil para caracterizar las propiedades mecánicas, tanto de productos reestructurados a partir de músculo picado, como de productos gelificados (Bourne, 2002; Kim *et al.*, 2004). La identidad textural de los alimentos raramente puede ser descrita por un solo atributo como dureza o cohesividad, es por ello que el Análisis de Perfil de Textura es un método analítico que permite cuantificar múltiples atributos de textura en una sola medición.

Un pequeño cilindro de gel (aproximadamente 2cm de diámetro y 0.8cm de altura) se coloca sobre la plataforma de un texturómetro tipo prensa Instron, o similar. Sobre el mismo actúa un plato plano que lo comprime hasta una altura predeterminada. La determinación del perfil de textura involucra

dos compresiones sucesivas del material a una velocidad constante durante las cuales se registra la evolución de la fuerza como forma de imitación del proceso natural de masticación..

Los parámetros medibles en una muestra a través del Análisis de Perfil de Textura se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Análisis de Perfil de Textura (TPA)

Parámetro	Expresión	Cuantificación (2^a compresión)
Dureza	Fuerza máxima registrada durante la primera compresión	Misma
Dureza: Pico de fuerza registrado durante la primera compresión. La dureza no debería de registrarse en el punto de la compresión más prolongada, sin embargo ocurre de esta manera para la mayoría de los productos.		
Fracturabilidad	Fuerza registrada en el primer pico	Pico de fuerza registrado durante primera compresión
Fracturabilidad: se define como la fuerza en el primer quiebre significativo de la curva. No todos los productos poseen dicho atributo.		
Cohesividad	Área de trabajo durante la segunda compresión dividida por el área de trabajo durante la primera compresión	Área 2/ Área 1
Cohesividad: es definido como la razón del área positiva lograda durante la segunda compresión y del área positiva de la primera compresión (A2 /A1). Representa la resistencia del producto a una segunda deformación en relación con una deformación sufrida previamente.		

Elasticidad	La elasticidad se expresa como un ratio o porcentaje de la altura original del producto. La elasticidad puede ser medida de diversas formas, la más común de ellas es la relación entre la distancia de la altura detectada durante la segunda compresión dividida entre la distancia de compresión original	Distancia 2/ Distancia 1
Elasticidad: es definida como la altura que recupera el alimento durante el tiempo que transcurre entre la primera y la segunda compresión.		
Gomosidad	Utilizada para productos semi-sólidos. Se obtiene a partir del producto de la dureza por la cohesividad	Dureza * cohesividad Dureza * (Área 2/ Área 1)
Gomosidad: excluyente de la masticabilidad ya que un producto no puede ser semi-sólido y sólido al mismo tiempo.		
Masticabilidad	Gomosidad * Distancia 2/Distancia 1	Dureza * Cohesividad * Elasticidad
Masticabilidad: es definida como el producto de gomosidad por elasticidad (que es igual a dureza por cohesividad y por elasticidad). Aplica únicamente para productos sólidos.		
Resiliencia	Se calcula al dividir el aumento en la energía durante la primera compresión entre la disminución de energía durante la segunda compresión	Área 4 / Área 5

Resiliencia expresa que tanto el producto lucha para recuperar su altura original. La resiliencia se mide en la retirada durante la primera penetración, antes de que el periodo de espera entre compresiones inicie.

Fuente: An Overview of Texture Profile Analysis (TPA)

<http://texturetechnologies.com/texture-profile-analysis/texture-profile-analysis.php#section-01>

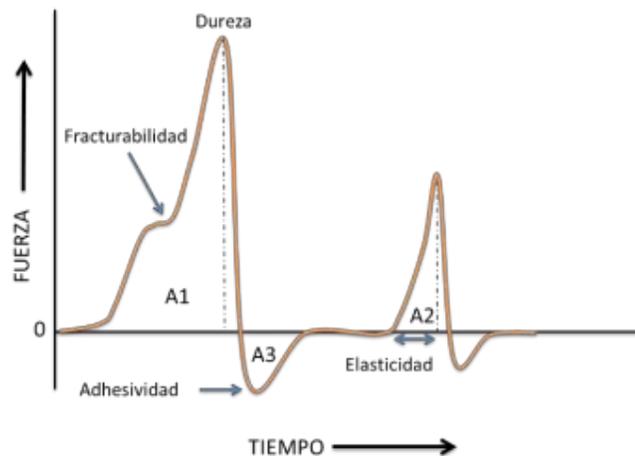


Figura 7. Ejemplo generalizado de gráfica de TPA.

Fuente (Arizmendi, 2012).

4. JUSTIFICACIÓN

Mientras que los edulcorantes artificiales han tenido una larga tradición como aditivos alimentarios seguros, recientemente han sido reconocidos como contaminantes medioambientales debido a su extrema persistencia y ubicua presencia en diferentes ambientes acuáticos (Sang *et al.*, 2013)

Desde el año 2009 el número de artículos científicos relacionados con la presencia, destino y efectos ecotoxicológicos de los sustitutos de azúcar han aumentado de manera significativa,

especialmente de sucralosa (SUC) y acesulfame (ACE) los cuales han mostrado en ambientes acuáticos una ocurrencia mayor que algunos de los contaminantes orgánicos antropogénicos y productos de cuidado personal más ampliamente utilizados (Lange *et al.*, 2012); sin embargo, el estudio de los efectos ecotoxicológicos de otros edulcorantes como es el caso de stevia son escasos (Lange *et al.*, 2012).

Los contaminantes acumulados en los tejidos de animales acuáticos pueden catalizar reacciones que generan ERO's las cuales pueden derivar en un EO ambiental importante (Farombi *et al.*, 2007). Los peces como carpa común *Cyprinus carpio* son ampliamente utilizados para la valoración de la calidad del ambiente acuático al servir como bioindicadores de la contaminación de ríos, presas y lagos debido a su importancia económica y distribución geográfica (García-Medina *et al.*, 2012). Metodológicamente se hace uso de biomarcadores y cuantificación de daño a macromoléculas como lípidos, DNA y proteínas para evaluar el grado de daño oxidativo en diferentes sistemas biológicos (Díaz-Acosta & Membrillo-Hernández, 2006). Las consecuencias de la oxidación proteica en alimentos cárnicos han sido asociadas con cambios en la solubilidad y la funcionalidad de las proteínas como propiedades de gelificación y emulsificación, capacidad de retención de agua y parámetros de textura entre los que destaca un importante deterioro en la suavidad y jugosidad de la carne debido a fenómenos de entrecruzamiento y fragmentación proteica, modificación de las cadenas laterales de aminoácidos y pérdida de grupos sulfhidrilo (Lund *et al.*, 2011). Es por ello que el objetivo de este estudio es evaluar la toxicidad inducida por stevia en carpa común *Cyprinus carpio* mediante la evaluación del EO a través de biomarcadores y las alteraciones en la calidad proteica de la carne debido a que diversos estudios han puesto en evidencia que las proteínas musculares pueden ser modificadas por especies reactivas de oxígeno generadas vía lipoperoxidación, reacciones enzimáticas catalizadas por metales y otros procesos químicos y biológicos. (Wolf *et al.*, 1986; Butterfield & Standtman, 1997)

5. HIPÓTESIS

Los glicósidos de steviol presentes en el edulcorante natural Stevia proveniente de la planta Stevia rebaudiana Bertoni producirá un aumento en el estrés oxidativo y con ello alteraciones en las propiedades fisicoquímicas y texturales de la carne de carpa común (*Cyprinus carpio*).

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

- Evaluar la toxicidad inducida por GSv en *Cyprinus carpio* mediante la medición del estrés oxidativo determinando su relación con la modificación de las propiedades fisicoquímicas y texturales de la carne de carpa común.

6.2 Objetivos Específicos

- Determinar la toxicidad inducida por GSv en carpa común *Cyprinus carpio*.
- Evaluar el estrés oxidativo inducido por GSv en carpa común *Cyprinus carpio* mediante la determinación del contenido de hidroperóxidos y proteínas carboniladas, el grado de lipoperoxidación y la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT.
- Determinar el efecto de la exposición a GSv mediante pruebas fisicoquímicas de pH, capacidad de retención de agua, porcentaje de acidez, solubilidad, determinación de grupos disulfuro y sulfhidrilo y SDS-PAGE en carne de carpa común *Cyprinus carpio*
- Realizar un análisis de textura TPA para evaluar la influencia de la exposición a GSv en carpa común.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Sustancias de ensayo

Glicósidos de steviol utilizados : steviósido (ácido 13-[(2-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)oxi]kaur-16-en-18-oico, β-D-glucopiranosil éster; fórmula condensada: C₃₈H₆₀O₁₈; número CAS : 57817-89-7; pureza >97%) y rebaudiósido-A (ácido 13-[(2-O-β-D-glucopiranosil-3-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)oxi]kaur-16-en-18-oico, β-D-glucopiranosil éster; fórmula condensada: C₄₄H₇₀O₂₃; número CAS : 58543-16-1; pureza >97%). Estos productos fueron provistos por Sensient Flavors Mexico.

A menos que se especifique lo contrario, todos los reactivos utilizados en este estudio fueron provistos por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

7.2 Colecta y mantenimiento de la carpa común (*Cyprinus Carpio*)

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

7.3 Ensayos de toxicidad

Los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo montando 20 sistemas de prueba en recipientes con capacidad para 10 L con agua a temperatura ambiente y aireación constante. Se introdujeron 5 carpas en cada sistema las cuales no fueron alimentadas durante los tiempos de exposición. Los especímenes fueron expuestos a tres concentraciones de glicósidos de steviol añadidas directamente en el agua: 1 ng/L, 1 µg/L y 1 mg/L durante periodos de 12, 24, 48, 72 y 96 hrs. Los sistemas fueron estáticos sin renovación del medio.

7.4 Evaluación del estrés oxidativo

Después de la punción, los especímenes fueron sacrificados por dislocación cervical y se colocaron en baño de hielo. Se retiraron el músculo e hígado, colocándolos en tampón de fosfato [NaCl 0.138M; KCl (Vetec-Sigma-Aldrich, Toluca) 0.0027 M] con una solución de pH de 7.4 y los tejidos se homogeneizaron por separado. El sobrenadante se centrifugó a 12,500 rpm a una temperatura de -4°C durante 15 minutos en centrífuga Centurion Scientific K3 Series, West Sussex, UK. Las muestras de los tejidos se almacenaron a -70°C en Revco Luzerne, PA antes del análisis.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos heparinizados y se colocan en tampón de fosfato [NaCl 0.138M; KCl (Vetec-Sigma-Aldrich, Toluca) 0.0027 M] con una solución de pH de 7.4 y sonicados. Las muestras de sangre se almacenaron a -70°C antes del análisis.

Los biomarcadores que se evaluaron en sangre, hígado y músculo fueron los siguientes: CHP, LPX, PCC y la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT.

7.4.1 Determinación de hidroperóxidos (Método Jiang, 1992)

El contenido de hidroperóxidos (CHP) en las muestras fue analizado de la siguiente manera: 100 μ L de sobrenadante (previamente desproteinizado con ácido tricloroacético al 10%) fue mezclado con 900 μ L de una mezcla de reacción que contenía 0.25 mM FeSO₄, 25mM H₂SO₄, 0.1 mM de naranja de xilenol e hidroxitolueno de butilo 4mM en 90% (v/v) de metanol. La mezcla se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente y la absorbancia se leyó a 560nm en Optizen POP Bio from Mecasys Co., Ltd, frente a un blanco que contenía sólo mezcla de reacción. Los resultados se interpolaron a una curva tipo y se expresaron como nM de CHP (hidroperóxido de cumeno /mg de proteína).

7.4.2 Determinación del grado de lipoperoxidación TBARS (Método de Buege y Aust, 1979).

A 100 μ L de la muestra (sin centrifugar) se completó a 1 mL con solución reguladora tris-HCl 150 mM a pH 7.4 y se le adicionaron 2mL de TCA-TBA [ácido tiobarbitúrico al 0.375% (Fluka-Sigma-Aldrich, Toluca) en ácido tricloroacético al 15%] se indujo un choque térmico de la muestra con agua en ebullición y se dejó en baño maría. Posteriormente, se incubó 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 / g tejido, usando el coeficiente de extinción molecular (CEM) el cual es de 1.56×10^5 mM⁻¹cm⁻¹.

$$\text{nM de malondialdehído / mg proteínas / g tejido} = \text{Abs} / \text{CEM}$$

7.4.3 Determinación de los niveles de oxidación de proteínas (Método Burcham, 2007; Parvez & Raisuddin, 2005; Levine et al., 1994).

A 100 μ L de sobrenadante se le adicionaron 150 μ L de 2,4-dinitrofenihidracina (DNPH) (10 mM, disuelto en HCl 2M). La mezcla se incubó durante 60 min a temperatura ambiente y en oscuridad.

A la mezcla resultante se le adicionaron 500 μL de tricloroacético (20%) y se dejó reposar durante 15 minutos a 4°C. El precipitado se centrifugó a 11000 rpm durante 5 minutos. El botón resultante se lavó tres veces con etanol-acetato de etilo 1:1 y posteriormente se disolvió en 1 mL de una solución de guanidina 6M pH 2.3 y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. La absorbancia se determinó a 366 nm. Los resultados se expresaron en mM o nM de carbonilos reactivos (C=O) /mg proteínas.

7.4.4 Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (Método de Misra y Fridovich, 1972)

Se colocaron 40 μL del homogeneizado 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 seg y 5 min. Los resultados se expresaron como UI de SOD/ mg de proteína.

7.4.5 Determinación de la actividad de la catalasa (Método de Radi et al., 1991)

30 μL del sobrenadante de la muestra fueron colocados en una microcelda, se agregaron 280 μL de una solución amortiguadora de aislamiento [0.3 M sacarosa (Vetec-Sigma-Aldrich, St. Louis), 1 mM EDTA, 5 mM HEPES y 5 mM KH_2PO_4 (Vetec-Sigma-Aldrich, St. Louis)] y 200 μL de la solución de H_2O_2 20 mM (Vetec-Sigma-Aldrich, St. Louis). Posteriormente se realizaron las lecturas a 240 nm, a 0 seg y 60 seg. Los resultados obtenidos de las absorbancias fueron utilizados en la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad de catalasa} = (A_0 - A_{60}) / \text{CEM}$$

$$\text{CEM del H}_2\text{O}_2 = 0.043 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Los resultados fueron expresados en $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ / mg de tejido.

7.4.6 Determinación de la concentración de proteínas (Método de Bradford, 1976).

A 25 μL de sobrenadante se le agregaron 75 μL de agua desionizada y 2.5 mL del reactivo de Bradford (0.05 g de azul de Cumassie en 25 mL de etanol al 96% y 50 mL de H_3PO_4 en 500 mL de agua desionizada). Los tubos se agitaron y se dejaron reposar por 5 min en oscuridad, posteriormente se determinó la absorbancia a 595 nm. Los resultados se extrapolaron a una curva estándar hecha con albúmina presentada en la Tabla 7.

Tabla 7 Curva tipo para la prueba de proteínas totales

Tubo	Albúmina (μL)	Agua desionizada (μL)
1	10	90
2	25	75
3	50	50
4	75	25
5	100	0
Blanco	0	100

7.5 Análisis Fisicoquímicos

7.5.1 Medición pH (Método NMX-F-317- S-1978 “Determinación de pH en Alimentos”). Se tomó una porción de 10 g de músculo, se mezcló con 90ml de agua destilada. Se homogeneizó hasta obtener una pasta consistente y uniforme. Se ajustó la temperatura de la pasta a $20\text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$. Finalmente se realizó la lectura de pH con un potenciómetro previamente calibrado (Conductronic pH 120).

7.5.2 Capacidad de retención de agua (CRA). Método Honikel & Hamm (1983), reportado en (Dublán, 2006)

Se tomó una porción de 10g de músculo y se homogeneizó. Se colocaron 5g de muestra en un tubo de centrifuga y se añadieron 8mL de una disolución de NaCl 0.6 M. Se agitó con varilla de vidrio durante 1 min en baño de hielo, se dejó reposar 30 minutos. Se agitó 1 minuto. Se centrifugó (Eppendorf 5810R 15Amp Version, USA) durante 30 minutos a 2500 rpm a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se midió el volumen. Se reportó el porcentaje de H₂O retenida por 100 g de muestra.

7.5.3 Concentrado proteínico (Ngapo *et al.*, 1992)

Se homogeneizaron 100g de músculo mediante licuado por 10 min con una mezcla de hielo- agua fría 1:1 (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 (Eppendorf 5810R 15Amp Version, USA) a 3500 rpm a 4°C por 15 min, se eliminó el sobrenadante. Parte del precipitado proteínico se reservó para formar geles y el resto para determinar concentración de proteínas y solubilidad.

7.5.4 Concentración de proteína Método biuret reportado en Dublán (2006)

Utilizando tubos de ensayo se midió 1mL de las disoluciones de proteína y se agregaron 3 mL del reactivo de biuret (Se disolvió 1.5 g de CuSO₄.5H₂O y 6 g de tartrato de sodio y potasio (NaKC₄H₄O₆.4H₂O), se transfirió a un matraz volumétrico de 1000mL se disolvió con 500 mL de agua destilada, se agregaron 300 mL de hidróxido de sodio 10 % y se llevó a volumen con agua destilada). Se homogeneizaron las disoluciones y se dejaron en reposo durante 30 minutos en la sombra sin contacto directo con la luz. Se midió la absorbancia de las muestras a una $\lambda = 540$ nm

en un espectrofotómetro TU-1800 (Beijing Purkinje General Instrument Co. Ltd., Beijing, China). Los datos obtenidos se interpolaron a una curva patrón de seroalbúmina-bovina de concentración 0-10 mg/mL.

7.5.5 Determinación de Solubilidad por el Método de Pilosof (2000)

Se extrajeron las proteínas (5 mg/mL, a pH 7) y se centrifugó (Eppendorf 5810R 15Amp Version, USA) durante 15 min a 3500 rpm a una temperatura de 4 °C, para evitar su desnaturalización. Se determinó la concentración de proteínas al sobrenadante mediante el método biuret reportado en Dublán *et al.* (2006). Se reportó la solubilidad como la relación entre el contenido de proteínas del sobrenadante y el contenido de la proteína sin centrifugar por 100.

7.5.6 Determinación de grupos disulfuro y sulfhidrilo totales por el Método Ellman (1959), reportado en Dublán (2006)

Se mezcló 1 mL de la disolución proteica (5 mg/mL a pH 7) y 9 mL de urea 8 M disuelta en un amortiguador de Tris-Glicina-EDTA (10.4 g/L Tris; 6.9 g/L Glicina; 1.2 g/L EDTA; pH 8). Se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 30 min. Se tomaron 3 mL de la mezcla y se añadieron 50 mL de una disolución del reactivo 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzónico (4 mg/mL en la misma disolución amortiguadora). Se dejó reposar durante 30 min en obscuridad. Se midió la absorbancia a 412 nm un espectrofotómetro TU-1800 (Beijing Purkinje General Instrument Co. Ltd., Beijing, China). Se transformó el valor de absorbancia empleando la siguiente ecuación.

$$SS \text{ o } SHT = (75,53 (DO1 - DO2) 10 / C.$$

Siendo:

SS o SHT la concentración de los disulfuros o sulfhidrilo totales en la muestra (μ moles SH o SS/g proteína)

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

DO2 la absorbancia a 412 nm del blanco de reactivos.

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

7.5.7 Formación de gel reportado (Dublán, 2006)

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

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

El análisis de textura de los geles se realizó utilizando un analizador de textura TA-XT2, v2.63 (Texture Technologie Corporation, Scarsdale, Nueva York, EE.UU.) equipado con una célula de carga de 25 N. Los geles se equilibraron y se evaluaron a temperatura ambiente (20-25 ° C). Se prepararon tres muestras en forma de cilindro con una longitud de 2,5 cm y se sometieron a determinación. Las muestras se comprimieron dos veces hasta el 80% de su altura original. El TPA se midió utilizando el analizador de textura equipado con un émbolo esférico (diámetro 1,25 cm, velocidad de depresión de 1 mm/s, reposo de 5 seg entre primera y segunda compresión). Los datos se analizaron utilizando el software Texture Expert versión 1.20 (Stable Micro Systems, Surrey, U.K) y se calcularon dureza, cohesividad, elasticidad, gomosidad y resiliencia.

7.5.9 Perfil de pesos moleculares SDS-PAGE (García-Carreño & Haard, 1993; L'Hocine & Pitre, 2016)

Muestras de sobrenadantes fueron sometidas a electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. La preparación de las muestras fue la siguiente: De los sobrenadantes se tomaron 200 μ L, se adicionaron 100 μ L de un amortiguador de Tris-HCl (10.4 g Tris- HCl, 6.9 g glicina, 480 g urea, 1.2 g EDTA por litro) pH 8.0. Muestras sólidas (0.1g de precipitados y geles) se disolvieron en 300 μ L de el mismo amortiguador. A las muestras así preparadas se les adicionaron 700 μ L del amortiguador de carga que contenía β -mercaptoetanol como agente reductor. Las muestras se sometieron a un baño de agua a 90°C durante 10 min. Se inyectaron en sistemas formados por dos geles, un gel concentrador con un %T de 5% y un gel separador con un 10%. La separación se llevó a cabo a 200mV constantes durante 40 min en un sistema Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Se llevó a cabo la fijación de las muestras en una disolución metanol 20% y formaldehido 0.5% durante 30 min. La tinción se llevó a cabo con una disolución de 40% metanol, 15% ácido acético y 0.1% azul brillante Coomassie® R-250.

7.6 Análisis estadístico

Se llevó a cabo mediante un análisis de varianza ANOVA y para diferencia de medias se utilizó el método LSD con un nivel de significancia ($p < 0.05$), mediante el programa estadístico SPSS v10 software (SPSS, Chicago, IL, USA).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1 Estrés oxidativo

A continuación se presentan los resultados y la discusión de resultados obtenidos del análisis de biomarcadores de EO en carpa común.

8.1.1 Contenido de Hidroperóxidos (CHP)

La concentración de equivalentes de hidroperóxidos de cumeno (CHP) inducidos por glicósidos de steviol se muestra en la figura 8. Se observó que existen diferencias significativas ($P < 0.05$) en todos los órganos analizados en al menos un tiempo de exposición y una concentración con respecto a grupo control. Reducciones significativas con respecto a grupo control ($P < 0.05$) fueron observadas para la C1 en sangre en todos los tiempos de exposición, mientras que la C2 únicamente mostró diferencia significativa a las 12 h (87.2%) y finalmente en la C3 se observó diferencia significativa con respecto a grupo control a las 72 h (37.2%). En hígado se observaron diferencias significativas para C1 a las 12, 24, 48 y 72 h (38.4%, 44.3%, 35.0% y 31.6% respectivamente). La C2 tuvo un aumento significativo con respecto a grupo control a las 24 h (64.0%). En músculo se muestran reducciones significativas para la C1 a las 12 h (54.8%), 24 h

(49.2%), 48 h (67.5%) y 96 h (59.7%). La C2 mostró reducción significativa con respecto a grupo control a las 72 h (44.8%).

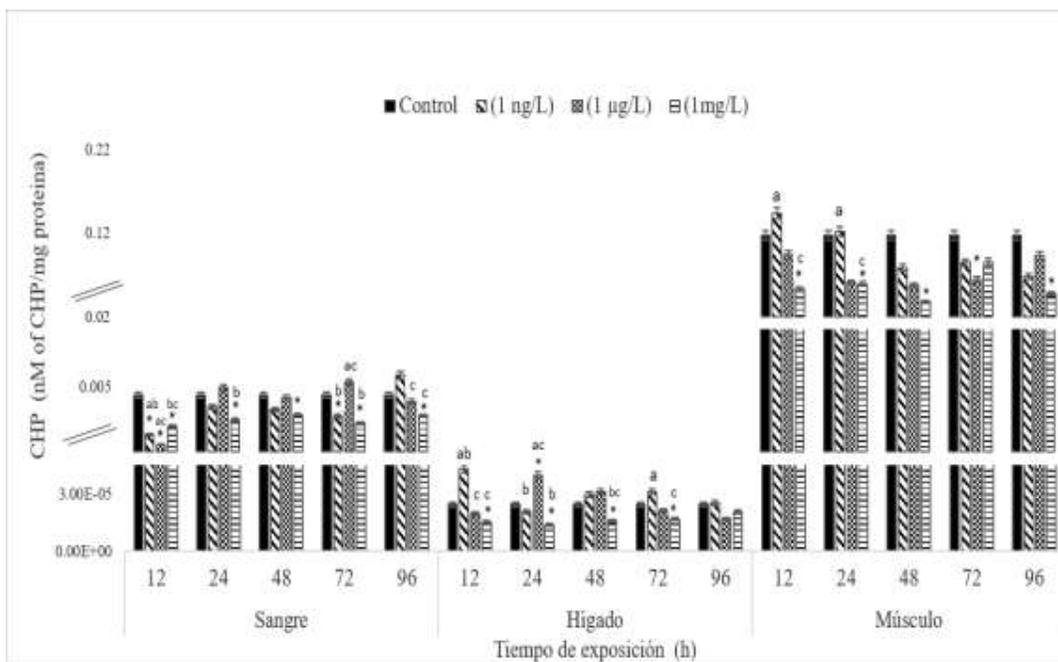


Figura 8. CHP en sangre, hígado y músculo de *C. carpio* expuestos a glicósidos de steviol por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a *= control, a= C1 1 mg/L, b= C2 1 µg/L y c= C3 1 ng/L. ANOVA y Test de LSD.

La oxidación de lípidos involucra la abstracción del hidrógeno alílico para formar un radical tetradienil (L^*) seguido por la inserción de O_2 . La adición de O_2 resulta en la formación de un radical peroxilo (LOO^*), el cuál es posteriormente transformado en hidroperóxido lipídico ($LOOH$) por la abstracción de otro H^+ perteneciente a una molécula lipídica (LH) (Yin *et al.*, 2002). La disminución significativa en este biomarcador de EO se pueden explicar por el efecto protector mostrado por los glicósidos de steviol, cuyo papel como agentes antioxidantes secundarios (secuestradores de especies reactivas de oxígeno como el radical hidroxilo) ha sido comprobado en estudios *in vitro* e *in vivo* en diferentes sistemas biológicos (Stoyanova *et al.*, 2011; Hajjhashemi & Geuns, 2013). No se observan diferencias significativas tiempo-dependientes. Diversos estudios de metabolismo

de GSv han confirmado que éstos son transformados por las bacterias presentes en la microflora intestinal a la aglicona de steviol (Renwick & Taka, 2008) la cuál es posteriormente eliminada como glucurónido de steviol. De acuerdo a (Purkayastha *et al.*, 2016) la hidrólisis completa de los principales GSv a una concentración de 2.0 mg/L se lleva a cabo en 48 h cuando estos son incubados en homegeneizados fecales humanos. De acuerdo a los resultados y al margen de que se realicen estudios posteriores de metabolismo de GSv en peces, se podría decir que los principales productos padre steviósido y rebaudiósido A y sus productos de transformación (steviol y glucurónido de steviol) permanecen en el organismo el tiempo suficiente para poder producir un efecto, y que, aunado a ello, su constante de absorción/excreción genera una disminución significativa de hidroperóxidos concentración dependiente sin que en ello se observe un comportamiento tendencioso con respecto al tiempo de exposición.

El mecanismo de actividad antioxidante mostrada por GSv ha sido estudiado por Juttner *et al.* (2015). Su estudio se basó en dos posibles mecanismos mediante los cuales las moléculas de steviósido, rebaudiósido A y su aglicona el steviol actúan para contrarrestar el efecto oxidante del radical hidroxilo. El primer mecanismo estudiado se basó en la actividad *scavenging* mostrada por las moléculas de glucosa contenidas en las moléculas de steviósido y rebaudiósido A y el segundo mecanismo fue relacionado con la doble ligadura exhibida por la aglicona de steviol. Concluyeron que la mayor actividad *scavenging* fue mostrada por steviósido y rebaudiósido A (IC₅₀ de la formación del radical hidroxilo de 0.209 y 0.200 mM respectivamente) mientras que el steviol tuvo una IC₅₀ de 0.51. Existió una alta correlación entre la actividad *scavenging* y la cantidad de grupos OH presentes en las moléculas.

Hermes-Lima (2004) menciona que otro tipo de mecanismos participa en la supresión de la oxidación de lípidos; ejemplo de ello se tiene la GPx-4 la cual detoxifica los peróxidos lipídicos inmediatamente formados en la membrana. En el caso del músculo, la formación de

hidroperóxidos tanto *in vivo* como *post-mortem* a partir de la reacción generada entre el radical peroxi (producto intermediario de la oxidación de lípidos) y los ácidos grasos insaturados presentes en el tejido, pueden generar la aparición de compuestos aromáticos volátiles que pueden proveer a la carne de sabores rancios y aromas desagradables (Chaijan, 2008) por lo tanto una disminución significativa de este parámetro como se observa en este estudio contribuye al mantenimiento de la calidad de los productos cárnicos.

8.1.2 Análisis TBARS (Concentración de malondialdehído MDA)

Los resultados del análisis TBARS se muestran en la figura 9. Se observaron reducciones significativas con respecto a grupo control ($P < 0.05$) en sangre para la C1 a las 12 h (64.3%), 48 h (62.0%), 72 h (37.2%) y 96 h (47.7%). Para el mismo órgano y la C2 se observó diferencia significativa a las 12 y 48 h. Las reducciones fueron de 67.3% y 56.8% respectivamente. La C3 presentó reducción significativa a las 48 h. En hígado se muestran diferencias significativas con respecto a grupo control ($P < 0.05$) para la C1 a las 12, 24, 48 y 72 h. Las reducciones fueron de 29.9%, 28.4%, 33.4% y 24.9% respectivamente. Se observó un aumento significativo con respecto a grupo control a las 12 h (17.7%) y 24 h (29.3) así como una disminución significativa a las 48 h (39.6%) para la C3. Músculo presentó diferencias significativas con respecto a grupo control ($P <$

0.05) para la C1 a las 12 h (39.4%), 24 h (36.1%), 48 h (36.3%) y 96 h (38.7%). Se observó un aumento significativo con respecto a grupo control para la C3 a las 12 h (38.2%).

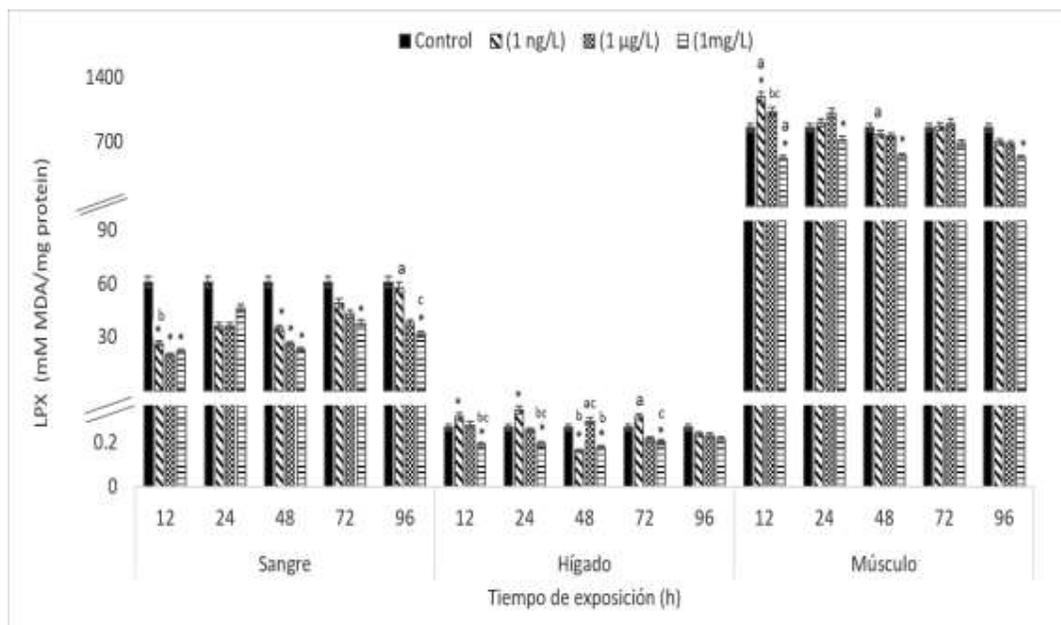


Figura 9. LPX en sangre, hígado y músculo de *C. carpio* expuestos a glicósidos de steviol por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a *= control, a= C1 1 mg/L, b= C2 1 µg/L y c= C3 1 ng/L. ANOVA y Test de LSD.

Los resultados obtenidos en este estudio al respecto de la oxidación de lípidos muestran que se observó reducción significativa en el análisis TBARS en todos los órganos principalmente para los sistemas cuya concentración fue de 1 mg/L, lo cual indica que los glicósidos de steviol a esta concentración pueden poseer un efecto protector.

Durante la lipoperoxidación, los compuestos *scavengers* de radicales libres pueden reaccionar con los radicales peroxilo antes de que actúen sobre los ácidos grasos poliinsaturados previniendo la oxidación de estos. Los antioxidantes que rompen la cadena donan átomos de hidrógeno para convertir los radicales peroxilo en especies estables y no radicales (Lee *et al.*, 2004).

Por otro lado dada la naturaleza de formación de los hidroperóxidos lipídicos y los productos finales generados a partir de los hidroperóxidos como MDA y 4-hidroxi-2-nonenal la disminución significativa con respecto a grupo control observada en este biomarcador de EO se encuentra acorde a los resultados obtenidos en el análisis de CHP. De la misma forma que en el análisis de contenido de hidroperóxidos no se observa un efecto tiempo dependiente. El comportamiento en sangre se encuentra acorde a los resultados obtenidos por Hajjhashemi & Geuns (2013) quienes demostraron la capacidad antioxidante de los GSv y del glucurónido de steviol el cual puede ser encontrado en concentraciones suficientemente elevadas en sangre periférica para mostrar un efecto antioxidante *in vivo*.

De acuerdo a Geeraert *et al.* (2010), la administración de steviósidos a ratas con obesidad y resistencia a la insulina promovió la disminución de la oxidación de lipoproteínas de baja densidad, la maduración del tejido adiposo, incrementó el transporte de glucosa, la señalización de la insulina y la defensa antioxidante en los tejidos adiposos viscerales asociada a un incremento en la adiponectina. Las células de las plantas son continuamente atacadas por compuestos hiperactivos derivados del oxígeno, ERO's, generadas como subproductos de la fotosíntesis y la respiración (Mittler *et al.*, 2004). De acuerdo a Morrelli *et al.* (2003) los azúcares y compuestos con estructuras similares pueden ser considerados *scavengers* de ERO's en plantas debido a que su estudio reveló que los radicales hidroxilo, generados a partir de las reacciones tipo Fenton atacaban directamente a la desoxirribosa y otros carbohidratos simples como sacarosa, maltosa, glucosa y sorbitol. El papel de los GSv como metabolitos secundarios de protección generados en las hojas de *S. rebaudiana* podría reforzar la teoría de que estos compuestos pueden presentar un efecto *in vivo* en otros sistemas biológicos.

Investigaciones sobre la actividad antioxidante de GSv pueden respaldar la premisa manejada en este estudio. Rao *et al.* (2014) realizaron un estudio sobre la actividad antioxidante del polvo de

hojas de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni (PHS) y de polvo comercial de steviósidos (PCS), encontrando que aún cuando el PHS mostró valores superiores de inhibición de radicales DPPH⁺ y ABTS⁺ (52.46% y 37.5% de inhibición a 100 µg/mL respectivamente) debido a una mayor concentración de compuestos fenólicos (5.6%), el PCS mostró también una importante actividad inhibitoria de dichos radicales (47.64% de inhibición a 100 µg/mL y 39.69% de inhibición a 40 µg/mL respectivamente).

8.1.3 Contenido de proteínas carboniladas (CPC)

El contenido de proteínas carboniladas inducidas por glicósidos de steviol se muestran en la figura 10. Disminuciones significativas con respecto a grupo control ($P < 0.05$) se observaron en sangre para la C1 a las 12 h, 24 h, 48 h y 96 h. Las reducciones fueron 55.5%, 55.5%, 53.2% y 48.4% respectivamente. Se observó diferencia significativa para C2 a las 12 h (62.0%) y 48 h (39.1%). La C3 muestra disminución significativa a las 48 h (28.7%). En hígado se muestran reducciones significativas para la C1 con respecto a grupo control ($P < 0.05$) a las 12 h (74.6%), 24 h (39.7%), 48 h (31.0%) y 96 h (51.5%). A las 72 h se observó reducción significativa para la C2. La C3 mostró disminución significativa a las 48 h (49.3%) y un aumento significativo a las 12 h (26.1%). Músculo mostró disminución significativa con respecto a grupo control ($P < 0.05$) para la C1 en todos los tiempos.

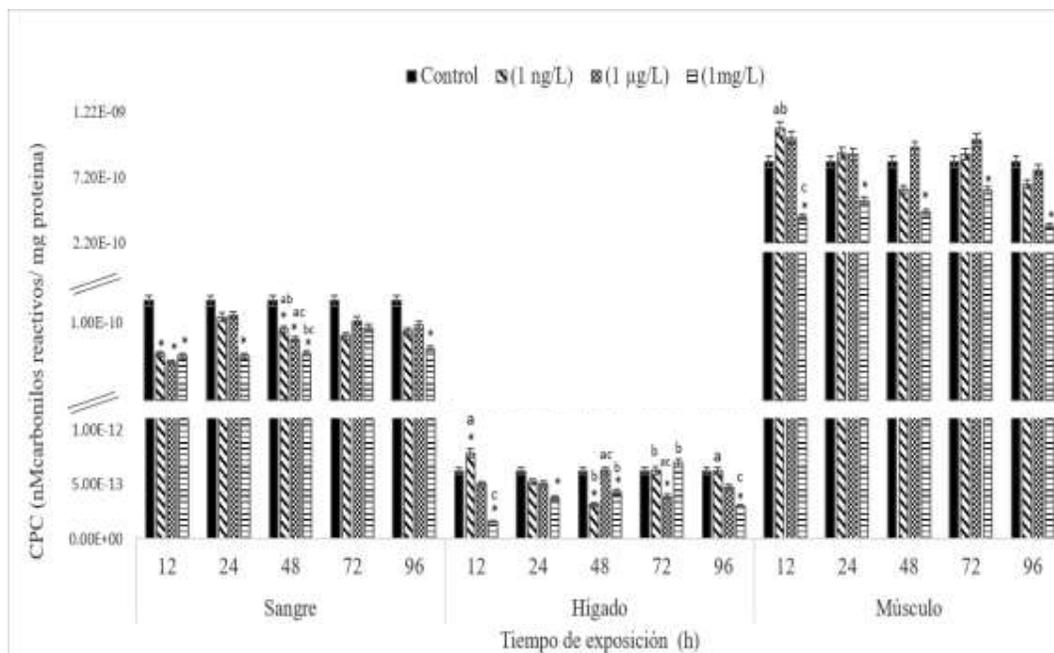


Figura 10. CPC en sangre, hígado y músculo de *C. carpio* expuestos a glicósidos de steviol por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a *= control, a= C1 1 mg/L, b= C2 1 µg/L y c= C3 1 ng/L. ANOVA y Test de LSD.

Diversos estudios han comprobado que los productos de lipoperoxidación tales como el 4-hidroxi-2-nonenal y otros aldehídos pueden reaccionar con residuos de aminoácidos, modificando la estructura y funciones de las proteínas (Bagnyukova *et al.*, 2006). ERO's como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), radical hidroxilo (HO^{\cdot}) y otras especies no radicalarias como el peróxido de hidrógeno H_2O_2 y los hidroperóxidos (ROOH), han sido reconocidos como iniciadores de la oxidación de proteínas (Estevez *et al.*, 2011). De manera indirecta los productos de lipoperoxidación pueden reaccionar con otras biomoléculas y generar todo tipo de daños a la célula (Konigsberg, 2008). En las proteínas los RL producen carbonilación, pérdida de grupos sulfhidrilo, fragmentación de moléculas, nitración, enrollamientos erróneos de la estructura secundaria o pérdida de la conformación de la estructura terciaria y cuaternaria, reacciones espontáneas con

glucosa y entrecruzamientos de tipo covalente (Lund, 2011). La mayor concentración de proteínas carboniladas fue detectada en orden decreciente en músculo, sangre e hígado. La sangre representa el principal vehículo de distribución de xenobióticos en los organismos, al igual que en los biomarcadores de contenido de hidroperóxidos y TBARS, la reducción del CPC en carpa común puede deberse a la presencia de GSv. En el hígado se lleva a cabo la biotransformación de xenobióticos; estudios de metabolismo de GSv demuestran que una vez llevada a cabo la hidrólisis de los compuestos a la aglicona de steviol, ésta sufre un proceso de biotransformación de fase II en la cual la aglicona de steviol es transformada en glucurónido de steviol para su posterior eliminación (Wheeler *et al.*, 2008), por lo tanto el efecto que muestran los productos padre y los productos de transformación se observa *in situ* generando con ello una menor carbonilación de proteínas en comparación con los dos órganos estudiados en este trabajo. En el caso de músculo se puede observar mediante el perfil electroforético realizado a las muestras expuestas a las tres condiciones de estudio, que las principales proteínas que conforman el tejido no sufren daño oxidativo aparente a lo largo del tiempo de exposición. La reducción significativa del contenido de proteínas carboniladas en los tres órganos encontrada en este estudio puede explicarse por el efecto protector de GSv y por la disminución significativa de productos generados a partir de la lipoperoxidación. En un estudio llevado a cabo por García *et al.* (2016) donde se compara el efecto de edulcorantes en ratones sometidos a estrés crónico en linfocitos, bazo y placas de Peyes, se comprobó que la administración de stevia disminuyó la oxidación de proteínas en los tejidos analizados. Sánchez-Aceves *et al.* (2017) comprobaron en un estudio llevado a cabo en *C. carpio* que la exposición a GSv de dichos organismos bioindicadores administrados con un inductor de estrés oxidativo, (CCl₄) disminuyó de manera significativa algunos biomarcadores de EO entre ellos el contenido de proteínas carboniladas.

8.1.4 Superóxido dismutasa (SOD)

La actividad inducida de superóxido dismutasa se muestra en la figura 11. Se observó un incremento significativo con respecto a grupo control ($P < 0.05$) en sangre para la C1 a las 12 h (36.2%) y 48 h (53.5%). Las C2 y C3 no presentaron diferencias significativas con respecto a grupo control ($P < 0.05$) a ningún tiempo de exposición. Para hígado se observó reducción significativa con respecto a grupo control ($P < 0.05$) a las 48 h (40.6%) para la C1. Para la C3 se mostró una reducción significativa a las 48 h (38.5%) y 96 h (32.2%). Se observó un aumento significativo con respecto a grupo control ($P < 0.05$) a la C3 a las 12 h (42.6%). En músculo se observó disminución significativa con respecto a grupo control ($P < 0.05$) para la C1 a las 12 h y 48 h (35% y 36.5% respectivamente). Para la C3 se observó un aumento significativo a las 12 h (43.9%) al igual que para la C2 a las 24 h (39.4%).

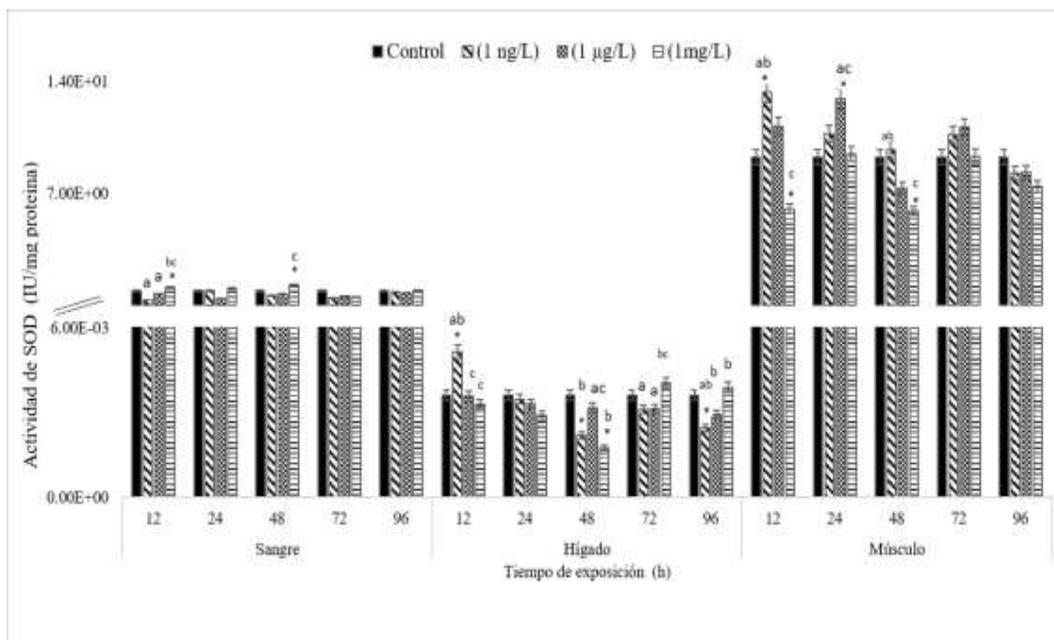


Figura 11. SOD en sangre, hígado y músculo de *C. carpio* expuestos a glicósidos de steviol por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a *= control, a= C1 1 mg/L, b= C2 1 µg/L y c= C3 1 ng/L. ANOVA y Test de LSD.

Las defensas antioxidantes celulares son representadas por la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y enzimas relacionadas con el glutatión, como la glutatión peroxidasa (GPx), glutatión-S-transferasa (GST) y glutatión reductasa (GR) (Bagnyukova *et al.*, 2006). Los peces como *Cyprinus carpio*, poseen un sistema de defensa antioxidante sumamente eficaz, por lo que un cambio en su expresión puede servir como indicador de daño celular. SOD es la enzima encargada de contrarrestar los efectos dañinos producidos por ERO's al convertir el ion superóxido (O_2^-) en H_2O_2 (van der Oost *et al.*, 2003). Diversos estudios han comprobado que un aumento de su actividad puede servir como indicador de EO conduciendo a la inducción de otras enzimas del sistema antioxidante endógeno asociadas a un sistema de captura de H_2O_2 como son CAT y GPx (Konigsberg, 2008). Lushchak *et al.* (2005) mencionan que los productos de lipoperoxidación se encuentran relacionados con la regulación y/o modificación de la actividad de algunas enzimas

antioxidantes. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo la disminución en la actividad antioxidante inducida por SOD principalmente observada para la mayor concentración de glicósidos de steviol en hígado y músculo, puede deberse al papel de los GS como agentes *scavengers*. En un estudio llevado a cabo por Stoyanova *et al.*, (2011), se encontró que el steviósido resultó ser un excelente agente *scavenger* del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y del radical hidroxilo (OH^{\cdot}), con valores de IC_{50} de 0.305 y 0.118 mM, valores por debajo de los reportados para el manitol, un reconocido agente *scavenger* de ERO's, concluyendo que los antioxidantes presentes en la dieta (tales como inulina, steviósidos y polifenoles) pueden ser importantes para prevenir la oxidación de biomoléculas.

Los incrementos significativos encontrados en sangre y músculo se encuentran en concordancia con los estudios llevados a cabo por (Geeraert *et al.*, 2010) quienes realizaron un trabajo en sistemas murinos con administración de GS donde indican que uno de los mecanismos a través de los cuales se observa la capacidad protectora de los compuestos de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni es debido a un incremento en las defensas antioxidantes evidenciadas a partir de un aumento en las concentraciones de Sod1, Sod2 y Sod3. Por otro lado, (Nelson *et al.*, 2006) observaron que después de administrar extractos de cinco plantas medicinales que presumían tener una fuerte actividad antioxidante, se observó un incremento de SOD (30%) y CAT (54%) así como un descenso en la concentración de MDA (40%), lo que indica que además de actuar como agentes *scavengers*, las moléculas antioxidantes pueden generar un aumento de la capacidad antioxidante endógena celular.

8.1.5 Catalasa (CAT)

La actividad inducida de catalasa se muestra en la figura 12. Se encontraron reducciones significativas con respecto a grupo control ($P < 0.05$) para la C1 en sangre a las 12 h (37.2%), 24

h (37.2%), 48 h (43.8%); C2 y C3 mostraron reducción significativa con respecto a grupo control a las 12 h (53.2%) y (50.3%) respectivamente. En hígado se observó diferencia significativa con respecto a grupo control ($P < 0.05$) para la C2 a las 12 h y 72 h (33.8% y 34.9% respectivamente). La C3 presentó reducción significativa a las 24 h (37.9%) con respecto a grupo control. Músculo presentó reducción significativa con respecto a grupo control para la C1 a las 12, 24 y 48 h (28.8%, 22.4% y 25.8%).

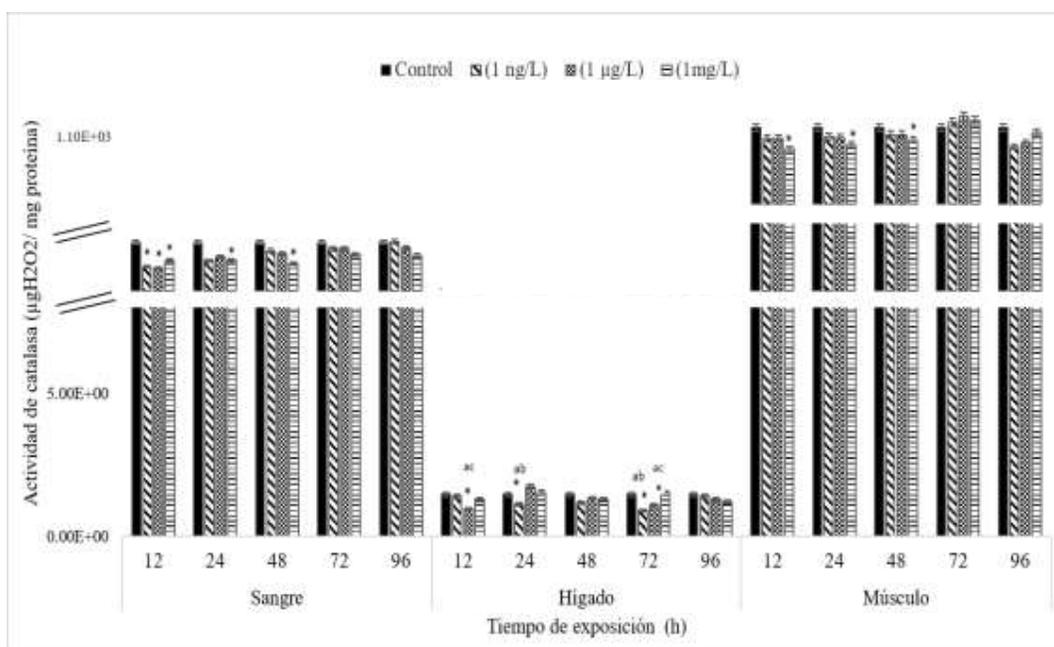


Figura 12. CAT en sangre, hígado y músculo de *C. carpio* expuestos a glicósidos de steviol por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a *= control, a= C1 1 mg/L, b= C2 1 µg/L y c= C3 1 ng/L. ANOVA y Test de LSD.

(Bagnyukova *et al.*, 2006) encontraron que la actividad de la enzima CAT se encuentra positivamente relacionada con los niveles de LOOH presentes. Por lo tanto es posible que los productos de lipoperoxidación puedan encontrarse relacionados con la sobre regulación de la catalasa y por lo tanto la mayor actividad de CAT es observada en grupos con contenidos de LOOH mayores. La enzima, encargada de degradar peróxido de hidrógeno puede afectar la tasa

de reacción de Fenton y, por ese lado, disminuir la intensidad de la oxidación lipídica. La disminución de la actividad inducida de la enzima catalasa observada en este estudio puede encontrarse relacionada con el efecto protector de los glicósidos de steviol demostrado por autores como Stoyanova *et al.*, (2011) y Sánchez-Aceves *et al.*, (2017) quienes comprobaron su efecto protector *in vitro* e *in vivo*, por la disminución en los productos de lipoperoxidación relacionados de forma directa con la regulación de la actividad enzimática antioxidante además de la actividad antioxidante endógena de las glutatión que no fueron evaluadas en este estudio pero que sin embargo juegan un papel fundamental en la protección celular contra las ERO's. Mayo *et al.* (2003) concluyeron que los radicales alquil-peroxilos tienden a oxidar e inactivar la enzima CAT lo que puede generar una reducción de la capacidad antioxidante celular total, sin embargo la presencia de sustancias antioxidantes puede proveer una doble protección al actuar como sustancia protectora directa de macromoléculas contra los radicales libres y por otro lado preservar las enzimas celulares las cuales proveen de protección contra RL.

Geuns & Struyf (2010) sugieren que la actividad antioxidante de glicósidos de steviol y de su producto de biotransformación el glucurónido de steviol, es debida a que éstos incrementan la concentración de metionina que se encuentra directamente relacionada con la regulación del sistema antioxidante de la glutatión. Además de incrementar la concentración de triptófano relacionado con el sistema de defensa a través de su actividad como precursor de antioxidantes y su efecto en la respuesta inflamatoria.

8.2 Evaluación fisicoquímica del músculo de carpa común *Cyprinus carpio*

8.2.1 Determinación de pH

Los resultados de la prueba de pH a músculo de carpa común *Cyprinus carpio* se muestran en la Figura 13. Para pH se presentó una disminución significativa con respecto a grupo control ($P < 0.05$) a las 12 h y 96 h para la concentración 1 y a las 12 h para la concentración 2. La reducción fue de 5.53%, 4.79% y 4.49% respectivamente.

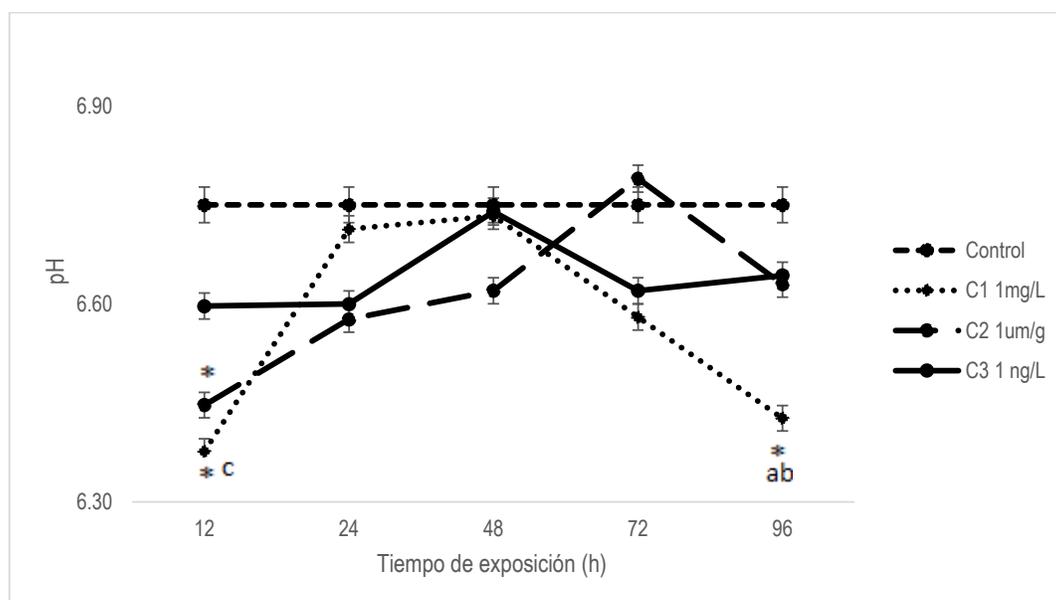


Figura 13. pH en músculo de *C. carpio* expuesto a glicósidos de steviol por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a *= control, a= C1 1 mg/L, b= C2 1 µg/L y c= C3 1 ng/L. ANOVA y Test de LSD.

Tras la captura y muerte del pescado, la interrupción de la circulación sanguínea priva al músculo del aporte de oxígeno y de toda serie de nutrientes celulares, gracias a esto tiene lugar la glicólisis anaerobia, generándose con ello ácido láctico como producto final, con la concomitante

disminución del pH muscular (Agüeda, 2006). Durante el rigor mortis el glucógeno es convertido en ácido láctico por la ruta de Embden-Meyerhof generando disminución del pH, endureciendo el músculo, produciendo la ruptura de la miofibrila (unidad fundamental del músculo) con la consecuente pérdida de agua y compuestos hidrosolubles por goteo. En peces de carne blanca el pH del músculo inmediatamente después de su captura oscila entre 6.2 y 6.8, mientras que en el caso de los pescados de carne roja el pH tiende a ser menor 5.5-5.9 (Lougovois & Kyrana, 2005). En este estudio se observa que la exposición a concentraciones de 1 mg/L, 1 µg/L y 1 ng/L de glicósidos de steviol no afecta significativamente a este parámetro fisicoquímico ya que el pH se mantiene dentro del intervalo normal para peces de carne blanca. Es importante mencionar que la formación de geles, una de las propiedades funcionales más importantes de las proteínas, se puede ver afectada por el pH del músculo. (Xiang & Holley, 2010) mencionan que la formación de geles es fuertemente dependiente entre varios otros factores del pH, ya que a pI de las proteínas miofibrilares, se forman geles muy débiles o se inhibe la formación de estos, por otro lado a pH entre 6 y 7 se induce la formación de geles fuertes en presencia de calor. En este estudio se observó que el pH se encuentra dentro del intervalo adecuado reportado para tener una buena gelificación en músculo blanco.

8.2.2 Determinación de Acidez

Los resultados de acidez en músculo de carpa común se muestran a continuación. Se observó incremento significativo con respecto a grupo control ($P < 0.05$) a las 12 h y 96 h para la C1.

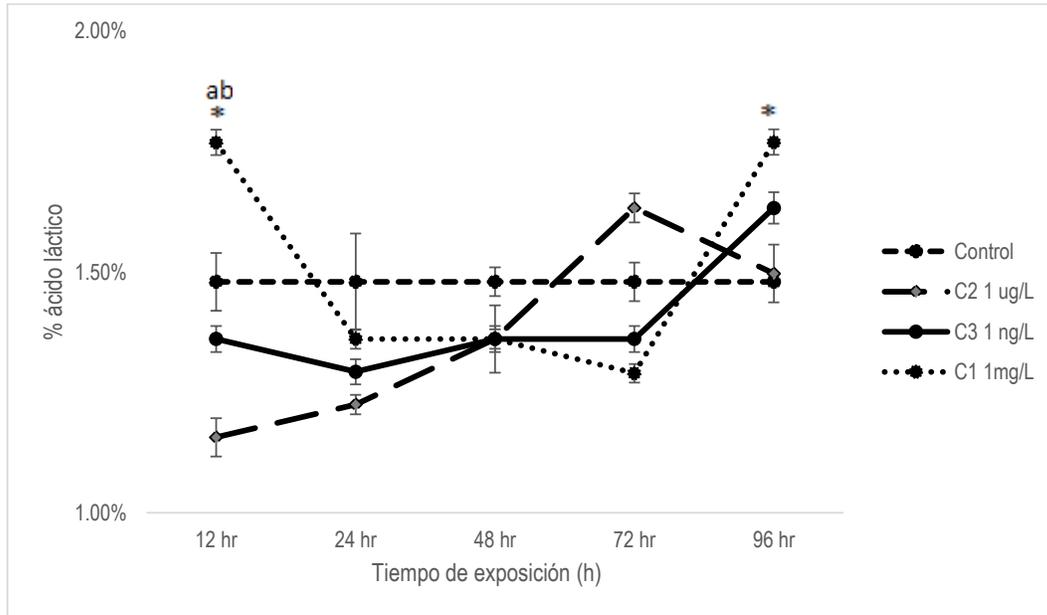


Figura 14. % de ácido láctico en músculo de *C. carpio* expuesto a glicósidos de steviol por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a *= control, a= C1 1 mg/L, b= C2 1 µg/L y c= C3 1 ng/L. ANOVA y Test de LSD.

En organismos marinos la respuesta fisiológica al estrés muestra un aumento en la gluconeogénesis hepática, agotando con ello la concentración de glucógeno en este órgano (Davis, 2006; Portz *et al.*, 2006) provocando que la energía necesaria para las funciones vitales se obtenga por otras rutas metabólicas como la glucólisis anaerobia. En estos organismos, gran parte de la masa muscular está compuesta por fibras glicolíticas de rápida contracción nerviosa. El aumento significativo en la prueba de acidez a las 12h y 96 h para la concentración de 1 mg/L puede ser explicado de la siguiente manera; una actividad muscular intensa asociada con un proceso de estrés, induce la utilización de glucógeno por el músculo y genera la acumulación de lactato en el mismo viéndose reflejado en una disminución del pH y con ello un aumento en la acidez presentada en el músculo.

El estrés puede deberse a diversos factores tanto ambientales como de manipulación, Lefevrè *et al.* (2008) mencionan que algunas condiciones que pueden generarlo son las siguientes:

- Efecto de la evolución postmortem
- Efecto de la concentración de oxígeno durante la crianza
- Efecto de las condiciones de sacrificio
- Interacciones entre la concentración de oxígeno y el estrés generado con el sacrificio
- Relación con los parámetros de calidad de la carne
- Presencia de sustancias contaminantes en el medio acuático

De acuerdo a los resultados encontrados en el estudio de EO y los demás parámetros fisicoquímicos y de textura analizados podemos presumir que el aumento significativo en la acidez del músculo puede deberse a la condiciones de sacrificio, manipulación posterior del músculo y efectos post mortem no al estrés provocado por la presencia de GSv en el medio.

8.2.3 Capacidad de Retención de Agua (CRA)

Los resultados de CRA se muestran en la figura 15. No se observaron diferencias significativas con respecto a grupo control ($P < 0.05$) a ningún tiempo de exposición para capacidad de retención de agua (CRA) en músculo de carpa común expuesta a 1 mg/L, 1 µg/L y 1 ng/L de glicósidos de steviol.

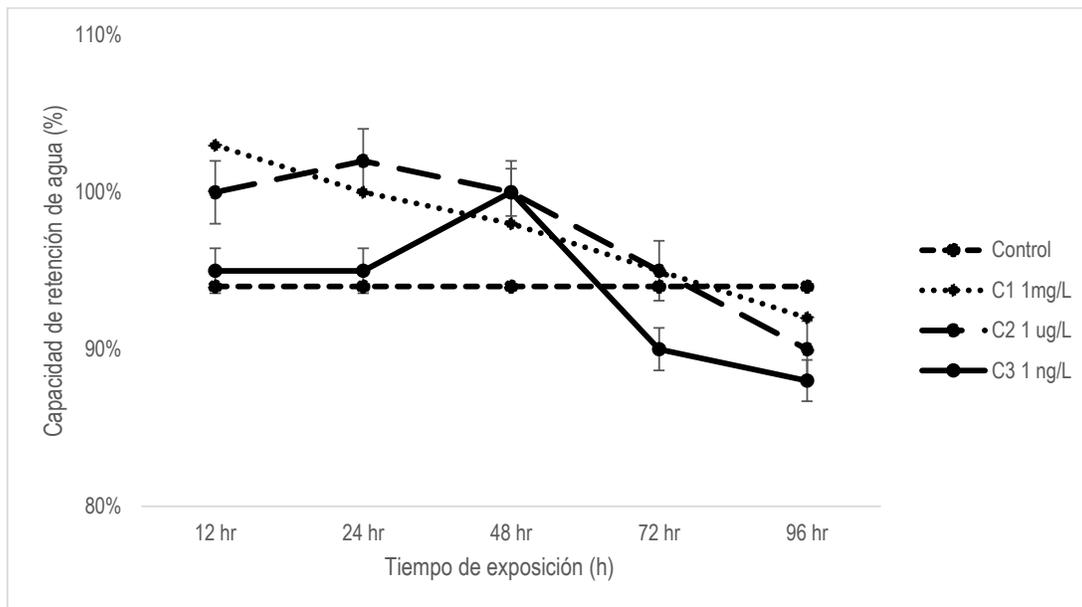


Figura 15. CRA en músculo de *C. carpio* expuesto a glicósidos de steviol por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a * = control, a = C1 1 mg/L, b = C2 1 µg/L y c = C3 1 ng/L. ANOVA y Test de LSD.

Durante la conversión de músculo a carne se forma ácido láctico con la consiguiente reducción del pH. La disminución en el pH muscular tiene diversos efectos en las propiedades físicas del tejido. Una vez que el pH alcanza el punto isoeléctrico (pI) la mayoría de las proteínas en especial la miosina (pI = 5.4), tienden a tener una carga neta de cero, así las proteínas se sienten atraídas por otras proteínas reduciendo con ello el espacio miofibrilar, generando una disminución de la capacidad de retención de agua (Huff-Lonergan & Lonergan, 2005). En el caso del músculo analizado en este estudio no se observa disminución significativa de la capacidad de retención de agua a ningún tiempo de exposición con respecto a grupo control; existen variaciones a lo largo del tiempo de exposición con tendencia a la disminución de la CRA, sin embargo estas diferencias no resultan significativas y por lo que se observa en los resultados de los análisis de textura, no se muestran alteraciones en los atributos estudiados, por otro lado los resultados concuerdan con

las mediciones de pH ya que en ningún momento se llegó al pI de la miosina principal proteína presente en las fibras musculares. Las proteínas miofibrilares, cuyo principal componente es la miosina poseen una solubilidad intermedia influenciando con ello las propiedades funcionales de la carne de pescado debido a su alta capacidad de retención de agua y su capacidad emulsificante (Miranda, 2012). Al existir una posible disminución en el daño generado en las principales proteínas estructurales del músculo de *C. carpio* generado a partir de la presencia de GSv en el medio, se promueve la integridad miofibrilar y con ello la capacidad de las proteínas para mantener el agua físicamente atrapada en las miofibrillas y entre miofibrillas y la membrana celular o sarcolema.

8.2.4. Determinación de solubilidad

Los resultados de solubilidad de músculo de *C. carpio* se presentan a continuación. Se observó un aumento del % de solubilidad de las proteínas a las 72 h y 96 h, aunque esta diferencia no resulta significativa con respecto a grupo control ($P < 0.05$). Ninguna concentración presenta un comportamiento tiempo-dependiente en el aumento de solubilidad de las proteínas. Estos cambios no resultan significativos.

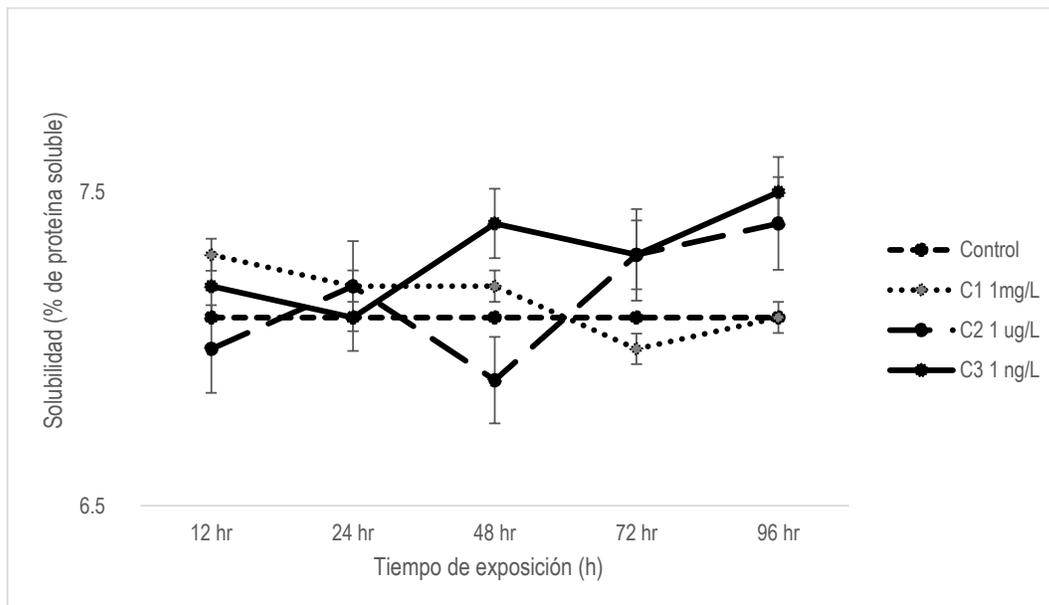


Figura 16. Solubilidad de músculo de *C. carpio* expuesto a glicósidos de steviol por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a *= control, a= C1 1 mg/L, b= C2 1 µg/L y c= C3 1 ng/L. ANOVA y Test de LSD.

La estabilidad proteica puede verse modificada por diversos factores, entre ellos la oxidación, afectando los enlaces de unión como fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, e interacciones electrostáticas. Al existir una afectación en estos enlaces la energía libre de estabilización disminuye, orientando a los aminoácidos hidrofílicos hacia la superficie de la proteína y exponiendo a los aminoácidos hidrofóbicos resultando en pérdida de solubilidad. En el presente estudio no se observa una disminución significativa de la solubilidad con respecto a grupo control lo que se encuentra en concordancia con los resultados de disminución de la oxidación proteica debido al efecto protector de los glicósidos de steviol. Se puede observar que a las 72 h y 96 h existe un aumento aunque no estadísticamente significativo en la solubilidad de las proteínas en todas las concentraciones de GSv. Diferencias significativas en este parámetro de estudio tanto en aumento como en decremento pueden reflejar un cambio

conformacional de las proteínas que afectan directamente a las propiedades funcionales y tecnológicas de los productos cárnicos. De acuerdo a Estevez (2011) una de las consecuencias de la oxidación proteica, la formación de grupos carbonilo, genera la pérdida de grupos amino, modificación en las interacciones electrostáticas en las proteínas miofibrilares y pérdida de solubilidad, disminuyendo con ello la funcionalidad de los productos cárnicos. Por otro lado, un aumento significativo en la solubilidad, puede indicar incremento de la actividad proteolítica o desnaturalización de las proteínas miofibrilares. La desnaturalización proteica es un factor importante que afecta las propiedades funcionales como la solubilidad, la capacidad de retención de agua, viscosidad y formación de geles. Podemos presumir que aun cuando a las 72 h y 96 h se observa un aumento en la solubilidad proteica en las tres concentraciones, este puede deberse a un cambio conformacional de las proteínas y posible liberación de péptidos de menor peso molecular. El perfil electroforético muestra la integridad de las proteínas miofibrilares a las 12 h, 24h y 48 h ya que las bandas se observan sin cambios con respecto a grupos control en cada tiempo, al igual que los análisis de CRA y los geles formados para el análisis de perfil de textura, sin embargo se observa que a las 72 h y 96 h aparece una banda de menor PM (37 kD) que no se observa en tiempos anteriores, lo cual indica que se ha liberado un péptido de menor peso que explicaría en un momento dado el aumento en la concentración de proteínas solubles. En el año 2002, Badii & Howell realizaron un estudio de efecto de antioxidantes, citrato y crioprotectores en la desnaturalización de proteínas y textura de bacalao congelado, encontrando que la presencia de estas sustancias en los productos pesqueros mejora la solubilidad de las proteínas en comparación con la muestra sin tratamiento debido al efecto protector de los antioxidantes que disminuyeron el daño en proteínas, comportamiento igualmente observado en nuestro estudio.

8.2.5 Determinación de grupos sulhidrido (SH) y disulfuro totales (SS)

El contenido de grupos sulhidrido y disulfuro libres se presentan en la **Fig. 17**. Los grupos sulhidrido y disulfuro libres presentaron diferencia significativa con respecto a grupo control ($P < 0.05$) a las 96 h para la C2 y C3. Las reducciones fueron de 12.4% y 14.0% respectivamente.

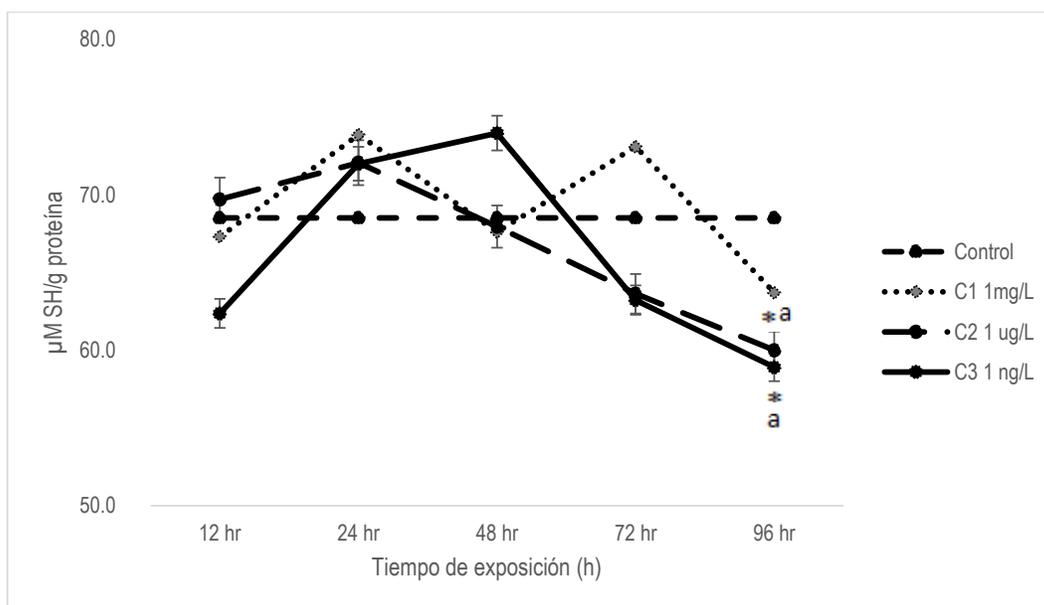


Figura 17. Contenido de grupos sulhidrido y disulfuro totales en músculo de *C. carpio* expuesto a glicósidos de steviol por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a *= control, a= C1 1 mg/L, b= C2 1 µg/L y c= C3 1 ng/L. ANOVA y Test de LSD.

La conversión de grupos sulhidrido en grupos disulfuro es uno de los fenómenos más evidentes cuando se ha llevado a cabo el fenómeno de oxidación proteica. Estudios llevados a cabo por Liu *et al.* (2000) sobre oxidación de proteínas miofibrilares, mencionan la pérdida de grupos sulhidrido en proteínas miofibrilares después de ser sometidas a condiciones oxidantes, simultáneamente observaron un aumento en los grupos disulfuro. La miosina que resulta ser casi el 55% de las proteínas miofibrilares contiene cerca de 42 grupos sulhidrido sin grupos disulfuro, mientras que

la actina que representa cerca del 20% de las proteínas miofibrilares tiene alrededor de 12 grupos sulfhidrilo y no contienen grupos disulfuro. En este estudio se observó una disminución de los grupos sulfhidrilo totales con respecto a grupo control a las 96 h en la C2 y C3 lo que se podría explicar por un cambio conformacional de las proteínas miofibrilares. Diversos estudios llevados a cabo con proteína de soya han comprobado que un aumento de grupos sulfhidrilo y/o su forma oxidada se encuentran relacionados con la insolubilización proteica (Saio *et al.*, 2014). Por otro lado algunos compuestos que se encuentran de manera natural en el músculo como lípidos insaturados, pigmentos heme, metales de transición y enzimas oxidativas pueden actuar como potenciales precursores o catalizadores de la formación de ERO's y por lo tanto juegan un importante papel en el proceso de oxidación de proteínas (Xiong, 2000); en este estudio se observa por tanto la importancia de la actividad protectora mostrada por los glicósidos de steviol en la prevención de la oxidación de las proteínas del músculo y la disminución de la formación de entrecruzamientos y pérdida de grupos sulfhidrilo producto del daño oxidativo a aminoácidos azufrados.

8.3 Análisis de Perfil de Textura

Se realizó un Análisis de Perfil de Textura (TPA) al músculo de carpa común *Cyprinus carpio* expuesto a concentraciones de 1 mg/L, 1 µg/L y 1 ng/L de glicósidos de steviol, los resultados se observan en la Tabla 8. Se evaluaron los siguientes atributos: dureza, cohesividad, elasticidad, gomosidad y resiliencia. No se observaron diferencias significativas con respecto a grupo control en ningún atributo, concentración y/o tiempo de exposición.

Tabla 8. TPA de músculo de *C. carpio* expuestos a 1 mg/L, 1 µg/L y 1 ng/L de glicósidos de steviol por 12, 24, 48, 72 y 96 h. Diferencia significativa ($P < 0.05$) con respecto a *= control. ANOVA y Test de LSD.

Parámetro	Concentración	Tiempo de exposición				
		12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Dureza	Control	3.259	3.259	3.259	3.259	3.259
	1 mg/L	3.272 ^a	3.409 ^a	3.069 ^b	3.197 ^a	3.406 ^a
	1 µg/L	3.307 ^a	3.026 ^a	3.272 ^a	3.591 ^a	3.498 ^a
	1 ng/L	3.225 ^a	3.030 ^a	3.229 ^a	3.355 ^a	3.327 ^a
Cohesividad	Control	0.446	0.446	0.446	0.446	0.446
	1 mg/L	0.459 ^a	0.413 ^b	0.417 ^a	0.463 ^a	0.459 ^a
	1 µg/L	0.434 ^a	0.460 ^a	0.465 ^a	0.450 ^a	0.483 ^a
	1 ng/L	0.455 ^a	0.484 ^a	0.393 ^a	0.459 ^a	0.471 ^a
Elasticidad	Control	0.9998	0.9998	0.9998	0.9998	0.9998
	1 mg/L	0.9999 ^a	1.0000 ^a	0.9998 ^a	0.9999 ^a	1.0000 ^a
	1 µg/L	1.0000 ^a	1.0000 ^a	1.0000 ^a	1.0000 ^a	0.9998 ^a
	1 ng/L	1.0000 ^a	1.0000 ^a	1.0000 ^a	1.0000 ^a	0.9998 ^a
Gomosidad	Control	1.457	1.457	1.457	1.457	1.457
	1 mg/L	1.494 ^a	1.411 ^a	1.371 ^a	1.254 ^b	1.557 ^a
	1 µg/L	1.436 ^a	1.390 ^a	1.519 ^a	1.615 ^a	1.692 ^a
	1 ng/L	1.465 ^a	1.466 ^a	1.270 ^b	1.543 ^a	1.570 ^a
Resiliencia	Control	0.872	0.872	0.872	0.872	0.872
	1 mg/L	0.867 ^a	0.762 ^b	0.873 ^a	0.896 ^a	0.864 ^a
	1 µg/L	0.873 ^a	0.914 ^a	0.881 ^a	0.914 ^a	0.892 ^a
	1 ng/L	0.761 ^a	0.872 ^a	0.874 ^a	0.886 ^a	0.821 ^a

Valores con letras diferentes dentro de la columna son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Wan-Ling *et al.* (2012) mencionan que entre las características sensoriales más importantes a evaluar en los productos cárnicos se encuentran la dureza, resiliencia, cohesividad, gomosidad, elasticidad, dentro de las cuales la dureza se considera el atributo principal cuando se habla de productos acuícolas y marinos. Zakrys *et al.* (2009) han confirmado la relación entre la oxidación de proteínas y la disminución de características sensoriales en músculo de res al disminuir la degradación proteolítica en la carne durante la maduración y al inducir el entrecruzamiento vía puentes disulfuro. Así mismo debido a que la μ -calpaína y la m-calpaína contienen ambas histidina y residuos de cisteína que contiene grupos tiol (SH) en sus sitios activos, la degradación de dichos grupos debido a las condiciones oxidantes puede generar inactivación enzimática. En este estudio

no se observaron diferencias significativas en los parámetros de textura analizados en ningún tiempo de exposición y concentración de GSv con respecto a grupo control ($p < 0.05$), lo cual se encuentra en concordancia con los resultados obtenidos en EO y las pruebas fisicoquímicas. La actina y la miosina son las principales proteínas que conforman el músculo de *C. carpio*. La integridad de estas proteínas se ve reflejada en las características texturales de la carne de dicha especie. La disminución significativa de los biomarcadores de EO tiene como consecuencia la preservación de la integridad de las fibrillas musculares y por lo tanto la capacidad de las proteínas miofibrilares para producir una buena gelificación del producto analizado.

Por otro lado uno de los parámetros fisicoquímicos estudiados, la CRA que no tuvo diferencia estadísticamente significativa en este estudio, juega un papel fundamental en la determinación de la textura del producto final. La mayor cantidad de agua en el músculo de pescado se encuentra como agua libre, mientras que solamente una pequeña porción se encuentra como agua ligada de las diferentes biomoléculas que conforman dicho tejido. Consecuentemente un aumento significativo en el contenido de agua del músculo reduce su integridad mecánica (disminución de la dureza), así como una disminución significativa de dicho contenido altera la solvatación y genera un aumento en la dureza, gomosidad, elasticidad, cohesividad y resiliencia del producto analizado (Wan-Ling *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en el TPA de músculo de *C. carpio* expuesto a GSV se encuentran en concordancia con los resultados obtenidos en la prueba de CRA donde no se encontró diferencia significativa con respecto a grupo control ($p < 0.05$).

La relación existente entre el efecto protector de GSv, los parámetros fisicoquímicos y los atributos de textura analizados resulta evidente; se observa que la presencia de GSv en el medio acuático puede disminuir el estrés oxidativo lo cuál deriva en un valor aceptable de pH del músculo de *C. carpio*. Es importante destacar que la variación en el pH muscular puede tener como consecuencia

que se presenten las condiciones idóneas para la actividad enzimática proteolítica endógena y exógena. La disminución de los grupos SH consecuencia de la oxidación de aminoácidos azufrados como la cisteína y la metionina genera entrecruzamientos y alteraciones en las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas de las proteínas miofibrilares, modificando con ello la estructura de las miofibrillas musculares al disminuir las interacciones proteína-agua con la consecuente disminución de la CRA que en textura se ve reflejado en un aumento en la dureza, cohesividad, gomosidad, elasticidad y resiliencia del producto. Por otro lado, alteraciones significativas en la solubilidad de las proteínas, consecuencia de cambios conformacionales y/o condiciones oxidantes, produce aumento en la dureza del producto al generarse entrecruzamientos proteicos.

Estudios han mostrado que la calidad y la vida útil de pescados puede ser mejorada al adicionarlos con antioxidantes de origen natural antes o después del sacrificio (Velasco & Williams, 2011; Iglesias et al., 2012). Se ha reportado que dichas estrategias retrasan la tasa de oxidación de lípidos y el crecimiento microbiano en productos de origen marino (Iglesias *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2017). Ortiz-Viedma *et al.* (2017) llevaron a cabo un estudio sobre el efecto protector de extractos de hojas de stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) durante la preservación de salmón en refrigeración donde concluyeron que los productos que habían sido tratados con los extractos presentaban una mayor estabilidad contra la rancidez lipídica y una moderada inhibición microbiana. De acuerdo a Stoyanova *et al.* (2011) la fuerte capacidad de los steviósidos para contrarrestar los efectos generados por OH* sugieren que además de actuar como edulcorante, puede ser utilizado como antioxidante al ser añadido a diversos alimentos.

8.4 Perfil electroforético SDS-PAGE

Para realizar la comprobación de los resultados obtenidos en los análisis de EO y las pruebas fisicoquímicas y de textura se llevó a cabo un perfil electroforético desnaturante del músculo de *C. carpio* expuesto a C1=1 mg/L, C2= 1µg/L y C3= 1 ng/L de glicósidos de steviol por 12, 24, 48, 72 y 96 h. El perfil arrojó los siguientes resultados: No se observa degradación de proteínas de alto PM en ninguno de los tiempos de observación, solamente se observa la aparición de un péptido de bajo peso molecular a las 72h y 96 h en todas las concentraciones.

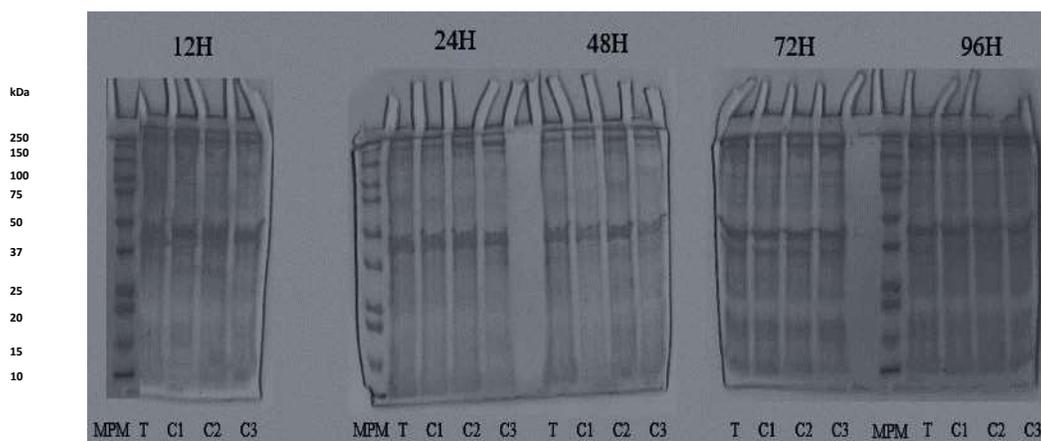


Figura 18. Perfil electroforético de músculo de *C. carpio* expuesto a C1=1 mg/L, C2= 1µg/L y C3= 1 ng/L de glicósidos de steviol por 12, 24, 48, 72 y 96 h.

En el campo de la ciencia de los productos cárnicos es conocido que las proteínas del músculo de pescado tienden a sufrir desnaturalización y/o formar agregados durante el almacenamiento. La formación de agregados se genera a partir de la presencia de formaldehído, que es producido por algunas especies de peces debido a la degradación de la trimetilamina, la oxidación de los ácidos grasos, así como la presencia de aldehídos y cetonas generados a partir de la oxidación de los lípidos, los cuales aceleran la desnaturalización de las proteínas, principalmente las proteínas miofibrilares. Es importante destacar que en diferentes modelos ha sido comprobado que el MDA

reacciona con las proteínas miofibrilares para generar agregados. La utilización de técnicas como la electroforesis SDS-PAGE nos permite conocer el grado de daño de las proteínas al observar modificaciones en las bandas generadas a partir de la separación de las proteínas miofibrilares. Esta tecnología ofrece una herramienta fiable utilizada para la separación, identificación y purificación de proteínas. La electroforesis realizada en músculo de carpa común expuesta a tres concentraciones de GSV muestra integridad de las bandas correspondientes a la cadena pesada de miosina y la cadena ligera de la actina durante los tiempos de exposición con respecto al grupo control, las proteínas separadas se observan casi sin alteraciones en todos los tiempos de exposición y concentraciones de GSV analizadas a excepción de las 72 h y 96 h donde se observa mayor intensidad de una banda de menor peso molecular (37 kD aproximadamente) que pudiera indicar degradación proteica, incremento en la actividad proteolítica y liberación de un péptido de menor tamaño, que podría corresponder a la troponina T 37.9 kDa o a la β -tropomiosina 39.5 kDa. Wang *et al.* (2010) observaron que una disminución de pH entre 6.3 y 6.0 en músculo de pescado puede generar la degradación de la cadena pesada de miosina y que a pH mayores de hasta 6.9 esa degradación se veía particularmente disminuida, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, ya que no se observa degradación de las bandas de la cadena pesada de miosina (250 kDa) a los pH encontrados en el músculo de *C. carpio* en todos los tiempos y concentraciones analizadas. Los resultados de biomarcadores de EO en el caso de músculo se pueden ver confirmados con el perfil electroforético. La electroforesis realizada en este estudio es un análisis solamente de proteínas, sin embargo hay que tener en cuenta que la compleja expresión de las proteínas en las células y en los tejidos animales refleja la homeostasis total del animal vivo, es decir la forma en la que el medio ambiente influencia al organismo y las reacciones que éste tiene para mantenerse en equilibrio con el medio.

9. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran que las concentraciones de glicósidos de steviol utilizadas (1 mg / L, 1 µg /L y 1 ng/L) no son capaces de inducir aumento significativo de estrés oxidativo en sangre, hígado y músculo de *C. carpio* o efectos deletéreos en la carne de dicha especie, por el contrario parece que se induce un efecto antioxidante.

Los resultados de EO muestran que a las concentraciones de GSv utilizadas se observa disminución significativa en los biomarcadores analizados de oxidación celular TBARS, CHP, CPC y actividad antioxidante SOD y CAT en los órganos analizados principalmente para la concentración de 1 mg/L.

Los parámetros fisicoquímicos pH, porcentaje de acidez, CRA, solubilidad, grupos sulhidrilo y disulfuros totales, y de textura TPA de la carne de *C. carpio* no mostraron diferencia significativa a ningún tiempo de exposición y/o concentración analizada, lo que se encuentra en concordancia con los resultados de EO. El perfil electroforético llevado a cabo al músculo de *C. carpio* muestra integridad de las principales proteínas de la carne de carpa, la miosina y la actina principales responsables de las características funcionales y tecnológicas del producto de estudio.

Consideramos importante la realización de estudios ecotoxicológicos de glicósidos de steviol y de sus productos de transformación donde se analicen concentraciones ambientales y se evalúe el riesgo ecotoxicológicos a través de estudios de toxicidad en bioindicadores a diversos niveles de cadena trófica ya que el efecto antioxidante encontrado en *C. carpio* a las concentraciones estudiadas podría producir otros comportamientos en diferentes especies.

Las proyecciones de consumo del edulcorante para los siguientes años nos indican que en un futuro las concentraciones medioambientales de glicósidos de steviol pueden ir del orden de

nanogramos a miligramos por lo que este trabajo sienta un precedente del estudio de los efectos tóxicos que pueden derivarse de su presencia en los cuerpos de agua, la cual aunada a la presencia de otros contaminantes prioritarios y emergentes podría generar relaciones sinérgicas, antagonismos o efectos aditivos cuyas consecuencias deben ser estudiadas, ya que los organismos acuáticos resultan ser especialmente sensibles a la exposición a sustancias contaminantes ya que en ellos toma lugar una cascada de eventos biológicos si la concentración de contaminantes es demasiado alta, el tiempo de exposición es suficiente para generar efectos adversos o si los xenobióticos y/o sus productos de transformación biótica o abiótica resultan ser particularmente tóxicos.

10. REFERENCIAS

- Abou-Donia, M. B., El-Masry, E. M., Abdel-Rahman, A. A., McLendon, R. E., & Schiffman, S. S. (2008). Splenda alters gut microflora and increases intestinal p-glycoprotein and cytochrome p-450 in male rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 71(21), 1415-1429.
- Adams, S.M., & Greeley, M.S. (2000). Ecotoxicological indicators of water quality: using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. *Water, Air & Soil Pollution*, 123, 103–115.
- Agüeda, E.M. (2006). Cambios bioquímicos post-mortem en músculo de diferentes especies pesqueras. Determinación de la vida útil de las mismas en frío. Tesis Universidad de Mar del Plata.
- Ahmed, A.M., & Muguruma, M. (2010). A review of meat protein hydrolysates and hypertension. *Meat Science*, 86, 110–118.

Alasalvar, C., Shahidi, F., Miyashita, K., Wanasundara, U. (2011). Handbook of Seafood Quality, Safety and Health Applications. *John Wiley & Sons*. 132-133.

Aldershville, J., Ambrosio, G., Bayés de la Luna, A., Badimon, L., Bertrand M., Cleand, J. (1998). Estrés oxidativo (especies reactivas de oxígeno), patología cardiovascular (Parte I) *European Cardiology Journal*; 3(72).

Almeida, J., Casado, G., García, J. (2013) Una visión global y actual de los edulcorantes. Aspectos de regulación, *Nutrición Hospitalaria*; 28 (Supl. 4), 17-31.

An Overview of Texture Profile Analysis (TPA), (2015). Recuperado de:

<http://texturetechnologies.com/texture-profile-analysis/texture-profile-analysis.php#section-01>

Arizmendi, 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.

Arbeláez, P., Borrull, F., Pocurull, E., & Marcé, R. M. (2015). Determination of high-intensity sweeteners in river water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1393, 106-114.

Arredondo-Vargas, E., Osuna-Paredes, C., Meléndez-Galicia, C., de Jesús-Avedaño, C., & Hernández-Montaño, D. (2012). *Cyprinus carpio* carpa común. En: Pesquerías Continentales de México. *Instituto Nacional de Pesca*, México, 43-44.

Awney, H. A., Massoud, M. I., & El-Maghrabi, S. (2011). Long-term feeding effects of stevioside sweetener on some toxicological parameters of growing male rats. *Journal of Applied Toxicology*, 31(5), 431-438.

Bagnyukova, T. V., Chahrak, O. I., & Lushchak, V. I. (2006). Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquatic Toxicology*, 78(4), 325-331.

Barceló, D., & López, M. J. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Jornadas de presentación de resultados: el estado ecológico de las masas de agua. Panel científico-técnico de seguimiento de la política de aguas, Sevilla.

Barrera-Escorcía, G., & Namihira-Santillán, P. E. (2004). Contaminación microbiológica en la zona costera de Akumal, Quintana Roo, México Microbiological contamination in the Akumal coastal zone, Quintana Roo State, Mexico. *Hidrobiología*, 14(1), 27-35.

Barriocanal, L. A., Palacios, M., Benitez, G., Benitez, S., Jimenez, J. T., Jimenez, N., & Rojas, V. (2008). Apparent lack of pharmacological effect of steviol glycosides used as sweeteners in humans. A pilot study of repeated exposures in some normotensive and hypotensive individuals and in Type 1 and Type 2 diabetics. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 51(1), 37-41.

Becerril, J, 2009. Contaminantes Emergentes en el Agua. En: Revista Digital Universitaria. (2009). Vol. 10. N° 8. p. 1-7 Recuperado de:

<http://www.revista.unam.mx/vol.10/num8/art54/art54.pdf>

Berlett, B., Stadtman, E. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 20313–6.

Berset, J. D., & Ochsenbein, N. (2012). Stability considerations of aspartame in the direct analysis of artificial sweeteners in water samples using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS). *Chemosphere*, 88(5), 563-569.

Bolontrade, A., Scilingo, A. & Añón, M. (2013). Amaranth Proteins Foaming Properties: Adsorption Kinetics and Foam formation—Part 1. Colloids and Surfaces B: *Biointerfaces*, vol. 105, 319–327.

Boots, A. W., Haenen, G. R., & Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European journal of pharmacology*, 585(2), 325-337.

Bourne, M. (2002). Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement Food science and technology international series, Academic Press, pp. 12-16.

Buegue, J., Aust, S. (1978). Methods in Enzymology, Academic Press, 30, 302-310.

Buerge, I. J., & Poiger, T. (2011). Acesulfam: ein künstlicher Süßstoff als Abwasserindikator. *Nachrichten aus der Chemie*, 59(11), 1084-1086.

Buerge I.J., Buser H.-R., Kahle M., Muller M.D., Poiger T., (2009). Ubiquitous Occurrence of the Artificial Sweetener Acesulfame in the Aquatic Environment: An Ideal Chemical Marker of Domestic Wastewater in Groundwater, *Environmental Science & Technology*, 43(12), 4381-4385.

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

Butterfield, D., Stadtman, E., (1997). Protein oxidation processes in aging brain. *Advantage of Cell Aging Gerontology*; 2:161–191

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Braña, D., Ramírez, E., Rubio, M., Sánchez, A., Torrescano, G., Arenas, M., Partida, J., Ponce, E., Rpiios, F. (2011). Manual de Análisis de Calidad en Muestras de Carne. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal, México, 13-14.

Brorström-Lundén, E., Svenson, A., Viktor, T., Woldegiorgis, A., Remberger, M., Kaj, L. & Schlabach, M. (2008). Measurements of Sucralose in the Swedish Screening Program 2007: PART I; Sucralose in surface waters and STP samples.

Brusick, D. J. (2008). A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. *Food & Chemistry Toxicology*, 46(7), S83-S91.

Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., & Parma, M. J. (2014). Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: a field caging study. *Ecological Indicators*, 38, 104-112.

Chatsudthipong V, Muanprasat C. (2009). Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacology & therapeutics*, 12(1), 41–54.

Chan P, Tomlinson B., Chen Y., Liu J., Hsieh M., & Cheng, J. (2000). A double blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 50(3), 215-220.

Chaijan, M. (2008). Review: Lipid and myoglobin oxidations in muscle foods. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 30(1), 47–53.

Chevion M, Berenshtein E., & Stadtman ER. (2000). Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radical Research*, 33, S99– 108.

Crammer, B., & Ikan, R. (1987). Progress in the chemistry and properties of the rebaudiosides. *Developments in Sweeteners*, 3, 45-64.

Cnubben, N., Rietjens, I., Wortelboer, H., Van Zenden, J., & Van Bladeren, P. (2001) The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. *Environmental Toxicology & Pharmacology*, 10(4), 141-152.

Corotto, F. S., & O'brien, M. R. (2002). Chemosensory stimuli for the walking legs of the crayfish *Procambarus clarkii*. *Journal of Chemistry & Ecology*, 28(6), 1117-1130.

Curry, L. L., & Roberts, A. (2008). Subchronic toxicity of rebaudioside A. *Food & Chemistry Toxicology*, 46(7), S11-S20.

Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2006). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of cellular and molecular medicine*, 10(2), 389-406.

Daudin, J. D., & Bucharles, C. (1991). Tecnología de la carne y de los productos cárnicos. *Editorial Acribia*, SA Zaragoza (España).

Davies, M. J., & Dean, R. T. (Eds.) (2003). Radical-mediated Protein Oxidation. Oxford Science Publications, 45-47.

Davis, K.B., 2006. Management of physiological stress in finfish aquaculture. *North American Journal of Aquaculture*, 68, 116–121.

De Boeck, G., Smolders, R., & Blust, R. (2010). Copper toxicity in gibel carp *Carassius auratus gibelio*: importance of sodium and glycogen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 152(3), 332-337.

Di Giulio, R. T., Washburn, P. C., Wenning, R. J., Winston, G. W., & Jewell, C. S. (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8(12), 1103-1123.

Díaz-Acosta, A., & Membrillo-Hernández, J., (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Tip Revista Especializada en ciencias químico-biológicas*, 9(1), 34-44.

Dublán- G O., (2006). Evaluación de los cambios estructurales y fisicoquímicos del manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) durante el almacenamiento en refrigeración o congelación, México, D.F. Universidad Autónoma Metropolitana, 54-62. Tesis de Doctorado en Biotecnología. UAM Iztapalapa.

Dublán, O., Cruz, C., Guerrero, L., & Ponce, E., (2006). Effect of refrigerated storage on proteolytic activity and physicochemical and microstructural properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) mantle muscle. *Journal of Muscle Foods*, 17(3), 291-310.

Eissa, L., Salibian A., Ferrari, L., Porta, P., Borgnia, M., (2003) Evaluación toxicológica no invasiva del Cadmio: modificaciones de biomarcadores conductuales en *Cyprinus carpio*. *Biología Acuática*, 20(1), 221.

Estévez, M., Kylli, P., Puolanne, E., Kivikari, R., & Heinonen, M., (2008). Fluorescence spectroscopy as a novel approach for the assessment of myofibrillar protein oxidation in oil-in-water emulsions. *Meat Science*, 80(4), 1290–1296.

Estévez, M., Kylli, P., Puolanne, E., Kivikari, R., & Heinonen, M., (2008). Oxidation of skeletal muscle myofibrillar proteins in oil-in-water emulsions: interaction with lipids and effect of selected phenolic compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(22), 10933–10940.

European Parliament and Council of the European Union, Regulation (EC) No 1333/2008 on Food Additives, (2008), L354/316-333.

Espina, S., & Vanegas, C. (2005). Ecofisiología y contaminación. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, *Instituto Nacional de Ecología. Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias*, México, 53-78.

Estrada, P., (2005) Desarrollo de una salchicha de pescado utilizando como materia prima carne de trucha (*Salmo gairdneri*) y carpa (*Cyprinus carpio mounis*). Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, 3-25. Tesis de Licenciatura. México.

Fang, M., Liu, W., Meng, F., & Sun, H., (2009). Aberrant methylation at promoter región of HOX A gene cluster in leukemia cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 30 (7), 468-472.

Farombi, E., Adelowo, O., & Ajimoko, Y., (2007). Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 4(2), 158-165.

Fassiano, A., Ríos de Molina, M., & Juárez, A., (2013) Biomarcadores Señal de alerta de contaminación ambiental, aplicación del estrés oxidativo, 2(131):8-12.

Fennema, O. (2000). Química de los alimentos. 2ª edición. España. Acribia. pp. 412-504.

Ferrer, I., & Thurman, E. M. (2010). Analysis of sucralose and other sweeteners in water and beverage samples by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), 4127-4134.

Formigari, A., Irato, P., & Santon, A. (2007). Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(4), 443-459.

García-Carreño, F. L., & Haard, N. F. (1993). Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 17, 97-113.

García-Almeida, J. M., Casado Fdez, G. M., & García Alemán, J. (2013). Una visión global y actual de los edulcorantes: aspectos de regulación. *Nutrición Hospitalaria*, 28, 17-31.

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 physiology and biochemistry*, 36(4), 875-882.

Gardana, C., Simonetti, P., Canzi, E., Zanchi, R., & Pietta, P. (2003). Metabolism of stevioside and rebaudioside A from *Stevia rebaudiana* extracts by human microflora. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(22), 6618-6622.

Garrison, W. M. (1987). Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chemical Reviews*, 87(2), 381-398.

Gaspar-Dillanes, M., & Hernández-Montaña D., (2012). Pesquerías Continentales de México. Instituto Nacional de Pesca, México, 9-10.

Geeraert, B., Crombé, F., Hulsmans, M., Benhabiles N., Geuns, J., & Holvoet, P., (2010). Stevioside inhibits atherosclerosis by improving insulin signaling and antioxidant defense in obese insulin-resistant mice. *International Journal of Obesity*, 34(3), 569-577.

Geuns, J., (2003) Molecules of Interest Stevioside, *Phytochemistry*, 64; 913-921.

Geuns, J. M., Buyse, J., Vankeirsbilck, A., Temme, E. H., Compennolle, F., & Toppet, S. (2006). Identification of steviol glucuronide in human urine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(7), 2794-2798.

Geuns, J. M., Buyse, J., Vankeirsbilck, A., & Temme, E. H. (2007). Metabolism of stevioside by healthy subjects. *Experimental Biology & Medicine*, 232(1), 164-173.

Geuns J.M. & Struyf T., (2010) Radical scavenging activity of steviol glycosides and steviol glucuronide, Proceedings of the 4th EUSTAS Stevia Symposium, Stevia, Science no Fiction, J. M. C. Geuns, Ed., pp. 191–207.

Gil, M., Soto, A., Usma, J., & Gutiérrez, O., (2012) Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos, *Producción más limpia*, 7(2), 52-73.

Gil, F. (2000) El papel de los biomarcadores en Toxicología humana. *Revista de Toxicología.*, 17(1), 19-26.

Goyal, S. K., & Goyal, R. K., (2010). Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 61(1), 1-10.

Guerrero, I., Rosmini. M., & Armenta, R., (2009), Tecnología de productos de origen acuático, Editorial Limusa, 171-180.

Gunzler, W., & Flohe-Clairbone, A., (1985). Glutathione peroxidase. In R. A. Green-Wald (Ed.), *Handbook of Meth. Ox. rad.*, 285-290.

Gutteridge, J., (1995). Lipid peroxidation and antioxidant biomarkers oftissue damage. *Clinical Chemistry* 41, 1819-1828.

Hagerman, A. E., Dean, R. T., & Davies, M. J., (2003). Radical chemistry of epigallocatechin gallate and its relevance to protein damage. *Archives of biochemistry and biophysics*, 414(1), 115-120.

Hajihashemi, S., & Geuns, J. M., (2013). Free radical scavenging activity of steviol glycosides, steviol glucuronide, hydroxytyrosol, metformin, aspirin and leaf extract of *Stevia rebaudiana*. *Free Radical Antioxidants*, 3, S34-S41.

Hall, G., (2012). *Fish Processing Techonology*. Springer *Science & Business Media*, 75-77.

Halliwell B, Gutteridge J., (1999). *Free radicals in biology and medicine*, *Oxford Univ. Press.*, 145-157.

Halliwell, B., (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2), 321-322.

Hamid, A., Aiyelaagbe, O., Usman, L., Ameen, O., & Lawal A., (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications, *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 4(8), 142-151.

Handy, et al., (2009). Glutathione Peroxidase-1 Regulates Mitochondrial Function to Modulate Redox-dependent Cellular Responses. *Journal of Biological Chemistry*, 284(18), 11913-11921.

Hay, M. E. (2009). Marine chemical ecology: chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, 1, 193.

Henríquez, D., (2012). Presencia de contaminantes emergentes en aguas y su impacto en el ecosistema. Estudio de caso: productos farmacéuticos en la cuenca del río Biobío, Región del Biobío, Chile, Tesis, Universidad de Chile. Tesis de Máster, Chile.

Hernández, A., (2002). El cuidado del medio ambiental: análisis, reseñas, propuestas, crónicas, tesis, concepciones y paradigmas, UAEM, 23-24

Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. Functional metabolism: Regulation and adaptation, *Functional metabolism: Regulation and adaptation* 1, 319-66.

Hjorth, M., Hansen, J. H., & Camus, L. (2010). Short-term effects of sucralose on *Calanus finmarchicus* and *Calanus glacialis* in Disko Bay, Greenland. *Chemistry & Ecology*, 26(5), 385-393.

Honikel, K., & Hamm, R., (1994). Measurement of water-holding capacity and juiciness. In: *Advances in Meat Research*. Vol. 9. Quality Attributes and their Measurement in Meat, Poultry and Fish Products (ed. A.M. Pearson and T.R. Dutson). Blackie Academic and Professional. London, UK.; 125-161.

Houtman, C. (2010) Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. *Journal of Integrative Environmental Sciences*, 7(4), 271–295.

Huang, Z. Y., Zhang, Q., Chen, J., Zhuang, Z. X., & Wang, X. R. (2007). Bioaccumulation of metals and induction of metallo-thioneins in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) co-exposed to cadmium, mercury and lead. *Applied organometallic Chemistry*, 21(2), 101-107.

Huff-Lonergan, E., & Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat science*, 71(1), 194-204.

Huggett, D. B., & Stoddard, K. I. (2011). Effects of the artificial sweetener sucralose on *Daphnia magna* and *Americamysis bahia* survival, growth and reproduction. *Food & Chemistry Toxicology*, 49(10), 2575-2579.

Hui, Y., & Shekrat, F., (2005). Handbook of Food Science, Technology, and Engineering - 4 Volume Set. *Food Science & Technology*, Vol. 4, 58.

Hurrell, R., (2003). Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *Journal of Nutrition*, 133(9), 2973S–2977S.

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; 202.

Iglesias J., Pazos, M., Torres J.L., Medina I. (2012) Antioxidant mechanism of grape procyanidins in muscle tissues: Redox interactions with endogenous ascorbic acid and α -tocopherol. *Food Chemistry*, 134, 1767–1774.

Ikeda, S., & Nishinari, K. (2001). On Solid-like Rheological Behaviors of Globular Protein Solutions. *Food Hydrocolloids*, 15(4), 401–406.

Imai, H., Nakagawa, Y. (2003) Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 34, 145-169.

International Stevia Council .Increased interest in stevia as mainstream ingredient confirmed.

(2012) Recuperado de:

<http://www.internationalsteviacouncil.org/index.php?id=185>

Irazusta, V., Moreno-Cermeño A., Ros, J., & Tamarit, J., (2008). Estrategias proteómicas para el análisis de grupos carbonilo como marcadores de daño oxidativo en proteínas. *Proteómica*. 2(1), 51-58.

Irie, M., Asami, S., Ikeda, M., & Kasai, H. (2003). Depressive state relates to female oxidative DNA damage via neutrophil activation. *Biochemical and biophysical research communications*, 311(4), 1014-1018.

Jackson, A. U., Tata, A., Wu, C., Perry, R. H., Haas, G., West, L., & Cooks, R. G. (2009). Direct analysis of Stevia leaves for diterpene glycosides by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*, 134(5), 867-874.

Jarma A., Combatt E., & Cleves J., (2010). Aspectos nutricionales y metabolismo de *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Agronomía Colombiana.*, 28(2), 199-208.

Jeppesen P., Gregersen S., Poulsen C., & Hermansen K., (2000). Stevioside acts directly on pancreatic beta cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K⁺-channel activity. *Metabolism*, 49(2), 208–214.

Jeppesen, P., Gregersen, S., Alstrup, K., & Hermansen, K., (2002). Stevioside induces antihyperglycaemic, insulinotropic and glucagonostatic effects in vivo: studies in the diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Phytomedicine*, 9(1), 9–14.

Jímenez, A., (2014). Estudio de la degradación de edulcorantes en agua mediante tratamiento con radiación ultravioleta. Facultad de Ciencias Experimentales Universidad de Jaén, 1-2.

Jiang, Z., Hunt, J., & Wolff, S., (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 202(2), 384-389.

Jutabha, P., Toskulkao, C, & Chatsudhipong, V., (2000). Effect of steviosid on PAH transport by isolated perfused rabbit renal proximal tubule. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 78(9), 737-744.

Kanner, J., (1994). Oxidative processes in meat and meat products. *Meat Science*, 36(1), 169-189.

Kasai, H., (2003). A new automated method to analyze urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by a high-performance liquid chromatography- electrochemical detection system. *Journal of radiation research*, 44(2), 185–189.

Kazemi, S., Ngadi, M. O., & Gariépy, C., (2011). Protein denaturation in pork longissimus muscle of different quality groups. *Food and Bioprocess Technology*, 4(1), 102–106.

Kemp, C. M., Sensky, P. L., Bardsley, R. G., Buttery, P. J., & Parr, T., (2010). Tenderness—An Enzymatic view. *Meat Sci.*, 84(2), 248–256.

Kim, J., Choi, Y., & Choi, Y., (2002) Use of stevioside and cultivation of *Stevia rebaudiana* in Korea. In: Kinghorn, A.D. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal & Aromatic Plants Industrial Profile*, 19(1), 196–202.

Kinghorn, A. D. (Ed.). (2003). *Stevia: the genus Stevia*. CRC Press.

Kokotou M., Asimakopoulos A., & Thomaidis N., (2012). Artificial sweeteners as emerging pollutants in the environment: analytical methodologies and environmental impact. *Analytical Methods*, 4(10), 3057–70.

Konigsberg, M., (2008). Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones Médicas. Ed. Manual Moderno, 368.

Koyama, E., Kitazawa, K., Ohori, Y., Izawa, O., Kakegawa, K., Fujino, A., & Ui, M. (2003). In vitro metabolism of the glycosidic sweeteners, stevia mixture and enzymatically modified stevia in human intestinal microflora. *Food & Chemistry Toxicology*, 41(3), 359-374.

Koyama, E., Sakai, N., Ohori, Y., Kitazawa, K., Izawa, O., Kakegawa, K. & Ui, M. (2003). Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. *Food & Chemistry Toxicology*, 41(6), 875-883.

Kroger M, Meister K, & Kava R., (2006). Low-calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes: A Review of the Safety Issues. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 5(2), 35–47.

Kroyer, G. (2010). Stevioside and Stevia-sweetener in food: application, stability and interaction with food ingredients. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 5(2), 225-229.

Kuster M, López de Alda M, Hernando M, Petrovic M, Martín A, & Barceló D., (2008). Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). *Journal of Hydrology*, 358(1), 112-23.

Lambropoulou, D. A., & Nollet, L. M. (Eds.). (2014). Transformation products of emerging contaminants in the environment: Analysis, processes, occurrence, effects and risks. *John Wiley & Sons*,

Lange, F., Scheurer, M., & Brauch, H., (2012). Artificial sweeteners- a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403 (9), 2503-2518.

de la Lanza-Espino, G., Pulido, S. H., & Pérez, J. L. C. (2000). Organismos indicadores de la calidad del agua y de la contaminación (bioindicadores). Plaza y Valdés. 58-65.

Lapworth D.J., Baran N., Stuart M.E., & Ward R.S., (2012). Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence, *Environmental Pollution*, 163, 287-303.

Lee, C., Wong, K., Liu, J., Chen, Y., Cheng, J., & Chan, P., (2001). Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce anti-hypertension. *Planta Medica*, 67(09), 796-799.

Lee, J., Koo, N., & Min, D. B. (2004). Reactive oxygen species, aging, and antioxidative nutraceuticals. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 3(1), 21-33.

Levine, R., Williams, J., Stadtman, E., & Shacter, E., (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233, 346-357.

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

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

Livingstone, D. R. (2001). Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Marine pollution bulletin*, 42(8), 656-666.

Loos, R., Gawlik, B., Boettcher, K., Locoro, G., Contini, S., & Bidoglio, G., (2009). Sucralose screening in European surface waters using a solid-phase extraction-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry method. *Journal of Chromatography A*, 1216 (7), 1126-1131.

Lougovois, V. P., & Kyrana, V. R. (2005). Freshness quality and spoilage of chill-stored fish. *Food Policy, Control and Research*, 1, 35-86.

Lund, M., Heinonen, M., Baron, C., & Estévez, M., (2011). Protein oxidation in muscle food: A review. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(1), 83–95.

Lund, M. N., Luxford, C., Skibsted, L. H., & Davies, M. J., (2008). Oxidation of myosin by heme proteins generates myosin radicals and protein cross-links. *Biochemistry Journal*, 410(3), 565–574.

Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Husak, V. V., Luzhna, L. I., Lushchak, V., & Storey, K. B. (2005). Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37(8), 1670-1680.

L'Hocine, L. & Pitre, M. (2016). Quantitative and qualitative optimization of allergen extraction from peanut and selected tree nuts. Part 1. Screening of optimal extraction conditions using a D-optimal experimental design. *Journal of Food Chemistry*, 194, 780-786.

Magnarelli, G., (2015). Exposición ambiental a plaguicidas: biomarcadores en matrices de la tríada madre-placenta-feto, *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 49 (1), 39-53.

Mawhinney, D. B., Young, R. B., Vanderford, B. J., Borch, T., & Snyder, S. A. (2011). Artificial sweetener sucralose in US drinking water systems. *Environmental Science & Technology*, 45(20), 8716-8722.

Mayo, J. C., Tan, D. X., Sainz, R. M., Lopez-Burillo, S., & Reiter, R. J. (2003). Oxidative damage to catalase induced by peroxy radicals: functional protection by melatonin and other antioxidants. *Free Radical Research*, 37(5), 543-553.

Mead, R., Morgan, J., Avery, J., Keiber, R., Krik, A., Skrabal, S., & Willey, J. (2009). Occurrence of the artificial sweetener sucralose in coastal and marine waters of the United States. *Marine Chemistry*, 116 (1-4), 13-17.

Melis, M. S. (1999). Effects of chronic administration of *Stevia rebaudiana* on fertility in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 67(2), 157-161.

Melis, M. S., & Sainati, A. R. (1991). Effect of calcium and verapamil on renal function of rats during treatment with stevioside. *Journal of Ethnopharmacology*, 33(3), 257-262.

Miranda, S. (2011). Caracterización fisicoquímica, funcional y estructural de 7 productos marinos de importancia económica en México. Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. 8-22. Tesis de Licenciatura. México.

Miranda J.M., Ortiz J., Barros-Velázquez J., Aubourg S.P. (2016) Quality enhancement of chilled fish by including alga *Bifurcaria bifurcata* extract in the icing medium. *Food and Bioprocess Technology*, 9, 387-395.

Mitjavila, M. T., & Moreno, J. J. (2012). The effects of polyphenols on oxidative stress and the arachidonic acid cascade. Implications for the prevention/treatment of high prevalence diseases. *Biochemical Pharmacology*, 84(9), 1113-1122.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, & Van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9 (10), 490–498.

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 Biological Chemistry*, 247(10), 3170-3175.

McClements, D. J. Food Emulsions: Principles, Practice, and Techniques. (2005) US: *CRC Press Inc*, Recuperado de http://books.google.com/books?id=huCSbPwyvBoC&printsec=frontcover&hl=sv&source=gb_s_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false (2016-08-10)

Morelli R, Russo-Volpe S, Bruno N, & Scalzo R.L., (2003). Fentondependent damage to carbohydrates: Free radical scavenging activity of some simple sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7418–7425.

Moreno G. (2003). Toxicología ambiental evaluación de riesgo para la salud humana, Mc Graw Hill, España. 370.

Nishizawa, A., Yabuta, Y., & Shigeoka, S. (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant Physiology*, 147(3), 1251-1263.

Norma Mexicana (NMX-F-317-S-1978) Determinación de pH en alimentos. Dirección General de Normas. Diario Oficial de la Federación, Volumen 634.

Novotny, V. (2003) Water Quality: Diffuse Pollution and Watershed Management, John Wiley & Sons, 25-26.

O'Connor, D., (1994) Toxic pollution and it's impact on Receiving waters. In water quality prevention identification and managment of diffuse pollution. New York, USA, 1024.

O'Brien-Nabors, L. (2011) Alternative Sweeteners, *Food Science & Technology*, 48(1), 159-160.

Oppenheimer J., Eaton A., Badruzzaman M., Haghani A. W., & Jacangelo J. G., (2011), Occurrence and suitability of sucralose as an indicator compound of wastewater loading to surface waters in urbanized regions, *Water Research*, 45(13), 4019-4027.

Ortiz-Viedma, J., Romero, N., Puente, L., Burgos, K., Toro, M., Ramirez, L. & P Aubourg, S. (2017) Antioxidant and antimicrobial effects of stevia (*Stevia rebaudiana* Bert.) extracts during preservation of refrigerated salmon paste. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 1600467.

Oxilia, R. (2010). Oxidative stress and antioxidant defense system. *Revista del Instituto de Medicina Tropical*, 5(2), 23-29.

Parvez, S., & Raisuddin, S., (2005) Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch). *Environmental Toxicology & Pharmacology*., 20(1), 112-117.

Peñalva-Arana, D. C., Lynch, M., & Robertson, H. M., (2009). The chemoreceptor genes of the waterflea *Daphnia pulex*: many Grs but no Ors. *BMC evolutionary biology*, 9(1), 1.

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

Park, D., Xiong, Y. L., & Alderton, A. L., (2006). Concentration effects of hydroxyl radical oxidizing systems on biochemical properties of porcine muscle myofibrillar protein. *Food Chemistry*, 101, 1239–1246.

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

Portz, D.E., Woodley, C.M., Cech, J.J., (2006). Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 16, 125–170.

Purkayastha, S., Markosyan, A., Prakash, I., Bhusari, S., Pugh, G., Lynch, B., & Roberts, A. (2016). Steviol glycosides in purified stevia leaf extract sharing the same metabolic fate. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 77, 125-133.

Quintanar, M., & Calderón, J., (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y Aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica*, México, 28(3), 89-101.

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

Raes, M., Michiels, C., & Remacle, J., (1987) Comparative study of the enzymatic defense systems against oxygen-derived free radicals: the key role of glutathione peroxidase. *Free Radical Biology & Medicine* 3(1), 3–7.

Raikos, V., Campbell, L. & Euston, S.R., (2007). Rheology and Texture of Hen's Egg Protein Heat-set Gels as Affected by pH and the Addition of Sugar And/or Salt. *Food Hydrocolloids*, 21(2), 237–244.

Rao, J.V., (2006). Toxic effects of novel organophosphorus insecticide (RPR-V) on certain biochemical parameters of euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. *Pesticides Biochemistry and Physiology*, 86 (2), 78–84.

Rao, A. B., Reddy, G. R., Ernala, P., Sridhar, S., & Ravikumar, Y. V., (2012). An improvised process of isolation, purification of steviosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves and its biological activity. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(12), 2554-2560.

Rao, G. N. (2014). Antioxidant Activity of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* L.) Leaf Powder and A Commercial Stevioside Powder. *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences*, 2(2).

Rendón, A., (2005). El daño oxidativo y la respuesta antioxidante durante la intoxicación con plomo en una población expuesta y los efectos del tratamiento con antioxidantes. Tesis de doctorado. Departamento de Bioquímica CINVESTAV.

Richardson S.D., & Ternes T.A., (2011) Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues, *Analytical Chemistry*, 83(12), 4614–4648.

Richardson S.D., (2011), Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues, *Analytical Chemistry*, 84(2), 747–778.

Ríos, M., 2003. El estrés oxidativo y el destino celular. *Química Viva*, 2(1), 17-28.

Robertson, W. D., Van Stempvoort, D. R., Solomon, D. K., Homewood, J., Brown, S. J., Spoelstra, J., & Schiff, S. L. (2013). Persistence of artificial sweeteners in a 15-year-old septic system plume. *Journal of Hydrology*, 477, 43-54.

Roberts, A., & Renwick, A. G. (2008). Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats. *Food & Chemistry Toxicology*, 46(7), S31-S39.

Rojas-Carrillo, P., & Fernández-Méndez, J., 2006. La pesca en aguas continentales. En: Pesca, Acuicultura e Investigación en México. Comisión de Pesca, Cámara de Diputados, México, 49-68.

Rosenberg, D. M., & Resh, V. H. (1993). *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. Chapman & Hall.

Rybczynska, M. (1994) Biochemical aspects of free radical mediated tissue injury. *Postepy higieny i medycyny doswiadczonej*, 48(4), 419-41.

Saio, K., Kajikawa, M., & Watanabe, T. (2014). Food Processing Characteristics of Soybean Proteins: Part II. Effect of Sulfhydryl Groups on Physical Properties of Tofu-gel. *Agricultural and Biological Chemistry*, 35(6), 890-898.

Sánchez, M., (2013) “Efecto de los edulcorantes G.E. y sucralosa en la respuesta inmunológica pro-inflamatoria” (Tesis de Maestría) Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

Sang, Z., Jiang, Y., Tsoi, Y., & Leung, K. (2013) Evaluating the environmental impact of artificial sweeteners: A study of their distributions, photodegradation and toxicities. *Water Research*, 52, 260 -274.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca (2015) Recuperado de:

<https://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuicultura-y-pesca>

Secretaría de Desarrollo Agropecuario. (2006). Cultivo de Carpa. Recuperado de: <http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/documentos/peces/carpa/Cultivos%20de%20carpa.pdf>

Scheurer M., Brauch H.-J., & Lange F. T., (2009) Analysis and occurrence of seven artificial sweeteners in German waste water and surface water and in soil aquifer treatment (SAT), *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(6), 1585–1594.

Shen, B., Jensen, R. G., & Bohnert, H. J. (1997). Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiology*, 115(2), 527-532.

Shibata, H., Sawa, Y., Oka, T., Sonoke, S., Kim, K. K., & Yoshioka, M., (1995). Steviol and steviol-glycoside: glucosyltransferase activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni — purification and partial characterization. *Archives of biochemistry and biophysics*, 321(2), 390–396.

Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V., & Shukla, S. (2009) In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food and Chemical Toxicology*, 47(9), 2338–2343.

Soderberg, J., (2013). Functional properties of legume proteins compared to egg proteins and their potential as egg replacers in vegan food. *Sveriges lantbruksuniversitet*, 378, 3-6.

Spoelstra, J., Schiff, S. L., & Brown, S. J., (2013). Artificial sweeteners in a large canadian river reflect human consumption in the watershed. *PLoS one*, 8(12), e82706.

Stadtman, E. R., & Levine, R. L., (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 25(3-4), 207-218.

Stoyanova, S., Geuns, J., Hideg, E., & Van den Ende, W., (2011). The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 62(3), 207-214.

Suanarunsawat, T., & Chaiyabutr, N., (1997) The effect of stevioside on glucose metabolism in rat. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology*, 75(8) 976-982.

Stadtman, E., & Berlett, B., (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chemical Research in Toxicology*, 10(5) 485– 94.

Stolte, S., Steudte, S, Schebb, N., Willenberg, I., & Stepnowski, P., (2013) Ecotoxicity of artificial sweeteners and stevioside, *Environmental International*, 60, 123–127.

Ternes T, Siergrist H, & Joss A., (2004) Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environmental Science & Technology*, 38(20), 393-399.

Tollefsen, K. E., Nizzetto, L., & Huggett, D. B. (2012). Presence, fate and effects of the intense sweetener sucralose in the aquatic environment. *Science of the total Environment*, 438, 510-516.

Torres, C., Ramakrishna, S., Chiu, C., Nelson, K., Westerhoff, P., & Krajmalnik-Brown, R., (2011) Fate of sucralose during wastewater treatment. *Environmental Engineering Science*, 28 (5), 325-331.

Toskulkao, C., Chaturat, L., Temcharoen, P., & Glinsukon, T., (1997) Acute toxicity of stevioside, a natural sweetener, and its metabolite, steviol, in several animal species. *Drug Chemistry & Toxicology*, 20(1-2), 31–44.

Uchida, K., (2000). Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, 28(12), 1685– 1696.

USEPA-United States Environmental Protection Agency (2008) Emerging contaminants- polybrominated diphenyl ethers (PBDE) and polybrominated biphenyls (PBB).

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., & Scoullou, M., (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecology and Environmental Safety*, 64(2) 178-189.

Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N., (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57-149.

Valko, M., Morris, H., & Cronin, M.T. (2005) Toxicity and oxidative stress. *Current Medical Chemistry*, 12(10) 1160-1207.

Venero, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31 (2), 126-133.

Vera, O. (2010). Efecto de la concentración de inulina de un producto tipo surimi elaborado a base de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), calamar gigante (*Dosicus gigas*) y proteína de soya.. Facultad de Química. UAEM, 23-26, 37-41. Tesis de Licenciatura. México

Vindas, R., Ortiz, F., Ramírez, V., & Cuenca, P. (2004). Genotoxicity of three pesticides used in Costa Rican banana plantations. *Revista de Biología Tropical/International Journal of Tropical Biology and Conservation*, 1(2), 601-609.

Wölwer-Rieck U., (2012). The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 60(4):886–95.

Yadav, S.K., Guleria, P., (2012). Steviol glycosides from *Stevia*: biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(11), 988–998.

Tamarit, J., Cabisco, E., Ros, J., (1998). Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 3027-3032.

Ternes T, Siegrists H, Joss A. (2004) Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environmental Science & Technology*, 393A-399A.

Toldrá, F. 1998. Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. *Meat Science*, 49, S101–S110.

Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aumann, K. D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohe, L. (1995) Diversity of glutathione peroxidases. *Methods of Enzymology*, 252, 38–53.

Vaclavik, V. A., & Christian, E. W. (2008). Water. *In Essentials of Food Science* (pp. 21-31). Springer New York.

Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecology and Environmental Safety*, 64, 178-189.

Valko, M., Morris, H., Cronin, M., (2006). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*. 12, 1161-1208.

Van Laack, R. L. J. M., Liu, C. H., Smith, M. O., & Loveday, H. D. 2000. Characteristics of pale, soft, exudative broiler breast meat. *Poultry Science*, 79, 1057–1061.

Van Stempvoort, D. R., Roy, J. W., Brown, S. J., & Bickerton, G. (2011). Artificial sweeteners as potential tracers in groundwater in urban environments. *Journal of Hydrology*, 401(1), 126-133.

Velasco, V. & Williams, P. (2011). Improving meat quality through natural antioxidants. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71, 313–322.

Venero J., 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 31(2), 126-133.

Winterbourn, C. C., Metodiewa, D., (1999). Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 322–328.

Woelwer-Rieck, U., Lankes, C., Wawrzun, A., & Wüst, M., (2010). Improved HPLC method for the evaluation of the major steviol glycosides in leaves of *Stevia rebaudiana*. *European Food Research and Technology*, 231(4), 581-588.

Yadav, S. K., & Guleria, P., (2012). Steviol glycosides from *Stevia*: biosynthesis pathway review and their application in foods and medicine. *Critical reviews in food science and nutrition*, 52(11), 988-998.

Yarmolinsky, D. A., Zuker, C. S., & Ryba, N. J., (2009). Common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, 139(2), 234-244.

Yeh, S., Moffatt, B. A., Griffith, M., Xiong, F., Yang, D. S., Wiseman, S. B. & Doherty-Kirby, A., (2000). Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiology*, 124(3), 1251-1264.

Zakrys, P. I., O'Sullivan, M. G., Allen, P., & Kerry, J. P., (2009). Consumer acceptability and physiochemical characteristics of modified atmosphere packed beef steaks. *Meat Science*, 81, 720–725.

Zenith International. Global Stevia market up 14% in 2014 (2014). Recuperado de: <http://www.zenithinternational.com/articles/1464?Global+Stevia+market+up+14%25+in+2014>

ANEXOS



Livier Sanchez <livier.sanchez15@gmail.com>

Your article has been published

1 mensaje

Sara Adel <sara.adel@hindawi.com>

13 de junio de 2017, 3:16

Para: livier.sanchez15@gmail.com

Dear Dr. Sánchez-Aceves,

I am pleased to let you know that your article has been published in its final form in "BioMed Research International."

Livier Mireya Sánchez-Aceves, "Reduction of the Oxidative Stress Status Using Steviol Glycosides in a Fish Model (*Cyprinus carpio*)," BioMed Research International, vol. 2017, Article ID 2352594, 9 pages, 2017. doi:10.1155/2017/2352594.

You can access this article from the Table of Contents of Volume 2017, which is located at the following link:

<https://www.hindawi.com/journals/bmri/contents/>

Alternatively, you can access your article directly at the following location:

<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2017/2352594/>

"BioMed Research International" is an open access journal, meaning that the full-text of all published articles is made freely available on the journal's website with no subscription or registration barriers.

Best regards,

Sara Adel
BioMed Research International
Hindawi
<https://www.hindawi.com/>

Reduction of the oxidative stress status using steviol glycosides in a fish model (*Cyprinus carpio*)

Livier Mireya Sánchez-Aceves^a, Octavio Dublán-García^a, Leticia-Xochitl López-Martínez^b, Karen Adriana Novoa-Luna^a, Hariz Islas-Flores^a, Marcela Galar-Martínez^c, Sandra García-Medina^c, María Dolores Hernández-Navarro^a, Leobardo Manuel Gómez-Oliván^{a*}

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

^b Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Unidad Culiacán. Carretera El dorado Km 5.5. Col. Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa, México. CP 80110.

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

*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, Mexico. Tel.: (52) 7222173890; fax: (52) 7222173890; e-mail: lmgomezo@uaemex.mx; lgolivan74@gmail.com

Abstract

Sweeteners are widely consumed as sugar substitutes in important concentrations in food and beverages, medicines and health products. Steviol glycosides are sweetening compounds from the *Stevia rebaudiana* Bertoni plant marketed under the name stevia. This product is considered safe for human consumption and was approved as a food additive by the Food and Drugs Administration (FDA) and the European Food Safety Authority (EFSA) in 2011. Its effects on the ecosystem have not been studied in depth; therefore it is necessary to carry out ecotoxicological studies in organisms of commercial importance such as *Cyprinus carpio* and to determine toxicological and pharmacological effects. The present study aimed to evaluate the antioxidant activity by SGs on diverse tissues in the common carp using oxidative stress (OS) biomarkers. To test the antioxidant activity, carps were exposed to four systems: (1) SGs free control, (2) CCl₄ 0.5 mL/kg, (3) SGs 1 g/L and (4) CCl₄ 0.5 mL/kg + SGs 1g/L at 96 h. The following biomarkers were analyzed: lipoperoxidation (LPX), hydroperoxide content (CHP) and protein carbonyl content (PCC), as well as antioxidant activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). It was found that both (3) SGs 1 g/L and (4) CCl₄ 0.5 mL/kg + SGs 1g/L exposure decreases LPX, CHP, PCC and SOD and CAT activity with respect to CCl₄ system. The results of this study demonstrate that the concentrations of SGs used is not capable of generating oxidative stress and, on the contrary, would appear to induce an antioxidant effect.

Keyword: sweeteners; antioxidant properties, common carp, oxidative stress biomarkers.

1. Introduction

High-potency sweeteners are used to provide sweetness of taste without the calories associated to the consumption of sugar [1]. A growing consumption of sugar substitutes have gained importance due to their low caloric intake, potential health benefits and reduced costs [2]. The most worldwide consumed sweeteners are aspartame (ASP), sucralose (SUC), acesulfame (ACS), saccharin (SAC), cyclamate (CYC), neotame (NEO), alitame (ALI), neohesperidin dihydrochalcone (NHDC) [3].

Due to the growing incidence of both obesity and type 2 diabetes [4] and health-related concerns such as weight gain [5,6], cancer risk [7], metabolic syndrome, hypertension pregnancy preterminal delivery risks [8-11] among others associated with the consumption of artificial high-potency sweeteners [12] much attention has been placed on low-calorie plant-derived compounds [13] sucrose substitutes. Nowadays the food industry is increasingly interested in using natural sugars such as stevia instead of artificial sugars in order to offer a wider range of options for people that does not want or can eat sucrose [14].

Stevia rebaudiana Bertoni an herb plant native to Paraguay and Brazil produces sweet-tasting diterpene compounds as secondary metabolites in its leaves [15]. Stevia is the generic term used for all the compounds or substances derived from the plant *Stevia rebaudiana* Bertoni, nevertheless

a most accurate term for the group of intense sweetening compounds extracted from the plant is Steviol Glycosides (SGs) [16]. The main SGs found in stevia leaves are stevioside and rebaudioside A, 250-350 times sweeter than sugar, widely used in food, beverages and dietary non-caloric labeled products [17]. As the SGs were recognized by the United States Food and Drugs Administration and the European Food Safety Authority as a GRAS (generally recognized as safe) product, it is expected the global consumption grows to millions of metric tons in the coming years [17].

Globally, the stevia sweetener market is expected to grow from US\$347 million in 2014 to US\$ 565 million by 2020, in terms of volume consumption stevia is expected to reach almost 8507 tons by the end of 2020 including suppliers such as Nestlé S.A., The Coca-Cola Company and PepsiCo Inc. and producers such as Cargill Inc., Evolva Holding S.A., PureCircle Ltd., Stevia Corp., Ingredion Inc., GLG Life Tech Corp. and Tate & Lyle Plc. [18].

Several studies have shown that SGs regulate the content of sugar, radionuclides, and cholesterol in the blood [19]. They also exhibit anti-inflammatory and antitumor promoting properties [20], insulinotropic, antihyperglycemic, antihypertensive [21-23], antimicrobial activity [24].

On the other hand, oxidative damage to biological material is inflicted on all compounds of all major chemical classes; proteins, nucleic acids, carbohydrates, lipids [25]. The inner balance between substances with pro-oxidant potential and the antioxidant defenses in biological systems [26] can be helpful to assess damages induced by the presence of pollutants in the environment. Carbon

tetrachloride (CCl₄) a well-known hepatotoxic industrial solvent has been found to provoke damages not only in liver but also in other tissues such as blood, kidneys, brain, heart, testis and lungs by generating free radicals [27-29]. Extensive evidence demonstrate that cytochrome P450 metabolic activation of CCl₄ into free radicals (*CCl₄ and *Cl) induces lipid peroxidation and protein oxidation resulting in severe cell damage [30].

Previous studies demonstrate that natural compounds with antioxidant properties may act against oxidative stresses induced by CCl₄ in fish models [31-32]. Therefore, the present study aimed to evaluate the antioxidant activity by SGs on diverse tissues in the common carp *Cyprinus carpio* using oxidative stress (OS) biomarkers. OS will be induced using CCl₄ model.

2.1. Test substances

Glycosides of steviol were used:

Stevioside, 13-[(2-O-β-D-glucopyranosyl-β-D- glucopyranosyl)oxy]kaur-16-en-18-oic acid, β-D-glucopyranosyl ester; C₃₈H₆₀O₁₈; CAS number 57817-89-7. Purity of this glycoside was >99%.

Rebaudioside A, 13-[(2-O-β-D-glucopyranosyl-3-O-β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl)oxy]kaur-16-en-18-oic acid, β-D-glucopyranosyl ester; C₄₄H₇₀O₂₃; CAS number 58543-16-1. These products were provided by Sensient Flavors México. Purity of this glycoside was >97%.

2.2. Fish procurement and maintenance

Cyprinus carpio species were obtained from a certified aquaculture facility located in Tiacaque, State of Mexico. The carps used for this experiment fit for the following characteristics: 15.3 ± 0.58 cm in length and weight 30.01 ± 4.5 g. Prior to toxicity studies, organisms were maintained for 30 days in tap water, at 20 ± 2 °C and exposed to natural light/dark photoperiods. Oxygen concentrations was kept above 85%, pH at 7.6–7.9, total alkalinity at 17.8 ± 4.3 mg/L and total hardness at 18.5 ± 0.4 mg/L.

2.3. Oxidative stress determination

Test systems were prepared using water with the same characteristics and conditions described above in the specimen procurement and maintenance section. The systems were statics without renewal of medium, no food was provided to specimens.

Previous studies were performed by determining the CCl_4 concentration that induced OS used in this study (0.15, 0.3, 0.44 and 0.62 mL/kg bw) according to Jia et al. [33]. The selected concentration CCl_4 was 0.5 mL/kg bw.

To test the antioxidant activity of SGs four systems were tested: (1) SGs free control, (2) CCl_4 0.5 mL/kg, (3) SGs 1 g/L and (4) CCl_4 0.5 mL/kg + SGs 1g/L. Each system used 6 carps and the assays were performed in triplicate (72 fish were used in the oxidative stress evaluation). In the systems containing CCl_4 , the fish were given a caudal vein injection of CCl_4 (30% in olive oil) at a dose of 0.5 mL/kg body weight. The target concentrations used in this experiment were based on previous

experiments (0.29, 0.58, 0.87 y 1.0 g/L SGs). These concentrations were determined by experimental design central composite (STATGRAPHICS Centurion XVII version). The concentration of SGs selected was 1.0 g/L. At the end of the exposure period (96 h), blood was removed by puncture of the caudal vessel and liver, muscle, gills and brain were removed from each specimen. Organs and tissue were placed in phosphate buffer solution (pH 7.4) and then centrifuged at 12,500g and $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min. The following biomarkers were then evaluated: HPC, LPX, PCC and the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). All bioassays were performed on the supernatant.

2.4 Determination of HPC

HPC was determined by the Jiang et al. [34] method. To 100 μL of supernatant (previously deproteinized with 10 % trichloroacetic acid; Sigma-Aldrich, St. Louis) was mixed with 900 μL of the reaction mixture [0.25 mM FeSO_4 (Sigma-Aldrich, St. Louis), 25 mM H_2SO_4 (Sigma-Aldrich, St. Louis), 0.1 mM xylenol orange (Sigma-Aldrich, St. Louis) and 4 mM butyl hydroxytoluene (Sigma-Aldrich, St. Louis) in 90 % (v/v) methanol (Sigma-Aldrich, St. Louis)]. The mixture was incubated during 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, St. Louis)/mg protein.

2.5 Determination of LPX

LPX was determined using the thiobarbituric acid-reactive substances, as described by the Buege and Aust [35] method. To 100 μL of supernatant, Tris-HCl buffer solution pH 7.4 (Sigma-Aldrich, St. Louis) was added until a 1-mL volume was attained. Samples were incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30

min; 2 ml TBA-TCA reagent [0.375 % thiobarbituric acid (Fluka-Sigma-Aldrich, Toluca, Mexico) in 15 % tri- chloroacetic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis)] were added and samples were shaken. They were then heated up to boiling for 45 min, allowed to cool down, and the precipitate was removed by centrifugation at 3 000 xg for 10 min. Absorbance was read at 535 nm against a reaction blank. MDA content was calculated using the molar extinction coefficient (MEC) of malondialdehyde (MDA) (1.56 9 10⁵ M/cm). Results were expressed as mM MDA/ mg protein.

2.6 Determination of PCC

PCC was determined using the method of Levine et al. [36] as modified by Parvez and Raisuddin [37] and Burcham [38]. To 100 µL of supernatant, 150 µL of 10 mM DNPH in 2 M HCl were added and the resulting solution was incubated at room temperature for 1 h in darkness. Then, 500 µL of 20 % trichloroacetic acid were added and the solution was allowed to rest for 15 min at 4 °C. The precipitate was centrifuged at 11, 000 xg for 5 min. The bud was washed several times with 1:1 ethanol:ethyl acetate, then dissolved in 1 ml of 6 M guanidine solution (pH 2.3) and incubated at 37 °C for 30 min. All reagents were obtained from Sigma-Aldrich, St. Louis. 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.

2.7 Determination of SOD activity

SOD activity was determined by the Misra and Fridovich [39] method. To 40 µL of supernatant in a 1-cm cuvette, 200 µL adrenaline (30 mM) and 260 µL carbonate buffer solution (50 mM sodium carbonate and 0.1 mM EDTA) pH 10.2 were added. All reagents were from Sigma-Aldrich, St.

Louis. Absorbance was read at 480 nm after 30 s and 5 min. Enzyme activity was determined by using the MEC of SOD (21 M/cm). Results were expressed as IU SOD/mg protein.

2.8 Determination of CAT activity

CAT activity was determined by the Radi et al. [40] method. To 20 mL of supernatant was added 1 mL isolation buffer solution [0.3 M saccharose (Vetec-Sigma- Aldrich, St. Louis), 1 mL EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis), 5 mM HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis) and 5 mM KH₂PO₄ (Vetec-Sigma-Aldrich, St. Louis)], plus 0.2 mL of a hydrogen peroxide solution (20 mM, Vetec- Sigma-Aldrich, St. Louis). 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: CAT concentration = $(A_0 - A_{60})/MEC$ where the MEC of H₂O₂ is 0.043 mM/cm, and were expressed as $\mu\text{M H}_2\text{O}_2/\text{mg protein}$.

2.9. Determination of total protein

25 μL of supernatant were mixed with 75 μL of deionized water and 2.5 mL Bradford's reagent. The mix was shaken in a vortex for 1 min and then stored without light for 5 min. Absorbance was read at 595 nm and the results were interpolated on a bovine albumin curve. Total protein analysis was determined by the Bradford [41] method.

2.14. Statistical analysis

Results of the oxidative stress biomarkers were statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Bonferroni multiple comparisons test, with P set at <0.05 . Statistical determinations were performed with SPSS v10 software (SPSS, Chicago IL, USA).

3. Results

3.1 HPC

The amount of CHP equivalents induced by different systems are shown in Fig.1. Significant increases with respect to the control ($P < 0.05$) were observed in the treatment with CCl_4 in blood, gill and brain in 892.1, 457.1 and 250.4% respectively. In SGs system were observed significant decreases with respect to the control ($P < 0.05$) in blood (91.3%), liver (82.9%) and gill (94.4%). No significant differences were observed in the treatment with SGs + CCl_4 in any tissue. Significant decreases ($P < 0.05$) with respect to the CCl_4 were found in all tissues in the SGs system. The system SGs + CCl_4 shown significant decreases ($P < 0.05$) with respect to the CCl_4 system in blood, liver, muscle, gill and brain in 96.0, 80.9, 83.7, 76.2 and 81.7% respectively.

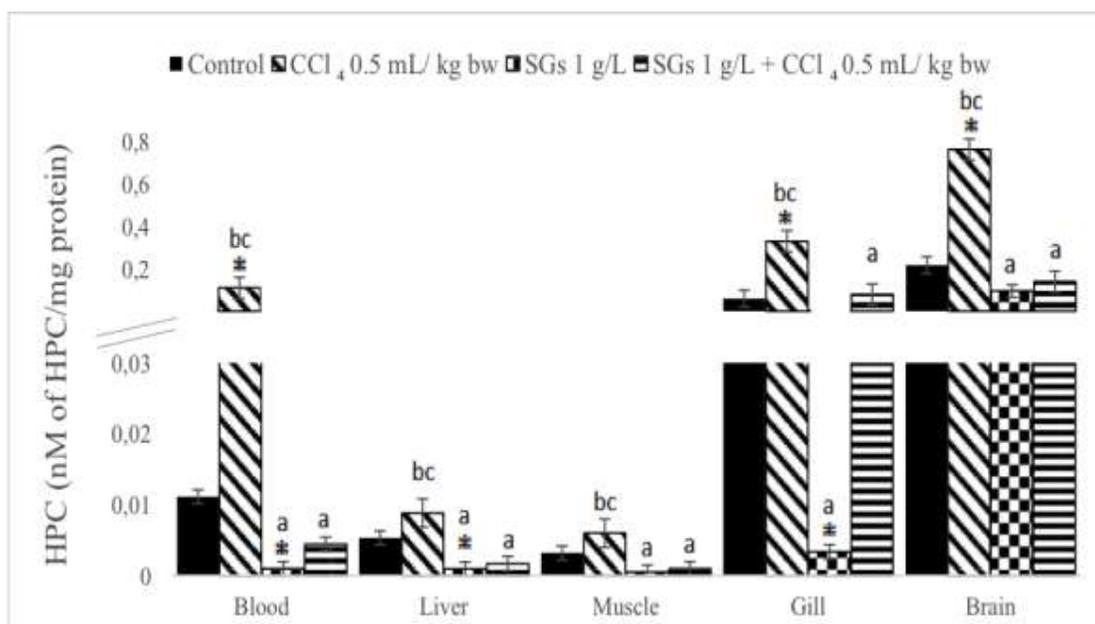


Fig.1. HPC in blood, liver, muscle, gill and brain of *C. carpio* exposed at 96 h in different systems.

Values are the mean of three replicates \pm SEM. CHP = cumene hydroperoxide. Significantly

different ($P < 0.05$) from: *= control, a= CCl₄, b= SGs, c= SGs + CCl₄. ANOVA and Bonferroni's test.

3.2 LPX

LPX results are shown in Fig. 2. Significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were observed in the system with CCl₄ in blood, liver, gill and brain. These increases were 92.6, 434.9, 99.9 and 171.5% respectively. Significant decreases with respect to the control group ($P < 0.05$) were observed in the system with SGs in blood, liver and gill. The decreases observed were 83.7, 91.1, 72.3% respectively. No significant differences were observed in the treatment with SGs + CCl₄ in any tissue. Significant decreases with respect to the CCl₄ system were found in blood (91.5%), liver (91.0%), muscle (68.9%), gill (86.1%) and brain (90.6%) in the SGs system. Significant decreases with respect to the CCl₄ induced system were found in blood, liver, muscle, gill and brain in the SGs + CCl₄ system. The decreases observed were 69.7, 76.9, 60.0, 58.7 and 83.2% respectively.

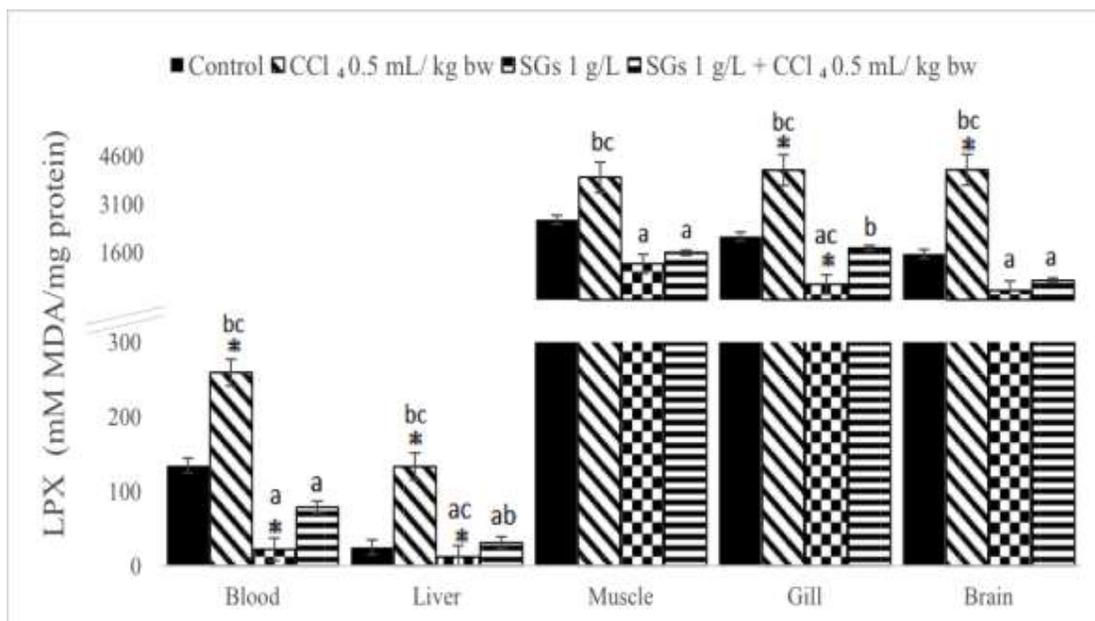


Fig.2. LPX in blood, liver, muscle, gill and brain of *C. carpio* exposed at 96 in different systems. Values are the mean of three replicates \pm SEM. MDA = malondialdehyde. Significantly different ($P < 0.05$) from: *= control, a= CCl₄, b= SGs , c= SGs + CCl₄. ANOVA and Bonferroni's test.

3.3. PCC

PCC results are shown in Fig.3. Significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) were observed in the CCl₄ system in blood (514.6%) and gill (417.9%). Exposition to SGSv (1 g/L) showed significant decreases ($P < 0.05$) with respect to the control in blood, liver and gill. These decreases were 91.9, 75.6 and 97.0% respectively. No significant differences were observed in the treatment with SGSv + CCl₄ in any tissue. No significant differences of the biomarker were observed in muscle in any treatment. Significant decreases with respect to the CCl₄ induced system were observed in the SGSv system in blood, liver, gill and brain. Significant differences were observed in the SGSv + CCl₄ system with respect to the CCl₄ system in blood (88.9%), liver

(80.2%), gill (80.4%) and brain (84.0%). No significant differences were observed in muscle in any treatment.

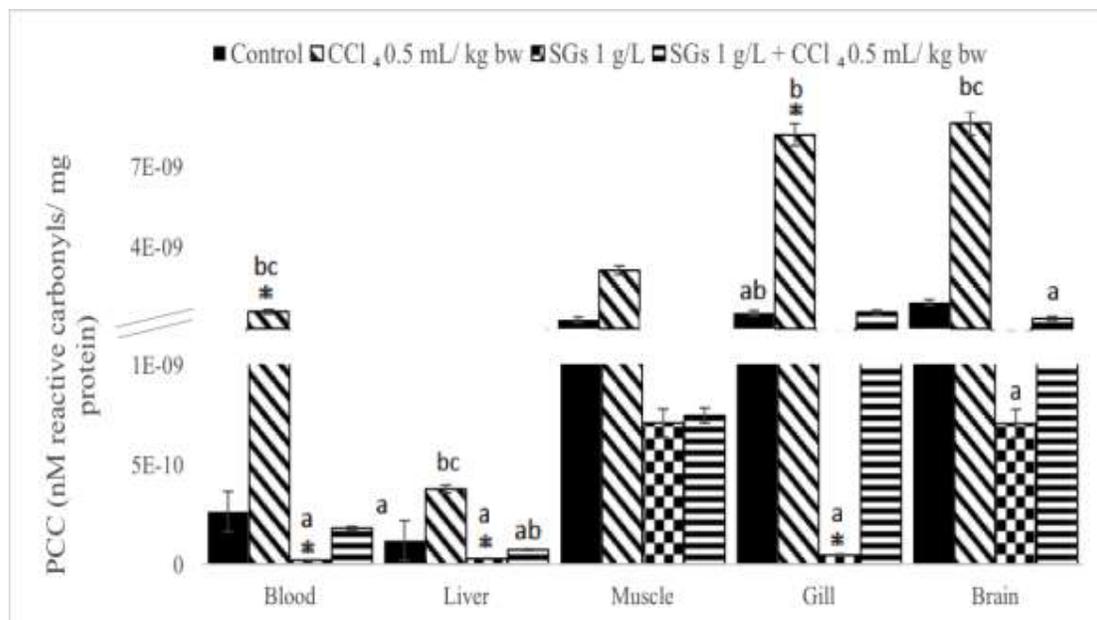


Fig. 3. PCC in blood, liver, muscle, gill and brain of *C. carpio* exposed at 96 h in different systems. Values are the mean of three replicates \pm SEM. Significantly different ($P < 0.05$) from: *= control, a= CCl₄, b= SGSv, c= SGSv + CCl₄. ANOVA and Bonferroni’s test.

3.4 SOD

SOD activity is shown in Fig.4. CCl₄ treatment shown significant increases in all tissues (blood, liver, muscle, gill and brain) with respect to control ($P < 0.05$). These increases were 951.9, 672.6, 401.2, 272.3 and 562.6 % respectively. SGSv exposition shown significant decreases ($P < 0.05$) with respect to control in blood (96.1%), and gills (97.8%). Significant increase was observed in liver (166.3%) with the SGSv treatment with respect to the control group. No significant differences were observed in the treatment with SGSv + CCl₄ in any tissue. Significant decreases with respect

to the CCl₄ system were observed in blood, liver and gill in the SGSv system. Decreases observed were 99.6, 65.5, 99.4% respectively. Significant decreases in the SGSv + CCl₄ system were observed in blood (94.0%), liver (98.2%), gill (82.3%) and brain (96.9%) respect to CCl₄ system.

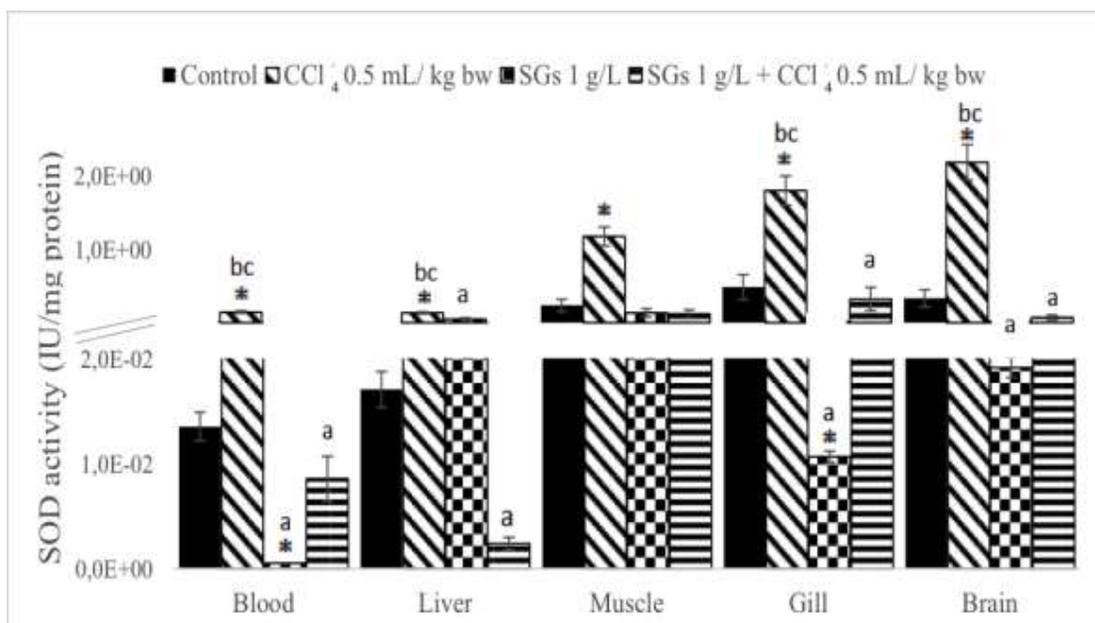


Fig. 4. SOD activity in blood, liver, muscle, gill and brain of *C. carpio* exposed at 96 h in different systems. Values are the mean of three replicates \pm SEM. Significantly different ($P < 0.05$) from: *control, a = CCl₄, b = SGSv, c = SGSv + CCl₄. ANOVA and Bonferroni's test.

3.5 CAT

CAT activity is shown in Fig. 5. In the CCl₄ system were observed significant increases with respect to the control group ($P < 0.05$) in blood, liver, gill and brain (203.6, 161.9, 139.8 and 1233.8% respectively). Significant decreases with respect to the control group were found in blood (88.3%), liver (72.6%) and gill (46.2%) in the SGSv system. No significant differences of the biomarker were observed in muscle in any treatment. No significant differences were observed in the treatment with

SGSv + CCl₄. Significant decreases were found in the SGSv system in blood (96.1%), liver (89.5%), gill (77.6%) and brain (99.1%) with respect to the CCl₄ system. Significant decreases were found in the SGSv + CCl₄ system in blood, liver, gill and brain with respect to the CCl₄ system. These decreases were 88.0, 67.8, 45.4 and 97.1% respectively. Significant increases were observed in liver and gill with respect to the SGSv system in the SGSv + CCl₄ system.

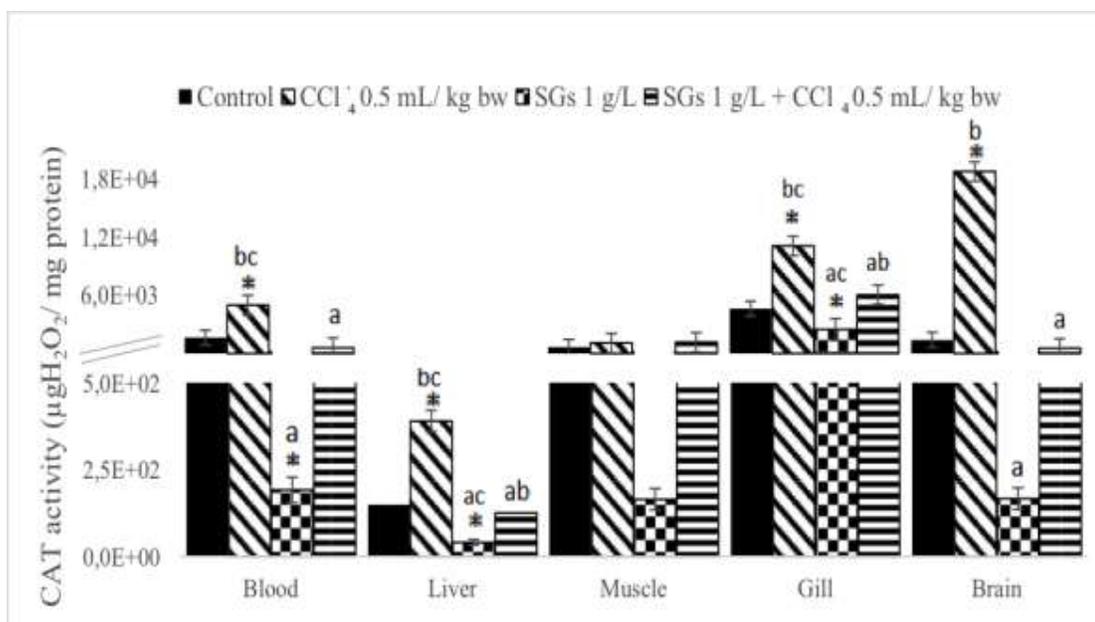


Fig. 5. CAT enzymatic activity in blood, liver, muscle, gill and brain of *C. carpio* exposed at 96 h in different systems. Values are the mean of three replicates \pm SEM. Significantly different ($P < 0.05$) from: *control, a = CCl₄, b = SGSv, c = SGSv + CCl₄. ANOVA and Bonferroni's test.

4. Discussion

Stevia rebaudiana (Bertoni), a plant species native to North Eastern Paraguay, is known to accumulate diterpene glycosides. These compounds are non-toxic, high potency sweeteners that are used as sugar substitutes. The major SGSv stevioside and rebaudioside-A constitute 60–70%

and 20–30%, respectively, of the total glycosides in *S. Rebaudiana*. Several studies have suggested that, besides sweetness, SGSv, along with related compounds, may also offer therapeutic benefits, as they have anti-hyperglycemic, antihyper-tensive, anti-inflammatory, anti-tumour, anti-diarrhoeal, diuretic, and immunomodulatory effects [4].

Another important effect of SGSv related to the scientific literature is its antioxidant activity. In a study conducted by Shukla et al. [42] they demonstrate that aqueous extract also inhibited the hydroxyl radical, nitric oxide and superoxide anions with IC₅₀ values of 100.86, 98.73 and 100.86 µg/ml, respectively. The greater amount of phenolic compounds leads to more potent radical scavenging effects as shown by the aqueous leaf extract of *S. rebaudiana*.

OS is one important mechanism of toxicity, given the impact that an imbalance between reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses has on vital biomolecules such as lipids, proteins, and genetic material, as well as the countless toxicants capable of inducing it (hydrocarbons, metals, pesticides, solvents and drug, among others compounds [43-48]. An increasing in the scientific literature suggests that diseases including cardiovascular diseases, diabetes, cancer, neural disorders, arthritis and, ageing, are caused by or related to the production of ROS which can result in tissue damage and cell death [49-51]. Kim et al. [52] reported that *Stevia* extracts contain high levels of compounds with ROS scavenging activity.

On the other hand, sugars are well known as ROS scavengers [53] and a number of recent findings point to a prominent role for sugars or sugar-like compounds in oxidative stress defense in plants [54-56]. A study conducted by Hajhashemi and Geuns [57] hypothesized that due to the high content of sugars present in the SGSv, these presented their high antioxidant capacity, however the results showed that this did not occur.

In the same way as all aerobic organisms, fish as *Cyprinus carpio*, have inherent and efficient antioxidant defense system that includes the enzymes (SOD, CAT and GPx) and non-enzymatic antioxidant components such as GSVH [58]. These enzymes play an preponderant role in defending the cells against free radical-mediated oxidative damage [59] decreased activities, or expressions of these enzymes may predispose tissues to free radical injury [60].

From the above, this study was carried out to investigate the antioxidant properties of SGSv in CCl₄- induced injuries in fish model (*Cyprinus carpio*). The utilization of halogenated alkanes such as CCl₄, CHCl₃ or CHI₃ has been prohibited due to their severe toxicity, CCl₄ however continues to be used as a model substance to elucidate the mechanisms of action of hepatotoxic effects such as fatty degeneration, fibrosis, hepatocellular death, carcinogenicity and OS. The mechanism through which CCl₄ produces its toxic effects is the formation of reactive trichloromethyl radicals ($\cdot\text{CCl}_3$) by CYP450 activity. In the presence of oxygen, $\cdot\text{CCl}_3$ is quickly transformed into trichloromethyl peroxy radical (CCl₃O₂ \cdot). CCl₃O₂ \cdot binds covalently to cellular proteins or lipids, which initiates the lipid peroxidation in the cellular membrane [61].

In the current work, treatment of the fish with CCl₄ at 96h increased significantly the activities of SOD and CAT in all tested tissues. In addition, it increased significantly CHP, LPX and PCC in blood, liver, gill and brain. These results demonstrate that CCl₄ may be a good inducer of OS in common carp *Cyprinus carpio*.

SGSv alone system showed an efficient decrease in the oxidative stress biomarkers used in this study with respect to control and CCl₄ systems; and to determine the effect of CCl₄ exposure on OS system and consequently potential antioxidant effects of SGSv on disturbed system by CCl₄, a system was tested using CCl₄ 0.5 mL/kg + SGSv 1g/L. The results in this systems showed a

significant decrease in the cellular oxidation biomarkers (CHP, LPX and PCC) and the antioxidant enzymes (SOD and CAT) with respect to the CCl₄ systems.

These results are in agreement with Holvoet et al. [62], they demonstrate that stevioside treatment of obese diabetic mice improved adipose tissue maturation, and increased glucose transport, insulin signaling and antioxidant defense in white visceral adipose tissues. Together, these increases were associated with a twofold increase of adiponectin. The adiponectin has been associated with improved insulin signaling and antioxidant defense in both the adipose tissue and the aorta of stevioside-treated mice [63].

Also these authors, shows that rebaudioside increased methionine that is directly involved in the regulation of the glutathione antioxidative system. It also increased tryptophan that is involved in the regulation of the defense system through its action as a precursor of antioxidants and its effect on the inflammatory response [64].

In addition to these findings, it was shown that SGSv had a very potent ·OH scavenging activity [65-66]. Diversos estudios han demostrado que extractos crudos de *Stevia rebaudiana* son responsables de actividades antioxidantes en modelos murinos y empleando pruebas químicas como

5. Conclusion

SGSv single used is not capable of generating oxidative stress and, on the contrary, would appear to induce an antioxidant effect in the common carp *Cyprinus carpio*. The antioxidant properties of SGSv in CCl₄- induced injuries in *Cyprinus carpio* model was proven when comparing the systems with CCl₄ alone system and the mixture CCl₄ and SGSv system. The concentration of SGSv which showed to have antioxidant activity in the model used was 1g /L.

Conflict of interest

The authors declares that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

References

- [1] J. Suez, T. Korem, D. Zeevi, G. Zilberman-Schapira, C.A. Thaiss, O. Maza, ... and Y. Kuperman, "Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota". *Nature*, vol. 514, pp.181-186, 2014.
- [2] C. Gardner, J. Wylie-Rosett, S.S. Gidding, L.M. Steffen, R.K. Johnson, D. Reader and A.H. Lichtenstein, "Non nutritive sweeteners: current use and health perspectives a scientific statement from the American heart association and the American diabetes association", *Diabetes care*, vol. 3, no 8, pp. 1798-1808, 2012
- [3] F.T. Lange, M. Scheurer and H.J. Brauch, "Artificial sweeteners—a recently recognized class of emerging environmental contaminants: a review", *Analytical and Bioanalytical Chemistry.*, vol. 403, no 9, pp. 2503–2518, 2012.
- [4] V. Chatsudthipong, and C. Muanprasat, "Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness", *Pharmacology and therapeutics*, vol. 121, no 1, pp. 41-54, 2009.
- [5] Q. Yang, "Gain weight by "going diet?" Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar craving" *Yale Journal of Biology and Medicine*, vol. 83, pp. 101-108, 2010.
- [6] J.J. Thomas, D. Cavan and D. Kerr, "Preventing childhood obesity by reducing consumption of carbonated drinks: cluster randomised controlled trial" *British Medical Journal*, vol. 328, no 7450, pp. 1237, 2004.

[7] FDA, Food and Drug Administration "Cyclamate (Cyclamic Acid, Calcium Cyclamate and Sodium Cyclamate) Commissioner's Decision", <http://www.fda.gov/downloads/Food/IngredientsPackagingLabeling/FoodAdditivesIngredients/UCM404344.pdf>, Accessed 28 November 2016.

[8] R. Dhingra, L. Sullivan, P.F. Jacques T.J. Wang, T.J. Fox, J.B. Meigs, R.B. D'Agostino, J.M. Gaziano and R.S. Vasan, "Soft drink consumption and risk of developing cardiometabolic risk factors and the metabolic syndrome in middle-aged adults in the community" *Circulation*, vol. 116, no 5, pp. 480–488, 2007.

[9] P.L. Lutsey, L.M. Steffen and J. Stevens, "Dietary intake and the development of the metabolic syndrome: the Atherosclerosis Risk in Communities study" *Circulation* vol. 117, no 6, pp.754–761, 2008.

[10] W.C. Winkelmayr, M.J. Stampfer, W.C. Willett and G.C. Curhan, "Habitual caffeine intake and the risk of hypertension in women" *Journal of the American Medical Association*, vol. 294, no 18, pp.2330–2335, 2005.

[11] T.I. Halldorsson, M. Strøm, S.B. Petersen and S.F. Olsen, "Intake of artificially sweetened soft drinks and risk of preterm delivery: a prospective cohort study of 59,334 Danish pregnant women" *The American journal of clinical nutrition*, 2010.

[12] N. A. Elnaga, M. I. Massoud, M. I. Yousef and H. H. Mohamed, "Effect of stevia sweetener consumption as non-caloric sweetening on body weight gain and biochemical's parameters in overweight female rats" *Annals of Agricultural Sciences*, vol. 61, no 1, pp. 155-163, 2016.

[13] N. C. Kim and A. D. Kinghorn, "Highly sweet compounds of plant origin" *Archives of Pharmacal Research*, vol. 25, no 6, pp.725-746, 2002.

- [14] A. Periche, M.L. Castelló, A. Heredia and I. Escriche, "Influence of drying method on steviol glycosides and antioxidants in *Stevia rebaudiana* leaves", *Food Chemistry*, vol. 172, pp. 1-6, 2015.
- [15] G. J. Gerwig , E. M. te Poele , L. Dijkhuizen and J. P. Kamerling, "Chapter One-Stevia Glycosides: Chemical and Enzymatic Modifications of Their Carbohydrate Moieties to Improve the Sweet-Tasting Quality", *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, vol. 73, pp.1-72, 2016.
- [16] M. C. Carakostas, L. L. Curry, A. C. Boileau and D. J. Brusick, "Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages", *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, no 7, pp.S1-S10, 2008.
- [17] S. K. Goyal and R. K. Goyal, "Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review", *International Journal of Food Sciences and Nutrition.*, vol. 61, no 1, pp.1-11 2010.
- [18] Stevia Market: Global Industry Analysis and Opportunity Assessment 2014 – 2020, Available at <http://www.futuremarketinsights.com/reports/global-stevia-market>
- [19] J. O. Atteh, O. M. Onagbesan , K. Tona, E. Decuypere, J. M. Geuns, and J. Buyse, "Evaluation of supplementary stevia (*Stevia rebaudiana*, bertoni) leaves and stevioside in broiler diets: effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance". *Journal of animal physiology and animal nutrition*, vol. 92, no 6, pp. 640-649, 2008.
- [20] C. Boonkaewwan, C.,Toskulkao, and M. VonGSvakul, "Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stevioside and its metabolite steviol on THP-1 cells" *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 54, no 3, pp. 785-789, 2006.

[21] R. Abudula, P.B. Jeppesen, S.E.D. Rolfsen, J. Xiao and K. Hermansen, "Rebaudioside A potently stimulates insulin secretion from isolated mouse islets: studies on the dose-, glucose-, and calcium-dependency", *Metabolism*, vol.53, no 10, pp. 1378-1381, 2006.

[22] P.B. Jeppesen, S. Gregersen, C.R. Poulsen and K. Hermansen, "Stevioside acts directly on pancreatic β -cells to secrete insulin: Actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate-sensitive K⁺- channel activity", *Metabolism*, vol. 49, no 2, pp. 208–214, 2000.

[23] P. Chan, B. Tomlinson, Y.J. Chen, J.C. Liu, M.H. Hsieh and J.T. Cheng, "A double-blind placebo-controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension", *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 50, no 3, pp. 215-220, 2000.

[24] M. Puri and D. Sharma, "Antibacterial activity of stevioside towards food-borne pathogenic bacteria", *Engineering in Life Sciences*, vol. 11, no 3, pp. 326-329, 2011.

[25] H. Sies (Ed.), "Oxidative stress". Elsevier, pp.4-5, 2013.

[26] A. Valavanidis, T. Vlahogianni, M. Dassenakis and M. Scoullou, "Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants", *Ecology and Environmental Safety*, vol. 64, no 2, pp. 2006.

[27] F.F. Ahmad, D.L. Cowan and A.Y. Sun, "Detection of free radical formation in various tissues after acute carbon tetrachloride administration in gerbil". *Life Science*, vol. 41, no 22, pp. 2469-2475, 1987.

[28] Y. Ohta, K. Nishida, E. Sasaki, M. Kongo, I. Ishiguro, "Attenuation of disrupted hepatic active oxygen metabolism with the recovery of acute liver injury in rats intoxicated with carbon

tetrachloride". *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, vol. 95, no 2, pp.191-207, 1997.

[29] F. Ozturk, M. Ucar , I.C. Ozturk , N. Vardi ,K. Batcioglu, "Carbon tetrachloride-induced nephrotoxicity and protective effect of betaine in Sprague-Dawley rats", *Urology*, vol. 62, no 2, pp.353-356, 2003.

[30] N. Tirkey, S. Pilkhwal, A. Kuhad and K. Chopra, "Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney" *Biomedical Central Pharmacology*, vol. 5, no 1, pp. 1-8, 2005.

[31] H. Malekinejad, A. Alizadeh, H. Cheraghi, S. Meshkin and F. Dardmeh, "The protective effect of liquorice plant extract on CCl₄-induced hepatotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*)" *Veterinary Research Forum*, vol. 1, no 3, pp. 158-164, 2012.

[32] G. Yin, L. Cao, P. Xu , G. Jeney, M. Nakao and C. Lu, "Hepatoprotective and antioxidant effects of Glycyrrhiza glabra extract against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced hepatocyte damage in common carp (*Cyprinus carpio*)" *Fish physiology and biochemistry*, vol. 37, no 1, 209-216, 2011.

[33] J. Jia, L. Cao, J. Du, P. Xu, G. Jeney, G. Yin, "The protective effect of silymarine on the carbon tetrachloride (CCl₄)- induced liver injury in common carp (*Cyprinus carpio*). *In vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*, vol. 49, no 3, pp. 155-161, 2013.

[34] Z.Y. Jiang, J.V. Hunt, and S.P. Wolff, "Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein", *Analytical Biochemistry* vol. 202, no 2, pp. 384–389, 1992.

[35] J. A. Büege, and S.D. Aust, "Microsomal lipid peroxidation", *Methods in Enzymology* vol. 52, pp. 302-310, 1978.

[36] R. L. Levine, J.A. Williams, E.R. Stadtman, and E. Shacter, "Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins". *Methods in Enzymology*, vol. 233, pp. 346-357, 1994.

[37] S. Parvez, and S. Raisuddin, "Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctata* (Bloch)", *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 20, pp. 112-117, 2005.

[38] P.C. Burcham, "Modified protein carbonyl assay detects oxidised membrane proteins: a new tool for assessing drug and chemically induced oxidative cell injury", *Journal of Pharmacology and Toxicology Methods*, vol. 56, pp. 18-22., 2007.

[39] H. P. Misra, and I. Fridovich, "The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 247, pp. 3170-3175, 1972.

[40] R. Radi, J.F. Turrens, L.Y. Chang, K.M. Bush, J.D. Carpo, and B.A. Freeman, "Detection of catalase in rat heart mitochondria". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, pp. 22028-22034, 1991.

[41] M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding", *Analytical Biochemistry*, vol. 72, pp. 248-254, 1976.

[42] S. Shukla, A. Mehta, P. Mehta, and V.K. Bajpai, "Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert", *Experimental and Toxicologic Pathology*, vol. 64, pp 807-811, 2012.

[43] A.F. Hernández, M. Lacasaña, F. Gil, M. Rodríguez-Barranco, A. Pla, O. López-Guarnido, "Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene-environment interaction perspective", *Toxicology*, vol. 307, pp. 95–102, 2013.

[44] A. Sureda, S. Tejada, A. Boxsa, S. Deudero, "Polycyclic aromatic hydrocarbon levels and measures of oxidative stress in the Mediterranean endemic bivalve *Pinna nobilis* exposed to the Don Pedro oil spill", *Marine Pollution Bulletin*, vol. 71, pp. 69-73, 2013.

[45] S. Espín, E. Martínez-López, M. León-Ortega, J.E. Martínez, A.J. García- Fernández, "Oxidative stress biomarkers in Eurasian eagle owls (*Bubo bubo*) in three different scenarios of heavy metal exposure", *Environmental Research*, vol. 131, pp. 131-134, 2014.

[46] L.M. Gómez-Oliván, M. Galar-Martínez, H. Islas-Flores, S. García-Medina, and N. SanJuan-Reyes, "DNA damage and oxidative stress induced by acetylsalicylic acid in *Daphnia magna*", *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, vol. 164, pp. 21-26., 2014.

[47] M. Galar-Martínez, L.M. Gómez-Oliván, A. Amaya-Chávez, C. Razo-Estrada, and S. García-Medina, "Oxidative stress induced on *cyprinus carpio* by contaminants present in the water and sediment of madín reservoir", *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, vol. 45, no. 2, pp. 155-160, 2010.

[48] N. Sanjuan-Reyes, L.M. Gómez-Oliván, M. Galar-Martínez, P. Vieyra-Reyes, S. García-Medina, H. Islas-Flores, and N. Neri-Cruz, "Effluent from an NSAID-manufacturing plant in Mexico induces oxidative stress on *Cyprinus Carpio*", *Water, Air, and Soil Pollution*, vol. 224, no. 9, 2013.

- [49] D. Zhu, Z. Shen, J. Liu, J. Chen, Y. Liu, Ch. Hu, Z. Li, Y. Li, "The ROS-mediated activation of STAT-3/VEGF signaling is involved in the 27-hydroxycholesterol-induced angiogenesis in human breast cancer cells", *Toxicology Letters*, vol. 264, pp.79-86, 2016.
- [50] R. V. Roy, P. Pratheeshkumar, Y. O. Son, L. Wang, J. A. Hitron, S. P. Divya, Z. Zhang, X. Shi "Different roles of ROS and Nrf2 in Cr(VI)-induced inflammatory responses in normal and Cr(VI)-transformed cells" *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 307, pp. 81-90, 2016.
- [51] E. Belaidi, J. Morand, E. Gras, J.L. Pépin, D. Godin-Ribuot, "Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications", *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 168, pp. 1-11, 2016.
- [52] I.S. Kim, M. Yang, O.H. Lee, and S.N. Kang, "The antioxidant activity and the bioactive compounds content of *Stevia rebaudiana* water extracts", *LWT- Food Science and Technology*, vol. 44, pp. 1328–1332, 2011.
- [53] R. Morelli, S. Russo-Volpe, N. Bruno, and R.L. Scalzo, "Fenton- dependent damage to carbohydrates: Free radical scavenging activity of some simple sugars". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, pp. 7418–7425, 2003.
- [54] A. Nishizawa, Y. Yukinori, and S. Shigeoka S, "Galactinol and raffinose as a novel function to protect plants from oxidative damage". *Plant Physiology*, vol. 147, pp. 1251–1263, 2008.
- [55] A. Kawakami, Y. Sato, and M. Yoshida, "Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance". *Journal of Experimental Botany*, vol. 59, pp. 803–814, 2008.

- [56] M.R. Bolouri-Moghaddam, K. Le Roy, L. Xiang, F. Rolland, and W. Van den Ende, “Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells”, *Journal FEBS* vol. 277, pp. 2022–2037., 2010.
- [57] S. Hajhashemi, and J.M.C. Geuns, “Radical scavenging activity of steviol glycosides, steviol glucuronide, hydroxytyrosol, metformin, aspirin and leaf extract of *Stevia rebaudiana*”, *Free Radicals and Antioxidants*, vol. 3, pp 34-41, 2013.
- [57] R.M. Martínez-Alvarez, A.E. Morales, and A. Sanz, “Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors”, *Reviews in Fish Biology and Fisheries* , vol. 15, pp. 75–88, 2005.
- [58] S. Ozden, B. Catalgol, S. Gezginci-Oktayoglu, P. Arda-Pirincci, S. Bolkent, and B. “Methiocarb-induced oxidative damage following subacute exposure and the protective effects of vitamin E and taurine in rats”, *Food Chemistry and Toxicology*, vol. 47, pp. 1676–1684, 2009.
- [59] H.H. Wang, T.M. Hung, J.Wei, and A. N. Chiang, “Fish oil increases antioxidant enzyme activities in macrophages and reduces athero-sclerotic lesions in apoE-knockout mice, *Cardiovascular Research*, vol. 61, pp. 169–176, 2004.
- [60] S. A. Levine, and J.H. Reinhardt, “Biochemical-pathology initiated by free radicals, oxidant chemicals, and therapeutic druGSv in the etiology of chemical hypersensitivity disease”, *Journal of Orthomolecular Psychiatry*, vol. 12, pp. 166–183, 1983.
- [61] P. Holvoet, A. Rull, A. García-Heredia, S. López-Sanromà, B. Geeraert, J. Joven, and J. Camps, “*Stevia*-derived compounds attenuate the toxic effects of ectopic lipid accumulation in the liver of obese mice: A transcriptomic and metabolomic study” *Food and Chemical Toxicology*, vol 77, pp. 22-23, 2015.

[62] T. Fiaschi, F. Magherini, T. Gamberi, P.A. Modesti, and A. Modesti, "Adiponectin as a tissue regenerating hormone: more than a metabolic function". *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 71, pp. 1917–1925, 2014.

[63] J.M.C. Geuns, and T. Struyf, "Radical scavenging activity of steviol glycosides and steviol glucuronide, Stevia, Science no Fiction. In: Geuns JMC, ed. ProceedinGSv of the 4th EUSTAS Stevia Symposium. Belgium: KULeuven; pp. 191-207, 2010, ISBN 978-90-742-53079.

[64] B. Geeraert, F. Crombe, M. Hulsmans, N. Benhabiles, J.M. Geuns, and P. Holvoet, "Stevioside inhibits atherosclerosis by improving insulin signaling and antioxidant defense in obese insulin-resistant mice". *International Journal of Obesity*, vol. 34, pp. 569–577, 2010.

[65] S. Stoyanova, J.M.C. Geuns, W. Van den Ende, and E. Hideg, "The food additives inulin and stevioside counteract oxidative stress", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, vol. 62-63, pp. 207-2014, 2011.