



**Universidad Autónoma del Estado de México**  
Facultad de Química

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"INFLUENCIA DEL DICLOFENACO ADICIONADO A AGUA SOBRE LAS  
CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y TEXTURALES DE LA CARNE DE CARPA  
COMÚN (*Cyprinus carpio*)"

POR

Q.A. KARINNE SAUCEDO VENCE

TUTOR ACADÉMICO

Dr. OCTAVIO DUBLÁN GARCÍA

TUTORES ADJUNTOS

Dr. LEOBARDO M. GÓMEZ OLIVÁN

Dra. LETICIA XOCHITL LÓPEZ MARTÍNEZ

## Índice

	Pag
1. Resumen	4
2. Introducción	5
3. Antecedentes	6
3.1 El agua	6
3.2 Contaminación del agua	6
3.3 Contaminación del agua por productos farmacéuticos	7
3.3.1 Comportamiento de los fármacos en el ambiente	9
3.3.2 Efecto de los productos farmacéuticos sobre la biota	10
3.3.2 Legislación y valoración del riesgo ambiental de los fármacos	11
3.4 Diclofenaco	12
3.4.1 Características generales	12
3.4.2 Farmacodinamia	13
3.4.3 Farmacocinética	13
3.4.4 Efectos tóxicos del diclofenaco en diversas especies	14
3.5 Bioensayo	16
3.6 Bioindicadores	17
3.6.1 <i>Cyprinus carpio</i> (Linnaeus, 1758)	17
3.6.1.1 Rasgos biológicos	17
3.6.1.2 Composición nutrimental	18
3.6.1.3 Hábitat y biología	19
3.6.1.4 Importancia económica de la carpa común en México	20
3.6.1.5 Estadísticas de producción	21
3.7 Biomarcadores	22
3.7.1 Clasificación de biomarcadores	22
3.7.1.1 Biomarcadores de exposición o de dosis interna	22
3.7.1.2 Biomarcadores de susceptibilidad	23
3.7.1.3 Biomarcadores de efecto (o respuesta)	23
3.8 Estrés oxidativo	24
3.8.1 Radicales libres	25

3.8.2	Especies reactivas del oxígeno	25
3.8.3	Efecto del estrés oxidativo sobre biomoléculas	26
3.8.3.1	Lipoperoxidación	26
3.8.3.1.1	Etapas de la lipoperoxidación	27
3.8.3.1.2	Efectos de la lipoperoxidación	28
3.8.3.2	Daño a proteínas	28
3.8.3.3	Daño genético	29
3.8.4	Antioxidantes	30
3.9	Carne de pescado	31
3.9.1	Generalidades del pescado	31
3.9.1.1	Tejido muscular del pescado	31
3.9.1.2	Composición del músculo de pescado	31
3.9.1.3	Biomoléculas presentes en el músculo del pescado	32
3.9.1.4	Cambios en la calidad de la carne de pescado	33
3.9.1.5	Propiedades funcionales de las proteínas del musculo de pescado	35
3.9.1.5.1	Solubilidad	35
3.9.1.5.2	Propiedades gelificantes	37
3.9.1.5.3	Capacidad emulgente	38
3.9.1.5.4	Capacidad de retención de agua	39
3.9.1.5.5	Perfil de textura	39
4.	Justificación	42
5.	Hipótesis	44
6.	Objetivos	44
6.1	Objetivo General	44
6.2	Objetivos Específicos	44
7.	Metodología	45
7.1	Colecta y mantenimiento de la carpa ( <i>Cyprinus carpio</i> )	45
7.2	Análisis fisicoquímicos	45
7.3	Identificación de proteínas	46
7.4	Evaluación del estrés oxidativo	46

7.5 Análisis estadístico	50
8. Resultados Artículo 1	51
9. Referencias	91
10. Anexos	98
Fig 1. Efecto de diclofenaco sobre el ácido láctico presente en el músculo de <i>Cyprinus carpio</i>	98
Figura 2. Efecto del diclofenaco sobre la proteína del músculo de <i>Cyprinus carpio</i>	99
Figura 3. Efecto del diclofenaco sobre la solubilidad de proteína del músculo de <i>Cyprinus carpio</i>	100
Figura 4. Efecto del diclofenaco sobre los grupos sulfhidrilos de proteína del músculo de <i>Cyprinus carpio</i>	101
Figura 5. Efecto del diclofenaco sobre el color (L*, a*, b*) de proteína del músculo de <i>Cyprinus carpio</i>	102
Figura 6. Parámetros de textura de la proteína del músculo de <i>Cyprinus carpio</i>	103
12. Conclusiones	104

## 1.RESUMEN

Este tema es muy importante debido a que la evaluación ecotoxicológica de los productos farmacéuticos en los cuerpos de agua es un área de investigación emergente a nivel mundial. El uso indiscriminado de medicamentos e incorrecta eliminación de estos productos, ha generado el ingreso de estas sustancias a los ecosistemas acuáticos por descargas municipales, hospitalarias e industriales lo que ha causado diversos efectos no deseados en el ambiente, ya que muchos de estos contaminantes son persistentes y son susceptibles a sufrir transformaciones bióticas y/o abióticas, produciendo metabolitos que son muchas veces más tóxicos que los productos originales. Algunos de los efectos que se han reportado por la presencia de estos contaminantes son la resistencia a antibióticos, daño a las comunidades microbianas por los desinfectantes, variación en el ciclo de vida y en las relaciones tróficas por los anestésicos, organismos como: artemia salina, en trucha, entre otros. El impacto de estos contaminantes, ha traído como consecuencia alteraciones proteicas, que se pueden reflejar como alteraciones en la textura y estructura de la carne modificando su calidad e integridad para consumo humano.

El propósito de esta investigación será medir el efecto del diclofenaco sobre las propiedades fisicoquímicas y texturales de la carne de carpa común (*Cyprinus carpio*) mediante la exposición de la especie a diferentes concentraciones de diclofenaco, se determinaron las características iniciales de la carpa, se realizó el análisis de perfil de textura, se estudió la estructura de la carne para cada tratamiento, se analizó el grado de influencia que tienen la cantidad como el tiempo de exposición de la carne de carpa al diclofenaco.

Los resultados del trabajo de investigación demostraron que la contaminación con diclofenaco produce daños fisicoquímicos y texturales en la carne de carpa, perjudicando la producción, distribución y consumo de éste alimento.

## 2. INTRODUCCIÓN

La evaluación ecotoxicológica de los productos farmacéuticos en los cuerpos de agua es un área de investigación con un desarrollo incipiente a nivel mundial. Los medicamentos son sustancias que tienen como finalidad curar, mitigar o prevenir enfermedades en diversos organismos. Debido a las actividades antropogénicas estos compuestos pueden ingresar al medio ambiente a través de descargas municipales, industriales y hospitalarias. El incremento de éstos en ambientes acuáticos ocasiona muchos efectos deletéreos en los organismos como: transmisión de genes de resistencia a antibióticos, daño a las comunidades microbianas, variación en el ciclo de vida y en las relaciones tróficas, además de diversas manifestaciones en organismos centinelas y endémicos de los ambientes señalados. Existe evidencia de que muchos de estos productos son persistentes en el ambiente y pueden llegar a las aguas superficiales y subterráneas, produciendo impactos en los organismos acuáticos. Muchas de estas sustancias son encontradas en aguas superficiales y en el subsuelo en concentraciones que van en magnitudes microgramos por litro ( $\mu\text{g/L}$ ). Los fármacos con diferentes estructuras, funciones y actividades como antibióticos, hormonas, anestésicos, antihipertensivos, antiulcerosos, antilipémicos, cardiovasculares, antidrepeivos, medios de contraste de rayos X y antiinflamatorios entre otros, han sido detectados en diferentes matrices ambientales. La principal forma de eliminar estos residuos farmacéuticos es a través de una eficiente remoción durante el tratamiento de las aguas residuales haciendo uso de combinaciones de procesos de oxidación avanzada, es importante resaltar que los métodos convencionales empleados en el tratamiento de aguas residuales, no eliminan estos contaminantes.

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 El agua**

Es un compuesto químico cuya fórmula es H<sub>2</sub>O; contiene en su molécula un átomo de oxígeno y dos de hidrógeno. A temperatura ambiente es un líquido insípido, inodoro e incoloro. El agua tiene una importancia esencial en biología porque es el medio en el cual se realizan procesos biológicos y es hábitat de múltiples comunidades acuáticas. Todos los organismos vivientes contienen agua. Su extracción para uso doméstico, agrícola, minero, industrial, para la generación de energía, así como el vertido de contaminantes, puede llevar un deterioro en su calidad y cantidad, impactando no sólo el sistema acuático, sino también a la disponibilidad de agua segura para consumo humano. (SAGAN, 2013)

#### **3.2 Contaminación del agua**

Los procesos acelerados de contaminación que aquejan a la humanidad están sin duda ligados al crecimiento de la población mundial y al aumento y diversificación de las actividades del hombre.

La contaminación ambiental es definida como cualquier modificación indeseable de la composición natural del medio, debida a la introducción de agentes biológicos, químicos o físicos que no pertenecen al mismo. La contaminación es una consecuencia indeseable de los procesos productivos que afecta no sólo a la salud humana sino también a la integridad de los ecosistemas, ocasionando daños a veces irreversibles, tales como la pérdida de biodiversidad. Donde quizás el deterioro ambiental se hace más acuciante es en el agua, pues es un insumo básico para la subsistencia de todo organismo vivo y para las actividades productivas del hombre (Albert y Namihira, 2004).

Los ecosistemas acuáticos, incluyendo ríos, lagos, mares y océanos son el vehículo y depósito final de un sin número de contaminantes que son vertidos directamente en éstos para su eliminación (desechos humanos e industriales), llevados por arrastres diversos (aportes de agua de lluvia y aguas de riego), depositados del aire o que son el producto de derrames accidentales o descargas intencionales.

Los contaminantes más importantes de los cuerpos de agua incluyen a moléculas inorgánicas y orgánicas, dentro de las que destacan: metales pesados, hidrocarburos, gases, detergentes, plaguicidas y recientemente los productos farmacéuticos que son actualmente considerados contaminantes emergentes.

Es importante mencionar que muchos contaminantes son bioacumulados a lo largo de la cadena alimentaria, ya que la ingestión de partículas en suspensión o alimentos contaminados depende de los hábitos alimenticios de cada uno de los hidrobiontes (Moreno, 2003).

La toxicidad producida por contaminantes como metales pesados, hidrocarburos y plaguicidas en ambientes acuáticos ha sido ampliamente evaluada, pero existen pocos estudios sobre el efecto de los productos farmacéuticos.

Sustancias como aceites, grasas, breas, tinturas, productos químicos sintéticos, plaguicidas y otros afectan los procesos metabólicos de los organismos acuáticos, incluso se ha demostrado que producen estrés oxidativo. Investigaciones realizadas en anfípodos de agua dulce (*Gammarus lacustris* Sars y *Gammarus tigrinus*), expuestos a disolventes orgánicos presentes en aguas negras, mostraron una elevación significativa en los niveles de catalasa, peroxidasa, glutatión s-transferasa y en la concentración celular de peróxido de hidrógeno, lo cual puede derivar en la acumulación del  $H_2O_2$  y provocar daño a las estructuras lipídicas derivando en una lesión celular o en la muerte del organismo (Timofeyev *et al.*, 2006)

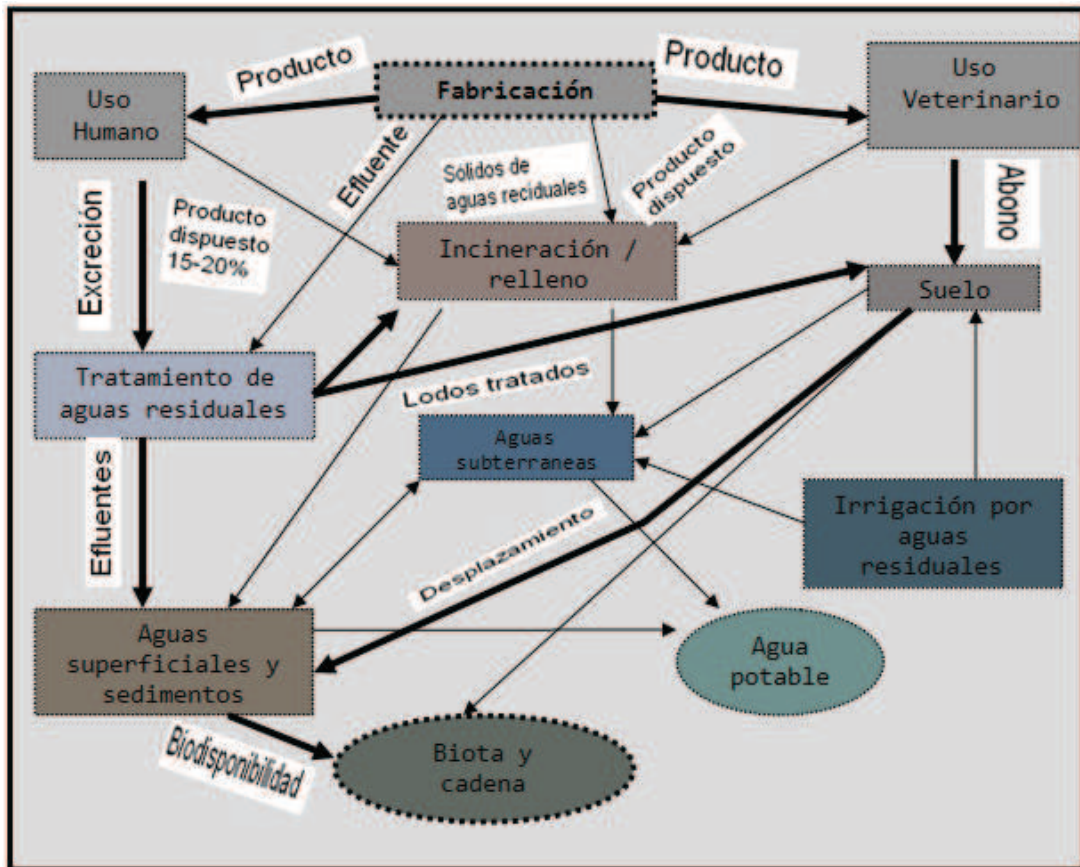
### **3.3 Contaminación del agua por productos farmacéuticos**

Los fármacos son componentes biológicamente activos, empleados para restablecer la salud tanto de los seres humanos como de los animales. Estas sustancias pueden tener efectos parecidos, incluyendo los adversos, en mamíferos y no mamíferos, ya que comparten muchos receptores y moléculas blanco similares, que se han conservado a través de la evolución. Sin embargo, pueden producir respuestas inesperadas en organismos menores debido a diferencias farmacocinéticas, farmacodinámicas y fisiológicas (Fent *et al.*, 2006b).

Los fármacos pueden ser introducidos al ambiente (Figura 1) después de su uso en pacientes y animales, ya que son excretados de forma inalterada o como metabolitos a través de la orina o las heces en las descargas de agua doméstica hacia los ríos y lagos. Aunque una pequeña parte de



estos productos puede ser removida por plantas de tratamiento de agua, la gran mayoría no logra eliminarlos en su totalidad (SERMARNAT, 2007; Jemba, 2006, Jones *et. al.*, 2004)



**Figura 1.** Flujo de los farmacéuticos de uso humano y animal en el medio ambiente, (el tamaño de las líneas indica la masa relativa del fármaco) (Kümmerer y Henninger, 2003).

Productos farmacéuticos, tales como analgésicos, antibióticos, anticonvulsivos, hormonas y otros, se ha encontrado en cuerpos de agua alrededor de todo el mundo. Los primeros hallazgos fueron reportados en 1970. Dentro de los primeros estudios realizados se encuentra uno realizado en Alemania entre 1996 a 1998, que reportó la presencia de 55 fármacos en efluentes de plantas

de tratamiento, otra investigación similar se realizó en Estados Unidos entre 1999 y 2000, en este se detectaron 82 componentes farmacéuticos en un arroyo (Ternes et al., 2004)

Cabe hacer mención que los productos farmacéuticos sufren transformaciones abióticas por las características medio ambientales del sistema, o bien bióticas que generan metabolitos los cuales muchas veces pueden generar mayor toxicidad que los compuestos originales.

La contaminación por fármacos puede ocurrir en concentraciones traza (ppb y ppt), las cuales son relativamente bajas y difíciles de detectar (Jones et al., 2004). Sin embargo, los antiepilépticos, carbamazepina y gemfibrozil, han sido reportados en concentraciones de ng/L en muestras de agua para consumo humano en Alemania y Canadá, respectivamente (Jones *et al.*, 2004). Por otro lado (Borgmann *et. al.*, 2007), detectaron paracetamol, triclosan, ibuprofeno, naproxeno, ácido salicílico y diclofenaco en agua, a concentraciones superiores a 1750 ng/L (Fent *et al.*, 2006b).

### 3.3.1 Comportamiento de los fármacos en el ambiente

Una vez descargados el agua, la concentración de los fármacos en la fase acuosa puede disminuir por su adsorción a la fase sólida, esto es a los sólidos en suspensión, sedimentos o biota. Sin embargo, muchos medicamentos son componentes hidrofílicos y es poco probables que su absorción sea un factor significativo en la reducción de la concentración en las fase acuosa (Jones *et al.*, 2004)

La biodegradación puede ser la principal ruta de eliminación de algunos componentes de los medicamentos. Sin embargo, este proceso no sólo del tiempo de vida media, inherente a las características fisicoquímicas de éstos, sino también de las condiciones ambientales, el flujo del cuerpo de agua, las características bióticas y abióticas, entre otras. Así, ciertos fármacos como los anticancerígenos y algunos antibióticos han mostrado que no degradables (Jones *et al.*, 2004).

Dentro de los procesos que pueden sufrir los productos farmacéuticos en el ambiente acuático están (Gurr y Reinhard, 2006):

- ♣ **Dispersión y dilución:** la concentración de un componente puede disminuir y así la concentración no será suficiente para producir un efecto en los organismos. Este proceso sucede solo en regiones que reciben volúmenes importantes de precipitaciones pluviales.
- ♣ **Volatilización:** sucede con las sustancias que tienen constante de Henry elevada.

- ♣ **Sorción:** este proceso incluye tanto adsorción como absorción. La captación de los contaminantes por los sedimentos y por los sólidos suspendidos es una forma importante de mitigación, pero este material puede volver a la columna de agua cuando exista turbulencia en el medio.
- ♣ **Fotólisis:** es el proceso de disociación de las moléculas por efecto de la luz, y se divide en directa (cuando el tóxico absorbe luz y como resultado directo se transforma) e indirecta (cuando otras especies excitadas transfieren energía, electrones o átomos de hidrógeno provocando una transformación).
- ♣ **Biodegradación y biotransformación:** se lleva a cabo a través de enzimas producidas por las bacterias presentes en el ambiente para su utilización como fuente de energía.

### 3.3.2 Efecto de los productos farmacéuticos sobre la biota

Un fármaco de uso humano no necesariamente producirá una actividad similar en otros organismos, ya que el mismo blanco puede gobernar diversos procesos en diferentes especies, esto es especialmente importante para los invertebrados (Heckmann *et al.*, 2007; Nentwing, 2007).

Diversas investigaciones han demostrado que los fármacos y sus metabolitos en el ambiente producen efectos tóxicos sobre la biota. Así, Jones *et al.*, (2004), indican que algunos de los antibióticos inhiben el crecimiento de las bacterias encargadas de la degradación de la materia orgánica y por lo tanto interfieren con el proceso de nitrificación y desnitrificación (SEMARNAT, 2007). Por su parte, Nentwing (2007) reportó que la fluoxentina disminuye el crecimiento del alga *Pseudo kirchneriella subcapitata* y la fecundidad *Ceriodaphnia dubia*, por lo que este fármaco afecta a los organismos que habitan en los sedimentos así como en la columna de agua.

En peces se ha reportado que los medicamentos beta-bloqueadores tienen un efecto inhibitor de la actividad espermática en alguna especie (Jones *et al.*, 2004). Otros estudios refieren la producción de vitelogenina en peces machos debido a componentes estrógenicos en el agua que habitan, de tal modo que afectan el contenido de sus hormonas sexuales y se homeostasis (Borgmann *et al.*, 2007; Fent *et al.*, 2006a). Adicionalmente Nentwing (2007) indica que el etilen estradiol afecta de forma considerable la vida acuática en concentraciones de 10ng/L, particularmente a la población de peces.

### 3.3.2 Legislación y valoración del riesgo ambiental de los fármacos

Los requerimientos legales en lagunas regiones como Europa, estados Unidos y Canadá, exigen una valoración del riesgo ambiental para los nuevos fármacos que van a ser introducidos al mercado, para lo cual se realizan estudios toxicológicos en tres o cuatro especies diferentes (algas, *Cyprinus carpio* y peces) para valorar su comportamiento en el ambiente (Lange y Dietrich, 2002)

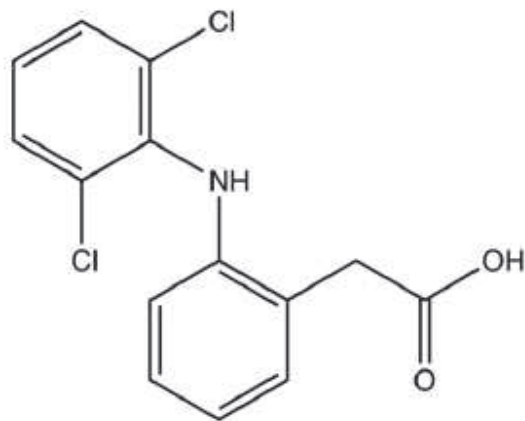
Para estos estudios es necesario calcular la concentración de fármaco que va a ser introducida al ambiente, basada en cinco años de producción. Si la concentración de medicamento o la de algunos de sus metabolitos es menor a  $1\mu\text{g/L}$  (1ppb), es considerado como aceptable y se le asigna una categoría de exclusión para los posteriores análisis. Por el contrario si es mayor a  $1\mu\text{g/L}$  se tiene que realizar una batería de pruebas toxicológicas, las cuales incluyen afectos en la respiración microbiana y pruebas de toxicidad crónica son necesarias si el fármaco tiene la capacidad de bioacumularse (Snyder *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2004).

Directrices de la UE (93-67-CEE), establecido por la Comisión de las Comunidades Europeas (1996) clasifica a las sustancias por categoría de riesgo de acuerdo a su LC50. Así, las sustancias con una CL50 de  $<1\text{ mg/L}$  son extremadamente tóxicos,  $1-10\text{ mg/L}$  son tóxicos y  $10-100\text{ mg/L}$  peligroso para los organismos acuáticos. Basado en este sistema de clasificación, DCF es peligroso para *Cyprinus carpio*.

En la actualidad en México no se cuenta con alguna legislación que contemple la presencia de productos farmacéuticos o de cuidado personal en el agua, mucho menos límites permisibles de éstos.

### 3.4 Diclofenaco

#### 3.4.1 Características generales



**Figura 2.** Estructura química del diclofenaco

**Nombre químico:** ácido 2- [2-[(2,6-diclorofenil)amino]fenil]acético

**Fórmula química:** C<sub>14</sub>-H<sub>11</sub>-Cl<sub>2</sub>-N-O<sub>2</sub>

**Log K<sub>ow</sub>:** 1.56

**Log D:** 1.22

**pK<sub>a</sub>:** 3.90

**Solubilidad en agua (g/L):** 21.3

**Clasificación farmacológica:** Antiinflamatorio no esteroideo (AINE)

**Clasificación terapéutica:** antiinflamatorio, antirreumático.

El diclofenaco (figura 2) es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) derivado del ácido benzoacético, que posee propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Es utilizado

ampliamente para el alivio del dolor en inflamaciones agudas y crónicas, síndromes reumáticos, procesos degenerativos, dolor inflamatorio agudo de tipo lumbar, postoperatorio, tendinitis, bursitis, ciática, gota, cirugía dental, dismenorrea y cefalea. En México su venta no requiere receta médica y es uno de los medicamentos más utilizados por la población (Gómez-Oliván *et al.*, 2009).

### 3.4.2 Farmacodinamia

El principal mecanismo de acción del diclofenaco es la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX), responsable de la síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico. Además bloquea la acción del glutamato, neuromodulador responsable del proceso de amplificación de la respuesta refleja sensibilización periférica al dolor, activa la vía inhibitoria descendente serotoninérgica, es decir, activa la liberación de opioides endógenos y de serotonina, neurotransmisores involucrados en promover diversos grados de analgesia, e inhibe a la elastasa de los gránulos de los leucocitos polimorfonucleares, proteínas que participan en la degradación del cartílago en los procesos reumáticos crónicos (Roberts y Monrrow, 2007; Diprio, 2001)

### 3.4.3 Farmacocinética

**Absorción:** después de la administración oral, el diclofenaco se absorbe rápida y completamente en el duodeno.

**Distribución:** la concentración plasmática máxima se alcanza entre dos a tres horas después de su administración. La unión a proteínas es del 99%.

El diclofenaco (DCF) ha sido identificado y cuantificado en diversos cuerpos de agua (Ternes- T.A. 1998), éste puede ser biodegradado por microorganismos o fotodegradado, en los metabolitos: 5,4'-dihidroxiclofenaco, 3-hidroxiclofenaco, 4'-hidroximetildiclofenaco, 3'-hidroximetildiclofenaco, 4'-hidroxiclofenaco y 5'-hidroxiclofenaco<sub>2</sub>. Estos dos últimos pueden ser oxidados a intermediarios de benzoquinonaimina, compuestos muy tóxicos para organismos acuáticos (Gómez- Oliván L. *et al.*, 2009).

**Biotransformación:** se metaboliza en el hígado por acción de la isoenzima de la subfamilia CYP2C del citocromo P<sub>450</sub> a 4-hidroxiclofenaco que es el metabolito principal y otras formas hidroxiladas, sufriendo posteriormente glucuronidación y sulfatación (Roberts y Monrrow, 2007;

Diprio, 2001). También se ha identificado que el diclofenaco sufre biotransformación (10 al 50%) por medio de las enzimas CYP2C8 y 9, a través de una glucoronidación por la enzima uridin 5'-difosfoglucuronosil transferasa (UGT2B754) y diversas vías de hidroxilación. Otro metabolito generado es el 5-hidroxiclofenaco resultado de las enzimas CYP2C8, CYP2C19, CYP2C18 y CYP2C8, el diclofenaco glucoronizado es metabolizado por CYP2C8 (Martínez *et al.*, 2006).

**Excreción:** se excreta en la orina (65%) y por la bilis (35%). Más de 90% es excretado en 72 horas. El tiempo de vida media oscila alrededor de 2 horas. Se acumula en el líquido sinovial después de su ingestión, lo cual explica la duración del efecto terapéutico que es mucho más largo que su vida media plasmática.

**Efectos adversos en humanos:** en algunos pacientes se produce sangrado y ulceración de la pared gastrointestinal. Entre el 5 y 15% de los usuarios se inducen ligeramente los niveles de transaminasas hepáticas en el plasma. Es posible encontrar también efectos en el sistema nervioso central, erupciones, reacciones alérgicas, retención de líquidos y edema, en raras ocasiones se presenta deficiencia en la función renal. Interfiere con el efecto antiplaquetario de la aspirina (Roberts y Monrrow, 2007; Diprio, 2001).

Se sabe que en el humano la biotransformación del DCF por hidroxilación es realizado por la CYP2C9 para obtener 4-hidroxiclofenaco; y por las familias CYP2C8, CYP2C18, CYP2C19 y CYP2B6 para tener 5-hidroxiclofenaco (Feng *et al.*, 2003; Bort *et al.*, 1996). Como se puede observar, estas mismas familias del CYP se encuentran presentes en los peces y pueden ser responsables de la biotransformación del DCF en los metabolitos hidroxilados.

#### **3.4.4 Efectos tóxicos del diclofenaco en diversas especies**

En el 2004, el diclofenaco se consideró el responsable de las muertes de tres especies de buitres en la India y Pakistán. Estudios posteriores encontraron que éste produjo falla renal debido a la acumulación de ácido úrico (Fent *et al.*, 2006b).

Además de las transformaciones abióticas, el DCF puede ser biotransformado por el citocromo (CY) CYP450 presentes en retículo endoplásmico liso de las células de los peces, en diferentes órganos

como hígado, riñón, branquias, intestino, cerebro, corazón, gónadas, entre otros (Cook y Burkhard, 1998; Stegman y Livingstone, 1998).

En los peces se han caracterizado diferentes familias de genes del CYPP450, tales como la CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP11, CYP17 y CYP19 (Buhler *et al.*, 1998; Stegman y Hahn, 1994; Stegman y Livingstone, 1998). Además estudios recientes realizados por Washington University-Zebrafish Genome Resources Project refieren la presencia de múltiples genes de la enzima la enzima UDP-Glucuronil Transferasa UDPGT en peces.

Diversas investigaciones sugieren que en el metabolismo de hidroxilación del DCF por parte del CYP pueden producir diversas especies reactivas del oxígeno (ERO) como el radical anión superóxido ( $O_2^*$ ) en diferentes sistemas biológicos. Además los metabolitos del DCF, 4-OH-diclofenaco y 5-OH-diclofenaco pueden ser oxidados a intermediarios de una iminoquinona reactiva, que es capaz de reaccionar con grupos nucleofílicos de las proteínas formando aductos. Existe también la formación radicales catiónicos de diclofenaco o nitróxidos e iminoquinolonas, los cuales están asociados al ciclo redox (Gómez *et al.*, 2003).

Por otro lado, Gómez-Lechón *et al.*, (2003), demostraron que éste fármaco puede inducir apoptosis de hepatocitos humanos y de ratas, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno a causa de uno de sus metabolitos principales, el 5'-OH-diclofenaco. Efectos similares fueron descritos en el pez *Oryzia slatipes*, mientras que en *Onchoryn chusmykiss* produjo alteraciones en el riñón y su acumulación en órganos como hígado y tejido muscular, por lo cual se concluyó que la exposición prolongada en el ambiente produce deficiencia en la condición general del pez (Schwaigeret *et al.*, 2004). Por su parte, Han *et al.*, (2007) encontraron un incremento en la expresión del gen para la producción de vitalonogénia, por lo que el diclofenaco también puede ser un potencial agente estrogénico.

Jones *et al.*, (2002) propusieron una clasificación de la toxicidad de medicamentos en función del grupo farmacéutico al que pertenecen, con base en la  $CE_{50}$  (tabla 1) para diferentes organismos de prueba, encontrándose que los analgésicos como el diclofenaco, resultan tóxicos para los crustáceos y dañinos para los peces. Por otro lado, de acuerdo a la clasificación del peligro



ambiental y valoración de riesgo de ingredientes farmacéuticos en Suecia (2002), el diclofenaco está clasificado como peligroso para el ambiente (Carlsson *et al.*, 2006; Escher *et al.*, 2005).

Tabla 1. Clasificación de la toxicidad de productos farmacéuticos en el ambiente acuático

Substancia	Extremadamente Tóxico $CE_{50} < 0.1$ mg/L	Muy tóxico $CE_{50} 0.1-1$ mg/L	Tóxico $CE_{50}$ 1-10 mg/L	Dañino $CE_{50}$ 10-100 mg/L	No tóxico $CE_{50} > 100$ mg/L
Analgésicos			D	D,E	
Antibióticos	A	B			
Antidepresivos		D			
Antiepilépticos			C		D,E
Cardiovasculares		D			
Citostáticos		A		D,E	

Donde: A-microorganismos; B-alga; C-Cnidaria; D-Crustáceos; E-Peces.

(Jones *et al.*, 2002)

### 3.5 Bioensayo

El efecto de los contaminantes en los organismos se valora mediante pruebas controladas de laboratorio conocidas como ensayos biológicos o “bioensayos”, los cuales consisten en medir la toxicidad de los contaminantes ya sea en forma individual o en mezcla, sometiendo a 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 (Espina y Vanegas, 1996; O'connor, 1994).

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.

### **3.6 Bioindicadores**

El monitoreo de la calidad del ambiente acuático se puede realizar a través del empleo de organismos de prueba, conocidos como bioindicadores. En esta evaluación toxicológica, se empleará *Cyprinus carpio*.

#### **3.6.1 *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758)**

##### **3.6.1.1 Rasgos biológicos**

Cuerpo alargado y algo comprimido. Labios gruesos. Dos pares de barbillas en el ángulo de la boca, las más cortas sobre el labio superior. Base de la aleta dorsal larga con 17-22 rayos ramificados y una espina dorsal fuerte y dentada en el frente; contorno de la aleta dorsal cóncavo anteriormente. Aleta anal con 6-7 rayos blandos; borde posterior de la 3ª espina de las aletas dorsal y anal con espinulas filudas. Línea lateral con 32 a 38 escamas. Dientes faríngeos 5:5, dientes con coronas aplanadas. Color variable, las carpas silvestres son de color parduzco verdoso sobre el dorso y parte superior de los costados, con tonalidad amarillo dorada ventralmente. Las aletas son oscuras, ventralmente con un matiz rojizo.



### 3.6.1.2 Composición nutrimental

La carpa presenta un contenido graso de algo más de 5 g/100 g 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 que contienen las carnes. En relación con el fósforo, es el pescado más rico en este mineral, sólo por debajo del pez espada. En la siguiente tabla se puede ver reducidamente la composición nutrimental de la carpa (Miranda, 2011).

Tabla 2. Composición química de la carpa en 100g de porción comestible

a) ELEMENTO	CANTIDAD
Humedad (%)	77.7
Proteínas (%)	15.1
Grasas (%)	4.2
Cenizas (%)	1.2

Fuente: Miranda, 2011

### 3.6.1.3 Hábitat y biología

La carpa común silvestre (generalmente referida simplemente como 'carpa' en esta hoja de información) vive en las corrientes medias y bajas de los ríos, en áreas inundadas y en aguas confinadas poco profundas, tales como lagos, meandros lacunares y embalses de agua. Las carpas son principalmente habitantes del fondo, pero buscan alimento en las capas media y superior del cuerpo de agua. Los típicos 'estanques de carpas' en Europa son pozas poco profundas, eutróficas con un fondo fangoso y vegetación acuática densa en los diques. El espectro ecológico de la carpa es amplio. El mejor crecimiento se obtiene cuando la temperatura del agua está en el intervalo 23 °C y 30 °C. Los peces pueden sobrevivir períodos de inviernos fríos. Salinidades hasta alrededor de 5‰ son toleradas. La gama de pH óptimo es 6,5-9,0. La especie puede sobrevivir bajas concentraciones de oxígeno (0,3-0,5 mg/litro) así como súper saturación. Las carpas son omnívoras, con una gran tendencia hacia el consumo de alimento animal, tal como insectos acuáticos, larvas de insectos, gusanos, moluscos y zooplancton. El consumo de zooplancton es dominante en estanques de peces donde la densidad de siembra es alta. Adicionalmente, la carpa consume los tallos, hojas y semillas de plantas acuáticas y terrestres, plantas acuáticas en descomposición, etc. El cultivo de la carpa en estanques se basa en la habilidad de la especie para aceptar y utilizar cereales proporcionados por los granjeros. El crecimiento diario de la carpa puede llegar a ser 2 a 4 por ciento del peso corporal. Las carpas pueden alcanzar 0,6 a 1,0 kg de peso corporal dentro de una estación en los estanques de cría de peces en policultivo de áreas subtropicales/tropicales. El crecimiento es mucho más lento en la zona temperada: ahí los peces alcanzan pesos corporales de 1 a 2 kg después de dos a cuatro estaciones de crianza. En Europa, las carpas hembras necesitan alrededor de 11 000 a 12 000 grados-días para alcanzar la madurez en las zonas climáticas temperadas y subtropicales. Las carpas macho están maduras dentro de un período que es 25-35 por ciento más corto. El período de madurez de las cepas asiáticas de carpa es levemente más corto. El desove de la carpa europea comienza cuando la temperatura del agua es 17-18 °C. Las cepas asiáticas comienzan a desovar cuando la concentración de iones del agua disminuye abruptamente al comienzo de la estación lluviosa. Las carpas silvestres son desovantes parciales. Las carpas domesticadas liberan todos sus huevos maduros dentro de unas pocas horas.

Después del tratamiento hormonal las carpas liberan sus huevos maduros dentro de un período mucho más corto, lo que hace posible "ordeñar" a los reproductores para obtener sus gametos

(huevos y espermios). La cantidad de huevos liberados es 100 a 230 g/kg de peso corporal. La cáscara del huevo se hace pegajosa después del contacto con el agua.

El desarrollo embrionario de la carpa común demora alrededor de tres días a 20-23 °C (60-70 grados-días). Bajo condiciones naturales, los peces eclosionados se pegan al substrato. Alrededor de tres días después de la eclosión se desarrolla la parte posterior de la vejiga natatoria, las larvas nadan horizontalmente y comienzan a consumir alimento externo con un tamaño máximo de 150-180 µm (principalmente rotíferos).

#### 3.6.1.4 Importancia económica de la carpa común en México

En México, el cultivo de carpa tiene gran importancia porque el manejo de su cultivo es sencillo, económico y de gran impacto social; independientemente de que el 78% de la superficie de los cuerpos de agua epicontinentales reúnen las características limnológicas adecuadas en donde se han creado importantes pesquerías que basan su producción en la explotación semi intensiva de carpas, dentro de las cuales la especie *Cyprinus carpio* es la más abundante (Aragones, 1995). En el 2009, la carpa común ocupó en la producción pesquera nacional el 17º lugar, mientras que en el Estado de México la carpa es una de las principales especies que se producen (Tabla 6) (CONAPESCA, 2009). Sin embargo, su consumo es monótono, es decir, se consume únicamente de forma empapelada o frita, no teniendo otra alternativa de su consumo. Por lo cual, es necesario presentar alternativas de consumo para que esta especie pueda ser aprovechada a nivel industrial; siendo esto último, una gran oportunidad de crecimiento económico para el Estado de México.

Tabla 3. Principales especies de la producción pesquera del Estado de México en 2009.

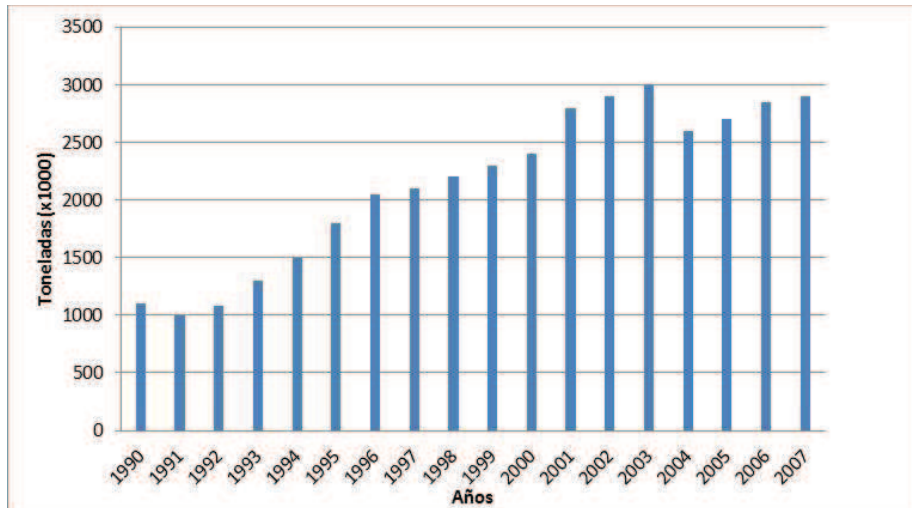
ESPECIE	TONELADAS
Carpa	6437
Trucha	3713
Mojarra	925

Fuente: CONAPESCA, 2009

### 3.6.1.5 Estadísticas de producción

**Gráfica 1. Producción global de *Cyprinus carpio***

(FAO Fishery Statistic)



La producción de carpa común cultivada fue cercana al 14 por ciento del total de la producción global de acuicultura de agua dulce en 2002 (3 202 561 toneladas). La producción de carpa común aumentó en una tasa promedio global de 9,5 por ciento/año entre 1985 (681 319 toneladas) y 2002. En la década pasada (1993-2002) ésta ha aumentado a 10,4 por ciento/año. Esto es mayor que la tasa de expansión de producción de cultivo de carpa china (10,1 por ciento/año), carpa plateada (8,8 por ciento/año) y carpa cabezona (7,2 por ciento/año), pero menor que aquella de tilapias (11,8 por ciento/año) durante esta década. En 2002, las principales áreas productoras de carpa común fueron Asia (alrededor de 93 por ciento) y Europa (4,5 por ciento). En Europa, la producción de carpa común fue 144 602 toneladas en 2002. Esto representa una reducción substancial desde el máximo de producción por sobre 402 000 toneladas en 1990, causada por cambios en Europa del este. Sin embargo, la producción europea parece estar aumentando gradualmente de nuevo; la mínima del período 1993-2002 fue 125 274 toneladas en 1997. ([http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus\\_carpio/es](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/es))

De acuerdo con los datos de FAO, el precio unitario promedio global de carpa común cultivada ha disminuido desde 1,43 USD/kg en 1993 a 0,92 USD/kg en 2002. Sin embargo, esto puede ser

debido principalmente a una caída en el valor del RMB yuan durante este período en China, donde tiene lugar una gran proporción de la producción (e.g. 70 por ciento en 2002).

### **3.7 Biomarcadores**

Un biomarcador es definido como un cambio en la respuesta biológica (midiendo los cambios moleculares, celulares y fisiológicos en la respuesta conductual) que puede ser relacionado con la exposición de tóxicos que están en el ambiente.

Los efectos negativos que se producen sobre los organismos como consecuencia de la exposición a los xenobióticos ambientales pueden expresarse inmediatamente o tardar años en manifestarse. Es por ello que para identificar el problema antes de que se genere un daño irreversible al ecosistema, se aplican estudios con marcadores que permitan establecer la relación entre los contaminantes y sus efectos biológicos, detectando alteraciones iniciales en fases que aún no son letales (van der Oost et al., 2003).

#### **3.7.1 Clasificación de biomarcadores**

##### **3.7.1.1 Biomarcadores de exposición o de dosis interna**

Los biomarcadores de exposición o de dosis interna pueden ser un compuesto exógeno (o un metabolito) dentro del organismo que refleja la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se realiza en fluidos corporales (sangre y orina, fundamentalmente) o incluso aire espirado (Repetto M. 1997). En el caso de tóxicos acumulativos, la dosis interna puede también reflejar la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales.

En 1986 Bernard y Lauwerys, dividen los biomarcadores de exposición en dos subgrupos, basándose en la especificidad de las pruebas de detección; a) Los biomarcadores selectivos se basan en la medida directa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos (por ejemplo: plomo

en sangre); b) Los no selectivos constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición (por ejemplo; tioésteres en orina como indicadores de exposición a sustancias electrófilas y, por tanto, reflejo de la absorción de sustancias mutagénicas y cancerígenas).

### **3.7.1.2 Biomarcadores de susceptibilidad**

Existen biomarcadores de susceptibilidad los cuales sirven como indicadores de sensibilidad individual al efecto de un xenobiótico o grupo de compuestos tóxicos. Se deben generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de ADN y sus fragmentos de restricción (RFLPs, por sus siglas en inglés), clonado de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas (Repetto, 1997).

### **3.7.1.3 Biomarcadores de efecto (o respuesta)**

Los biomarcadores de respuesta o efecto son indicativos de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. Incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARNm, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos (auto anticuerpos) contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares (núcleo, membrana, etc.) (Repetto, 1997).

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 estrés oxidativo, 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, superóxido dismutasa y peroxidasa. Las macromoléculas que pueden resultar afectadas incluyen a los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Di Guilio et al., 1989).



### 3.8 Estrés oxidativo

De manera habitual, el oxígeno se encuentra en su forma más estable ( $O_2$ ), sin embargo por reacciones puramente químicas, enzimáticas o por efecto de las radiaciones ionizantes, se pueden producir una serie de especies químicas o sustancias prooxidantes (moléculas o radicales libres altamente reactivos) que son capaces de producir daño celular. (Venero, 2002).

El desbalance entre la producción de RL y la defensa antioxidante provoca un daño orgánico conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales ocasionan el deterioro y muerte celular<sup>24-25</sup>. Se puede medir este daño mediante métodos directos e indirectos. Entre los indirectos, los cuales son más indicados, se encuentran los siguientes: a) determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre biomoléculas, como el grado de lipoperoxidación a través de la cuantificación del malondialdehído (MDA); b) medición de la concentración de antioxidantes como vitaminas E, C y coenzima Q, que se realiza mediante cromatografía líquida de alta resolución, sobre material biológico que puede ser plasma, orina o tejido; c) medición del estado oxidativo, que refleja el balance entre el sistema oxidante y pro-oxidante y es beneficioso en muchas enfermedades.

El posible destino celular bajo condiciones de estrés, dependerá de varios factores: el contenido endógeno de defensas antioxidantes, el grado de estimulación de las mismas bajo la condición de estrés, la reversibilidad de las modificaciones a macromoléculas producidas, la magnitud del estrés oxidativo y sus consecuencias funcionales. Existen varios sistemas de reparación de daño al ADN, y a nivel de proteínas hay muchas reacciones que son reversibles, en tanto que los lípidos quizás sean las macromoléculas más establemente afectadas y con consecuencias más directas sobre la integridad celular, (Berlett y Stadtman; 1997) de allí la gran atención que se ha puesto en ellos.

Las especies reactivas derivadas del oxígeno es un término colectivo ampliamente empleado, que comprende todas aquellas especies reactivas que, siendo o no radicales libres, centran su reactividad en un átomo de oxígeno. No obstante, a menudo, bajo la denominación ERO se incluyen otras especies químicas cuya actividad se centra o se deriva en átomos distintos al oxígeno. En rigor, sin embargo, las especies cuya reactividad deriva, o se centra en átomos como Nitrógeno o cloro deben referirse como ERN.

El estrés oxidativo es un estado de la célula en la cual se encuentra alterada la homeostasis oxido-reducción intracelular, esto significa que hay un desbalance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas (ERO) y/o por la deficiencia en los mecanismos antioxidantes (Ríos, 2003), todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado, es decir esta serie de eventos conducen al daño celular (Venero, 2002).

### **3.8.1 Radicales libres**

Desde el punto de vista químico los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas, o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración que genera gran inestabilidad y desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas que se producen por diferentes mecanismos como la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo), al interactuar con las principales moléculas del organismo. Los radicales libres (RL) más importantes de las células aerobias (como las células humanas), son el oxígeno, el súper óxido, los radicales de hidroxilo, el peróxido de hidrógeno y los metales de transición. Los RL que se forman dentro de las células pueden oxidar las biomoléculas (moléculas empleadas dentro de las células, en especial a los lípidos) y por tanto producir la muerte celular, es importante destacar que el ADN es muy sensible a la oxidación por los radicales libres (Venero, 2002).

### **3.8.2 Especies reactivas del oxígeno**

Se consideran como (ERO's) el oxígeno atómico (O) y el ozono (O<sub>3</sub>), al oxígeno singulete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) que se produce con la excitación de uno de los electrones desapareados de O<sub>2</sub> y al superóxido (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), al peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y al radical hidroxilo (-OH) que son especies parcialmente reducidas. Las ERO's en bajas concentraciones estimulan el crecimiento de las células, de algunas bacterias y de otros microorganismos, además de que son indispensables para la diferenciación celular y la muerte celular programada (Konigsberg, 2008).

El ( $^1\text{O}_2$ ) reacciona con la mayoría de los compuestos celulares, con la membrana plasmática, los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos e hidratos de carbono muy cerca del sitio donde se forma. Interacciona con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos siendo el producto principal la 8-hidroxi guanina.

El ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) es a la vez un anión y un radical, se produce principalmente en la cadena respiratoria. Es tóxico para la célula porque a partir de él se puede originar el ( $^1\text{O}_2$ ) y el ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

El ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) se forma cuando uno de los electrones del ( $\text{O}_2$ ) se ha apareado con un electrón de giro contrario. Puede formar aductos con los hidratos de carbono, aminoácidos y bases nitrogenadas. Es tóxico debido a que puede formar ( $^1\text{O}_2$ ) y ( $\cdot\text{OH}$ ), asociado a la reacción con algunos metales de transición con los que produce el radical ( $\cdot\text{OH}$ ) que interacciona irreversiblemente con las proteínas y el ADN.

El ( $\cdot\text{OH}$ ) se produce principalmente por la reacción de Fenton. Es uno de los compuestos más reactivos que existen, puede oxidar a las bases púricas y pirimídicas, así como a la desoxirribosa, además puede producir rupturas en el ADN. También reacciona con cualquier aminoácido en el sitio que se origina, incluso con los ácidos grasos poliinsaturados (Valavanidis *et al.*, 2006).

Otras fuentes endógenas de ERO's interiormente de las células son las enzimas oxidativas como triptófano dioxigenasa, xantino de oxidasa y el CYP450 reductasa, que pueden producir ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ), 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 estrés oxidativo (Valavanidis *et al.*, 2006).

### **3.8.3 Efecto del estrés oxidativo sobre biomoléculas**

#### **3.8.3.1 Lipoperoxidación**

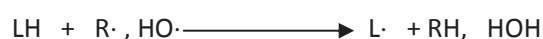
La oxidación lipídica por los RL se lleva a cabo mediante una reacción en cadena en la que el ácido graso al oxidarse, se convierte en radical de ácido graso con capacidad de oxidar a otra molécula vecina. Este proceso es conocido como lipoperoxidación y genera numerosos subproductos, muchos de ellos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

La lipoperoxidación o peroxidación lipídica puede ocurrir por vía enzimática como no enzimática, es una reacción auto catalítica donde las especies reactivas del oxígeno o radicales libres (RL) sustraen átomos de hidrógeno a las moléculas de ácidos grasos poliinsaturados, es decir, que atacan a los residuos de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, ya que altera la permeabilidad de la membrana celular produciéndose edema y muerte celular. Los RL destruyen a la membrana lipídica, produciendo una variedad de compuestos como alcoholes, aldehídos, y ésteres, los cuales pueden provocar mutagénesis y carcinogénesis, la reacción termina cuando dos moléculas de peróxidos colisionan entre sí o cuando reaccionan con algún antioxidante disponible. La determinación de los productos terminales de la peroxidación lipídica, entre ellos el malondialdehído, y la técnica de quimioluminiscencia constituyen métodos de amplio uso para evaluar el estrés oxidativo o el daño por radicales libres a las membranas celulares y las lipoproteínas (Valko et al., 2005).

### 3.8.3.1.1 Etapas de la lipoperoxidación

Este proceso está compuesto por un conjunto de reacciones en cadena, sobre los ácidos grasos poliinsaturados (Valavanidis *et al.*, 2006).

Iniciación de la lipoperoxidación: comienza cuando un ácido graso poliinsaturado es atacado por una ERO que es capaz de absorber o retirar un átomo de hidrógeno de un grupo metileno. El metileno queda como radical libre que se estabiliza mediante un rearrreglo molecular que da origen a un dieno que no reacciona con el sigulete de oxígeno, sino con oxígeno molecular y forma el radical peroxilo.



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





Terminación: la terminación de la lipoperoxidación es el resultado de la interacción de los radicales lipídicos y/o la formación de especies no radicales por los radicales lipídoperoxilo. El resultante – LOOH que puede descomponerse fácilmente a varias especies reactivas, incluyendo radicales lípido-alcoxil (LO·), aldehídos (malondialdehído), alcanos, epoxi-lípidos y alcoholes (Valavanidis *et al.*, 2006).

#### **3.8.3.1.2 Efectos de la lipoperoxidación**

Cuando reaccionan los radicales libres de ácidos poliinsaturados entre sí se 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 moléculas como los aminoácidos y dañar a la célula (Konigsberg, 2008)

#### **3.8.3.2 Daño a proteínas**

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

Muchas proteínas son capaces de tolerar gran cantidad de oxidaciones sin que aparentemente se vea afectada su función. La oxidación parcial y selectiva en algunos casos produce proteínas modificadas que pueden actuar como moduladores en algunas reacciones, favoreciendo la homeostasis celular, en este caso la oxidación tiene una finalidad fisiológicas. Por otro lado, existe una gran cantidad de agentes oxidantes que pueden dañar a las proteínas. Uno de los daños que

es utilizado como marcador de la oxidación directa de los residuos de lisinas, arginina, prolina y treolina. También pueden ser introducidos por reacciones con aldehídos (malonaldehído, 4-hidroxi-2-nonenal) producidos durante la lipoperoxidación o al incorporar un grupo carbonilo a la proteína al reaccionar residuos de lisina con azúcares reductores o de sus productos de oxidación (Konigsberg, 2008; Hangsber, 2002)

### **3.8.3.3 Daño genético**

Una de las consecuencias del estrés oxidativo es la producción de especies reactivas de oxígeno que pueden interactuar con el ADN y eventualmente producir mutaciones. Para identificar compuestos genotóxicos, se emplean biomarcadores específicos en el ADN de organismos expuestos. Estos estudios forman parte de las investigaciones toxicológicas y se les denominan “estudios especiales”. Su objetivo es correlacionar a los factores de riesgo y el incremento en el daño al ADN. La identificación de marcadores de genotoxicidad es útil para definir un estado de prepatogénesis, de vital importancia para la prevención. Si se induce un daño genético, este puede ser visualizado mediante técnicas citogenéticas o moleculares (Pastor, 2002).

Se puede decir que todo agente que provoque lesión celular originará enfermedad, si su acción es lo suficientemente extensa para abarcar un número grande de células. El daño casi siempre es precedido por una lesión inicial bioquímica, que afecta alguno de los sistemas básicos para la supervivencia de la célula, su destrucción o alteración funcional resultará en anormalidades en los tejidos, que a su vez integran órganos más o menos vitales, cuya función se verá deteriorada, el daño genético, por ejemplo, se traduce en modificaciones severas de la síntesis proteica (Vindas *et al.*, 2004).

La pérdida de bases, la desaminación de la citosina en uracilo y de la 5-metilcitosina en timina así como la ruptura de una de o dos hebras de ADN, son eventos que ocurren normalmente, siendo su tasa de producción muy baja pero continua (Hangsber, 2002). Sin embargo, dichos eventos pueden ser inducidos, elevando su tasa de producción por efecto de las ERO's. Ejemplo de ello es

el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) que tiene gran reactividad y la capacidad de desunir átomos de hidrógeno de la molécula de DNA, así como unirse a las bases formando aductos (Koningsberg, 2008)

La heterogeneidad de la molécula del ADN permite al hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) atacar tanto a las bases púricas o pirimidicas, y a la desoxiribosa generando rupturas en su cadena. El oxígeno  $\text{O}_2$  es más selectivo e interacciona con las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos, siendo el producto principal la 8-hidroxiguanina; ésta a su vez puede unirse al  $\cdot\text{OH}$ , pudiendo ocasionar la ruptura de la hebra, puede hacer puentes de hidrogeno con una adenina en lugar de una citosina, o bien con una guanina en lugar de una tiamina. Otros radicales hidroxil pueden reaccionar con uniones de azúcar-fosfato de ADN causando lesiones, incluyendo sitios sin purinas, donde las bases han sido removidas, oxidación del azúcar o fragmentación de desoxirribosa (Valavanidis *et al.*, 2006)

#### **3.8.4 Antioxidantes**

Todos los organismos soportan numerosos factores exógenos y endógenos de estrés oxidativo, por lo que existen sistemas antioxidantes de defensa regulables, tanto enzimáticos como no enzimáticos, que protegen al organismo del estrés oxidativo.

Entre los enzimáticos destacan la superóxido dismutasa (SOD), esta enzima destruye el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) mediante su transformación en peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), lo que contribuye al mantenimiento del equilibrio fisiológico antioxidante-prooxidante. (Domínguez 2006), la catalasa (CAT) transforma al  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  a cualquier pH entre 4 y 11 existen catalasas monofuncionales que tienen una sola actividad y otras que son capaces de oxidar algunas moléculas pequeñas como etanol y metanol, y la glutatión peróxidasa (GPX) cataliza la reducción de peróxidos ( $\text{ROOH}$ , inclusive al  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a alcoholes ( $\text{ROH}$ ) (Ríos, 2003).

La GPX y la glutatión reductasa (GRd) se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GPx/GRd), y la CAT de otro (SOD/CAT). Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par; la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la GPX lo hace a concentraciones bajas, lo que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas. Además, algunas citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), el interferón (IFN) y la interleucina-1 (IL-1) son capaces de inhibir la actividad de la GPX. (Cisneros *et al.*, 1997)

### 3.9 CARNE DE PESCADO

#### 3.9.1 Generalidades del pescado

##### 3.9.1.1 Tejido muscular del pescado

El músculo de pescado puede ser de dos tipos: rojo y blanco; ambos son parecidos en composición, pero el músculo rojo tiene un mayor contenido de hemopigmentos, tales como la mioglobina para el transporte de oxígeno y más lípidos no estructurales para proveer energía, reflejando su papel en una fuerte actividad natatoria de especies como el atún o la caballa. El músculo rojo está situado a lo largo de los laterales del cuerpo, debajo de la piel, seguido por el músculo blanco.

Ambos tipos de músculo, crean una estructura formada por fibrillas contráctiles (de diámetro de 1 a 3 micras), líquido citoplasmático o sarcoplasma, organelos e inclusiones como gotas de grasa.

##### 3.9.1.2 Composición del músculo de pescado

Dependiendo su función y solubilidad, las proteínas del músculo del pescado se pueden dividir en tres grupos:

1. **Proteínas estructurales** (actina, miosina, tropomiosina y actomiosina), que constituyen el 65-80% de la proteína total, las cuales dan al músculo su estructura y actividad. Estas proteínas son solubles en disoluciones salinas de concentración superior a 0,3 M.
2. **Proteínas sarcoplásmicas** (mioalbúmina, globulina y enzimas), que son solubles en agua y se encuentran normalmente en el plasma de las células, constituyendo entre el 18-20% del total de proteínas musculares.
3. **Proteínas del tejido conectivo** (estroma), representan alrededor del 3-5% del total de las proteínas, son solubles en disoluciones salinas muy concentradas, o mediante la cocción.

La propia naturaleza de los diferentes tipos de músculo refleja su importancia en la elaboración de productos marinos. Las proteínas sarcoplásmicas, al ser muy solubles, no contribuyen a la formación de geles, a diferencia de las proteínas miofibrilares, que confieren la estructura de geles



por acción del calor; mientras que las proteínas del estroma, que se solubilizan por calor, pueden ser componentes “inertes” en los productos finales (Estrada, 2005).

### 3.9.1.3 Biomoléculas presentes en el músculo del pescado

Lípidos: fosfolípidos y triglicéridos. Los primeros constituyen la estructura integral de la unidad de membranas en la célula (lípidos estructurales) y los triglicéridos se emplean como reserva energética. El músculo blanco de un pez magro típico, contiene menos del 1 % de lípidos, del cual, el 90% son fosfolípidos. Los lípidos en los alimentos provenientes del mar, tienen significativamente niveles más altos de ácidos grasos  $\Omega 3$ .

Agua: principal componente de la fracción comestible de los peces, siendo mayor la retención de agua en el pescado fresco, pues durante la cocción se pierde aproximadamente un cuarto de humedad.

Proteínas: éstas tienen un alto grado de digestibilidad, mayor al 90%.

Carbohidratos: su porcentaje en el pescado es insignificante.

Vitaminas y minerales: vitaminas hidrosolubles, el complejo B y C; vitaminas liposolubles A, D, K y E (Estrada, 2005).

En la tabla 4 se puede ver las cantidades de los principales constituyentes del músculo del pescado:

Tabla 4. Porcentaje de principales constituyentes del músculo de pescado (filete)

Constituyente	Mínimo	Variación normal	Máximo
Proteínas	6	16-21	28
Lípidos	0.1	0.2-2.5	67
Carbohidratos	0.1	Menor a 0.5	0.5

Cenizas	0.4	1.2-1.5	1.5
Agua	28	66-81	96

Fuente: Estrada, 2005

### 3.9.1.4 Cambios en la calidad de la carne de pescado

Al morir el pescado comienza inmediatamente un deterioro, la velocidad de degradación es mayor que la de carnes terrestres. Este tipo de degradación es llevado a cabo en una primera instancia por enzimas propias del músculo del pescado y posteriormente por enzimas producidas por microorganismos que ingresan al músculo; consecuentemente se producen cambios en la calidad del pescado, dando lugar a diferentes etapas de deterioro y por ende diferentes grados de frescura que son de importancia para la aceptación del mismo como materia prima en la industria alimentaria; ya que, de los atributos de calidad de la materia prima de la cual se parte y a la que se le someterá un proceso tecnológico es de vital importancia para obtener un producto final de buenas características (Oliveira, 1998).

No es posible fijar el tiempo de deterioro del pescado debido que, depende éste de muchos factores tales como: especie, talla, método de captura, manipulación, temperatura y condiciones físicas del pescado; sin embargo, se observa que el músculo del pescado atraviesa solamente por tres etapas post-mortem: irritabilidad o pre-rigor, rigor mortis o rigidez cadavérica y post-rigor o proceso alterativo, sin atravesar el proceso de maduración como las carnes rojas. Es esta la razón que hace difícil la manipulación tecnológica de la carne proveniente de productos acuícolas, debido a que se altera la funcionalidad de la proteína (Oliveira, 1998).

Existen por lo menos dos tipos de deterioro en el pescado: bacteriano y enzimático, de los cuales el enzimático es el que se da en una primera etapa, seguido por el bacteriano. En la tabla 3 se muestran los cambios autolíticos o provocados por las propias enzimas del pescado (Bourgeois, 1986).

Tabla 5. Cambios autolíticos en el pescado

ENZIMA	SUSTRATO	CAMBIOS PROVOCADOS	PREVENCIÓN/INHIBICIÓN
Enzimas glicolíticas	Glucógeno	Producción de ácido láctico, disminución de pH en tejidos, pérdida de capacidad para enlazar agua en el músculo.	El pescado debe de pasar por la etapa de rigor a temperaturas cercanas a 0°C.
Enzimas autolíticas, involucradas en degradación de nucleótidos	ATP, ADP AMP, IMP	Pérdida de sabor a pescado fresco, producción gradual de sabor amargo.	Igual que el anterior. La manipulación inadecuada acelera la degradación.
Catepsinas	Proteínas péptidos	Ablandamiento del tejido	Manipulación, almacenamiento y descarga inadecuada
Quimotripsina, tripsina carboxipentidasas	Proteínas péptidos	Autólisis de la cavidad visceral	El problema se agrava por congelación/descongelación y almacenamiento en frío prolongado
Colagenasas	Tejido conectivo	Desgajamiento de filetes	La degradación del tejido conectivo está relacionada con el tiempo y temperatura de almacenamiento en refrigeración.
OTMA desmetilasa	OTMA	Endurecimiento inducido por formaldehído	Temperatura de almacenamiento del pescado a -30°C.

Fuente: Estrada, 2005

### 3.9.1.5 Propiedades funcionales de las proteínas del musculo de pescado

Por lo general las proteínas tienen una gran influencia sobre los atributos sensoriales del alimento, por ejemplo: las propiedades texturales y organolépticas de los productos cárnicos dependen en buena medida de las proteínas musculares (miosina y actina). La funcionalidad de las proteínas alimentarias se define como aquellas propiedades físicas y químicas que derivan del comportamiento de las proteínas en los sistemas alimenticios durante el procesado, el almacenamiento, la preparación y el consumo (Vera, 2010).

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

Tabla 6. Propiedades funcionales de las proteínas

<b>INTERACCIONES DE PROTEÍNAS CON</b>		
<b>AGUA</b>	<b>AGUA Y PROTEÍNAS</b>	<b>LÍPIDOS O GASES</b>
Hinchamiento	Inducción de Viscosidad	<b>Capacidad de emulsificación</b>
Rehidratación	<b>Gelificación</b>	Estabilidad de emulsificación
<b>Retención de agua</b>	Formación de fibras	Habilidad espumante
<b>Solubilidad</b>	Formación de masas	Estabilidad espumante

Fuente: Miranda, 2011

De las propiedades de las proteínas destacan cuatro, especialmente cuando se habla de un proceso de embutidos, las cuales se describen a continuación.

#### 3.9.1.5.1 Solubilidad

La solubilidad de las proteínas afecta diversas propiedades de las mismas, entre estas: espesantes, espumantes, emulgentes y gelificantes; por lo cual una proteína insoluble tendrá muy poco uso en

el procesamiento de alimentos. La solubilidad de las proteínas depende de las interacciones iónicas e hidrófobas. Las primeras promueven las interacciones proteína- agua y aumentan la solubilidad y las segundas promueven la interacción proteína-proteína y disminuyen la solubilidad (Miranda, 2011).

La solubilidad puede ser definida como el porcentaje total de proteína muscular que permanece en solución bajo condiciones específicas y que no es sedimentable bajo fuerzas moderadas de centrifugación. Por lo tanto, representa un estado de equilibrio entre el soluto (proteína) y el disolvente (Miranda, 2011).

Las principales variables que pueden alterar la solubilidad son: el pH, la temperatura y la fuerza iónica. Estas variables afectan la solubilidad de las proteínas por que causan alteraciones en los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, así como en las interacciones presentes en la estructura molecular de la proteína (Miranda, 2011). La solubilidad de las proteínas se ve incrementada a temperaturas de entre 0 y 40-50°C.; sin embargo, al elevar la temperatura, se da un incremento de la energía cinética afectando las interacciones no covalentes que mantienen estable tanto las estructuras secundarias como terciarias de la proteína provocando con esto su desnaturalización, exponiendo los grupos hidrofóbicos que se encontraban en su interior los cuales interaccionan entre sí, provocando que se dé una disminución de la solubilidad y así precipitando (Miranda, 2011).

La fuerza iónica determina la capacidad de las proteínas (por ejemplo miofibrilares) para ligar agua y así poder entrar en disolución. Existen dos fenómenos que ocurren a diferentes fuerzas iónicas: la solubilización (salting-in) y la insolubilización (salting-out) (Miranda, 2011).

La mayoría de las proteínas alimentarias son ácidas, por lo que exhiben una solubilidad mínima a pH 4-5 (punto isoeléctrico), debido a la ausencia de repulsión electrostática, y máxima a pH's alcalinos. La desnaturalización por calor modifica el perfil de solubilidad de las proteínas frente al pH. Asimismo, a pH y fuerza iónica constantes, la solubilidad de la mayor parte de las proteínas suele incrementar con la temperatura entre 0°C y 40°C, exceptuando a las muy hidrófobas. Por

encima de los 40°C se presenta la desnaturalización de la proteína, lo cual provoca un descenso de la solubilidad (Fennema, 2000).

### **3.9.1.5.2 Propiedades gelificantes**

Un gel es un estado intermedio entre el estado sólido y el estado líquido. Técnicamente se define como un sistema sustancialmente diluido que exhibe un flujo de estado no estacionario, está formado por un entrecruzamiento de gruesas moléculas (polímeros) reticuladas por las uniones transversales (enlaces covalentes o no covalentes) formando una red inmersa en un líquido. Esta propiedad depende de la interacción agua-proteína. En esta estructura, el líquido impide que la red se rompa y por otro parte, la red mantiene atrapado al líquido; por lo cual las proteínas no pueden moverse. Esta transformación se ve facilitada por el calor, las enzimas o los cationes divalentes, en condiciones adecuadas. El papel de polímero es asumido por las proteínas miofibrilares, y el del solvente por el agua y sales minerales (Bucharles *et al.*, 1991).

La mayor parte de los geles proteicos alimentarios se preparan calentando una disolución de proteína. En este procedimiento de gelificación, la proteína en estado de sol se transforma primero en un “estado progel”, por desnaturalización. El progel suele ser un líquido viscoso en el que ya ha tenido lugar un cierto grado de polimerización. En esta etapa la proteína se despliega y se expone un número crítico de grupos funcionales (como grupos hidrófobos y grupos formadores de puentes de hidrógeno) de forma que permita el inicio de la segunda etapa, es decir, la constitución de la red tridimensional proteica. La formación del progel es irreversible, porque tienen lugar muchas interacciones proteína-proteína entre las moléculas desplegadas. Cuando el progel se enfría a temperatura ambiente o de refrigeración, el descenso de energía cinética térmica facilita la formación de enlaces no covalentes estables entre los grupos funcionales expuestos de las diversas moléculas; esto es lo que constituye la gelificación. Las fuerzas implicadas en la formación de la red son, fundamentalmente, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas. Las proteínas que contienen cisteína y cistina pueden polimerizar vía reacciones de intercambio sulfhidrilo-disulfuro durante el calentamiento, y formar una red covalente que continua al enfriarse (Fennema, 2000).

Las proteínas globulares con pesos moleculares menores a 23,000 Da, 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).

### **3.9.1.5.3 Capacidad emulgente**

La propiedad emulgente forma parte de un conjunto de propiedades funcionales, reagrupadas con el nombre de propiedades de "superficie" y esta es la habilidad de la proteína de participar en la formación de una emulsión y de estabilizar la nueva emulsión creada. 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. La capacidad de emulsión de una proteína depende de dos propiedades:

1. Propiedad de formar películas adsorbentes que rodeen los glóbulos de grasa.
2. Propiedad de reducir la tensión interfacial entre los componentes hidrófobos e hidrófilos del producto cárnico (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).

#### 3.9.1.5.4 Capacidad de retención de agua

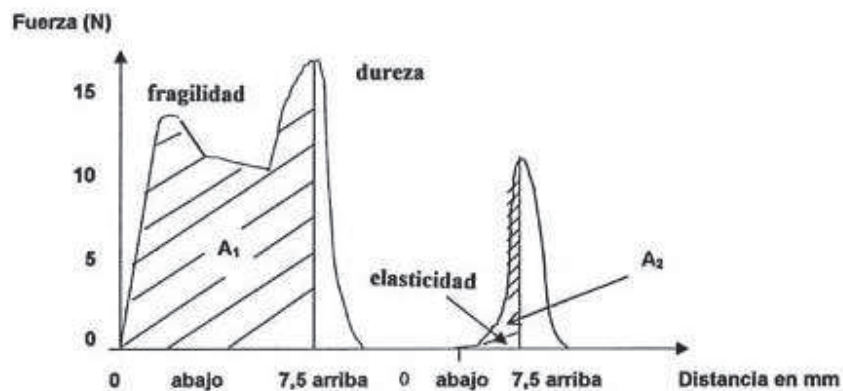
La capacidad de retención de agua se define como la facultad de la carne de conservar el agua que le es propia o el agua añadida, bajo el efecto de una tensión cualquiera (Bucharles *et al.*, 1991). El tejido muscular contiene un 75% de agua, en donde el principal responsable de la retención del agua es el componente proteico. La mayor parte de agua en el músculo está en 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 (Fennema, 2000).

#### 3.9.1.5.5 Perfil de textura

El análisis de perfil de textura (TPA) es un método objetivo correlacionado con el análisis sensorial de la textura. El ensayo comprende la compresión de una muestra dos veces seguidas, imitando el proceso de masticación.

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.





Curva típica de análisis de perfil de textura lograda en máquina Instron (Bourne, 1978).

Del análisis de las curvas de la figura se logran siete parámetros texturales.

- Fracturabilidad (fracturability, antes llamado brittleness) es la fuerza en el primer quiebre significativo de la curva.
- Dureza (hardness) es definida como la fuerza pico lograda durante el primer ciclo de compresión.
- Cohesividad (cohesiveness) es definido como la razón del área positiva lograda durante la segunda compresión y del área positiva de la primera compresión ( $A_2 / A_1$ ).
- Pegajosidad (adhesiveness) es definida como el área negativa lograda durante la primera compresión y representa el trabajo necesario para sacar el pistón de la muestra.
- Elasticidad (springiness antes llamado elasticity) es definida como la altura que recupera el alimento durante el tiempo que transcurre entre la primera y la segunda compresión.
- Gomosidad (Gumminess) es definida como el producto de dureza por cohesividad.
- Chiclosidad (Chewiness) es definida como el producto de gomosidad por elasticidad (que es igual a dureza por cohesividad y por elasticidad).

La calidad de un alimento es un concepto que el consumidor actual busca cuando adquiere cualquier tipo de producto alimenticio. Exceptuando la calidad nutricional y microbiológica de los alimentos, la calidad de estos se define como las características fisicoquímicas y funcionales de los mismos. Las principales características fisicoquímicas de la carne son: color, textura, sabor y olor; y se relacionan con el pH y Capacidad de Retención de Agua, la composición química, la degradación proteica, la interacción entre componentes y el grado de oxidación de las grasas. Por otro lado, Las propiedades funcionales de la carne se dividen en: propiedades de hidratación dependientes de las interacciones proteína-agua (retención de agua, adhesión); propiedades relacionadas con las interacciones proteína-proteína (formación de geles); y propiedades de superficie (emulsificación). Las más importantes, debido a su aplicación en la industria alimenticia, son la capacidad de retención de agua (CRA), la emulsificación de grasa (CE) y la gelificación (CG). La CRA se define como la capacidad que tiene la carne para retener agua, tanto propia como añadida, al someterse a una fuerza externa; el agua es retenida en el seno de una red de fibras musculares Su

importancia radica en estar directamente relacionada con la suavidad, la jugosidad y el color; depende del pH, los cambios *postmortem* y la presencia de sales. La CE se refiere a la habilidad de las proteínas cárnicas como agentes emulsificantes. Los productos de pasta fina se consideran como emulsiones del tipo aceite en agua, afectados por factores pre y *post rigor*, así como por el tipo y concentración de proteínas, y la relación proteína-grasa. La gelificación es el resultado de la desnaturalización y agregación de proteínas para formar una red ordenada; la miosina, la actina y en algunos casos la paramiosina, son las principales proteínas responsables de la formación de geles. La temperatura, el pH y las sales, al modificar la estructura cuaternaria o la distribución de la carga neta de las proteínas, afectan el grado de unión de las proteínas, alteran la naturaleza y la estructura de un gel.

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

El diclofenaco está relacionado con la calidad de la carne, se han hecho estudios, en los cuales se muestra que cuando este tipo de especies está en contacto no solo con medicamentos sino con metales pesados, presentan una licuefacción del cerebro, por lo que se cree que también afecta la calidad fisicoquímica, textural y sensorial de su carne.

#### 4.JUSTIFICACIÓN

El diclofenaco es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) derivado del ácido benzoacético, que posee propiedades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Es utilizado ampliamente para el alivio del dolor en inflamaciones agudas y crónicas, síndromes reumáticos, procesos degenerativos, dolor inflamatorio agudo de tipo lumbar, postoperatorio, tendinitis, bursitis, ciática, gota, cirugía dental, dismenorrea y cefalea. En México su venta no requiere receta médica y es uno de los medicamentos más utilizados por la población.

Productos farmacéuticos como el diclofenaco se han encontrado en cuerpos de agua alrededor de todo el mundo. Los primeros hallazgos fueron reportados en 1970. Dentro de los primeros estudios realizados se encuentra uno estudiado en Alemania entre 1996 a 1998, que reportó la presencia de 55 fármacos en efluentes de plantas de tratamiento, otra investigación similar se realizó en Estados Unidos en 1999 y 2000, en donde se detectaron 82 componentes farmacéuticos en un arroyo.

Estudios sobre el diclofenaco encontraron que produce falla renal debido a la acumulación de ácido úrico (Fent, *et al.*, 2006b) por otro lado, (Gómez, *et al.*, 2003) demostraron que este fármaco puede inducir apoptosis de hepatocitos humanos y de ratas, debido a la generación de especies reactivas de oxígeno a causa de uno de sus metabolitos principales, el 5'OH-diclofenaco. Efectos similares fueron descritos en el pez japonés *Oryzias latipes*, mientras que en *Onchoryncus mykiss* produjo alteraciones en el riñón y su acumulación en órganos como hígado y tejido muscular, por lo que se concluyó que la exposición prolongada en el ambiente produce deficiencia en la condición general del pez (Schwaiger, *et al.*, 2004). Por su parte, (Han, *et al.*, 2007) encontraron un incremento en la expresión del gen para la producción de vitalonogenina, por lo que el diclofenaco también puede ser un potencial agente estrógeno.

El diclofenaco produce una gran cantidad de agentes oxidantes que pueden dañar a las proteínas. Uno de los daños que es utilizado como marcador de la oxidación de las proteínas es su carbonilación, la cual puede llevarse a cabo por la oxidación directa de los residuos de lisina, arginina, prolina y treolina. También pueden ser introducidos por reacciones con aldehídos (malondialdehído, 4-hidroxi-2-nonenal) producidos durante la lipoperoxidación o al incorporar un grupo carbonilo a la proteína al reaccionar residuos de lisina con azúcares reductores o de sus

productos de oxidación (Konigsberg, 2008 y Hanksber, 2002). Debido a los cambios producidos por los agentes oxidantes en las proteínas tenemos que, también pueden existir alteraciones de las características fisicoquímicas, texturales, estructurales y sensoriales sobre la carpa común (*Cyprinus carpio*). Por lo que es necesario llevar a cabo un estudio para evaluar el efecto del diclofenaco sobre estas características.

## **5. HIPÓTESIS**

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

## **6. OBJETIVOS:**

### **6.1 Objetivo General**

Evaluar la influencia del diclofenaco sobre las propiedades fisicoquímicas y texturales de la carne de carpa común (*Cyprinus carpio*).

### **6.2 Objetivos Específicos**

- Determinar las características fisicoquímicas de la carne de carpa (*Cyprinus carpio*).
- Determinar la textura de la carne para cada tratamiento.
- Determinar el estrés oxidativo para cada tratamiento

## 7. METODOLOGÍA

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

Las carpas con una longitud de  $18.39 \pm 0.31$  cm y peso de  $50.71 \pm 7.8$  g se 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 que contienen agua oxigenada. 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 a su uso en el experimento. Durante la aclimatación los peces fueron alimentados con Pedregal Silver Corp<sup>MR</sup>. 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 ( $20 \pm 2$  ° C), la concentración de oxígeno de 80-90%, pH (7.5 a 8.0), la alcalinidad total ( $17,8 \pm 7,3$  mg / L) dureza total ( $18,7 \pm 0,6$  mg / L). La carpa se mantuvo en los ciclos naturales de luz y oscuridad.

### 7.2 Análisis fisicoquímicos

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

**Capacidad de retención de agua (CRA).** Método Honikel&Hamm (1983), reportado en (Dublán, 2006). Se tomarón 10g de músculo y se picarón. Se colocaron 5g 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 durante 30 minutos a 2500 rpm. Se decantó el sobrenadante y se midió el volumen. Se reportó el volumen de NaCl retenido por 100 g de muestra.

**Solubilidad.** Método (Ternes, 2004). Se extrajeron las proteínas (5 mg/mL, a pH 7) y se centrifugó a una temperatura de  $4$  °C para evitar su desnaturalización. Al sobrenadante extraído se le midió la concentración de proteínas mediante método biuret. Se reportó la solubilidad como la relación

entre el contenido de proteínas del sobrenadante y el contenido de la proteína sin centrifugar por 100.

**Determinación de grupos disulfuro y sulfhídrido totales.** 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 oscuridad. Se midió la absorbancia a 412 nm. Se transformó el valor de absorbancia empleando la siguiente ecuación.  $SS = (75,53(DO_1 - DO_2) / C)$ .

Siendo:

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

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

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

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

### 7.3 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

**Concentración de proteína.** Método biuret reportado en (Dublán, 2006). Utilizando tubos de ensayo se midió 1 mL de las disoluciones de proteína y se agregaron 3 mL del reactivo de biuret. Se homogeneizó y se dejó en reposo durante 30 minutos en la sombra sin contacto directo con la luz. Se midió la absorbancia de la muestra a una  $\lambda = 540$  nm. Los datos obtenidos se relacionaron con respecto a una curva patrón de Seroalbúmina-bovina de concentración 0-10 mg/mL. Reactivo de biuret de acuerdo a Gornall (1948). Se disolvió 1.5 g de  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  y 6 g de tartrato de sodio y potasio ( $NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ), se transfirió a un matraz volumétrico de 1000 mL 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.

**Formación de gel.** Extraídas las proteínas, se vertieron en un contenedor adecuado. 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 no mayor a 4 °C para madurar la estructura del gel. Se realizó prueba de penetración de geles. Se penetró la superficie del gel con un vástago de acrílico de 8 mm de diámetro a una velocidad de 25 mm/s.

**Análisis de textura.** Método García (Dublán, 2006). Se realizó en geles elaborados a partir de carne de carpa los cuales fueron medidos instrumentalmente con un texturométero. Se definieron los parámetros de la muestra como tamaño, temperatura y aplicación de la fuerza con respecto a la muestra. Se definieron los procesos de evaluación de textura estos pueden ser:

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

#### **7.4 EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO**

Después de la punción, las muestras fueron sacrificadas por dislocación cervical y se colocaron en baño de hielo. Se retiraron el músculo, branquias, cerebro e hígado, colocándolo en tampón de fosfato [NaCl (Sigma-Aldrich) 0.138M; KCl (VETEC, Sigma-Aldrich) 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. Las muestras de los tejidos se almacenaron a -70°C antes del análisis.

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

Los siguientes biomarcadores que se evaluaron fueron: CHP, LPX, PCC y la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, CAT Y GPx. Todos los biensayos se realizaron con el sobrenadante.

**Determinación de hidroperóxidos** (Método Jiang, 1992) para 100 µL de sobrenadante (previamente desproteinizado con ácido tricloroacético al 10%) Sigma-Aldrich 900 µL de la mezcla de reacción [mM de FeSO<sub>4</sub> 0.25 (Sigma-Aldrich), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25mM (Sigma-Aldrich), 0.1 mM de naranja de xilenol (Sigma-Aldrich) y 4 hidroxitolueno de butilo mM (Sigma-Aldrich) en 90% (v/v) de metanol (Sigma-Aldrich). La mezcla se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente y la



absorbancia se leyó a 560nm 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) (Sigma-Aldrich)/mg de proteína.

**Determinación del grado de lipoperoxidación** (Método de Buege y Aust, 1979) a 100  $\mu$ L de la muestra (sin centrifugar) se completa a 1 mL con solución reguladora tris-HCl 150 mM a pH 7.4 y se le adiciona 2mL de TCA-TBA (ácido tiobarbitúrico al 0.375% en ácido tricloroacético al 15%) se induce un choque térmico de la muestra con agua en ebullición y se deja en un baño maría. Se incuba a 37 °C por 30 min. Concluido el tiempo se centrifugo a 3500 rpm durante 10 min. y se determinó la absorbancia a 535 nm. Los resultados se expresan en mM de malondialdehído / mg proteínas / g tejido, usando el coeficiente de extinción molecular (CEM) el cual es de  $1.56 \times 10^5$  mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

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

**Determinación de los niveles de oxidación de proteínas** (Método Burcham, 2007; Parvez y Raisuddin, 2005; Levine et al, 1994). A 100  $\mu$ L de sobrenadante se le adicionaron 150  $\mu$ L de 10mM de DNPH/2M HCl. Se incubo durante 1 h a oscuridad. Después de la incubación se le adicionaron 500  $\mu$ L de tricloroacético al 20% y se deja reposar durante 15 minutos a 4°C. El precipitado se centrifugo a 11000 rpm durante 5 minutos. El botón se lavó tres veces con etanol-acetato de etilo 1:1 y posteriormente se disolvió en 1 mL de una solución de 6M guanidina pH 2.3 y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. La absorbancia se determinó a 366 nm. Los resultados se expresan en mM o nM de carbonilos reactivos (C=O) /mg proteínas, se utiliza el coeficiente de extinción molecular (CEM) de  $21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

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

**Determinación de la actividad de la superóxido dismutasa** (Método de Misra y Fridovich, 1972) se colocaron 40  $\mu$ L del homogeneizado en una celda de cuarzo y se adicionaron 260  $\mu$ L de la solución amortiguadora de carbonatos (50 mM de carbonato de sodio y 0.1 mM EDTA) a pH 10.2. Se agregaron 200  $\mu$ L de adrenalina 30 mM, y se determinó la absorbancia a 480 nm, a los 30 seg y

5 min. Los resultados se expresan en M adrenalina /mg proteínas, se utiliza el coeficiente de extinción molecular (CEM) de  $21 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

$$\text{M de adrenalina / mg proteínas / g tejido} = \text{Abs} / \text{CEM}$$

**Determinación de la actividad de la catalasa** (Método de Radi *et al*, 1991) 20  $\mu\text{L}$  del sobrenadante de la muestra fueron colocados en una celda de cuarzo, se le agregaron 280  $\mu\text{L}$  de la solución amortiguadora de aislamiento (0.3 M sucrosa, 1 mM EDTA, 5 mM HEPES y 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y 200  $\mu\text{L}$  de la solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  20 mM. Posteriormente se realizaron las lecturas a 240 nm, a 0 y 60 seg. Los resultados que se obtienen de las absorbancias son utilizados en la siguiente fórmula:

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

Donde el CEM del  $\text{H}_2\text{O}_2 = 0.043 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; los datos son expresados en mM de  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min/g}$  tejido

**Determinación de la actividad de la glutatiónperoxidasa** (Método Gunzler y Flohe-Clairborne, 1985) modificado por Stephensen *et al.* (2000). 10  $\mu\text{L}$  de glutatión reductasa (2 U glutatión reductasa, Sigma-Aldrich, St Louis Missouri, EE.UU.), 290  $\mu\text{L}$  de tampón de reacción 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (VETEC, Sigma-Aldrich, Toluca, MX), mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 (VETEC, Sigma-Aldrich, Toluca, MX) de pH 7,0, 3,5 mM de glutatión reducido (Fluka, Sigma-Aldrich, Toluca, MX), azida de sodio 1 mM (Sigma-Aldrich, Toluca, MX) y 0,12 mM de NADPH (Sigma-Aldrich, Toluca, MX) ] y 100 l de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,8 mM, VETEC, Sigma-Aldrich, Toluca, MX)] se añadieron a 100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante. Se leyó la absorbancia a 340nm a los 0 y 60 segundos. La actividad enzimática se calculó utilizando la ecuación: actividad de la GPx=(A0-A60/MEC), donde MEC de NADPH= $6.2 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Los resultados se expresaron como  $\text{NADPH min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ .

### **7.5 Análisis estadístico**

Se llevó a cabo mediante un análisis de varianza ANOVA y para diferencia de medias se utilizó el método de Tukey con un nivel de significancia ( $p < 0.05$ ), mediante el programa estadístico SPSS versión 17.

## 8. RESULTADOS

Artículo 1

### **Acute and chronic exposures to diclofenac alter oxidative stress status in common carp *Cyprinus carpio***

Karinne Saucedo-Vence<sup>ab</sup>, Octavio Dublán-García<sup>b</sup>, Leticia Xochitl López-Martínez<sup>b</sup>, Gabriela Morachis-Valdes<sup>ab</sup>, Marcela Galar-Martínez<sup>c</sup>, Hariz Islas-Flores<sup>a</sup>, Leobardo Manuel Gómez-Oliván<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Toxicología Ambiental, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, México.

<sup>b</sup> Laboratorio de Alimentos, Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, México.

<sup>c</sup> Laboratorio de Toxicología Acuática, Departamento de Farmacia, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México

\* Corresponding author:

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

## **Abstract**

Diclofenac (DCF) has been detected in significant amounts in municipal effluent. Diverse studies report that trace concentrations of DCF may induce toxic effects on different aquatic organisms as well as developmental, reproductive and renal damage. This study aimed to determine whether acute and chronic exposures to DCF alter the oxidative stress (OS) status in blood, muscle, gills, brain and liver of common carp *Cyprinus carpio*. The median lethal concentration of DCF at 96 h (96-h LC<sub>50</sub>) was determined and used to establish the concentration equivalent to the lowest observed adverse effect level (LOAEL). Carp specimens were exposed (acute and chronically) to this concentration for different exposure times (4 and 24 days) and the following biomarkers were evaluated: hydroperoxides content (HPC), lipid peroxidation (LPX), protein carbonyl content (PCC) and the activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). Also, the DCF was determined by LC-MS/MS. Results show a statistically significant HPC, LPX and PCC increase with respect to control ( $P < 0.05$ ) in blood, muscle, gill, brain and liver as well as significant changes in the activity of the antioxidant enzymes evaluated in these organs, with respect to controls ( $P < 0.05$ ). The DCF concentrations decreased in water system and increased in the carp. *Cyprinus carpio* exposed to DCF were affected in oxidative stress status during the initial days of the study (at 4 days), exhibiting an increased response at 24

days in blood and liver. In contrast, a decrease was observed in muscle, gills and brain at 24 days with respect to 4 days. DCF induces oxidative stress on blood, muscle, gills, brain and liver of *C. carpio* in acute and chronic exposure. The biomarkers employed in this study are useful in the assessment of the environmental impact of this agent on aquatic species.

**Keyword:**

Diclofenac; oxidatives extress; acute and chronic exposure; *Cyprinus carpio*

**1. Introduction**

Pharmaceuticals drugs are widely used in human and veterinary medicine, to cure, to mitigate or to prevent disease in diverse organisms. The extensive use and large production of these compounds may enter the environment through discharge of domestic, industrial and hospital wastewater. Diverse studies have shown a remarkable increase worldwide in the levels of these contaminants in surface and groundwater, eliciting toxicity problems in diverse hydrobionts (Montforts et al. 2007; Spindler et al.2007).

Pharmaceuticals are designed to persist and perform their therapeutic action and, consequently, once they enter the aquatic environment, persist in it, damaging the health of organisms living in these ecosystems and even human health. Therefore, these products are currently of worldwide environmental concern and have been called “emerging contaminants” (Richardson 2007). The latter term includes nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), a heterogeneous group of pharmaceuticals with anti-inflammatory, analgesic and antipyretic properties, which act as selective inhibitors of the enzyme cyclooxygenase (COX), inhibiting

cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) which are responsible for production of prostaglandins, prostacyclins and thromboxanes. The most commonly used NSAIDs at world level, based on number of prescriptions and sales, are acetylsalicylic acid (ASA), paracetamol (PCM), diclofenac (DCF), ibuprofen (IBP) and naproxen (NPX).

DCF has been detected in significant amounts in municipal effluent. Ternes et al. (1999) report its presence at concentrations above 1 µg/L in treatment plant water and lower concentrations in surface water. Other studies have reported concentrations between 10 and 2,200 ng/L in effluent from wastewater treatment plants in diverse European countries (Stülten et al. 2008; Letzel et al. 2009).

In Mexico, there are no reports of the presence of contaminants of this type in water bodies apart from a study by Siemens et al. (2008), who found DCF at concentrations of 0.25-0.50 µg/L in the Mexico City-Mezquital Valley irrigation system.

Diverse studies report that trace concentrations of DCF may induce toxic effects on different aquatic organisms as well as developmental, reproductive and renal damage (Marques et al. 2004; Brun et al. 2006). DCF-exposure in aquatic species, particularly, fish, induces acute and/or chronic toxicity, affecting survival, swimming and feeding behavior, growth, embryonic development and reproduction (Fent et al. 2006; Nassef et al. 2010; Lee et al. 2011). Gomez-Lechon et al. (2003), demonstrate that DCF may induce apoptosis in human and rat hepatocytes, due to generation of reactive oxygen species (ROS), due to one of its major metabolite, the 5'-OH-diclofenac. Similar effects were described in the Japanese fish *Oryzias latipes*, while in *Onchoryncus mykiss* DCF produced alterations in the kidney and its accumulation in organs such as liver and muscle, so it was concluded that prolonged exposure in the environment produces deficiency in the general condition fish (Gómez-Lechón et al. 2004). Meanwhile, (Han et al. 2007)

found an increased in gene expression for producing vitellogenin, so the DCF can also be a potential estrogenic agent.

Various studies suggest that in DCF hydroxylation metabolism by the P450 complex, diverse ROS such as the superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot-}$ ) may be produced in different organ systems such as common carp *Cyprinus carpio* (Islas-Flores et al. 2013). Also, the DCF metabolites 4-OH-diclofenac and 5-OH-diclofenac can be oxidized to intermediates of a reactive quinone imine that reacts with protein nucleophilic groups to form adducts. There is also formation of DCF cationic radicals to nitroxides and quinolone imines, both of which are associated with the redox cycle (Hoeger et al. 2008).

Oxidative stress (OS) is defined as disruption of the balance between ROS and the antioxidant systems in the body (Barata et al. 2005). ROS, such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), the superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) and the hydroxyl radical ( $HO^{\cdot}$ ), are formed in cells as a result of metabolic processes (Valavanidis et al. 2006). Aerobic organisms produce ROS due to their oxidative metabolism. Hydroxyl radicals may initiate LPX (lipid peroxidation) in body tissues. To mitigate the negative effects of ROS, fish and other vertebrates possess an antioxidant defense system that uses enzymatic and non-enzymatic mechanisms. The most important antioxidant enzymes are SOD (superoxide dismutase), CAT (catalase), GPx (glutathione peroxidase) and GST (glutathione S-transferase). Antioxidants protect the body against oxyradical-induced damage such as breaks in the DNA chain, protein oxidation and LPX induction (Winzer et al. 2000). An increase in the active form of molecular oxygen species due to overproduction and/or inability to destroy them can lead to damage of DNA structure and may therefore induce mutations, chromosomal aberrations and carcinogenesis. A change towards increased oxidant status or any imbalance between ROS production and degradation in animal tissues may induce LPX, plasma membrane alterations, or enzyme deactivation (Anand et al. 2000).



It is well known that bioassay tests can be used to establish the maximum acceptable concentration of any environmental contaminant causing any adverse effects on the organisms (Jos et al. 2005). Embry et al. (2010) reported that aquatic toxicity data on acute and chronic responses to anthropogenic chemicals by fish plays a very important role in environmental monitoring of the xenobiotics. Due to continuous entry of pharmaceuticals into aquatic environments, it is necessary to perform chronic studies to observe the long-term effects of drugs on non-target organisms (Galus et al. 2013). Further, biomonitoring using chronic toxicity assay may sensitively indicate the stress posed by the pollutants (Zhou et al. 2008).

*C. carpio*, a fish commonly used in commercial aquaculture, has been proposed as a test organism in toxicological assays due to its economic importance and wide geographic distribution. Also, it shows adaptive response in contaminated aquatic environments (Oruç and Uner 2002).

The aim of this study was to determine whether acute and chronic exposures to DCF alter the OS status in blood, muscle, gills, brain and liver of common carp *Cyprinus carpio*.

## **2. Materials and methods**

### 2.1 Test substance

The pharmaceutical agent DCF (CAS number 15307-86-5, > 99% purity)  $C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ , 296 Da, was purchased from Sigma-Aldrich. Stock solutions were prepared by dissolving 1 g DCF in deionized water.

All concentrations reported were measured. The analysis was performed by LC/MS/MS.

## 2.2 Diclofenac quantification in water and carp by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

### 2.2.1 Standard

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

### 2.2.2 Equipment

The HPLC-MS/MS system consisted of an Agilent 1290 Infinity HPLC unit (Santa Clara CA). The RRHD Eclipse Plus C18 (2.1 x 50 mm, 1.8 µm) chromatography column was maintained at 40 °C. The mobile phase was a 60:40 v/v mixture of acetonitrile and ammonium formate (10 mM). Flow rate was 0.3 mL/min, run time 1.8 min, and injection volume 2 µL. DCF was identified and quantified by means of a mass spectrometer (Triple quadrupole 6430, Agilent, Santa Clara, CA. USA) fitted with electrospray ionization (ESI). The ESI positive mode was used throughout. Electrospray voltage operated at 4000 V as the MS collected data in the negative ion mode. The retention time, base peak,  $m/z$  and fragmentor voltage were: 24.9,  $[M-Na]^{-1}$ , 294 and 80 V, respectively. Mass spectrometer optimization was conducted by direct infusion of a 10 µg/mL standard solution of DCF; thereafter the ionization mode and precursor ion mode was selected.

The method detection limit (MDL) and method quantitation limit (MQL) were defined and determined as the minimum detectable amount of DCF with a signal to noise ratio of 3:1 from DCF

waters spiked extract, in mRM mode. These data (MDL and MQL) were 30 and 84 ng/mL respectively. Instrumental detection limits (IDL) was determined by direct injection of decreasing amounts of the DCF standard. The IDL was 27 pg/injected for DCF.

### 2.2.3 Calibration curve

Calibration curve of DCF was performed using standard solutions at concentrations of 1, 3, 10, 50, 250 µg/mL prepared in 60:40 mix acetonitrile and ammonium formate at pH 6. Linear regression coefficients ( $R^2$ ) were > 0.99 for DCF. The MS/MS detector was maintained according to manufacturer's specifications and cleaned regularly, but when changes in the slope of the calibration curve was observed more than 50%, the detector received additional cleaning.

### 2.2.4 Water

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

layers were combined and evaporated to dryness. The water samples were extracted the same form.

#### 2.2.5 Plasma

Frozen plasma samples were brought to room temperature followed by the addition of 5 mL of ice-cold acetone. After thorough mixing on a vortex mixer, contents were centrifuged at 2,000 rpm for 10 min. Supernatant was separated, evaporated to 0.5 mL, back-extracted into the extraction solvent, and finally evaporated to dryness. Samples were analyzed for DCF by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS).

#### 2.3 Specimen procurement and maintenance

Common carp (*Cyprinus carpio*) juveniles (three months old),  $19.05 \pm 0.51$  cm in length and weighing  $73.4 \pm 7.8$  g were obtained from the aquaculture facility in Tiacaque, State of Mexico. Fish were transported to the laboratory in well-sealed polyethylene bags containing oxygenated water and were subsequently stocked in a large tank with dechlorinated tap water (previously reconstituted with salts; see section 2.4) and acclimated to test conditions for 30 days prior to the experiment. During acclimation, carp were fed Pedregal Silver™ fish food, and three-fourths of the tank water was replaced every 24 h in order to maintain a healthy environment. The physicochemical characteristics of tap water reconstituted with salts were maintained, i.e. temperature  $20 \pm 2$  °C, oxygen concentration 80-90%, pH 7.5-8.0, total alkalinity  $17.8 \pm 7.3$  mg L<sup>-1</sup>, total hardness  $18.7 \pm 0.6$  mg L<sup>-1</sup>. A natural light/dark photoperiod (12:12) was maintained. During aquaculture period the fish were not exposed to any pharmaceuticals. DCF concentrations were

determined by LC-MS/MS in both pond water from the aquaculture facility in Tiacaque, and neither DCF nor other NSAID was detected in water.

#### 2.4 Median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) determination at 96 h

Test systems consisting in 120 x 80 x 40 cm glass tanks filled with water reconstituted with the following salts: NaHCO<sub>3</sub> (174 mg/L, Sigma-Aldrich, Toluca, MX), MgSO<sub>4</sub> (120 mg/L, Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA), KCl (8 mg/L, Vetec, Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA) and CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (120 mg/L, Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA) were maintained at room temperature with constant aeration and a natural light/dark photoperiod (12:12). Static systems were used without renewal of the test solutions (DCF concentration). During exposure periods the fish were not fed.

To establish the target concentration to be used for oxidative stress evaluation, the median lethal concentration at 96h (LC<sub>50</sub>-96 h) of DCF was determined. To this end, six experimental systems to which different nominal concentrations of DCF were added (9.5, 18.9, 37.7, 75.2, 300.8, 600 mg/L) plus an seventh DCF-free control system were set up, and ten carp randomly selected from the stock (using the random number method) were placed in each system. The assay was performed in triplicate. A total of 210 fish were used for LC<sub>50</sub> determination.

Duration of the exposure period was 96 h, at the end of which the number of dead specimens in each system was counted. The 96-h LC<sub>50</sub> of DCF and its 95% confidence limits ( $p < 0.05$ ) were estimated by Probit analysis (US-EPA 2009). The data obtained were used to estimate the concentration to be used in the assays for OS determination.

## 2.5 Acute and chronic toxicity studies

Acute and chronic toxicity assays involved adding DCF at a concentration nominal equal to the lowest observed adverse effect level (LOAEL), i.e.  $7.098 \text{ mg L}^{-1}$ , to two experimental systems with six carp each. The exposure periods were 4 days (acute exposure) and 24 days (chronic exposure).

During acute toxicity studies, healthy fish were taken from the stock and were maintained in the glass tank. Two days prior to experiments and during the experimental period feeding was discontinued. DCF concentration ( $7.098 \text{ mg/L}$ ) was added in each glass aquaria (120 cm X 80 cm X 40 cm) containing 60 L of water. Three replicates were maintained and 18 fish of equal size and weight were introduced. A concurrent control of 18 fish in three glass aquaria were also maintained under identical conditions. No mortality was observed during the study period. At the end of 4 days period fish from the control and DCF treated groups were taken for OS analysis.

For chronic studies, DCF concentration ( $7.098 \text{ mg/L}$ ) was added in each glass aquaria (120 cm X 80 cm X 40 cm) containing 60 L of water. Three replicates were maintained and 18 fish of equal size and weight were introduced. Water was changed daily in order to avoid accumulation of faecal matter and excess feed and renewed with DCF. A concurrent control of 18 fish in three glass aquaria were also maintained under identical conditions. No mortality was observed during the study period. At the end of 24 days period fish from the control and DCF treated groups were taken for OS analysis.

The sublethal assays were performed in triplicate. A total of 72 fish were used in the acute and chronic assays. At the end of the exposure period, fish were removed from the systems and placed in a tank containing 50 mg/L of clove oil as an anaesthetic (Yamanaka et al. 2011). Anesthetized specimens were placed in a lateral position and blood was removed with a heparinized 1mL hypodermic syringe by puncture of the caudal vessel performed laterally near the base of the caudal peduncle, at mid-height of the anal fin and ventral to the lateral line.

## 2.6 Oxidative stress evaluation

After puncture, specimens were sacrificed by cervical dislocation and placed in an ice bath. The muscle, gill, brain and liver were removed, placed in phosphate buffer [NaCl (Sigma-Aldrich, Toluca, MX) 0.138 M; KCl (Vetec, Sigma-Aldrich, Toluca, MX) 0.0027 M] solution pH 7.4 and the tissues were separately homogenized. The supernatant was centrifuged at 12,500 x g and -4 °C for 15 min. The tissues samples were stored at -70°C prior the analysis.

Blood samples were collected in heparinized tubes and placed in phosphate buffer [NaCl (Sigma-Aldrich, Toluca, MX) 0.138 M; KCl (Vetec, Sigma-Aldrich, Toluca, MX) 0.0027 M] solution pH 7.4 and ultrasonicated. The blood samples were stored at -70°C prior the analysis.

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

### 2.6.1 Determination of HPC

HPC was determined by the Jiang et al. (1992) method. To 100  $\mu\text{L}$  of supernatant (previously deproteinized with 10% trichloroacetic acid) (Sigma-Aldrich) was added 900  $\mu\text{L}$  of the reaction mixture [0.25 mM  $\text{FeSO}_4$  (Sigma-Aldrich), 25 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Sigma-Aldrich), 0.1 mM xylenol orange (Sigma-Aldrich) and 4 mM butyl hydroxytoluene (Sigma-Aldrich) in 90% (v/v) methanol (Sigma-Aldrich)]. The mixture was incubated for 60 min at room temperature and absorbance was read at 560 nm against a blank containing only reaction mixture. Results were interpolated on a type curve and expressed as nM HPC (cumene hydroperoxide) (Sigma-Aldrich) /mg protein.

#### 2.6.2 Determination of LPX

LPX was determined by the Buege and Aust (1978) method. To 100  $\mu\text{L}$  of supernatant was added TrisHCl buffer solution pH 7.4 (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA) until a 1 mL volume was attained. Samples were incubated at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 30 min; 2 mL TBA-TCA reagent [0.375% thiobarbituric acid (TBA, Fluka, Sigma-Aldrich, Toluca, MX) in 15% trichloroacetic acid (TCA, Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA)] was added and samples were shaken in a vortex. They were then heated to boiling for 45 min, allowed to cool, and the precipitate removed by centrifugation at 3,000 x g for 10 min. Absorbance was read at 535 nm against a reaction blank. Malondialdehyde (MDA) content was calculated using the molar extinction coefficient (MEC) of MDA ( $1.56 \times 10^5 \text{ M cm}^{-1}$ ). The results were expressed in mM of MDA  $\text{mg}^{-1}$  protein.

#### 2.6.3 Determination of PCC

PCC was determined using the method of Levine et al. (1994) as modified by Parvez and Raisuddin (2005) and Burcham (2007). To 100  $\mu\text{L}$  of supernatant was added 150  $\mu\text{L}$  of 10 mM DNPH (Sigma-



Aldrich) in 2 M HCl (Sigma-Aldrich) and the resulting solution was incubated at room temperature for 1 h in the dark. Next, 500  $\mu$ L of 20% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich) was added and the solution was allowed to rest for 15 min at 4  $^{\circ}$ C. The precipitate was centrifuged at 11,000 rpm for 5 min. The bud was washed several times with 1:1 ethanol:ethyl acetate (Sigma-Aldrich), then dissolved in 1 mL of 6M guanidine (Sigma-Aldrich) solution (pH 2.3) and incubated at 37  $^{\circ}$ C for 30 min. Absorbance was read at 366 nm. Results were expressed as  $\mu$ M reactive carbonyls formed (C=O)/mg protein, using the MEC of 21,000 M/cm.

#### 2.6.4 Determination of SOD activity

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

#### 2.6.5 Determination of CAT activity

CAT activity was determined by the Radi et al. (1991) method. One mL isolation buffer solution [0.3 M saccharose (Vetec, Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA), 1 mL EDTA (Sigma-Aldrich), 5 mM HEPES (Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA), 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Vetec, Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA)], and 0.2 mL of a hydrogen peroxide solution (20 mM, Vetec, Sigma-Aldrich, Saint Louis Missouri, USA) were added to 20 mL of supernatant. Absorbance was read at 240 nm

after 0 and 60 s. The absorbance value obtained for each of these times was substituted in the formula:  $CAT\ activity = (A_0 - A_{60})/MEC$ , where the MEC of  $H_2O_2$  is  $0.043\ mM\ cm^{-1}$ , and results were expressed as  $mM\ H_2O_2\ mg^{-1}\ protein$ .

#### **2.6.6 Determination of GPx activity**

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

#### **2.6.7 Determination of Total Protein**

Total Protein was determined by the Bradford (1976) method. To 25  $\mu L$  of supernatant were added 75  $\mu L$  deionized water and 2.5 mL Bradford's reagent [0.05 g Coomassie Blue dye (Sigma-Aldrich), 25 mL of 96 % ethanol (Sigma-Aldrich), and 50 mL  $H_3PO_4$  (Sigma-Aldrich), in 500 mL deionized water]. The test tubes were shaken and allowed to rest for 5 min prior to the reading of absorbance at 595 nm and interpolation on a bovine albumin (Sigma-Aldrich) curve. The amount of total protein was used to express the results of OS biomarkers.

## 2.7 Statistical analysis

To estimate 96-h LC<sub>50</sub> values and their 95% confidence limits a probit method using EPA Analysis Program v1.5; US-EPA 2009, which was also used for constructing the dose–response curves. In order to evaluate the lowest concentration of DCF that causes an alteration, the LOAEL was calculated using the concentration-response curve and probit analysis, obtained from the acute assay.

In the acute and chronic toxicity assays, results of oxidative stress biomarkers were statistically evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) and differences between means were compared using the Bonferroni's multiple comparisons test, with  $p$  set at <0.05. Pearson's correlation analysis was used to examine possible associations between DCF at 4 and 24 days and OS biomarkers in blood, muscle, brain, gill and liver of *Cyprinus carpio*. Statistical determinations were made with the SPSS v10 software package (SPSS, Chicago IL, USA).

## 3. Results

### 3.1 DCF quantification

Table 1 shows both DCF concentrations in the water system and carp. As can be seen, the DCF concentration in the water system are decreasing over time and increasing in the carp at 4 and 24 days. The increase being more evident after 4 days.

### 3.2 Determination of LC<sub>50</sub>

The 96-h LC50 of DCF in *C. Carpio* was 70.98 mg/L with a 95% confidence interval of (51.66-98.14).

The  $\chi^2$  linear adjustment test was not significant at  $P < 0.05$ .

### 3.3 Oxidative stress evaluation

#### 3.3.1 Hydroperoxides content

HPC results are shown in Fig. 1. Significant increases with respect to the control group ( $P < 0.05$ ) were observed in blood at 24 days (23.6%), in muscle, gills, brain and liver at 4 days (30.5, 283.5, 16649.0 y 3248.3% respectively) and at 24 days (58.7, 96.1, 60.5 y 250.0 %, respectively). At 4 days in blood was observed a significant decrease of 12.7%. Comparing hydroperoxides content at 4 versus 24 days of exposure a significant increases in blood of 65.6% and in liver of 150% were observed; and a significant decreases in muscle (6.4%), brain (6463.8%) and gills (988.3%) were observed [Table 2].

#### 3.3.2 Lipid peroxidation level

Figure 2 shows LPX results. Significant increases with respect to the control group ( $P < 0.05$ ) were found in blood (7.4%) and brain (71.5%) at 24 days; in muscle, gills and liver at 4 days (34.1, 9.7, 10.0%, respectively) and at 24 days (53.7, 172.8 y 50.8% respectively). At 4 days in blood and brain a significant decreases were observed (3.1 and 12.8% respectively). Comparing LPX at 4 versus 24 days, a significant increases in blood, gills and liver (20.7, 209.5 and 9.2% respectively) and a significant decreases of 5.1% in muscle and 1.2% in the brain were observed [Table 2].

#### 3.3.3 Protein carbonyl content

PCC results are shown in Fig. 3. Significant increases with respect to the control group ( $P < 0.05$ ) were observed in muscle, gills, brain and liver at 4 days (15.8, 202.6, 466.8 and 150% respectively) and at 24 days in gills, brain and liver (399, 16.3, 89.7% respectively). In blood, a significant decreases were observed at 4 days and 24 days exposure (64.98 and 26.53%). Comparing PCC at 4 days versus 24 days of exposure, a significant decreases in muscle, gills and brain (18, 64.9, 387.4 %, respectively) and a significant increases in blood (109.8%) and liver (31.8%) were observed [Table 2].

#### 3.3.4 SOD activity

SOD activity results are shown in Fig. 4. Significant increases with respect to the control group ( $P < 0.05$ ) were observed in gills, brain and liver (195.6, 63.3 and 45.9 % respectively) at 4 days, in gills (603.4 %) and liver (42.3%) at 24 days. In contrast, a statistically significant decreases were observed in blood (41.1%) and muscle (57.3%) at 4 and 24 days in blood, muscle, and brain (64.5, 63.5 and 14.3% respectively) were observed. Comparing SOD activity at 4 versus 24 days, a significant decreases in muscle, gills, brain and liver were observed (31.3, 4300438, 19765315.5 and 1236.5% respectively) [Table 2].

#### 3.3.5 Catalase activity

Figure 5 shows CAT activity results. Significant increases with respect to the control group ( $P < 0.05$ ) were found in muscle, gills and brain (26, 2.2 and 24.9 % respectively) at 4 days, and 29.4, 312.9 and 42.5% respectively at 24 days. At 4 days a significant decreases were observed in blood

(49.1%) and liver (88.3%) and at 24 days of 75.3% and 36.1%, respectively. Comparing CAT activity at 4 versus 24 days, a significant increases in blood and muscle of 341.8% and 9.4% respectively were observed and a significant decreases in gills, brain and liver of 11247.7, 69417.6 and 9241.8% respectively were observed [Table 2].

### 3.3.6 GPx activity

GPx activity results are shown in Fig. 6. Significant increases with respect to the control group ( $P < 0.05$ ) were observed in blood (1.1%) and liver (250%) at 4 days, in blood, gills and liver (65.8, 60.4 y 250% respectively) at 24 days. At 4 days a significant decreases were observed in gills (57.2%) and brain (42.6%); and at 24 days in muscle (59.4%) and brain (48.6%). Comparing GPx activity at 4 versus 24 days, a significant increases were observed in muscle, liver and gills of 41.3, 160.6 and 722%, respectively. In contrast, a significant decreases of 7.7 and 37.9% in blood and brain respectively, were observed [Table 2].

In Table 3, it shows the results of the Pearson's correlation among DCF at 4 and 24 days and OS biomarkers in blood, muscle, gills, brain and liver of *Cyprinus carpio*. As shown, there are very close correlations between DCF and oxidative stress biomarkers.

## 4. Discussion

EU guidelines (93-67-EEC) laid down by the Commission of the European Communities (1996) classify substances by risk category according to their  $LC_{50}$ . Thus, substances with an  $LC_{50}$  of  $<1$  mg/L are extremely toxic, 1-10 mg/L are toxic and 10-100 mg/L hazardous for aquatic organisms. In this study, 96-h  $LC_{50}$  of DCF in *C. carpio* was determined to be 70.98 mg/L with a 95% confidence interval of (51.66-98.14). Based on this ranking system, DCF is hazardous for *C. carpio*.

Recent studies have reported NSAID-induced toxicity in aquatic organisms, since these organisms are more susceptible to toxic effects due to their continued exposure to waste-water discharges throughout the life cycle (Fent et al. 2006).

DCF has been identified and quantified in diverse water bodies (Ternes et al. 1999). It is biodegradable by microorganisms or photodegradable into the following metabolites: 5,4'-dihydroxy-diclofenac, 3-dihydroxy-diclofenac, 4'-dihydroxymethyl-diclofenac, 3'-hydroxymethyl-diclofenac, 4'-hydroxy-diclofenac and 5'-hydroxy-diclofenac (Deng et al. 2003). The latter two are oxidized to intermediates of benzoquinone imine, compounds that are highly toxic to aquatic organisms (Oviedo-Gómez et al. 2010).

In addition to these abiotic transformations, DCF is biotransformed by P450 enzymes present in the smooth endoplasmic reticulum of cells in different organs such as the liver, kidneys, gills, gut, brain, heart and gonads, among others (Stegeman and Livingstone 1998).

Benzoquinones formed in NSAIDs photodegradation and biotransformation are highly electrophilic molecules with a high affinity for binding to lipids, proteins and DNA (Baillie 2006; Wilhelm et al. 2009) and altering the function of these macromolecules. They are also persistent in the aquatic environment and highly toxic to organisms that live in it (Oviedo-Gómez et al. 2010; Islas-Flores et al. 2013).

The toxicity of NSAID is mediated by ROS formation as a result of biotransformation of these compounds through redox cycling (Abdollahi et al. 2004; Oviedo-Gómez et al. 2010, Gómez-Oliván et al. 2012, Islas-Flores et al. 2013, Islas-Flores et al. 2014; Gómez-Oliván et al. 2014).

During LPX, polyunsaturated fatty acids with double bonds react with ROS, particularly the hydroxyl radical (HO·) and the reactive nitrogen species (RNS) peroxyxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), through a chain reaction mechanism. This permits the formation of hydroperoxides that are degraded to low-molecular-weight products, including MDA (Wilhelm Filho et al. 2005). These findings explain

the increase of the two biomarkers evaluated in this study HPC and LPX in muscle, gills and liver at 4 and 24 days compared to control. The HPC also increased in acute and chronic exposure to DCF in brain.

In freshwater fish, the gills permit gas exchange, osmoregulation, ion exchange, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste (Evans et al. 2005). The gills are likewise known to carry out the oxidative metabolism of many toxic agents, thereby promoting production of the ROS responsible for HPC and LPX in the present study.

The liver is the main organ of NSAIDs biotransformation through cytochrome P450 (CYP). CYP is known to produce an oxygenated intermediate — the oxy-cytochrome P450 complex [P450 (Fe<sup>3+</sup>) O<sub>2</sub><sup>-</sup>] — during the biotransformation of NSAID (as DCF), with subsequent release of the superoxide anion by reaction decoupling (Doi et al. 2002).

Although most research has emphasised how lipid components are altered by oxidative deterioration in fish, proteins, including sarcoplasmic, myofibrillar and stromal proteins (forming the muscle) from fish, are also susceptible to oxidative damage. Oxidising lipids, metal ions and other prooxidants (as DCF), the agents that initiate oxidative damage, exist in animal muscle or are generated during meat processing ( Xiong and Decker 1995; Li et al. 2013).

Studies by Schmidt et al. (2011) and Gonzalez-Rey and Bebianno (2014) have shown that DCF induces estrogen and neurotoxic disturbances, and damage to tissue in *Mytilus* (spp.).

It is also well known that when NSAID (as DCF) are ingested they enters in contact with the vasculature where they acetylates the enzyme COX-2 present in endothelium or circulating leukocytes to produce 15-epi-lipoxin A4, which promotes nitric oxide (NO) synthesis mediated by endothelial (eNOS) and inducible (iNOS) nitric oxide synthase (Paul-Clark et al. 2004). When the superoxide anion and NO bind they may form a reactive nitrogen specie (peroxynitrite) through a diffusion-limited reaction (Huie and Padmaja, 1993). The oxidant agent peroxynitrite is known to



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

Protein carbonyl content measured in this study was increased significantly at 4 and 24 days in gills, brain and liver. This result could be explained by the presence of NRS as peroxy nitrite.

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

Comparing the results of HPC, LPX and PCC biomarkers in acute exposure (4 days) and chronic exposure (24 days) were observed significant increases in blood and liver. A significant decreases were observed in muscle and brain, showing the effect most pronounced in brain.

SOD is the first mechanism of antioxidant defense and the main enzyme responsible for offsetting the effects of ROS, particularly the superoxide ion (van der Oost et al. 2003) which is converted to hydrogen peroxide by SOD. Subsequently,  $H_2O_2$  is sequestered and degraded to  $H_2O$  by CAT and GPx. In relation to the antioxidant enzymes, SOD activity in this study increased significantly in gills, brain and liver at 4 days with respect to controls ( $p < 0.05$ ) and gills and liver at 24 days. These increases may be due to the fact that during the CYP-mediated biotransformation of DCF in carp, the superoxide anion radical  $O_2^{\cdot -}$ , responsible for increased SOD activity, is released (Doi et al. 2002).

Significant increases with respect to the control group ( $p < 0.05$ ) also occurred in CAT activity in muscle, gills and brain in both 4 and 24 days. In GPx activity a significant increases with

respect to control group were observed in blood and liver at 4 days and in blood, gills and liver at 24 days.

As regards CAT and GPx activity, the increased activity of these biomarkers found in this study may be due to a defense mechanism of the cells in order to offset the oxidative stress induced by increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Vlahogianni et al. 2007). Bagnyukova et al. (2006) state that LPX products are apparently involved in the up-regulation of some antioxidant enzymes, including CAT and GPx.

As stated above, in the present study an increase in SOD activity occurred in *C. carpio* exposed to DCF at 4 and 24 days, leading to increased hydrogen peroxide formation, which may act as a signal for CAT and GPx bioactivation in order to convert this highly toxic free radical to less toxic compounds. Similar responses have been found in other aquatic organisms exposed to other NSAIDs (Oviedo-Gómez et al. 2010; Gómez-Oliván et al. 2012; Islas-Flores et al. 2013; Gómez-Oliván et al. 2014).

*Cyprinus carpio* exposed to DCF were affected in oxidative stress status during the initial days of the study (at 4 days), exhibiting an increased response at 24 days in blood and liver. In contrast, a decrease was observed in muscle, gills and brain at 24 days with respect to 4 days. This study confirm that, there is influence of exposure time (acute and chronic) in oxidative stress biomarkers, but this influence depends on the organ or tissue evaluated.

## **5. Conclusions**

In conclusion, DCF induces oxidative stress on blood, muscle, gills, brain and liver of *C. carpio* in acute and chronic exposure (4 and 24 days, respectively). Oxidative stress is a reliable biomarker for evidencing acute and chronic exposure to concentrations of NSAIDs such as DCF.

**Acknowledgments**

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

## References

- Abdollahi M, Mostafalou S, Pournourmohammadi S, Shadnia S (2004) Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following sub-chronic exposure to malathion. *Comparative Physiology and Biochemistry* 137(C): 29–34
- Anand RJK, Arabi M, Rana KS, Kanwar U (2000) Role of vitamin C and E with GSH in checking the peroxidative damage to human ejaculated spermatozoa. *Int. J. Urol.* 7: S1-S98
- Bagnyukova, T. V., Chahrak, O. I., Lushchak, V. I., 2006. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquatic Toxicology*, 78(4), 325–31
- Baillie TA (2006) Future of toxicology-metabolic activation and drug design: challenges and opportunities in chemical toxicology. *Chem Res Toxicol* 19: 889-893
- Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, & Porte C (2005) Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physioilogy Part C: toxicology & Pharmacology* 140(2): 175-186
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1): 248-254
- Büege JA, & Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 52: 302-310
- Burcham PC (2007) Modified protein carbonyl assay detects oxidized membrane proteins: a new tool for assessing drug-and chemically-induced oxidative cell injury. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 56(1): 18-22
- Brun L, Bernier M, Losier R, Doe K, Jackman P, Lee H (2006) Pharmaceutically active compounds in Atlantic Canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters and potential for

- environmental effects as measured by acute and chronic aquatic. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(8): 2163–2176
- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* 3: 3-8
- Commission of the European Communities (1996) Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Commission Regulation (EC) No. 1488/94 on Risk Assessment. Office for Official Publications of the European Communities. Luxembourg
- Deng A, Himmelsbach M, Zhu QZ, Frey S, Sengl M, Buchberger W, Niessner R, Knopp D (2003) Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC–MS. *Environmental Science and Technology* 37:3422–3429
- Doi H, Iwasaki H, Masubuchi Y, Nishigaki R, & Horie T (2002) Chemiluminescence associated with the oxidative metabolism of salicylic acid in rat liver microsomes. *Chemico-Biological Interactions* 140(2):109–119
- Evans DH, Piermarini PM, & Choe KP (2005) The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews* 85(1): 97–177
- Embry MR, Scott EB, Thomas AB, Malyka GB, Marlies H, David EH, Marc AL, Adam L, Teresa NK, Graham W (2010) The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquat Toxicol* 97:79–87
- Fent K, Weston AA, & Caminada D (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76(2):122-159

- Galus M, Jeyaranjan JE, Smith LH, Metcalfe C, Wilson JY (2013) Chronic effects of exposure to a pharmaceutical mixture and municipal wastewater in zebrafish. *Aquat Toxicol* 132–133, 212–222
- Gómez-Lechón M, Ponsoda X, O'Connor E, Donato T, Castell J, Jover R (2003) Diclofenac induces in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochemical Pharmacology*. 66:2155-67
- Gómez-Oliván L, Carmona-Zepeda F, Galar-Martínez M., Téllez-López, A., Amaya-Chávez, A., 2009. Estudio de automedicación en una farmacia comunitaria de la ciudad de Toluca. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(1), 5–11
- Gómez-Oliván, L.M., Neri-Cruz, N., Galar-Martínez, M, Vieyra-Reyes P, García-Medina S, Razo-Estrada C, Dublán-García O, Corral-Avitia AY (2012) Assessing the oxidative stress induced by paracetamol spiked in artificial sediment on *Hyalella azteca*. *Water Air Soil Pollut* 223: 5097-5104
- Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M, García-Medina S, Valdés-Alanís A, Islas-Flores H, Neri-Cruz N (2014) Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*. *Drug Chem Toxicol* In press
- Gonzalez- Rey M, Bebiano MJ, (2014) Effect of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) diclofenac exposure in mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 148: 221-230
- Gunzler W, & Flohe-Clairbone A (1985) Glutathione peroxidase. In R. A. Green-Wald (Ed.), *Handbook of methods for oxygen radical research* Boca Raton: CRC Press 285-290
- Gluszczak L, Miron Ddos S, Moraes BS, Simões RR, Schetinger MR, Morsch VM, Loro VL (2007) Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 146: 519-524

- Han- H, Han- K, Kyeong- P, Sung- KL, Man- G (2007) Analysis of the effects diclofenac on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. *Chemosphere* 67: 2115-21
- Hoeger B, Dietrich D, Schmid D, Hartmann A (2008) Distribution of intraperitoneally injected diclofenac in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 412–418
- Huie RE, Padmaja S, (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 18: 195-199
- Islas- Flores H, Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M, Colín-Cruz A, Neri-Cruz N, & García-Medina S (2013) Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* Doi:10.1016/j.ecoenv.2013.01.025
- Islas-Flores H, Gómez-Oliván LM, Galar-Martínez M, García-Medina S, Neri-Cruz N, Dublán-García O (2014) Effect of ibuprofen exposure on blood, gill, liver, and brain on common carp (*Cyprinus carpio*) using oxidative stress biomarkers. *Environ Sci Pollut Res* DOI 10.1007/s11356-013-2477-0
- Jaeschke H, Knight TR, Bajt ML, (2003) The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 144: 279-288
- Jiang ZY, Hunt JV, & Wolff SP (1992) Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry* 202(2): 384-389
- Joss A, Keller E, Alder AC, Göbel A, Mc Ardell CS, Ternes T, Siegrist H (2005) Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Water Res* 39:3139–52

- Lee J, Ji K, Kho YL, Kim P, Choi K (2011) Chronic exposure to diclofenac on two freshwater cladoceran and Japanese medaka. *Ecotox Environ Safe* 74: 1216-1225
- Letzel M, Metzner G, Letzel T, (2009) Exposure assessment of the pharmaceutical diclofenac based on long-term measurements of the aquatic input. *Environment International*. 35(2): 363–8
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, & Schacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 233: 346-357
- Li Y, Kong B, Xia X, Liu Q, Diao X (2013) Structural changes of the myofibrillar proteins in common carp (*Cyprinus carpio*) muscle exposed to a hydroxyl radical-generating system. *Process Biochemistry* 48:863-870
- Marques CR, Abrantes N, Gonçalves F (2004) Life-history traits of standard and autochthonous cladocerans: II. Acute and chronic effects of acetylsalicylic acid metabolites. *Environmental Toxicology* 19(5): 527–40
- Misra HP & 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
- Montforts M, Brandt I, & Hutchinson T (2007) Summary of workshop on environmental assessment of human medicines: development and use of aquatic toxicity data. *Drug Information Journal* 41: 200–203
- Nassef M, Matsumoto S, Seki M, Khalil F, Kang JJ, Oshima Y, Honjo T, Shimasaki Y (2010) Acute effects of triclosan, diclofenac and carbamazepine on feeding performance of Japanese medaka fish (*oryzias latipes*). *Chemosphere* 80: 1095-1100
- Oruç EO & Uner N (2002) Marker enzyme assessment in the liver of *Cyprinus carpio* (L.) exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *J Biochem Mol Toxicol* 16: 182-188



- Oviedo-Gómez DG, Galar-Martínez M, García-Medina S, Razo-Estrada C, Gómez-Oliván LM, (2010) Diclofenac-enriched artificial sediment induces oxidative stress in *Hyalella azteca*. *Environ Toxicol Pharmacol* 29: 39-43
- Parvez S, & Raisuddin S (2005) Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctate* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20(1): 112-117
- Paul-Clark MJ, Van Cao T, Moradi-Bidhendi N, Cooper D, Gilroy DW, (2004) 15-epi-lipoxin A4-mediated induction of nitric oxide explains how aspirin inhibits acute inflammation. *J Exp Med* 200: 69-78
- Radi R, Turrens JF, Chang LY, Bush KM, Crapo JD & Freeman BA (1991) Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 266(32): 22028-22034
- Richardson SD, Plewa MJ, Wangner ED, Schoeny R, DeMarini DM (2007) Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research. *Mutat Res* 636: 178-242
- Schmidt W, O'Rourke K, Hernan R, Quinn B (2011) Effects of the pharmaceuticals gemfibrozil and diclofenac on the marine mussel (*Mytilus spp.*) and their comparison with standardized toxicity test. *Marine Pollution Bulletin* 62 (7): 1389-1395
- Siemens J, Huscheka G, Siebeb C, Kaupenjohann M (2008) Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system. Mexico City-Mezquital Valley *Water Res* 42: 2124-2134
- Spindler P, Montforts M, Olejniczak K, & Koschorreck J (2007) Environmental assessment for human medicines in the European Union. *Drug Information* 41: 149
- Stegeman- J J, Livingstone- D R (1998) Forms and functions of cytochrome P450. *Compos Biochem Physiol* 211-12

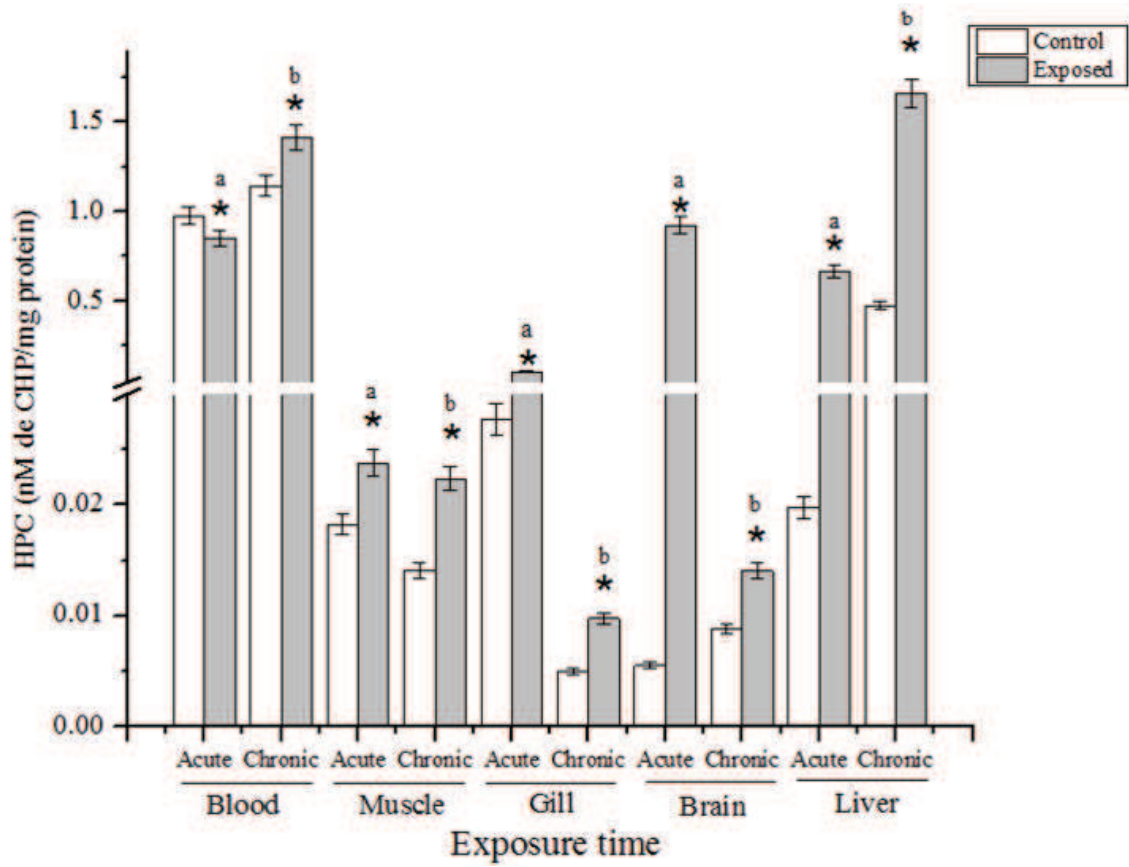
- Stülten D, Zühlke S, Lamshöft M, Spiteller M (2008) Occurrence of diclofenac and selected metabolites in sewage effluents. *Sci Total Environ* 405 (1-3): 31-316
- Ternes TA, Stumpf M, Müller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M (1999) Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants I. Investigations in Germany, Canada and Brazil *Sci Total Environ* 405 (1-3): 310-316
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 64: 178-189
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP, (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol Pharmacol* 13: 57-149
- Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou MJ, Valavanidis A, (2007) Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin* 54: 1361–1371
- Wilhelm EA, Jesse CR, Leite MR, Nogueira CW (2009) Studies on preventive effects of diphenyl diselenide on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Pathophysiology* 16: 31-37
- Winzer K, Becker W, Van Noorden CJ, Köhler A (2000) Short-time induction of oxidative stress in hepatocytes of the European flounder (*Platichthys flesus*). *Mar Environ Res* 50: 495-501
- Wilhelm Filho D, Torres MA, Zaniboni-Filho E, & Pedrosa RC (2005) Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongates* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture* 244(1): 349–357
- Xiong YL, Decker E (1995) Alterations of muscle protein functionality by oxidative and antioxidative processes. *J Muscle Foods* 6: 139-60

Yamanaka H, Sogabe A, Handoh IC, Kawabata Z (2011) The effectiveness of clove oil as an anaesthetic on adult common carp. *Cyprinus carpio*. *L J Anim Vet Adv* 10 (2): 210-213

Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G (2008) Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal Chim Acta* 606: 135–150

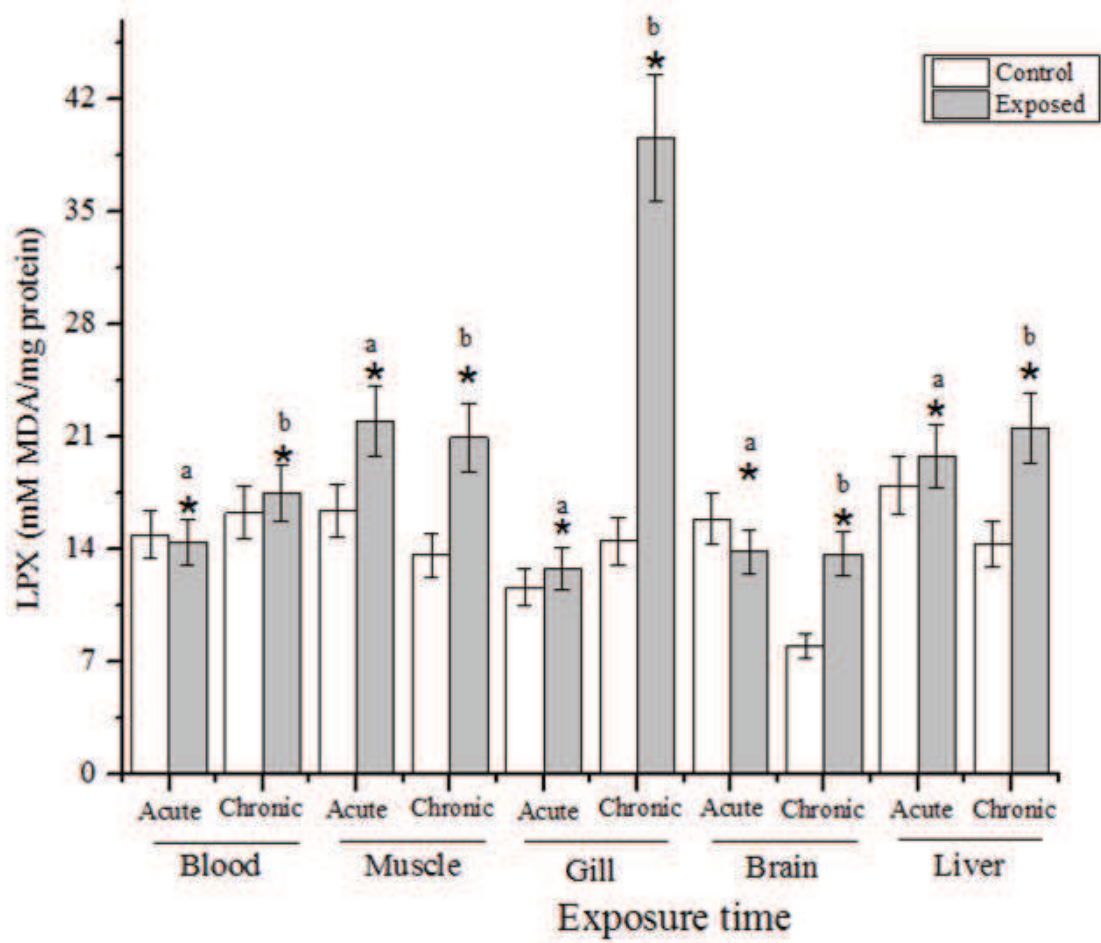
**Figure captions**

**Fig. 1** Hydroperoxide content (HPC) in blood, muscle, gill, brain and liver of *C. carpio* exposed to DCF in acute (4d) and chronic (24d) time. Values are the mean of three replicates  $\pm$  SE. CHP = cumene hydroperoxide \*Significantly different from control values, ANOVA and Bonferroni's ( $P < 0.05$ ).

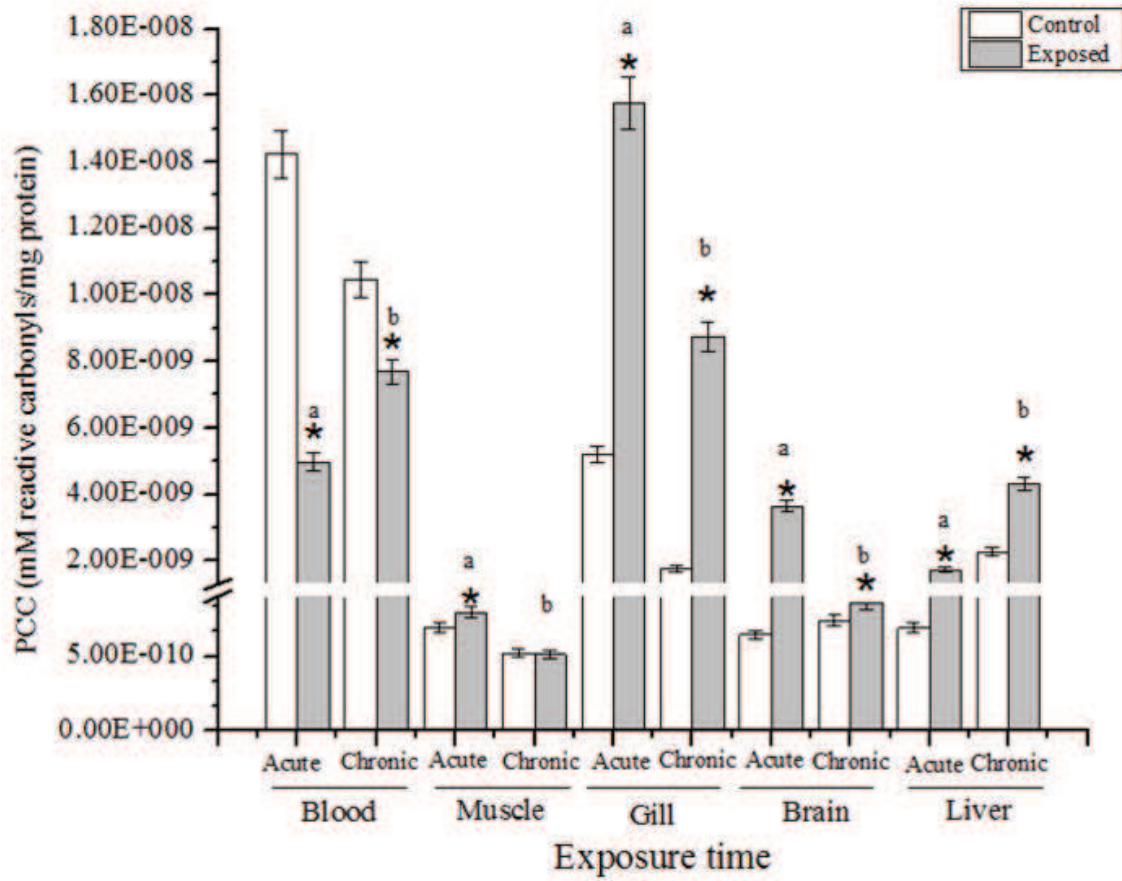


**Fig. 2** Lipid peroxidation (LPX) in blood, muscle, gill, brain and liver of *C. carpio* exposed to DCF in acute (4d) and chronic (24d) time. Values are the mean of three replicates  $\pm$  SE. PT = protein.

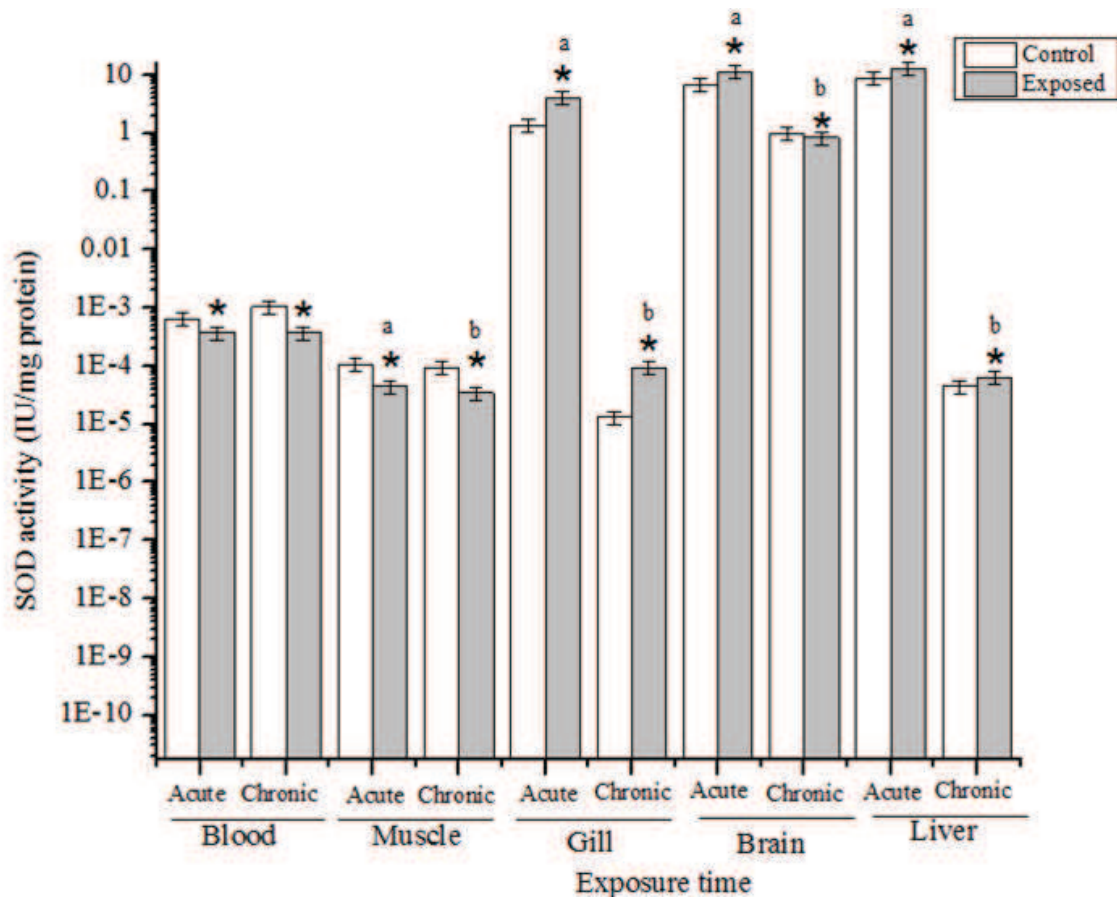
\*Significantly different from control values, ANOVA and Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).



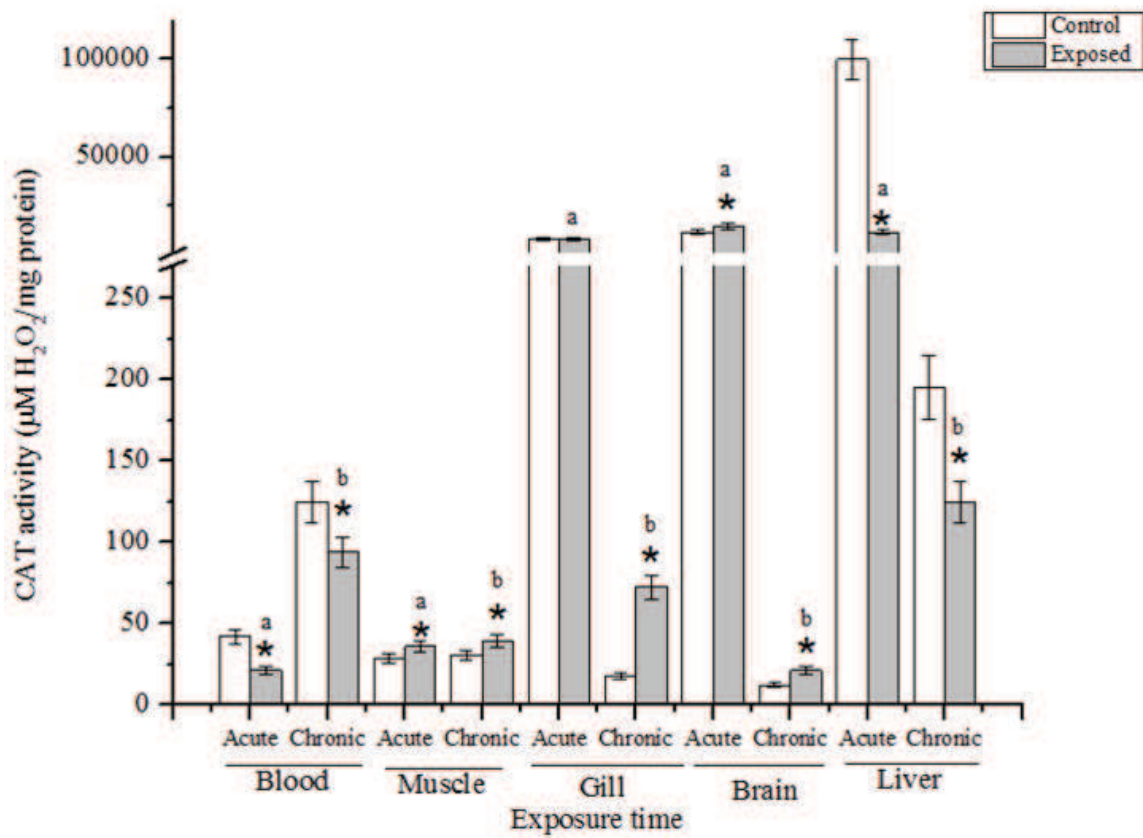
**Fig. 3** Protein carbonyl content (PCC) in blood, muscle, gill, brain and liver of *C. carpio* exposed to DCF in acute (4d) and chronic (24d) time. Values are the mean of three replicates  $\pm$  SE. PT = protein. \*Significantly different from control values, ANOVA and Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4** Superoxide dismutase (SOD) activity in blood, muscle, gill, brain and liver of *C. carpio* exposed to DCF in acute (4d) and chronic (24d) time. Values are the mean of three replicates  $\pm$  SE. PT = protein. \*Significantly different from control values, ANOVA and Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).

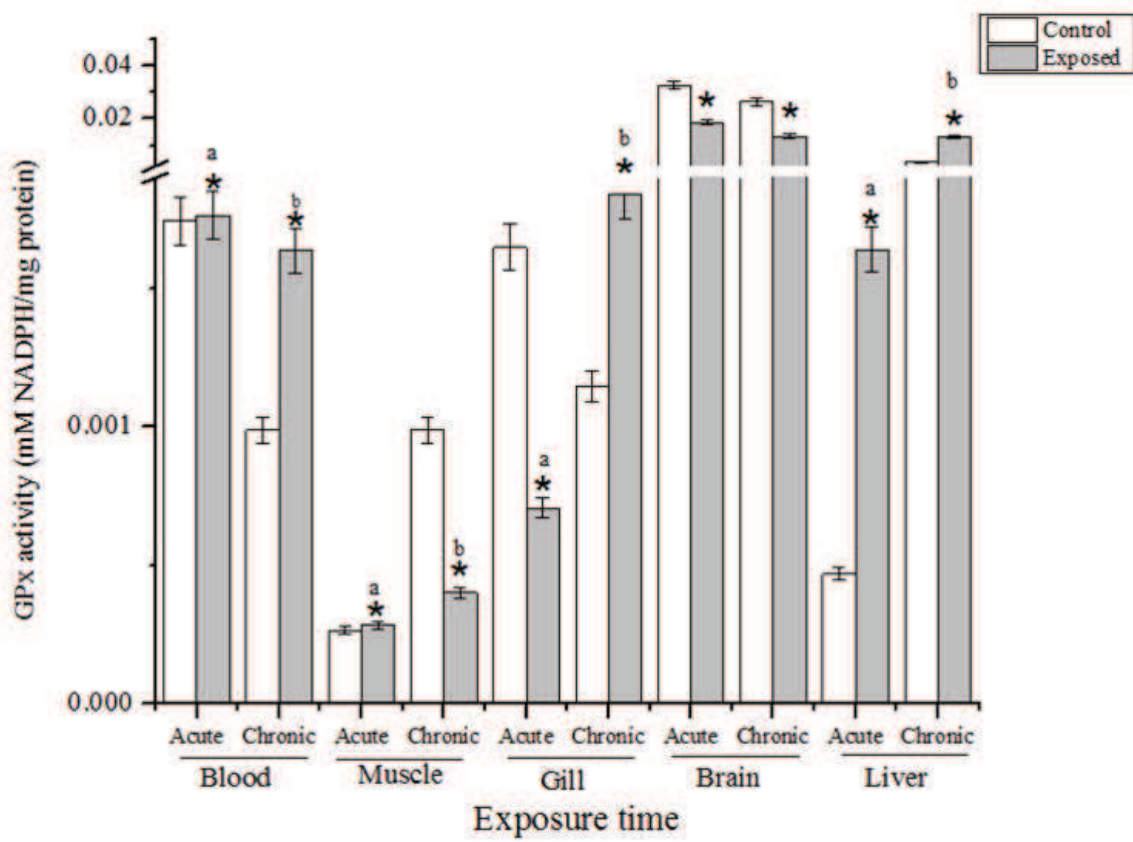


**Fig. 5** Catalase (CAT) activity in blood, muscle, gill, brain and liver of *C. carpio* exposed to DCF in acute (4d) and chronic (24d) time. Values are the mean of three replicates  $\pm$  SE. PT = protein. \*Significantly different from control values, ANOVA and Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).





**Fig. 6** Glutathione peroxidase (GPX) activity in blood, muscle, gill, brain and liver of *C. carpio* exposed to DCF in acute (4d) and chronic (24d) time. Values are the mean of three replicates  $\pm$  SE. PT = protein. \*Significantly different from control values, ANOVA and Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ).



**Table 1.** DCF concentrations in the exposure times.

Exposure time (days)	DCF in water system ( $\mu\text{g/L}$ )	DCF in plasma of carp ( $\mu\text{g/L}$ )
0	$7098.4 \pm 354.9$	0
4	$1392.6 \pm 58.7$	$3416 \pm 80.3$
24	$1228 \pm 46.2$	$2044 \pm 75.3$

**Table 2.** Increases and decreases in oxidative stress biomarkers comparing 4 and 24 days

Organ or tissue	Oxidative stress biomarker					
	HPC	LPX	PCC	SOD	CAT	GPx
Blood	$\uparrow 65.6\%$	$\uparrow 20.7\%$	$\uparrow 109.8\%$	$\uparrow 0.04\%$	$\uparrow 341.8\%$	$\downarrow 7.7\%$
Muscle	$\downarrow 6.4\%$	$\downarrow 5.1\%$	$\downarrow 18\%$	$\downarrow 31.3\%$	$\uparrow 9.4\%$	$\uparrow 41.3\%$
Gill	$\downarrow 988.3\%$	$\uparrow 209.5\%$	$\downarrow 64.9\%$	$\downarrow 4300438\%$	$\downarrow 11247.7\%$	$\uparrow 160.6\%$
Brain	$\downarrow 6463.8\%$	$\downarrow 1.2\%$	$\downarrow 387.4\%$	$\downarrow 1236.5\%$	$\downarrow 69417.6\%$	$\downarrow 37.9\%$
Liver	$\uparrow 150\%$	$\uparrow 9.2\%$	$\uparrow 31.8\%$	$\downarrow 19765315.5\%$	$\downarrow 9241.8\%$	$\uparrow 722\%$

CHP = hydroperoxide content; LPX= Lipid peroxidation level; PCC= Protein carbonyl content;

SOD= superoxide dismutase; CAT= catalase; GPx= glutathione peroxidase.

**Table 3.** Pearson's correlation among DCF 4 and 24 days and oxidative stress biomarkers in blood, muscle, brain, gill and liver of *Cyprinus carpio*. HPC= Hydroperoxide content. LPX= Lipid peroxidation level. CPC= Protein carbonyl content. SOD= Superoxide dismutase activity. CAT= Catalase activity. GPx= Glutathione Peroxidase activity.

	<u>Biomarker</u>	<u>Organ or tissue</u>	<u>DCF 24 days</u> 2044 ± 75.3 µg/L
<u>DCF 4 days</u> 3416.4 ± 80.3 µg/L	CHP	<u>Blood</u>	0.093
		<u>Muscle</u>	0.483
		<u>Brain</u>	0.234
		<u>Gill</u>	<b>-0.957</b>
		<u>Liver</u>	<b>0.999</b>
	LPX	<u>Blood</u>	0.066
		<u>Muscle</u>	0.164
		<u>Brain</u>	<b>-0.554</b>
		<u>Gill</u>	<b>0.716</b>
		<u>Liver</u>	<b>-0.862</b>
	CPC	<u>Blood</u>	-0.295
		<u>Muscle</u>	0.310
		<u>Brain</u>	<b>-0.608</b>
		<u>Gill</u>	<b>0.882</b>
		<u>Liver</u>	<b>0.827</b>
	SOD	<u>Blood</u>	0.030
		<u>Muscle</u>	-0.186
		<u>Brain</u>	<b>-0.990</b>
		<u>Gill</u>	-0.277
		<u>Liver</u>	-0.304
CAT	<u>Blood</u>	<b>0.680</b>	
	<u>Muscle</u>	0.159	
	<u>Brain</u>	-0.386	
	<u>Gill</u>	<b>-0.739</b>	
	<u>Liver</u>	<b>-0.976</b>	
GPx	<u>Blood</u>	<b>-0.509</b>	
	<u>Muscle</u>	0.037	
	<u>Brain</u>	0.332	
	<u>Gill</u>	0.419	
	<u>Liver</u>	<b>-0.928</b>	

Correlations coefficients are significant when they are higher than 0.5 (bold coefficients).

## 9. REFERENCIAS

- Albert L., Namihira D. (2004). Capítulo 3: Conceptos básicos en ecología y su relación con la toxicología ambiental. Capítulo 9: Contaminación ambiental y criterios de evaluación. En: Toxicología ambiental. Universidad de la Ciudad de Juárez. Chihuahua, México. 52-54 y 154-160.
- Aragones, G.H. (1995). Realizar investigaciones que permitan conocer y aplicar la biotecnología para producir en cautiverio acocil, rana toro, ajolote, desarrollo de lotes. Proyecto de Investigación. México. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Berlett- B S, Stadtman- E R. Protein oxidative in aging, disease and oxidative stress. J. 1997; Biol. Chem. 272:20313-16.
- Borgmann U, Bennio D, Ball A, Palabrica V. (2007). Effect of a mixture of seven pharmaceuticals on *Hyalella Azteca* over multiple generations. Chemosphere, 66: 1278-1283.
- Bort- R, Ponsoda- X, Carrasco- E, Gómez- Lechon M J, Castell- J V. (1996). Metabolims of aceclofenac in humans. Drug Metab. 24:834-41.
- Bourgeois, M., (1986). Proteínas animales. Editorial El Manual Moderno. México. pp. 261-287.
- Bourne, MC, JF Kenny, J. Barnard. (1978). Lectura asistida por ordenador de los datos de perfil de textura curvas de análisis . Revista de Estudios de Textura 9, 481.
- Burcham, P. C. (2007). Modified protein carbonyl assay detects oxidized membrane proteins: a new tool for assessing drug-and chemically-induced oxidative cell injury. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 56(1), 18-22.
- Bucharles, C; Davdin, J.D.; Denoyer, C.; Girard, J. P.; Goutefongea, R.; Laroche M.; Maillard, T. y Ramihone, M. (1991). Tecnología de la carne y de los productos cárnicos. España. Acribia. pp. 269-273, 283-285.
- Buege J, Aust S. (1979). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52: 302-310.
- Buhler- D R and Wang- B J. (1998). Rainbow trout cytochrome P450s: Purification, molecular aspects, metabolic activity, induction and role in environmental monitoring. *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 121. 107-37.

- Carlsson C, Johansson A, Alvan G, Bergman, Kuhler T. (2006). Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part I: Environmental risk assessment of selected active pharmaceutical ingredients. *Science of the Total Environment*, 364: 67-87.
- Cisneros E., Pupo J., y Céspedes E. (1997). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutatión peróxidasa. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*. 16 (1): 10-15.
- Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA). (2009). Anuario estadístico de acuicultura y pesca 2009. SAGARPA. [En línea]. México. Disponible en: [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario\\_2009\\_capitulo\\_i\\_preliminar](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2009_capitulo_i_preliminar). (Accesado el 30 de marzo de 2011).
- Cook- P M and Burkhard- L P. (1998). Development of bioaccumulation factors for the Great Lakes. Proceedings of the National Sediment Bioaccumulation Conference, Bethesda, MD, Sept. 11-13, 1996. EPA 823-R-98-002. U.S. EPA Office of Water. 3-27.
- Di Giulio R., Wasburn P., Wenning R., Winston G., Jewell C. (1989). Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Environmental Toxicology Chemistry*. 8:1103.
- Diprio J. (2001). *Pharmacist's Drug Handbook*, American Society of Health System Pharmacists, Springhouse. USA. Pp. 381-382.
- 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.
- Eissa L, Salibian A, Ferrari L, Porta P, Borgnia M. (2003). Evaluación toxicológica no invasiva del Cadmio: modificaciones de biomarcadores conductuales en *Cyprinus carpio*. *Bilología Acuática*, 20: 221.
- Escher B, Bramaz N, Eggen R, Richter M. (2005). Monitoring the removal efficiency of pharmaceuticals and hormones in different treatment processes of source-separated urine with bioassays. *Environment Science Technology*, 39(9): 3090-3100.
- Espina S, Vanegas C. (1996). Ecotoxicología y contaminación. En: *Contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias*. A.V.

- Estrada, P., (2005) Desarrollo de una salchicha de pescado utilizando como materia prima carne de trucha (*Salmo gairdneri*) y carpa (*Cyprinus carpio mounis*). Tesis de Licenciatura. México. Facultad de Química, Universidad Autónoma del estado de México. pp. 3-25.
- FAO (2014) Programa de información de especies acuáticas. *Cyprinus carpio*. Programa de información de especies acuáticas. Texto de Peteri, A. In: Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. Roma. Available from <[http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus\\_carpio/es#tcNA00D9](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Cyprinus_carpio/es#tcNA00D9)> [24 January 2014].
- Fennema, O. (2000). Química de los alimentos. 2ª edición. España. Acribia. pp. 412-504.
- Fent K, Weston A, Caminada D. (2006b). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76: 122-159.
- Feng, Zhaohui, Hu, Wenwei, Amin- S, Tang, Moon- S. (2003). Mutational spectrum and genotoxicity of the product, trans-4-hidroxy-2-nonenal, induced DNA adducts in nucleotide excision repair-proficient- deficient human cells. *Journal Article*, 1;42(25). *Biochemistry*. 7848-54.
- Gómez-Lechón M, Ponsoda – X, O’Connor- E, Donato- T, Castell- J, Jover- R. (2003). Diclofenac induces in hepatocytes by alteration of mitochondrial function and generation of ROS. *Biochemical Pharmacology*. 66:2155-67.
- Gómez-Oliván L, Carmona-Zepeda F, Galar-Martínez M, Téllez-López A, Amaya-Chávez A. (2009). Estudio de automedicación en una farmacia comunitaria de la ciudad de Toluca. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 40(1):5-11.
- Gurr C, Reinhard M. (2006). Harnessing natural attenuation of pharmaceuticals and hormones in rivers. *Environmental Science and Technology*, 272-276.
- Gunzler, W., & Flohe-Clairbone, A. (1985). Glutathione peroxidase. In R. A. Green-Wald (Ed.), *Handbook of methods for oxygen radical research* (pp. 285-290). Boca Raton: CRC Press.
- Han- H, Han- K, Kyeong- P, Sung- K L, Man- G. (2007). Analysis of the effects diclofenac on Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using real-time PCR. *Chemosphere*, 67: 2115-21.
- Hangsber W. (2002). *Bilología de las especies de oxígeno reactivas*. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. 24: 19-54.

- Heckmann H, Callagan A, Hooper H, Connona R, Hutchinson T, Maund S, Sibly R. (2007). Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on lifehistory traits and population dynamics. *Toxicology Letters*, 172: 137-145.
- Huss, H.H., Ababouch, L. and Gram, L. (2004). Assessment and management of seafood safety and quality . FAO Fisheries Technical Paper No. 444. Food and Agriculture Organisation, Rome.
- Jemba P. (2006). Excretion and ecotoxicology of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63: 113-130.
- Jiang, Z. Y., Hunt, J. V., & Wolff, S. P. (1992). Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 202(2), 384-389.
- Jones O, Vuolvoulis N, Lester J, (2002). Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research*, 36: 5013-5022.
- Jones o; Vuolvoulis N, Lester J. (2004). Potencial ecological and human health risks associated with the presence of pharmaceutically active compounds in the aquatic environment. *Critical Reviews in Toxicology*, 34(4):335-3350.
- Koningsberg M. (2008). Radicales libres y éstres oxidative. Aplicaciones médicas. Editorial el manual modern. México.
- Kümmerer K. y Henninger A. (2003). Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clinical Microbiology and Infection*. 9:1203.
- Lange R, Dietrich D. (2002). Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substance- conceptual considerations. *Toxicology Letters*, 131: 97-104.
- Levine R, Williams J, Stadtman E, Shacter E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 233:Methods in Enzymology, 233: 346-357.
- Linnæus- C. (1758). *Systema naturæ per regna tria naturæ, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Tomus I. Edition decima, reformata. Holmiæ. (Salvius). 821-824.
- Martínez C, Blanco G, García-Martín E, G-Agúndez J. (2006). Farmacogenómica clínica de CYP2C8 y CYP2C9: conceptos generales y aplicación al uso de AINE. *Farmacia Hospitalaria*, 30: 240-248.

- Miranda, S. (2011). Caracterización fisicoquímica, funcional y estructural de 7 productos marinos de importancia económica en México. Tesis de Licenciatura. México. Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México. pp. 8-22
- Misra P, Fridovich I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *Biological Chemistry*, 247: 3170-3175.
- Moreno G. (2003). Toxicología ambiental evaluación de riesgo para la salud humana, Mc Graw Hill, España. 370pp.
- Nentwing G. (2007) Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: the antidepressant drug fluoxetine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52: 163-170.
- O'Connor D. (1994) Toxic Pollution and its Impact on Receiving Waters. In Water quality prevention identification and management of diffuse pollution. New York, EU, 1054pp.
- Oliveira, C. 1998. Guía didáctica. Deterioro del pescado. Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Instituto de investigaciones pesqueras.
- Oteiza- P A. (1995). Modificación activa de las proteínas. *Antioxidante y Calidad de Vida*. 2:12-20.
- Parvez S., Raisuddin S. (2005). Protein carbonyls: novel biomarkers of exposure to oxidative stress-inducing pesticides in freshwater fish *Channa punctate* (Bloch). *Environmental Toxicology & Pharmacology*. 20: 112-117.
- Pastor B. (2002). Biomotorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos. Tesis doctoral en Biología. Universidad Autónoma de Barcelona España. 48-50.
- Pilosof AM (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) p.p.60-75.
- Radi R, Turrens J, Chang Y, Bush M, Capro D, Freeman A. (1991). Detection of catalase in rat heart mitochondria. *Biological Chemistry*, 22: 20028-22034.
- Repetto M. (1997). Concepto y definición de toxicología y toxicidad, en *Toxicología Fundamental*. Editorial Díaz de Santos. 3ª edición, 17 pp.
- Ríos M. (2003). El estrés oxidativo y el destino celular. *Química viva* 1(2): 17-23.
- Roberts J, Monrrow J. (2007) Analgésicos-antipiréticos y antiinflamatorios, y fármacos antigotosos. En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 11ª ed, Mac Graw Hill, México DF. 698-699 pp.



- SAGAN. Contaminación del agua. Disponible en : [http://www.sagan-gea.org/hojared\\_AGUA/paginas/17agua.html](http://www.sagan-gea.org/hojared_AGUA/paginas/17agua.html) (citado 26/04/2013)
- Schwaiger J., Ferling U., Mallow H., Wintermayr y R. D. (2004). Negele Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology*. June; 68, Issue 2, 10: 141-150
- SEMARNAT (Secretaría de medio ambiente y recursos naturales). (2007). Página de la Semarnat, Comisión Nacional del Agua (CNA). (citado 26/04/2013). Disponible en: <http://www.infoagua.org/cuanta-agua-tiene-mexico.htm>.
- Stegeman- J J, Hahn- M E. (1994). Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: Current perspective on forms, functions and regulation of cytochrome P450 in aquatic species. In: Mallins DC, Ostrander GK (eds.), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemistry and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton. 87-206
- Stegeman- J J, Livingstone- D R. (1998). Forms and functions of cytochrome P450. *Compos Biochem Physiol*. 211-12.
- Snyder E, Pleus R, Snyder S. (2005). Pharmaceuticals and EDCS in the US water industry-an update. *American Water Works Association*, 11: 32-36.
- Ternes T, Siegrists H, Joss A. (2004) Scrutinizing pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment. *Environmental Science and Technology*, 393A-399A.
- Timofeyev M, Shatilina Z, Kolesnichenko A, Bedulina D. (2006). Natural organic matter (NOM) induces oxidative stress in freshwater amphipods *Gammarus trigrinus*. *Science of the Total Environment*, 366: 673-681.
- 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.
- van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.
- Valko M., Morris H. y Cronin M.T. (2005) Toxicity and oxidative stress. *Current Medical Chemistry*, 12: 1160-1207.
- 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.

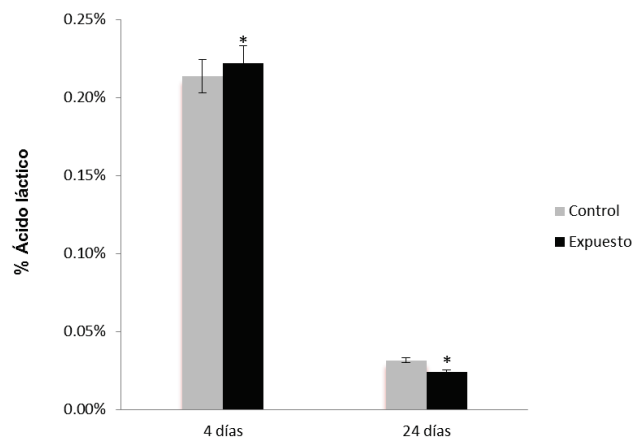
Tesis de Licenciatura. México. Facultad de Química. Universidad Autónoma del estado de México. Pp. 23-26, 37-41.

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

Vindas R., Ortiz F., Ramírez V., y Cuenca P. (2004). Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica. Revista de Biología Tropical. 52 (3): 601-609

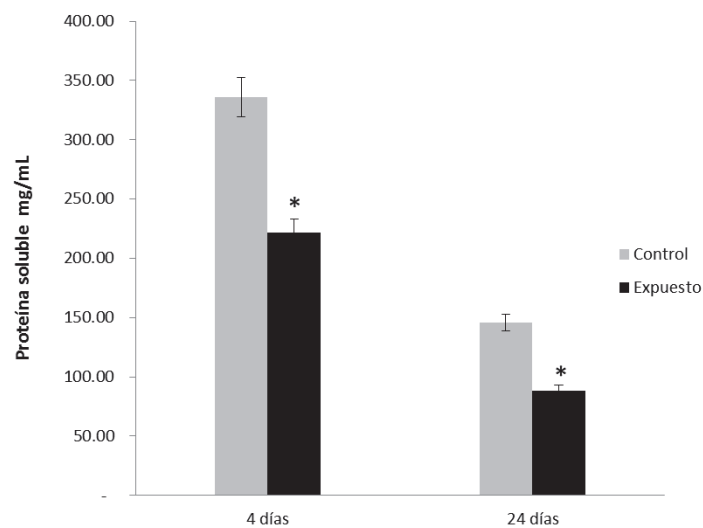
## 10. ANEXOS

El efecto de los AINES sobre el pH del músculo de la carpa común no presentaron diferencia significativa con respecto al control a los dos tiempos de exposición, obteniendo valores de 6.8 y 6.9 en un tiempo de 4 días y para 24 días de 6.8 y 6.83 respectivamente, coincidiendo con lo reportado por Huss (2004), donde se expresa que para especies acuícolas y/o marinas, el intervalo de pH para muestras frescas después del rigor mortis es de 6.3-6.9, lo que indicaría que ambas especies presentaron un comportamiento similar de cambios bioquímicos al momento de ser capturados, sin embargo, para el porcentaje de ácido láctico se tuvo una diferencia significativa con respecto al control ( $P < 0.05$ ) a los dos tiempos de exposición comparando el control contra la especie expuesta obteniéndose valores de 0.21% y 0.22%, para un tiempo de 4 días, lo que estaría sucediendo es que parte de la flora microbiana presente en ambos músculos siguen su proceso oxidativo, formando ácidos orgánicos de su metabolismo y a los 24 días de 0.03% y 0.02%, respectivamente, ocurriendo el mismo fenómeno, solo que en mayor proporción para el control (Huss et al., 2004).



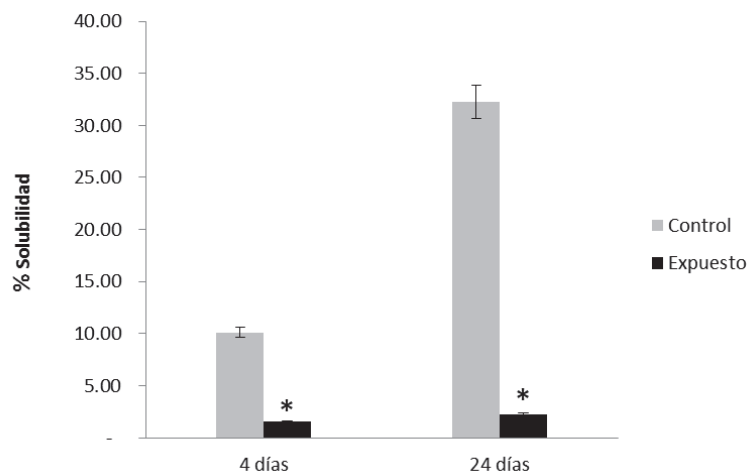
**Fig 1. Efecto de diclofenaco sobre el ácido láctico presente en el músculo de *Cyprinus carpio***

En el caso de proteína soluble (Fig. 2), se observó diferencia significativa con respecto al control ( $P < 0.005$ ) a los dos tiempos de exposición obteniendo valores de 336.04 y 221.69 mg/mL para un tiempo de 4 días y a los 24 días de 145.81 y 88.42 mg/mL respectivamente. Halliwell and Gutteridge (1999), observaron que uno de los papeles fundamentales de las defensas antioxidantes, para la desintoxicación de la producción de las EROS pueden inducir un daño oxidativo significativo, que incluye la inactivación enzimática, degradación de las proteínas y oxidación de lípidos, en este caso se puede observar que el daño a las proteínas estarían obligando a la formación de nuevos enlaces entre la proteína, de tal manera que la proteína soluble disminuye para el caso de la especie expuesta, probablemente llevando a cabo una conformación diferente de la estructura proteica.



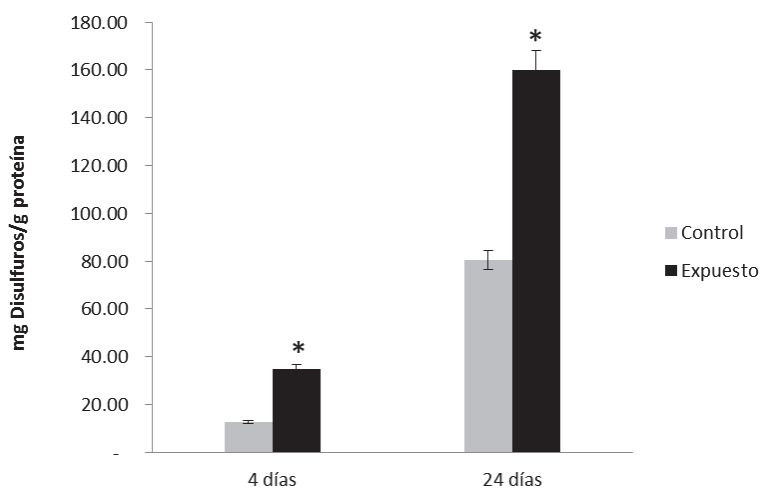
**Figura 2. Efecto del diclofenaco sobre la proteína del músculo de *Cyprinus carpio***

La solubilidad de las proteínas (Fig. 3), van correlacionadas con la proteína soluble, ya que como se mencionó anteriormente, la presencia de diclofenaco, puede actuar a nivel proteico, pudiéndose dar un cambio en la conformación de la proteína, formándose nuevos enlaces proteína-proteína, formación de nuevas redes, enlaces iónicos, enlaces hidrofóbicos y puentes disulfuro (Kinsella et al., 1985), de esta manera también podría observarse una inactivación enzimática, como por ejemplo algunas proteasas, o bien podría existir una degradación proteica (Swaisgood, 1982) dando como consecuencia una menor solubilidad ( $p < 0.05$ ), caso que no ocurre con el control, ya que se sabe que la solubilidad está directamente relacionada con el grado de exposición de residuos hidrofóbicos quienes son más susceptibles a una desnaturalización dando como resultados más residuos hidrofóbicos, pudiéndose de esta manera tener una mayor cuantificación de éstos (10.13% y 32.27%) para los días 4 y 24 respectivamente, y una menor cuantificación para la muestra expuesta al diclofenaco ( 1.57% y 2.24%) para 4 y 24 días respectivamente.



**Figura 3. Efecto del diclofenaco sobre la solubilidad de proteína del músculo de *Cyprinus carpio***

La exposición de la especie al diclofenaco tuvo un efecto significativo en los enlaces disulfuro ( $P < 0.05$ ), ya que se observó un aumento de éstos (Fig. 4), Srinivasan y Hultin (1997), reportaron la pérdida de grupos sulfhidrilos, proponiendo que la pérdida éstos pueda ser debido a la formación de enlaces disulfuro con o entre polipéptidos, siendo la cisteína, localizada en el centro catalítico de la miosina tal vez la más susceptible (Li et al, 2013; Lund et al., 2011). Los enlaces disulfuro son de gran importancia en la configuración terciaria de las proteínas, ya que la hace termodinámicamente más estable cuando otras atracciones resultan débiles, confiriendo rigidez, impidiendo la proteólisis, corroborando los datos mostrados para la proteína soluble y la solubilidad, ya que al observarse una mayor cuantificación de enlaces disulfuro, las proteasas presentes no pudiendo quizá llevar a cabo su función, minimizando con esto la degradación de las propiedades funcionales (Pilosoff, 2000).



**Figura 4.** Efecto del diclofenaco sobre los grupos sulfhidrilos de proteína del músculo de *Cyprinus carpio*

Para poder observar claramente el color (Fig. 5) de las proteínas de cada tratamiento (control y expuesto), se llevó a cabo el proceso de gelificación de las proteínas de temperatura ambiente grado por minuto hasta alcanzar una temperatura interna de 80°C, en donde se puede observar que para el parámetro L\* los valores obtenidos fueron de 72.93 y 70.15 para un tiempo de 4 días y para 24 días de exposición de 75.40 y 68.43 respectivamente ( $p < 0.05$ ), lo cual podría sugerir que el músculo del pescado se oscureció por la presencia de estos xenobióticos (diclofenaco), provocando quizás la acción de oxidación de la hemoglobina. Para el valor de a\*, los valores para los 4 días de exposición fueron de 0.20 y 0.58 y para los 24 días de -0.50 y 0.57 control y expuesto respectivamente, indicando que el color del músculo fue perdiendo su tonalidad roja. Caso similar ocurrió con b\*, ya que para ambos casos, 4 (22.35 y 9.73) y 24 días (10.49 y 10.10) de exposición los valores disminuyeron, teniéndose de esta manera un color grisáceo no característico de un músculo fresco que no ha sido expuesto a ningún contaminante. Esto podría afectar a la aceptación de este tipo de productos por parte del consumidor, ya que se espera que el color rosa-rojo característico de este músculo esté presente.

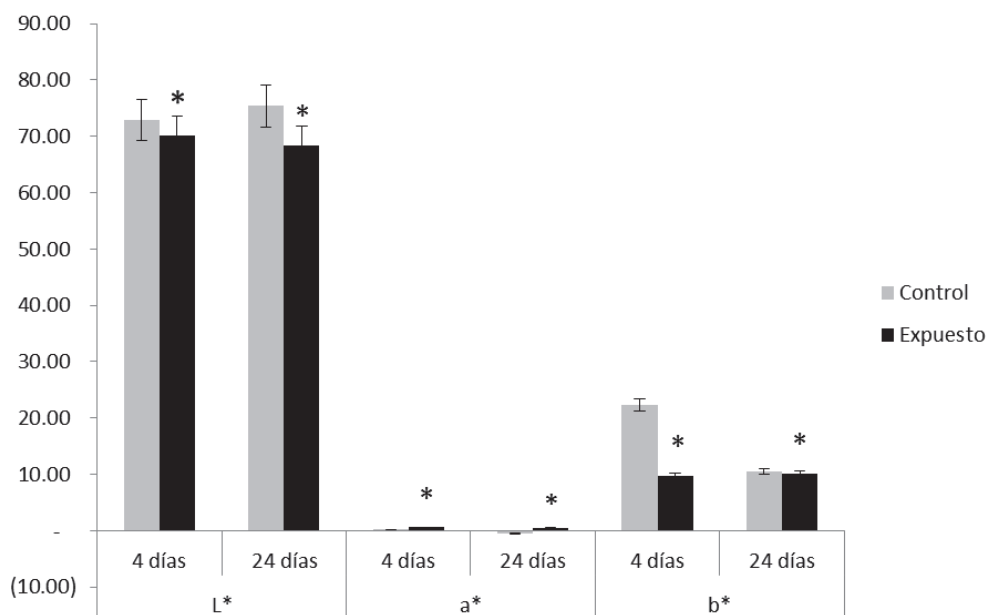


Figura 5. Efecto del diclofenaco sobre el color (L\*, a\*, b\*) de proteína del músculo de *Cyprinus carpio*

Para observar el efecto que tuvieron estos xenobióticos sobre las características de textura, se llevó a cabo un Análisis de Perfil de Textura, el cual se muestra en la Figura. 7, donde el comportamiento del análisis tuvo diferencia significativa con respecto al testigo ( $P < 0.005$ ). Para el caso de la dureza, fibrosidad y masticabilidad, los valores obtenidos respectivamente para los 4 días de exposición fueron de 2.1, 9.2 y 1.4. Para los 24 días de 8.1, 10.4 y 3.1 respectivamente. Se puede observar que al disminuir la dureza, la masticabilidad también disminuyó, esto probablemente a que los enlaces presentes en el gel conformado por estas proteínas expuestas al fármaco se vuelven más débiles, lo cual, podría provocar que exista una red tridimensional menos estable, ocasionando huecos más grandes, causando una mayor rugosidad en el gel. Éstos parámetros, son de importancia en el procesamiento de productos cárnicos, en especial los embutidos, ya que se desea que la dureza sea mayor, y que el grado de porosidad sea prácticamente nulo, lo que nos indicaría que las proteínas expuestas al xenobiótico tienden a ser alteradas por la biotransformación del xenobiótico. En el resto de los atributos medidos (Cohesividad, Elasticidad, Resiliencia y Gomosidad), no presentaron diferencia significativa, siendo éstos, parámetros poco afectados por la presencia del xenobiótico.

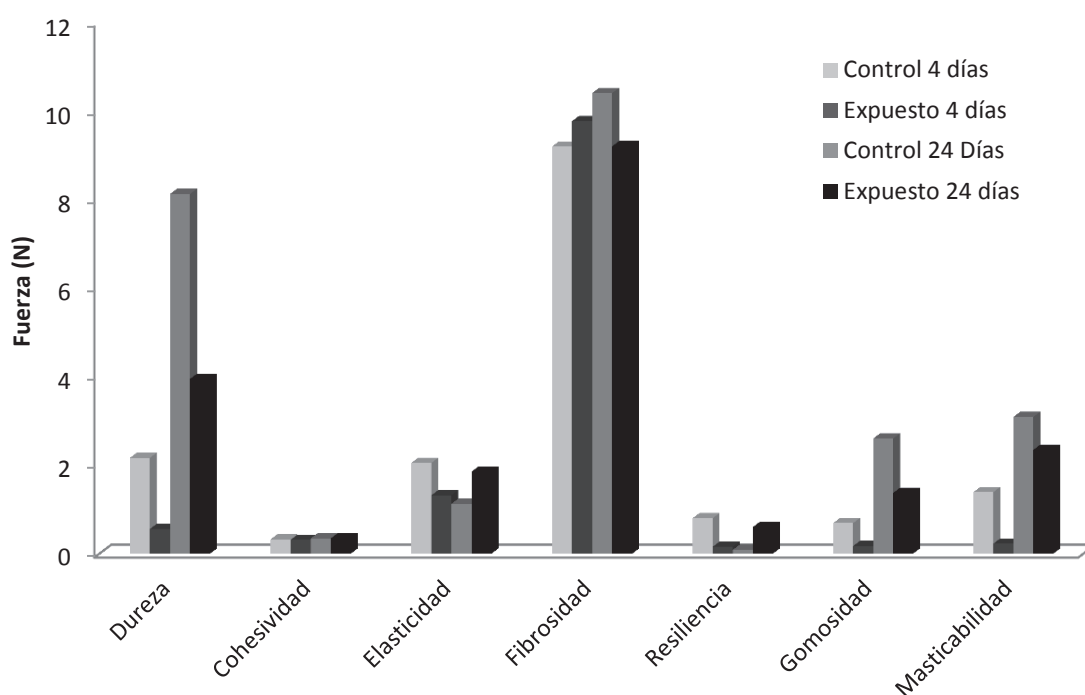


Figura 6. Parámetros de textura de la proteína del músculo de *Cyprinus carpio*



## **11. Conclusiones**

La presencia de diclofenaco en cuerpos de agua disminuye la calidad de la carne de carpa induciendo cambios a nivel de proteínas, acidez, solubilidad, grupos Sulfhídrido y concentración proteica, debido a ello se ven afectados los atributos de textura la dureza, fibrosidad y masticabilidad aumentan en un mayor tiempo de exposición al fármaco, lo que indica que la estructura proteica contenida en la carne de carpa se ve modificada significativamente, indicando un disminución en la calidad de la carne de carpa.