



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

“Influencia de una dieta a base de okra (*Abelmoschus esculentus*) y espirulina (*Arthrospira maxima*) sobre la embriotoxicidad y teratogenicidad inducida por cloruro de aluminio (AlCl_3) sobre *Danio rerio*”.

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICAS**

PRESENTA:

Biol: Erika Mariana García Avalos

Tutora académica:

Dra. en CBQ. María Dolores Hernández Navarro

Tutores adjuntos:

Dr. en CBQ. Leobardo Manuel Gómez Oliván

Dra. en CQ. Hariz Islas Flores

Toluca de Lerdo, Estado de México, 2024.

ÍNDICE

1	Abstract.....	5
2	Resumen	6
3	Introducción	7
4	Antecedentes.....	8
4.1	Aluminio: Contaminante ambiental.....	8
4.1.1	Mecanismo de acción tóxica	10
4.1.2	Ocurrencia	11
4.1.3	Danio rerio como bioindicador	13
4.1.4	Biomarcadores de estrés oxidativo	14
4.1.5	Estudios por exposición a $AlCl_3$	15
4.1.6	Propiedades biorremediadoras de okra (<i>Abelmoschus esculentus</i>).....	16
4.1.7	Importancia y propiedades biológicas de la A. esculentus (Okra).....	16
4.1.8	Generalidades y propiedades del alga espirulina (<i>Arthrospira máxima</i>).....	18
4.1.9	Espirulina como biorremediador y alimento funcional.....	18
5	Justificación	20
6	Objetivos.....	21
7.1.1	Objetivo general	21
7.1.2	Objetivos específicos.....	21
7	Metodología	21
8.1.1	Materiales biológicos	21
8.1.2	Obtención de okra (<i>Abelmoschus esculentus</i>).....	21
8.1.3	Formulación del alimento funcional.....	22
8	Pruebas de toxicidad.....	24
9.1.2	Estrés oxidativo	25
9	Resultados.....	28
9.1	Análisis bromatológico	28
9.2	Biomarcadores de oxidación celular y actividad antioxidante.....	29
9.2.1	Resultados de actividad de superóxido dismutasa (SOD).....	29
9.2.2	Resultados de la actividad de lipoperoxidación (LPX).....	29
9.2.3	Resultados de la actividad de catalasa (CAT).....	30
9.2.4	Contenido de proteínas carboniladas (POX).....	30
9.2.5	Contenido de hidroperóxidos (HPX).....	30
9.3	Resultados embrioletalidad y teratogénesis	36
9.4	Desarrollo embrionario.....	36
9.5	Teratogenicidad	42
9.6	Embrioletalidad	43
9.7	Embriotoxicidad	44
10	Discusión	44
11	Conclusiones	50
12	Referencias.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ocurrencia de la presencia de aluminio en cuerpos de agua.....	11
Tabla 2. CI50 obtenidas para distintas especies de peces.....	13
Tabla 3. Componentes nutricionales presentes en okra y espirulina	19
Tabla 4. Comparativo del análisis bromatológico vs, perfil nutrimental de okra (abelmoschus esculentus y espirulina (<i>Arthrospira máxima</i>)).	28
Tabla 5. Desarrollo embrionario, respecto a las horas de observación/exposición a $AlCl_3$ en el grupo alimentado con hojuela comercial.....	36
Tabla 6. Desarrollo embrionario, respecto a las horas de observación/ exposición a $AlCl_3$ en el grupo alimentado con la formulación de espirulina.	38
Tabla 7. Desarrollo embrionario, respecto a las horas de observación/ exposición a $AlCl_3$ en el grupo alimentado con la formulación okra- espirulina.	41
Tabla 8. Concentración letal media CI50 (μg l-1), concentración media de malformaciones CE50 (μg l-1) e índice teratogénico (IT).	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.5.Evaluación de la actividad enzimática superóxido dismutasa (sod). Prueba anova, tukey hsd y dunett ($p < 0,05$).....	31
Fig.6.Niveles de lipoperoxidación (lpx) prueba anova, tukey hsd y dunett ($p < 0,05$).	32
Fig.7.Evaluación de la actividad enzimática catalasa (cat) . Prueba anova, tukey hsd y dunett ($p < 0,05$)	33
Fig.8.Niveles de proteínas carboniladas (pox). Prueba anova, tukey hsd y dunett ($p < 0,05$)	34
Fig.9.Contenido de hidroperóxidos (hpx) prueba anova, tukey hsd y dunett ($p < 0,05$).	35
Fig.10.Embrioletalidad inducida por la exposición de $AlCl_3$ sobre <i>Danio rerio</i>	44

ABREVIATURAS

pH	Potencial de hidrógeno
PT	Proteínas totales
SOD	Superóxido dismutasa
TBARS	Especies reactivas de ácido tiobarbitúrico
UI	Unidades internacionales
AlCl ₃	Cloruro de Aluminio
ANOVA	Análisis de varianza
CAT	Catalasa
CE ₅₀	Concentración efectiva media
CL ₅₀	Concentración letal media
CYP450	Citocromo P450
EO	Estrés oxidativo
ERO's	Especies reactivas de oxígeno
IT	Índice Teratogénico
LPO	Lipoperoxidación
MDA	Malondialdehído
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
NO	Óxido nítrico
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
LPX	Lipoperóxidos
POX	Proteínas carboniladas
HPX	Hidroperóxidos
CAT	Catalasa
SOD	Superoxidodismutasa

ABSTRACT

Aluminum (Al) is one of the most abundant metallic elements on the planet. Due to its properties, it is widely used in the pharmaceutical, automotive and food industries, among others, as well as in wastewater treatment processes. Its presence in the ecosystem can cause adverse effects on aquatic organisms, an ideal model to study them is the species *Danio rerio*. Aluminum exposure has been linked to various pathologies ranging from oxidative stress, behavioural abnormalities, reproduction and osmoregulatory problems to severe morphological alterations. In the present investigation, the impact of aluminum chloride (AlCl₃) on *D. rerio* embryos and possible strategies to mitigate the damage caused by this metal were evaluated. The parents were divided into three different dietary groups: commercial fed, okra-spirulina and spirulina, oocytes obtained from these three groups were exposed to environmentally relevant concentrations of AlCl₃, for 60 weeks, oocytes from each group were collected and exposed to 14 concentrations of aluminum increasing 500 µg L⁻¹ between each (1500 µg L⁻¹ to 8000 µg L⁻¹ respectively), The CL50 and CE50 were obtained to calculate the Teratogenic Index (TI), morphological damage during embryonic development, oocyte viability and oxidative stress status were observed and analyzed. The results showed that the spirulina- and okra-spirulina-enriched diets were able to increase the reproductive viability of the organisms, reduce the induced embryotoxicity, improve the response of the organisms to AlCl₃-induced oxidative stress and significantly outperform the commercial diet. Notably, all groups exposed to the highest concentrations of AlCl₃ showed deleterious effects on embryonic development, including hatching abnormalities, structural deformities, and developmental delays. However, the okra-spirulina group showed a marked reduction in these responses compared to the other groups. In conclusion, this research emphasizes the potential of nutritional formulations and the urgent need to explore alternatives to mitigate damage caused by contaminants in the aquatic environment as these findings have substantial implications for environmental conservation and the general welfare of aquatic organisms in aluminum-contaminated environments.

1 RESUMEN

El aluminio (Al) es uno de los elementos metálicos más abundantes del planeta, debido a sus propiedades es ampliamente utilizado en la industrias farmacéutica, automotriz y alimentaria entre otras, así como procesos de tratamiento de aguas residuales. Su presencia en el ecosistema puede ocasionar efectos adversos en los organismos acuáticos, un modelo idóneo para estudiarlos es la especie *Danio rerio*. La exposición al aluminio se ha relacionado con diversas patologías que abarcan desde estrés oxidativo, anomalías en el comportamiento, reproducción y problemas osmorregulatorios hasta alteraciones morfológicas graves. En la presente investigación se evaluó el impacto del cloruro de aluminio (AlCl_3) en embriones de *D. rerio* y posibles estrategias para atenuar los daños causados por este metal. Los progenitores se dividieron en tres grupos dietéticos distintos: alimentó comercial, okra-espirulina y espirulina, los ovocitos obtenidos a partir de estos tres grupos fueron expuestos a concentraciones ambientalmente relevantes de AlCl_3 , durante 60 semanas, se recolectaron los ovocitos de cada grupo y se expusieron a 14 concentraciones de aluminio que aumentaron 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ entre cada una (1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 8000 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente), durante 12, 24, 48, 72 y 96 h, se obtuvieron las CL50 y CE50 para calcular el Índice Teratogénico (IT), se observó y analizó el daño morfológico durante el desarrollo embrionario, la viabilidad de los ovocitos y el estado del estrés oxidativo. Los resultados mostraron que las dietas enriquecidas con espirulina y okra-espirulina fueron capaces de aumentar la viabilidad reproductiva de los organismos, reducir la embriotoxicidad inducida, mejorar la respuesta de los organismos ante el estrés oxidativo inducido por el AlCl_3 superando notablemente a la dieta comercial. Cabe destacar que todos los grupos expuestos a las concentraciones más altas de AlCl_3 mostraron efectos nocivos sobre el desarrollo embrionario, incluyendo anomalías en la eclosión, deformidades estructurales y retrasos en el desarrollo. Sin embargo, el grupo de okra-espirulina mostró una reducción estadísticamente significativa de estas respuestas en comparación con los otros grupos. En conclusión, esta investigación enfatiza el potencial de las formulaciones nutricionales y la necesidad urgente de explorar alternativas para atenuar los daños causados por contaminantes en el medio acuático ya que estos hallazgos tienen implicaciones sustanciales para la conservación del medio ambiente y el bienestar general de los organismos acuáticos en entornos contaminados por aluminio.

2 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, varios estudios en diversos cuerpos de agua han revelado la presencia de nuevos contaminantes, potencialmente tóxicos con efectos que aún son parcialmente desconocidos. Estas especies químicas se denominan contaminantes emergentes (CE) y pueden llegar a diferentes nichos ambientales tanto a través de la actividad humana como de la ocurrencia natural, lo que ha representado una preocupación mundial, ya que los CE se detectan en prácticamente todos los ambientes de los países del mundo, independientemente de su situación económica, estos contaminantes se han convertido en un problema global especialmente debido al resultado de diversas actividades humanas, lo cual ha llevado a un suministro excesivo de nutrientes; compuestos orgánicos (p. ej., compuestos farmacéuticos y pesticidas) e inorgánicos (p. ej., fósforo, nitrógeno y metales) en los suelos y las aguas superficiales, lo que ha modificado la calidad del agua. Los metales, son elementos que se distinguen de otros contaminantes. Por tener una alta capacidad térmica y eléctrica, es maleables, tienen una densidad alta y presentan alta conductividad y facilidad de oxidación, dentro de estos metales se encuentran el plomo, mercurio, arsénico, cadmio, cromo, hierro y aluminio (Mahdi Ahmed et al., 2017).

La descarga continua de contaminantes por fuente de origen no puntuales afecta principalmente al suelo y al ecosistema acuático, dañando la cadena alimenticia del planeta (Escobar et al., 2023). El estudio y la exploración de alternativas alimentarias que atenúen los daños causados por contaminantes se ha vuelto de gran relevancia en los últimos años (Rojas et. al., 2022). La okra (*Abelmoschus esculentus*) es una malvácea originaria de África, es un cultivo vegetal y oleaginoso de alto valor nutricional el cual es valorado por su calidad única para la salud y la nutrición humanas ya que contiene proteínas y aminoácidos fibra, vitaminas, elementos minerales como calcio, potasio, sodio, magnesio y selenio (Petropoulos et al. 2018), la okra ha sido empleada en diversas investigaciones como coagulante de contaminantes industriales y metales como el sulfato de aluminio (Lasteros, 2020), estos nutrientes y cualidades presentes en la okra podrían ser complementados con la espirulina, cianobacteria fotosintético que naturalmente crece en condiciones de luz solar intensa, altas temperaturas y medio altamente alcalino es popularmente reconocida en el mundo de los alimentos saludables como un superalimento alto en proteína (Jaeschke et al., 2021) además de ser empleado en diversas

investigaciones en la eliminación de sustancias tóxicas, como: pesticidas, herbicidas y metales pesados, entre otros; esto gracias a su capacidad de acumular importantes concentraciones de compuestos tóxicos, sin afectar su actividad biológica. (Bhattacharya, 2020). Para ello es necesaria la exploración de los efectos derivados de su ocurrencia en el medio acuático, los cuales se pueden determinar a partir del daño tóxico inducido en los organismos que forman parte de las cadenas tróficas, dentro de los cuales se encuentran los modelos teleósteos, tal es el caso del bioindicador *Danio rerio* el cual ha sido utilizado como bioindicador en diversos estudios de toxicidad, ya que posee características que lo distinguen de otros organismos entre los que destacan su alta tasa de fecundidad, ciclo de vida corto, embrión con transparencia y bien definido, su alta sensibilidad a diversos agentes xenobióticos y un manejo sencillo dentro del laboratorio (Castillo-Salas et al., 2022).

4 ANTECEDENTES

4.1 Aluminio: contaminante ambiental

El medio acuático desde el punto de vista toxicológico puede ser considerado un vertedero de diversas contaminantes que son el resultado de la industrialización, la producción agrícola y de las descargas de aguas residuales. Los contaminantes ambientales pueden desplazarse muchos kilómetros desde el punto de aplicación, e incluso en muy bajas concentraciones, pueden inducir a varios efectos adversos para la mayoría de los organismos acuáticos, y por ende en la cadena trófica; la exposición al aluminio se ha asociado con diversos efectos adversos para la salud, tanto en humanos como en animales, incluyendo neurotoxicidad, problemas reproductivos y embriotoxicidad (Abd Elnabi et al., 2023; Zhang et al., 2023). Se ha identificado al aluminio como uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, El aluminio representa aproximadamente el 8% de la corteza terrestre, es el tercer elemento más abundante después del silicio y el oxígeno, además tiene la capacidad de combinarse con más de 270 minerales diferentes entre ellos con cloro, flúor, silicio, azufre, oxígeno y otras formas (Pardo., 2023), el aluminio puede liberarse al medio natural mediante fuentes naturales y diversos procesos geológicos como la actividad volcánica, meteorización, acidificación de sistemas acuático y actividades antropogénicas; ya sea por medio del consumo de agua, alimentos, uso y fabricación de productos farmacéuticos y de higiene personal, inhalación aerosoles y polvos. En diversas investigaciones la exposición al aluminio

no solo se ha relacionado con la aparición de patologías como retención pulmonar e inflamación en los ganglios linfáticos, disfunción renal, cardiopatías, encefalopatías e incluso Alzheimer en pacientes de edad avanzada. La ingesta media de aluminio en la dieta de los adultos es probablemente de 3 a 5 mg/día (Vidya, 2017). En el medio acuático, en diversos organismos, se han observado efectos embriotóxicos y teratogénicos, en peces; acumulación en branquias, hígado y cerebro (Monaco et al., 2017; Long et al., 2017; Nordberg et al., 2017). El aluminio se puede encontrar en sus diversas formas trivalentes Al^{3+} , Al^+ , $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, AlOH^2 , $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Al}(\text{OH})^{4-}$ y formar diversos complejos inorgánicos como fluoruro (F^-) y sulfato (SO_4^{-2}) y especies orgánicas como los ácidos fúlvicos, en suelos está combinado con diversas rocas que contienen aleaciones de silicatos con aluminio como imogolita, caolinita, fosfatos, sulfatos como la varicita e hidróxidos como la gibbsita (DeForest et al., 2018). La forma más común en la que se encuentra dentro de la naturaleza es como catión trivalente, el cual puede ser absorbido por vía oral a nivel del tracto gastrointestinal, se ha observado que el porcentaje de absorción depende del pH. La presencia de complejos orgánicos permite la formación de especies neutras que favorecen su absorción (Rawy et al., 2013; Vignal et al., 2016), el aluminio compite con los iones de magnesio, calcio y hierro, sustituyéndolos en las enzimas y proteínas que forman parte de sus sitios de unión, así la función de la proteína se ve alterada y con ello el mecanismo celular (Mite et al., 2023)

Un ejemplo es que una vez que ingresa a la circulación sanguínea, cerca del 90% del metal se une a la proteína sérica que se encarga del transporte de hierro, la transferrina (Harris et al., 2003), y se puede llegar a acumular en los riñones, huesos, hígado y cerebro (Gómez et al., 2011). Se ha comprobado que el aluminio puede traspasar la barrera hematoencefálica mediante endocitosis, este proceso es mediado por receptores de la proteína transportadora de Fe, en modelos murinos se reporta que aproximadamente el 0.005% de los compuestos formados con este metal ingresan al cerebro (Yokel et al., 2006) La acumulación del metal o los complejos formados, afectan la fluidez de las membranas, lo que se relaciona con la producción de lipoperoxidación de los tejidos (Kumar y Gill, 2014; Pauca et al., 2022), en la Fig. 1, se ejemplifica el ciclo de vida del aluminio.

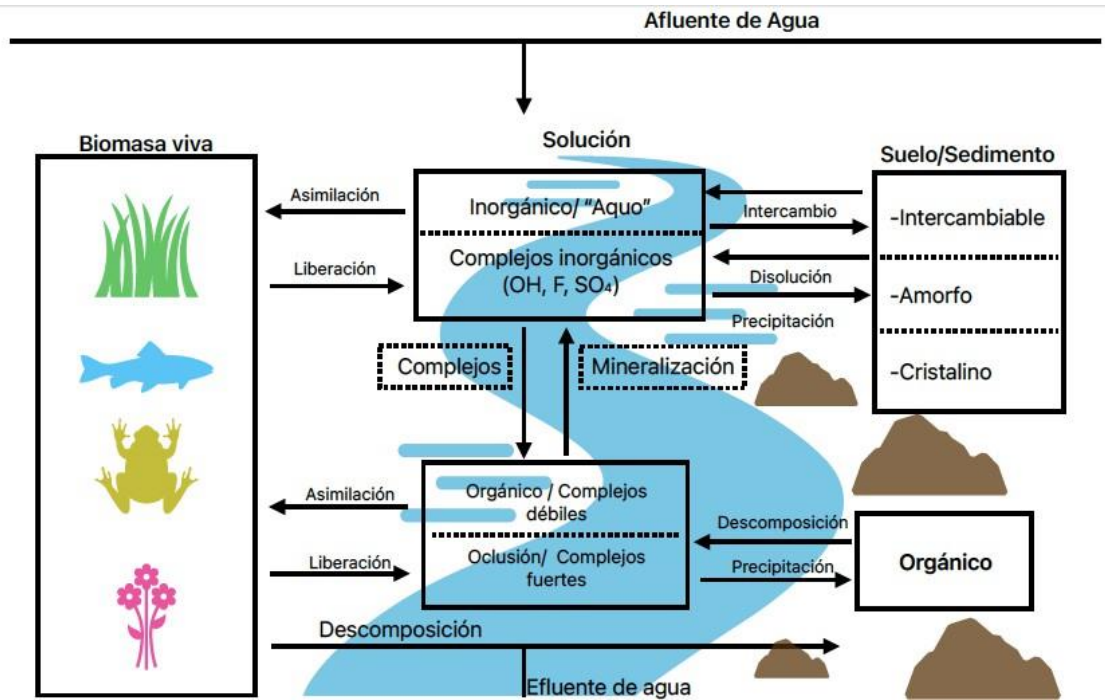


Fig. 1. Ciclo de vida del aluminio (Autoría propia).

4.2 Mecanismo de acción tóxica.

El aluminio hasta hace poco no era considerado un agente peligroso para el ambiente ya que en el medio una parte puede formar una aleación con silicatos formando aluminio-silicatos, cuando se encuentra disuelto, las sales de este metal pueden formar compuestos monoméricos hidroxilados que tienden a convertirse en partículas coloidales, que disminuyen su absorción, el cloruro de aluminio ($AlCl_3$) es utilizado en la industria petrolera como un catalizador además de ser utilizado en la industria textil, farmacéutica, cosmética, textil y en los procesos de clarificación y floculación en el tratamiento de purificación de agua, esta sustancia es corrosiva en piel y ojos además de causar problemas respiratorios. La intoxicación por $AlCl_3$ puede alterar el sistema musculoesquelético, el hígado, los riñones. Y el sistema respiratorio, la intoxicación puede ser diagnosticada analizando la concentración de los compuestos de aluminio en la sangre, cabello, orina o sudor. En los últimos años diversos estudios han comprobado que este metal es capaz de inducir respuestas tóxicas graves en organismos acuáticos (Bondy, 2010; Mite et al., 2023).

El Al en organismos acuáticos están relacionados con la alteración homeostática de iones esenciales: zinc, magnesio, potasio, calcio, hierro y cobre en los centros catalíticos de enzimas esenciales para mantener la homeostasis celular, además de

producir alteraciones iónicas y osmorregulatorias (Grassie et al., 2013; Wu J. et al., 2005) puede ocasionar agotamiento respiratorio como respuesta a daños branquiales (Voigt et al., 2015) a estos síntomas también se asocia al aumento en la mucosidad, hipoxia, acidosis metabólica, e hipercapnia (Allin & Wilson, 2000) debido a la deposición de precipitados insolubles en tejidos susceptibles. Aunado a ello, este metal forma complejos con grupos sulfhidrilo (SH), lo cual puede inducir un daño en el estado de estrés oxidativo en biomoléculas al aumentar las especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares a través de diversos mecanismos (Griffitt et al., 2008; Kumar & Gill, 2014; Maya et al., 2016a). En diversos estudios se ha explorado su función como neurotoxina, se ha corroborado que este metal tiene la capacidad de unirse a las enzimas que procesan la fenilalanina y tirosina hidroxilasas las cuales participan en mecanismos de síntesis de las catecolaminas, alterando con ello su liberación en el SNC y consecuentemente la respuesta de los organismos al estrés (Fernández-Dávila et al., 2012a; Sánchez-Iglesias et al., 2009a). Otro de los mecanismos más aceptados es la alteración en el equilibrio redox ya que se produce un constante aumento en el estrés oxidativo vinculado a las reacciones de Fenton (Ruipérez et al., 2012). Los efectos embriotóxicos causados por los metales son especialmente preocupantes, ya que pueden tener consecuencias duraderas para las poblaciones de peces y afectar potencialmente a toda la cadena alimentaria acuática (Li et al., 2023). Se han realizado importantes esfuerzos para identificar formas de contrarrestar el impacto perjudicial del aluminio en el desarrollo embrionario (Wang et al., 2023).

4.2.1 Ocurrencia del aluminio en el mundo

En México, la Norma Oficial Mexicana A NOM-127-SSA1-1994, 2017, indica que el límite permisible es de en agua potable es de 0.20 mg/L, aunque no está claro si existe un monitoreo continuo del contenido de aluminio en agua de pozos, en virtud de que no se consideraba un parámetro relevante para la salud pública (Vázquez et al., 2014).

Tabla 1. Ocurrencia de la presencia de aluminio en cuerpos de agua.

Fuente	Concentración determinada	País (región)	Autor (es)
Lago Adirondack	0.5 mg/L	USA (Nueva York)	Driscoll, 1980
Río Támesis	0.08 mg/L	Inglatera (Gloucestershire)	Sollars, 1980

Río Yorkshire	0.05 mg/L	Europa (Yorkshire)	Sollars, 1989
Río Támesis Río Goyt	0.27 mg/L 0.246 mg/L	Inglaterra Gloucestershire Mersey)	Comber et al., 2005
Río Magdalena	40 mg/L	Brasil (Huila)	Gazabón et al., 2013
Cuenca de río Fraser	617 μ g/L	Canadá (Pacífico)	Schindler, 2019
Lago Mackenzie	577 μ g/L	Canadá (Ártico)	Schindler, 2019
Laguna Quiulacocha	2.08 mg/L Sedimento* 6.29 mg/L	Perú (Pasco) Distrito. Simon Bolívar	Vizarreta et al., 2021

A continuación, se muestra un mapa con estas concentraciones ambientalmente relevantes alrededor del mundo en el que podemos observar cambios en el tiempo con respecto a los distintos lugares en la tabla (1) y (figura 2).

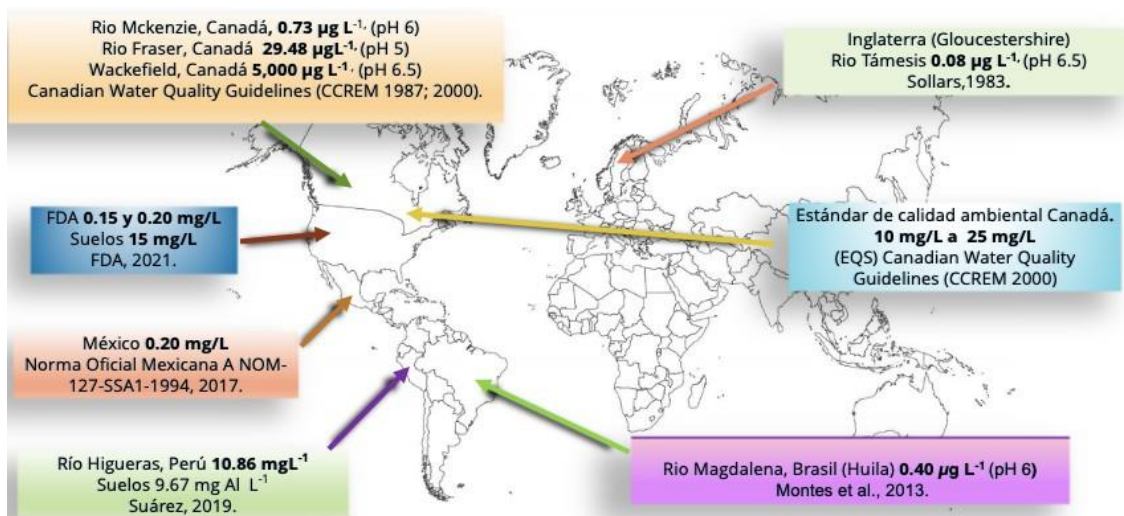


Fig. 2. Concentraciones ambientalmente relevantes (Autoría propia).

Una de las industrias silenciosamente más afectadas es la pesquera. La exposición a metales pesados ocasiona lesiones en hígado, los riñones y el cerebro, aunque las branquias son las primeras afectadas generando alteraciones iónicas regulatorias por la competencia entre el calcio y el aluminio por los sitios de absorción de la membrana celular, esencialmente relacionadas a la pérdida de sales plasmáticas, valores bajos de pH en el agua y altas concentraciones de Al, limitando la función respiratoria por daños morfológicos y funcionales (Rondon-Barragan et. al., 2007;

Santore et al., 2018). En la Tabla 2, se muestran las CL₅₀ obtenidas por la exposición AlCl₃ en distintas especies.

Tabla 2. CL₅₀ obtenidas para distintas especies de peces.

Concentración (CL50)	Especie	Hallazgos	País	Autores
50- 200 µg/L	Poecilia reticulata	Exposición por 48 horas. Daños morfológicos y reducción de la movilidad	Canadá	Gheorghiu, 2007
4 µg/L	Carassius auratus	Exposición por 48 horas, bioacumulación en branquias, piel e hígado	Colombia	Corpus, 2010
43-32 mg/L	Phoxinus phoxinus	Exposición por 76 horas, rango de toxicidad definitivo, reducción de movilidad y daño branquial	Colombia	Corpus 2010
125 µg/L	Oreochromis sp.	Exposición por 48 horas, muestra daño branquial y alteración morfológica	Ecuador	Samaniego Aguilar, 2015
100 µg/L	Danio rerio	Embriones expuestos durante 72h. Edema pericárdico y alteración de la frecuencia cardíaca.	USA	Monaco et al., 2017

4.2.2 Danio rerio como bioindicador.

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez teleosteo de agua dulce, que ha sido ampliamente utilizado en diversos estudios e investigaciones para evaluar la toxicidad; letalidad, embriotoxicidad y teratogenicidad así como estrés oxidativo entre otros, este modelo biológico resalta debido a sus características morfológicas y su genoma, el cual ha sido completamente secuenciado, este organismo se caracteriza por tener una alta tasa de fecundidad externa, tiene un tiempo de desarrollo corto comparado con otras especies que son usualmente utilizadas como bioindicadores, sus embriones son transparentes y su desarrollo embrionario es muy rápido en comparación con otros biomarcadores ampliamente utilizados para estudios toxicológicos, tiene una amplia practicidad en cuanto a su manipulación por su tamaño ya que ofrece ventajas prácticas mantenimiento y versatilidad además de ser un organismo de bajo costo. (Timme et al., 2018; Hassen et al., 2018; Min et al., 2023). Respecto al sistema nervioso y su desarrollo este biomarcador tiene un proceso de desarrollo bastante corto en comparación con otros organismos pues finaliza completamente a las 6 dpf además de conservar el sistema nervioso central y periférico al igual que los mamíferos (Chen et al., 2023). Debido a estas

características, los estudios científicos se ven favorecidos pues se vuelven más fáciles de realizar, permitiendo la detección de anomalías en el desarrollo y con ello su seguimiento morfológico, a nivel, molecular, celular y biológico (De Marco et al., 2022). *Danio rerio* no representa, además un problema bioético mientras la larva no sobrepasa los 120hpf según la Directiva, 2010/63/UE. Por otro lado, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) establecieron normas estandarizadas para el estudio de la toxicidad del pez cebra (OCDE 236, 2016).

El teleosteo ha sido empleado para estudiar varios agentes infecciosos relevantes para la industria acuícola, ya que el costo de las infecciones para la acuicultura puede ser muy elevado. Esto ha permitido comprender la biología de los patógenos, así como la respuesta inmune de los peces ante los cambios en el medio, por lo tanto, ha ayudado a mejorar el control de enfermedades; el desarrollo de vacunas, la detección de medicamentos y la evaluación de diversas formulaciones alimentarias que han sido evaluadas en el biomarcador y ya son investigaciones prometedoras que tienen una amplia aplicación generando impactos positivos en la práctica de la acuicultura (Lee-Esteves et al., 2018).

El pez cebra es un modelo eficaz en las pruebas de toxicidad, (Anandhan et al., 2013), expusieron a embriones de pez cebra a diferentes concentraciones de Al durante varias horas, encontrando daño branquial y edema pericárdico empleando concentraciones ambientales estableciendo que las concentraciones que prevalecen en los arroyos causan una reducción en el desarrollo y tasas de crecimiento, anomalías del desarrollo (escoliosis y osificación esquelética inhibida por el aluminio), reducción de supervivencia de los peces, especialmente al comienzo de alimentación exógena, en conclusión se sentó un precedente entre la evaluación basada en células y los ensayos con mamíferos (McGrath y Li, 2008).

4.2.3 Biomarcadores de estrés oxidativo

El estrés oxidativo puede definirse como la respuesta ante la exposición de uno o más organismos ante sustancias que puedan producir una alteración en el equilibrio redox, lo cual puede deberse a una deficiencia en las respuestas antioxidantes y un incremento excesivo en las especies reactivas de oxígeno (ROS) o nitrógeno (RNS) o una deficiencia en la defensa antioxidante. La exposición a aluminio es capaz de producir daños en las biomoléculas como: lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo

que se traduce como alteraciones estructurales y funcionales celulares, a nivel organoléptico es decir daño celular (Rodríguez et al., 2001; Ames et al., 1993). Las alteraciones causadas por la anomalía en el estrés oxidativo pueden ser estudiadas mediante un monitoreo biológico constante mediante la exposición a xenobióticos para conocer su impacto uno de estos organismos eficazmente empleados es *Danio rerio*, en este organismo podemos analizar diversos parámetros; parámetros bioquímicos, morfológicos y fisiológicos los cuales nos permiten identificar y clasificar el efecto causado por los agentes xenobióticos específicos (Arteaga et al., 2022; Magnarelli, 2015; Nguyen et al., 2020).

4.2.4 Estudios por exposición a AlCl_3

Zhang y colaboradores en el año 2018, analizaron la influencia de la exposición de cloruro de aluminio (AlCl_3) sobre la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) en pez cebra (*Danio rerio*). Se encontró una disminución significativa en la actividad locomotora durante la exposición a niveles subletales de aluminio lo cual indica que dichos niveles podrían modificar los parámetros de comportamiento del pez cebra y la actividad de la acetilcolinesterasa (AChE) cuando los peces se mantienen a un pH de 5.8. (Quiroga et al., 2021), determinaron el efecto genotóxico, citotóxico y embriotóxicos de la mezcla de aluminio y diclofenaco en concentraciones ambientalmente relevantes sobre *Cyprinus carpio* con el diclofenaco en concentraciones separadas, el Al por se empleó una concentración de 24.45 mg L⁻¹, una vez concluido el tiempo de exposición se disecaron hígado y branquias; concluyendo que el aluminio aumenta significativamente el daño hepático y produce un daño branquial extenso.

(Monaco et al., 2016) estudiaron la letalidad inducida por tres concentraciones distintas de AlCl_3 en embriones y larvas de pez cebra durante 72 h, las curvas de supervivencia mostraron que el AlCl_3 afecta a los embriones y la viabilidad de las larvas, después de cada tiempo de exposición. La mayor toxicidad fue observada con una concentración a 40, 25 y 16 mM. Adicionalmente se encontró edema pericárdico y alteraciones de la frecuencia cardíaca en un 50% de los ovocitos después de 48 h de exposición a 100 μM ; en larvas expuestas a la misma concentración, se identificaron lesiones neurológicas.

4.2.5 Propiedades biorremediadoras de okra (*Abelmoschus esculentus*)

Con la intención de aprovechar las propiedades de las plantas de manera integral, algunos investigadores evaluaron el poder floculante del mucílago de herbáceas de la familia Malvaceae entre ellas *A. esculentus*. (Beltrán et al., 2009) realizaron un estudio de floculación que involucró el empleo de coagulantes de origen vegetal en el tratamiento de aguas industriales y específicamente en la eliminación de tintes mientras que Solís y colaboradores (2012) utilizaron como agente coagulante sales de aluminio en el tratamiento de efluentes de diversa naturaleza. Los resultados demostraron que el mucílago de hibiscos requiere de menores cantidades para obtener la misma eficiencia de remoción de partículas suspendidas. Se han realizado estudios sobre la obtención de la goma de okra (*Abelmoschus esculentus*), la cual mostró la desestabilización de las suspensiones coloidales en polisacáridos compuestos, comparados con la eficiencia del cloruro férrico en aguas residuales textiles. (Freitas et. al., 2015).

4.2.6 Importancia y propiedades biológicas de la okra (*Abelmoschus esculentus*)

La "Okra" (*Abelmoschus esculentus*), L. Moench, es una hortaliza que pertenece una especie de la familia de las Malváceas del género Hibiscos. Fue identificada por Carlos Linneo (1753). es parte fundamental de la dieta en países como Ghana, tiene una superficie considerable de cultivo en África y Asia con un enorme potencial socioeconómico. (Agbenorhevi, et al., 2020).

La okra (*Abelmoschus esculentus* L.) este cultivo común en el continente asiático es muy resistente a factores como las bajas temperaturas, sequías y heladas ya que los cultivares de okra han adoptado determinados comportamientos en función de las condiciones climáticas en las que crecen (Ali, et al., 2023).

Fue introducida a América por esclavos africanos en el año 1600, sus semillas fueron usadas por los ejércitos del sur como sustitutas del café durante la guerra civil americana. En África Occidental y Central, la okra se conoce como gombo (francés), miyangro; Gumbo al Sur de USA. En Portugal y Angola se le llama Quiabo mientras que en Cuba "quimbombo". En Japón se le llama okura y, en Taiwan "qiu kui", (Abidi et al., 2023). En México la okra es una hortaliza no tradicional cuya producción oscila de 4 000 a 7 000 ha anuales y rendimiento medio de 10 t ha⁻¹, se destina para el mercado de exportación hacia Estados Unidos de América. En México, los

principales estados productores son Morelos, Michoacán, Guerrero y Tamaulipas, éste último aporta alrededor de 70% de la superficie nacional (Díaz et al., 2007). La superficie cultivada de Okra fluctúa entre 4 000 a 7 000 ha anuales, con un rendimiento promedio de 10 t por ha y una producción nacional de alrededor de 55 000 toneladas anuales, misma que es destinada al mercado de exportación a Estados Unidos. Es parte fundamental de la dieta en países de África y Asia, donde se le conoce como okra o gombo (Agbenorhevi, et al., 2020), posee propiedades fisicoquímicas que podrían potencialmente proporcionar una nueva fuente de pectina funcional para varias aplicaciones industriales (Datsomor et al., 2019)

El fruto de Okra se caracteriza por tener un alto contenido de K, Cu, Mg, Zn, Mn, vitaminas A, C, E, K y complejo B, posee además flavonoides, betacarotenos, lepidimoide del mucílago, que tiene múltiples funciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Cook et al., 2000). Se le han atribuido propiedades farmacológicas como efecto gastroprotector contra úlceras gástricas inducidas por etanol (Gurbuz et al., 2003). Actividad antimicrobiana contra cepas patógenas de *Rhodococcus erythropolis*, *Mycobacterium sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Xanthobacter* (De Carvalho et al., 2011). En 2019, Daliu et al., identificaron al ácido abscísico (ABA) como componente característico de la okra, el cual mostró efecto hipoglucemiante al evaluar la capacidad de absorción en el tracto intestinal mediante estudios in vitro en estadios gástrico y duodeno. En años recientes, se evaluó el efecto hepatoprotector de un extracto etanólico de okra en ratas expuestas a tetracloruro de carbono, donde los resultados sugieren que los compuestos fitoquímicos flavonoides, taninos, antraceno, esteroides y triterpenos, son los que producen un efecto antioxidante que protege al tejido hepático. (Alqasoumi, 2020). Este efecto fue corroborado por Nuhu et al., (2020) quienes demostraron que los extractos etanólicos de las variedades de los frutos de okra, ejercen un efecto hipolipidémico significativo, actividad hepatoprotectora y antioxidante, mostrando un comportamiento dosis-respuesta correspondiente a la presencia de quercetina, además de otros compuestos como betacarotenos, xanteína y luteína.

demostrado que tiene una buena aceptación organoléptica. Debido a su alto valor nutricional, se ha comprobado que *A. maxima* tiene efectos beneficiosos para la salud, por ejemplo, para contrarrestar afecciones intestinales o renales, diabetes respuesta inmune, favorece la eliminación de sustancias tóxicas, es utilizada después de tratamientos de radioterapia y quimioterapia. Así como es utilizada como

un alimento para combatir la mala nutrición, por lo que se considera a la espirulina como alimento funcional (Tarazona, 2018).

4.2.7 Generalidades y propiedades del alga espirulina (*Arthrospira maxima*).

El alga espirulina (*Arthrospira maxima*), es una microalga verde-azulada, es considerada en el reino procariota, ya que, aunque contiene clorofila y otros pigmentos, realizan fotosíntesis oxigénica. Es por esta razón que, a pesar de ser organismos procariotas, también se incluyen a las cianobacterias en este grupo es considerada un alimento funcional y es utilizada en productos farmacéuticos y suplementos alimenticios, en los últimos años el interés por esta microalga ha ido en incremento, así como sus diversos usos como un suplemento alimenticio tanto humano como para diversas especies animales en distintas etapas del desarrollo y estado de salud (Villota et al., 2018; Wang et al., 2023).

Salmean y colaboradores (2015), analizaron los aspectos nutricionales y toxicológicos de alga espirulina, la cual ofrece un perfil de aminoácidos de alto valor biológico. Además, de proveer ácidos grasos esenciales, tiene una alta densidad proteica contiene vitamina B12, es considerada una buena fuente de betacaroteno, hierro, calcio y fósforo, se ha comprobado que *A. maxima* tiene efectos beneficiosos para la salud, por ejemplo, para contrarrestar afecciones intestinales o renales, diabetes respuesta inmune, favorece la eliminación de sustancias tóxicas, es utilizada después de tratamientos de radioterapia y quimioterapia. Así como es utilizada como un alimento para combatir la mala nutrición, por lo que se considera a la espirulina como alimento funcional (Tarazona, 2018).

4.2.8 Espirulina como biorremediador y alimento funcional

Rincón et al., (2012) emplearon espirulina como sustituto proteico en la fabricación de harina de pescado para alimentar a alevines de tilapia roja en tres concentraciones distinta, encontrando que la dieta con una base de espirulina al 30% (porcentaje máximo utilizado), tuvo el mejor rendimiento con respecto a coloración y crecimiento. Abbas (2020), elaboró un alimento funcional para carpas (*Cyprinus carpio* L. 1758) mediante un estudio en el que se administraron diferentes concentraciones de espirulina para dar seguimiento del aumento de peso teniendo como resultado que al alimentar a la carpa común con una dieta de 100% espirulina, el peso medio final de las carpas aumento significativamente respecto a las otras

concentraciones del experimento incluso comparado con una dieta basada en alimento comercial. Murali et al., (2014) analizaron la capacidad de la cianobacteria espirulina para la remediación de los efectos contaminantes del aluminio en aguas residuales encontrando que la espirulina es una potente herramienta ecológica para el remedio de Al, por lo que la espirulina podría utilizarse para el tratamiento de aguas residuales industriales a través de la fitorremediación basada en espirulina como parte de la gestión ambiental.

Villota et al., (2018) compararon cepas de espirulina *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis* y *Chlorella vulgaris* con el objetivo de disminuir los niveles de nitratos, nitritos y fosfatos (NO₃⁻, NO₂⁻, PO₄⁻) de la laguna de Ubaque en Colombia para poder comprobar la capacidad depuradora de las cianobacterias. Se determinó que la biorremediación con microalgas es una alternativa viable para disminuir el nivel de eutrofización.

A continuación, se muestra en la tabla 3 la comparación entre los componentes nutricionales presentes en okra y espirulina respectivamente

Tabla 3. Componentes nutricionales presentes en okra y espirulina

Componente	Okra (<i>Abelmoschus esculentus</i>)	Espirulina (<i>Arthrospira maxima</i>)
Proteínas	2 g/100 g	54 g/100 g
Vitaminas	mg/100 g	mg/100 g
Provitamina A	0	12
Vitamina A	0.036	0
Tiamina B1	0.2	4
Riboflavina B2	0.21	3
Niacina B3	1	0.014
Vitamina B6	0	0.6
Cobalamina B12	0	0.2
Vitamina C	23	0
Vitamina E	0.027	6
Vitamina K	31.3	2
Ácido fólico	0	4.5
Ácido pantoténico	0	0.07
Biotina	0	0.005
Ácido palmítico	0	47
Ácido abscísico (ABA)	880	0

Minerales	mg/100 g	mg/100 g
Potasio	299	13
Sodio	3	0.45
Fósforo	51	0.05
Calcio	0.82	0.3
Magnesio	57	0.2
Fierro	57	0.04
Manganeso	9.5	0.005
Zinc	0.58	0.003
Cobre	10.3	0.0012
Cromo	0.12	0.28
Selenio	0.00064	0.01
Carbohidratos	7.6g	24g

Fuente: Kumar et al., 2013; Cohen, 1997; Sánchez et al., 2003; Ramirez et al., 2006.

5 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad los metales pesados son un problema mundial debido al riesgo sanitario e impacto ambiental que generan. La contaminación en los cuerpos de agua trae como consecuencia la disminución del número de individuos de las especies acuáticas y una serie de patologías en la población expuesta. El aluminio es ampliamente utilizado por la población y transformado por la industria química y empleado por la industria automotriz, farmacéutica, cosmética y alimentaria, entre otras, lo que genera una acumulación adversa para el ambiente. Es por ello la búsqueda de estrategias para coadyuvar la biorremediación de efluentes contaminados por este metal, así como estimulación del crecimiento de especies acuáticas de importancia económica a nivel mundial es de gran importancia. La espirulina es una microalga, rica en proteínas, vitaminas y minerales, conocida por sus ampliamente documentadas propiedades nutricionales, así como antioxidantes y antiinflamatorias (Zanell & Vianello 2023) La okra por otro lado es un fruto que de manera natural provee a los organismos de distintos nutrientes, alto contenido de antioxidantes, grasas, aminoácidos, minerales y fibra entre otros ha demostrado eficacia protectora en diversos modelos biológicos (Guebebia et al., 2023). Por lo que la sinergia entre las propiedades entre okra y espirulina podrían proteger a los organismos ante los daños producidos por el $AlCl_3$.

Por otro lado, esta malvácea se produce en Cahuitan Oax., una comunidad afro mestiza originaria en la que este cultivo es la única fuente de empleo de muchas

familias, por lo que se pretende utilizar la okra o "congo" que crece en este lugar, para apoyar con un respaldo científico sólido sobre sus beneficios en nuestro país. En el presente estudio se evaluará la embriotoxicidad y teratogenicidad del $AlCl_3$ empleando como bioindicador al pez cebra (*Danio rerio*), alimentado con una dieta funcional elaborada con okra y espirulina.

6 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la influencia de una dieta a base de okra (*Abelmoschus esculentus*) y espirulina (*Arthrospira maxima*) sobre la embriotoxicidad y teratogenicidad inducida por cloruro de aluminio ($AlCl_3$) en *Danio rerio*.

5.1.1 Objetivos específicos

1. Formular un alimento para peces (*Danio rerio*) a base de okra (*Abelmoschus esculentus*) enriquecido con alga espirulina (*Arthrospira maxima*).
2. Evaluar la embriotoxicidad inducida por $AlCl_3$ en *Danio rerio* alimentado con una dieta a base de okra y espirulina.
3. Determinar el índice teratogénico (CL_{50}/CE_{50}) inducido por $AlCl_3$ sobre *Danio rerio* alimentado con una dieta funcional a base de okra y espirulina.
4. Evaluar y cuantificar las malformaciones estructurales y cardiológicas, producidas por la exposición a $AlCl_3$.

7 METODOLOGÍA

6.1.1 Materiales biológicos

Se utilizó el estándar de cloruro de aluminio (99%, $AlCl_3$).

El alga espirulina (*Arthrospira maxima*) se obtuvo de Spiral Spring, ubicada en Puebla, México.

6.1.2 Obtención de okra (*Abelmoschus esculentus*).

Las muestras de *Abelmoschus esculentus* fueron obtenidas de la comunidad de Cahuitan (Oaxaca, México) de la cosecha anual (febrero - marzo 2021). Esta comunidad Afromestiza se ubica en el municipio de Cuajinicuilapa, Guerrero (Fig.3), en el límite entre los estados de Guerrero y Oaxaca en México, tiene una población actual de 92 habitantes (INEGI, 2022), sus actividades económicas principales son: la pesca, la siembra de okra y su comercio y los programas de apoyo a las actividades de conservación de tortuga Laúd de Semarnat (Secretaría de Desarrollo

Social, 2018). Las muestras se deshidrataron, pulverizaron y reservaron a temperatura ambiente y en obscuridad hasta su empleo (Fig.4).

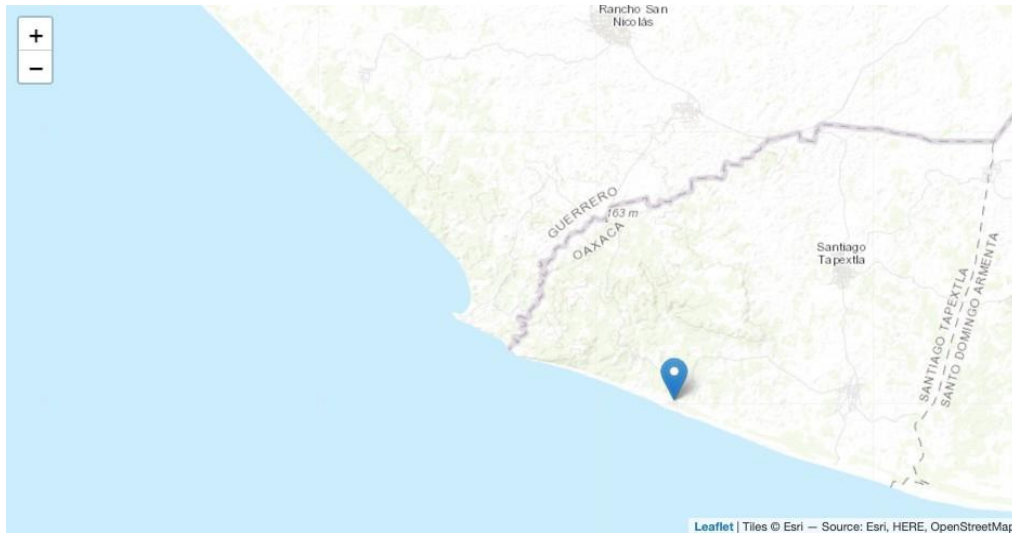


Fig.3. Ubicación de la comunidad de Cahuitan Oax. México, coordenadas: 65 ha; 16°17'N 098°29'W



Fig.4. Proceso de obtención de okra (fotos de autoría propia).

6.1.3 Formulación del alimento funcional

Debido a que se carece de estudios sobre la alimentación de *Danio rerio*, se propuso una formulación con base a proteínas de alta calidad, Okra, alga espirulina, un premix de vitaminas y minerales, en comparación con un alimento comercial. Se adquirieron peces cebras madurez sexual (3.5 ± 0.5 cm de longitud) de un proveedor comercial libres de infección y enfermedad. Se mantuvieron bajo un periodo de aclimatación por 60 días previos a la experimentación, se mantuvieron en acuarios con una capacidad de carga recomendada de 2L de agua por pez, en peceras de 40 L a temperatura de $27 \pm 1^\circ C$ y un pH de 7.2 - 7.6 con saturación de oxígeno mayor al 60%, separados machos de hembras, con un fotoperíodo natural. Se

proporción de hojuela comercial para el grupo control, okra-espirulina para el grupo 1 y okra para el grupo 2 hasta el desove. Se realizaron limpiezas y recambios de agua cada tercer día (OECD, 2016)

6.1.3.1 Colecta de ovocitos y mantenimiento de progenitores de *D. rerio*

6.1.3.2 Aclimatación de organismos a dosis de AlCl_3

Se formaron dos grupos de 15 organismos de cada género en el siguiente orden: Grupo testigo alimentado con hojuela comercial para peces. Grupo alimentado con la dieta a base de Okra enriquecida con alga espirulina. Los peces fueron alimentados dos veces al día, considerando el equivalente del 4% de su peso corporal durante 60 días previos a la exposición a AlCl_3 . Los peces fueron distribuidos aleatoriamente en acuarios de vidrio de 40L litros, 18 especímenes por cada uno. El experimento se llevó a cabo en un sistema de flujo continuo.

6.1.3.3 Producción de ovocitos y fecundación

Los huevos de pez cebra se produjeron en tanques de desove individuales, en los cuales se colocaron los grupos de desove por tratamiento y hembras/machos (previamente sexados y aislados) en una proporción de 2 a 1 respectivamente en tres recipientes de desove individuales de temperatura de $27 \pm 1^\circ \text{C}$. El tanque de desove se colocó unas horas antes del inicio de la oscuridad un día anterior a la prueba (a las 17 horas del día), cada uno con 10 L con agua de grifo de clorada reconstituida con sales comerciales (1 mL/L).

6.1.3.4 Recolección de ovocitos

Para evitar la depredación se colocaron cajas de malla de 0.5 cm de poro dentro de las maternidades. El apareamiento, el desove y la fertilización sucedieron dentro de los 30 minutos posteriores al inicio de la luz, las trampas de desove se eliminaron cuidadosamente para recolectar los huevos por medio de succión y se enjuagaron con solución fisiológica después de la recolección (OECD, 2013).

Los ovocitos se recolectaron de forma aleatoria y fueron observados bajo estereomicroscopio para separar los ovocitos viables y no viables. Los embriones fertilizados estaban en etapa de blástula ya que esta etapa representa una tasa de fertilización $\geq 90\%$, conforme a la metodología de Kimmel et al., (1995).

8 Pruebas de toxicidad

7.1.1.1 Exposición a AlCl_3

Para evaluar la exposición a AlCl_3 durante el desarrollo embrionario y efectos teratogénicos en *Danio rerio* se utilizó la guía No. 236 "Prueba de toxicidad aguda de embriones de pescado (FET)", 2013 de la OCDE. Siguiendo la guía, se colocaron 3 placas de 24 pozos por cada concentración para cada grupo de estudio (okra-espirulina, espirulina y alimento comercial) con 30 embriones de manera aleatoria, con 2 mL de la solución de AlCl_3 en concentraciones que fueron de 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 8000 $\mu\text{g L}^{-1}$, es decir: 1500 $\mu\text{g L}^{-1}$, 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$, 2500 $\mu\text{g L}^{-1}$, 3000 $\mu\text{g L}^{-1}$, 3500 $\mu\text{g L}^{-1}$, 4000 $\mu\text{g L}^{-1}$, 4500 $\mu\text{g L}^{-1}$, 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$, 5500 $\mu\text{g L}^{-1}$, 6000 $\mu\text{g L}^{-1}$, 6500 $\mu\text{g L}^{-1}$, 7000 $\mu\text{g L}^{-1}$, 7500 $\mu\text{g L}^{-1}$, 8000 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, tomando en cuenta concentraciones ambientalmente relevantes (Tabla 1), mientras el grupo control, se mantuvo libre de la exposición al metal. Las placas se mantuvieron a temperatura de 27° C y fotoperiodos de luz/obscuridad. A las 96 horas posterior a la fertilización, se registraron los embriones supervivientes y muertos. Se calcularon: 1) el porcentaje de mortalidad para construir una curva de dosis-mortalidad y 2) la concentración letal media (CL50). El registro de las malformaciones observadas durante el desarrollo embrionario se evaluó a las 12, 24, 48, 72, 96 h de exposición, considerando las características morfológicas de los embriones en comparación con los embriones testigos o de referencia conforme lo propuesto por Kimmel et al., (1995) se tomaron distintas fotografías para su posterior descripción y cotejo. Para considerar validez de la prueba, los controles no mostraron más del 10% de los efectos teratogénicos a las 96 horas posteriores a la fertilización.

Las características para evaluar recibieron una puntuación basándose en las consideraciones por Hermesen et al., (2011). La concentración efectiva media de malformaciones (CE50) se calculó mediante un análisis de regresión lineal. Tanto la CL50 como la CE50, con un límite de confianza del 95%. Las pruebas se realizaron por triplicado.

7.1.1.2 Evaluación del efecto teratogénico inducido por el AlCl_3

El conteo de las malformaciones y los efectos teratogénicos se registraron: presente o ausente en cada tiempo de corte (12, 24, 48, 72, 96, 120 hpf). Se observaron todos los organismos en busca de cualquiera de las siguientes malformaciones reportadas en pez cebra: edema pericárdico, edema del saco vitelino, edema ocular, malformación de la cabeza, malformación de otolitos, malformación de cola,

malformación de corazón, estructura de cuerda modificada (escoliosis) y raquisquis (Hermsen et al., 2011).

7.1.1.3 Índice teratogénico (IT)

El índice teratogénico (IT) se determinó calculando el cociente de la CL50 y la CE50. Si el IT correspondiera a un valor mayor a 1, entonces se consideró que el AlCl_3 es teratogénico, mientras que, si fuese menor a 1, se evidenciaría un efecto embrioletal (Weigt et al., 2011).

7.1.1.4 Análisis estadístico

Los datos se analizaron empleando una ANOVA unidireccional, seguido de una comparación múltiple para analizar los datos homogéneos de las variables continuas. Se empleó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para analizar datos no homogéneos. Por último, se aplicaron Pruebas exactas de Fisher para la frecuencia de ovocitos o embriones anormales ($p < 0.05$). Esto mediante el programa estadístico Probit.

7.1.2 Estrés oxidativo

El desbalance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la defensa antioxidante que se ve superada, esto trae como consecuencia una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales ocasionan deterioro y muerte celular (Vidya et al., 2017). El EO es un estado alterado de la homeostasis intracelular de óxido-reducción, esto significa la existencia de un desbalance entre sustancias prooxidantes y las defensas antioxidantes tanto endógenas como exógenas. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de ERO's y/o por la deficiencia en los mecanismos antioxidantes (Xiong, 2011), teniendo como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado, pudiendo generar con ello daño celular (Venero, 2002).

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

microsegundos) (Rendón, 2005; Boots et al., 2008; Mitjavila et al., 2012). Una de las principales características de los RL es que debido a su inestabilidad tienden a iniciar reacciones en cadena, reacciones auto propagadoras, en las cuales un radical reactivo origina un producto que también posee cierto grado de inestabilidad (reactividad) y que a su vez reacciona para producir más radicales. Este tipo de reacciones se componen de tres fases principales, iniciación generada a partir del contacto de un RL con una molécula oxidable, propagación en "Evaluación de la influencia de glicósidos de steviol sobre las características fisicoquímicas y texturales de la carne y estrés oxidativo en carpa común (*Cyprinus carpio*)" la cual se generan especies radicales a partir de la oxidación de las moléculas y una última fase, terminación, en la cual dos compuestos radicales reaccionan entre sí para generar una especie no radical (Casado, 2006).

Los RL, compuestos electrofílicos que se forman in vivo dentro de la célula son altamente oxidantes, poseen la capacidad de oxidar macromoléculas biológicas nucleofílicas como carbohidratos, aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos produciendo con ello alteraciones estructurales y/o funcionales que en casos extremos pueden llevar a la muerte celular (Venero, 2002). Los RL tienen la propiedad de reaccionar con una gran variedad de especies químicas, ya que participan en un amplio rango de funciones biológicas, en especial en la señalización celular (NO.), muerte celular programada (apoptosis), proliferación celular, diferenciación celular, metabolismo, reacciones inflamatorias, enzimología (unidos a proteínas en el mecanismo de una variedad de reductasas, peroxidasas, catalasas y oxidasas) (Casado, 2006; Konigsberg, 2008; Quintanar & Calderón, 2009). Los RL más importantes de las células aerobias son el oxígeno singulete, el anión súper óxido, los radicales de hidroxilo y los metales de transición (Venero, 2002). Por su importancia biológica los radicales libres se pueden clasificar en (Rendón, 2005; Quintanar & Calderón, 2009) Especies reactivas de oxígeno: Oxígeno molecular (O_2), oxígeno singulete (O_2^1) y ozono (O_3), así como especies parcialmente reducidas, anión superóxido (O_2^-), radical hidroperoxilo ($HO_2^.$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($.OH$). Dichas especies se generan a partir de la ruptura y/o excitación del oxígeno molecular y por su naturaleza altamente electrofílica son más reactivos que este. B) Metales de transición: los metales de transición como (Fe, Mn, Co, Ni y Cu) poseen la característica de alcanzar la estabilidad por si mismos sin reaccionar con otro elemento.

7.1.2.1 Determinación del grado de lipoperoxidación

La determinación de LPX se realizó mediante el método de Buege y Aust (1979). Se tomaron 100 mL de sobrenadante y se completaron a 1 mL con la solución amortiguadora Tris-HCl pH 7.4, se incubó 37°C durante 30 min, se agregaron 2 mL del reactivo TCA-TBA (ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.375 % en ácido tricloroacético (TCA) al 15 %) y se agitaron en un vórtex. Posteriormente se calentaron a ebullición durante 45 min, se dejaron enfriar y se removió el precipitado por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. Se determinó la absorbancia de la muestra a 535 nm contra un blanco de reactivo. Se calcularon la concentración de MDA por medio de su coeficiente de extinción molar ($1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

7.1.2.2 Determinación del contenido de proteínas carboniladas

Se realizó utilizando el método Levine et al. (1994). Las proteínas solubles se obtuvieron por centrifugación de las muestras a 12500 rpm durante 15 min a -4°C. A 100 μL de este sobrenadante se añadieron 150 μL de 10mM DNPH/2M HCl, antes de la incubación a temperatura ambiente durante 1 h en la oscuridad. Posteriormente, se le adicionaron 500 μL de ácido tricloroacético 20% y se dejó reposar (15 minutos a 4 °C). A continuación, ésta se centrifugó 11000 rpm durante 5 min. El botón se enjuaga tres veces con etanol-acetato de etilo 1:1, se disolvió 1 mL de una solución de 6M guanidina pH 2.3 y se incubó a 37°C durante 30 minutos. La absorbancia se leyó a 366 nm y los resultados se expresaron en mM o nM de carbonilos reactivos (C=O) /mg proteínas, sobre la base de el coeficiente de extinción molar de $21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

7.1.2.3 Determinación de la actividad del superóxido dismutasa

La determinación de la actividad de la SOD se realizó mediante el método de Misra y Fridorich, 1972. Se adicionaron 40 μL del sobrenadante a una celda de 1 cm, se agregaron 260 μL de la solución amortiguadora de carbonatos (50 mM de carbonato de sodio y 0.1 mM de EDTA) a pH 10.2 y 200 μL de adrenalina 30 mM. Se determinó la absorbancia a 480 nm a los 30 s y 5 min. La actividad de la SOD se determinó por medio del su coeficiente de extinción molecular ($21 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

7.1.2.4 Determinación de la actividad de la catalasa

La determinación de la actividad de la CAT se realizó mediante el método de Radi et al., (1991). Se tomaron 20 mL del sobrenadante y se le agregara 1 mL de la solución amortiguadora de aislamiento (0.3 M de sacarosa, 1 mM de EDTA,

5 mM de HEPES y 5 mM de KH₂PO₄) y 0.2 mL de la solución de peróxido de hidrógeno 20 mM, se determinó la absorbancia a 240 nm, a 0 y 60 s. Los resultados se obtuvieron sustituyendo la absorbancia de ambos tiempos en la siguiente fórmula: (Concentración de catalasa = (A0 - A60)/CEM). Donde el CEM del H₂O₂ equivale a 0.043 mM⁻¹ cm⁻¹; los datos se expresaron en mM de H₂O₂ min⁻¹ g de tejido húmedo⁻¹.

9 RESULTADOS

9.1 Análisis bromatológico

El análisis bromatológico (tabla 1) realizado en el laboratorio de Servicios externos de la Facultad de Química UAEMéx, siguiendo las normativas NOM-116-55A1-1994; NMIGF-607-NORMEX-2013; NMX-F-615-NORMEX-2004; INMX-F-608- NORMEX-2011; NMX-F-613-NORMEX-2003; mostro una mayor cantidad de proteínas (62.85) comparado con las cantidades presentes tanto en okra como en espirulina, un contenido de 9.85g de carbohidratos, los cuales son mucho menores si los comparamos con la cantidad de proteínas, respecto a la fibra dietética tenemos un contenido de 2.02g y 13.16g de vitaminas y minerales lo cual comparado con los datos sobre los nutrientes presentes en okra y espirulina resultan una importante fuente de nutrientes disponibles para el bioindicador *Danio rerio* (USDA, data base entry. 2019; Cohen).

Tabla 4. Comparativo del análisis bromatológico vs, perfil nutrimental de okra (*Abelmoschus esculentus*) y espirulina (*Arthrospira máxima*).

Componente	Hojuela comercial LOMAS (g/100g)	Okra b.h (g/100g)	Espirulina b.s (g/100g)	Okra-espirulina b.s (g/100g)
Proteínas	42	2.0	54.0	62.8
Carbohidratos	36	7.5	17.8	9.8
Fibra dietética	2.0	3.3	7.7	2.0
Vitaminas	12.0	(mg/100g)	(mg/100g)	13.2

Folato (B9)		60	0
Vitamina A		0.036	0
Tiamina B1		0.2	4
Vitamina C		23	0
Vitamina E		0.027	6
Vitamina K		31.3	2
Magnesio		57	0.2
Fierro		57	0.04
Manganeso		9.5	0.005
Zinc		0.58	0.003
Cobre		10.3	0.0012
Selenio *		0.00064	0.01

9.2 Biomarcadores de oxidación celular y actividad antioxidante.

9.2.1 Resultados de actividad de superóxido dismutasa (SOD).

En la Figura.5, se muestra la actividad antioxidante de la enzima SOD presente en los tres grupos de estudio, se observó una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los grupos alimentados con hojuela comercial, espirulina y okra espirulina a las 72 y 96 horas respectivamente. La actividad de SOD aumentó significativamente respecto al aumento en la concentración de $AlCl_3$ en los tres grupos, la mayor concentración se observó a las 96 horas en los tres grupos aunque se observó un notable aumento en el grupo alimentado con hojuela comercial.

9.2.2 Resultados de la actividad de lipoperoxidación (LPX).

En la Fig. 6 se puede observar que en las muestras expuestas a las diferentes concentraciones de $AlCl_3$ la actividad antioxidante (LPX) va en aumento con respecto a la concentración, con una diferencia significativa entre el grupo hojuela comercial con respecto a los grupos espirulina y okra- espirulina respectivamente. La mayor concentración se presentó en el grupo hojuela comercial a las 96 horas.

9.2.3 Resultados de la actividad de catalasa (CAT).

En la Fig.7 se puede observar que en las muestras expuestas a las diferentes concentraciones de $AlCl_3$ la actividad antioxidante de la enzima CAT va en aumento con respecto a la concentración, con una diferencia significativa entre el grupo hojuela comercial con respecto a los grupos espirulina y okra- espirulina respectivamente. La mayor concentración se presentó en los tres grupos evaluados a las 96 horas de exposición.

9.2.4 Contenido de proteínas carboniladas (POX)

En la Fig.8. se puede observar que en las muestras expuestas a las diferentes concentraciones de $AlCl_3$ la actividad antioxidante de la enzima CAT va en aumento con respecto a la concentración, con una diferencia significativa entre el grupo hojuela comercial con respecto a los grupos espirulina y okra- espirulina respectivamente. La mayor concentración se presentó en los tres grupos evaluados a las 96 horas de exposición.

9.2.5 Contenido de hidroperóxidos (HPX)

En la Fig.9. se aprecia el aumento del contenido de hidroperóxidos el cual aumento con respecto a la concentración y las horas de exposición, encontrando un contenido mayor a las 96 horas en los tres grupos, este aumento también es notable con respecto a los grupos; existe mayor concentración en el grupo de hojuela comercial, seguido del grupo espirulina y por último el grupo de okra- espirulina.

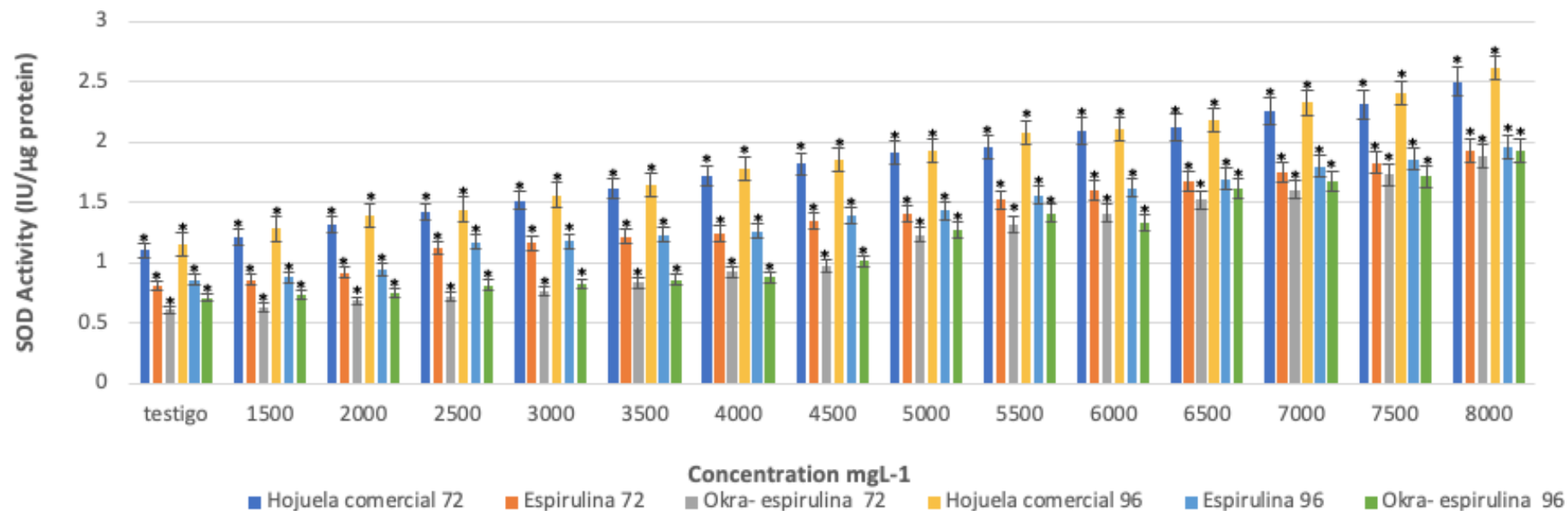


Fig.5.Evaluación de la actividad enzimática superóxido dismutasa (SOD). Prueba ANOVA, Tukey HSD y Dunnett ($p < 0,05$).

Donde se encontró:

- A) Diferencia significativa con respecto al grupo de hojuela comercial a las 72 y 96 horas.
- B) Diferencia significativa con respecto al grupo Espirulina a las 72 y 96 horas.
- C) Diferencia significativa con respecto al grupo Okra- Espirulina a las 72 y 96 horas.
- D) Diferencia significativa entre el grupo Espirulina y Okra- Espirulina a las 72 y 96 horas.

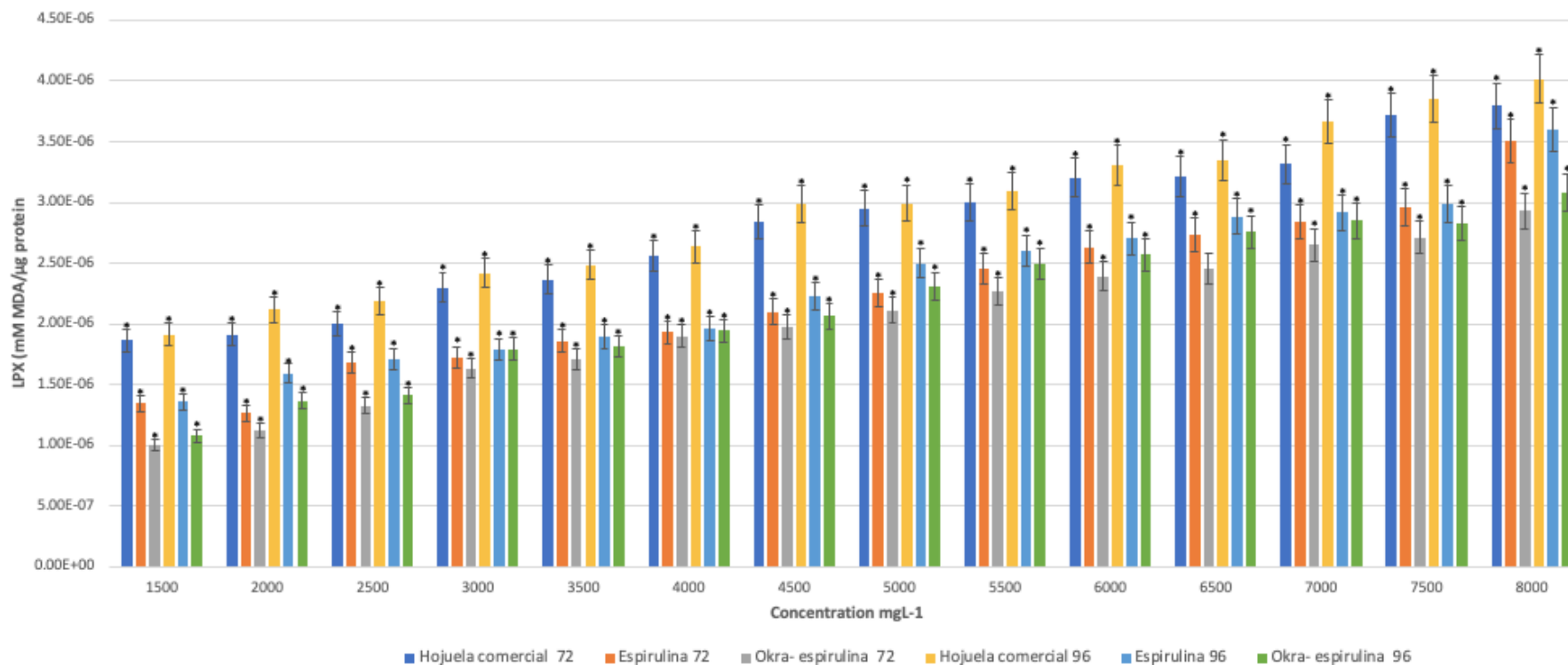


Fig.6.Niveles de lipoperoxidación (LPX) Prueba ANOVA, Tukey HSD y Dunett ($p < 0,05$).

Donde se encontró:

- A) Diferencia significativa con respecto al grupo de hojuela comercial a las 72 y 96 horas.
- B) Diferencia significativa con respecto al grupo Espirulina a las 72 y 96 horas.
- C) Diferencia significativa con respecto al grupo Okra- Espirulina a las 72 y 96 horas.
- D) Diferencia significativa entre el grupo Espirulina y Okra- Espirulina a las 72 y 96 horas.

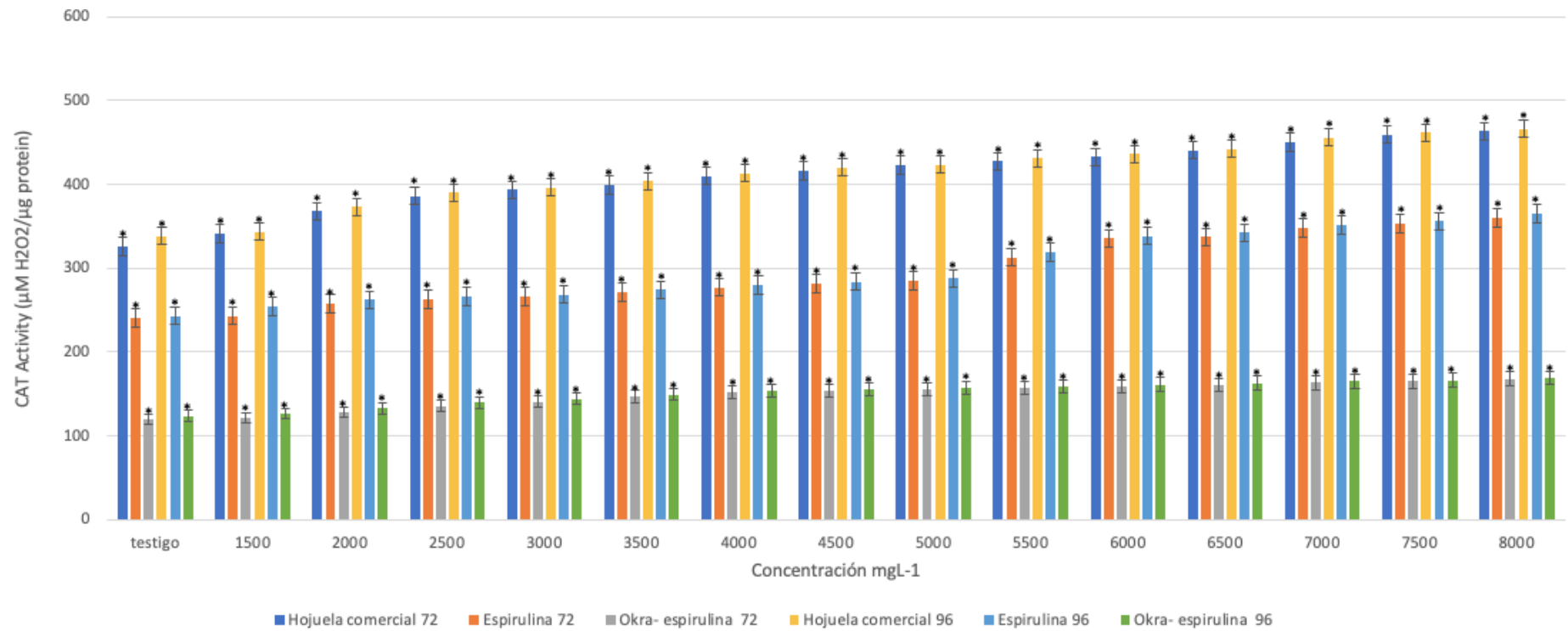


Fig.7.Evaluación de la actividad enzimática catalasa (CAT). Prueba ANOVA, Tukey HSD y Dunett ($p < 0,05$).

Donde se encontró:

- A) Diferencia significativa con respecto al grupo de hojuela comercial a las 72 y 96 horas.
- B) Diferencia significativa con respecto al grupo Espirulina a las 72 y 96 horas.
- C) Diferencia significativa con respecto al grupo Okra- Espirulina a las 72 y 96 horas.
- D) Diferencia significativa entre el grupo Espirulina y Okra- Espirulina a las 72 y 96 horas.

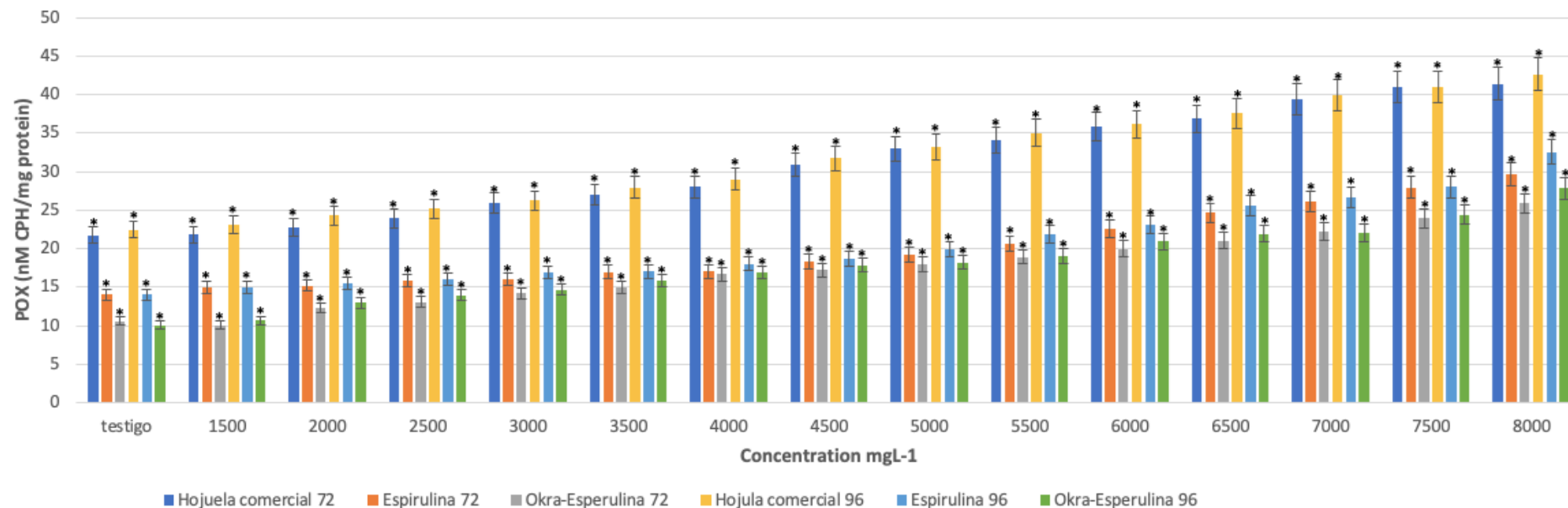


Fig.8. Niveles de proteínas carboniladas (POX). Prueba ANOVA, Tukey HSD y Dunett ($p < 0,05$).

Donde se encontró:

- A) Diferencia significativa con respecto al grupo de hojuela comercial a las 72 y 96 horas.
- B) Diferencia significativa con respecto al grupo Espirulina a las 72 y 96 horas.
- C) Diferencia significativa con respecto al grupo Okra- Espirulina a las 72 y 96 horas.
- D) Diferencia significativa entre el grupo Espirulina y Okra- Espirulina a las 72 y 96 horas.

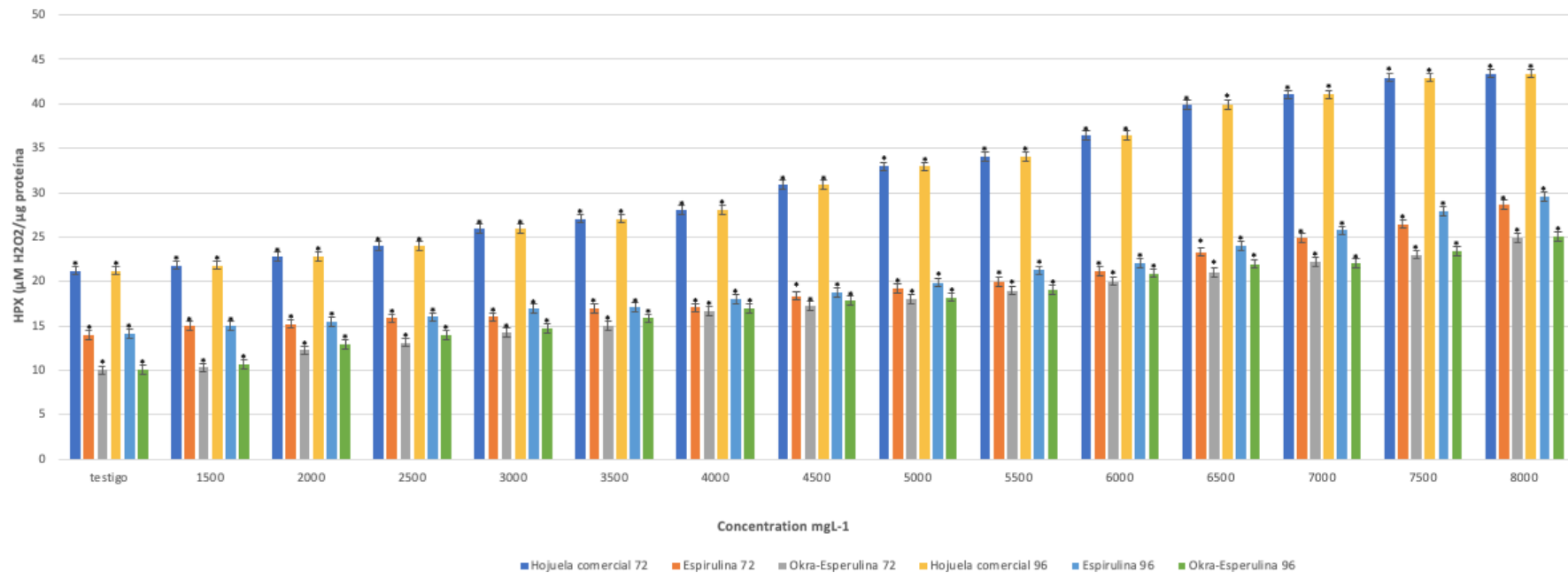


Fig.9.Contenido de hidropéroxidos (HPX) Prueba ANOVA, Tukey HSD y Dunett ($p < 0,05$).

Donde se encontró:

- A) Diferencia significativa con respecto al grupo de hojuela comercial a las 72 y 96 horas.
- B) Diferencia significativa con respecto al grupo Espirulina a las 72 y 96 horas.
- C) Diferencia significativa con respecto al grupo Okra- Espirulina a las 72 y 96 horas.
- D) Diferencia significativa entre el grupo Espirulina y Okra- Espirulina a las 72 y 96 horas.

9.3 Resultados embrioletalidad y teratogénesis

9.4 Desarrollo embrionario

Los organismos sin exposición a $AlCl_3$ mostraron un crecimiento normal con respecto a la escala de (Kimmel, 1995), el grupo okra-espirulina tuvo algunas eclosiones a las 72 horas a diferencia del grupo control el cual, no mostro ninguna eclosión acelerada, los ovocitos del grupo espirulina mostraron una eclosión promedio acelerada (72h) incluso algunos a las 48hrs. Con respecto a los ovocitos viables tenemos que la formulación okra- espirulina mostro más del doble de ovocitos viables (1029) que el control (489), los ovocitos totales del grupo alimentado con espirulina fueron (750), mucho mayor que el grupoalimentado con hojuela comercial.

Tabla 5. Desarrollo embrionario, respecto a las horas de observación/exposición a $AlCl_3$ en el grupo alimentado con hojuela comercial.

Influencia de una dieta a base de okra (*Abelmoschus esculentus*) y espirulina (*Arthrospira maxima*) sobre la embriotoxicidad y teratogenicidad inducida por cloruro de aluminio ($AlCl_3$) sobre *Danio rerio*.

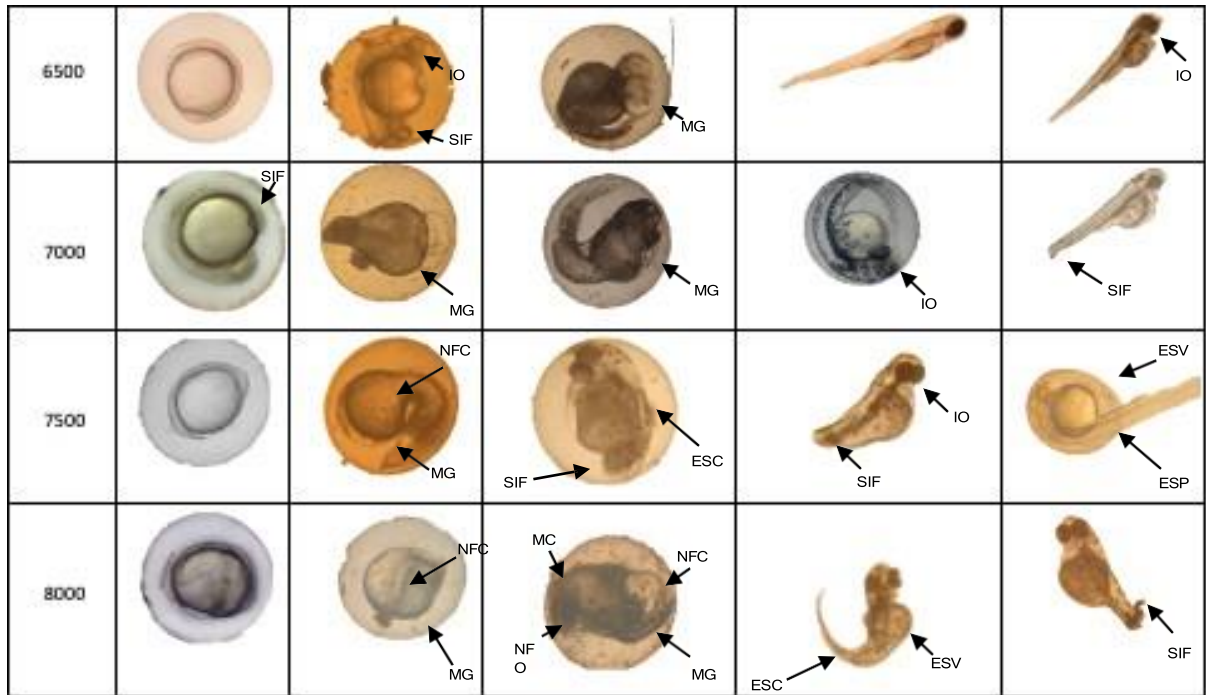
Hora Concentración (µg L ⁻¹)	12 hpf	24hpf	48 hpf	72 hpf	96hpf
Control					
1500					
2000					
2500					
3000					
3500					
4000					
4500					
5000					
5500					

6000					
6500					
7000					
7500					
8000					

MG = malformación general RE = retraso en la eclosión; NFO = no formación de ojos; NFC= no formación de cola HE= hemorragia; MC= malformación de la cabeza; HIP = hipopigmentación; MSV = malformación del saco vitelino; EP = edema pericárdico; ESP= eclosión prematura; ESC = escoliosis; MCO = malformación de la cola; SF= sifosis DSV = deformación del saco vitelino; ESV = edema del saco vitelino.

Tabla 6. Desarrollo embrionario, respecto a las horas de observación/ exposición a $AlCl_3$ en el grupo alimentado con la formulación de espirulina.

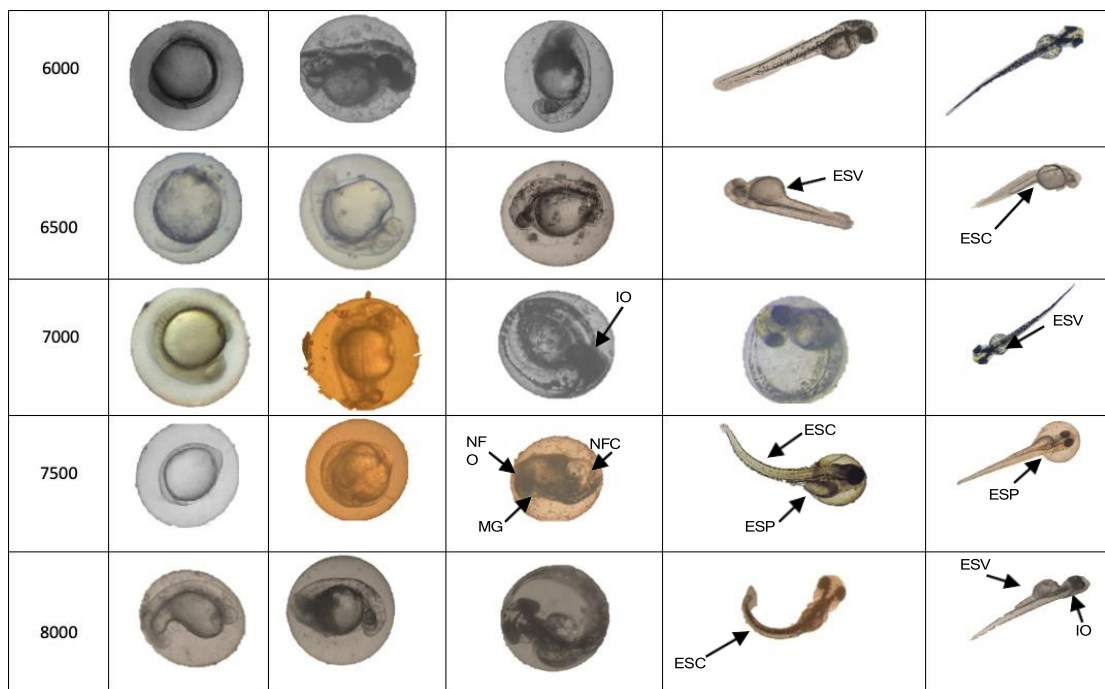
Hora Concentración (µg L ⁻¹)	12 hpf	24hpf	48 hpf	72 hpf	96hpf
Control					
1500					
2000					
2500					
3000					
3500					
4000					
5500					
6000					



MG = malformación general RE = retraso en la eclosión; NFO = no formación de ojos; NFC= no formación de cola HE= hemorragia; MC= malformación de la cabeza; HIP = hipopigmentación; MSV = malformación del saco vitelino; EP = edema pericárdico; EP = eclosión prematura; ESC = escoliosis; MCO = malformación de la cola; SF= sifosis DSV = deformación del saco vitelino; ESV = edema del saco vitelino.

Tabla 7. Desarrollo embrionario, respecto a las horas de observación/ exposición a $AlCl_3$ en el grupo alimentado con la formulación okra- espirulina.

hora Concentración ($\mu g L^{-1}$)	12 hpf	24hpf	48 hpf	72 hpf	96hpf
Control					
1500					
2000					
2500					
3000					
3500					
4000					
4500					
5000					
5500					



MG = malformación general RE = retraso en la eclosión; NFO = no formación de ojos; NFC= no formación de cola HE= hemorragia; MC= malformación de la cabeza; HIP = hipopigmentación; MSV = malformación del saco vitelino; EP = edema pericárdico; EP = eclosión prematura; ESC = escoliosis; MCO = malformación de la cola; SF= sifosis DSV = deformación del saco vitelino; ESV = edema del saco vitelino.

9.5 Teratogenicidad

Se observaron varias malformaciones en los tres grupos, las cuales fueron en aumento con respecto a las concentraciones de exposición, la cantidad de malformaciones observadas en el grupo alimentado con hojuela comercial es mayor que con respecto a los grupos alimentados con espirulina y okra-espirulina, el grupo espirulina mostro malformaciones, aunque de menor gravedad comparadas con las encontradas en el grupo alimentado con okra-espirulina Las malformaciones más frecuentes fueron; no formación de ojos, cola y cabeza, escoliosis, sifosis, edema pericárdico, edema de saco vitelino y hemorragia. Las alteraciones de eclosión, malformación de la cola, edema pericárdico, deformación de la cabeza,

hipopigmentación, edema pericárdico, ausencia de aleta pectoral y de protuberancia bucal fueron los trastornos más comunes detectados para la mezcla, en cuyo caso las malformaciones fueron múltiples y relativamente más graves en comparación con las formas aisladas, poniendo en riesgo la vida de los embriones (Fig.5).

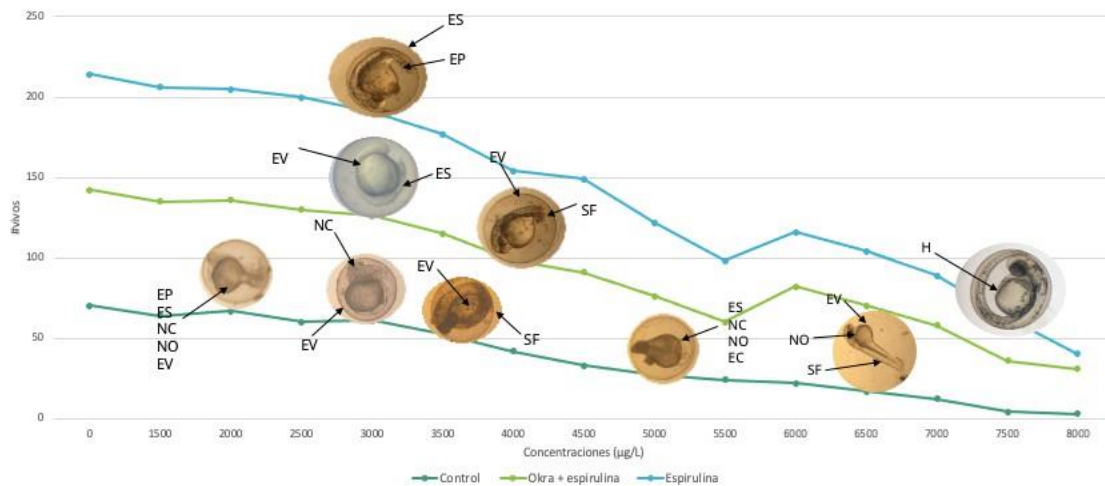


Fig.5. Teratogenicidad inducida por $AlCl_3$ sobre *Danio rerio* a las 48 horas respecto a cada grupo de estudio, edema pericárdico (EP), escoliosis (ES), no formación de cola (NC), no formación de ojos (NO), edema en saco vitelino (EV), hemorragia (H). Los datos fueron expresados en $x \pm \sigma$. $n=3$.

9.6 Embrioletalidad

La embrioletalidad fue visiblemente mayor en el grupo alimentado con hojuela comercial que con respecto a los grupos okra-espirulina y espirulina, la menor cantidad de ovocitos muertos se encontró en el grupo okra-espirulina (Fig.2)

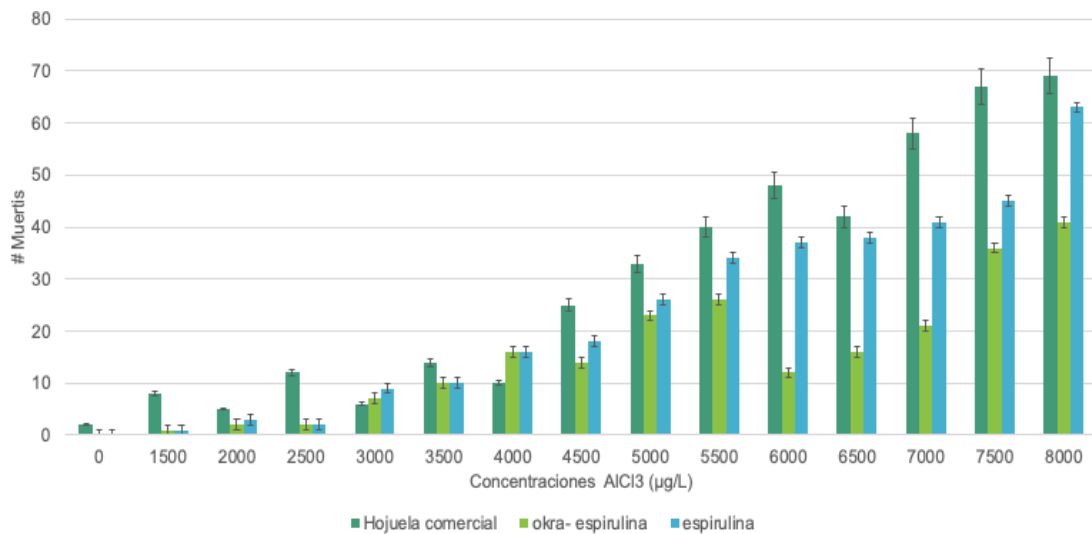


Fig.10.Embrioletalidad inducida por la exposición de $AlCl_3$ sobre *Danio rerio*.

9.6.1 Los datos fueron expresados en $x \pm \sigma$. $n=3$, $p \leq .5$ (prueba ANOVA).

9.7 Embriotoxicidad

Los resultados muestran que el $AlCl_3$ es un agente teratogénico que podría alterar el estado de estrés oxidativo en el bioindicador ya que se observaron alteraciones de la eclosión, malformaciones estructurales, deterioro cardíaco y retrasos en el desarrollo embrionario al aumentar la concentración.

El índice teratogénico calculado nos indica considerando: EMBRIOTÓXICO $1 < IT > 1$ TERATOGÉNICO.

Grupo	CL50 ($\mu g L^{-1}$)	CE50 ($\mu g L^{-1}$)	IT
Alimento comercial	5320.2	1620.3	3.28
Okra + espirulina	7230.2	5648.2	1.28
Espirulina	5950.7	5660.3	1.05

Tabla 8. Concentración letal media CL_{50} ($\mu g L^{-1}$), concentración media de malformaciones CE_{50} ($\mu g L^{-1}$) e índice teratogénico (IT).

10 DISCUSIÓN

Los metales pesados son capaces de inducir diversos efectos tóxicos, algunos son mediados por la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) generando

estrés oxidativo (González & Ochoa, 2008; Sivakumar et al., 2012), el Al forma parte de estos y es considerado un riesgo para el medio acuático, ya que posee una gran estabilidad química ante los procesos de biodegradación, por lo que los organismos tienen una gran dificultad para metabolizarlos, generándose una contaminación por bioacumulación y un efecto multiplicador en la concentración del contaminante en la cadena trófica, alcanzando niveles altos de toxicidad además de ser absorbidos muy eficientemente a través de las membranas biológicas, su biodisponibilidad se ve fuertemente afectada por los parámetros fisicoquímicos del medio acuático (Santore et al., 2018; Trenfield et al., 2012). En México, la Norma Oficial Mexicana A NOM-127-SSA1-1994, 2017, indica que el límite permisible en agua potable es de 0.20 mg/L, y (0.05-0.1 mg L⁻¹) como límite de protección para la vida acuática, aunque no está claro si existe un monitoreo continuo del contenido de aluminio en agua de pozos, en virtud de que no se consideraba un parámetro relevante para la salud pública o ambiental (Vázquez et al., 2014). La presencia de este metal se ha reportado en diversos organismos acuáticos; los peces son un foco de especial atención, la toma de estos contaminantes puede ocurrir a partir de sedimentos, material particulado en suspensión, columna de agua o fuentes alimenticias, lo cual dependerá de la dieta y del modo de vida del organismo (Authman, 2015; Alamdar et al., 2017). La relevancia de esta investigación no sólo profundiza en las consecuencias de la exposición al aluminio, sino que también amplía nuestros conocimientos abarcando las posibles repercusiones dentro de la biodiversidad acuática mostrando a la vez una alternativa de protección ante los efectos que el aluminio pueda causar en los organismos, a partir de la composición nutricional única que ofrece esta mezcla de vitaminas, minerales y antioxidantes presentes en okra con espirulina, la okra ha sido ampliamente reconocida por sus nutrientes y por poseer propiedades coagulantes empleados para la remoción de diversos contaminantes entre ellos el aluminio. La okra además posee un conjunto de fitoquímicos que ofrecen beneficios potenciales que promueven la salud de los organismos, como se ha documentado en estudios recientes (Bakhsh et al., 2023; Mohammadzadeh et al., 2023), al combinar estos componentes nutricionales con los presentes en la microalga espirulina, la cual ha sido utilizada desde tiempos prehispánicos por sus amplios beneficios para la salud, así como sus efectos benéficos sobre los organismos acuáticos (Abreu et al., 2023; Al Mamun et al., 2023; Dianratri et al., 2023), formulan en conjunto un alimento que proporciona

compuestos bioactivos y nutrientes esenciales para la salud reproductiva y la viabilidad de los ovocitos de *D. rerio*, lo cual puede verse reflejado en la viabilidad de los ovocitos, la cual fue significativamente mayor en los ovocitos producidos por el grupo de pez cebra alimentados con una dieta enriquecida con espirulina y okra (95%) en comparación con la dieta con espirulina (89%) y la dieta comercial (82%) lo cual puede atribuirse a la composición nutricional única de la mezcla de okra y espirulina. La espirulina, al ser rica en proteínas, vitaminas, minerales y antioxidantes, desempeña un papel fundamental en el apoyo a diversos aspectos de los procesos reproductivos de los peces (El-Sheekh et al., 2023; Pérez-Alvarez et al., 2023; Youssef et al. 2023). Por otro lado, la okra aporta nutrientes adicionales y compuestos potencialmente protectores (Expósito-Almellón et al., 2023; Yeung et al., 2023). La sinergia de nutrientes que aportan tanto la espirulina como la okra podría sustentar el aumento observado en la viabilidad de los ovocitos en *D. rerio*. La dieta comercial por otro lado puede carecer de varios nutrientes específicos o componentes bioactivos que se encuentran en la dieta enriquecida con espirulina y okra, lo que puede dar lugar a una disminución de la viabilidad de los ovocitos (Abbas 2023). Las diferencias significativas observadas entre los porcentajes de viabilidad en los ovocitos, muestran el gran potencial que puede tener la formulación de dietas que incorporan ingredientes naturales específicos para mejorar el éxito reproductivo de organismos acuáticos como el pez cebra (Amenyogbe 2023).

El aluminio en sus diversas especies puede producir embriotóxicidad, además de tener la capacidad de provocar daños teratogénicos y generar alteraciones en el desarrollo embrionario y acumulación en tejidos además de ser considerado un agente cardiotoxico, citotóxico, teratogénico y embrioletal (Corrales, 2010; Mohammed, 2011; Rondón et. al., 2007; Fernández 2014; Adams, 2018). En la presente investigación el aluminio produjo diversas alteraciones en embriones de *D. rerio*, entre las que destacan edema pericárdico, edemas en el saco vitelino, malformaciones craneofaciales, hipopigmentación corporal, retraso del crecimiento, cifosis, lordosis, escoliosis, malformaciones del saco vitelino, malformaciones de la cola, malformaciones corporales generales y retrasos en la eclosión. Sin embargo, los embriones sometidos a la exposición crónica de una dieta enriquecida con espirulina redujeron significativamente las malformaciones inducidas por el aluminio. En los embriones de *D. rerio* expuestos crónicamente a una dieta enriquecida en espirulina-okra, las malformaciones inducidas por el aluminio disminuyeron aún más

en proporción a las de los embriones alimentados con una dieta enriquecida en espirulina.

Este efecto protector puede deberse a los mecanismos mediante los cuales las dietas enriquecidas con okra y espirulina ejercen una protección ante los efectos embriotóxicos inducidos por el aluminio, generando una disminución en el número de malformaciones en comparación con los ovocitos producidos por el grupo alimentado con hojuela comercial, se puede inferir la interacción de algunos factores interconectados en el proceso; en primera estancia la defensa antioxidante, tanto de la espirulina como de la okra, ambas tienen un alto contenido de antioxidantes, incluyendo vitaminas como C y E, respecto a los fitoquímicos en ambos casos se encuentran presentes tanto carotenoides como polifenoles (Ali & Bhattacharjee 2023; Lakhdar et al., 2023; Seğmen et al., 2023). Por otro lado, diversas investigaciones han demostrado el aluminio tiene la capacidad de alterar el transporte de electrones dentro de la cadena respiratoria dando como resultado una alteración dañina para las mitocondrias, aunado a esto el aluminio puede tener interacciones directa o indirectamente con diversas enzimas esenciales en diversos procesos metabólicos y moleculares, este metal tiene la capacidad de unirse y generar una acumulación en las estructuras óseas, ya que puede sustituir al calcio en sus sitios de unión, dentro de las superficies óseas lo cual altera la actividad cardíaca y del sistema nervioso en general al promover la mineralización, hipocalcemia, osteomalacia y osteogénesis, en diversos estudios se ha descrito que en embriones de ratones se produce la inhibición de la vía de señalización Wnt / β -catenina la cual regula procesos como la regeneración de tejidos, la diferenciación de células madre y la proliferación celular, generando así lo cual produce malformaciones esqueléticas axiales como cifosis, lordosis o escoliosis. (Brannen et al., 2010; Klein, 2019; Song et al., 2018; Sun et al., 2017). Se ha comprobado en diversas investigaciones que el aluminio tiene la capacidad de causar un deterioro en las funciones celulares ya que puede generar una alteración estructural en las proteínas, ocasionado por su afinidad con los grupos sulfidriilo, presentes en estructuras como las cisteínas (Khan et al., 2013). La alteración en la eclosión especialmente en el grupo del alimento comercial debido a la falta de protección que provee tanto la espirulina como la formulación okra- espirulina puede deberse a la interacción del aluminio con una enzima denominada corionasa, la cual se considera una metaloproteasa llamada proteasa de eclosión (Scheil et al., 2009). Cuando el

aluminio logra traspasar la membrana del corion, tiene la capacidad de unirse a los grupos tiol dentro de las proteínas, generando especies reactivas de oxígeno, generando estos efectos embriotóxicos (Adeyemi et al., 2015; Ganesan et al., 2016; Hasan et al., 2018)

En el caso de la hipopigmentación en organismos de los tres grupos, aunque del grupo de alimento comercial desde la concentración 1500 mg/L a diferencia del grupo espirulina y el grupo okra- espirulina en los que se presentó hipopigmentación en las exposiciones más altas de $AlCl_3$, se puede inferir a la disminución en la expresión de genes (NRF1 y NRF2) pues de estos se derivan las células encargadas de la pigmentación (Rocha et al., 2020; Monaco et al., 2017; Asghari et al.).

La exposición al aluminio puede provocar la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), causando estrés oxidativo y daño celular (Huixin et al., 2023; Karami et al., 2023; Sung et al., 2023). Existen diversos organismos, en los que se puede presentar una producción sostenida de especies radicales de oxígeno lo cual es necesario para mantener los procesos metabólicos celulares (Wells et al., 2005). En el presente estudio, se evaluó el efecto en el estado del estrés oxidativo de las larvas producidas por los progenitores de tres grupos experimentales de *Danio rerio*, los ovocitos fueron expuestos a 9 concentraciones de $AlCl_3$ durante 72 y 96 horas respectivamente en donde pudimos observar una reducción en el estrés oxidativo lo cual puede deberse a la presencia de los antioxidantes de la espirulina y la okra ya que los antioxidantes tienen la capacidad de eliminar las especies reactivas de oxígeno, reduciendo así el estrés oxidativo y protegiendo a los embriones ante el desarrollo de malformaciones (Ijarotimi et al., 2023; Jha et al., 2023; Parmar et al., 2023). Es muy probable que las formulaciones enriquecidas con espirulina y la mezcla de okra con espirulina tengan un efecto reductor en el estado de estrés oxidativo en los embriones de *Danio rerio* debido a su composición antioxidante, la espirulina es conocida por su alto contenido de y la activación de mecanismos de defensa de antioxidantes endógenos, es probable que las dietas enriquecidas con espirulina y mezcla de espirulina y okra reduzcan el estrés oxidativo en embriones de pez cebra mediante una combinación de compuestos antioxidantes y la activación de mecanismos de defensa antioxidantes endógenos. La espirulina es conocida por sus altos niveles de proteína, vitaminas, incluidas las vitaminas C y E, el betacaroteno y la ficocianina y antioxidantes (Ajayi et al., 2023; Wang et al., 2023), estas cualidades antioxidantes presentes en la microalga pueden neutralizar las

especies reactivas del oxígeno (ROS) y los radicales libres generados durante la exposición al AlCl₃, lo que permite la prevención del daño celular y el estrés oxidativo (Ansari et al., 2023; Mohan et al., 2023; Parveen et al., 2023).

La okra complementa el contenido antioxidante dentro de la dieta ya que contiene diversos flavonoides y polifenoles, así como otros fitoquímicos polifenoles con propiedades antioxidantes que al combinarse con la espirulina forman una sinergia que aumenta su capacidad antioxidante, esta acción conjunta refuerza la capacidad del embrión en cuanto a la defensa antioxidante probablemente iniciando procesos de regulación ante el incremento de enzimas antioxidantes endógenas como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) (Younis et al., 2023; Parmar et al., 2023), evitando así el estrés oxidativo, interceptando y neutralizando eficientemente los ERO (Pruteanu et al., 2023; Zhu et al., 2023; Ijarotimi et al., 2023; Jha et al., 2023; Parmar et al., 2023). Este mecanismo sinérgico que implica una amplia gama antioxidante directa y la estimulación de las defensas antioxidantes intrínsecas promueve la protección a nivel celular, reduce el estrés oxidativo y por ende promueve una reducción de malformaciones en embriones de *Danio rerio* expuestos a AlCl₃

Otro mecanismo importante ejercido por el alimento a base de okra- espirulina es la quelación, en diversas investigaciones se ha estudiado el contenido de compuestos como el mucilago que tiene propiedades quelantes dentro de la okra, la cual ha sido utilizada para aislar diversos elementos como residuos industriales, remoción de metales pesados en aguas industriales y residuos textiles, esta cualidad promueve la desintoxicación que puede promover la eliminación de toxinas generadas por el aluminio en el tracto digestivo (Pourakbar et al., 2023; Ormanli et al., 2023). (Dhiman et al., 2023; Saleh & Fadillah 2023), por ello la presencia de la okra en la alimentación de este grupo de estudio, contribuye a la disminución de los efectos tóxicos que produce el aluminio, otro factor considerable en este alimento es el efecto antiinflamatorio, se ha reportado con anterioridad que el aluminio ejerce una inflamación en la exposición crónica de los organismo ante este metal alterando el desarrollo embrionario, por lo que las propiedades antiinflamatorias reportadas en el alga espirulina pueden coadyubar en la protección de los organismos ante este efecto que afecta la embriogénesis (Saraswathi & Kavitha 2023). (Abdelghany et al., 2023; Kumar et al., 2023), este efecto protector aunado a los nutrientes presentes en espirulina la cual es considerad un "superalimento" por su alto valor nutrimental

(Terzioğlu et al., 2023), la espirulina tiene además la capacidad de modular y promover las respuestas inmunitarias, reforzando las defensas inmunitarias en el organismo, mejorando así las capacidades en el sistema de defensa del organismo ante los efectos tóxicos en los organismos. (El-Shall et al., 2023; Iatrou et al., 2023; Jamil Emon et al., 2023).

En conjunto con la okra, la cual también provee a los organismos de vitaminas, minerales y diversos nutrientes esenciales (Chadha, 2023), la mezcla de nutrientes puede proporcionar a los organismos un fuente tan rica en nutrientes que puede tener la capacidad de contrarrestar los efectos tóxicos que ejerce el $AlCl_3$, ejerciendo una perfecta sinergia por la combinación de agentes antioxidantes, vitaminas, minerales, el mucilago y otros elementos quelantes metálicos dentro de la okra, agentes inflamatorios presentes principalmente en la microalga espirulina pueden ejercer una mejora en los mecanismos de protección ante los efectos embriotóxicos inducidos por el aluminio.

11 CONCLUSIONES

- El alimento diseñado a base de okra y espirulina aumentó en promedio las tallas de los progenitores.
- La viabilidad de los ovocitos fue significativamente mayor en el grupo alimentado con la formulación enriquecida con okra y espirulina, mostrando una notable capacidad para estimular una mayor producción de ovocitos viables, en comparación tanto con la dieta de espirulina como la dieta comercial.
- Los organismos alimentados con la formulación de espirulina mostraron una eclosión acelerada (48h) con respecto al grupo control y al grupo okra-espirulina (72h).
- La embriotoxicidad fue mayor en el grupo alimentado con hojuela comercial con respecto a los grupos okra-espirulina y espirulina.
- La severidad de las malformaciones observadas en el grupo alimentado con hojuela comercial es mayor que con respecto a los grupos alimentados con espirulina y menor gravedad con el grupo alimentado con okra-espirulina.
- Las malformaciones más frecuentes con respecto a las concentraciones en el grupo control son: edema pericárdico, edema en el saco vitelino, no formación de cola y ojos, sifosis y escoliosis severa; en el grupo espirulina y

okra espirulina las malformaciones más severas se observaron a las 48 horas y en concentraciones mayores a 5500 $\mu\text{g/L}$ de AlCl_3 ; las malformaciones más comunes fueron: edema pericárdico, edema en el saco vitelino, hemorragias, escoliosis y sifosis.

- La formulación con okra- espirulina mostro mayor protección ante la Embriotoxicidad.
- Se observó un comportamiento Dosis-Respuesta del efecto embrioletal en todos los grupos de alimentos (Hojuela comercial > okra-espirulina > espirulina).
- La formulación okra- espirulina mostro mayor protección ante la embrioletalidad provocada por el AlCl_3 .
- La concentración letal 50 fue mayor en los organismos alimentados con la formulación okra- espirulina.
- La concentración efectiva 50 (malformaciones) fue igual para el grupo okra-espirulina y para el grupo espirulina.
- Los valores obtenidos para el IT indican que el AlCl_3 es un agente teratogénico.
- El alimento okra- espirulina mostro un efecto reductor en el estado de estrés oxidativo, así como la formulación espirulina, aunque en menor proporción.
- Esta investigación no solo enriquece el conocimiento sobre la toxicidad del aluminio y sus efectos, resalta la importancia de explorar nuevas alternativas nutricionales naturales que pueden mejorar la calidad de vida en los organismos acuáticos y por ende la seguridad y calidad en nuestra cadena alimentaria promoviendo practicas más sustentables y el aprovechamiento de productos provenientes de comunidades como Cahuitan, Oax.

12 REFERENCIAS

Abbas, Ons Thamer; Mohammed Ahmed Jasim; AL-Hussiny, Ahmed Aidan. The Ability to use spirulina sp. As a food for common carp fish (*Ciprinus carpio* L. 1758). *Plant Archives*, 2020, vol. 20, no 1. <https://www.researchgate.net/publication/343746409>

Abdelghany, A. K., Gamal, A., Abdel-Wahab, A., Abdel-Razik, A. R. H., El-Samannoudy, S. I., Ibrahim, M. A., ... & El-Ela, F. I. A. (2023). Evaluating the neuroprotective effect of Spirulina platensis-loaded niosomes against Alzheimer's disease induced in rats. *Drug Delivery and Translational Research*, 1-13.

Abd Elnabi, M. K., Elkaliny, N. E., Elyazied, M. M., Azab, S. H., Elkhalifa, S. A., Elmasry, S., & Mahmoud, Y. A. G. (2023). Toxicity of Heavy Metals and Recent Advances in Their Removal: A Review. *Toxics*, 11(7), 580.

Abidi, O., Khazri, A., Smii, H., Belgacem, R., Mahmoudi, E., Beyrem, H., & Dellali, M. (2023). The antioxidant properties of Spirulina (microalgae) can reduce oxidative stress and neurotoxicity caused by mercury in freshwater mussels. *Chemistry and Ecology*, 1-16.

Abreu, A. P., Martins, R., & Nunes, J. (2023). Emerging Applications of Chlorella sp. and Spirulina (*Arthrospira*) sp. *Bioengineering*, 10(8), 955.

Adeyemi, J. A., Da Cunha Martins, A., & Barbosa, F. (2015). Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 172- 173, 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.04.001>

Agbenorhevi JK, Kpodo FM, Banful BKB, Oduro IN, Abe-Inge V, Dastoor DN, et al. Survey and evaluation of okra pectin extracted at different maturity stages. *Cogent Food Agric*. 2020;6(1):1760476. doi: <https://doi.org/10.1080/23311932.2020.1760476>

Allin, C. J., & Wilson, R. W. (2000). Effects of pre-acclimation to aluminium on the physiology and swimming behaviour of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during a pulsed exposure. *Aquatic Toxicology*, 51(2), 213-224. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00111-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00111-9)

Alamdar, A., Eqani, S. A. M. A. S., Hanif, N., Ali, S. M., Fasola, M., Bokhari, H., ... & Shen, H. (2017). Human exposure to trace metals and arsenic via consumption of fish from river Chenab, Pakistan and associated health risks. *Chemosphere*, 168, 1004-1012.

Ali, A., & Bhattacharjee, B. (2023). Nutrition security, constraints, and agro-diversification strategies of neglected and underutilized crops to fight global hidden hunger. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1144439.

Al Mamun, M., Hossain, M. A., Saha, J., Khan, S., Akter, T., & Banu, M. R. (2023). Effects of spirulina *Spirulina platensis* meal as a feed additive on growth performance and immunological response of Gangetic mystus *Mystus cavasius*. *Aquaculture Reports*, 30, 101553.

Ali, J., Jan, I., Ullah, H., Fahad, S., Saud, S., Adnan, M., ... & S. Elshikh, M. (2023). Biochemical response of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) to Selenium (Se) under drought stress. *Sustainability*, 15(7), 5694.

Alqasoumi, S. I. „Okra “*Hibiscus esculentus* L.: A study of its hepatoprotective activity. (Internet) Arabia Saudita. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2011.10.002>

Anandhan, R., & Hemalatha, S. (2009). Bioaccumulation of aluminium in selected tissues of zebra fish *Brachydanio rerio* (Ham.). *Nature Environment and Pollution Technology*, 8(4), 751-753.

Amenyogbe, E. (2023). Application of probiotics for sustainable and environment-friendly aquaculture management-A review. *Cogent Food & Agriculture*, 9(1), 2226425.

Arteaga, C., Guanga, V., Marizande, MF y Borja, R. (2022). Uso del modelo de pez cebra como herramienta para evaluar la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los alimentos. *Revisión de literatura. Investigación y Desarrollo* , 16 (1).

Asghari, A., Fazilati, M., Latifi, A. M., & Salavati, H. (2016). A Review on Antioxidant Properties of Spirulina. 3(1).

Authman, M. M. (2015). Use of Fish as Bio-indicator of the Effects of Heavy Metals Pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 06(04). <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000328>

Bakhsh, H. T., Mokhtar, F. A., Elmaidomy, A. H., Aly, H. F., Younis, E. A., Alzubaidi, M. A., ... & Abdelhafez, O. H. (2023). *Abelmoschus esculentus* Seed Extract Exhibits In Vitro and In Vivo Anti-Alzheimer's Potential Supported by Metabolomic and Computational Investigation. *Plants*, 12(12), 2382.

Bhattacharya, S. (2020). The role of Spirulina (*Arthrospira*) in the mitigation of heavy-metal toxicity: an appraisal. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 39(2).

Beltrán-Heredia J, Sánchez-Martín J, Delgado-Regalado A, Jurado-Bustos C. Removal of Alizarin Violet 3R (anthraquinonic dye) from aqueous solutions by natural coagulants. *J Hazard Mater*. 2009;170(1):43-50. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.04.131

Bondy, S. C. (2010). The neurotoxicity of environmental aluminum is still an issue. *NeuroToxicology*, 31(5),575-581. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.05.009>

Brannen, K. C., Panzica-Kelly, J. M., Danberry, T. L., & Augustine-Rauch, K. A. (2010). Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive*

Toxicology, 89(1), 66-77. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20223>

Castillo-Salas, D. L., Gaytán-Oyarzun, J. C., López-Herrera, M., & Sánchez-Olivares, M. A. (2022). Pez cebra (*Danio rerio*): modelo experimental en la evaluación de compuestos xenobióticos. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*.

Chadha, M. L. (2023). Home Gardening: The Way Forward to Be Safe and Healthy. In *Vegetables for Nutrition and Entrepreneurship* (pp. 217-239). Singapore: Springer Nature Singapore.

Chen, Q., Zhao, H., Liu, Y., Jin, L., & Peng, R. (2023). Factors Affecting the Adsorption of Heavy Metals by Microplastics and Their Toxic Effects on Fish. *Toxics*, 11(6), 490.

Cohen Z (1997) The chemicals of Spirulina. In *spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. Taylor & Francis. Londres, RU. pp. 175-203. doi: <https://doi.org/10.1201/9781482272970>

Comber, S. D., Gardner, M. J., & Churchley, J. (2005). Aluminium speciation: implications of wastewater effluent dosing on river water quality. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 17(3), 117-128. doi: <https://doi.org/10.3184/095422905782774874>

Cook J.A., VanderJagt D.J., Pastuszyn A., Mounkaila G., Glew R.S., Milson M., & Glew R.H., Nutrient and chemical composition of 13 wild plant foods of Niger, *Journal of Food Composition and Analysis*. 2000. 13: 83-92. doi: <https://doi.org/10.1006/jfca.1999.0843>

Corpus Sjogreen, Ana Melissa. "Determinación de la concentración letal media (CL50-96) del aluminio mediante pruebas toxicológicas utilizando alevinos de *Oncorhynchus mykiss* (trucha Arco Iris)." 2010. https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria/511

De Carvalho, C.C.C.R., Cruz, P.A., da Fonseca, M.M.R. et al. Antibacterial properties of the extract of *Abelmoschus esculentus*. *Biotechnol Bioproc E* 16, 971 2011. doi: <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0050-6>

Daliu P, Annunziata G, Tenore GC, Santini A. Abscisic acid identification in Okra, *Abelmoschus esculentus* L. (Moench): perspective nutraceutical use for the treatment of diabetes. *Nat Prod Res.* 2019;34(1):3-9. doi: <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1637874>

Datsomor, D. N., Agbenorhevi, J. K., Kpodo, F. M., & Oduro, I. N. (2019). Okra pectin as lecithin substitute in chocolate. *Scientific African*, 3, e00070. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00070>

De Carvalho, C.C.C.R., Cruz, P.A., da Fonseca, M.M.R. et al. Antibacterial properties of the extract of *Abelmoschus esculentus*. *Biotechnol Bioproc E* 16, 971 2011. doi: <https://doi.org/10.1007/s12257-011-0050-6>

DeForest, D. K., Brix, K. V., Tear, L. M., & Adams, W. J. (2018a). Multiple linear regression models for predicting chronic aluminum toxicity to freshwater aquatic organisms and developing water quality guidelines. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(1), 80-90. <https://doi.org/10.1002/etc.3922>

De Marco, G., Conti, G. O., Giannetto, A., Cappello, T., Galati, M., Iaria, C., ... & Maisano, M. (2022). Embryotoxicity of polystyrene microplastics in zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Research*, 208, 112552.

Dhiman, A., Kaur, R., Chandel, R., Kumar, S., Singh, B., Kumar, D., ... & Suhag, R. (2023). Effect of blanching and dehydration on rheological, structural, functional and physicochemical properties of okra. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 1-13.

Dianratri, I., Hadiyanto, H., Wahyono, Y., & Pratiwi, W. Z. (2023, May). Potency of microalgae for animal feed and aquaculture feed: A short review. In AIP Conference Proceedings (Vol. 2683, No. 1). AIP Publishing.

Díaz Franco, A., Loera Gallardo, J., Rosales Robles, E., Alvarado Carrillo, M., & Ayvar Serna, S. (2007). Producción y tecnología de la okra (*Abelmoschus esculentus*) en el noreste de México. *Agricultura técnica en México*, 33(3), 297-307. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S056825172007000300009&script=sci_abstract&tlng=pt

Driscoll, C. T., & Letterman, R. D. (1988). Chemistry and fate of Al (III) in treated drinking water. *Journal of Environmental Engineering*, 114(1), 21-37. doi: [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)0733-9372\(1988\)114:1\(21\)](https://doi.org/10.1061/(ASCE)0733-9372(1988)114:1(21))

El-Shall, N. A., Jiang, S., Farag, M. R., Azzam, M., Al-Abdullatif, A. A., Alhotan, R., ... & Alagawany, M. (2023). Potential of *Spirulina platensis* as a feed supplement for poultry to enhance growth performance and immune modulation. *Frontiers in Immunology*, 14, 1072787.

Escobar Tovar, V., & Fernández Vargas, K. D. (2023). Remoción del contaminante emergente dipirona mediante oxidación avanzada en aguas residuales hospitalarias de San Antonio de Padua, la Plata, Huila (Doctoral dissertation, Uniautónoma del Cauca. Facultad de Ciencias Ambientales y Desarrollo Sostenible. Programa de Ingeniería Ambiental y Sanitaria).

Expósito-Almellón, X., Duque-Soto, C., López-Salas, L., Quirantes-Piné, R., de Menezes, C. R., Borrás-Linares, I., & Lozano-Sánchez, J. (2023). Non-Digestible Carbohydrates: Green Extraction from Food By-Products and Assessment of Their Effect on Microbiota Modulation. *Nutrients*, 15(18), 3880.

Fernández-Dávila, M. L., Razo-Estrada, A. C., García-Medina, S., Gómez-Oliván, L. M., Piñón-López, M. J., Ibarra, R. G., & Galar-Martínez, M. (2012a). Aluminum-

induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (Cyprinidae-*Ctenopharingodon idella*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76(1), 87-92.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.09.012>

Freitas, S., Oliveira, M., de Souza, F., Geraldino, L., Almeida, C., Fávoro, L., & Garcia, C. Optimization of coagulation-flocculation process for treatment of industrial textile wastewater using okra (*A. esculentus*) mucilage as natural coagulant. *Industrial Crops and Products*, 2015. 76. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.027>

Ganesan, S., Anaimalai Thirumurthi, N., Raghunath, A., Vijayakumar, S., & Perumal, E. (2016). Acute and sub-lethal exposure to copper oxide nanoparticles causes oxidative stress and teratogenicity in zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 36(4), 554-567. <https://doi.org/10.1002/jat.3224>

Gazabón, L. E. M., Verbel, R. E. O., & Martínez, I. D. M. (2013). Remoción de la turbidez del agua del río Magdalena usando el mucílago del nopal *Opuntia ficus-indica*. *Producción+ limpia*, (1), 19-27.

Gheorghiu, C., Cable, J., Marcogliese, D. J., & Scott, M. E. (2007). Effects of waterborne zinc on reproduction, survival and morphometrics of *Gyrodactylus turnbulli* (Monogenea) on guppies (*Poecilia reticulata*). *International Journal for Parasitology*, 37(3-4), 375-381. • doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.09.004>

Gomez, C. F., Constantine, L., Moen, M., Vaz, A., Wang, W., & Huggett, D. B. (2011). Ibuprofen metabolism in the liver and gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86(3), 247-251.
<https://doi.org/10.1007/s00128-011-0200-8>

González, J. F., & Ochoa, D. M. (2008). Estrés oxidativo en peces inducido por contaminantes ambientales. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 55(II), 115-126.

Gonzalez-Rey, M., & Bebianno, M. J. (2012a). Does non-steroidal anti-inflammatory

(NSAID) ibuprofen induce antioxidant stress and endocrine disruption in mussel *Mytilus galloprovincialis*? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 33(2), 361-371. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.017>

Grassie, C., Braithwaite, V. A., Nilsson, J., Nilsen, T. O., Teien, H. C., Handeland, S. O., Stefansson, S. O., Tronci, V., Gorissen, M., Flik, G., & Ebbesson, L. O. E. (2013). Aluminum exposure impacts brain plasticity and behavior in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Experimental Biology*, 216(16), 3148-3155. <https://doi.org/10.1242/jeb.083550>

Griffitt, R. J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J. C., & Barber, D. S. (2008). Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1972-1978. <https://doi.org/10.1897/08 002.1>

Harris, W. R., Wang, Z., & Hamada, Y. Z. (2003). Competition between transferrin and the serum ligands citrate and phosphate for the binding of aluminum. *Inorganic Chemistry*, 42(10), 3262-3273. <https://doi.org/10.1021/ic026027w>

Hasan, M. K., Alam, S., Mirkovic, J., & Hossain, M. F. (2018). Screening of Human Proteins for Fluoride and Aluminum Binding. *Bioinformation*, 14(02), 68-74. <https://doi.org/10.6026/97320630014068>

Hermesen, S. A. B., van den Brandhof, E. J., van der Ven, L. T. M., & Piersma, A. H. (2011). Relative embryotoxicity of two classes of chemicals in a modified zebrafish embryotoxicity test and comparison with their in vivo potencies. *Toxicology in Vitro*, 25(3), 745-753. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.005>

Huixin, P., Guangji, W., Yanxin, H., Yanfang, P., Huixiong, Y., Xiong, Z., ... & Wencheng, C. (2023). Transcriptome-based analysis of the toxic effects of aluminum chloride exposure on spermatocytes. *Toxicology in Vitro*, 92, 105658.

Iatrou, A. M., Michailidou, S., Papadopoulos, G. A., Afaloniati, H., Lagou, M. K., Kiritsi, M., ... & Fortomaris, P. (2023). Effects of Dietary Supplementation of *Spirulina platensis* on the Immune System, Intestinal Bacterial Microbiome and Skin Traits of

Mink. Animals, 13(2), 190.

Ijarotimi, O. S., Akinola-Ige, A. O., & Oluwajuyitan, T. D. (2023). Okra seeds proteins: Amino acid profile, free radical scavenging activities and inhibition of diabetes and hypertensive converting enzymes indices. Measurement: Food, 11, 100101.

Jamil Emon, F., Rohani, M. F., Sumaiya, N., Tuj Jannat, M. F., Akter, Y., Shahjahan, M., ... & Goh, K. W. (2023). Bioaccumulation and Bioremediation of Heavy Metals in Fishes—A Review. Toxics, 11(6), 510.

•Jaeschke, D. P., Teixeira, I. R., Marczak, L. D. F., & Mercali, G. D. (2021). Phycocyanin from Spirulina: A review of extraction methods and stability. Food Research International, 143, 110314

Jha, N., Madasamy, S., Prasad, P., Lakra, A. K., Esakkiraj, P., Tilwani, Y. M., & Arul, V. (2023). Optimization and Physicochemical Characterization of Polysaccharide Purified from *Sonneratia caseolaris* Mangrove Leaves: a Potential Antioxidant and Antibiofilm Agent. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1-27.

Karami, E., Goodarzi, Z., Shahtaheri, S. J., Kiani, M., Faridan, M., & Ghazi-Khansari, M. (2023). The aqueous extract of *Artemisia Absinthium* L. stimulates HO-1/MT-1/Cyp450 signaling pathway via oxidative stress regulation induced by aluminium oxide nanoparticles (α and γ) animal model. BMC Complementary Medicine and Therapies, 23(1), 310.

Khan, M. D., Mei, L., Ali, B., Chen, Y., Cheng, X., & Zhu, S. J. (2013). Cadmium-induced upregulation of lipid peroxidation and reactive oxygen species caused physiological, biochemical, and ultrastructural changes in upland cotton seedlings. BioMed Research International, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/374063>

Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. Developmental Dynamics, 203(3), 253-310. <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>

Klein, G. L. (2019). Aluminum toxicity to bone: A multisystem effect? Osteoporosis and Sarcopenia, 5(1), 2-5. <https://doi.org/10.1016/j.afos.2019.01.001>

Kumar, A., Kumar, P., & Nadendla, R. (2013). A review on: *Abelmoschus esculentus* (Okra). International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences, 3(4), 129-132.

Kumar, P. P., Darshini, I. S., & Prashanth, K. V. H. (2023). Neuroprotective potential of plant-based bioactive polysaccharides: molecular mechanisms and therapeutic advances. In *Ayurvedic Herbal Preparations in Neurological Disorders* (pp. 635-667). Academic Press.

Kumar, V., & Gill, K. D. (2014). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in aluminium neurotoxicity and its amelioration: A review. *NeuroToxicology*, 41, 154-166. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2014.02.004>

Lasteros Patilla, I., & Mejia Quispe, E. (2020). Revisión sistemática de la aplicación de coagulantes naturales de origen vegetal en el tratamiento de aguas residuales industriales, 2020.

Lakhdar, A., Trigui, M., & Montemurro, F. (2023). An Overview of Biostimulants' Effects in Saline Soils. *Agronomy*, 13(8), 2092.

Lee, S. H., Kang, J. W., Lin, T., Lee, J. E., & Jin, D. II. (2018). Teratogenic potential of antiepileptic drugs in the zebrafish model. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/726478>

Li, G., Xie, F., Zhang, J., Wang, J., Yang, Y., & Sun, R. (2016). Occurrence of phosphorus, iron, aluminum, silica, and calcium in a eutrophic lake during algae bloom sedimentation. *Water Science and Technology*, 74(6), 1266-1273. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.277>

Li, X. (2012). Improved pyrogallol autoxidation method: A reliable and cheap

superoxide- scavenging assay suitable for all antioxidants. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(25), 6418-6424. <https://doi.org/10.1021/jf204970r>

Li, Z., Lu, T., Li, M., Mortimer, M., & Guo, L. H. (2023). Direct and gut microbiota-mediated toxicities of environmental antibiotics to fish and aquatic invertebrates. Chemosphere, 138692.

Long, R. S., Boettcher, E., & Crawford, D. (2017). Current and Future Uses of Aluminum in the Automotive Industry. Jom, 69(12), 2635-2639. <https://doi.org/10.1007/s11837-017-2554-9>

McGrath, P., & Li, C. Q. (2008). Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. Drug discovery today, 13(9-10), 394-401. McGrath, P., & Li, C. Q. (2008). Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity. Drug discovery today, 13(9-10), 394-401.

Magnarelli, G. (2015). Exposición ambiental a plaguicidas: biomarcadores en matrices de la tríada madre-placenta-feto. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 49(1), 39-53.

Mahdi Ahmed, M., Doumenq, P., Awaleh, M. O., Syakti, A. D., Asia, L., & Chiron, S. (2017). Levels and sources of heavy metals and PAHs in sediment of Djibouti-city (Republic of Djibouti). Marine Pollution Bulletin, 120(1-2), 340-346. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.05.055>

Maya, S., Prakash, T., Madhu, K. Das, & Goli, D. (2016a). Multifaceted effects of aluminium in neurodegenerative diseases: A review. Biomedicine and Pharmacotherapy, 83, 746-754. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.07.035>

Min, N., Park, H., Hong, T., An, G., Song, G., & Lim, W. (2023). Developmental toxicity of prometryn induces mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and failure of organogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). Journal of hazardous materials, 443, 130202

Mite, A. I. A., Torres, D. J. P., & Bermello, V. A. H. (2023). Intoxicación ocupacional por cloruro de aluminio. *RECIMUNDO*, 7(2), 228-237.

Mohammadzadeh, Z., Shojaeiyan, A., Ayyari, M., Tohidfar, M., Mokhtassi-Bidgoli, A., & Atighi, M. R. (2023). Comparative analysis of bioactive compounds in various organs of Iranian okra accessions. *South African Journal of Botany*, 160, 682-696

Monaco, A., Grimaldi, M. C., & Ferrandino, I. (2017). Aluminium chloride-induced toxicity in zebrafish larvae. *Journal of Fish Diseases*, 40(5), 629-635. <https://doi.org/10.1111/jfd.12544>

Murali, O., Reddy, C. S., Kumar, P. V., Raju, M. A., & Mehar, K. S. Efficient bioremediation of aluminium by using ecofriendly cyanobacteria from heavy metal contaminated water. *International Journal of Advanced Research*, 2014. 2(10), 144-149. doi :10.21474/IJAR01

Mustafa, H. N. (2020). Neuro-amelioration of cinnamaldehyde in aluminum-induced Alzheimer's disease rat model. *Journal of Histotechnology*, 43(1), 11-20. <https://doi.org/10.1080/01478885.2019.1652994>

Nguyen, T. H., Le, H. D., Kim, T. N. T., The, H. P., Nguyen, T. M., Cornet, V., Lambert, J., & Kestemont, P. (2020). Anti-inflammatory and antioxidant properties of the ethanol extract of *Clerodendrum cyrtophyllum turcz* in copper sulfate-induced inflammation in zebrafish. *Antioxidants*, 9(3), 1-20. <https://doi.org/10.3390/antiox9030192>

Nordberg, G., & Nordberg, G. (2017). Metales: Propiedades químicas y toxicidad productos químicos. T, 2, 63.

Nuhu AA, Mhya DH, Atiku MK, Wudil AM. Antihyperlipidemic efficiency of *Abelmoschus esculentus* (okra) fruits varieties on rats fed high-fat diet. *J Appl Life Sci Int*. 2020;40-52. doi: 10.9734/jalsi/2020/v23i730174

Rondon-Barragán, I. S., Ramírez-Duarte, W. F., Barato, P., & Eslava-Mocha, P. R.

(2007). Importancia del ciclo biogeoquímico del aluminio (Al) con relación con la acidez de los suelos en la producción piscícola y la salud pública, ¿cuál sería el caso de la Orinoquia?. Orinoquia, 11(2), 81-94. <https://www.redalyc.org/pdf/896/89611209.pdf>

OECD. (2013). Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, July, 1-22. <https://doi.org/10.1787/9789264203709>.

Ormanlı, E., Bayraktar, O., Şahar, U., Tavman, S., & Kumcuoglu, S. (2023). Development and characterization of films based on okra polysaccharides and whey protein isolate. Journal of Food Measurement and Characterization, 17(1), 264-277.

Pardo, N. M. (2023). Depósitos de bauxita en el Escudo de Guayana venezolana: actualización de los recursos inferidos y otras consideraciones geomineras. Boletín de la Academia Nacional de la Ingeniería y el Hábitat. ISSN, 1317, 6781.

Parmar, P., Kumar, R., Neha, Y., & Srivatsan, V. (2023). Microalgae as next generation plant growth additives: Functions, applications, challenges and circular bioeconomy based solutions. Frontiers in Plant Science, 14, 1073546.

Pauca Revilla, Y. A., & Torres Quispe, R. P. (2022). Determinación de la calidad del agua para consumo humano en el distrito de urasqui, anexo de secocha-Camaná 2022.

Pérez-Alvarez, I., Islas-Flores, H., Sánchez-Aceves, L. M., Gómez-Olivan, L. M., & Chamorro-Cevallos, G. (2023). Effects of Spirulina (*Arthrospira Maxima*) on Teratogenicity and Diclofenac-Induced Oxidative Damage in *Xenopus Laevis*. Water Emerging Contaminants & Nanoplastics, 2(1), 5.

Petropoulos, S., Fernandes, A., Barros, L., Ferreira, I.C.F.R., 2018. Chemical composition, nutritional value and antioxidant properties of Mediterranean okra genotypes in relation to harvest stage. Food Chem. 242, 466-474.

Pruteanu, L. L., Bailey, D. S., Grădinaru, A. C., & Jäntschi, L. (2023). The Biochemistry and Effectiveness of Antioxidants in Food, Fruits, and Marine Algae. *Antioxidants*, 12(4), 860.

Pourakbar, N., Ganje, M., Shekarfroush, S. S., & Hosseinzadeh, S. (2023). Physicochemical and sensory properties of probiotic yogurt containing *Lactobacillus plantarum* ATCC 10241 microencapsulated with okra (*Abelmoschus esculentus*) mucilage and sodium alginate. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 30, 100364.

Quiroga-Santos, E. H., Galar-Martínez, M., García-Medina, S., Gasca-Pérez, E., Cano-Viveros, S., Ruíz-Lara, K., Gómez-Oliván, L. M., & Islas-Flores, H. (2021). Geno-cytotoxicity and congenital malformations produced by relevant environmental concentrations of aluminum, diclofenac and their mixture on *Cyprinus carpio*. An interactions study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 82(August 2020). <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103555>

Ramírez-Moreno, L., & Olvera-Ramírez, R. (2006). Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp.(*Arthrospirasp.*). *Interciencia*, 31(9), 657-663. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33912009>

Rawy, S. M., Morsy, G. M., & Elshibani, M. M. (2013). Lethality, accumulation and toxicokinetics of aluminum in some tissues of male albino rats. *Toxicology and Industrial Health*, 29(3), 254-263. <https://doi.org/10.1177/0748233711432576>

Rincón, D. D., Velásquez, H. A., Dávila, M. J., Semprun, A. M., Morales, E. D., & Hernández, J. L. (2012). Substitution levels of fish meal by *Arthrospira* (= *Spirulina*) *maxima* meal in experimental diets for red tilapia fingerlings (*Oreochromis* sp.). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(3), 430-437.

Rocha, M., Singh, N., Ahsan, K., Beiriger, A., & Prince, V. E. (2020). Neural crest development: insights from the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 249(1), 88-111. <https://doi.org/10.1002/dvdy.122>

Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., & Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, 36(1), 1-9. <https://doi.org/10.1046/j.1600-079X.2003.00092.x>

Rojas, E. M., Chavez, M. D. P. B., Jurado, F. D. L. M. P., Vega, E. C., & Ortiz, E. A. D. (2022). Estudios recientes de metales pesados en peces: Una revisión bibliográfica con énfasis en Perú. *Revista Científica Dékamu Agropec*, 3(1), 10-19.

Ruipérez, F., Mujika, J. I., Ugalde, J. M., Exley, C., & Lopez, X. (2012). Pro-oxidant activity of aluminum: Promoting the Fenton reaction by reducing Fe(III) to Fe(II). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 117, 118-123. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.09.008>

Saleh, T. A., & Fadillah, G. (2023). Green synthesis protocols, toxicity, and recent progress in nanomaterial-based for environmental chemical sensors applications. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, e00204.

Samaniego Aguilar, S. L. Determinación de la concentración letal media Cl_{50} producida por sulfato de aluminio $So_4_3Al_2$ en alevines de tilapia roja *oreochromis sp* y en postlarvas de camarón *litopenaeus vannamei* (Bachelor's thesis, Machala: Universidad Técnica de Machala). (2015). Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/2697>

Sánchez-Iglesias, S., Méndez-Álvarez, E., Iglesias-González, J., Muñoz-Patiño, A., Sánchez-Sellero, I., Labandeira-García, J. L., & Soto-Otero, R. (2009a). Brain oxidative stress and selective behaviour of aluminium in specific areas of rat brain: Potential effects in a 6-OHDA-induced model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 109(3), 879-888. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06019.x>

Santore, R. C., Ryan, A. C., Kroglund, F., Rodriguez, P. H., Stubblefield, W. A., Cardwell, A. S., Adams, W. J., & Nordheim, E. (2018). Development and application of a biotic ligand model for predicting the chronic toxicity of dissolved and precipitated aluminum to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37(1), 70-

79. <https://doi.org/10.1002/etc.4020>

Saraswathi, K., & Kavitha, C. N. (2023). Spirulina: Pharmacological Activities and Health Benefits. *Journal of Young Pharmacists*, 15(3), 441-447.

Schindler, D. W. (2019). Desafíos pasados, presentes y futuros para la gestión de la calidad del agua dulce en Canadá. *Calidad del Agua en las Américas*, 135.

Seğmen Levine, R. L. (1994). Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. *Methods. Enzymol.*, 233, 246-257.

Sivakumar, S., Khatiwada, C. P., & Sivasubramanian, J. (2012). Bioaccumulations of aluminum and the effects of chelating agents on different organs of *Cirrhinus mrigala*. *Toxicology and Pharmacology*, 34(3), 791-800. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.09.007>

Sollars, C. J., Bragg, S., Simpson, A. M., & Perry, R. (1989). Aluminium in European drinking water. *Environmental Technology*, 10(2), 131-150. doi: <https://doi.org/10.1080/09593338909384727>

Solis Silvan Rudy, Laines Canepa José Ramón, Hernandez Barajas José Roberto. Mezclas con potencial coagulante para clarificar aguas superficiales. *Rev. Int. Contam. Ambient [revista en la Internet]*. 2012.

Song, Y., Chai, T., Yin, Z., Zhang, X., Zhang, W., Qian, Y., & Qiu, J. (2018). Stereoselective effects of ibuprofen in adult zebrafish (*Danio rerio*) using UPLC-TOF/MS-based metabolomics. *Environmental Pollution*, 241, 730-739. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.009>

Sun, X., Wang, H., Huang, W., Yu, H., Shen, T., Song, M., Han, Y., Li, Y., & Zhu, Y. (2017). Inhibition of bone formation in rats by aluminum exposure via Wnt/B-catenin pathway. *Chemosphere*, 176, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.02.086>

Sung, H. K., Murugathasan, M., Abdul-Sater, A. A., & Sweeney, G. (2023). Autophagy deficiency exacerbates iron overload induced reactive oxygen species production and apoptotic cell death in skeletal muscle cells. *Cell Death & Disease*, 14(4), 252.

Tarazona Díaz, M. P. (2018). La espirulina una oportunidad como alimento funcional. *UTADEO*, 1(1): 12-25.<http://hdl.handle.net/20.500.12010/8816>

Terzioğlu, M. E., Edebali, E., & Bakirci, İ. (2023). Investigation of the Elemental Contents, Functional and Nutraceutical Properties of Kefirs Enriched with *Spirulina platensis*, an Eco-friendly and Alternative Protein Source. *Biological Trace Element Research*, 1-13.

Timme-Laragy, A. R., Hahn, M. E., Hansen, J. M., Rastogi, A., & Roy, M. A. (2018, August). Redox stress and signaling during vertebrate embryonic development: Regulation and responses. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 80, pp. 17-28). Academic Press.

Trenfield, M. A., Markich, S. J., Ng, J. C., Noller, B., & van Dam, R. A. (2012a). Dissolved organic carbon reduces the toxicity of aluminum to three tropical freshwater organisms.

Environmental Toxicology and Chemistry, 31(2), 427-436.
<https://doi.org/10.1002/etc.1704>

Vasquez, M. I., Lambrianides, A., Schneider, M., Kümmerer, K., & Fatta-Kassinos, D. (2014).

Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: What we know and what we should know. *Journal of Hazardous Materials*, 279, 169-189.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.06.069>

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

Vidya PV, Chitra KC. 2017. Assessment of acute toxicity (LC50-96 h) of aluminium oxide, silicon dioxide and titanium dioxide nanoparticles on the freshwater fish,

Oreochromis mossambicus (Peters, 1852). *Int J Fish Aquat. Stud.* 5(1):327-332.

Vignal, C., Desreumaux, P., & Body-Malapel, M. (2016). Gut: An underestimated target organ for Aluminum. *Morphologie*, 100(329), 75-84. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2016.01.003>

Vilando, A. C., Caparanga, A. R., & Lu, M. C. (2019). Enhanced recovery of aluminum from wastewater using a fluidized bed homogeneously dispersed granular reactor.

Villota MT, Morales MAR, Rodríguez LDM. La biorremediación con microalgas (*Spirulina máxima*, *Spirulina platensis* y *Chlorella vulgaris*) como alternativa para tratar la eutrofización de la laguna de Ubaque, Colombia. *Rev Investig Desarro Innov.* 2018; 9(1):163-76.

doi: 10.19053/20278306.v9.n1.2018.8153

Vizarreta Luna, G. A. (2021). Evaluación de riesgo tóxico y ecotoxicológico de la Laguna Quiulacocha en el Distrito Simón Bolívar, Departamento de Pasco, Perú. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/4696>

Voigt, C. L., da Silva, C. P., Doria, H. B., Randi, M. A. F., de Oliveira Ribeiro, C. A., & de Campos, S. X. (2015). Bioconcentration and bioaccumulation of metal in freshwater Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8242-8252. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3967-4>

Wang, M., Yin, Z., Sun, W., Zhong, Q., Zhang, Y., & Zeng, M. (2023). Microalgae play a structuring role in food: Effect of *spirulina platensis* on the rheological, gelling characteristics, and mechanical properties of soy protein isolate hydrogel. *Food Hydrocolloids*, 136, 108244.

Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., & Broschard, T. H. (2011). Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology*, 281(1-3), 25-36. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.01.004>

Wells, P., Bhuller, Y., Chen, C., Jeng, W., Kasnovic, S., Kennedy, J., ... Nicol, C. (2005). Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive

oxygen species. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 207(2), 354-366. doi:10.1016/j.taap.2005.01.061 10.1016/j.taap.2005.01.061

Wu, J., Du, F., Zhang, P., Khan, I. A., Chen, J., & Liang, Y. (2005). Thermodynamics of the interaction of aluminum ions with DNA: Implications for the biological function of aluminum. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 99(5), 1145-1154. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.02.010>

Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X., & Zhu, W. (2011). Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of the Total Environment*, 409(8), 1444-1452. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.015>

Yeung, Y. K., Kang, Y. R., & Chang, Y. H. (2023). Synbiotic Encapsulation with Maillard Reaction Product and Okra Pectic Oligosaccharide to Enhance the Survival of *Lactiplantibacillus Plantarum*. *Food and Bioprocess Technology*, 1-15.

Yokel, R. A., Lasley, S. M., & Dorman, D. C. (2006). The speciation of metals in mammals influences their toxicokinetics and toxicodynamics and therefore human health risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 9(1), 63-85. <https://doi.org/10.1080/15287390500196230>

Yousef, M. I. (2004). Aluminium-induced changes in hemato-biochemical parameters, lipid peroxidation and enzyme activities of male rabbits: Protective role of ascorbic acid. *Toxicology*, 199(1), 47-57. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.02.014>

Younis, M., Akram, N. A., Latef, A. A. H. A., & Ashraf, M. (2023) Appraisal of Improvement in Physiological and Metabolic Processes by Exogenously Applied Natural and Synthetic Ascorbic Acid in Okra (*Abelmoschus esculentus* L.) Fruit Subjected to Water Deficit Stress. *Phyton*

Youssef, I. M., Saleh, E. S., Tawfeek, S. S., Abdel-Fadeel, A. A., Abdel-Razik, A. R. H., & Abdel-Daim, A. S. (2023). Effect of *Spirulina platensis* on growth, hematological, biochemical, and immunological parameters of Nile tilapia

(*Oreochromis niloticus*). *Tropical Animal Health and Production*, 55(4), 275.

Zhang, C., Willett, C., & Fremgen, T. (2018). Zebrafish: An Animal Model for Toxicological Studies. *Current Protocols in Toxicology*, 17(1), 1-18. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0107s17>.

Zhang, X., Shen, M., Wang, C., Gao, M., Wang, L., Jin, Z., & Xia, X. (2023). Impact of aluminum exposure on oxidative stress, intestinal changes and immune responses in red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Science of The Total Environment*, 855, 158902.

Zhu, J., Cai, Y., Wakisaka, M., Yang, Z., Yin, Y., Fang, W. & Zheng, A. L. T. (2023). Mitigation of oxidative stress damage caused by abiotic stress to improve biomass yield of microalgae: A review. *Science of The Total Environment*, 165200