

Determinación de Cu, Zn, Pb y Cd por espectrometría de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado en órganos de la especie *Gambusia punctata* (Poeciliidae)

*Determination of Cu, Zn, Pb and Cd by Atomic Emission Spectrometry with Inductively Coupled Plasma in Organs of the Specie *Gambusia punctata* (Poeciliidae)*

MSc. George Argota-Pérez^I, Lic. Humberto Argota-Coello^{II}, Dr. Jesús Rodríguez-Amado^{III},

MSc. Ángel Fernández-Heredia^{III}

george.argota@gmail.com



^ICentro de Toxicología y Biomedicina, Santiago de Cuba, Cuba; ^{II}Empresa Geominera Oriente, Santiago de Cuba, Cuba; ^{III}Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

● Resumen

El objetivo del presente trabajo fue la adecuación del método ICP-AES a la cuantificación de Cu, Zn, Pb y Cd en cerebro, hígado y branquias de la especie *Gambusia punctata* para conocer el nivel de exposición de los ecosistemas San Juan y Filé, de la provincia Santiago de Cuba. El ajuste del método al propósito se logró evaluando los límites de detección, reproducibilidad y veracidad en patrones de referencia certificados de peces. Las muestras biológicas fueron clasificadas según el ecosistema, longitud, sexo y órgano. Una vez secadas y tratadas con mezcla de ácidos, los metales fueron medidos en el espectrómetro. Los resultados obtenidos demostraron que los factores longitud y sexo no influyeron en la bioacumulación, mientras que en las branquias fue donde se bioacumularon todos los elementos. Finalmente, considerando que las menores concentraciones de metales estuvieron en el ecosistema Filé, este puede ser utilizado como referencia ambiental.

Palabras clave: metales, ICP-AES, bioacumulación, *Gambusia punctata*.

● Abstract

The aim of this research was to adequate the ICP-AES method to the quantification of Cu, Zn, Pb and Cd in brain, liver and gills of the specie *Gambusia punctata*, in order to know the level of exposure of the ecosystems San Juan and File in Santiago de Cuba province. To achieve the fitness for purpose of the method, limits of detection, reproducibility and accuracy were evaluated using reference certificated materials of fishes. The biological samples were classified according the ecosystem, length, sex and organ. It were dried, digested with mix of acids and the metals measured in the spectrometer. The results demonstrated that factors as length and sex have not influence in the bioaccumulation, whereas the gill was the organ where all the elements were bioaccumulated. Finally, due that the smallest concentrations of metals were in the Filé ecosystem, it could be used as an environmental reference.

Key words: metals, ICP-AES, bioaccumulation, *Gambusia punctata*.

● Introducción

Los metales son componentes naturales de la corteza terrestre que no pueden degradarse ni destruirse con facilidad y constituyen contaminantes estables y persistentes en el medioambiente. La actividad humana ha modificado drásticamente los ciclos biogeoquímicos de algunos metales, pudiendo influir en sus efectos tóxicos potenciales de dos maneras: variando la calidad y cantidad del agua, suelo, aire y alimentos, así como alterando la forma química de los elementos /1/.

La especiación de metales en muestras medioambientales es un reto para la química analítica. En primer lugar, por las dificultades asociadas a la complejidad de las matrices naturales y en segundo lugar, porque el tratamiento de las muestras puede provocar cambios en el equilibrio entre las formas químicas presentes en el sistema analítico. Además, la carencia de muestras de referencias o matrices estandarizadas, así como las bajas concentraciones que presentan la mayoría de las especies químicas en las muestras, hacen que se necesiten sistemas analíticos de una alta sensibilidad y selectividad para lograr una determinación fiable /2/.

Entre las áreas de aplicación de los análisis de especiación de los metales, se encuentran la medioambiental y la biológica. En el primer caso, se evalúa el riesgo medioambiental potencialmente peligroso para las especies vivas que habitan los ecosistemas, ya sean de forma disueltas o acumuladas en diferentes órganos y en el segundo caso se esclarecen los mecanismos de biotransformación de las formas químicas e iones metálicos inorgánicos. En ambos casos los problemas analíticos que hay que resolver son muy similares, siendo por tanto una distinción en la aplicación, más que en el tipo de formas químicas /3/.

En el caso particular de los ecosistemas acuáticos, las tendencias actuales para conocer los efectos nocivos es a través del monitoreo con organismos naturales, los cuales constituyen herramientas fundamentales para evaluar el estado ambiental /4/. En estos sistemas, los peces fueron de los primeros organismos en ser utilizados en los

protocolos de evaluación ambiental y aún siguen siendo de elección como especies centinelas /5/. Lo más importante de todas sus características es que están en la cumbre de la cadena alimenticia y pueden afectar directamente a la salud humana, lo cual aumenta su importancia en estos estudios /6/.

La especie *Gambusia punctata* es un pez de la familia *Poeciliidae*, que habita de forma natural en los ríos cubanos y ha sido utilizada tradicionalmente en el control biológico, además de emplearse como indicador a la exposición ambiental de metales en las aguas /7/.

Para la determinación de metales en matrices biológicas, es necesario realizar la digestión de las muestras /8/. El método más utilizado es la disolución ácida, la cual puede clasificarse en tres tipos fundamentales: digestión ácida propiamente dicha /9/, digestión ácida a alta presión mediante el empleo de reactores de teflón /10/ y digestión ácida asistida por microondas /11/.

En la actualidad, para la cuantificación de metales está más extendido el uso la Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-AES), debido al alto grado de automatización que ofrece, así como a su buena sensibilidad, reproducibilidad y rapidez de trabajo /12/.

El objetivo del presente trabajo fue la adecuación del método ICP-AES con vista axial a la cuantificación de cobre, cinc, plomo y cadmio en branquias, hígado y cerebro de la especie *Gambusia punctata*, para conocer el nivel de exposición de los ecosistemas San Juan y Filé en la provincia Santiago de Cuba.

● Materiales y métodos

Selección de las muestras

Se seleccionaron peces adultos de la especie *Gambusia punctata*. Los mismos se clasificaron según el río de procedencia (San Juan y Filé), sexo (machos y hembras), longitud (2.1-3.0 cm y 3.1-4.0 cm) y órgano en la bioacumulación (cerebro, hígado y branquias) /13/. Los elementos que se analizaron fueron cobre, zinc, plomo y cadmio.

Preparación de las muestras

La especie fue colocada en posición ventral y mediante la utilización de una pinza de sujeción dentada, se realizó una conización posterior a los orificios nasales correspondiente en la región cefálica hasta visualizar y extraer con ayuda de una pinza de disección lisa el cerebro. Posteriormente, la especie fue colocada en posición dorsal y mediante la utilización de dos pinzas de disección lisas, fueron abiertos los opérculos para extraer los arcos branquiales. En esta misma posición, se realizó un corte con una tijera curva para extraer el hígado.

Digestión de las muestras

Los órganos una vez extraídos fueron tratados individualmente en forma de pool y colocados en estufa a 70 °C durante 48 h para su secado total /7/. Las muestras de cada órgano fueron trituradas y homogenizadas utilizando un mortero de ágata /14/.

Para el análisis se pesaron en balanza analítica 0,5 g de las muestras, colocándose las mismas en vasos de precipitados de 250 mL. Se adicionaron 5 mL de una mezcla de ácidos HClO_4 : H_2SO_4 (7:1) y

15 mL de HNO_3 concentrado y la digestión se efectuó en una plancha de calentamiento a 80 °C hasta la evaporación total de la mezcla de ácidos. Se añadió nuevamente 5 mL de HNO_3 concentrado y se calentó hasta la aparición de sales húmedas. Finalmente, se trasvasó cuantitativamente a frasco volumétrico de 25 mL, con la ayuda de una disolución de ácido nítrico 0,7 M.

Preparación de la curva de calibración

La curva de calibración se realizó a partir de reactivos de calidad espectral considerando los valores certificados de las muestras patrones de referencia DOLT-3 (Dogfish Liver) y DORM-2 (Dogfish Muscle), ambas de peces no expuestos a contaminación con metales pesados. Se partió de una solución patrón de 1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y los estándares de calibración se prepararon por dilución de la misma con solución de HNO_3 0,7 M.

Condiciones instrumentales

Se determinaron los contenidos de los metales Cu, Zn, Pb y Cd realizando las mediciones en el espectrómetro ICP-AES con vista axial de la firma alemana Spectro-Arco, según las condiciones reportadas en la tabla 1.

TABLA 1. CONDICIONES INSTRUMENTALES

PARÁMETROS	CONDICIONES
Tipo de nebulizador	Meinhard (concéntrico)
Grátula	2 400 líneas /mm
Frecuencia	27 MHz
Energía del plasma	1,4 kW
Velocidad de flujo del gas	18,8 L/min
Pre flujo	2 mL/min
Velocidad de bombeo de la muestra	15 rpm
Tiempo de integración	3 segundos
Ranura de entrada de la radiación	25 μm

Análisis de los datos

El tratamiento de los resultados se realizó aplicando métodos estadísticos utilizando el software profesional Statgraphics /15/.

● Resultados y discusión

Adecuación del método

Para conocer si el método aplicado se ajusta al propósito que se persigue en la investigación /16, 17/ se estudiaron las características básicas de desempeño:

1. Límites de detección y cuantificación: debido a que el método ICP-AES con vista axial proporciona límites de detección del orden de 10^{-9} g para la mayoría de los elementos metálicos y además es un método rápido y fiable, se seleccionó el mismo como método analítico en este trabajo.
2. Veracidad: para garantizar resultados exactos cuando se aplican métodos analíticos se utilizan materiales de referencia certificados con matrices de composición similar a las muestras que se analizan. En este trabajo se emplearon las muestras patrones de referencia certificadas DOLT-3 (Dogfish Liver) y DORM-2 (Dogfish Muscle), ambas de peces no expuestos a contaminación con metales pesados.
3. Reproducibilidad: se evaluó la precisión del procedimiento en condiciones de repetibilidad a partir de 6 determinaciones de cada elemento en las muestras patrones de referencia.

TABLA 2. VALORES DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN (EN $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

ELEMENTO	LD	LC
Cu	0,016 3	0,019 5
Zn	0,020 2	0,051 3
Pb	0,008	0,031
Cd	0,007 3	0,009 7

TABLA 3. RESULTADOS DE ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS PATRONES DE REFERENCIA (EN $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)

MUESTRA PATRÓN	ELEMENTO	VALOR CERTIFICADO	VALOR PROMEDIO	RSD _{exp}	RSD _{rep}
DOLT-3	Cu	$31,2 \pm 1,00$	31,4	1,34	4,76-7,14
	Zn	$86,6 \pm 2,4$	85,6	2,95	4,09-6,14
	Pb	$0,319 \pm 0,05$	0,316	6,79	9,51-14,3
	Cd	$19,4 \pm 0,6$	19,2	4,01	5,13-7,69
DORM-2	Cu	$2,34 \pm 0,16$	2,29	4,57	7,06-10,6
	Zn	$25,6 \pm 2,3$	25,8	7,10	4,90-7,36
	Pb	$0,065 \pm 0,01$	0,066	10,2	12,0-18,1
	Cd	$0,043 \pm 0,01$	0,043	7,57	12,8-19,3

Análisis de las muestras

La tabla 4 muestra los resultados experimentales obtenidos para cada una de las combinaciones estudiadas. El factor longitud está expresado en

Los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros evaluados anteriormente fueron:

1. *Límites de detección y cuantificación:* Se midieron las intensidades de emisión de 20 blancos para cada uno de los elementos a estudiar preparados con solución de ácido nítrico 0,7 M. A estos resultados se les calculó la media y desviación estándar, obteniéndose los parámetros límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para cada uno de los elementos. Los resultados se reportan en la tabla 2.
2. *Veracidad:* en la tabla 3 se muestran los valores experimentales obtenidos de seis réplicas por elemento durante el análisis de las muestras patrones de referencia. Como se puede observar, los valores promedio de los análisis están dentro de los límites de incertidumbre certificados por las muestras patrones de referencia, lo que indica que el método analítico no presenta errores sistemáticos.
3. *Reproducibilidad:* se calcularon las desviaciones típicas relativas experimentales (RSD_{exp}), y se compararon con los límites establecidos por la ecuación de Horwitz en condiciones de repetibilidad (RSD_{rep}) para los niveles de concentración correspondientes. Como se puede apreciar de la tabla 3, las precisiones obtenidas están en correspondencia con los valores permisibles para esos niveles de concentración /17/, indicando que los límites de confiabilidad de las medias son adecuados para cada uno de los elementos analizados, indicando que el método es reproducible.

centímetros y los contenidos de los elementos se reportan en $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$. Cuando no se detecta (ND) la señal analítica de un elemento, se asume para el cálculo el valor de su límite de detección (ver tabla 2).

La aplicación del análisis de varianza factorial a los resultados de la tabla 4, permitió identificar los factores que influyeron significativamente en la bioacumulación de los elementos estudiados.

En la tabla 5 se presentan los resultados de este cálculo y en la última columna aparecen los valores experimentales de probabilidad evaluados en la distribución de Fisher.

TABLA 4. RESULTADOS EXPERIMENTALES

EXP	FACTORES INFLUYENTES				VARIABLE DE RESPUESTA			
	RIO	LONGITUD	SEXO	ÓRGANO	Cu	Zn	Pb	Cd
1	San Juan	2,1 – 3,0	Machos	Cerebro	ND	ND	ND	ND
2	San Juan	2,1 – 3,0	Machos	Higado	42,29	79,19	ND	ND
3	San Juan	2,1 – 3,0	Machos	Branquia	48,20	50,66	0,026	18,51
4	San Juan	2,1 – 3,0	Hembras	Cerebro	ND	ND	ND	ND
5	San Juan	2,1 – 3,0	Hembras	Higado	44,57	80,46	ND	ND
6	San Juan	2,1 – 3,0	Hembras	Branquia	49,22	51,76	0,035	19,69
7	San Juan	3,1 – 4,0	Machos	Cerebro	ND	ND	ND	ND
8	San Juan	3,1 – 4,0	Machos	Higado	42,79	78,42	ND	ND
9	San Juan	3,1 – 4,0	Machos	Branquia	47,19	51,71	0,029	18,72
10	San Juan	3,1 – 4,0	Hembras	Cerebro	ND	ND	ND	ND
11	San Juan	3,1 – 4,0	Hembras	Higado	46,71	79,51	ND	ND
12	San Juan	3,1 – 4,0	Hembras	Branquia	51,15	52,38	0,039	19,77
13	Filé	2,1 – 3,0	Machos	Cerebro	ND	ND	ND	ND
14	Filé	2,1 – 3,0	Machos	Higado	24,2	53,21	ND	ND
15	Filé	2,1 – 3,0	Machos	Branquia	31,2	44,18	0,010	12,32
16	Filé	2,1 – 3,0	Hembras	Cerebro	ND	ND	ND	ND
17	Filé	2,1 – 3,0	Hembras	Higado	25,8	55,30	ND	ND
18	Filé	2,1 – 3,0	Hembras	Branquia	31,9	44,21	0,012	12,58
19	Filé	3,1 – 4,0	Machos	Cerebro	ND	ND	ND	ND
20	Filé	3,1 – 4,0	Machos	Higado	24,6	52,22	ND	ND
21	Filé	3,1 – 4,0	Machos	Branquia	30,7	44,20	0,013	12,12
22	Filé	3,1 – 4,0	Hembras	Cerebro	ND	ND	ND	ND
23	Filé	3,1 – 4,0	Hembras	Higado	23,83	53,72	ND	ND
24	Filé	3,1 – 4,0	Hembras	Branquia	32,0	44,22	0,012	12,55

Como se puede apreciar, los factores longitud y sexo no influyen significativamente en la bioacumulación de ninguno de los elementos estudiados ($p > 0,05$), indicando que estas características no deben emplearse para evaluar el comportamiento de éstos elementos tóxicos en los ecosistemas /6/.

Es importante destacar que la longitud es un indicador de crecimiento, la cual está favorecida entre otras razones por la disponibilidad alimentaria en el medio, encontrándose entre ellos elementos minerales esenciales para el metabolismo (Cu y Zn). En aquellas circunstancias donde exista una exposición

a elementos no esenciales (Pb y Cd), estos pueden ser acumulados igualmente por diferentes mecanismos biológicos como expresión de tolerancia a la adaptación.

Por cuanto, la no existencia de diferencias significativas en las concentraciones entre los intervalos de longitud, debió estar dado a que aún cuando biológicamente los niveles de metales vayan aumentando en los tejidos de los órganos seleccionados, la acumulación siempre será proporcional a la longitud, pudiendo estar justificado por la mayor expresión cinética de la tasa metabólica de ingreso con relación a la menor cinética de

TABLA 5. ANÁLISIS DE VARIANZA FACTORIAL PARA LOS ELEMENTOS ESTUDIADOS

ELEMENTO	FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	gl	CUADRADO MEDIO	F _{calc}	p-valor
Cu	RÍO	911	1	911	34,5	0,00
	LONGITUD	0,105	1	0,11	0,00	0,95
	SEXO	8,18	1	8,18	0,31	0,58
	ÓRGANO	7 539	2	3 769	143	0,00
	RESIDUAL	475	18	26,4		
	TOTAL	8 934	23			
Zn	RÍO	735	1	735	18,6	0,00
	LONGITUD	0,28	1	0,28	0,01	0,93
	SEXO	2,52	1	2,52	0,06	0,80
	ÓRGANO	18 825	2	9 413	239	0,00
	RESIDUAL	710	18	39,5		
	TOTAL	20 274	23			
Pb	RÍO	$280 \cdot 10^{-6}$	1	$280 \cdot 10^{-6}$	7,79	0,01
	LONGITUD	$4,17 \cdot 10^{-6}$	1	$4,17 \cdot 10^{-6}$	0,12	0,74
	SEXO	$16,7 \cdot 10^{-6}$	1	$16,7 \cdot 10^{-6}$	0,46	0,50
	ÓRGANO	$1 045 \cdot 10^{-6}$	2	$522 \cdot 10^{-6}$	15,5	0,00
	RESIDUAL	$647 \cdot 10^{-6}$	18	$35,9 \cdot 10^{-6}$		
	TOTAL	$1 993 \cdot 10^{-6}$	23			
Cd	RÍO	30,6	1	30,6	8,85	0,01
	LONGITUD	$1,5 \cdot 10^{-4}$	1	$1,5 \cdot 10^{-4}$	0,00	0,99
	SEXO	0,36	1	0,36	0,10	0,75
	ÓRGANO	1 327	2	664	192	0,00
	RESIDUAL	62,3	18	3,46		
	TOTAL	1 421	23			

excreción, trayendo consigo retención de los elementos, siempre que la exposición a los mismos en el medio sea persistente. En el caso del sexo, la no diferencia significativa entre ellos, pudo estar dado simplemente porque la exposición a los elementos metálicos es la misma para ambos sexos.

Los factores río y órgano presentaron diferencias significativas para todos los elementos estudiados ($p < 0,05$). Las magnitudes individuales de estas diferencias se evaluaron aplicando la prueba de intervalos múltiples de Duncan /18/ y los resultados obtenidos se presentan en la tabla 6.

TABLA 6. PRUEBA DE DUNCAN PARA LAS DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS

METAL	RÍO		ÓRGANO		
	San Juan	Filé	Cerebro	Higado	Branquia
Cu	31,0 **	18,7 *	0,016 *	34,3 **	40,2 ***
Zn	43,7 **	32,6 *	0,020 *	66,5 ***	47,9 **
Pb	0,016 **	0,009 *	0,008 *	0,008 *	0,022 **
Cd	6,40 **	4,14 *	0,007 *	0,007 *	15,8 **

Los asteriscos indican el número de grupos con diferencias estadísticas significativas. Las casillas sombreadas coinciden con los límites de detección del método.

Todas las concentraciones medias de los elementos metálicos fueron mayores en el ecosistema San Juan comparados con Filé, encontrándose diferencias significativas entre los mismos. Este comportamiento es debido a que los factores de tensión relacionados con el vertimiento de las fuentes tributarias, es mayor en el río San Juan. Por lo tanto, el ecosistema Filé puede ser utilizado como referencia ambiental.

Si se comparan los valores de la tabla 6 con los límites de detección de la tabla 2 (casillas sombreadas), se aprecia que en las branquias se bioacumulaban todos los elementos estudiados, mientras que en el hígado solo se acumularon Cu y Zn. Asimismo, tanto las concentraciones medias de los elementos detectadas en cerebro como los contenidos de Pb y Cd en hígado fueron tan bajos, que coincidieron con los límites de detección del método analítico empleado.

Lo anterior se justifica porque las branquias son los órganos que permiten la entrada, al igual que el oxígeno, de elementos esenciales (Cu y Zn) desde la columna de agua, la cual representa la matriz ambiental de mayor presencia de los mismos /19/. De forma similar ocurre el ingreso permanente de otros elementos como Pb y Cd, que aunque no tienen una función biológica definida, pueden ser retenidos por las branquias, siendo entonces este órgano el blanco inicial de toxicidad por exposición a metales.

Asimismo, una vez que el Cu y Zn son absorbidos por las branquias se transportan al torrente sanguíneo hasta llegar al hígado, ya que el Cu interviene en el metabolismo del tejido conectivo, desarrollo óseo y función nerviosa, mientras que el Zn juega un papel importante en la regulación de la homeostasia /20/. Esto justifica la presencia de ambos elementos en este órgano y la ausencia de Pb y Cd. Finalmente, queda demostrado que en el cerebro no ocurrió acumulación de ninguno de los metales.



Conclusiones

1. La evaluación de las características metodológicas básicas de desempeño del método ICP-AES con vista axial aplicado a la cuantificación de Cu, Zn, Pb y Cd en órganos de peces se ajustó correctamente al propósito para el cual fue adaptado, pues se demostró que los

límites de detección y cuantificación obtenidos fueron adecuados para los niveles de concentración a evaluar, que las precisiones alcanzadas están en correspondencia con los valores permisibles por la ecuación de Horwitz, así como el método no presentó errores sistemáticos.

2. La aplicación del método en órganos de la especie *Gambusia punctata* que habitan en los ecosistemas San Juan y Filé, demostró que en las branquias ocurrió la mayor bioacumulación de metales, sin considerarse para ello el sexo y la longitud.

3. Todas las concentraciones medias de los elementos estudiados fueron mayores en el ecosistema San Juan comparados con Filé, por lo que este último puede ser utilizado como referencia ambiental.



Bibliografía

- JURADO G., J. A. "Metodología analítica para el análisis de cadmio en agua de mar por AdCSV - Distribución y comportamiento biogeoquímico de metales pesados en ecosistemas costeros singulares del golfo de Cádiz: Ría de Huelva y Bahía de Cádiz. 2003". Tesis doctoral. Universidad de Cádiz, Colombia.
- PICKERING, L., W. F. *Chemical Speciation in the Environment*. 2nd Edition. Chapter 2: General Strategies for Speciation. Ed. 2002. Blackwell Science Ltd.
- KOT, A.; J. NAMIESNIK. "The Role of Speciation in Analytical Chemistry". *Trends Anal. Chem.* 2000; 19, 69-79.
- DOYLE, C. T.; C. HANJAVANIT; M. F. MULCAHY. "Squamous Cell Carcinoma in Fish, *Scardinius erythrophthalmus*, in an Area of High Mortality from Oesophageal Carcinoma". *J. Pathol.* 1998; 152 A.
- RAND, G. M.; P. G. WELLS; L. S. MCCARTY. "Introduction to Aquatic Toxicology". En: Rand GM (ed.) *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Taylor y Francis. Washington. 1995; pp. 3-67.
- ZHOU, Q.; J. ZHANG; J. FU; J. SHI; G. JIANG. "Biomonitoring: an Appealing Tool for Ssessment of Metal Pollution in the Aquatic Ecosystem". *Anal. Chim. Acta* 2008; 606, 135-150.
- ARGOTA, G.; Y. GONZÁLEZ; H. ARGOTA; R. FIMIA; J. IANNAcone. "Desarrollo y bioacumulación de metales pesados en *Gambusia punctata* (*Poeciliidae*) ante los efectos de la contaminación acuática". *REDVET Rev. electrón. vet.* 2012; Volumen 13 N° 05B. ISSN 1695-7504.
- MENG, H. C. "Baseline Metal Concentrations in Sediments and Fish, and the Determination of Bioindicators in the Subtropical Chi-Ku lagoon". *S.W. Taiwán. Mar. Pollut. Bull.*, 2002; 44, 703-714.

9. MZIMELA, H. M.; V. WEPENER; D. P. CYRUS. Seasonal Variation of Selected Metals in Sediments, Water and Tissues of the Groovy Mollet, *Liza dumerelli* (Mugilidae) from the Mhlathuze Estuary. South Africa. *Mar. Pollut. Bull.*, 2003; 46, 659-676.
10. SOLTAN, M. E.; M. N. MOALLA S.; M. N. RASHED; E. M. FAWZY. "Physicochemical Characteristics and Distribution of Some Metals in the Ecosystem of Lake Nasser". *Egypt. Toxicol. Environ. Chem.*, 2005; 87(2), 167-197.
11. PYLE, G. G.; J. M. RAJOTTE; P. COUTURE. "Effects of Industrial Metals on Wild fish Populations Along a Metal Contamination Gradient". *Ecotox. Environ. Safe.*, 2005; 61 287-312.
12. GONZALVEZ, A.; M. L. CERVERA; S. ARMENTA; M. DE LA GUARDIA. "A Review of Non-Chromatographic Methods for Speciation Analysis". *Anal. Chim. Acta.* 2009; 636, 129-157.
13. VAN DEN BROEK, J. L.; K. S. GLEDHILL; D. G. MORGAN. Heavy Metal Concentrations in the Mosquito Fish, *Gambusia holbrooki*, in the Manly Lagoon Catchment. En: UTS Freshwater Ecology Report 2002. Department of Environmental Sciences. University of Technology. Sydney.
14. U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories. Volume 1. *Fish Sampling and Analysis*. Third Edition. Disponible en <http://www.epa.gov>. 2000.
15. SOFTWARE: Statgraphics Plus for Windows. Version 5.1. Copyright 1994-2001 for Statistical Graphics Corporation.
16. EURACHEM GUIDE. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Developed by a EURACHEM Working Group, 1998.
17. NORMA CUBANA NC TS-368:2010. Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos. Oficina Cubana de Normalización. 2010.
18. MONTGOMERY, D. C. *Diseño y Análisis de Experimentos*. 3^{era} Edición. Editorial Félix Varela. La Habana. 2004.
19. ALQUEZAR R, BOOTH S, BOOTH D. Metal accumulation in the smooth toadfish, *Tetractenos glaber*, in estuaries around Sydney, Australia. *Environmental Pollution* 2005. XX: 1 - 9.
20. WIDIANARKO B, VAN GESTEL CAM, VERWEIJ RA, VAN STRAALEN NM. Associations between Trace Metals in Sediment, Water and Guppy, *Poecilia reticulata* (Peters), from Urban Streams of Semarang, Indonesia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2000. 46:101-107.