

ORIGINAL ARTICLE

DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA Y CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS EN LA RESERVA NATURAL PUNTA CUCHARAS DE PONCE, PUERTO RICO

Abner J. Colón Ortiz, EdD

Profesor

Departamento de Biología y Ciencias Ambientales

Pontificia Universidad Católica de Puerto Rico

Recinto de Ponce

Ponce, Puerto Rico

abner_colon@pucpr.edu

Jennifer Sotomayor Pabón, BS

Estudiante graduada

Pontificia Universidad Católica de Puerto Rico

Recinto de Ponce

Ponce, Puerto Rico

jennifersotomayor@pucpr.edu

Resumen

La Reserva Natural Punta Cucharas de Ponce es un área que fue designada por su nombre bajo la Ley 227 del 9 de agosto de 2008 del Departamento de Recursos Naturales y Ambientales de Puerto Rico (DRNA). El propósito de esta investigación fue determinar la presencia y concentración de metales pesados en esta Reserva Natural de Ponce, Puerto Rico. Para analizar el propósito de este estudio, se realizó un muestreo de metales pesados, dado que esta reserva es una costera que tiene contacto con el Mar Caribe y los niveles de evaporación son muy altos, por lo que el porcentaje de salinidad y sólidos en el agua es alto, haciendo de esta laguna una hipersalina. Para esta investigación, se hizo un muestreo de agua simple en siete puntos de la Reserva en el 2015, que fueron identificados como puntos A, B, C, D, E, F y G. Estas muestras se analizaron mediante un Inductor de Plasma Acoplado por Emisión de Espectroscopia Óptica (ICP-OES 3300 XL). En los resultados obtenidos se encontró presencia de metales como Arsénico (As), Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Níquel (Ni), Cobre (Cu), Calcio (Ca), Magnesio (Mg), Vanadio (V), Bario (Ba), Sodio (Na), Plomo (Pb) y Aluminio (Al). Para analizar los resultados de la presencia y concentraciones de los metales se usó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis. Los resultados de la prueba fueron significativos, al encontrar diferencias en las concentraciones de As y Ni en todos los puntos de muestreo.

Palabras claves: Reserva Natural Punta Cucharas, metales pesados

Abstract

The Punta Cucharas Natural Reserve in Ponce is an area that was designated by name under the Law 227 of August 9, 2008 of the Department of Natural and Environmental Resources of Puerto Rico. The purpose of this research was to determine the presence and concentration of heavy metals in the Natural Reserve of Ponce, Puerto Rico. To analyze the purpose of this study, sampling of heavy metals was performed, since this reserve is a coastal having contact with the Caribbean Sea and evaporation levels are very high, so that the percentage of salinity and solids in water is high, making it a hyper saline lagoon. For this investigation, a simple water sampling was performed in seven points of the Reserve in 2015, which were identified as points A, B, C, D, E, F and G. These samples were analyzed using an Inductor Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy (3300 XL ICP-OES). In the results obtained were found the presence of metals such as Arsenic (As), Iron (Fe), Manganese (Mn), Nickel (Ni), Copper (Cu), Calcium (Ca), Magnesium (Mg), Vanadium (V), Barium (Ba), Sodium (Na), Lead (Pb) and Aluminum (Al). To analyze the results of the presence and concentrations of metals, the nonparametric Kruskal-Wallis test was used. The test results were significant, finding differences in the concentrations of As and Ni in all sampling points.

Keywords: Punta Cucharas Natural Reserve, heavy metals

INTRODUCCIÓN

La Reserva Natural Punta Cucharas (RNPC) está localizada en las zonas litoral y sub-litoral del Barrio Canas, Sector Punta Cucharas en el Municipio Autónomo de Ponce. Esta es una reserva costera, puesto que tiene contacto con el Mar Caribe. Sus niveles de evaporación son muy altos, por lo que el porcentaje de salinidad y sólidos en el agua es alto, haciendo de esta laguna una hipersalina (Cruz y Cruz, 2009).

El Departamento de Recursos Naturales y Ambientales de Puerto Rico (DRNA) presentó, en junio del 2004, un informe al reconocer el valor natural del área de Punta Cucharas y la importancia de identificar las alteraciones que la amenazan. La RNPC le ofrece refugio, alimento y áreas de reproducción a la fauna, entre las que se encuentran aves, mamíferos, reptiles y anfibios. Por esta razón, se designó por su nombre, Reserva Natural Punta Cucharas, bajo la Ley 227 del 9 de agosto de 2008 del DRNA de Puerto Rico.

De acuerdo con la Ley 227 del DRNA de Puerto Rico, esta reserva cuenta con varios recursos naturales. Entre estos se encuentran ecosistemas de manglares, dunas costeras, la laguna Las Salinas, aguas abiertas y una comunidad local que sin duda la convierte en un lugar de gran importancia ecológica. Según el DRNA (2008), los hábitats de los humedales, de los bosques costeros y de tierras altas en el área natural Punta Cucharas en Ponce constituyen un recurso de alto valor natural.

Como parte del ordenamiento territorial, se han realizado cambios al buscar la mejoría económica del Municipio de Ponce. Un plan de desarrollo importante fue la construcción de un puerto de transbordo propuesto en la costa sur, a unos 5 kilómetros (km) al sur del centro de Ponce. Una de las zonas directamente afectadas por la construcción lo fue la RNPC, una laguna hipersalina situada a unos 5 km al oeste de las principales instalaciones portuarias (Soler, Gómez & Rodríguez, 2005).

Entre los efectos que pudo ocasionar la construcción de este puerto de transbordo se encuentra la posible acumulación de metales pesados que podrían ser letales para la flora y fauna de la RNPC. En esta investigación se determinó la presencia y concentración de metales pesados como parte de un monitoreo de agua para propósitos de control de calidad. Los resultados que se obtuvieron en esta investigación son de gran relevancia para la ciencia, puesto que los hallazgos contribuirán a otras investigaciones para medir el efecto en la flora y la fauna de esta Reserva Natural.

REVISIÓN DE LITERATURA

En el 2004, Dávila y Sustache realizaron una investigación cuyo fin fue describir la composición natural de la RNPC. De acuerdo con su investigación, la diversidad y complejidad de los hábitats presentes en el Área Natural de Punta Cucharas constituye su atributo de mayor relevancia. Esto permite la convivencia e interacción de especies de hábitos diversos, tales como aves de hábitos acuáticos y terrestres, reptiles y anfibios, con requisitos de regímenes de humedad y temperaturas muy variables (Dávila y Sustache, 2004). La topografía, diversidad y propiedades físicas de los suelos presentes en la RNPC propician la formación de áreas húmedas permanentes o estacionales cuya existencia se ve amenazada por la alteración de los patrones hídricos existentes.

En el estudio de Dávila y Sustache (2004), se realizaron seis inventarios de campo, donde se identificaron distintas especies de fauna al incluir especies raras, vulnerables y en peligro de extinción. Como resultados de estos inventarios, se lograron identificar nueve reptiles y cinco anfibios, uno de ellos lo fue *Anolis poncensis*, el cual está clasificado como vulnerable. Además, lograron identificar cinco especies de mamíferos y 56 especies de aves, de estas, seis son especies endémicas, 44 son residentes, 5 son migratorias y sólo una es introducida. También, se identificaron 147 especies de vegetación al dar énfasis en aquella vegetación que le ofrece

hábitat a la fauna de la RNPC.

Según Cruz y Cruz (2009), la RNPC en Ponce es una de las áreas que, por sus características ecológicas, físicas y geográficas, son identificadas y designadas para conservación, preservación o restauración. Por esta razón, encontraron la necesidad de orientar a los ciudadanos sobre el gran valor ecológico de esta Reserva y la importancia de cuidar de la misma. En su estudio se percataron de que, tanto los estudiantes como los ciudadanos aledaños a la RNPC, desconocían el valor ecológico de esta Reserva Natural. Es por esto que desarrollaron materiales educativos con el propósito de fortalecer las destrezas de investigación científica y la integración de información en la RNPC al tema de los ecosistemas acuáticos de Puerto Rico en el nivel elemental. Como parte de estos materiales educativos, crearon “Reserva Natural Punta Cucharas Guía del Maestro” y distintos opúsculos informativos de la RNPC.

No obstante, en un estudio realizado en la laguna Mandinga en Veracruz, México, se estudiaron los efectos negativos de los metales pesados en las ostras (Guzmán, et al., 2009). Para realizar este estudio, se tomaron muestras de agua, sedimentos y ostras. Estas muestras se recogieron en marzo, junio y octubre de 2003 y en enero y mayo de 2004 en tres lugares diferentes de la laguna. Se recolectaron 15 ostras para la determinación de metales (Cr, Cd y Pb), 15 para los estudios histopatológicos, 20 para estudios biométricos y 40 fueron transportados al laboratorio para su desintoxicación y la evaluación de los cambios histopatológicos y contenido de metales.

En este estudio se encontró presencia de niveles elevados a los permitidos de metales (Pb, Cd y Cr). Además, el análisis histopatológico realizado a las ostras reveló lesiones en la glándula digestiva, edema, atrofia del epitelio en los túbulos digestivos, la presencia de vesículas de color marrón, la reacción hemofílica, y necrosis. Los autores encontraron que el 47% de las ostras presentaron lesiones histopatológicas relacionadas con las concentraciones de plomo, cadmio y cromo presentes en la laguna.

MÉTODOS

Localización de las muestras

La colección de las muestras de metales se llevó a cabo en la RNPC de Ponce, Puerto Rico. Para esta investigación, se hizo un muestreo de agua simple en siete puntos de la Reserva, que fueron identificados como puntos A, B, C, D, E,

F y G (Figura 1). El punto E fue el control, este se realizó en la entrada del mar a la laguna. El motivo del muestreo de agua simple fue porque se consideró que las características de la Reserva son homogéneas, es decir, cuando el cuerpo de agua no presenta alteraciones en su composición espacio-temporal. Estas muestras representan las condiciones y características de un cuerpo de agua en el instante en que son tomadas (Mezquida, 2012).



Figura 1. Localización de los puntos de muestreo

Recolección de muestras

Las muestras fueron recolectadas durante la mañana a 20 cm de profundidad en los Puntos A, B, C, D, E, F y G al seguir una cadena de custodia (Roldán y Ramírez, 2008). Para el análisis de metales, las muestras se recolectaron en botellas de polietileno con una preservación física de hielo ($<4^{\circ}\text{C}$) y una preservación química con ácido nítrico (HNO_3) a un pH de aproximadamente 2 (INECC-CCA, 2010). Las muestras se transportaron en una nevera con hielo hasta el laboratorio de bioquímica y toxicología CIC-206 en el Edificio de Ciencias Ambientales de la Pontificia Universidad Católica de Puerto Rico, Recinto de Ponce. Luego, se almacenaron a cuatro grados centígrados hasta ser preparadas para el procedimiento analítico.

Procedimiento analítico

Las muestras se analizaron mediante un Inductor de Plasma Acoplado por Emisión de Espectroscopia Óptica (ICP-OES 3300 XL). El ICP-OES se utilizó para determinar los metales y algunos elementos no metálicos en solución. La técnica utiliza descargas eléctricas que se

requieren para excitar los átomos. Las emisiones emitidas por el plasma son policromáticas, estas son separadas en largos de onda individuales, la emisión de cada especie excitada es identificada y su intensidad se mide sin interferencias de emisiones a otros largos de onda.

Estos largos de ondas determinaron qué metales pesados se encuentran y a qué concentraciones están los mismos en la RNPC de Ponce. Luego del muestreo, se acidificó con ácido nítrico (HNO_3) y se llevó a un pH menor de 2. Pasadas las 16 horas, se verificó el pH nuevamente (con un pH de 2 las muestras pueden almacenarse por un período de 6 meses antes de su análisis). Al momento de analizar las muestras, estas pasaron por un proceso de digestión (proceso en el cual un precipitado es calentado en la disolución a partir de la cual se formó y se mantiene en contacto con la disolución, Skoog et al., 2014). Utilizando una probeta de 50 ml, se transfirieron 50 ml de la muestra previamente preservada con HNO_3 a un vaso de 250 ml. Luego, se le añadió a cada muestra 1 ml de HNO_3 y 0.5 ml de HCl . Se colocó el vaso en un “hot plate” previamente ajustado a una temperatura no mayor de 85°C , evitando que esta hirviera. Se cubrió el vaso con un cristal de reloj para prevenir la contaminación de la muestra. Se redujo el volumen de la muestra a 10 ml. Se cubrió el vaso completamente con el cristal de reloj para reducir la evaporación adicional y se dejó reflujar por 15 minutos. Después de reflujar, se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente y se transfirió la solución a un matraz volumétrico de 50 ml. Finalmente, se llenó el matraz volumétrico hasta la marca con agua deionizada y se mezcló la solución.

El instrumento se calibró al utilizar un blanco de calibración compuesto de HCl y HNO_3 . Los metales analizados fueron Be, B, Cd, Co, Cr, Se, Si, Sr, Ag, Zn, As, Fe, Mn, Ni, Cu, Ca, Mg, V, Ba, Na, Pb y Al. Por esto, se utilizaron dos estándares multielementales de la compañía PelkinElmer, uno de los estándares contenía 1,000 ug/ml de K, 500 ug/ml de Si, 100 ug/ml de Al, B, Ba, Na y 50 ug/ml de Ag, mientras el otro contenía 100 ug/ml de As, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, V y Zn. Se realizó una curva de calibración de 3 puntos. Para hacer esta curva, se prepararon 3 concentraciones a 0, 3 y 5 ppm de cada metal a analizar. Estas tres concentraciones se prepararon a partir de un estándar multielemental al utilizar agua deionizada.

RESULTADOS

Los hallazgos de esta investigación se basan en el análisis de siete puntos de muestreo en la RNPC del área sur de Puerto Rico. Para determinar la presencia y concentración de metales pesados como parte del monitoreo de agua para propósitos de control de calidad se realizó un análisis de concentración de metales para cada punto de muestreo de la RNPC.

A continuación se presentan los hallazgos de los puntos de muestreo de la RNPC (Tablas 1-7). Las Tablas 1-7 presentan las concentraciones de los elementos detectados en cada punto de muestreo. El análisis de las concentraciones mostró que hubo elementos que se detectaron en todos los puntos de muestreo. En las tablas, estos elementos se identifican en azul.

Tabla 1. Punto A

Elementos detectados	Concentración (mg/l)
As	19.1
Fe	1.16
Mn	43.5
Ni	15.6
Cu	0.273
Ca	296
Mg	912
V	3.63
Ba	0.003
Na	21.5

Tabla 2. Punto B

Elementos detectados	Concentración (mg/l)
As	10.1
Fe	0.874
Mn	150
Ni	16.8
Pb	5.68
Cu	1.18
Ca	23.7
Mg	71.6
V	1.79
Ba	0.003
Na	2.68

Tabla 3. Punto C

Elementos detectados	Concentración (mg/l)
As	12.9
Mn	112
Ni	14.3
Pb	13.6
Cu	0.978
Ca	8.63
Mg	23.6
V	6.73
Ba	0.002
Na	1.94

Tabla 4. Punto D

Elementos detectados	Concentración (mg/l)
As	7.68
Mn	88.1
Ni	20.3
Pb	2.32
Cu	0.805
Ca	14.1
Mg	39.2
V	11.1
Al	0.017
Ba	0.002

Tabla 5. Punto E

Elementos detectados	Concentración (mg/l)
As	10.2
Fe	1.23
Ni	18.0
Ba	0.002

Tabla 6. Punto F

Elementos detectados	Concentración (mg/l)
As	14.6
Ni	19.5
Pb	3.49
Cu	0.269
Ca	0.628
Mg	1.61
V	0.354
Ba	0.003

Tabla 7. Punto G

Elementos detectados	Concentración (mg/l)
As	16.9
Ni	20.4
Mn	50.5
Cu	1.66
Ca	4.31
Mg	13.4
V	10.9
Ba	0.003
Na	0.387

Análisis inferencial de los datos

Para analizar la pregunta de investigación *¿Cómo se diferencia la cantidad de elementos detectados en los distintos puntos de muestreo?*, se llevó a cabo una prueba no paramétrica para tres muestras o más. La prueba de Kruskal Wallis se realizó para probar si no existía diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de elementos detectados y los puntos de muestreo. Los resultados de la prueba fueron significativos, $\chi^2 (N=7) = 61.000$, $p=.000$. Este valor de p , si se compara a una significancia de 0.01 ($p < 0.01$) indica que se rechaza la hipótesis nula. Por lo tanto, existe diferencia estadísticamente significativa en la cantidad de elementos detectados y los puntos de muestreo (Tabla 8).

Tabla 8. Prueba de Kruskal Wallis

	Estadístico de contraste
	Elementos detectados
Chi-cuadrado	61.000
gl	6
Sig. asintót	.000

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Puntos de muestreo

Para analizar la pregunta de investigación *¿Cómo se diferencia la concentración de arsénico en los distintos puntos de muestreo?*, se llevó a cabo una prueba no paramétrica para tres muestras o más. La prueba de Kruskal Wallis se realizó para probar si no existía diferencia estadísticamente significativa en la concentración de arsénico y los puntos de muestreo. Los resultados de la prueba fueron significativos, $\chi^2 (N=7) = 91.000$, $p=.000$. Este valor de p , si se compara a una significancia de 0.01 ($p < 0.01$) indica que se rechaza la hipótesis nula. Por lo tanto, existe diferencia estadísticamente significativa en la concentración de arsénico y los puntos de muestreo (Tabla 9).

Tabla 9. Prueba de Kruskal Wallis #2

	Estadístico de contraste
	Concentración arsénico
Chi-cuadrado	91.000
gl	6
Sig. asintót	.000

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Puntos de muestreo

Para analizar la pregunta de investigación *¿Cómo se diferencia la concentración de níquel en los distintos puntos de muestreo?*, se llevó a cabo una prueba no paramétrica para tres muestras o más. La prueba de Kruskal Wallis se realizó para probar si no existía diferencia estadísticamente significativa en la concentración de níquel y los puntos de muestreo. Los resultados de la prueba fueron significativos, $\chi^2 (N=7) = 124.000$, $p=.000$. Este valor de p , si se compara a una significancia de 0.01 ($p < 0.01$) indica que se rechaza la hipótesis nula. Por lo tanto, existe diferencia estadísticamente significativa en la concentración de níquel y los puntos de muestreo (Tabla 10).

Tabla 10. Prueba de Kruskal Wallis #3

	Estadístico de contraste
	Concentración níquel
Chi-cuadrado	124.000
gl	6
Sig. asintót	.000

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: Puntos de muestreo

DISCUSIÓN

Por un lado, en los resultados obtenidos se encontró la presencia de distintos metales, entre estos se encuentran: As, Fe, Mn, Ni, Cu, Ca, Mg, V, Ba, Na, Pb y Al. Sin embargo, no se encontró presencia de Be, Cd, Co, Cr, Se, Si, Ag ni Zn en la RNPC. La concentración encontrada de Pb por punto de muestreo fue: punto B (5.68 mg/L), punto C (13.6 mg/L), punto D (2.32 mg/L) y punto F (3.49 mg/L). De acuerdo con el Reglamento de Estándares de Calidad de Agua de Puerto Rico (2010), la concentración permitida de Pb es de 0.00852 mg/L. De acuerdo con Guzmán et al. (2009), las ostras son incapaces de eliminar las concentraciones de los metales bioacumulados de Pb y Cd durante la etapa de desintoxicación ocasionándole problemas histopatológicos.

Por otro lado, las concentraciones de As encontradas en los puntos de muestreo fueron las siguientes: punto A (19.1 mg/L), punto B (10.1 mg/L), punto C (12.9 mg/L), punto D (7.68 mg/L), punto E (10.2 mg/L), punto F (14.6 mg/L) y punto G (16.9 mg/L). Estas concentraciones superan la concentración establecida por el Reglamento de Estándares de Calidad de Agua de Puerto Rico (2010), la cual es de 0.0360 mg/L. La contaminación de As en el agua potable y de las aguas subterráneas utilizadas para el riego conduce a la contaminación de la cadena alimentaria y presenta serios riesgos de salud a las personas de todo el mundo (Tripathi et al., 2012). El As y sus compuestos se introducen al organismo principalmente por ingestión, en donde el sistema gastrointestinal absorbe en promedio el 80% del As; esta cantidad es variable según algunas características del compuesto y del individuo (Prieto & Báez, 2011).

Las concentraciones de Ni encontradas en el estudio por punto de muestreo fueron: punto A (15.6 mg/L), punto B (16.8 mg/L), punto C (14.3 mg/L), punto D (20.3 mg/L), punto E (18.0 mg/L), punto F (19.5 mg/L) y punto G (control, 20.4 mg/L). Estos resultados evidencian que el

Ni se encuentra en concentraciones elevadas, dado que la concentración establecida por el Reglamento de Estándares de Calidad de Agua de Puerto Rico (2010) es de 0.00828 mg/L. El Cu es un micronutriente esencial necesario para el crecimiento de las plantas y el desarrollo, pero a concentraciones elevadas, es altamente tóxico para el crecimiento de las mismas (Wang et al., 2012). Según Wang et al. (2012), altas concentraciones de Cu potencialmente resultan en la inhibición completa del crecimiento de las plantas. En este estudio se encontraron concentraciones de Cu elevadas en cada punto de muestreo. Punto A (0.273 mg/L), punto B (1.18 mg/L), punto C (0.978 mg/L), punto D (0.805 mg/L), punto F (0.269 mg/L) y punto G (1.66 mg/L). De acuerdo con el Reglamento de Estándares de Calidad de Agua de Puerto Rico (2010), la concentración de cobre no debe exceder de 0.00373 mg/L.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los hallazgos de esta investigación, se infieren las siguientes conclusiones. En primer lugar, se determinó la presencia de metales pesados en todos los puntos de muestreo como lo fue el As, Ba y Ni. La presencia de estos metales pesados en todos los puntos de muestreo, incluyendo el punto control, podría ser indicativo de que este elemento es arrastrado por las escorrentías de agua del Mar Caribe que nutren la RNPC. En segundo lugar, la presencia de arsénico (As) encontrada sin duda afecta la fauna y flora de la RNPC. La exposición a As es un problema significativo de salud ambiental a nivel mundial. El As es tóxico para las plantas, las raíces son generalmente el primer tejido expuesto a As, donde el metaloide inhibe la extensión de la raíz y la proliferación. Además, se ha comprobado que la exposición al arsénico, aunque sea a bajas dosis, se ha asociado con un riesgo superior al normal de cáncer en la piel, pulmón y vejiga, así como, a las enfermedades cardiovasculares y la diabetes (Riedmann et al., 2015). En tercer lugar, la presencia de Pb en la RNPC podría estar afectando la fauna que ingiere agua de esta laguna y la flora presente en la misma. El envenenamiento por Pb es una de las intoxicaciones más frecuentes en el medio ambiente. El Pb es uno de los metales más tóxicos conocidos y sus efectos negativos van desde leves trastornos bioquímicos o fisiológicos a estados patológicos graves, en los que algunos órganos y sistemas pueden ser dañados o tienen sus funciones alteradas (De Francisco et al., 2003).

RECOMENDACIONES

Las recomendaciones de esta investigación son las siguientes: 1) Realizar un estudio donde se determine si los metales As, Ba y Ni provienen del Mar Caribe, puesto que se encontraron en todos los puntos de muestreo, 2) Analizar el impacto de la presencia de estos metales pesados en la flora y fauna presente en la Reserva, 3) Realizar varios muestreos para corroborar las concentraciones de metales obtenidas y 4) Investigar como el As afecta la flora y fauna de la RNPC, dado que se ha comprobado que la contaminación de las aguas con As puede conducir a la contaminación de la cadena alimentaria y plantea serios riesgos de salud para las personas de todo el mundo (Tripathi, et al., 2012).

RECONOCIMIENTOS

Agradecemos a la Pontificia Universidad Católica de Puerto Rico y al Programa Puerto Rico Louis Stokes Alliance for Minority Participation (PR-LSAMP) por su apoyo en el proyecto de investigación y por facilitar la realización de este estudio. Agradecemos la contribución de la Dra. Zaira Mateo y Daisy Morales, por su apoyo, por su dedicación y compromiso.

REFERENCIAS

- Cruz Torres, María de los Ángeles, & Cruz Torres, Natividad. (2009). Educación ambiental: herramienta para proteger la Reserva Natural Punta Cucharas, Universidad Metropolitana, San Juan Puerto Rico.
- Dávila Casanova, Daniel, & Sustache Sustache, José. (2004). Informe sobre valor natural Área Natural Punta Cucharas, Barrio Canas en Ponce, Departamento de Recursos Naturales y Ambientales, Área de planificación integral, División de patrimonio natural, pág. 42. Departamento de Recursos Naturales y Ambientales. (2008). Ley para designar el Área Natural Punta Cucharas del Municipio de Ponce como área de Reserva Natural. Recuperado de <http://www.lexjuris.com/lexlex/Leyes2008/lexl2008227.htm>
- De Francisco, N., Ruiz Troya, J. D., & Agüera, E. I. (2003). Lead and lead toxicity in domestic and free living birds. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A*, 32(1), 3-13.
- Guzmán-García, X., Botello, A. V., Martínez-Tabche, L., & González-Márquez, H. (2009). Effects of heavy metals on the oyster (*Crassostrea virginica*) at Mandinga Lagoon, Veracruz, México. *Revista De Biología Tropical*, 57(4), 955-962.
- INECC-CCA. (2010). Manual de métodos de muestreo y preservación de muestras de las sustancias prioritarias para las matrices del PRONAME: México, p. 55.
- Mezquida Lucas, R. (2012). Toma De Muestras. Corporación autónoma regional de los Valles del Sinu y del San Jorge, CVS laboratorio de calidad de aguas. Versión 5; 2012-10-23 Recuperado de http://www.cvs.gov.co/jupgrade/images/stories/docs/varios/MT-LAB-CVS_04_Toma_de_muestras_V4.pdf

- Prieto, F., & Báez, A. (2011). Concentraciones de arsénico en agua potable y sus implicaciones de bioacumulación y teratogénesis en el pez cebra (*Danio rerio*). *Avances En Ciencias E Ingeniería*, 2(1), 37-50.
- Reglamento de Estándares de Calidad de Agua de Puerto Rico, 2010. Recuperado de <http://www2.pr.gov/agencias/jca/Documents/Leyes%20y%20Reglamentos/Reglamentos/Reglamentos/Reglamento%20Estádares%20Calidad%20de%20Agua%202010.pdf>
- Riedmann, C., Ye, M., Melikishvili, M., Godfrey, S. G., Zhou, Z., Kuey Chu, C., & ... Fondufe-Mittendorf, Y. N. (2015). Inorganic Arsenic-induced cellular transformation is coupled with genome wide changes in chromatin structure, transcriptome and splicing patterns. *BMC Genomics*, 16(1), 1-19. doi:10.1186/s12864-015-1295-9
- Roldán, G. & Ramírez, J. (2008). *Fundamentos de limnología neotropical* (segunda edición). Colombia: Editorial de la Universidad de Antioquia.
- Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, F. J. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9th Edition, USA: Saunders Colleges Publishing.
- Soler-López, Luis, Gómez-Gómez, Fernando, & Rodríguez-Martínez, Jesús. (2005). Hydrologic, water-quality, and biological assessment of Laguna de Las Salinas, Ponce, Puerto Rico. January 2003-September 2004: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report 2005-5154, 50 p.
- Tripathi, R. D., Tripathi, P., Dwivedi, S., Dubey, S., Chatterjee, S., Chakrabarty, D., & Trivedi, P. K. (2012). Arsenomics: omics of arsenic metabolism in plants. *Frontiers in Physiology*, 31-14. doi:10.3389/fphys.2012.00275
- Wang, P., Menzies, N., Wang, Y., Zhou, D., Zhao, F., & Kopittke, P. (2012). Identifying the species of copper that are toxic to plant roots in alkaline nutrient solutions. *Plant & Soil*, 361(1/2), 317-327. doi:10.1007/s11104-012-1260-1

Copyright 2016 Non-Profit Evaluation & Resource Center, Inc.