

## **Efecto del método de cocción sobre la concentración de metales pesados en *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae)**

*Effect of cooking method on heavy metal concentrations in Hoplias malabaricus (Erythrinidae)*

**Maira Alejandra Discuviche<sup>a</sup>, Luty Gomez Cáceres<sup>b</sup>, Carlos Vergara<sup>c</sup>, Karen De Hoyos<sup>d</sup>**

<sup>a</sup> Universidad de sucre, facultad de Educación y Ciencias, Sistema de Universidades Estatales del Caribe, Sincelejo, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-5875-9218>

<sup>b</sup> M.Sc. Corporación Universitaria del Caribe- CECAR, Facultad de ciencias básicas, ingenierías y arquitectura. Grupo simulación de tecnologías para procesos industriales, Sincelejo, Colombia. <https://orcid.org/0000-0001-9409-4009>

<sup>c</sup> M.Sc. Universidad de Sucre, Facultad de Educación y Ciencias, Grupo de investigación Conservación del Recurso Hídrico y Alimentos (CRHIA), Sincelejo, Colombia <https://orcid.org/0000-0002-7166-861X>

<sup>d</sup> M.Sc. Corporación Universitaria del Caribe- CECAR, Facultad de ingeniería, Grupo simulación de tecnologías para procesos industriales, Sincelejo, Colombia. <https://orcid.org/0000-0002-2865-2137>

Correspondencia: [mdiscuviche@gmail.com](mailto:mdiscuviche@gmail.com)

Recibido: Septiembre 29, 2023. Aceptado: Diciembre 12, 2023. Publicado: Diciembre 20, 2023

### **Resumen**

Dados los impactos de la minería y la agricultura, el mercurio (Hg), metilmercurio (MeHg), zinc (Zn), cadmio (Cd), plomo (Pb) y el cobre (Cu), se han constituido como contaminantes habituales en los peces y los compartimentos ecosistémicos de los humedales de Colombia. Por tal razón, en este estudio se evaluó el efecto de los métodos de cocción (Ahumado, Frito, Guisado, Viuda y Salpicón) sobre las concentraciones de estos metales en el músculo de *Hoplias malabaricus*. Las concentraciones de los metales pesados fueron cuantificadas mediante descomposición térmica, amalgamación y espectroscopía de absorción atómica (EPA-7473) (Hg-MeHg), espectrofotometría de absorción atómica por flama (FLAAS) (EPA-7000B) (Zn-Cu) y espectrometría de absorción atómica en horno de grafito (GFAAS) (EPA-7010) (Pb-Cd). El Zn fue el metal que más fue acumulado, así mismo el Cd (Frito, en Viuda, Ahumado y Salpicón) y el Pb (Salpicón) superaron los límites máximos permisibles (UE, 2018) y FAO (1992) para sus concentraciones medias en músculo de peces para el consumo. De igual forma, se determinaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las cantidades medias de Cd y Pb en músculo cocido en Salpicón y los demás métodos de cocción. Los indicadores de riesgo (DID, HQ y HI) a la salud de la población estudiada por consumo de *Hoplias malabaricus* demuestran que los habitantes de La Mojana están expuestos a un riesgo potencialmente elevado, principalmente por el consumo de esta especie a través de la preparación en Salpicón.

### **Abstract**

Impacts of mining and agriculture have turned mercury (Hg), methylmercury (MeHg), zinc (Zn), cadmium (Cd), lead (Pb) and copper (Cu) into common pollutants in the fish and ecosystem compartments of Colombian wetlands. For this reason, in this study we evaluated concentrations of these metals in *Hoplias malabaricus* muscle, and determining their variations according 5 cooking methods (Smoked, Fried, Stew, Viuda and Salpicón). The concentrations were determined by thermal decomposition, amalgamation and atomic absorption spectroscopy (EPA-7473) (Hg-MeHg), atomic absorption spectroscopy with flame (FLAAS) (EPA-7000B) (Zn-Cu) and atomic absorption spectroscopy in graphite furnace (GFAAS) (EPA-7010) (Pb-Cd). We found Zn was the metal most accumulated in this tissue, likewise Cd (Fried, Viuda, Smoked and Salpicón) and Pb (Salpicón) exceeded maximum permissible limits (EU, 2018) and FAO (1992) for mean concentrations in fish muscle for human consumption. Similarly significant differences ( $p < 0.05$ ) in mean concentrations of Cd and Pb in muscle cooked with Smoked in Salpicón methods were determined respect to the rest. Risk indicators (DID, HQ and HI) for health assessment of the population by consumption of *Hoplias malabaricus* showed La Mojana habitants are exposed to high risk level, mainly due consumption of this species cooked with Salpicón method

**Palabras clave:** Ecotoxicología; humedales; peces; salud pública.

**Keywords:** Ecotoxicology; fish; public health; wetlands.

### **1. Introducción**

El fenómeno de la contaminación con metales pesados en Colombia y la ecorregión de La Mojana, producto de la explotación aurífera y la actividad agrícola ha sido abordado

a través de algunos estudios [1,2,3], que se han orientado fundamentalmente a evaluar y reportar las dinámicas de dicha contaminación en los compartimentos biogeoquímicos de este entramado sistema de humedales que forma parte de

la depresión Momposina y comprende 554500 hectáreas de extensión y que está delimitado por la intersección de las cuencas de los ríos Magdalena, Cauca y San Jorge [4]. Los impactos que genera la contaminación por metales pesados como Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu en los ecosistemas acuáticos, están asociados con la alteración de las condiciones y variables fisicoquímicas del medio, la transformación y degradación de las matrices ecosistémicas, los procesos de toxicidad generados en la biota contaminada y consecuentemente un aumento en la fragilidad de las poblaciones de las especies afectadas, fundamentalmente en la ictiofauna [5].

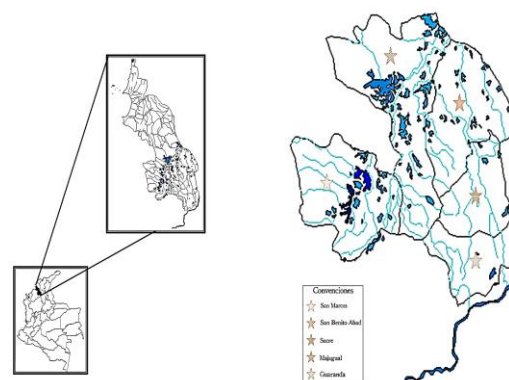
El Hg y sus formas bioactivas (MeHg, DMeHg) pueden causar alteraciones y disfunciones genéticas, celulares, estructurales, orgánicas y de comportamiento en los peces que contaminan, esto debido a que inducen la generación de especies reactivas de oxígeno, lo que les confiere una alta tasa de toxicidad, sumado a su capacidad de biomagnificarse a través de las redes tróficas especialmente en los ecosistemas acuáticos como los humedales de la región de La Mojana [6]. Por otro lado, existen metales esenciales para los organismos como el Zn, el cual es un micronutriente que tiene una función reguladora en el metabolismo, pero cuya bioacumulación en los peces, genera procesos de toxicidad como la disrupción en la función de las enzimas antioxidantes y alteraciones significativas en el transporte de iones a nivel citoplasmático [7]. Otro elemento esencial es el Cu, que interviene en la homeostasis proteica y enzimática, y cuyo exceso en peces afecta principalmente los procesos de excreción y osmorregulación, disminuyendo la excreción de amonio y la absorción de sodio, además genera alteraciones en las branquias de los individuos contaminados [8]. El Cd y el Pb son elementos que no poseen una función biológica documentada [9,10]. En general, el Cd tiende a producir en los peces inmunotoxicidad, nefrotoxicidad y daños en la función de órganos transportadores de iones como las branquias [10], el Pb origina alteraciones estructurales a nivel hematológico, estrés oxidativo, daños neurológicos y cambios comportamentales [11].

El estudio de la contaminación con estos metales en especies de gran interés alimenticio como *Hoplias malabaricus* en la región de La Mojana, permite evaluar y dilucidar los riesgos potenciales a los que están expuestos los habitantes de esta ecorregión debido a que los procesos de bioacumulación y biomagnificación de los metales pesados en los ecosistemas de humedal y su biota, implican tasas de exposición y de toxicidad significativamente elevadas a través del consumo de dicha especie [12]. Por lo tanto, en este estudio se evaluó el efecto de 5 métodos de cocción (Ahumado, Frito, Guisado, Viuda y Salpicón) sobre las concentraciones medias de Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu en el músculo de *Hoplias malabaricus* con el propósito de constatar la existencia de diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las cantidades finales de los metales estudiados y estimar así, las implicaciones potenciales para la salud humana a partir de la ingesta de esta

especie en la región de La Mojana.

## 2. Materiales y métodos

**Área de estudio.** Este estudio fue realizado en los municipios de Guaranda, Majagual, Sucre, San Benito y San Marcos en la región de La Mojana (Figura 1). El influjo constante de los ríos que irrigan a este complejo de humedales da lugar al transporte de una gran cantidad de materiales en sus aguas, como elevadas cantidades de metales pesados (sobre todo Hg) y ciertos compuestos traza producto de la actividad minera que principalmente tiene lugar aguas arriba en los departamentos de Antioquia y Bolívar. Adicionalmente las actividades antropogénicas en la zona de estudio (principalmente la agricultura), representan fuentes significativas de emisión de contaminantes como el Cu, Zn, Pb y el Cd debido a que estos elementos son componentes y aditivos frecuentes de los agroquímicos utilizados para la mantención de los cultivos de interés comercial en la región [13].



**Figura 1.** Localización geográfica de la región de La Mojana: (9° 11' y 8° 17' N)–(74° 32' y 75° 23' W). Fuente: Autor(es).

**Obtención y tratamiento de muestras.** Los peces estudiados se adquirieron en el mercado público del municipio de San Marcos, en este sentido se compraron 10 individuos de esta especie: 5 ahumados y 5 frescos. El peso fue tomado utilizando una balanza digital de precisión Mettler Toledo ME4002 de  $\pm 0,01$  mg de error, los peces fueron identificados utilizando las descripciones del registro de Peces Dulceacuícolas de Colombia del Instituto Humboldt [14]. Posteriormente se empacaron en bolsas separadas de polietileno a  $-5^{\circ}\text{C}$ , almacenados y refrigerados hasta su tratamiento con cada método de cocción. Los peces fueron descongelados, desempaquetados y seccionados con un cuchillo plástico en 5 porciones, realizando 5 repeticiones para cada método de cocción y para el control (tratamientos), resultando un total de  $n=30$  observaciones. De esta forma, en cada método de cocción evaluado en este estudio, se aplicaron las técnicas que son utilizadas por los habitantes de la región Mojana.

**Determinación de Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu.** En el análisis de Hg se tomaron 0,03g de cada muestra liofilizada que fueron introducidas en el analizador, las concentraciones

fueron cuantificadas mediante descomposición térmica, amalgamación y espectroscopia de absorción atómica (EPA-7473) utilizando un analizador directo de mercurio DMA-80 (Tricell) de MILESTONE. Para la cuantificación MeHg las muestras fueron liofilizadas y posteriormente fueron digeridos 0,7g de cada una, con ácido bromhídrico, siendo homogenizadas mediante macerado y posteriormente centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos, finalmente fue realizada la extracción líquido-líquido de 13 mL de la fase orgánica de cada muestra procesada, empleando una alícuota de fase cisteínica para su aislamiento y posterior cuantificación en el analizador directo de mercurio. Para el control de calidad de ambos análisis, fue utilizado material certificado DORM-2 del CRM de músculo de *Squalus acanthias* ( $4,47 \pm 0,032 \mu\text{g/g}$ ). La tasa de recuperación para Hg y MeHg fue de 99,7% (n=3), con umbrales de detección y cuantificación para ambas pruebas de  $0,002 \mu\text{g/g}$  y  $0,03 \mu\text{g/g}$  en cada caso.

La cuantificación de Zn, Cd, Pb y Cu fue realizada mediante espectroscopía de absorción atómica (AA), fueron tomados 5g de cada muestra liofilizada y digeridos en un horno MILESTONE-ETHOS ONE con disolución ácido trioxonítrico (V) - peróxido de hidrógeno (8:2) durante 1 h a  $180^\circ\text{C}$  y el subsecuente análisis implementando un espectrómetro iCE-3500 THERMOSCIENTIFIC. El Zn y el Cu fueron cuantificados usando espectrofotometría de absorción atómica con flama (FLAAS) (EPA-7000B), mientras que las cantidades de Pb y Cd fueron medidas a partir de espectrometría de absorción atómica en horno de grafito (GFAAS) (EPA-7010). El material certificado de referencia que se utilizó en los análisis fue el homogenado IAEA-407 para elementos traza en tejidos de peces Zn ( $67,1 \pm 3,8 \mu\text{g/g}$ ), Cd ( $0,189 \pm 0,019 \mu\text{g/g}$ ), Pb ( $0,12 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$ ) y Cu ( $3,28 \pm 0,40 \mu\text{g/g}$ ). El porcentaje de recuperación medio para todos los metales analizados fue de 97,91% (n=3). Los límites respectivos de detección y cuantificación fueron para Zn ( $0,0290 \mu\text{g/g}$  y  $0,118 \mu\text{g/g}$ ), Cd ( $0,00280 \mu\text{g/g}$  y  $0,010 \mu\text{g/g}$ ), Pb ( $0,00340 \mu\text{g/g}$  y  $0,010 \mu\text{g/g}$ ) y Cu ( $0,00750 \mu\text{g/g}$  y  $0,020 \mu\text{g/g}$ ).

**Análisis estadístico.** Se realizó un análisis descriptivo de las cantidades de Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu en músculo de *Hoplias malabaricus*, indicadas como las medias de las cantidades de cada metal  $\pm$  su desviación estándar. Fue evaluada la normalidad en la distribución de las concentraciones de los metales mediante prueba de Anderson-Darling con un nivel de significancia del 95%. Una vez analizada la normalidad en las distribuciones muestrales de los metales evaluados, fue realizado un ANOVA, así mismo se evaluó la homogeneidad de las varianzas de dichas distribuciones mediante la prueba de homocedasticidad de Levene. A través de la prueba de Dunnett, se constató la existencia de diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los métodos de cocción estudiados sobre las concentraciones de Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu en músculo. El tratamiento de las concentraciones de los metales objeto de estudio fue

realizado con el paquete estadístico MINITAB 19 (Minitab LLC.).

**Caracterización de la población.** La estimación de las implicaciones a la salud producto de la ingesta de *Hoplias malabaricus* por parte de los habitantes de los municipios de Guaranda, Majagual, Sucre, San Benito y San Marcos, se realizó en primera instancia a partir de la caracterización de la población y la posterior aplicación de 600 encuestas diseñadas para recopilar información puntual sobre el consumo de esta especie en función de la frecuencia de consumo, las cantidades de pescado consumidas, los métodos de cocción utilizados, e información relevante de los sujetos encuestados como el peso corporal. El número de cuestionarios aplicados (n=600), fue calculado y tuvo como base de significancia estadística la fórmula de aleatoriedad muestral propuesta por Henry [15] en la Ecuación 1:

$$n = \frac{z^2 pqN}{e^2(N-1) + z^2 pq} \quad (1)$$

N: Tamaño de la población. z: Nivel de significancia (95%) (t = 1,96). pq: Varianza de la población. e: Error estándar de muestreo (0,05).

p= 0,5. q= 0,5 (1-p)

Estimadores de riesgo la salud humana (DID, HQ y HI). Fueron implementados estos estimadores para determinar y evaluar los riesgos potenciales a los que están expuestos los habitantes de La región Mojana por consumo de *Hoplias malabaricus*. Las ecuaciones de los estimadores fueron utilizadas según lo descrito por la FAO/WHO - JECFA (2011) [16]. En este estudio se calcularon las dosis de Ingestión Diaria (DID) a partir de la Ecuación 2:

$$DID = \frac{\sum [C] \text{ IR FAG NDC}}{\text{PC } 365} \quad (2)$$

[C]= Concentración del metal evaluado en las muestras de *Hoplias malabaricus* en  $\mu\text{g/g}$  de fw. IR = Ingesta individual de la especie. FAG = Factor de absorción gastrointestinal de los metales estudiados (se asume el valor de 1 para todos los metales como factor de evaluación preliminar). NDC = Número de días del año en que la población estudiada consume *Hoplias malabaricus*. PC = Peso corporal del sujeto encuestado.

El coeficiente de peligro (HQ) para cada metal fue calculado a partir de la Ecuación 3:

$$\text{HQ} = \text{DID}/\text{IRf} \quad (3)$$

DID = Dosis de ingestión diaria. IRf = Índice de Referencia para las máximas concentraciones tolerables de Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu en el cuerpo humano USEPA/IRIS (2011)

[17] – NOAEL (sin efectos adversos observables). Fueron utilizados los valores de referencia (0,0003 µg/g) para Hg, (0,0001 µg/g) para MeHg, (0,3 µg/g) para Zn y (0,01 µg/g) para Cd. En tanto que se referenciaron (0,14 µg/g) para Pb y (0,04 µg/g) para Cu. Fue considerado un valor de referencia (VR) de coeficiente (HQ y HI) mayor a 1, como existencia de un alto riesgo de incidencia de impactos deletéreos sobre la salud de la población estudiada. De igual forma, el Índice de Riesgo (HI) por exposición a Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu en cada tratamiento estudiado se calculó usando la Ecuación 4:

$$HI = \sum HQi \dots n = HQHg + HQMeHg + HQZn + HQCd + HQPb + HQCu \quad (4)$$

Adicionalmente, se fijaron los valores de referencia (VR) de la UE (2018) y la FAO (1992) como los límites permisibles de seguridad clínica para la ingesta de carne de pescado, estos valores fueron caracterizados en peso fresco (fw) para Hg (0,5), MeHg (0,5 µg/g), Zn (30 µg/g), Cd (0,05 µg/g), Pb (0,3 µg/g) y Cu (20 µg/g), respectivamente.

### 3. Resultados

#### Concentraciones medias de Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu.

En la Tabla 1 se encuentran consignadas las concentraciones medias de Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu para cada método de cocción en el músculo de *Hoplias malabaricus*. Las máximas concentraciones medias de Hg (0,350 ± 0,090 µg/g), Zn (10,33 ± 4,05 µg/g) y Cu (3,82 ± 1,96 µg/g) fueron cuantificadas con el método de freído, mientras que el MeHg registró las mayores concentraciones medias, en músculo fresco sin ningún método de cocción (0,343 ± 0,317 µg/g). Así mismo, fueron detectadas las mayores concentraciones medias de Cd (2,48 ± 1,90 µg/g) y Pb (1,830 ± 1,160 µg/g) en músculo con el método de cocción en Salpicón. El Zn presentó los mayores valores de bioacumulación de todos los metales del estudio, registrando las mayores concentraciones medias generales en todos los métodos de cocción (10,33 ± 4,05 µg/g). Con relación a la comparación entre las concentraciones de Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu cuantificadas en cada método de cocción y los valores de referencia (VR) establecidos por la Unión Europea (UE, 2018) [18] y la FAO (1992) [19] como los límites máximos permisibles de las concentraciones de estos metales en peso fresco para el músculo de peces, se encontraron valores de concentraciones medias de Cd en músculo que superaron los límites de seguridad con los métodos de freído (0,055 ± 0,037 µg/g), en viuda (0,071 ± 0,030 µg/g), ahumado (0,081 ± 0,029 µg/g) y Salpicón (2,48 ± 1,90 µg/g). Adicionalmente, los límites máximos permisibles de Pb también fueron superados por las concentraciones medias en músculo con el método de cocción en Salpicón (1,830 ± 1,160 µg/g).

**Comparaciones entre las concentraciones de Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu en músculo con relación a los métodos de cocción.** En la Tabla 2 se muestran las comparaciones

múltiples de Dunnett. En este sentido, fueron encontradas diferencias estadísticas significativas (p<0.05) en función de las cantidades medias de Cd (2,48 ± 1,90 µg/g) y Pb (1,830 ± 1,160 µg/g) en las muestras de *Hoplias malabaricus* preparadas con el método de cocción en Salpicón. Las comparaciones fueron realizadas a partir de contrastes entre las concentraciones medias determinadas en cada método de cocción y las muestras frescas o de control, siendo las distribuciones y las cantidades medias de Cd (2,48 ± 1,90 µg/g) y Pb (1,830 ± 1,160 µg/g) registradas en el tejido muscular sometido a la cocción con Salpicón, ostensiblemente superiores a las medias de estos dos elementos determinadas en el control y en los métodos de cocción restantes (Figura 2).

**Tabla 1.** Concentraciones medias de Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu en el músculo de *Hoplias malabaricus*. (VR) valores de referencia de la UE (2018) y la FAO (1992) para los límites máximos permisibles en músculo de peces para el consumo humano (en negrilla las concentraciones por encima de los VR).

Tratamiento	Hg	MeHg	Zn	Cd	Pb	Cu
Fresco	0,198 ± 0,093	0,343 ± 0,317	5,66 ± 3,06	0,031 ± 0,018	0,082 ± 0,039	2,26 ± 1,63
	0,108 - 0,327	0,118 - 0,893	2,93 - 10,65	0,012 - 0,051	0,025 - 0,135	0,69 - 4,47
Freído	0,350 ± 0,090	0,289 ± 0,092	10,33 ± 4,05	<b>0,055 ± 0,037</b>	0,094 ± 0,034	3,82 ± 1,96
	0,231 - 0,450	0,190 - 0,408	4,64 - 14,64	0,0243 - 0,101	0,047 - 0,145	1,50 - 6,14
Guisado	0,320 ± 0,185	0,280 ± 0,160	8,51 ± 5,78	0,048 ± 0,02	0,099 ± 0,03	3,29 ± 2,67
	0,179 - 0,62	0,160 - 0,550	3,45 - 18,06	0,023 - 0,08	0,038 - 0,12	0,97 - 7,58
Viuda	0,203 ± 0,091	0,189 ± 0,087	5,17 ± 2,28	<b>0,071 ± 0,030</b>	0,034 ± 0,015	2,10 ± 1,44
	0,126 - 0,32	0,114 - 0,29	3,13 - 8,20	0,028 - 0,113	0,016 - 0,051	0,59 - 3,76
Ahumado	0,249 ± 0,103	0,200 ± 0,069	5,57 ± 2,43	<b>0,081 ± 0,029</b>	0,067 ± 0,025	2,10 ± 1,31
	0,143 - 0,361	0,124 - 0,270	3,10 - 8,13	0,037 - 0,116	0,032 - 0,103	0,65 - 3,70
Salpicón	0,227 ± 0,113	0,170 ± 0,05	4,23 ± 1,91	<b>2,48 ± 1,90</b>	<b>1,830 ± 1,160</b>	1,83 ± 1,16
	0,12 - 0,362	0,110 - 0,25	2,66 - 6,96	<b>0,70 - 4,82</b>	<b>0,67 - 3,35</b>	0,67 - 3,36
VR (µg/g fw)	<b>0,5</b>	<b>0,5</b>	<b>30</b>	<b>0,05</b>	<b>0,3</b>	<b>20</b>

**Tabla 2.** Comparaciones múltiples de Dunnett entre las cantidades de Cd y Pb (µg/g) en músculo de *Hoplias malabaricus* en todos los tratamientos (α=0,05) (En negrilla las diferencias estadísticamente significativas)

Metal	Método de cocción	Repeticiones	Media	Agrupación	p-valor
Cadmio (Cd)	Fresco (control)	5	0,0315	A	1
	Salpicón	5	2,4871	B	<b>0,001</b>
	Ahumado	5	0,0818	A	0,9905
	Viuda	5	0,0714	A	0,9911
	Frito	5	0,0556	A	0,997
	Guisado	5	0,0487	A	0,999
Plomo (Pb)	Fresco (control)	5	0,0827	A	1
	Salpicón	5	1,83	B	<b>0,001</b>
	Guisado	5	0,099	A	0,996
	Frito	5	0,0944	A	0,999
	Ahumado	5	0,0673	A	0,993
	Viuda	5	0,0342	A	0,891

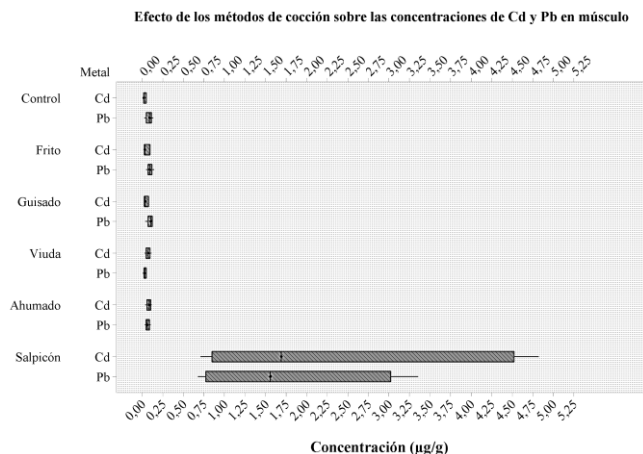


Figura 2. Distribuciones y medias de Cd y Pb y su variabilidad entre los métodos de cocción estudiados. Fuente: Autor(es).

**Cálculo de implicaciones a la salud por ingesta de músculo de *Hoplias malabaricus*.** En las Tablas 3 y 4, se muestran los estimadores de riesgo calculados para las concentraciones de Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu en el músculo de *Hoplias malabaricus*. La dosis de ingesta diaria (DID) de Hg para el control y para todos los métodos de cocción en su respectivo orden (0,00143 µg/g, 0,00253 µg/g, 0,00237 µg/g, 0,00143 µg/g, 0,00179 µg/g y 0,00163 µg/g), así como también las DID de MeHg (0,00247 µg/g, 0,00209 µg/g, 0,00206 µg/g, 0,00136 µg/g, 0,00144 µg/g y 0,00125 µg/g) sobrepasaron los índices de referencia (IRf) para las máximas concentraciones diarias tolerables de estos metales en el cuerpo humano descritos por la USEPA/IRIS (2011) [17], de igual forma, la dosis de ingesta diaria de Cd (0,01800 µg/g) para el pescado cocido con el método de cocción en Salpicón, sobrepasó significativamente los índices de referencia citados, siendo el metal que representa el mayor riesgo de exposición a base de esta preparación, ya que su DID fue la más elevada. (Tabla 3).

Tabla 3. Ingesta diaria de Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu de los habitantes de La Mojana a partir del consumo de *Hoplias malabaricus* e índices de referencia (IRf-NOAEL) para las máximas concentraciones diarias tolerables de estos metales USEPA/IRIS (2011) (en negrilla las dosis que superan los valores permisibles)

Tratamientos	DID (µg/g (PC)/día)					
	Hg	MeHg	Zn	Cd	Pb	Cu
IRf-NOAEL (µg/g)	<b>0,0003</b>	<b>0,0001</b>	0,3	<b>0,01</b>	<b>0,14</b>	<b>0,04</b>
Fresco (control)	<b>0,00143</b>	<b>0,00247</b>	0,040771	0,00023	0,00060	0,01628
Frito	<b>0,00253</b>	<b>0,00209</b>	0,074345	0,00040	0,00068	0,02751
Guisado	<b>0,00237</b>	<b>0,00206</b>	0,061248	0,00035	0,00071	0,02368
Viuda	<b>0,00143</b>	<b>0,00136</b>	0,037128	0,00051	0,00025	0,01513
Ahumado	<b>0,00179</b>	<b>0,00144</b>	0,040810	0,00059	0,00048	0,01515
Salpicón	<b>0,00163</b>	<b>0,00125</b>	0,030477	<b>0,01800</b>	0,01510	0,01318

Los coeficientes de peligro (HQ) para Hg (2,85; 5,05; 4,73; 2,85; 3,58 y 3,26 respectivamente) y para MeHg (10,73; 9,06; 8,94; 5,92; 6,27 y 5,44 respectivamente) por consumo de *Hoplias malabaricus* en todos los tratamientos de cocción, fueron significativamente superiores al umbral de seguridad establecido como valor de referencia (VR=1) por la FAO/WHO - JECFA (2011) [16]. De igual forma, el HQ para Cd (17,91) y Pb (3,26) con las concentraciones detectadas por

el método de cocción en Salpicón, superaron el mencionado umbral. En cuanto al índice de riesgo (HI), fueron encontrados valores muy por encima del umbral de riesgo referenciado (VR=1), los cuales fueron detectados para todos los tratamientos y para todos metales evaluados, encontrándose el HI más elevado con el método de cocción en Salpicón (30,31) y el menor el de la cocción de pescado en viuda (9,840) (Tabla 4).

Tabla 4. Coeficientes de peligro (HQ) e índices de riesgo (HI) estimados para el consumo de *Hoplias malabaricus* en La Mojana en función en los métodos de cocción estudiados (en negrilla los coeficientes que superan los umbrales de riesgo referenciados (VR))

Tratamientos	HQ						HI
	Hg	MeHg	Zn	Cd	Pb	Cu	VR
VR	1	1	1	1	1	1	1
Control	<b>2,85</b>	<b>10,73</b>	0,14	0,23	0,15	0,41	<b>14,51</b>
Frito	<b>5,05</b>	<b>9,06</b>	0,25	0,41	0,17	0,69	<b>15,63</b>
Guisado	<b>4,73</b>	<b>8,94</b>	0,21	0,35	0,18	0,59	<b>15,00</b>
Viuda	<b>2,85</b>	<b>5,92</b>	0,12	0,51	0,06	0,38	<b>9,840</b>
Ahumado	<b>3,58</b>	<b>6,27</b>	0,13	0,59	0,12	0,38	<b>11,07</b>
Salpicón	<b>3,26</b>	<b>5,44</b>	0,11	<b>17,91</b>	<b>3,26</b>	0,33	<b>30,31</b>

#### 4. Discusión

Los conocimientos sobre los procesos de contaminación en los ecosistemas acuáticos y la ictiofauna de La región Mojana con metales pesados que generalmente se constituyen en elementos traza (Zn, Cd, Pb y Cu) aún son escasos. No obstante, las dinámicas contaminantes del Hg y el MeHg en los peces de este entramado de humedales, han sido abordadas y descritas a través de ciertos estudios [20,21,22]. Por lo tanto, se hace necesario señalar que los niveles de acumulación reportados en este estudio y los procesos de contaminación con metales pesados como el Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu en los ecosistemas acuáticos de La Mojana y sus diversas matrices ambientales, obedecen principalmente a dos fenómenos: la explotación aurífera (Hg y MeHg) y la agricultura extensiva a partir de la utilización de agentes agroquímicos que contienen elevadas concentraciones de estos elementos (Zn, Cd, Pb y Cu) [23]. Así mismo, la distribución espacial de estos contaminantes está dada en función de los procesos estacionales de escorrentía de aluvión que ocasionan variaciones en la irrigación de los suelos por los cauces de los ríos Magdalena, Cauca y San Jorge la absorción, retención, movilidad y transformación de estos metales en los sedimentos y el material particulado en las macrófitas y variables fisicoquímicas como el grado de incidencia lumínica sobre los cuerpos de agua y su pH, los niveles de oxígeno disuelto y la influencia microbiana en los procesos de óxido-reducción [13,23,24,25].

En relación a lo anterior las elevadas concentraciones de Zn y Cu cuantificadas en las muestras del tejido muscular de *Hoplias malabaricus*, pueden obedecer al tipo de alimentación de esta especie que es estrictamente carnívora y consume grandes cantidades de otras especies de peces pertenecientes entre otras a los géneros *Triportheus*, *Oreochromis* y *Prochilodus* [26], las cuales habitan los humedales de La Mojana y tienen hábitos tróficos mayoritariamente omnívoros e iliófagos, pudiendo dar lugar

a un proceso de bioacumulación eficiente de estos dos metales en el tejido muscular y los compartimentos orgánicos de *Hoplias malabaricus*, ya que el Zn y el Cu tienden a precipitarse y a fijarse en el detritus y el manto de sedimentos de los cuerpos de agua que funge como sustrato alimenticio para estos géneros [27]. De esta manera siendo el Zn y el Cu elementos esenciales, poseen numerosas rutas y una alta afinidad metabólica en el organismo de los peces [28]. Por estas razones, la contaminación con Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu en peces asociados a ecosistemas acuáticos como los humedales de La Mojana, da lugar al debilitamiento, fragilidad y desaparición de sus poblaciones, ya que las manifestaciones toxicológicas de estos contaminantes provocan graves detrimentos en la capacidad y respuesta de supervivencia y adaptación de los individuos, como resultado de cambios drásticos en el comportamiento, la aptitud reproductiva y alimentaria [29].

Las diferencias significativas producto de la influencia del método de cocción de Ahumado en Salpicón sobre las cantidades medias de Cd y Pb en músculo de *Hoplias malabaricus*, pueden haberse originado inicialmente a partir de los procesos de deshidratación que sufre el músculo cuando es sometido en primera instancia al ahumado y al posterior freído, ya que los niveles de proteína, lípidos, minerales y ciertos macronutrientes contenidos en este tejido pasan a ser el mayor constituyente del mismo [30,31]. Dando lugar a variaciones en la biodisponibilidad de los metales pesados contenidos en el músculo [32,33], siendo este fenómeno muy posiblemente influenciado por la gran afinidad química y persistencia de estos xenobióticos en el componente estructural de las matrices musculares [34] y ósea [35] que poseen metales como el Cd y el Pb, disminuyendo así la tasa de degradación de los mismos durante el tratamiento. Estos factores, en conjunto con la influencia de los ingredientes añadidos a esta preparación y la fisiología de *Hoplias malabaricus* [36] podrían estar afectando la solubilización, volatilización, afinidad, el pH y otras variables fisicoquímicas que originen cambios significativos en las concentraciones cuantificadas de Cd y Pb [37].

En la determinación de la DID, el HQ y el HI en la población de la región Mojana de Colombia, para Hg y MeHg, al igual que para el Cd, se observaron valores (ver Tabla 3 y Tabla 4) que superan los estándares de seguridad clínica y alimentaria citados (ver metodología: Estimadores de riesgo la salud humana (DID, HQ y HI)) respecto al consumo de *Hoplias malabaricus*, pudiendo generar esto una serie de alteraciones, interferencias y disfunciones que van desde cambios en la estructura y expresión del componente genético, disrupción del ciclo celular e inmunotoxicidad, genotoxicidad, aumentos en los niveles de estrés oxidativo por desnaturalización del complejo enzimático antioxidante, daños en la estructura y función neuronal, degradaciones estructurales del componente sanguíneo sobre todo en los hematíes y leucocitos, teratogenicidad, detrimentos cognitivos y

motores, así como también alteraciones en las tasas de fertilidad [38-40]. Adicionalmente, estos índices demuestran que existe una alta incidencia de riesgos e impactos a la salud general de los pobladores de La Mojana por exposición a los contaminantes estudiados, producto del consumo de *Hoplias malabaricus* en todos los métodos de cocción estudiados, principalmente por contaminación con Cd.

## 5. Conclusiones

Los resultados de esta investigación muestran que existe contaminación por Hg, MeHg, Zn, Cd, Pb y Cu en especies como *Hoplias malabaricus*, siendo el Zn el elemento con mayor tasa de concentración en el tejido muscular. Representando un peligro considerable para la salud de los individuos, la integridad y supervivencia de sus poblaciones en estos ecosistemas. Es necesario señalar que la variación significativa ( $p < 0.05$ ) registrada en la acumulación de Cd y Pb a partir del método de cocción en Salpicón del músculo de *Hoplias malabaricus*, puede estar obediendo a la modificación de condiciones y variables determinantes en este tratamiento respecto a los demás métodos de cocción. Por lo anterior, se sugiere evitar o disminuir el consumo de esta especie principalmente preparado con el método de cocción en Salpicón. De igual forma, se recomienda a las autoridades y entidades gubernamentales e investigativas de esta jurisdicción, realizar un monitoreo de los niveles de contaminantes producto de las actividades como la minería y la agricultura en los ecosistemas y la biota de humedales de La Mojana.

## Reconocimientos

Los investigadores extienden sus agradecimientos al grupo de investigaciones Simulación de Tecnologías para Procesos Industriales de la Corporación Universitaria del Caribe (CECAR), por el financiamiento total de este trabajo.

## Referencias

- [1] J. Marrugo-Negrete, L. N. Benítez, J. Olivero-Verbel, E. Lans, and F. V. Gutierrez, "Spatial and seasonal mercury distribution in the Ayapel Marsh, Mojana region, Colombia," *International Journal of Environmental Health Research*, vol. 20, no. 6. Informa UK Limited, pp. 451–459, Dec. 2010. doi: 10.1080/09603123.2010.499451.
- [2] J. Marrugo Negrete, J. Pinedo-Hernández, R. Paternina-Urbe, L. Quiroz-Aguas, and S. Pacheco-Florez, "Distribución espacial y evaluación de la contaminación ambiental por mercurio en la región de la Mojana, Colombia," *Revista MVZ Córdoba*, vol. 23, no. S. Universidad de Cordoba, pp. 7062–7075, Nov. 20, 2018. doi: 10.21897/rmvz.1481.
- [3] M. A. Meza Martínez et al., "Mercurio total en hígado de *Trachemys callirostris* (Gray, 1856) (Testudines: Emydidae) en tres zonas de la Mojana, Sucre-Colombia," *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, vol. 23, no. 1. Universidad de Ciencias Aplicadas Y Ambientales - UDCA, Apr. 14, 2020. doi: 10.31910/rudca.v23.n1.2020.1239.
- [4] A. J. Zabaleta et al., "Curve Number (CN) as Pressure Indicator of the Hydrological Condition under Global Warming Scenarios at a Local Scale in La Mojana Region, Colombia," *Indian Journal of Science and Technology*, vol. 11, no. 29. Indian Society for Education and



- Environment, pp. 1–12, Aug. 01, 2018. doi: 10.17485/ijst/2018/v11i29/129276.
- [5] M. S. Rahman, N. Saha, A. H. Molla, and S. M. Al-Reza, “Assessment of Anthropogenic Influence on Heavy Metals Contamination in the Aquatic Ecosystem Components: Water, Sediment, and Fish,” *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, vol. 23, no. 4. Informa UK Limited, pp. 353–373, Dec. 16, 2013. doi: 10.1080/15320383.2014.829025.
- [6] P. Morcillo, M. Angeles Esteban, and A. Cuesta, “Mercury and its toxic effects on fish,” *AIMS Environmental Science*, vol. 4, no. 3. American Institute of Mathematical Sciences (AIMS), pp. 386–402, 2017. doi: 10.3934/environsci.2017.3.386.
- [7] N. K. McRae, S. Gaw, and C. N. Glover, “Mechanisms of zinc toxicity in the galaxiid fish, *Galaxias maculatus*,” *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, vol. 179. Elsevier BV, pp. 184–190, Jan. 2016. doi: 10.1016/j.cbpc.2015.10.010.
- [8] L. Song, M. G. Vijver, W. J. G. M. Peijnenburg, T. S. Galloway, and C. R. Tyler, “A comparative analysis on the in vivo toxicity of copper nanoparticles in three species of freshwater fish,” *Chemosphere*, vol. 139. Elsevier BV, pp. 181–189, Nov. 2015. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.06.021.
- [9] D. M. Templeton and Y. Liu, “Multiple roles of cadmium in cell death and survival,” *Chemico-Biological Interactions*, vol. 188, no. 2. Elsevier BV, pp. 267–275, Nov. 2010. doi: 10.1016/j.cbi.2010.03.040.
- [10] F. Hameed Et Al., “Hazardous Effects of Cadmium Contaminated Water on Biological Characteristics of Fish; A Review,” *RHAZES: Green and Applied Chemistry*, p. Vol 6 (2019), Aug. 2019, doi: 10.48419/Imist.prsrn/Rhazes-v6.17566.
- [11] A. Ishaque, S. Ishaque, A. Arif, and H. Abbas, “Toxic effects of lead on fish and human,” *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, vol. 2020, no. 1. Medeye Publishers, Dec. 28, 2020. doi: 10.54112/bcsrj.v2020i1.47.
- [12] C. Galeano-Páez et al., “Dietary exposure to mercury and its relation to cytogenetic instability in populations from ‘La Mojana’ region, northern Colombia,” *Chemosphere*, vol. 265. Elsevier BV, p. 129066, Feb. 2021. doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.129066.
- [13] J. Marrugo-Negrete, J. Pinedo-Hernández, E. M. Combatt, A. G. Bravo, and S. Díez, “Flood-induced metal contamination in the topsoil of floodplain agricultural soils: A case-study in Colombia,” *Land Degradation & Development*, vol. 30, no. 17. Wiley, pp. 2139–2149, Aug. 07, 2019. doi: 10.1002/ldr.3398.
- [14] J. Mojica, J. I. Usma, R. Álvarez-León, and A. Lasso. “Libro rojo de peces dulceacuicolas de Colombia”. 2da ed. Instituto de Recursos Biológicas Alexander von Humboldt; 2012. <http://hdl.handle.net/20.500.11761/34197>
- [15] G. Henry, “Practical Sampling,” *The SAGE Handbook of Applied Social Research Methods*. SAGE Publications, Inc., pp. 77–105, 2009. doi: 10.4135/9781483348858.n3.
- [16] USEPA-IRIS. “Integrated risk information system on heavy metal exposure doses”. 2011. <http://www.epa.gov/iris/>
- [17] Joint FAO/WHO. “Expert committee on food additives. In: Summary and conclusions. 61st meeting: methyl mercury”. 2011. <http://www.who.int/>
- [18] Commission Regulation (EU). “Amending Annexes II and III to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for mercury compounds in or on certain products”. (Text with EEA. Off J. Eur. Union L, 13 (2018), pp. 8-20. 2018. ELI: <http://data.europa.eu/eli/reg/2018/73/oj>
- [19] FAO. “Committee for in land fisheries of Africa; Report of the 3rd edn session of the working party on pollution and fisheries”. Accra, Ghana. Nov 1992;25-29. FAO Fisheries. Rep, No. 471. Rome, FAO, p 43
- [20] J. Marrugo-Negrete, S. Vargas-Licona, J. A. Ruiz-Guzmán, S. Marrugo-Madrid, A. G. Bravo, and S. Díez, “Human health risk of methylmercury from fish consumption at the largest floodplain in Colombia,” *Environmental Research*, vol. 182. Elsevier BV, p. 109050, Mar. 2020. doi: 10.1016/j.envres.2019.109050.
- [21] S. P. Vargas Licona and J. L. Marrugo Negrete, “Mercurio, metilmercurio y otros metales pesados en peces de Colombia: riesgo por ingesta,” *Acta Biológica Colombiana*, vol. 24, no. 2. Universidad Nacional de Colombia, pp. 232–242, May 01, 2019. doi: 10.15446/abc.v24n2.74128.
- [22] J. L. Marrugo-Negrete, J. A. Ruiz-Guzmán, and A. C. Ruiz-Fernández, “Biomagnification of Mercury in Fish from Two Gold Mining-Impacted Tropical Marshes in Northern Colombia,” *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 74, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, pp. 121–130, Oct. 17, 2017. doi: 10.1007/s00244-017-0459-9.
- [23] J. Marrugo-Negrete, J. Pinedo-Hernández, and S. Díez, “Assessment of heavy metal pollution, spatial distribution and origin in agricultural soils along the Sinú River Basin, Colombia,” *Environmental Research*, vol. 154. Elsevier BV, pp. 380–388, Apr. 2017. doi: 10.1016/j.envres.2017.01.021.
- [24] A. F. Rúa Cardona, M. T. Flórez Molina, and J. Palacio Baena, “Variations of seasonal and spatial Hg, Pb, Cr and organic matter contents in Ayapel Flood Plain Lake sediments, Córdoba, northwest Colombia,” *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, no. 69. Universidad de Antioquia, pp. 244–255, Jan. 20, 2014. doi: 10.17533/udea.redin.18153.
- [25] M. Walaszek, P. Bois, J. Laurent, E. Lenormand, and A. Wanko, “Urban stormwater treatment by a constructed wetland: Seasonality impacts on hydraulic efficiency, physico-chemical behavior and heavy metal occurrence,” *Science of The Total Environment*, vol. 637–638. Elsevier BV, pp. 443–454, Oct. 2018. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.325.
- [26] J. S. Silva, A. C. A. El-Deir, G. J. B. Moura, R. R. N. Alves, and U. P. Albuquerque, “Traditional Ecological Knowledge About Dietary and Reproductive Characteristics of *Tupinambis merianae* and *Hoplias malabaricus* in Semiarid Northeastern Brazil,” *Human Ecology*, vol. 42, no. 6. Springer Science and Business Media LLC, pp. 901–911, Aug. 23, 2014. doi: 10.1007/s10745-014-9698-9.
- [27] H. M. Leung et al., “Assessment of heavy metals/metalloid (As, Pb, Cd, Ni, Zn, Cr, Cu, Mn) concentrations in edible fish species tissue in the Pearl River Delta (PRD), China,” *Marine Pollution Bulletin*, vol. 78, no. 1–2. Elsevier BV, pp. 235–245, Jan. 2014. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.10.028.
- [28] E. Kondera, K. Ługowska, and P. Sarnowski, “High affinity of cadmium and copper to head kidney of common carp (*Cyprinus carpio* L.),” *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 40, no. 1. Springer Science and Business Media LLC, pp. 9–22, Jun. 12, 2013. doi: 10.1007/s10695-013-9819-1.
- [29] S. Rajeshkumar, Y. Liu, J. Ma, H. Y. Duan, and X. Li, “Effects of exposure to multiple heavy metals on biochemical and histopathological alterations in common carp, *Cyprinus carpio* L.,” *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 70. Elsevier BV, pp. 461–472, Nov. 2017. doi: 10.1016/j.fsi.2017.08.013.

- [30] B. Ersoy, "Effects of cooking methods on the heavy metal concentrations of the African catfish (*Clarias gariepinus*)," *Journal of Food Biochemistry*, vol. 35, no. 2. Hindawi Limited, pp. 351–356, Mar. 04, 2011. doi: 10.1111/j.1745-4514.2010.00386.x.
- [31] K. Marimuthu, M. Thilaga, S. Kathiresan, R. Xavier, and R. H. M. H. Mas, "Effect of different cooking methods on proximate and mineral composition of striped snakehead fish (*Channa striatus*, Bloch)," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 49, no. 3. Springer Science and Business Media LLC, pp. 373–377, Jul. 06, 2011. doi: 10.1007/s13197-011-0418-9.
- [32] J. Moreda-Piñeiro et al., "In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic, selenium and mercury species in food samples," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 30, no. 2. Elsevier BV, pp. 324–345, Feb. 2011. doi: 10.1016/j.trac.2010.09.008.
- [33] O. Ouédraogo and M. Amyot, "Effects of various cooking methods and food components on bioaccessibility of mercury from fish," *Environmental Research*, vol. 111, no. 8. Elsevier BV, pp. 1064–1069, Nov. 2011. doi: 10.1016/j.envres.2011.09.018.
- [34] I. A. Sthanadar, A.A. Sthanadar, M. Shah, M, et al. "White muscle as a bio-indicator of cadmium (Cd) pollution across Kalpani River Mardan, Khyber Pakhtunkhwa Pakistan," *International Journal of Biosciences (IJB)*, vol. 3, no. 10. International Journal of Biosciences, pp. 105–116, Oct. 05, 2013. doi: 10.12692/ijb/3.10.105-116.
- [35] A. Galitsopoulou, D. Georgantelis, and M. Kontominas, "The influence of industrial-scale canning on cadmium and lead levels in sardines and anchovies from commercial fishing centres of the Mediterranean Sea," *Food Additives and Contaminants: Part B*, vol. 5, no. 1. Informa UK Limited, pp. 75–81, Mar. 2012. doi: 10.1080/19393210.2012.658582.
- [36] E. Gheisari, M. Raissy, E. Rahimi. "The effect of different cooking methods on lead and cadmium contents of shrimp and lobster". *J. Food Biosci. Technol.* 2016;6: 53–58. [https://jfbt.srbiau.ac.ir/article\\_8911\\_03c3f8b54b7f6da69aaa74e81ecef213.pdf](https://jfbt.srbiau.ac.ir/article_8911_03c3f8b54b7f6da69aaa74e81ecef213.pdf)
- [37] K. Joyce and E. BO, "Effects of Different Cooking Methods on Heavy Metals Level in Fresh and Smoked Game Meat," *Journal of Food Processing & Technology*, vol. 7, no. 9. OMICS Publishing Group, 2016. doi: 10.4172/2157-7110.1000617.
- [38] C. R. Calao and J. L. Marrugo, "Efectos genotóxicos en población humana asociados a metales pesados en la región de La Mojana, Colombia, 2013," *Biomédica*, vol. 35, no. 0. Instituto Nacional de Salud (Colombia), May 04, 2015. doi: 10.7705/biomedica.v35i0.2392.
- [39] S. M. Diaz, R. M. Palma, M. N. Muñoz, C. Becerra-Arias, and J. A. Fernández Niño, "Factors Associated with High Mercury Levels in Women and Girls from The Mojana Region, Colombia, 2013–2015," *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 17, no. 6. MDPI AG, p. 1827, Mar. 11, 2020. doi: 10.3390/ijerph17061827.
- [40] C. H. Fløtre, K. Varsi, T. Helm, B. Bolann, and A.-L. Bjørke-Monsen, "Predictors of mercury, lead, cadmium and antimony status in Norwegian never-pregnant women of fertile age," *PLOS ONE*, vol. 12, no. 12. Public Library of Science (PLoS), p. e0189169, Dec. 05, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0189169.