

Metodologías analíticas para la determinación de Cu y Zn en suero sanguíneo de niños zulianos con deficiencias nutricionales por ETA-AAS

Denny R. Fernández¹, Aracelis del C. Vásquez¹, Jesús A. Villasmil¹, Ana M. Ocando¹, José G. Manzanilla¹, Nayda Pereira², Alis A. de Valbuena^{2†} y Víctor A. Granadillo^{1}*

¹Laboratorio de Instrumentación Analítica, Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, ²Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo 4011, Venezuela.

Recibido: 20-07-2012 Aceptado: 10-10-2012

Resumen

En este trabajo se presenta la determinación de cobre (Cu) y zinc (Zn) en muestras de suero sanguíneo de niños con diferentes grados de desnutrición (e.g., leve [L], moderada [M], grave [S] y controles [C]) de la ciudad de Maracaibo y la Costa Oriental del Lago de Maracaibo, estado Zulia (Venezuela) empleando la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETA-AAS). Las muestras de suero se separaron, se colocaron en tubos Eppendorf y almacenaron a 4°C hasta el análisis espectrométrico. Las muestras se diluyeron con Triton X-100 para la determinación espectrométrica de Cu y Zn. La exactitud y la precisión medias de los métodos empleados fueron 98% y 3,4% (DER), respectivamente. Los intervalos de concentraciones metálicas en los niños estudiados fueron: L, 830 - 1740 µg Cu/L y 90 - 510 µg Zn/L; M, 960 - 1860 µg Cu/L y 40 - 1350 µg Zn/L; S, 500 - 1740 µg Cu/L y 90 - 510 µg Zn/L; y C, 860 - 1880 µg Cu/L y 80 - 1530 µg Zn/L. Las metodologías empleadas para la determinación de Cu y Zn por ETA-AAS fueron exactas y precisas, las cuales representan herramientas útiles para el análisis de muestras clínicas.

Palabras clave: Cobre, espectrofotometría de absorción atómica con atomización electrotérmica, niños desnutridos, zinc.

Analytical methodologies for the determination of Cu and Zn in blood serum of zulian children with nutritional deficiencies by ETA-AAS

Abstract

In this work it was present the determination of copper (Cu) and zinc (Zn) in blood serum of children with different degrees of malnourished (i.e., light [L], moderate [M], severe [S] and controls [C]) in the city of Maracaibo and the eastern coast of Lake Maracaibo, Zulia (Venezuela) using electrothermal atomization atomic absorption spectrometry (ETA-AAS). Serum samples were separated, placed in Eppendorf tubes and stored at 4°C until spectrometric analysis. The samples were diluted with Triton X-100 for the spectrometric determination of Cu and Zn. The

* Autor para la correspondencia: vgranadillo@luz.edu.ve

mean accuracy and precision of the methods used were 98% and 3.4% (RSD), respectively. The ranges of metal concentrations in children studied were: L, 830 - 1740 $\mu\text{g Cu/L}$ and 90- 510 $\mu\text{g Zn/L}$; M, 960 -1860 $\mu\text{g Cu/L}$ and 1940 -1350 $\mu\text{g Zn/L}$; S, 500 - 1740 $\mu\text{g Cu/L}$ and 90 - 510 $\mu\text{g Zn/L}$; and C, 860 - 1880 $\mu\text{g Cu/L}$ and 1980 - 1530 $\mu\text{g Zn/L}$. The methodologies used for the determination of Cu and Zn by ETA-AAS were accurate and precise, which are useful tools for the analysis of clinical samples.

Keywords: Copper, electrothermal atomization atomic absorption spectrometry, malnourished children, zinc.

Introducción

El Cu y el Zn son elementos trazas esenciales en el organismo humano, requeridos para mantener un adecuado estado de salud. Estos forman parte de un gran número de enzimas y proteínas, lo cual los hace componentes indispensables en la dieta diaria a través de la ingesta de los alimentos que los contengan (1). El consumo inadecuado de ambos elementos ocasiona un déficit en el sistema inmunológico produciendo cuadros de desnutrición. El Cu actúa como cofactor de procesos enzimáticos que involucran óxido-reducción, asociado a la superóxido dismutasa, lisil oxidasa y ceruloplasmina. El Cu se distribuye en tejidos y órganos del cuerpo humano siendo el hígado, cerebro y los huesos quienes presentan las mayores concentraciones del mismo. Los niveles elevados de Cu sérico se relacionan con alteraciones gastrointestinales, anorexia, desnutrición infantil, náuseas, vómitos frecuentes, y trastorno del sistema nervioso central (2); además, produce la conocida fiebre del cobre (3). Los bajos niveles de Cu disminuyen la capacidad promotora de la ceruloplasmina para el proceso de la hematopoyesis (4), ocasionando un desarrollo mental deficiente y algunos tipos de anemia en los niños (5). Asimismo, el Zn cumple funciones catalíticas y reguladoras en muchos sistemas biológicos (6), se absorbe desde el duodeno y el yeyuno como complejo proteínico en la mucosa, está relacionado con proteínas que intervienen en la formación de la colágena, es componente de la insulina, participa en la duplicación y desarrollo de las células (7, 8), es corresponsable de la madura-

ción sexual (9) y está involucrado en la reparación y transcripción del ácido desoxirribonucleico (10-12). La deficiencia de Zn en el organismo se manifiesta por un crecimiento pobre, hipogonadismo, falta de apetito y alteración en la cicatrización de las heridas. También se relaciona con enfermedades de la piel y lesiones vesiculares de la piel (13).

En general, la deficiencia de Cu y Zn en el organismo humano está relacionada al bajo consumo de ambos elementos a través de la dieta, lo cual se evidencia en alteraciones de la salud (e.g., desnutrición), principalmente la desnutrición infantil. La desnutrición es un síndrome caracterizado por un estado multifactorial donde predomina el déficit energético y proteico (14). Asimismo, este síndrome está asociado al deterioro de la calidad de vida determinado por la pobreza, la privación socio-económica, la falta de educación (15), la sustitución de la lactancia materna por la lactancia artificial; así como, el consumo de alimentos pobres en proteínas y minerales importantes para el crecimiento [e.g., calcio, cobre (Cu), hierro, magnesio y zinc (Zn), entre otros], desarrollo normal y el adecuado mantenimiento del sistema inmunológico en el individuo (16, 17). En tal sentido, es importante señalar que el Cu y el Zn están estrechamente relacionados con el correcto funcionamiento del sistema inmunológico, participando como co-factores en las reacciones enzimáticas que involucran al ADN (18, 19). En consecuencia, es necesario el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de Cu y Zn en suero sanguíneo de niños desnutridos empleando técnicas instrumentales de análisis, las cuales

sean confiables, reproducibles y libres de interferencias; por lo tanto, se emplea la técnica de absorción atómica con atomización electrotrémica (ETA-AAS) con calentamiento longitudinal y corrector de fondo de fuente continua. La ETA-AAS es la técnica más utilizada para determinar Cu y Zn en muestras biológicas, clínicas, ambientales y alimenticias, entre otras, ya que permite la determinación de metales a concentraciones trazas y ultratrazas, presenta una alta sensibilidad, se utilizan pequeños volúmenes de muestra, y los problemas de contaminación están minimizados.

En este trabajo se presenta la optimización analítica de los desarrollos metodológicos para la determinación de Cu y Zn en suero sanguíneo de niños zulianos con deficiencias nutricionales por ETA-AAS, estableciendo las asociaciones estadísticas simples entre los diferentes niveles estudiados de desnutrición.

Parte experimental

Equipos

Para la determinación analítica de Cu y Zn se usó un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin-Elmer Modelo 2380, USA), acoplado a un horno de grafito (Perkin-Elmer Modelo HGA-500). Se usó un muestreador automático (Perkin-Elmer Modelo AS-40). Las absorbancias integradas se imprimieron en un impresor secuencial (Perkin-Elmer Modelo PRS-10). En las tablas 1 y 2 se muestran los parámetros operacionales y los programas de temperaturas usados para la determinación de Cu y Zn en suero sanguíneo de niños desnutridos del Estado Zulia empleando la ETA-AAS. Para la digestión del material certificado, se empleó un horno microondas marca CEM (USA), modelo MDS-81D, con válvulas de despresurización.

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Todas las soluciones estándar se prepararon en una matriz de ácido ní-

trico HNO_3 0,01 M. Las soluciones concentradas de cobre y zinc (ca. 1000 mg/L) se prepararon a partir de cobre metálico (Fisher Scientific, USA) y un Titrisol de Zn (Fixanal, Riedel de Haën, Alemania). Las soluciones patrones para la curva de calibración se prepararon diariamente por dilución directa de las soluciones concentradas de los analitos en HNO_3 0,01 M. Los patrones empleados en la preparación de la curva de trabajo para ambos analitos fueron: 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 $\mu\text{g/L}$ de Cu y Zn. Estos patrones se prepararon a partir de soluciones intermedias de 100 $\mu\text{g/L}$ de cada uno de los metales estudiados. Para la dilución de las muestras de suero sanguíneo se empleó Triton X-100. Todas las soluciones se prepararon con agua grado I ASTM (20), en balones aforados de polietileno lineal (Nalgene, USA). El ácido nítrico concentrado (Merck, Alemania) contenía concentraciones de Cu y Zn no detectables por ETA-AAS. La evaluación de la exactitud de los métodos se realizó a través del análisis de dos patrones certificados: Metales en Agua Potable: "Metals in Drinking Water" del High-Purity Standards, USA, HPS No. CRM 590321, y Tejido de Ostra: "Oyster Tissue" del National Institute of Standards and Technology, USA, NIST No. SRM-1566a.

Muestras

El estudio se realizó en un grupo poblacional de 89 niños (M= 45, F= 44) con edades comprendidas entre 6 meses y 6 años de edad. De ellos, 64 fueron desnutridos y 25 niños eutróficos o controles. La condición nutricional de los niños se estableció a través de la interrelación de indicadores antropométricos, clínicos, dietéticos y bioquímicos establecidos por especialistas de las áreas de pediatría, nutrición y bioanálisis. Los niños seleccionados pertenecían a familias de bajos ingresos de los estratos socio-económicos IV y V, y eran provenientes de diferentes hogares de cuidado diario de las Parroquias Antonio Borjas Romero, Venancio Pulgar y Francisco Eugenio Bustamante (Municipio Maracaibo); así como, a la Unidad de Recuperación Nutricional del Hospi-

Tabla 1
Parámetros operacionales y programa de temperaturas en el horno de grafito utilizados para la determinación de Cu por ETA-AAS.

Longitud de onda = 324,8 nm	Gas de purga: Argón					
Anchura de banda = 0,7 nm	Flujo de Argón: 300 mL/min					
Corriente de HCL = 10,0 mA	Tubo de grafito: HGA pirolítico					
Volumen de muestra = 20 µL	Modo de atomización: PP					
Programa de Temperaturas						
Etapa	Secado 1	Secado 2	Pirolisis	Pirolisis	Atomización	Limpieza
Temperatura (°C)	80	120	900	1200	2200	2700
Rampa (s)	5	10	10	5	0	2
Estadía (s)	5	20	5	5	5	3
Lectura					0	
Registro					-5	
Flujo interno de Ar (mL/min)	300	300	300	300	20	300

HCL: Lámpara de cátodo hueco. HGA: atomizador de grafito calentado longitudinalmente. PP: sobre la pared.

Tabla 2
Parámetros operacionales y programa de temperaturas en el horno de grafito utilizados para la determinación de Zn por ETA-AAS.

Longitud de onda = 213,9 nm	Gas de purga: Argón					
Anchura de banda = 0,7 nm	Flujo de Argón: 300 mL/min					
Corriente de HCL = 10,0 mA	Tubo de grafito: HGA pirolítico					
Volumen de muestra = 20 µL	Modo de atomización: PP					
Programa de Temperaturas						
Etapa	Secado 1	Secado 2	Pirolisis	Pirolisis	Atomización	Limpieza
Temperatura (°C)	80	110	500	1300	2100	2700
Rampa (s)	5	10	10	5	0	1
Estadía (s)	5	10	15	1	5	2
Lectura					0	
Registro					-5	
Flujo interno de Ar (mL/min)	300	300	300	300	50	300

HCL: Lámpara de cátodo hueco. HGA: atomizador de grafito calentado longitudinalmente. PP: sobre la pared.

tal General de Cabimas Dr. Adolfo D'Empaire, perteneciente a la parroquia Ambrosio, municipio Cabimas.

Recolección de las muestras de suero

Las muestras de sangre se tomaron de la vena cubital anterior con excepción de los desnutridos graves a los que se les extrajo sangre de la vena femoral, previo consentimiento informado de sus padres y/o representantes. El protocolo de muestreo fue aprobado por un Comité *Ad honorem* conformado por la junta directiva médica del hospital participante en esta investigación.

Procedimientos

Una vez extraída la muestra, ésta se distribuyó en tubos de polipropileno con tapa a presión, tubos sin anticoagulante, las muestras se centrifugaron a 15000 rpm por 10 minutos para obtener el suero. El suero obtenido se distribuyó en alícuotas, las cuales se colocaron en tubos de reacción (Eppendorf) para determinar Cu y Zn, estas muestras se conservaron a 4°C hasta el análisis espectrométrico.

Las muestras de suero se prepararon directamente en los microviales del muestreador automático del horno de grafito utilizando las micropipetas Gilson (Pipetman modelos P-20, P-200 y P-1000) y puntillas de polipropileno de grado *premium*. Antes del análisis espectrométrico, las muestras se diluyeron con Tritón X-100 (0,1 %v/v). Las curvas de calibración se prepararon por separado para cobre y zinc en una matriz de ácido nítrico 0,01 M; ambas con un intervalo de concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 µg/L.

Análisis estadístico

Todas las evaluaciones estadísticas se realizaron por métodos convencionales (e.g., correlación lineal, correlación de Pearson, t-student, test de Mann Whitney, análisis de varianza, etc.), con la ayuda de programas estadísticos comerciales (e.g., Statistic, Origen

6.0 y Maple V, entre otros), y las diferencias se consideraron significativas a $p \leq 0,05$.

Resultados y discusión

Optimización de los métodos analíticos para la determinación de Cu y Zn

Se validaron los parámetros de mérito analítico de los métodos previamente reportados (3) para obtener herramientas confiables de análisis debido a la importancia que tienen estos oligoelementos en el desarrollo y crecimiento del ser humano. Por lo tanto, la exactitud de los métodos espectrométricos empleados para la determinación analítica de los analitos considerados se verificó analizando los patrones certificados: Metales Trazas en Agua Potable (HPS No. 590321) y Tejido de Ostras (NIST SRM-1566a). Los resultados obtenidos en este estudio se presentan en la tabla 3, observándose similitud entre los valores experimentales y los valores teóricos. En tal sentido, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Este parámetro también se evaluó mediante estudios de recuperación de los analitos adicionados a las muestras de suero, obteniéndose porcentajes de recuperación promedios de $101,1 \pm 2,2$ y $103,0 \pm 1,1$ % para Cu y Zn, respectivamente. Estos resultados evidenciaron la adecuada exactitud para los métodos empleados.

De igual manera, se realizó un estudio de precisión para los métodos espectrométricos de cobre y zinc (tabla 4), obteniéndose errores promedios (expresados como desviación estándar relativa, DER) de 0,70 y 0,07% para los análisis en la corrida y entre corridas, respectivamente; los cuales estuvieron por debajo del valor máximo de error analítico reportado internacionalmente como aceptable (ca. $\leq 5\%$), indicando así la excelente reproducibilidad de los métodos analíticos empleados para la determinación de estos metales en las muestras de suero sanguíneo de niños desnutridos bajo consideración.

Tabla 3
Estudio de exactitud para la determinación de la concentración de cobre y zinc (media \pm 1DE) utilizando material certificado empleando ETA-AAS.

Material Certificado	Metal	Valor Certificado	Valor Experimental	Error relativo (%)
CRM 59032 ^a	Cu	20,00 \pm 0,10 ^c	20,01 \pm 0,60 ^c	0,05
	Zn	70,00 \pm 0,50 ^c	72,01 \pm 1,70 ^c	2,85
SRM 1566a ^b	Cu	66,30 \pm 4,30 ^d	67,10 \pm 3,60 ^d	1,20
	Zn	830,30 \pm 57,00 ^d	831,50 \pm 59,00 ^d	0,14

^aMetales traza en agua de consumo de la High-Purity Standards (HPS).

^bTejido de Ostras del National Institute of Standards and Technology (NIST).

^cEn $\mu\text{g/L}$.

^dEn $\mu\text{g/g}$.

Tabla 4
Estudio de precisión en la corrida y entre corridas para la determinación de cobre y zinc en suero sanguíneo de niños desnutridos por ETA-AAS.

Muestra	Suero Sanguíneo	\bar{X}	En la corrida ^a		Entre corridas ^b	
			DE ($\mu\text{g/L}$)	DER (%)	DE ($\mu\text{g/L}$)	DER (%)
Cu	1	7,10	0,10	1,42	0,10	1,00
	2	7,90	0,01	0,10	0,10	0,60
	3	12,50	0,01	0,10	0,01	1,00
Zn	1	16,60	0,01	0,07	0,01	0,12
	2	30,01	0,01	0,04	0,02	0,10
	3	30,03	0,01	0,04	0,02	0,10

^a Muestras leídas por pentaplicado, ^b muestras preparadas por triplicado.

Los límites de detección (expresados como tres veces la desviación estándar del blanco) y de cuantificación (expresados como diez veces la desviación estándar del blanco), y las masas características de estos elementos requeridas para producir una absorción del 1% (lo cual equivale a una señal de 0,0044 unidades de absorbancia) se indican en la tabla 5. Estos valores de mérito analítico son adecuados para llevar a cabo las diferentes determinaciones de estos metales en las muestras de suero sanguíneo de niños desnutridos del Estado Zulia.

Una vez validadas analíticamente las metodologías se transformaron en herramientas analíticas para determinar las concentraciones de Cu y Zn en suero sanguíneo de niños desnutridos de la región zuliana, con las cuales se obtuvieron mayores niveles de confiabilidad y reproducibilidad en las concentraciones obtenidas de los analitos estudiados mediante los métodos basados en la ETA-AAS empleados en esta investigación.

En la tabla 6 se presentan los intervalos de concentraciones de cobre y zinc (media \pm 1DE, $\mu\text{g/L}$) en suero sanguíneo de niños con

Tabla 5
Límite de detección ($L_D=3\sigma$), de cuantificación ($L_Q=10\sigma$) y Masa característica (M_0) para la determinación de cobre y zinc en suero sanguíneo de niños desnutridos por ETA-AAS.

Metal	Cu	Zn
Límite de detección	0,3 $\mu\text{g/L}$	0,02 $\mu\text{g/L}$
Límite de cuantificación	1,0 $\mu\text{g/L}$	0,07 $\mu\text{g/L}$
Masa característica	8,5 pg	2,60 pg

Tabla 6
Intervalo de concentraciones de cobre y zinc en muestras de suero sanguíneo de niños con diferentes grados de desnutrición determinados por ETA-AAS.

Estado Nutricional	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	
	Cu	Zn
Leves (n= 25)	1184,0 \pm 55,5 (830 - 1740)	390,6 \pm 35,6 (90 - 510)
Moderados (n= 25)	1397,0 \pm 64,4 (960 - 1860)	512,1 \pm 94,5 (40 - 1350)
Graves (n= 14)	1030,0 \pm 69,0 ^a (500 - 1740)	185,5 \pm 50,5 ^b (90 - 510)
Controles (n= 25)	1403,0 \pm 55,1 (860 - 1880)	580,2 \pm 95,0 (80 - 1530)

^aDiferente significativamente del Control ($p < 0,01$) y Moderados ($p < 0,05$)

^bDiferente significativamente del Control y Moderados ($p < 0,001$).

diferentes grados de desnutrición, los desnutridos graves presentaron un valor promedio (ca. 185,6 \pm 55,5 $\mu\text{g Zn/L}$) significativamente más bajo ($p < 0,01$) en comparación con los controles (ca. 580,2 \pm 95,0 $\mu\text{g Zn/L}$). De igual manera para el cobre en desnutridos graves fue menor al grupo control con un $p < 0,01$.

Según investigaciones previas (18, 21), las cuales indican que en niños desnutridos los niveles de estos metales son bajos; comprobando los hallazgos de este trabajo donde se encontraron niveles bajos para el Zn en los desnutridos graves (ca. 185,6 \pm 50,5 $\mu\text{g Zn/L}$) y en los desnutridos leves (ca. 390,6 \pm 35,6 $\mu\text{g Zn/L}$) con respecto al grupo control (ca. 580,2 \pm 95,0 $\mu\text{g Zn/L}$). Un comportamiento similar se observó para el Cu,

encontrándose disminuido para los desnutridos graves (ca. 1030,0 \pm 69,0 $\mu\text{g Cu/L}$) y en los leves (ca. 1184,0 \pm 55,5 $\mu\text{g Cu/L}$). Contrariamente a lo esperado, los desnutridos moderados presentaron para ambos oligoelementos (Zn: 512,1 \pm 94,5 $\mu\text{g/L}$; Cu: 1397,0 \pm 64,4 $\mu\text{g/L}$) niveles muy cercanos al grupo control (Zn: 580,2 \pm 95,0 $\mu\text{g/L}$; Cu: 1403,0 \pm 55,1 $\mu\text{g/L}$). Estos resultados son similares a los reportados por Schlesinger y col. (21), los cuales encontraron concentraciones de Zn más bajas en los desnutridos leves y graves; no así en los desnutridos moderados, y según estos autores, esto es producto de una etapa de recuperación, en la cual participan mecanismos de compensación no observados en el desnutrido grave debido a su mayor déficit nutricional. Estos mecanismos pudiesen llevarse a cabo a tra-

vés de tres procesos íntimamente relacionados, tales como: i) catabolismo intracelular, producido a nivel de los sitios de almacenamiento, cuando el descenso en las concentraciones para ambos metales provoca una liberación de los mismos a nivel del espacio extracelular con el fin de aumentar la concentración de los mismos a nivel corporal, ii) una absorción intestinal incrementada que trata de mantener en equilibrio los niveles séricos de Cu y Zn cuando éstos descienden a niveles críticos y que en los desnutridos graves se ve comprometida por atrofia de la mucosa del intestino, y iii) una excreción intestinal disminuida (21).

En tal sentido, los resultados de esta investigación indican que los niños desnutridos graves presentaron niveles de cobre y zinc muy por debajo de los niveles establecidos como normales; sin embargo, la población control también presenta niveles bajos para ambos metales, lo cual podría asociarse con la mala alimentación de la población estudiada. En general, se observó una deficiencia de estos oligoelementos en todos los pacientes evaluados, lo cual debe ser tomado en consideración para realizar campañas de mejora nutricional en la población infantil estudiada, sobre todo crear y suministrar suplementos contentivos de vitaminas y oligoelementos que sean capaces de combatir esta deficiencia para permitir un mejor desarrollo de nuestra población infantil.

Conclusiones

Los métodos analíticos propuestos para la determinación de cobre y zinc en suero sanguíneo de niños desnutridos son exactos, precisos y libres de interferencias; y por lo tanto, constituyen herramientas analíticas confiables para el establecimiento de los niveles de estos oligoelementos en el tipo de muestra sanguínea estudiada con fines clínico-nutricionales.

Referencias bibliográficas

1. RUBIO C., GONZÁLEZ D., MARTÍN-IZQUIERDO R.E., REVERT C., RODRÍGUEZ I., HARDISSON A. *Nutr Hosp* 22 (1): 101-107. 2007.
2. LADRÓN DE GUEVARA, J.; MOYA PUEYO, V. *Toxicología médica clínica y laboral*. McGraw-Hill Interamericana. Madrid (España). 785. 1995.
3. FERNÁNDEZ D.R., VÁSQUEZ A. DEL C., HERNÁNDEZ M., OCANDO A., MANZANILLA J., SOTO M., ALVAREZ F., GRANADILLO V.A. *Atom Spectrosc* 26 (3): 117-124. 2005.
4. FRKOVIC A., MEDUGORAC B., ALEBIC JURETIC, A. *Sci Total Environ* 192: 207-209. 1996.
5. MAURY E., MATTEIA., PEROZO K., BRAVO A., MARTÍNEZ E., VIZCARRA M. *Pediatr (Asunción)* 37 (2): 112-117. 2010.
6. DEHGHANI S.M., KATIBEH P., HAGHIGHAT M., MORAVEJ H., ASADI S. *Iran Red Crescent Med J* 13 (1): 4-8. 2011.
7. SINDAYIGAYA E., VAN CAUWENBERG A., ROBBERECHT H., DEELSTRA H. *Sci Total Environ* 144: 103-115. 1994.
8. TVINNEREIM H.M., EIDE R., RIISE T., FOSSE G., WESENBERG, G.R. *Sci Total Environ* 226: 201-212. 1999.
9. YAN M., SONG Y., WONG C.P., HARDIN K., HO E. *J Nutr* 138: 667-673. 2008.
10. ARTACHO R., RUÍZ M.D., GÁMEZ C., PUERTA A., LÓPEZ M.C. *Sci Total Environ* 205: 159-165. 1997.
11. BLOOMFIELD, MOLLY M. *Química de los organismos vivos* Editorial Limusa. (México). 514. 1993.
12. SALGUEIRO M.J., WEILL R., HERNÁNDEZ-TRIANA M., ZUBILLAGA M., LYSIONEKA., CARO R. *Rev Cubana Salud Pública* 30 (2). 2004.

13. JAVED F., ASGHAR A., SHEIKH S., ASGHAR BUTT M., HASHMAT N., ABDUL MALIK B. *Ann Punjab Med Coll* 3 (2): 139-143. 2009.
14. TAMAYO L.; RODRÍGUEZ A., QUIROGA M. *Rev Cuadernos* 53 (1): 60-67. 2008.
15. WHYE C., WAN W., ZAMH Z., KAM C. *Mal J Nutr* 13 (1): 19-28. 2007.
16. C. DE MACÊDO, E.M., F. AMORIM M.A., S. DA SILVA A.C., M.B. DE CASTRO C.M. *Rev Paul Pediatr* 28 (3): 329-336. 2010.
17. SRIVASTAVA D., MISRA R., PRAKASH A., GAUTAM P., DUTTA S. *Indian J Physiol Pharmacol* 55 (1): 37-43. 2011.
18. AMESTY-VALBUENA A., PEREIRA-MEDERO N., NÚÑEZ-GONZÁLEZ J.R., GARCÍA D., VICENTE DE VILLAROEL M., GRANADILLO V., MANZANILLA J., FERNÁNDEZ D. *Invest Clin* 47 (4): 349-359. 2006.
19. RODRÍGUEZ D., PAPALE J., DELLAN G., TORRES M., BERNÉ Y., MENDOZA N., MORENO J.M., SALAZAR J., CARDINALE-RANDAZZO N. *Boletín Médico de Postgrado* 20 (2). 55-60. 2004.
20. Standard Specification for Water; ASTM D 1193-77; American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA (1977).
21. SCHLESINGER L., AREVALO M., ARREDONDO S., DIAZ M., LÖNNERDAL B., STEKELA. *Am J Clin Nutr* 56: 491-498. 1992.