

Preparación de una amalgama de oro (Au/Hg) para determinar trazas de cinc en orina

Anunziata De Santis Caringella^{1*}, Jairo Márquez¹, Olga Pérez de Márquez¹, Gladys Becerra²

¹Laboratorio de Electroquímica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes. ²Laboratorio de Análisis Instrumental, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia. Mérida 5101, Venezuela.

Recibido: 09-06-99. Aceptado: 15-02-2000

Resumen

En los últimos años se ha centrado la atención en la determinación electroanalítica de trazas de cinc en fluidos biológicos, debido a la versatilidad, economía, fácil manejo, selectividad y sensibilidad de estas técnicas. Nuestro estudio consistió en la preparación de una amalgama de oro (como sustituto al altamente tóxico electrodo de mercurio puro) para determinar trazas de cinc en orina. Se optimizó el tiempo de interacción Au/Hg (12 h) para la obtención de una amalgama estable que permitiera la directa determinación de Zn^{2+} en este medio biológico. La composición superficial de la amalgama fue evaluada con un microscopio electrónico de barrido, equipado con EDX. La amalgama así preparada pudo ser utilizada en análisis repetitivos. También se definieron condiciones experimentales, empleando voltametría de barrido lineal repetitiva en dirección anódica (VBL), en KNO_3 0,1 M; pH: 3,20 y v : $100\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, para la limpieza electroquímica del electrodo, entre determinaciones. El análisis de Zn(II) se realizó por voltametría de pulso diferencial con redisolución anódica (VPDRA), con los siguientes parámetros óptimos electroquímicos: potencial de deposición (E_d/V): -1.50, tiempo de deposición (td/s): 1100, tiempo de pulso (tp/msec): 45, amplitud de pulso (A_p/mV): 50, pH: 7 y velocidad de barrido (v): $5\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, bajo estas condiciones se obtuvieron las siguientes características analíticas, límite de detección $4,26\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e intervalo dinámico 11,74 a $7000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Con estas características es posible la directa y confiable determinación de Zn^{2+} en orina, de gran interés en medicina y farmacología. Los resultados son comparados con aquellos obtenidos por Espectroscopía de Absorción Atómica.

Palabras clave: Amalgama de oro; análisis de cinc; voltametría de pulso diferencial; voltametría de redisolución.

Determination of zinc traces in urine, using gold amalgams

Abstract

Electroanalytical techniques have been used to analyse metallic traces in biological fluids due to their versatility, economy, easy handling, sensitivity and selectivity. We have prepared a gold amalgam (as a substitute to toxic mercury) to analyse Zinc in urine. The optimal interac-

* Autor para la correspondencia.

tion time Au-Hg was found to be 720 min to get a reliable amalgam. Surface composition was evaluated by Scanning Electronic Microscopy with EDX. The amalgam can be reused for Zn^{2+} analysis providing it is electrochemically cleaned within determinations (repetitive anodic linear sweep voltammetry in 0.1 M KNO_3 , pH: 3.2 and v : 100 mVs^{-1}). Analysis of Zn^{2+} was performed by Differential Pulse Voltammetry with Anodic Stripping (ASDPV) and results were compared with those of Atomic Absorption Spectroscopy. Detection limit was 4.26 $mg.L^{-1}$ and the dynamic interval was 11.74 to 7000 $mg.L^{-1}$. With these characteristics it is now possible to determine Zn^{2+} in urine, with medical and pharmaceutical interest.

Key words: Amalgam of gold; differential pulse voltammetry; stripping of Zinc; Zinc analysis.

Introducción

En años recientes, la determinación de diferentes trazas de metales en muestras biológicas ha sido fundamental en el área médica. Las investigaciones sobre el papel biológico del elemento cinc (nuestro interés) se han desarrollado en diversas etapas (nutricional, bioquímico, manifestaciones clínicas y genéticas (1). De interés común a estas etapas lo constituye la cuantificación de este elemento en tejidos y fluidos biológicos y son numerosas las metodologías desarrolladas con este fin. Por vía electroquímica se ha podido determinar trazas de diferentes metales en fluidos biológicos con alta sensibilidad (2), los electrodos normalmente empleados han sido de mercurio (3) y electrodos químicamente modificados (4). En este trabajo se optimizan condiciones para la preparación de un electrodo de amalgama de oro (de más fácil manipulación y menor toxicidad que un electrodo de mercurio), éste es luego evaluado y posteriormente probado en la determinación de trazas de cinc en orina utilizando la técnica sensible de voltametría de pulso diferencial con redisolución anódica.

Materiales y Métodos

Los análisis voltamétricos se realizaron en un Potenciostato/Galvanostato EGG PAR 273A, acoplado a un microcomputador en donde se registraron los voltagramas. Las medidas se realizaron a temperatura am-

biente y en atmósfera inerte, en una celda electrolítica de plexi-glass de un solo compartimiento y tres electrodos. Como electrodo de trabajo se utilizó una amalgama de oro (Au/Hg), preparada con un disco de oro (0,6 cm de diámetro) y mercurio triplemente destilado (Bioanalytical System INC.). Como electrodo secundario se empleó una placa de platino y como electrodo de referencia se utilizó Ag/AgCl 0,1 M. Todos los reactivos fueron de grado analítico. Las soluciones fueron preparadas con agua ultra pura (Millipore, 18 $M\Omega$), el electrolito soporte KNO_3 0,1 M y el pH ajustado con soluciones de NaOH y HNO_3 0,1 M. Las membranas empleadas para el tratamiento de la muestra fueron de celulosa Millipore 0,45 μm . Las micrografías electrónicas se obtuvieron empleando un Microscopio Electrónico de barrido HITACHI S- 2500. Los análisis espectroscópicos se realizaron en un EAALL Pelkin Elmer 3110.

En la adquisición, tratamiento y almacenamiento de las muestras de orina se escogieron pacientes al azar de una población heterogénea. A estos se les suministraron todas las recomendaciones necesarias para la toma de las muestras de orina. Las muestras se recolectaron en frascos color ámbar, previamente lavados y tratados con una solución ácida de HNO_3 25% v/v, sin ningún tipo de aditivo químico, para su conservación, durante la toma de la muestra y se les sugirió que estas muestras se conservaran en sus casas a temperatura de refrigeración.

Las muestras se almacenaron a temperatura de -3°C , en alícuotas de 6 mL en frascos de resina fenólicas y con alícuota (5 mL) de HNO_3 concentrado. Estas muestras, previamente se hicieron pasar por un filtro Millipore, acoplado a una inyectora de acetileno común, para retener las partículas suspendidas.

Preparación de la amalgama de oro Au/Hg

Se prepararon cuatro tipos de electrodos, basados esencialmente en el mismo procedimiento. La única variable importante fue el tiempo de interacción física entre el metal (Au) y mercurio elemental (Hg).

El procedimiento utilizado fue el siguiente: se conectó un disco plano de oro (0,6 cm de diámetro) a un alambre de plata y luego se ajustó a una de las tapas de la celda, con su respectiva rosca. El electrodo (disco de oro), con su respectivo soporte se introdujo en un vaso de precipitado en una solución de HNO_3 al 25% (v/v) durante 15 min, para luego proceder a la pulitura. El disco se sometió a una limpieza mecánica, con una mezcla pastosa de alumina sobre una tela abrasiva, hasta obtener una superficie especular. El tiempo de sonicación fue de 3 min, luego de cada pulitura. Seguidamente se colocó una gota de mercurio triplemente destilado (Bioanalytical System Inc.), de modo que cubra toda la superficie del disco. Transcurridos 30 minutos, en un recipiente que contiene agua ultra pura (18 M Ω), el mercurio sobrante (que no ha interactuado con el disco de oro) se desechó. Luego se procedió a realizar Espectroscopía de dispersión de rayos X (EDX), para la cuantificación superficial. Este electrodo se preparó diariamente antes de proceder a las experimentaciones, empleando siempre el mismo procedimiento. La limpieza mecánica fue la misma, para el segundo electrodo, pero el tiempo de contacto físico entre el metal y el mercurio fue de 60 min. También se realizó una espectroscopia de dispersión de rayos X para una cuantificación relativa de los com-

ponentes electródicos. El tercer tipo de electrodo fue dejado en contacto 90 min con el mercurio elemental. El procedimiento empleado para el cuarto tipo de electrodo, es idéntico a los tres primeros, con un tiempo de interacción física con la gota de mercurio de 720 min. A todos los electrodos se les realizó un seguimiento con microscopía de barrido electrónico.

Luego de preparado el electrodo, se realizaron 5 medidas electroquímicas independientes, empleando voltametría de pulso diferencial con redisolución anódica, con una concentración constante de cinc, de 334 mgL^{-1} para realizar estudios estadísticos de su reproducibilidad; estas medidas electroanalíticas se realizaron empleando parámetros experimentales sugeridos por el manual del usuario (5). Entre medidas se realizó limpieza electroquímica anódica empleando voltametría de barrido lineal; se utilizó solamente electrolito soporte (KNO_3 0,1 M), y se realizaron 5 barridos anódicos utilizando una velocidad de barrido de $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, el pH fue ajustado a 3,20.

Resultados y Discusión

La Tabla 1 nos muestra los resultados de análisis elemental obtenidos en el estudio de la superficie electródica. Se representan los valores promedios relativos para Hg y Au con sus respectivas desviaciones estándar (% Hg/Au \pm DS) de 10 medidas en diferentes sitios de la superficie del electrodo, observándose que para el electrodo que estuvo en contacto físico durante 30 min, con el mercurio elemental, solo se detectó mercurio sobre su superficie ($99,99/0,00 \pm 1,90$) y el electrodo que presentó una relación aproximada de 1/1 Hg/Au fue el electrodo cuyo tiempo de interacción física (TIF) fue de 720 min ($57,70/42,26 \pm 1,95$). Con el grupo restante de amalgamas preparadas la situación fue intermedia, todo parece indicar que la disolución de mercurio en oro y la estabilización de la amalgama formada, requiere de un tiempo determinado de interacción entre metales.

Tabla 1
Análisis de la superficie electródica por espectrografía de dispersión de rayos X (EDX)

Electrodo*	Hg/Au \pm DS %	Impureza %
30 min.	99,99/0,00 \pm 1,90	0,01 Al
60 min.	98,37/1,60 \pm 1,50	0,03 Al
90 min.	92,29/7,68 \pm 1,00	0,03 Al
720 min.	57,70/42,26 \pm 1,95	0,04 Al

*Se realizó un mapeo a la superficie del electrodo, desde 10 sitios diferentes.

Las microscopías electrónicas de barrido muestran las diferentes estructuras superficiales características para cada tiempo de interacción física entre el oro y el mercurio. En la Figura 1a observamos una estructura homogénea superficial correspondiente a una película de mercurio, en la Figura 1b observamos en toda la superficie electródica filamentos irregularmente distribuidos; en el tercer tipo de electrodo cuyo tiempo de interacción física fue de 90 min, observamos grumos brillantes que sobresalen de la superficie del electrodo (Figura 1c). En el electrodo que estuvo en contacto con mercurio elemental durante 720 min observamos una estructura totalmente diferente a las anteriores, estructuras irregulares en toda la superficie del electrodo (Figura 1d), homogéneas y uniformemente distribuidas. Las voltametrías de pulso diferencial mostradas en la Figura 2 fueron realizadas empleando una concentración constante de 334 mgL^{-1} de Zn^{2+} , empleando como electrolito soporte KNO_3 0,1 M, una velocidad de barrido de 5 mVs^{-1} , y con el primer tipo de electrodo. Podemos observar reproducibilidad en las corrientes ($\text{ip}/\mu\text{A}$) y potenciales de pico (Ep/V vs. Ag/AgCl 0,1 M), (Tabla 2).

La Figura 3 muestra los voltagramas obtenidos empleando el segundo tipo de electrodo, no existe ninguna reproducibilidad en las corrientes y potenciales de pico, los resultados estadísticos de estas medidas se representan en la Tabla 3. Para el electro-

Tabla 2
Corrientes de redisolución anódica y potenciales de pico*

Corriente $\text{ip}/\mu\text{A}$	Ep/V
30 min	
8,99	-0,99
9,00	-1,00
9,33	-1,01
9,13	-1,02
8,84	-0,99
\pm DS	
9,06 \pm 0,18	
% CV 1,99	
60 min	
40,1	-1,01
32,3	-1,01
27,40	-1,02
26,82	-1,08
23,90	-1,16
\pm DS	
30,10 \pm 6,35	
%CV 21,10	
90 min	
17,96	-1,23
17,31	-1,16
42,80	-1,16
39,18	-1,08
46,90	-1,00
\pm DS	
32,83 \pm 14,13	
% CV 43,04	
720 min	
46,60	-1,04
47,40	-1,06
48,07	-1,05
47,78	-1,02
49,00	-1,06
\pm DS	
47,77 \pm 0,88	
%CV 1,84	

*Obtenidos en cada medida, empleando una concentración de cinc de 334 mg.L^{-1} , luego de que el electrodo fue modificado mecánicamente con Hg elemental entre 30 y 720 min.

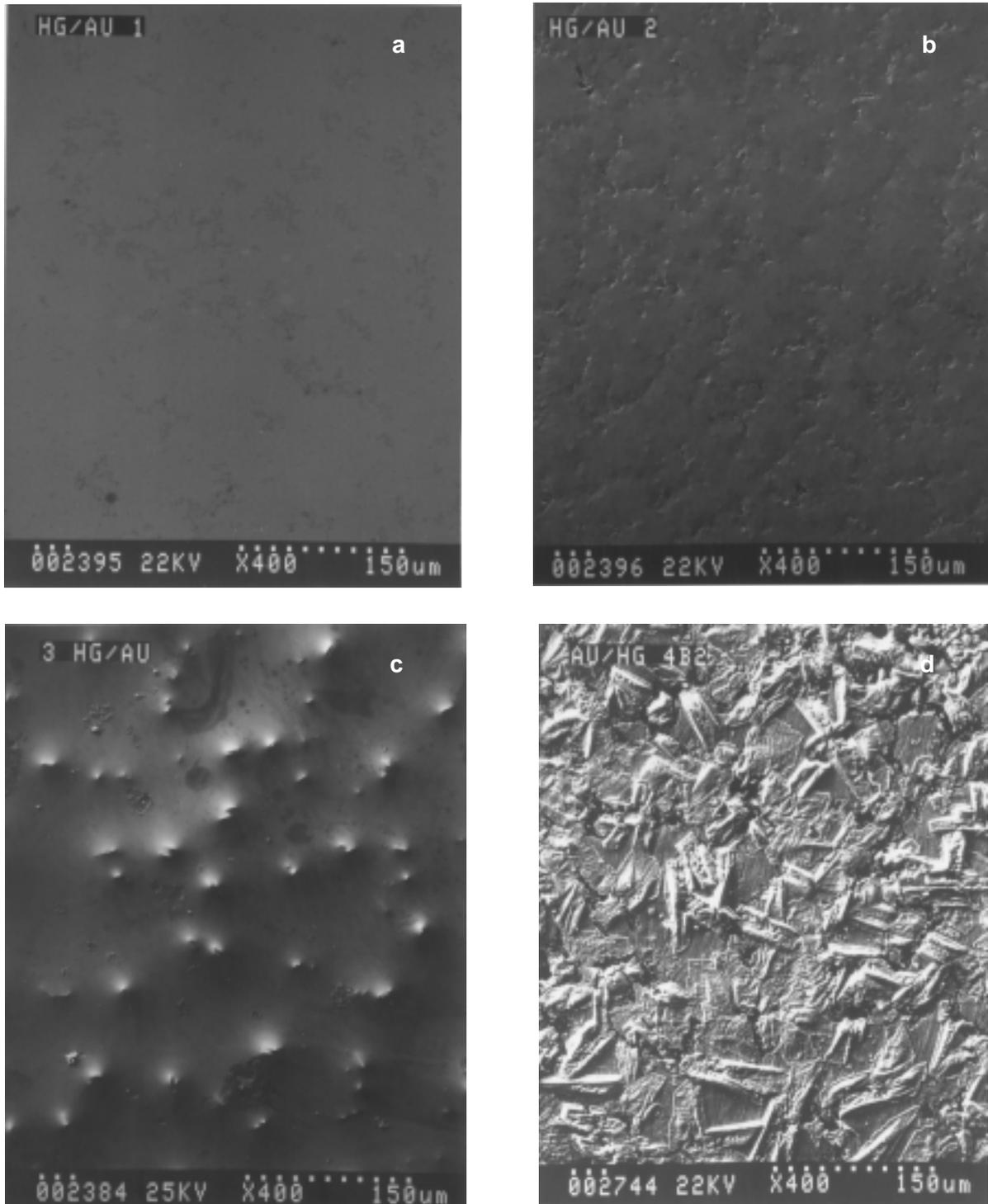


Figura 1. Micrografía electrónica de la superficie de los diferentes electrodos modificados físicamente para tiempos de interacción física de: (a) 30 min, (b) 60 min, (c) 90 min, y (d) 720 min.

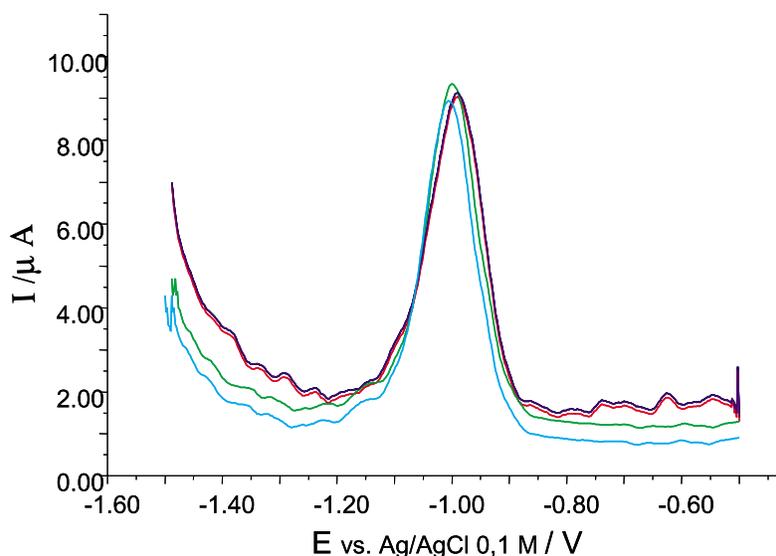


Figura 2. Voltagramas de pulso diferencial de 334 mg.L^{-1} de cinc en KNO_3 $0,1 \text{ M}$. Se usaron los parámetros experimentales reportados en la Tabla 3. pH: 3,20; v : 5 mV.s^{-1} . Interacción física: 30 min.

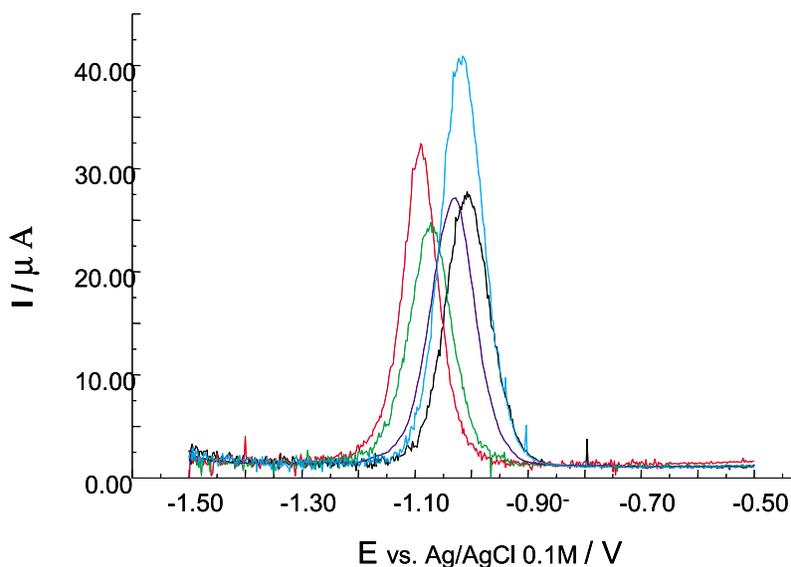


Figura 3. Voltagramas de pulso diferencial de 334 mg.L^{-1} de cinc en KNO_3 $0,1 \text{ M}$. Se usaron los parámetros experimentales reportados en la Tabla 3. pH: 3,20; v : 5 mV.s^{-1} . Interacción física: 60 min.

Tabla 3

Resumen de resultados obtenidos en la optimización de parámetros experimentales, empleando una concentración constante de Zn(II) de 334 mgL^{-1}

Ed/V	td/s	tp/ms	Ap/mV	pH	TIF/min
-1,50	1100	45	50	7	720

do tipo tres también se observa poca reproducibilidad de sus corrientes de redisolución anódica y potenciales de pico, Figura 4.

También se registraron voltametrías de pulso diferencial con redisolución anódica para el cuarto tipo de electrodo. Los resulta-

dos se muestran en la Figura 5, estos nos indican que existe una buena reproducibilidad de las corrientes y potenciales de pico.

La Tabla 2 muestra las corrientes de pico para medidas independientes de cinc y para diferentes tiempos de interacción física

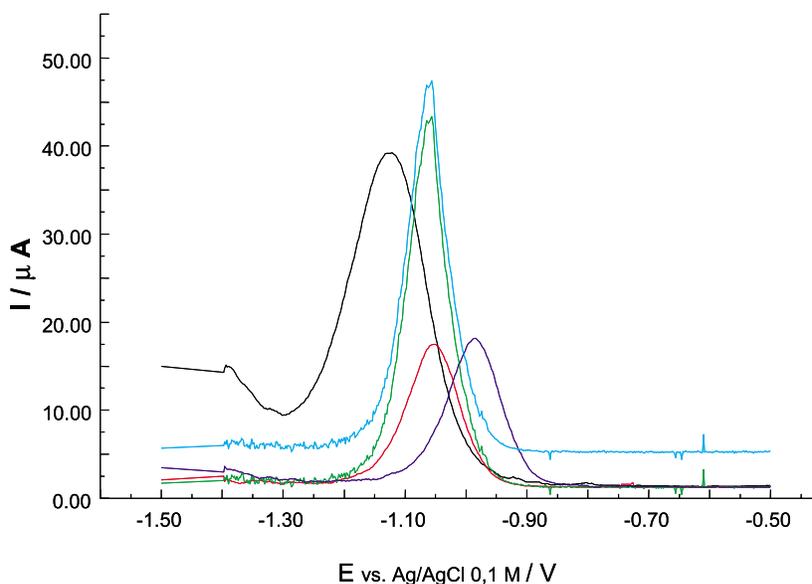


Figura 4. Voltagramas de pulso diferencial 334 mg.L^{-1} de cinc en KNO_3 $0,1 \text{ M}$. Se usaron los parámetros experimentales reportados en la Tabla 3. pH: 3,20; v : 5 mV.s^{-1} , Interacción física: 90 min.

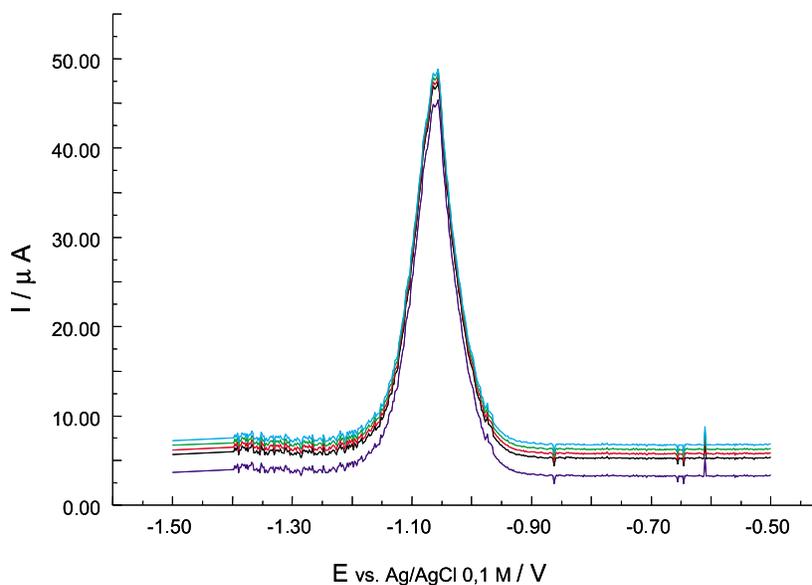


Figura 5. Voltagramas de pulso diferencial 334 mg.L^{-1} de cinc en KNO_3 $0,1 \text{ M}$. Se usaron los parámetros experimentales reportados en la Tabla 3. pH: 3,20; v : 5 mV.s^{-1} , Interacción física: 720 min.

con mercurio elemental; los resultados nos indican que para el electrodo cuyo TIF fue de 30 min, las corrientes de pico presentan una buena reproducibilidad: $i_p/\text{mA} \pm \text{DS}$ ($9,06 \pm 0,18$), mientras que para los electrodos cuyos tiempos de interacción física fueron de 60 y 90 min, las respuestas voltamétricas no fueron reproducibles (Tabla 2). Las corrientes resultantes para el electrodo del cuarto tipo se muestran en la Tabla 2, la respuesta en corriente para las cinco medidas independientes de cinc, empleando una concentración constante de cinc de 334 mg.L^{-1} , fue mayor que con los tres electrodos anteriores y su reproducibilidad fue muy buena, basada sobre argumentos estadísticos $i_p/\text{mA} \pm \text{DS}$ ($47,77 \pm 0,88$). Los resultados nos indican que el electrodo cuyo TIF fue de 720 min presentó buena reproducibilidad y mayor sensibilidad en corrientes y potenciales de pico, para una concentración constante de Zn(II) de 334 mg.L^{-1} , este electrodo se utilizó para determinar las características analíticas del sistema.

En el intervalo de tiempo entre medidas electroquímicas, empleando voltametría de pulso diferencial con redisolución anódica, se realizaron 5 barridos anódicos de limpieza electroquímica empleando solamente electrolito soporte, pH: 3,2 y una velocidad de barrido de 100 mV.s^{-1} . Los voltagramas obtenidos se muestran en la Figura 6, las corrientes disminuyen progresivamente con los barridos repetitivos hasta un valor límite (limpieza de la superficie del electrodo). Este resultado se verificó realizando voltametría de pulso diferencial antes de cada experimento en presencia solamente del electrolito soporte KNO_3 0,1 M, sin la especie electroactiva, no se observaron picos anódicos correspondientes a la presencia de especies electroactivas en solución. Estas corrientes de fondo están dentro de un intervalo de 2 a 5 mA (Figura 7).

Los parámetros experimentales utilizados, se optimizaron empleando el modo univariado y el parámetro óptimo en nuestra experimentación fue aquel que ofreció ma-

yor sensibilidad en las corrientes de redisolución anódica empleando una concentración de Zn(II) de 334 mg.L^{-1} . Estos parámetros se muestran en la Tabla 3.

Las curvas de calibración se elaboraron preparando estándares de grado analítico a partir de una solución concentrada de 10000 mg.L^{-1} , y por sucesivas diluciones se prepararon concentraciones desde 1000 a 10000 mg.L^{-1} . Los resultados se muestran en la Figura 8, que nos indica que el sistema presenta linealidad hasta 7000 mg.L^{-1} .

Los voltagramas obtenidos para la construcción de las curvas de calibración se muestran en la Figura 9, en ella podemos observar la influencia de la variación de la concentración sobre la corriente de pico, mostrando un comportamiento proporcional entre ambas variables.

El estudio de las características analíticas, se apoyó en argumentos estadísticos. La mejor recta se obtuvo por el método de mínimos cuadrados, el límite de detección (3 Sb) y la concentración mínima del sistema (10 Sb) se obtuvieron a partir de las reglas de la I.U.P.A.C. (6).

La Tabla 4 nos indica los resultados obtenidos para la determinación de las características analíticas, observándose que el intervalo dinámico está dentro de un intervalo de 11,74 a 7000 mg.L^{-1} , el límite de detección $4,26 \text{ mg.L}^{-1}$, y la sensibilidad está indicada dentro de un valor de $0,035 \text{ iC}^{-1}$.

Los límites de detección alcanzados con este sistema son comparables con aquellos encontrados en la bibliografía en donde emplean electrodos de mercurio y voltametría de pulso diferencial con redisolución anódica (7, 8).

Para minimizar las interferencias físicas y/o químicas provenientes de la matriz de las muestras (orina de 24 h), se realizaron curvas del método de adición de estándar, variando el volumen del estándar y manteniendo fijo el volumen de la muestra. Estas curvas se muestran en la Figura 10. La línea

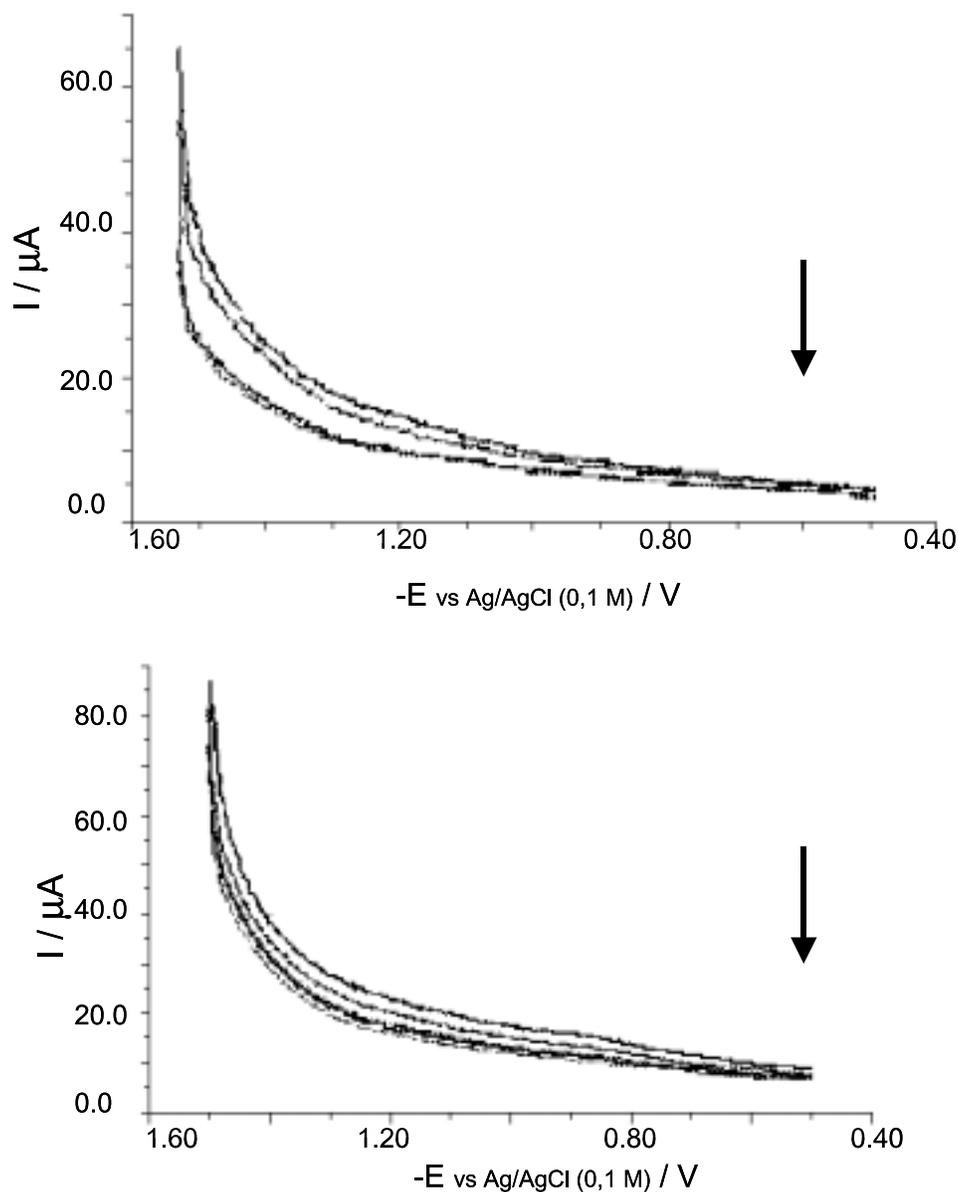


Figura 6. Limpieza electroquímica. Voltagramas de barrido lineal (barridos consecutivos) de una solución de KNO_3 0,1 M. Parámetros experimentales: pH: 3,20; $E_i = -1,50$ V; $E_f = -0,50$ V, v : $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

continua representa el método gráfico para la curva de calibración, y la línea segmentada indica la curva de la adición de estándar, obteniéndose el valor de cinc en la muestra de orina de 24 h por extrapolación de la línea segmentada; este valor es de $(1200 \pm 0,96$

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$ para $n = 5$, encontrándose dentro del intervalo de concentración normal de cinc en orina de 24 h determinado por la O.M.S., que es de $500 - 1200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (9).

Se empleó regresión lineal para comparar nuestro método electroanalítico optimi-

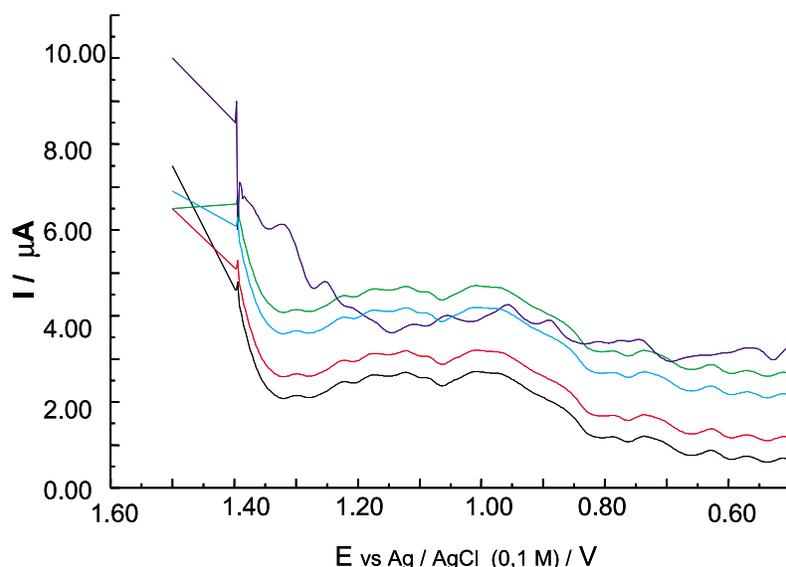


Figura 7. Voltagramas de redisolución anódica con pulso diferencial. Medio electrolítico KNO_3 0,1 M; pH: 3,20; $E_i = -1,50$ V; $E_f = -0,50$ V; $v: 5 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

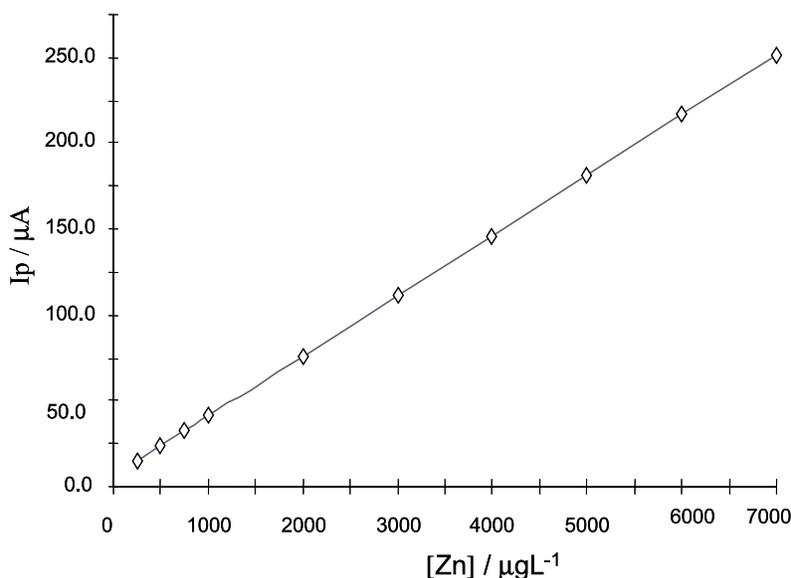


Figura 8. Curvas de calibración, realizadas usando un electrodo del tipo cuatro, para Zn(II). Se utilizaron soluciones de Zn^{2+} en medio acuoso con KNO_3 0,1 M. Tiempo de interacción: 720 min.

zado de voltametría de pulso diferencial con redisolución anódica (VPDRA), con espectroscopía de absorción atómica en llama (EAALL).

La adquisición, tratado y almacenamiento de las muestras de orina de 24 h fue explicada en la sección anterior. Las mues-

tras de los pacientes se escogieron al azar de una población heterogénea.

Los parámetros empleados en EAALL fueron los siguientes:

- Corriente de la lámpara de cátodo hueco para Zn(II): 15 mA.

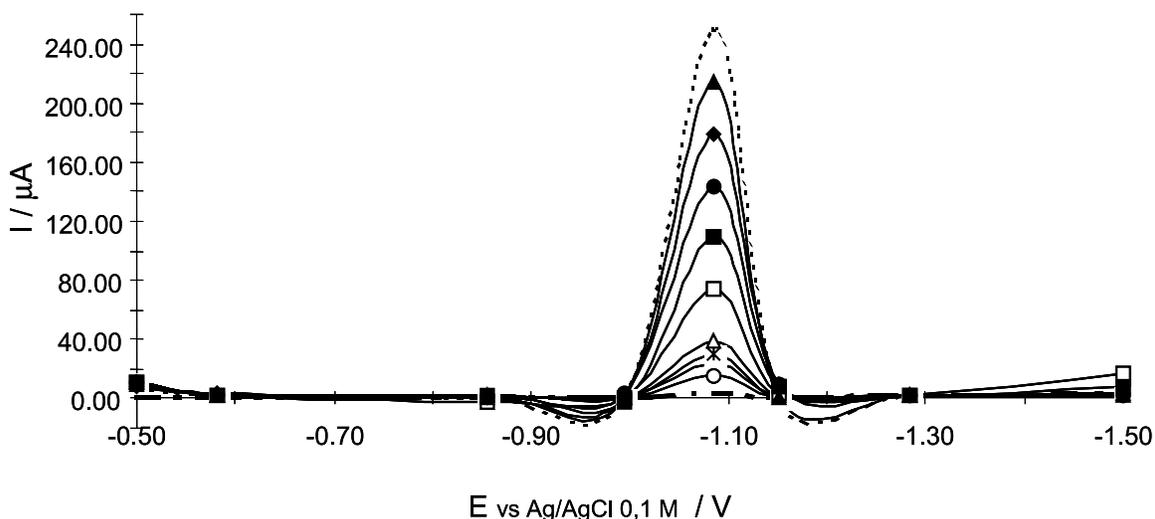


Figura 9. Sobreposición de voltagramas de pulso diferencial con redisolución anódica, para varias concentraciones de Zn(II) en KNO_3 0,1 M (Intervalo lineal).

Tabla 4

Características analíticas para determinar Zn(II) en medio acuoso KNO_3 0,1 M empleando VPDRA. Empleando un electrodo modificado con mercurio elemental durante 720 min

Parámetros	Zn
Intervalo dinámico μgL^{-1}	11,74 - 7000
Recta de calibrado en donde (Zn) es la concentración de cinc en μgL^{-1}	$i_{\text{máx}} = 2,7 \times 10^{-1} + 0,035 (\text{Zn})$
Concentración mínima μgL^{-1}	11,74 ₃
Coefficiente de correlación	0,9999
Sensibilidad iC^{-1}	0,035
Límite de detección μgL^{-1}	4,26 ₄

- Longitud de onda: 213,9 nm.
- Ancho de la rendija: 0,7 nm.

Los resultados obtenidos en la regresión de la recta se representan en una línea de regresión (Figura 11), con los obtenidos en VPDRA en el eje de las x y los que resultaron por EAALL en el eje Y. De la ordenada en el origen obtuvimos un valor de -0,088 y un coeficiente de correlación momento producto de 0,996. A partir de estos resultados se desprende que no difieren en forma significativa de los valores "ideales", de una línea recta, de 0 y 1 respectivamente, y por lo tan-

to no existe diferencia sistemática entre las dos series de resultados.

En conclusión se definen condiciones para la preparación de una amalgama de oro, de composición bastante reproducible y estable, apropiada para la determinación directa de Zn(II) en orina, con alta sensibilidad y reproducibilidad en las determinaciones (mayores a los obtenidos sobre mercurio metálico), de uso repetitivo, de fácil manipulación y baja toxicidad relativa al electrodo de mercurio y apropiada para su inmediata utilización en laboratorios de análisis.

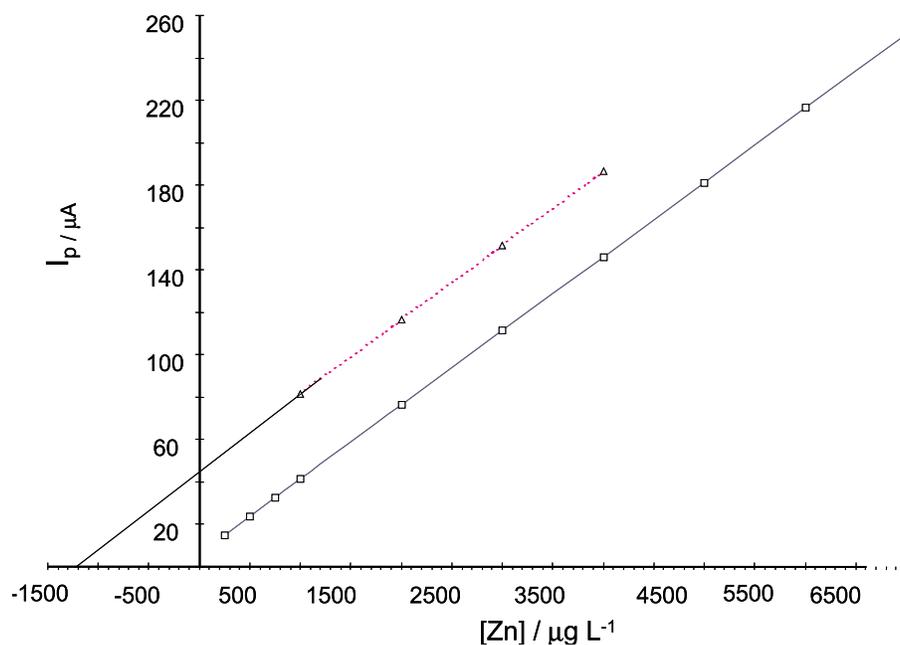


Figura 10. Método de adición de estándar para muestras de orina de 24 h. empleando condiciones experimentales óptimas en medio acuoso.

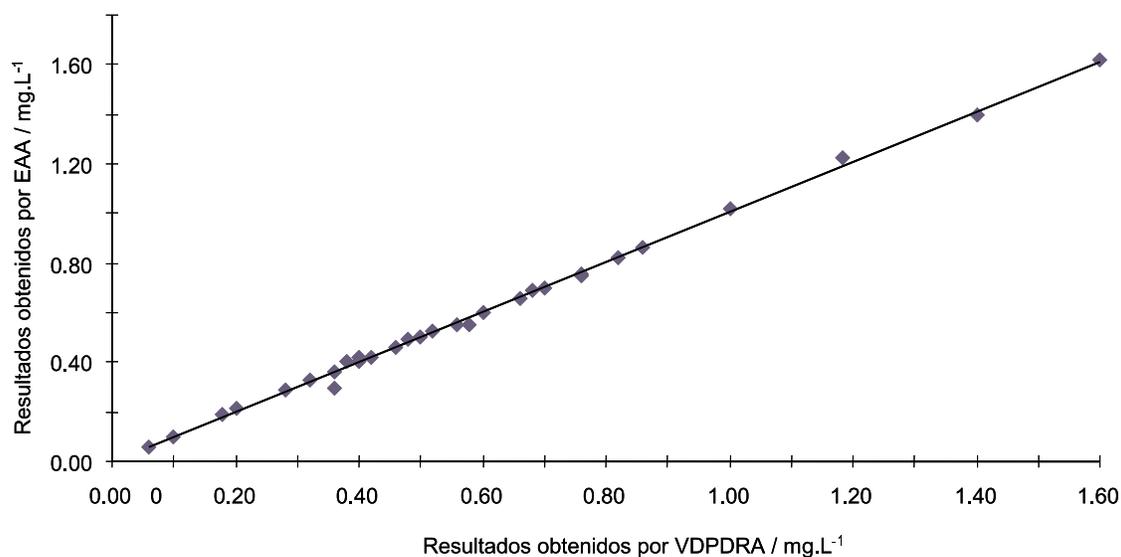


Figura 11. Correlación de metodologías analíticas, EAALL y VPDRA.

Agradecimiento

Los autores agradecen al CONICIT de Venezuela, al CEP de la Universidad de los Andes, al personal del Laboratorio de Elec-

troquímica Facultad de Ciencias, a Ledy Linares por su colaboración en los análisis espectroscópicos y al Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes.

Referencias Bibliográficas

1. VALLEE B., FALCHUK K. ***Phylos Trans Roy Soc*** B 294: 185-196, 1981.
2. KISSIGER P., HEINEMAN W. ***Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry***, Marcel Dekker, Inc., New York (USA), pp. 52-70, 1984.
3. FLORENCE M. ***J Electroanal Chem*** 27: 273-281, 1970.
4. AGRAZ R., HERNANDEZ Y. ***Anal Chim Acta*** 273: 205-212, 1993.
5. **Manual EGG Princenton** Applied Research, Applied Instruments Group, parte P-2, pp. 17-37, 1992.
6. MILLER J. ***Review Analyst*** 116: 3-14, 1991.
7. BOR'D J. ***Anal Chim Acta*** 258: 245-252, 1992.
8. ALFASSI Z., WAI C. ***Preconcentration Techniques for Trace Elements***, Editorial CRC Press, Florida (USA), pp. 170, 1992.
9. RODRIGUEZ A. ***Medical Data "Valores Normales"***, Rodram Corporation (Mexico), pp. 5, 1997.