

Metodología recomendada para la medición del contenido de zinc en especímenes biológicos

Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular.
Comité Científico.
Comisión de Elementos Traza¹.

Documento C Fase 3 Versión 3.

Documento preparado por: Elisa Herrero Huerta y Almudena Vigil Rodríguez.

Índice

0. Introducción
1. Objeto y campo de aplicación
2. Revisión de técnicas analíticas
 - 2.1. Espectrometría de fluorescencia molecular
 - 2.2. Fluorimetría de absorción molecular
 - 2.3. Espectrometría de absorción atómica de llama
 - 2.4. Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica
 - 2.5. Otras técnicas
3. Procedimientos analíticos recomendados
 - 3.1. Obtención de especímenes
 - a) Suero
 - b) Orina
 - c) Otros
 - d) Información semiológica
 - 3.2. Procedimiento de medida de la concentración de zinc en el suero y en la orina por espectrometría de absorción atómica de llama
 - a) Condiciones analíticas
 - b) Preparación de la muestra
 - c) Preparación de patrones
 - d) Características metrológicas
 - 3.3. Procedimiento de preparación de diferentes tejidos para la medida de zinc por espectrometría de absorción atómica de llama
 - a) Condiciones analíticas
 - b) Preparación de la muestra
 - c) Preparación de patrones
 - d) Características metrológicas
 - 3.4. Control de calidad
 - a) Materiales de control
 - b) Programas de evaluación externa de la calidad
4. Intervalos de referencia
5. Conclusiones.
6. Bibliografía.

0 INTRODUCCIÓN

El zinc es un metal de transición con peso atómico 65,38 g/mol que pertenece al grupo IIB del Sistema Periódico. Por oxidación forma iones sencillos divalentes y no presenta química redox.

Es un elemento esencial en nutrición humana (1-3). En 1869, Raulin descubrió que era necesario para el crecimiento del *Aspergillus niger* (4).

Vallee (5), en 1956, publicó la primera evidencia de deficiencia nutricional de zinc en el hombre y en 1963 Prasad *et al.* (6) la describieron en adolescentes egipcios. Posteriormente Halsted *et al.* (7, 8) observaron alteraciones similares en jóvenes iraníes de ambos sexos.

Su presencia resulta imprescindible para el funcionamiento de más de 200 metaloenzimas entre las que figuran la DNA-polimerasa dirigida por DNA, la RNA-polimerasa dirigida por DNA (9), la DNA-polimerasa dirigida por RNA, la timidinquinasa, la anhidrasa-carbónica intraeritrocitaria, la alcohol-deshidrogenasa, la superóxido-dismutasa, la carboxi-peptidasa y la fosfatasa-alcalina (10). Por su participación en la actividad de dichas enzimas interviene en gran variedad de procesos biológicos como son la expresión génica (11), la división celular, el crecimiento, la función sexual, la inmunidad celular, la cicatrización de heridas o la agudeza de gusto y olfato (12,13).

Existe una alteración genética autosómica recesiva denominada acrodermatitis enteropática caracterizada por una severa dermatitis acral y periorificial (14,15). En esta patología, aunque el defecto básico no está claro, sí se sabe que el metabolismo del zinc está alterado, ya que tras la administración de suplementos exógenos del elemento se revierte parcialmente la sintomatología. En la acrodermatitis enteropática también se observan alteraciones de la inmunidad celular y del metabolismo del cobre (16).

En países desarrollados existen grupos poblacionales que, dependiendo de los factores nutricionales y el estado metabólico, pueden ser más susceptibles a la instauración de una deficiencia nutricional de zinc. Dietas pobres en proteínas de origen animal y ricas en fibras y fitatos presentan baja biodisponibilidad del elemento, (17-19) como ocurre en el caso de los vegetarianos (20); presencia aumentada de iones como PO_4^{3-} , Cu(II) , Fe(II) , Al(III) conducen al mismo efecto (21,22). En los ancianos, el déficit es muy frecuente debido a la ingesta inadecuada y a la deficiente absorción intestinal propia de la edad (23-25). Se deben vigilar también aquellos estados fisiológicos en los que exista una demanda anabólica elevada tales como la lactancia (26), el crecimiento (27,28) y el embarazo (29-31). Determinados estudios relacionan concentraciones bajas de zinc plasmático con un aumento de prematuridad y recién nacidos con bajo peso corporal (32-34). El déficit de zinc también afecta a la síntesis de DNA en la cresta neural causando un desarrollo insuficiente del tubo neural (33). El metabolismo del zinc puede verse comprometido durante el embarazo si, administrándose simultáneamente dosis farmaco-

¹Composición de la Comisión: JA Cocho de Juan, JF Escanero Marcén, MD Fernández González, L García Beltrán, A García de Jalón Comet, M González Esteche, J González Revaldería, E Herrero Huerta, A Montel Ruiz de Alda, C Pintos Virgós, V Seijas Martínez-Echevarría

lógicas de folatos y hierro, concurre algún tipo de patología (33). El déficit de zinc puede presentarse, como una complicación adicional, asociado a diferentes patologías como son: el síndrome de malabsorción (35), la nutrición parenteral prolongada (36), la insuficiencia renal crónica (37-39), la cirrosis hepática (40) y el alcoholismo (24, 41); y también a aquellos procesos que cursan con intensa destrucción celular e incremento del catabolismo tales como la cirugía (42), los traumatismos (43), las quemaduras (44), las neoplasias (45), las infecciones agudas (46) y el infarto agudo de miocardio (47-49).

La intoxicación por este elemento es poco frecuente salvo en el ámbito industrial (fiebre por humo de zinc) (50).

La necesidad del zinc en nutrición humana llevó al desarrollo de técnicas analíticas para su medición en especímenes biológicos. En un principio, se utilizaron métodos colorimétricos que requerían etapas previas de desproteinización, lo que implicaba un mayor riesgo de contaminación (51). En 1955 Walsh (52) describió la aplicación de la espectrometría de absorción atómica en análisis químicos, permitiendo la omisión de estas etapas. De esta manera, se logró un aumento de la sensibilidad analítica y una elevada exactitud puesto que solo era necesario realizar una dilución previa de las muestras (51).

1 OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

En este documento se realiza una revisión de las técnicas analíticas comúnmente utilizadas para la medida de la concentración de zinc en especímenes biológicos así como de los procedimientos analíticos y se propone uno para ser empleado dentro del ámbito del laboratorio clínico.

2 REVISIÓN DE TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.1. Espectrometría de fluorescencia molecular.

Esta técnica se basa en la reacción de zinc con un cromógeno dando lugar a un producto coloreado que absorbe en el espectro visible. En un principio se han utilizado diferentes reactivos de color cuyo uso hace indispensable etapas de digestión y extracción lo que supone muchas probabilidades de contaminación y obtención de resultados erróneos (52,53). Actualmente se utiliza el 2-(5-bromo-2 piridilazo)-5-(N-propil-N-sulfopropilamino)- fenol que evita las etapas previas anteriormente citadas precisando únicamente desproteinización con cloruro de guanidina. Para evitar la presencia de falsos positivos, este compuesto se utiliza junto con el citrato, la dimetilgloxima y la salicilaldoxima con el objetivo de enmascarar su reacción con hierro, cobre y níquel, que se pueden encontrar en altas concentraciones en diferentes especímenes biológicos (53). Esta técnica se caracteriza por presentar una elevada precisión y exactitud. El límite de detección se ha estimado en 1,15 $\mu\text{mol/L}$ (54).

2.2. Fluorimetría de absorción molecular

Se basa en la formación de un complejo entre el zinc y el 8-quinolinol estabilizado con goma arábiga, que presenta una marcada fluorescencia a 517 nm cuando se excita a 375 nm. Bajo estas condiciones solamente el zinc puede ser medido sin interferencias por parte de otros elementos químicos tanto en sangre como en orina (52). La estabilidad de la fluorescencia decrece después de 45 minutos. Es una técnica con una eleva-

da precisión y alta fiabilidad, presentando un coeficiente de variación inferior a un 7%; sin embargo, requiere un gran volumen de muestra, es lenta y cara (53).

2.3. Espectrometría de absorción atómica de llama

Es la técnica analítica más utilizada en el Laboratorio Clínico para la medición de la concentración de zinc porque presenta una elevada sensibilidad y especificidad analítica, es rápida y requiere un volumen pequeño de muestra (53,55,56).

La muestra, diluida, es aspirada y conducida a la llama mediante un nebulizador. En ésta, los átomos de zinc en estado fundamental absorben la luz emitida por una lámpara de cátodo hueco del mismo metal. La llama utilizada está compuesta por acetileno y aire. La línea de resonancia correspondiente a los átomos de zinc cuantificados se aísla de la emisión de fondo de la llama mediante una red de difracción.

2.4. Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica

En esta técnica se ha sustituido la llama por un tubo de grafito en cuyo interior se deposita la muestra previamente diluida. Ésta se somete secuencialmente a un programa de tiempos y temperaturas para conseguir su evaporación, mineralización y posterior atomización. La precisión y exactitud son muy elevadas. El límite de detección del ensayo es de 0,010 $\mu\text{mol/L}$ (57). La masa característica es 0,45 pg y su especificidad analítica es adecuada. Sin embargo, la elevada sensibilidad inherente a esta técnica disminuye su aplicación, ya que para evitar la contaminación se deben tomar medidas muy laboriosas (58).

2.5. Otras técnicas

Las técnicas polarográficas presentan límites de detección bajos (59, 60). La voltametría de redisolución anódica, la fluorescencia por rayos X (61) y la activación neutrónica no resultan útiles en la práctica asistencial diaria porque son procedimientos costosos, lentos y requieren un adiestramiento especializado. En el caso de la activación neutrónica su utilización se limita al análisis multielemental de materiales de referencia (62). Otras técnicas utilizadas son la titulación electrotrémica (63), el análisis por resonancia fluorescente, los métodos radioquímicos y la espectrometría de masas con inducción acoplada de plasma (ICP-MS) (53).

3 PROCEDIMIENTO ANALÍTICO RECOMENDADO

La espectrometría de absorción atómica de llama (SAAF), descrito en el punto 2.3., permite la medición del contenido de zinc en diferentes especímenes biológicos. La cuantificación de la concentración de zinc se puede realizar mediante una simple dilución de la muestra. Es el método de elección por varias razones: rapidez, practicabilidad, coste y bajo riesgo de contaminación. Cabe destacar que es el procedimiento analítico elegido por el grupo de trabajo de elementos traza de la Sociedad Francesa de Biología Clínica (55). La SAAF (espectrometría de absorción atómica de llama) permite medir el contenido de zinc con una elevada precisión en suero, sangre total y eritrocitos.

En el estudio multicéntrico realizado por la comisión de elementos traza (SEQC) para medir cobre y zinc, la espectrometría de absorción atómica de llama cumplió con los valores requeridos de límite de detección (0,009 $\mu\text{mol/L}$), linealidad, recuperación y reproducibilidad (77).

3.1. Obtención de especímenes

a) Suero y plasma sanguíneo

Para una adecuada obtención de la muestra es necesario un conocimiento previo de todos aquellos factores preanalíticos que pueden influir en la medición. Se recomienda la utilización de tubos de poliestireno y polipropileno sin aditivos, para evitar la contaminación en sistemas de vacío que emplean tapones de goma. La heparina es el anticoagulante de elección, en el caso de la utilización de plasma sanguíneo (64,65). El plasma presenta una ventaja frente al suero, y es que en la medición de la concentración de zinc se ha de minimizar la liberación del elemento procedente de eritrocitos y plaquetas, siempre que la centrifugación y separación del plasma sean inmediatos (66). Se debe evitar la presencia de hemólisis porque los eritrocitos presentan un contenido de zinc 10 veces superior que el suero (67). Se aconseja una recogida de la muestra a primera hora de la mañana puesto que el zinc presenta ritmo circadiano (68).

b) Orina

El zinc urinario se determina en orina de 24 horas. Se requiere la presencia de ácido nítrico ultrapuro para evitar el intercambio de iones metálicos con la pared del contenedor, puesto que la matriz urinaria es pobre en compuestos quelantes del metal (69). Un pH < 2 se consigue con la incorporación previa de 20 mL de ácido nítrico 6 mol/L. Los contenedores recomendados son de material plástico lavados previamente con ácido (67).

c) Otros

Se puede medir en componentes celulares sanguíneos (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) siendo los más adecuados los leucocitos polimorfonucleares. La muestra debe ser procesada de forma inmediata tras su obtención (70) sugiriéndose la utilización de la técnica de separación celular en gradiente de densidad (71). La separación de los componentes celulares de la muestra debe realizarse con una pureza y eficacia elevadas ya que en caso contrario se obtendrían resultados incorrectos. El anticoagulante utilizado es EDTA sal de sodio (71).

La utilización de tejidos de secuestro del metal como son el pelo y las uñas permite confirmar la cronicidad de la deficiencia (67). Las muestras del pelo deben ser tomadas de la nuca con un instrumento de acero inoxidable, ya que presentan una gran sensibilidad a la contaminación ambiental (polvo, cosméticos) y a la de origen endógeno (sudor, grasas) (69,70). Se requiere un pretratamiento de la muestra que consiga la eliminación del zinc exógeno pero no del endógeno. La utilización de agua desionizada es insuficiente. Los solventes orgánicos y agentes tensoactivos permiten la eliminación de materia grasa y cosméticos pero no la de metales de origen externo. Se ha estudiado la posible utilización de quelantes o ácidos diluidos pero son demasiado agresivos puesto que eliminan una fracción importante de zinc endógeno (67,69).

d) Información semiológica

La información semiológica aportada por cada uno de estos tejidos les diferencia en cuanto a su aplicación. El suero es el espécimen más utilizado aunque no siempre sea un reflejo real del estado nutricional (69,70). Por otra parte, es sensible a fenómenos de redistribución característicos de todas aquellas situaciones asociadas a reacciones de fase aguda (estrés, infecciones y procesos inflamatorios) (72-75). La excreción del

zinc en orina no aporta ninguna información excepto en aquellas situaciones en las que la fracción ultrafiltrable aumenta de forma significativa, como son estados que cursan con intensa destrucción celular, cuadros de intoxicación o tras el tratamiento con compuestos quelantes (64,70). El contenido de zinc intraleucocitario (76) es idóneo a la hora de confirmar un déficit agudo por ser el leucocito la célula sanguínea de vida media más corta, pero los valores de referencia varían tanto en función de la población celular separada como de la relación mononucleares/polimorfonucleares (69). Presenta otro inconveniente que es la falta de estandarización en la forma de expresión de los resultados obtenidos (69). El pelo tampoco es útil a la hora de valorar el estado nutricional pues su contenido en zinc se modifica más lentamente que en otros tejidos, y presenta variaciones en función de la raza, el origen geográfico, edad y color del cabello, por lo que su análisis debe ser reservado a estudios poblacionales (69).

3.2. Procedimiento de medida recomendado de la concentración de zinc en el suero y en la orina por espectrometría de absorción atómica de llama

a) Condiciones analíticas

La optimización del espectrómetro se consigue mediante la utilización de una lámpara de cátodo hueco a una intensidad de corriente de 15 mA calentada previamente durante 15 minutos. La máxima energía de pico se consigue seleccionando la longitud de onda a 213,9 nm y la anchura de banda a 0,7 nm. Se utiliza un quemador estándar de 80 a 100 mm de ranura cuya posición se optimiza en las tres dimensiones del espacio y con una llama ligeramente oxidante (55).

b) Preparación de la muestra

Distintos estudios han dado como resultado la importancia de elegir el diluyente y la dilución para obtener una precisión elevada, alta sensibilidad y recuperación de la adición de cantidades conocidas del metal. Se obtienen resultados satisfactorios utilizando suero diluido 1/5 con ácido clorhídrico 0,1 mol/L (55). La muestra de orina se prepara diluyendo 1/5 con agua desionizada.

c) Preparación de patrones

Se prepara una solución de almacenaje de 1,5 mol/L a partir del patrón certificado de 15,3 mol/L (1g/L) de zinc mediante una dilución 1/10 con ácido clorhídrico 0,1 mol/L. A partir de ésta, se prepara una solución de trabajo de 0,15 mol/L realizando una dilución 1/10, elaborando a continuación los patrones de la curva de calibración cuya concentración será de 7,6 µmol/L, 15,3 µmol/L y 23 µmol/L.

d) Características metrologías

La dilución de la muestra se realiza como se ha mencionado anteriormente (55).

La linealidad varía en función del nebulizador utilizado. El ensayo es lineal, nebulizando mediante *spoiler*, hasta 150 µmol/L. Si se utiliza «bola de impacto», es lineal hasta 23 µmol/L. Sin embargo, es más eficaz la nebulización y se obtiene mejor rendimiento utilizando «bola de impacto».

Se estudió el efecto de la viscosidad usando calibradores de zinc con o sin glicerol no encontrándose diferencias significativas entre ellos. De forma similar, la adición de cloruro de sodio no tenía efectos.

No se han producido interferencias por parte del cloruro de sodio ni de metales como hierro y cobre. Tampoco se ha detectado absorción inespecífica, por lo que no se ha considerado necesario la utilización de corrector de fondo de deuterio, que disminuye considerablemente la reproductibilidad (55,77).

El límite de detección es de 0,23 $\mu\text{mol/L}$. La imprecisión intraserial es de un 4%, la interserial de un 8% y la inexactitud de un 4% (55).

3.3. Procedimiento de preparación de diferentes tejidos para la medida de zinc por espectrometría de absorción atómica de llama.

a) Condiciones analíticas

La optimización del espectrofotómetro se consigue con las mismas condiciones que se han descrito para las muestras de suero y orina, en el apartado 3.2.a

b) Preparación de la muestra

Leucocitos polimorfonucleares

Para la medición del contenido de zinc en leucocitos polimorfonucleares se requiere una obtención previa de los mismos mediante la técnica de separación en gradiente de densidad. La muestra de sangre, extraída con el anticoagulante EDTA sal de disodio, se diluye con un volumen equivalente de solución salina mezclando cuidadosamente por inversión. Se prepara un gradiente discontinuo de Percoll a diferentes concentraciones, 1060, 1075 y 1095 g/mL, mediante una dilución con una solución isotónica de cloruro de sodio. Tras depositar cuidadosamente las tres capas de solución de Percoll en un tubo de centrifuga, de mayor a menor densidad, se pipetea 6 mL de la sangre diluida en la parte superior del gradiente y se centrifuga durante 7 a 10 minutos a 1200 g. Las distintas poblaciones celulares presentes en la sangre se separan dentro de las distintas bandas. Cada fracción de células se separa cuidadosamente y se deposita en un tubo. Las suspensiones de leucocitos polimorfonucleares, aisladas entre los gradientes de densidad de 1075 g/mL y 1095 g/mL de Percoll®, son diluidas con un volumen equivalente de solución salina isotónica y se centrifugan a 200 g durante 10 minutos. A continuación se resuspenden en 5 mL de solución de cloruro de sodio (0,15 mol/L). Se añaden 9 mL de agua desionizada y se mezcla por inversión durante 15 segundos, entonces se añade 1 mL de solución de cloruro de sodio (1,5 mol/L) y se mezcla por inversión. Se centrifuga la muestra a 200 g durante 10 minutos y se descarta el sobrenadante. Este procedimiento se repite de una a tres veces, tanto como sea necesario para eliminar la presencia de eritrocitos, mediante inspección ocular. Una vez que el botón celular está libre de eritrocitos se resuspende en 5 mL de solución salina isotónica y se toma una alícuota para realizar un recuento celular. Las muestras se centrifugan a 1200 g durante 10 minutos y el sobrenadante se aspira cuidadosamente. Posteriormente se añaden 3 mL de ácido nítrico a los tubos y se calienta la muestra a 135°C. Se repite el tratamiento con ácido nítrico dos veces más. Tras la lisis celular conseguida se añade exactamente 1 mL de solución de ácido nítrico (0,15 mmol/L) y se mide por espectrometría de absorción atómica de llama (71).

Pelo

Para la cuantificación del zinc se requiere 0,5 g de muestra de pelo, cortado de la nuca con un instrumento de acero inoxidable en piezas de 1 cm de longitud. Se homogeneiza la muestra

mezclando suavemente. Se lava en un recipiente de polietileno de 500 mL que contiene 150 mL de una solución al 1% de un detergente no iónico mediante agitación mecánica durante 30 minutos a temperatura ambiente. De nuevo se lava la muestra a través de un filtro con 1 L de agua desionizada para secarse a continuación durante toda la noche a 110°C, después se pesa y se trasvasa a un Erlenmeyer de 50 mL. El peso seco debería ser aproximadamente de 0,5 g. Se añaden 6 mL de ácido nítrico y se permite que reaccione a temperatura ambiente. Tras la digestión se añade 1 mL de ácido perclórico y se calienta a 200°C hasta que aparezca un humo denso blanco. La solución debe ser tratada con agua. Se transfiere a un matraz aforado de 5 mL y se diluye con agua desionizada (78).

Uñas

Se utilizan preferentemente los recortes de las mismas previamente raspadas con forceps recubierto de Teflón para eliminar la suciedad de la superficie. La muestra, tras ser colocada en un recipiente de polietileno que contiene 25 mL de una solución al 1% de un detergente no iónico, se agita durante 30 minutos. A continuación se aclara con abundante agua desionizada, se seca durante toda la noche a 150°C, se pesa y se coloca en un Erlenmeyer de 10 mL, donde se procederá a su digestión con 1 mL de ácido nítrico y 0,5 mL de ácido perclórico. Finalmente se transfiere a un matraz aforado de 5 mL y se diluye en agua desionizada. Una alícuota de esta solución se diluye de nuevo hasta 5 mL con agua desionizada (79).

c) Preparación de patrones

Se preparan de la manera indicada anteriormente en el apartado 3.2.c.

d) Características metrológicas

Se corresponden con las ya mencionadas en el apartado 3.2.d.

3.4. Control de calidad

a) Materiales de Control

El control de calidad interno en el análisis del zinc por espectrometría de absorción atómica de llama se realiza con la ayuda de materiales certificados como los sueros líquidos comercializados por Kaulson Laboratories, Inc., en dos niveles. Pueden utilizarse también los sueros liofilizados de Lyphocheck (Bio-Rad), Seronorm Trace Elements (Nycomed) u otros similares.

Para orina se puede recurrir a muestras líquidas comercializadas por Bio-Rad. También están disponibles en el mercado muestras de orina humana liofilizada comercializadas por Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway. Se presentan en viales de cristal tapados siendo reconstituidos con 5 mL de agua desionizada previamente a su uso (80).

b) Programas de evaluación externa de la calidad

Es recomendable participar de modo asiduo en al menos un programa externo de control de calidad. La mayoría de los programas de bioquímica incluyen el zinc entre las magnitudes ofertadas para suero.

Existen asimismo numerosos programas externos de evaluación de la calidad específicamente diseñados para elementos traza que incluyen el zinc. Como ejemplo podemos citar el TEQAS de Surrey (Inglaterra), el de la SFBC (Francia) y el de QUEBEC (Canada).

4 INTERVALOS DE REFERENCIA

Los múltiples intervalos de referencia existentes en la literatura reflejan la diversidad de grupos poblacionales bien definidos. La disponibilidad de técnicas de gran exactitud y especificidad genera un acúmulo de información que puede llevar al usuario a errores en la interpretación de resultados (81).

Actualmente el establecimiento de rangos de referencia se realiza a través de la normativa que ha surgido de los acuerdos internacionales (International Federation of Clinical Chemistry, IFCC) (82). Para ello, la selección de individuos se basa en criterios estrictos de inclusión y exclusión, teniendo en cuenta una serie de factores como son: valoración del estado de salud, características de la población (edad, sexo, hábitos sociales, terapia medicamentosa), obtención y almacenamiento del espécimen, y un tratamiento adecuado de los datos (83,84).

El intervalo de referencia que se da a continuación ha sido generado por Caroli (85) mediante espectrometría de absorción atómica de llama, espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica, espectrometría de emisión atómica con plasma inducido y activación neutrónica. El intervalo de referencia para el zinc en suero, comprendido entre 9,1 y 18,3 $\mu\text{mol/L}$, presenta valores más bajos que en sangre total, 61,2-122,4 $\mu\text{mol/L}$, debido a la riqueza de los eritrocitos en este metal (85,67). Además, su concentración presenta una gran variabilidad biológica interindividual (86), por lo que la variabilidad analítica de la técnica instrumental elegida puede ser mayor (84,87,88). Los rangos de referencia en orina y pelo son 4,1-13 $\mu\text{mol/L}$ y 0,82-5 $\mu\text{mol/g}$ (85) respectivamente.

5 CONCLUSIONES

La valoración del estado nutricional de zinc, junto a la detección de síndromes de deficiencia, requiere la utilización de técnicas de análisis con una elevada exactitud y precisión. La espectrometría de absorción atómica de llama cumple adecuadamente el compromiso requerido entre criterios de practicabilidad (simplicidad, rapidez, posibilidad de cuantificar cobre y zinc con una misma dilución) y criterios puramente analíticos (exactitud, precisión y sensibilidad) (77).

6 BIBLIOGRAFÍA

- Underwood EJ. Trace elements in human and animal nutrition. 4th ed New York: Academic Press 1977.
- Hertz W. The essential trace elements. *Science* 1981; 213: 1332-8.
- Golden MHN, Golden BE. Trace elements: Potential importance in human nutrition with particular reference to zinc and vanadium. *Br Med Bull* 1981; 37: 31-6.
- Raulin, M.J. Études chimiques sur la végétation. *Ann Sci Nat Bot Biol Veg (Ser.5)* 1869; 11: 193-299
- Vallee BL, Wacker WEC, Bartholomay AF, Robin ED. Zinc metabolism in hepatic dysfunction. I. Serum zinc concentrations in Laennec's cirrhosis and their validation by sequential analysis. *N Engl J Med* 1956; 255: 403-8.
- Prasad AS. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *Ann J Clin Nutr* 1991; 53: 403-12.
- Halsted JA, Ronaghy HA, Abadi P. Zinc deficiency in man: the shiraz experiment. *Am J Med* 1972; 53: 277-84.
- Prasad AS, Halsted JA, Nadim M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am J Med* 1961; 31: 532-46.
- Clemens KR, Wolf V, McBryant SJ, Zhang P, Liao X, Wright PE et al Molecular basis for specific recognition of both RNA and DNA by a zinc finger protein. *Science* 1993; 260: 531-3.
- Vallee, BL. Zinc and metalloenzymes. In: *Advances in Protein Chemistry*. M.L. Anson, V. Bailey y J. T. Edsall editores. New York: Acad. Press, 1955.
- Vallee BL. A role of zinc in gene expression. *J Inher Metab Dis* 1983; 6:31.
- Vallee, BL. Metabolic role of zinc. *J Am Med Assoc* 1956; 162: 1053.
- Prasad AS. Clinical and biochemical manifestations of zinc deficiency in human subjects. *J Am Coll Nutr* 1985; 4: 65-72.
- Moynahan EJ. Acrodermatitis Enteropathica: A lethal inherited human zinc deficiency disorder. *Lancet* 1974; 17: 399-400.
- Heinen F, Matern D, Pringsheim W, Leutitis JU, Brandis M. Zinc deficiency in an exclusively breast-fed preterm infant. *Eur J Pediatr* 1995; 154: 71-5.
- Sandström B, Cederblad A, Lindblad BS, Lönnerdal B. Acrodermatitis enteropathica, zinc metabolism, copper status, and immune function. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1994; 148: 980-5.
- Sandstead HH. Zinc deficiency, a public health problem? *AJDC*. 1991; 145: 853-9.
- O'Dell, Bl. Bioavailability of trace elements. *Nutr Rev* 1984; 42:301-8.
- Southon S, Fairweather SJ, Harell T. Trace element availability from the human diet. *Proc Nutr Soc* 1988; 47: 27.
- Freeland-Graves JH, Ebangit ML, Hendrikson PJ. Alterations in zinc absorption and salivary sediment zinc after a lacto-ovo-vegetarian diet. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 1757-66.
- Hill CH, Matron G. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. *Fed Proc* 1970; 29: 1474-81.
- O'Dell, BL. Mineral interactions relevant to nutrient requirements. *J Nutr* 1989; 119: 1832-8.
- Ripa S, Ripa R. Zinc and the elderly. *Minerva Med* 1995; 86: 275-8.
- Hutton CW, Hayes-Davis RB. Assessment of the zinc nutritional status of selected elderly subjects. *J Am Diet Assoc* 1983; 82: 148-58.
- Boudaïba N, Flament C, Acher S, Chappuis P, Piau A. A physiological amount of zinc supplementation: effects on nutritional, lipid, and thymic status in an elderly population. *Ann J Clin Nutr* 1993; 57: 566-72.
- Fairweather-Tajj SJ, Wright AJA, Cooke J, Franklin J. Studies of zinc metabolism in pregnant and lactating rats. *Br J Nutr* 1985; 54: 401-13.
- King JC. Does poor zinc nutrition retard skeletal growth and mineralization in adolescents? *Ann J Clin Nutr* 1996; 64: 375-6.
- Milner JA. Trace minerals in the nutrition of children. *J Pediatr* 1990; 117: S147-S155.
- Prasad AS. Clinical manifestations of zinc deficiency. *Ann Rev Nutr* 1985; 5: 341-63.
- Solomons NW, Latham MC. Symposium: Clinical Nutrition in Developing Countries: Toward the Application of Contemporary Concepts and Technology. American Institute of Nutrition. *J Nutr* 1994; 124: 1447S-1448S.
- Campbell DM. Trace element needs in human pregnancy. *Proc Nutr Soc* 1998; 47: 45-53.
- Speich M, Bousquet B, Auget JL, Gelot S, Laborde O. Association between magnesium, calcium, phosphorus, copper, and zinc in umbilical cord plasma and erythrocytes, and the gestational age and growth variables of full-term newborns. *Clin Chem* 1992; 38: 141-3.
- Sandstead HH. Understanding zinc: Recent observations and interpretations. *J Lab Clin Med* 1994; 124: 322-7.
- Keating JN, Wada L, Stokstad ELR, King JC. Folic acid: effect on zinc absorption in humans and in the rat. *Ann J Clin Nutr* 1987; 46: 835-9.
- McClain C, Soutor C, Zreve L. Zinc deficiency: a complication of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1980; 78: 272-9.
- Okada A, Takagi J, Nezu R, Sando K, Shenkin A. Trace element metabolism in parenteral and enteral nutrition. *Nutrition* 1995; 11: 106-13.
- Mansouri AS, Halsted SA, Gombos EA. Zinc, copper, magnesium and calcium in dialyzed and non dialyzed uremic patients. *Arch Int Med* 1970; 125: 88-93.
- Alfrey AC, Smythe WR, Ibels LS, Nunnally LL. Trace elements abnormalities in chronic uremia. Second Annual Progress Report, Springfield VA. National Technical Information Service 1976; p. 35.
- Mahajan SK, Abraham J, Migdal SD, Abu-Hamdan DK, McDonald FD. Effect of renal transplantation on zinc metabolism and taste acuity in uremia. *Transplantation* 1984; 38: 599-602.
- Goode HF, Kelleher J, Walker BE. Relation between zinc status and hepatic functional reserve in patients with liver disease. *Gut* 1990; 31: 694-7.
- Leo MA, Kim C, Lieber CS. Alcohol, vitamin A, and zinc nutrition reviews 1987; 45: 253-5.
- Singh A, Smoak BL, Patterson KY, Lemay LG, Veillon C, Deuster PA. Biochemical indices of selected trace minerals in men: effect of stress. *Ann J Clin Nutr* 1991; 53: 126-31.
- Schechter P, Henkin RT. Abnormalities of taste and smell after head trauma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1974; 37: 802-10.

44. Berger M.M., Cavadini C. Apports méconnus d'oligo-éléments chez les polytraumatisés et les grands brûlés. *Ann Fr Anesth* 1994; 13: 289-96.
45. Borek C. Vitamins and micronutrients modify carcinogenesis and tumor promotion in vitro. *Molecular Interrelations of Nutrition and Cancer*, Raven Press, New York, 1982; 337-49.
46. Shenkin A. Trace elements and inflammatory response: implications for nutritional support. *Nutrition* 1995;11: 100-5.
47. Lindeman RD, Yunice AA, Baxter DJ, Miller LR, Nordquist J. Myocardial zinc metabolism in experimental myocardial infarction. *J Lab Clin Med* 1973; 79: 194-204.
48. Oster O. Trace element concentrations (Cu, Zn, Fe) in sera from patients with dilated cardiomyopathy. *Clin Chim Acta* 1993; 214: 209-18.
49. Gómez E, del Diego C, Orden I, Elosegui LM, Borque L, Escanero JF. Longitudinal study of serum copper and zinc levels and their distribution in blood proteins after acute myocardial infarction. *J Trace Elem Med Biol* 2000; 14 (2): 65-70.
50. Fosmire GJ. Zinc toxicity. *Am J Clin Nutr* 1990; 51: 225-7.
51. Mikac-Devic D. Methodology of zinc determinations and the role of zinc in biochemical processes. *Adv Clin Chem* 1970; 13: 271-333.
52. Walsh A. The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. *Spectrochim* 1955; *Acta* 7: 108-17.
53. Taylor A. Measurement of Zn in clinical samples. *Ann Clin Biochem* 1997; 34: 142-50.
54. Shum-Cheong-Sing-J, Arnaud-J, Javier-A. Automatisation de la détermination colorimétrique du zinc sérique sur Bayer RA 1000. *Ann Biol Clin Paris* 1994; 52: 765-8.
55. Arnaud J, Bellanger J, Bienvenu F, Chappuis P, Favier A. Méthode recommandée de dosage du zinc sérique par absorption atomique en flamme. *Ann Biol Clin* 1986; 44: 77-87.
56. Perry DF. Flame Atomic Absorption Spectrometric Determination of Serum Zinc: Collaborative Study. *Anal Chem* 1990; 73: 619-21.
57. Al-Tufail M; Akram M; Haq A. Process stability assessed by selecting Shewhart's psi statistical analysis technique of the influence of matrix modifier and furnace program in the optimization and precision of zinc determinations by graphite furnace atomic absorption spectroscopy. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1999; 103 : 311-24.
58. Shaw JCL, Bury AJ, Barber A, Mann L, Taylor A. A micromethod for the analysis of zinc in plasma or serum by atomic absorption spectrophotometry ashing graphite furnace. *Clin Chim Acta* 1982; 118: 229-39.
59. Kubes J, Pospisilova B. Determination of heavy metals in infusion solutions using modern polarography methods. *Cesk-Farm* 1989; 38: 156-60.
60. Weitzel G, Fretzdorff AM. Zinkbestimmung in Biologischem Material. *Z Physiol Chem* 1953; 292: 212-20.
61. Zaichick V, Sviridova TV, Zaichick SV. Zinc in the human prostate gland: normal, hyperplastic and cancerous. *Int Urol Nephrol* 1997; 29: 565-74.
62. Versiek J, Barbier F, Speecka A, Hoste J. Plasma zinc levels. *Lancet* 1974; i: 682.
63. Johnson NC. Electrometric titration of copper and zinc in biological material. *Clin Chem* 1962; 8: 497-501.
64. Chappuis P, Pineau A, Guillard O, Arnaud J, Zawislak R. Conseils pratiques concernant le recueil des liquides biologiques pour l'analyse des éléments-trace. *Ann Biol Clin* 1994; 52: 103-9.
65. Elisabeth L, Martin F, Hughes P et al. Effects of anticoagulants and contemporary blood collection containers on aluminium, copper and zinc. *Results. Clin Chem* 2001; 47: 1109-1111
66. Milne DB. Trace elements. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry* 1999; 1029-55.
67. NCCLS (The National Committee for Clinical Laboratory Standards), 1994. Control of Pre-analytical Variation en Trace Element Determinations; Proposed Guideline. NCCLS. Document C38-P. Vol.14 No. 23.
68. Lifschitz MD, Henkin RI. Circadian variation in copper and zinc in man. *J Appl Physiol* 1971; 31: 88-92.
69. Arnaud J, Chappuis P, Jaudon MC, Bellanger J. Marqueurs biologiques nutritionnels des carences en zinc, cuivre et sélénium. *Ann Biol Clin* 1993; 51: 589-604.
70. Agget PJ. The assesment of zinc status: a personal view. *Proc Nutr Soc* 1991; 50: 9-17.
71. Milne DB, Ralston NVC, Wallwork JC. Zinc content of cellular components of blood: methods for cell separation and analysis evaluated. *Clin Chem* 1985;31: 65-69.
72. Jeejeebhoy KN. Micronutrients-state of the art. *New Aspects of Clin Nutr* 1993; 8: 1-24.
73. Shenkin A. Trace elements and inflammatory response: implications for nutritional support. *Nutrition* 1995; 11: 100-5.
74. King JC. Assesment of zinc status. *J Nutr* 1990; 120: 1474-9.
75. Savory J, Willis MR. Trace Metals: Essential Nutrients or Toxins. *Clin Chem* 1992; 38: 1565-73.
76. Thomson RPH. Assesment of zinc status. *Proc Nutr Soc* 1991; 50: 19-28.
77. Monreal JL, Cocho JA, Seijas MV, Deulofeu R, Gonzalez C, Gil A et al. Determinación de las concentraciones séricas de cobre y zinc. Estudio multicéntrico. *Quím Clin* 1994; 13: 60-67.
78. Harrison WW, Yuracheck JP, Benson CA. The determination of trace elements in human hair by atomic absorption spectroscopy. *Clin Chim Acta* 1969; 23: 83.
79. Harrison WW, Tyree AB. The determination of trace elements in human fingernails by atomic absorption spectroscopy. *Clin Chim Acta* 1971; 31: 63.
80. Veillon C, Patterson KY. Trace elements in a commercial freeze-dried human urine reference material. *Analyst* 1996, Jul; 121(7): 983-5.
81. Iyengar V, Woittiez J. Trace elements in human clinical specimens: evaluation of literature data to identify reference values. *Clin Chem* 1988; 34: 474-81.
82. Cornelis R, Fuentes-Arderiu X, Bruunshuus I, Templeton D. Properties and units in the clinical laboratory sciences: part IX. Properties and units in trace elements. *IUPAC-IFCC. Pure and Appl Chem* 1997; 69: 2593-606.
83. Valores de referencia TRACY. *Scand J Work Health* 1993; 19:19-26.
84. Fraser CG. Interpretación de datos bioquímicos-clínicos. *Barcelona*; Mayo, 1988.
85. Caroli S, Alimonti A, Coni E, Petrucci F, Senofonte O, Violante N. The assesment of reference values for elements in human biological tissues and fluids: a systematic review. *Crit Rev Anal Chem* 1994; 24: 363-98.
86. González-Revaldería J, García-Bermejo S, Menchén-Herreros A, Fernández Rodríguez E. Biological variation of Zn, Cu, and Mg in serum of healthy subjects. *Clin Chem* 1990; 36: 2140-1.
87. Reuniones y Congresos. Avances en evaluación de métodos y aparatos en el laboratorio clínico. *Quim Clin* 1989; 8: 71-92.
88. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). *Eur J Chem Clin Biochem* 1997; 35: 833-43.

Correspondencia:
Montserrat González Estecha
cmpav@wanadoo.es
mgestecha@terra.es