

## Determinación de los niveles de zinc urinarios en gestantes de bajo nivel socioeconómico del municipio de Baranoa del departamento del Atlántico

### Determination of levels of urinary zinc in pregnant women of low socioeconomic level of the municipality of Baranoa of the Department of Atlantic

Muñoz Salas, Karen Esther<sup>1</sup>; García Solano, Emilse Flor<sup>1</sup>; Vargas Zapata, Carmiña Lucia<sup>1</sup>; Gómez Sarmiento, Álvaro<sup>1</sup>; Márquez Llanos, Diana Cecilia<sup>1</sup>; Rodríguez Macías, Juan David<sup>2</sup>

*1 Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Atlántico, Grupo de investigación Biología de los Nutrientes. Barranquilla, Colombia.*

*2 Facultad Ciencias de la Salud, Programa de Medicina, Universidad Libre, Grupo de Investigación de Biomembranas (GIBIOM). Barranquilla, Colombia.*

Recibido: 14/septiembre/2018. Aceptado: 30/noviembre/2018.

#### RESUMEN

**Introducción:** El zinc es uno de los micronutrientes esenciales en el organismo por intervenir en numerosos procesos biológicos como el crecimiento y desarrollo, siendo de especial importancia durante el periodo de gestación.

**Objetivo:** Determinar los niveles de zinc urinario en gestantes del municipio de Baranoa del (Atlántico) por el método colorimétrico utilizando zincon (MCZ) y el método de espectrofotometría de absorción atómica (MEAA) y comparar los niveles de zinc urinario por el método de MCZ y MEAA.

**Métodos:** Se estudiaron 54 gestantes entre 24 y 30 años de edad, las cuales fueron atendidas en el Hospital José Gómez Heredia del municipio de Baranoa (Atlántico), entre los meses de enero a agosto del año 2008 cuando se encontraban en las semanas 8–15, 20–25 y 32–36 de la gestación. Las gestantes llenaron una encuesta acerca de datos generales que incluye edad e historia patológica y entregaron muestras de orina durante los tres trimestres de gestación. Las muestras fueron colectadas en ayuna de 12 horas y conservadas a -20°C. Luego se determinó el zinc urinario por el MEAA y MCZ.

**Resultados:** Los niveles totales de zinc urinario fueron de  $16.2 \pm 7$  µg/dL por MCZ y  $25 \pm 16$  µg/dL por MEAA, se encontró que el zinc urinario fue de  $17.81 \pm 5.20$  µg/dL,  $16 \pm 6.50$  µg/dL y  $14.30 \pm 9.05$  µg/dL, para el primero, segundo y tercer trimestre de gestación por MCZ y  $27.2 \pm 16.8$  µg/dL,  $19.8 \pm 14.9b$  µg/dL,  $27.3 \pm 14.5a$  µg/dL, para el primero, segundo y tercer trimestre de gestación por MEAA. Los niveles de Zn determinados por MCZ y MEAA presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ), indicando que el MEAA detecta mejor la excreción de Zn. Pero el MCZ propuesto se puede utilizar para estudios a largo plazo.

**Conclusiones:** El comportamiento del zinc urinario en la gestación mostró variaciones, hallando las concentraciones de zinc urinario más bajo en el segundo y tercer trimestre de la gestación.

#### PALABRAS CLAVES

Zincon, zinc, gestación, colorimetría, espectrofotometría de absorción atómica.

#### ABSTRACT

**Introduction:** Zinc is one of the essential micronutrients in the organism for intervening in numerous biological processes such as growth and development, being of special importance during the gestation period.

**Objective:** To determine the levels of urinary zinc in pregnant women of the municipality of Baranoa del (Atlántico) by

**Correspondencia:**  
Karen Muñoz Salas  
bioka22@hotmail.com

the colorimetric method using zincon (MCZ) and the method of atomic absorption spectrophotometry (MEAA) and to compare the levels of urinary zinc by the MCZ method and MEAA.

**Methods:** Fifty-four pregnant women between 24 and 30 years of age were studied, who were treated at the José Gómez Heredia Hospital in the municipality of Baranoa (Atlántico), between the months of January and August 2008 when they were found in weeks 8- 15, 20-25 and 32-36 of gestation. Participants completed a survey on general data including age and pathological history and delivery of urine samples during the three trimesters of pregnancy. Samples were collected in a 12-hour fast and stored at -20°C. Urinary zinc was then determined by the MEAA and MCZ.

**Results:** The total urinary zinc levels were  $16.2 \pm 7 \mu\text{g} / \text{dL}$  per MCZ and  $25 \pm 16 \mu\text{g} / \text{dL}$  per MEAA, the urinary zinc was found to be  $17.81 \pm 5.20 \mu\text{g} / \text{dL}$ ,  $16 \pm 6.50 \mu\text{g} / \text{dL}$  and  $14.30 \pm 9.05 \mu\text{g} / \text{dL}$ , for the first, second and third trimesters of pregnancy by MCZ and  $27.2 \pm 16.8 \mu\text{g} / \text{dL}$ ,  $19.8 \pm 14.9 \mu\text{g} / \text{dL}$ ,  $27.3 \pm 14.5 \mu\text{g} / \text{dL}$ , for the first, second and third trimesters of gestation by MEAA. Zn levels determined by MCZ and MEAA showed statistically significant differences ( $p \leq 0.05$ ), indicating that MEAA better detects Zn excretion. But the proposed MCZ can be used for long-term studies.

**Conclusions:** The behavior of urinary zinc in pregnancy showed variations, finding the concentrations of urinary zinc lower in the second and third trimesters of gestation.

## KEY WORDS

Zincon, zinc, pregnancy, colorimetry, Spectrophotometry Atomic.

## ABREVIATURAS

MCZ: Método colorimétrico utilizando zincon.

MEAA: Método de Espectrofotometría de absorción atómica.

$\mu\text{g}/\text{dL}$ : Microgramos/decilitros.

Zn: Zinc.

## INTRODUCCIÓN

El zinc (Zn) es considerado un micronutriente importante para el crecimiento y desarrollo del organismo humano, ya que interviene en el metabolismo actuando como cofactor de las enzimas necesarias para la síntesis proteica de ácidos nucleídos, procesos de oxidación, proliferación y división celular entre otras funciones biológicas<sup>1-3</sup>. La cantidad de Zn en la dieta depende del peso de cada porción (en crudo) en la alimentación. Pero, hay factores que afectan su biodisponibilidad en el individuo, como los estados nutricionales, coexistencia de condiciones patológicas, defectos genéticos, alteraciones en su absorción e interacciones con otros nutrientes entre otros factores<sup>4,5</sup>.

Las necesidades diarias de Zn cambian con la edad, la fase de crecimiento y el estado fisiológico, cuando estas necesidades no son suplementadas con las dosis requeridas, causan deficiencias severas y moderadas, siendo la población infantil ( $\leq 4$  años de edad) y mujeres durante el embarazo y la lactancia los más afectados<sup>6</sup>.

En el estado nutricional de los seres humanos no se han encontrado o establecido indicadores adecuados para determinar los niveles de Zn, debido a que tiene un mecanismo homeostático bastante rígido. Sin embargo, su deficiencia está relacionada con niveles bajos en suero, eritrocitos, cabellos, metalotioneínas, sudor, semen y orina<sup>7</sup>. Resaltando que en el organismo humano existen mecanismos rígidos de regulación del Zn, los cuales consisten en utilizar las cantidades de Zn disponibles en los diferentes "pool" que se encuentran en cada órgano, siendo estos los más vulnerables en caso de una necesidad del nutriente en el organismo humano, como por ejemplo el débil "pool" de Zn-albúmina (66%), caracterizado porque la albúmina intercambia Zn. La cantidad "pool" Zn-albúmina cambia conforme los niveles de Zn en suero<sup>8</sup> mientras que el "pool" Zn- $\alpha$ 2macroglobulina contiene la mayoría de Zn plasmático restante, el cual no se puede intercambiar, no cambia con los niveles plasmáticos<sup>9,10</sup>. Por otro lado, en caso de necesidad de Zn en el organismo, los "pool" excretados por el sudor, orina y heces disminuyen<sup>11</sup>.

Para establecer las concentraciones de Zn en muestras biológicas, como la orina se han utilizado métodos con buena sensibilidad como la Espectrofotometría de Absorción Atómica (MEAA) y la fluorescencia molecular. Sin embargo, no todos los laboratorios cuentan con instalaciones dotadas de equipos e instrumentos de última tecnología, con altos costos de reactivos necesarios para realizar estas metodologías. Una alternativa sería el uso de técnicas de análisis más sencillas y menos costosas, uno de los métodos propuestos es la colorimetría utilizando zincon (MCZ), un agente quelante que reacciona con el Zn en condiciones de pH alcalino para formar un complejo azul, el cual ha sido cuantificado en agua y suero, pero no en muestras de orina<sup>12-14</sup>. Aunque hay estudios que han determinado la concentración de Zn en orina por colorimetría, pero utilizando otros complejos de color, diferentes al zincon, han presentado baja sensibilidad<sup>15,16</sup>.

## OBJETIVO

Determinar los niveles de zinc urinario en gestantes del municipio de Baranoa del departamento del Atlántico por el método colorimétrico utilizando zincon (MCZ) y el método de espectrofotometría de absorción atómica (MEAA).

## MATERIALES Y METODOS

**Tipo de estudio:** Estudio exploratorio, descriptivo y longitudinal, la muestra estuvo formada por 54 gestantes del municipio de Baranoa (Atlántico). Las gestantes donaron durante

los tres trimestres de gestación muestras de orina, las cuales fueron colectadas por triplicado durante cada mes. En el estudio participaron todas aquellas mujeres que se encontraban en estado de embarazo y que asistían a control prenatal en la ESE Hospital local público de Baranoa José Gómez Heredia, que presentaron bajo nivel socioeconómico y que se encontraban en un estado saludable. Además, las gestantes no poseían ningún tipo de enfermedad crónica o infecciosa, no tenían hábitos de fumar, no consumían alcohol u otro tipo de drogas. Fueron excluidas aquellas mujeres que no asistieron a las colectas programadas en los tres trimestres de la gestación y que eran menores de edad.

Las gestantes llenaron una encuesta acerca de datos generales que incluía edad, talla, peso antes del embarazo, historia patológica, padecimiento de complicaciones en las gestaciones, actividades de ejercicios físicos y uso de suplemento, de vitaminas o minerales, renta familiar, estrato entre otros.

**Comité de ética:** El estudio fue avalado por el Comité de Ética del Departamento de Investigaciones de la Universitaria del Atlántico.

**Colección de la muestra y determinación de zinc urinario:** Las muestras fueron recogidas en ayuna de 12 horas de la primera micción de la mañana, con la adición de 50µL de HCL concentrado, luego fueron conservadas a -20°C. Las determinaciones de las concentraciones de Zn por EAA, se analizaron en el laboratorio de Proteínas y Enzimas, Metabolismo y Nutrición de la Universidad del Valle en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica. SHIMADZU AA-6300 a una longitud de onda de 213.93nm. Para la determinación de Zn urinario por MCZ, se modificó el método descrito por Eaton et al. 2005<sup>17</sup> y William et al. 1962.<sup>18</sup> Se realizaron tres pretratamientos antes de determinar el Zn por el MCZ, los cuales fueron hidrolisis ácida (1:1 de HCl concentrado) a 120°C por 20 horas, incineración hasta la formación de cenizas y microcentrifugación por 10 minutos a 10000 rpm.

#### Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo para clasificar, organizar y representar cada variable para su caracterización general que incluye media, rango, mediana y desviación estándar. Para determinar las diferencias estadísticas entre la excreción urinaria de Zn por MCZ y MEAA, se aplicó el test de chi cuadrado ( $\chi^2$ ). Además, se aplicó el test de Tukey's (test-t) para evaluar parejas de variables (trimestres) de cada uno de los indicadores, logrando así estimar el grado de diferencia estadísticamente entre los resultados de cada trimestre, el nivel de confianza utilizado fue del 95,0%. Considerando como significativos los valores de  $p < 0.05$ .

Se graficaron las variaciones interindividuales de cada indicador por trimestre a través de Gráficos de Cajas y Bigotes.

Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del programa computacional Statgraphies plus 5.1, centurión versión 17.

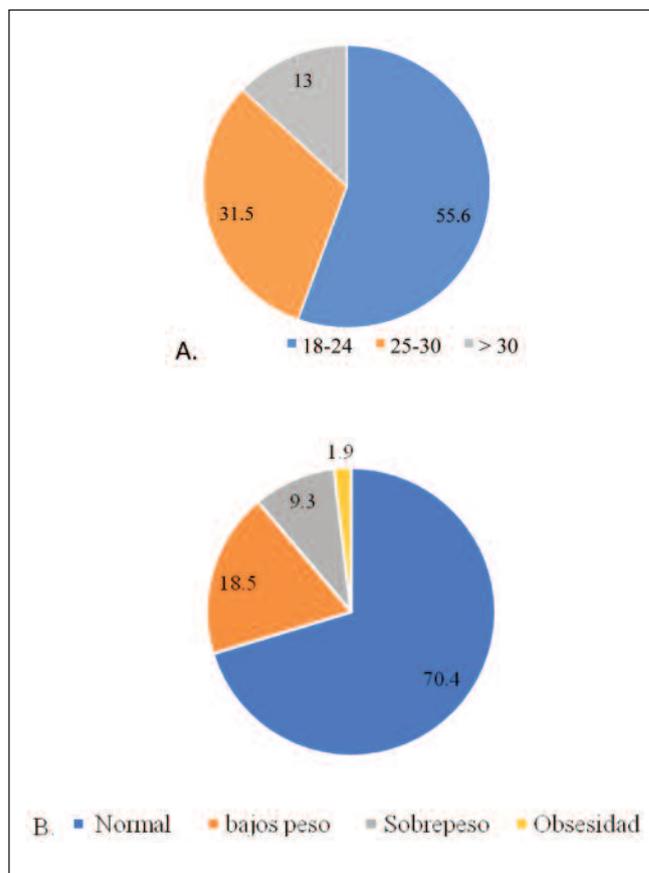
## RESULTADOS

La edad promedio de las gestantes fue de 24.8 años ( $DE \pm 5.1$ ), el 55.6% de las mujeres tenían entre 18 a 24 años ( $n=30$ ), el 31.5% tenían entre 25 y 30 años ( $n=17$ ) y el 13.0% tenían más de 30 años ( $n=7$ ). Según el índice de masa corporal pregestacional, el 70.4% de las mujeres ( $n=38$ ) presentaban un peso normal antes de la gestación, mientras que un 18.5% ( $n=10$ ) y un 9.3% ( $n=5$ ) presentaban bajos peso y sobrepeso respectivamente, un 1.9% presentaba obesidad (Figura 1).

En la tabla 1, se encuentra los niveles de Zn urinario de las gestantes del estudio. Los niveles de Zn por MCZ y MEAA fueron de  $16.2 \pm 7 \mu\text{g/dL}$  y  $25 \pm 16 \mu\text{g/dL}$  respectivamente. El rango estuvo de  $4.10 \mu\text{g/dL}$  a  $59.9 \mu\text{g/dL}$  con MCZ y de  $3.2 \mu\text{g/dL}$  a  $66 \mu\text{g/dL}$  con MEAA. Se encontró diferencias estadísticamente significativas entre MCZ y EAA.

En la tabla 2, se encuentra los niveles de Zn urinario de las gestantes por trimestre de gestación. Durante el primer, segundo y tercer trimestre de gestación se encontraron valores de  $17.81 \mu\text{g/dL}$ ,  $16 \mu\text{g/dL}$  y  $14.3 \mu\text{g/dL}$  respectivamente. Los valores máximos y mínimos para el primer trimestre fueron de

**Figura 1.** Características generales de las gestantes del hospital público de Baranoa, A: Edad y B. Índice de masa corporal pregestacional.



**Tabla 1.** Niveles de zinc urinario de las gestantes de Baranoa (Atlántico) por el método colorimétrico utilizando zincon (MCZ) y el método de espectrofotometría de absorción atómica (MEAA).

Variables	MCZ (µg/dL)	MEAA (µg/dL)
Media*	16.2	25
Mediana	15.2	22.37
Desviación estándar	7	16
Mínimo	4.10	3.27
Máximo	59.9	66
Rango	55.80	62.4

\*Diferencia estadísticamente significativa entre los dos métodos ( $P < 0.05$ ), según método de comparación de las medias de Mann-Whitney.

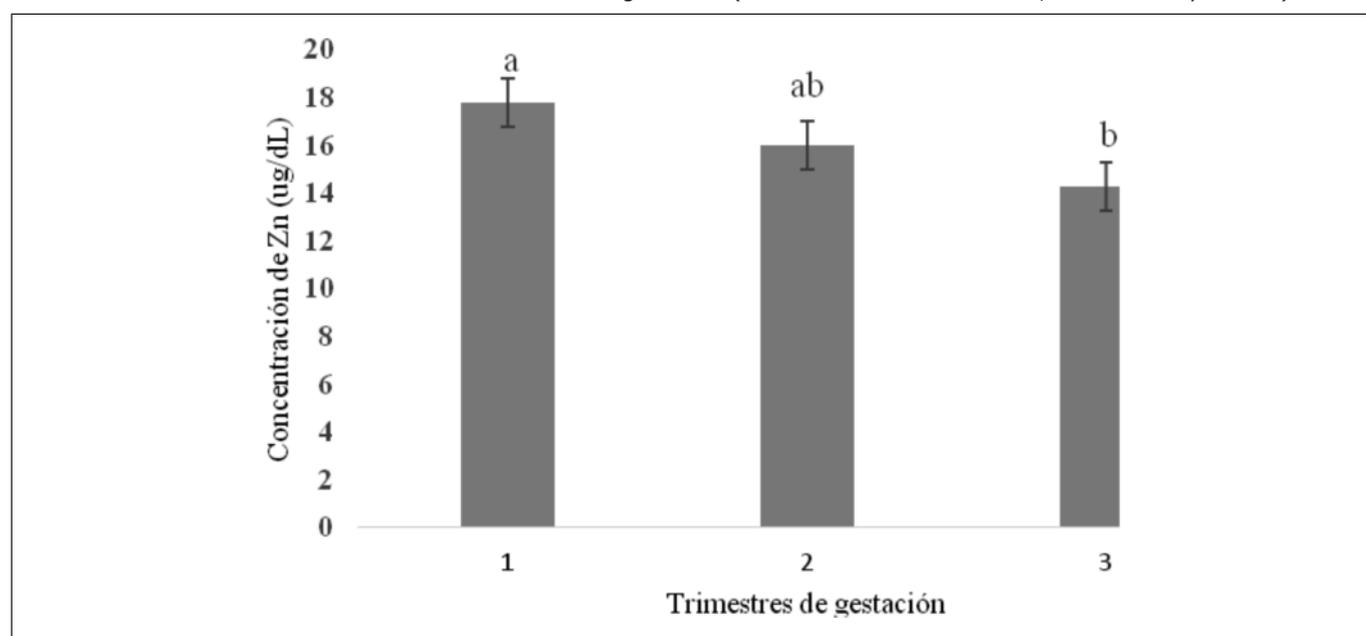
9.41 µg/dL a 31.09 µg/dL, el segundo trimestre 4.05 µg/dL a 34.47 µg/dL y tercer trimestre de 5.41 µg/dL a 50.02 µg/dL. Hubo variación entre los trimestres de gestación con disminución de los niveles de Zn del primero y segundo trimestre de gestación con respecto al tercer trimestre, con variabilidad interindividual entre los trimestres (Figura 2).

En la tabla 3, se encuentra los niveles de Zn urinario de las gestantes por trimestre de gestación evaluados por EAA. La excreción de zinc urinario exhibió variaciones a lo largo de la gestación, entre el primer y el segundo trimestre los valores fueron disminuyendo de  $27.2 \pm 16.8$  µg/dL a  $19.8 \pm 14.9$  µg/dL ( $t=2.30$ ;  $p < 0.05$ ) pero luego incrementó en el tercer trimestre hasta alcanzar una concentración similar al primer trimestre  $27.3 \pm 14.5$  µg/dL ( $t=2.84$ ;  $p < 0.01$ ), hubo diferencias estadísticamente significativas de Zn urinario en el segundo trimestre de gestación con respecto al primer y tercer trimestres.

**Tabla 2.** Niveles de zinc urinario de las gestantes de Baranoa (Atlántico) en los tres trimestres de gestación evaluados por MCZ. ug/dL: microgramos/decilitros.

Trimestre	Media* ± DE	Mínimo	Máximo	Rango
1	$17.81 \pm 5.20$ µg/dL	9.41 µg/dL	31.09 µg/dL	22 µg/dL
2	$16 \pm 6.50$ µg/dL	4.05 µg/dL	34.47 µg/dL	30.42 µg/dL
3	$14.30 \pm 9.05$ µg/dL	5.41 µg/dL	50.02 µg/dL	44.61 µg/dL

**Figura 2.** Caja de bigotes del método colorimétrico utilizando zincon en los tres periodos de gestación. Los indicadores que presentan diferente letra suscrita revelan diferencia estadísticamente significativa (Test de kruskal-Wallis  $P < 0.05$ ; Mann-Whitney  $P < 0.05$ ).



**Tabla 3.** Niveles de zinc urinario de gestantes de Baranoa durante los tres trimestres de la gestación evaluados por EAA.

Trimestre	Media* ± DE	Mínimo	Máximo	Rango
1	27.2 ± 16.8 <sup>a</sup> µg/dL	5.48µg/dL	58.4µg/dL	53µg./dL
2	19.8 ± 14.9 <sup>b</sup> µg/dL	3.74 µg/dL	60.8µg/dL	57µg/dL
3	27.3 ± 14.5 <sup>a</sup> µg/dL	3.27µg/dL	65.70 µg/dL	63µg/dL

Test de Tukey: Los indicadores que presentan diferente letra suscrita revelan diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

Para determinar el zinc urinario en las gestantes por MCZ, se realizaron unos pretratamientos, se trataron las muestras con hidrólisis, incineración y microcentrifugación, se observó que por hidrólisis con  $\text{HNO}_3$  producían diluciones que imposibilitaban la detección de Zn. El proceso de la incineración de las muestras obtuvo valores mayores a los observados cuando las muestras no eran degradadas e hidrolizadas con  $\text{HNO}_3$ . Posiblemente porque hay una mayor interferencia del zincon con otros iones que se encontraban altamente concentrados en las cenizas de las muestras de orina<sup>22</sup>. Por otro lado, la preparación de las muestras por microcentrifugación, fue la que presentó mejor resultado en la determinación de Zn, porque no se requiere un tratamiento previo de la muestra<sup>23</sup>. Hay que considerar que el Zn excretado se encuentra en estado inorgánico, no unido a proteínas, por lo que se convertiría en una matriz que no tuviera interferentes en la reacción del acople de Zn con el zincon<sup>24,25</sup>.

Este estudio se reporta los niveles de zinc urinario en mujeres gestantes de bajo nivel socioeconómico del municipio de Baranoa Atlántico. Se pudo observar que los niveles de zinc urinario presentan variaciones durante los trimestres de gestación, posiblemente por los cambios fisiológicos y los altos requerimientos de zinc por parte del feto, los cuales hacen que cambie la excreción de zinc. En otros estudios en mujeres con alto nivel socioeconómico pertenecientes a los países subdesarrollados encontramos que la excreción de Zn aumenta. Fung et al. 1997<sup>28</sup> en Estados Unidos reporta que para el segundo y tercer trimestre de gestación fue de 29.05 y 37.26 µg/dL respectivamente. Al comparar la excreción de Zn en las gestantes de bajo nivel socioeconómico, se encontró que fueron similares al estudio realizado por Hambidge et al. 1993<sup>25</sup> en mujeres de bajo nivel socioeconómico de la India, con valores para los trimestres de gestación de 21.2±8.12 µg/dL, 14.2±37 µg/dL, 14±2.5 µg/dL, diferente a lo reportado por los estudios de Donangelo et al. 2005<sup>27</sup> 21.2±8.12 µg/dL, 14.2±3.7µg/dL y 14±2.5 µg/dL durante el primer, segundo y tercer trimestre de gestación en mujeres brasileñas, los niveles de Zn urinario fueron más altas para los trimestres. Los cambios en la excreción de Zn de acuerdo al nivel socioeconómico pueden deberse a la ingesta y distribución de Zn en el organismo.

La disminución de Zn durante la gestación en este trabajo está en concordancia a lo descrito en otros estudios, sobre

todo en mujeres de bajo nivel socioeconómico, pues el Zn en el organismo presenta mecanismo de regulación homeostático rígido. En caso de necesidad del Zn se presentaría una redistribución entre los diferentes *pools* del organismo, dependiendo del estado nutricional de Zn en que se encuentra las gestantes. Si la cantidad de Zn es baja en la dieta, se comprometerían los *pools* vulnerables como el de músculo, hígado, hueso, además de la excreción en orina, sudor y heces se ven afectados por las necesidades que debe cubrir el feto tal como pudo ocurrir en el estudio. Además, en organismos sanos con una ingestión adecuada en Zn durante la gestación se presenta un aumento de la filtración glomerular, por ende, un aumento en la excreción del mineral. Sin embargo, debido al mecanismo de regulación que presenta el Zn entre los diferentes *pools* del organismo, parece ser que la conservación renal contribuye a la homeostasis del Zn en mujeres embarazadas<sup>30</sup>.

## CONCLUSIONES

Las gestantes presentaron niveles de zinc urinario variados, presentando una disminución de la excreción de zinc al final del tercer trimestre de gestación.

Diferencias en las excreciones de Zn urinario a lo largo de la gestación en las mujeres de bajo nivel socioeconómico puede deberse al mecanismo de regulación que presenta el Zn entre los diferentes *pools* del organismo y la conservación renal parece contribuir a la homeostasis del Zn en mujeres de bajo nivel socioeconómico.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a COLCIENCIAS y al Departamento del Atlántico bajo la Convocatoria 673 (2014) de formación de capital humano de alto nivel para el departamento del Atlántico capítulo de maestrías y doctorados nacionales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Velázquez PA, Pérez DO, Pino JR. El zinc, micronutriente importante en la salud humana. Rev. Electrón. Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta [Internet]. 2014 [citado 2018-06-22]; 39(8):1-5. Disponible en <http://revzoilomarinellosld.cu/index.php/zmv/article/view/223>.
- Rodríguez D, Papale J, Dellan G, Torres M, Berné N, Mendoza J et al. Deficiencia de zinc y cobre en menores de 15 años en una población rural de Venezuela. Rev. Bol Méd Post. [Internet].

- 2004[citado 2004-04-01]; 20(2): 55-60. Disponible en <http://bases.bireme.br>
3. Rubio C, González D, Martín D, Revert C, Rodríguez L, Hardisson A. El zinc: oligoelemento esencial [Internet]. *Rev. Nutr. Hosp.* 2007[citado 2007-02-01]; 22(1):101-107. Disponible en <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/3823>.
  4. Morales P, López J, Triana T (dir). Efficacy of zinc as a coadjuvant in the treatment of pneumonia in pediatric patients of the university hospital Luis Razetti. [Tesis de pregrado publicada]. [Chiquimula, Guatemala]: Eastern University. School of health sciences. Department of pediatrics; 2009. [citada 2009-01-1]: Disponible en <http://hdl.handle.net/123456789/1141>.
  5. López, D; Castillo C, Diazgranados D. Zinc in human health-II. *Rev. Chil. Nutr.* [Internet]. 2010. [citado 2018-06-30]. 7(2):240-247. Disponible en <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-7518201000200014>
  6. Mesa AC, Pinzon AM. (dir). Factors associated with zinc deficiency in children colombian between 1 and 4 years of age [undergraduate thesis in internet]. [Bogota, Colombia]. Rosary University. Department of pediatrics. 2014 [citado 2014-10-1]. Disponible en <http://repository.urosario.edu.co/bitstream/handle/10336/8960/33366144-2014.pdf>
  7. López D, Castillo C, Díaz D. Zinc in human health-I. *Rev Chil Nutr.* [Internet]. 2010 [citado 2010-04-2]. 37(2): 234-239. Disponible en <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rchnut/v37n2/art13.pdf>
  8. Pérez A. Zinc and sports performance. *Age. Rev. Digital Buenos Aires.* [Internet]. 2010 [citado 2007-10-1], 12 (113):1. Disponible en <http://www.efdeportes.com/efd113/zinc-y-rendimiento-deportivo.htm>
  9. King JC, Shames DM, Woodhouse LR. Zinc homeostasis in humans. *J Nutr.* 2000; 130(5):1360S-1366S.
  10. Coñote-Virhues MC, Arroyo-Arias G. (Aser) Determination of zinc in patients treated with artificial nutrition. [postgraduate thesis in internet [Lima, Peru]. National University of San Marcos. faculty of pharmacy and biochemistry. 2010. [citado en 2010]. Disponible en <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/2593>
  11. Rodrigues-Simoes TM, Vargas-Zapata CL, Marino C. Influence of hormonal contraceptives on indices of zinc homeostasis and bone remodeling in young adult women. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* [Internet]. 2015 [citado 2018-07-3], 37(9):402-410. Disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-72032015000900402&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032015000900402&lng=en&nrm=iso).
  12. Terres C, Lopez M (dir), Lopez H (dir), Navarro M (dir). Determination of zinc levels in food, soil and beverages in the motril area. evaluation of dietary intake. [Tesis doctoral publicada]. [Granada-España]. University of University of Granada. 1999. [citada 2014-10-1]. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/18654046.pdf>
  13. Ghasemi, J, Ahmadi S, Torkestani, K. Simultaneous determination of copper, nickel, cobalt and zinc using zincon as a metalochromic indicator with partial least squares. *Anal. Chim. Acta.* 2003; 487(2):181-188. Disponible en <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267003005567>.
  14. Ruiz N, Meertens L, Peña N, Sánchez A, Solano L. Behavior of serum zinc levels during pregnancy, *J Arch Latinoam Nutr* 2005; 5(3):235-244. Disponible en <http://europepmc.org/abstract/med/16454049>
  15. Caro D, Alfaro N, Vargas C (dir) Colorimetric determination of zinc in blood serum sample and human urine using 2-Carboxi 2´Hidroxi5´ Sulfaformacilbenceno (zincon). [Tesis de pregrado no publicada]. [Atlantico-Colombia]. Universidad del Atlántico. Facultad de quimica 2009.
  16. Miller D. Colorimetric determination of zinc with zincon and cyclohexanone, *J Water Pollut Control Fed* 1979; 5:(10) 2402-2424.
  17. Eaton D, Franson M, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Standard methods for the examination of water y wastewater: Washington, DC: 21st ed; American Public Health Association, 2005.
  18. William L, Cohen J, Bennie Z. Study of a Differential Demasking Technic for Serum Zinc. *J. clinical chemistry.* 1962; 8(5): 502-508.
  19. Meret S, Henkin, R. Simultaneous Direct estimation by Atomic Absorption Spectrophotometry of Copper and Zinc in Serum, Urine, and Cerebrospinal Fluid. *J Clin Chem* 1971; 17(5): 369-373.
  20. Nixon D, Moyer T, Johnson P, McCall J, Ness A, Fjerstad W, Wehde M. Routine Measurement of Calcium, Magnesium, Copper, Zinc, and Ironin Urine and Serum by Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy. *J. clinical chemistry.* 1988; 32(9):1660-1665.
  21. Säbel C, Neureuther J, Siemann, S. Spectrophotometric method for the determination of zinc, copper, and cobaltions in mealloproteins using zincon. *J Anal. Biochem* 2010; 3978(2): 218-226.
  22. Hamdi A. Chronic exposure to zinc of furnace operators in a brass foundry. *Br J Ind Med.* 1969; 26(2):126-134.
  23. Parker M, Humoller F, Mahler D. Determination of Copper and zinc in biological material. *J Clin Chem.* 1967; 138(1):40-48.
  24. Walker B, Dawson J, Kelleher J, Losowsky M. Plasma and urinary zinc in patients with mala absorption syndromes or hepatic cirrhosis. *J CGH.* 1973;14(12): 943-948.
  25. Hambidge KM, Krebs NF, Jacobs MA, Favier A, Guyette L, Ikie D. Zinc nutritional status during pregnancy a longitudinal study. *Am. J. Clin. Nutr.* 1986; 37(3): 429-442.
  26. Ogunfokany A, Kaisam J, Balogun O. Study of trace elements in urine of some Nigerian medical patients. *J Toxicol Environ Chem.* 2009; 91(3): 435-449.
  27. Donangelo C, Vargas C, Woodhouse L, Shames D, Mukherjea R, King J. Zinc absorption and kinetics during pregnancy and lactation in Brazilian women. *Am J Clin Nutr.* 2005; 82(1):118-24
  28. Fung E, Lorrrene D, Ritchie L, Woodhouse, R, Raimund R, et al. Zinc absorption in women during pregnancy and lactation:a longitudinal study. *Am J Clin Nutr.* 1997; 66(1):80-88.
  29. Afkhami A, Bahram M. Cloud point extraction simultaneous spectrophotometric determination of Zn (II), Co (II) and Ni (II) in water and urine samples by 1-(2-Pyridylazo)2-Naphthol using partial least squares regression. *J Microchim. Acta.* 2006; 155(4): 403-404.
  30. Krebs N, Hambidge F, Margaret A, Oliva J. The effects of a dieyary zinc supplement during lactation on longitudinal changes in maternal zinc status and milk zinc concentrations. *Am J Clin Nutr.* 1987; 41(3): 560-570.