

Tesis doctoral

Universidad de Granada

Facultad de Farmacia

*DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES
DE Zn EN ALIMENTOS, SUELOS Y
BEBIDAS DEL ÁREA DE MOTRIL.
EVALUACIÓN DE SU INGESTA EN
LA DIETA.*

*Memoria que presenta para aspirar al grado de Doctor en
Farmacia, la licenciada CARMEN TERRÉS MARTOS.*

1. Granada, Febrero de 1.999

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Carmen Terrés Martos
D.L.: GR 2256-2010
ISBN: 978-84-693-1322-0

*DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA*

DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL

Prof. Dra.

M^a C. López Martínez.

Prof. Dra.

H. López G^a de la Serrana

Prof. Dr.

M. Navarro Alarcón.

Licenciada: CARMEN TERRÉS MARTOS

Aspirante al grado de Doctor en Farmacia.

*DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE GRANADA*

Directora: M^a DEL CARMEN LÓPEZ MARTÍNEZ

*CERTIFICO que el presente trabajo ha sido realizado por Dña. Carmen Terrés Martos,
en el Laboratorio del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de
Farmacia de Granada.*

Granada, febrero de 1999

AGRADECIMIENTOS

Al presentar esta Tesis doctoral, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas.

A la Dra. Herminia López García de la Serrana, directora de este trabajo y verdadera artífice del mismo, ya que sin su especial ayuda no hubiese sido posible su realización.

Al Dr. Miguel Navarro Alarcón, por haberme iniciado en la investigación con sus enseñanzas y su constante estímulo y sobre todo, por la inestimable ayuda y dedicación que siempre ha tenido conmigo.

A Marisa Vílchez López, por su gran esfuerzo en la presentación final de esta memoria, sacrificando para ello su tiempo de descanso.

Por último, a todas aquellas personas, que sin aparecer aquí reflejadas, han contribuido de alguna forma a la realización de esta Tesis doctoral.

A todos, gracias.

Índice

<i>I. INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
1. Propiedades fisicoquímicas.....	6
2. Usos industriales del Zn.....	7
3. El Zn en el medio ambiente.....	8
3.1. El Zn en la corteza terrestre.....	8
3.2. El Zn en la atmósfera.....	9
3.3. El Zn en el agua.	10
4. El Zn en los alimentos.....	10
4.1. Fuentes alimentarias principales de Zn.....	10
4.1.1. Zn y carne.....	11
4.1.2. Zn y pescado.....	12
4.1.3. Zn y marisco.....	13
4.1.4. Zn y leche.....	14
4.1.5. Zn y vegetales.....	17
5. Comportamiento del Zn en el organismo humano.	19
5.1. Absorción del Zn.....	19
5.2. Distribución y transporte de Zn.....	22
5.3. Metabolismo del Zn.....	23
5.4. Eliminación del Zn.....	25
6. Biodisponibilidad.....	28
6.1. Factores que afectan a la biodisponibilidad del Zn.	29
A. Factores fisicoquímicos.....	29
- Solubilidad en agua.....	29
-Estado químico y forma farmacéutica.	29
-	29
-	29

B. Factores que disminuyen la biodisponibilidad.....	30
-. Competición por el mecanismo de absorción.....	30
Con el hierro.....	30
Con el calcio y el magnesio.....	32
-. Agentes quelantes.....	33
Fitatos y fibra.....	33
C. Factores que aumentan la biodisponibilidad del Zn.....	35
-. Cantidad y tipo de proteínas en la dieta.....	35
-. Origen del mineral.....	36
-. Tratamiento tecnológico.....	36
-. Ácido cítrico.....	36
7. Funciones bioquímicas y fisiológicas.....	37
A. Óxido reductasas.....	38
-. Alcohol deshidrogenasa.....	38
-. Superóxido dismutasa.....	38
B. Transferasas.....	39
-. Aspartato transcarbamilasa.....	39
-. Nucleótido polimerasa.....	39
-. Termolisina.....	39
-. Colagenasa.....	39
C. Liasas.....	39
-. Alcoholasas.....	39
-. Anhidrasa carbónica.....	40
D. Metalotionina.....	40
8. Toxicidad del Zn.....	41
8.1. Interacción del Zn con distintos fármacos.....	45
9. El Zn y las patologías asociadas a su deficiencia.....	46
9.1. Zn y crecimiento.....	47
9.2. Zn y embarazo.....	50
9.3. Zn y aparato reproductor en el hombre.....	54
9.4. Zn y diabetes.....	55

9.5. Zn y piel.....	60
9.6. Zn y alteraciones hepáticas.....	63
9.7. Zn y cáncer.....	66
9.8. Zn y sistema inmune.....	69
9.9. Zn y enfermedades cardiovasculares.....	73
10. Técnica analítica de determinación de Zn.....	76
10.1 Espectroscopía atómica.....	77
A. Espectroscopía de absorción atómica.....	79
-. Espectroscopía de absorción atómica con atomización a la llama.....	80
-. Espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotrémica (ETA-AAS) u horno de grafito (GF-AAS).....	82
10.2. Métodos para la determinación de elementos minerales en leche.....	84
A. Pretratamiento de las muestras.....	84
-. Mineralización por vía húmeda: digestión.....	85
II. OBJETIVOS.....	87
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	93
1. Material.....	95
1.1. Aparatos.....	95
1.2. Material.....	95
1.3. Reactivos y disoluciones.....	96
1.4. Muestras.....	97
1.4.1. Carnes.....	97
1.4.2. Alimentos marinos.....	97
1.4.3. Leches.....	98
1.4.4. Derivados lácteos.....	98
1.4.5. Cereales y leguminosas.....	99
1.4.6. Vegetales y frutas.....	99
1.4.7.	
1.4.7. Suelos, sedimentos y arenas.....	99
1.4.8. Aguas.....	100

1.4.9. Bebidas.....	100
1.5. Material informático.....	101
2. Métodos.....	111
2.1. Calibrado.....	111
2.1.1. Preparación de la recta de calibrado.....	111
2.1.2. Aplicación del método de adición de patrón.....	112
2.2. Fase preinstrumental.....	131
2.2.1. Mineralización de las muestras de carnes, pescados, cereales y legumbres, frutas y verduras, bebidas y otros.....	131
2.2.2. Mineralización de muestras de leche.....	131
2.2.3. Mineralización de muestras de suelos, sedimentos y arenas.....	133
2.2.4. Mineralización de muestras de bebidas.....	133
2.2.5. Mineralización de muestras sólidas (sal, azúcar, café, cacao.....)	134
3. Fase instrumental.....	139
3.1. Medida de la concentración de Zn a la llama.....	139
3.2. Características analíticas del método.....	140
3.2.1. Sensibilidad.....	140
3.2.2. Selectividad.....	141
3.2.3. Límite de detección.....	145
3.2.4. Exactitud.....	146
3.2.5. Precisión.....	153
3.3. Medida de la concentración de Zn mediante EAA por atomización electrotérmica (horno de grafito).....	158
4. Resultados del análisis de muestras.....	160
IV. ESTUDIO ESTADÍSTICO.....	169
1. Aplicación del análisis estadístico en carnes.....	172
2. Aplicación del análisis estadístico en pescados.....	174
3. Aplicación del análisis estadístico a leches.....	175
4. Aplicación del estudio estadístico a frutas y vegetales.....	183
5. Aplicación del análisis estadístico en suelos, sedimentos y arenas.....	184

6. Aplicación del análisis estadístico en aguas.....	190
7. Aplicación del análisis estadístico en bebidas.....	191
V. INGESTA.....	221
1. Cantidad media de Zn ingerida en la ración alimentaria.....	223
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	269
1. Zn en productos cárnicos (carne, vísceras y embutidos).....	272
2. Zn en pescados, mariscos y cefalópodos.....	275
3. Zn en productos lácteos.....	277
4. Zn en vegetales y frutas.....	282
5. Zn en cereales, legumbres y frutos secos.....	284
6. Zn en bebidas.....	286
7. Zn en suelos, sedimentos y arenas.....	287
8. Zn en aguas potables, residuales, de riego y de mar.....	292
VII. CONCLUSIONES.....	295
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	301

Introducción

A pesar del importante papel que el Zn ha jugado en la vida biológica y económica del hombre, históricamente este elemento no despertó un especial interés en los científicos, siendo en los últimos años cuando su estudio sufrió un considerable incremento. No en vano este elemento ocupa la posición 24 en cuanto a su abundancia en la corteza terrestre (Bertholf, 1987). Además, su contenido en el cuerpo humano es semejante al del hierro y mas de 10 veces que el de cobre, dos elementos que por otro lado están caracterizados como esenciales (Reilly, 1980).

Se trata de un elemento esencial que juega un papel importante en la homeostasis del organismo (Soria, 1995): más de 200 enzimas son Zn - dependientes (Tabla 1) y además participa en la síntesis de ADN y ARN (Mc Clain, 1988).

Tabla 1: Zinc, metaloenzimas y metaloproteínas

ENZIMA	FUENTE
Alcohol deshidrogenasa	Levadura; hígado equino y humano
Lactato deshidrogenasa	Músculo conejo
D-lactato-citocromo c reductasa	Levadura
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	Músculo bovino y porcino; levadura
Glutamato deshidrogenasa	Hígado bovino
Aldolasa	Levadura; <i>Aspergillus niger</i> , <i>E. coli</i>
Anhidrasa carbónica	Eritrocitos de bovino, simio, humano y porcino
Fosfatasa alcalina	<i>E. coli</i> , riñón, porcino, placenta humana y leucocitos
Procarboxipeptidasa A y B	Páncreas de bovino y porcino
Carboxipeptidasa A y B	Páncreas de bovino y porcino
Proteasa neutra	<i>B.subtilis</i> , <i>B.megatherium</i> , <i>Aeromonas proteolyticum</i> , <i>Serratia</i>
Termolisina	<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>
Leucina aminopeptidasa	Riñón de porcino
Piruvato carboxilasa	Levadura
Fosfomanosa isomerasa	Levadura
AMP-aminohidrolasa	Músculo de conejo
Dipeptidasa	Riñón de porcino
Aspartato transcarboxilasa	<i>E. coli</i>
DNA-polimerasa	<i>E. coli</i>
α -Macroglobulin	Suero humano
Colagenasa corneal	Tejido mamario

ALA-dehidrolasa	Tejido mamario
Proteínas que contienen Zn y Cd	Riñón e hígado equino; riñón e hígado humano; hígado de conejo
Metalotionina	<i>B. subtilis</i>
Metaloenzimas que contienen Zn y Ca	
amilasa	<i>E. coli</i>
Metaloenzimas que contienen Zn y Mn	
superóxido dismutasa	

Por tanto la falta de un aporte adecuado en la dieta diaria puede plantear graves problemas en la salud de los individuos (Yucel y col. 1994, Govindaraju y col. 1993, El Yazigi y col. 1993). La importancia del Zn se establece en base a sus características fisicoquímicas. En este sentido y a diferencia de los metales de transición, en los que se incluye este elemento, no forma muchos complejos coloreados brillantes con los agentes quelantes (Reilly, 1980).

La evidencia sobre su esencialidad fue establecida en las plantas en 1869 y en animales en 1934 (King y Keen, 1994). Debido a su amplia distribución en los alimentos, la aparición de deficiencias en Zn de forma natural fue considerada poco frecuente hasta 1955 cuando se demostró que la paraqueratosis del cerdo era una enfermedad debida a la falta de este elemento (King y Keen, 1994). Posteriormente, la constatación de que los humanos podían también padecer enfermedades derivadas de la deficiencia en Zn, se demostró tras la observación de que los pacientes chinos malnutridos durante la segunda guerra mundial, presentaban bajas concentraciones de Zn en plasma. Desde que en 1961, cuando el hipogonadismo endémico y el enanismo de la población rural de Irán, se sugirió que eran derivados de una deficiencia en Zn, ha habido de forma progresiva un aumento de la apreciación de la magnitud de su significancia, tanto clínica como en la salud pública.

El Zn es un elemento esencial para numerosos procesos fisiológicos, para las plantas, los animales y los seres humanos. Se depositan cantidades de Zn relativamente elevadas en el hueso y en el músculo pero estas reservas no establecen un equilibrio rápido con el contenido del resto del organismo.

El "pool" corporal de Zn disponible con facilidad es pequeño y parece tener una tasa de renovación rápida a juzgar por la aparición precoz de signos de deficiencia en los animales de laboratorio. Todavía no se ha identificado ninguna función enzimática aislada que pueda explicar el comienzo rápido de las alteraciones fisiológicas y bioquímicas en los

casos que presentan una deficiencia de Zn pero el hecho de que muchas enzimas relacionadas con la expresión de genes requieran este elemento, podría explicar el efecto inmediato de la deficiencia sobre el crecimiento y la reparación de las células (Halsted y col. 1972).

1.- Propiedades fisico-químicas

El Zn es un elemento que tiene un peso atómico de 65,37 g/at-g y su número atómico es 30 en la tabla periódica.

Su densidad es de 7.14 g/cm³, con un punto de fusión de 420°C. Como el mercurio y, en menor medida el cadmio, sus dos vecinos en el grupo IIIb en el que se encuadra, el Zn es considerablemente volátil para ser un metal pesado. Se trata de un blanco y brillante metal, que es dúctil y maleable a 100°C. Se deslucen en presencia de aire a un color gris azulado debido a la formación de una cubierta adherida de un carbonato básico [Zn₂(OH)₂CO₃]. Esta capa protege el metal subyacente de posteriores agresiones y constituye la base de su empleo en la galvanización de otros metales para su protección de la corrosión (Bertholf, 1987).

El Zn es un metal muy reactivo que se combina fácilmente con ácidos no oxidantes liberando hidrógeno y formando las sales de Zn. También disuelve las bases fuertes para formar iones zincato [(ZnO₂)²⁻]. Reacciona con oxígeno, especialmente durante su calentamiento, produciendo óxido de Zn. Aunque estrictamente hablando no es un metal de transición, puesto que tiene completamente llenos de electrones su orbital 3d, comparte con el cobre y otros metales de transición la tendencia a formar complejos fuertes con ligandos orgánicos. No hay duda que esta es la propiedad a la cual es debido, el importante papel biológico asumido por el Zn durante el curso de la evolución (Reilly, 1980).

El Zn forma numerosas aleaciones al combinarse con otros metales, de las cuales la más común es el acero galvanizado o latón, donde el revestimiento externo de Zn casi puro impide la corrosión superficial debida a la elevada actividad electroquímica del Zn (Bertholf, 1984).

El Zn aparece en la naturaleza como cinco isótopos estables: ⁶⁴Zn (48.89%), ⁶⁶Zn (27.81%), ⁶⁷Zn (4.11%), ⁶⁸Zn (18.5%) y ⁷⁰Zn (0.62%). Se han identificado 6 radioisótopos

incluyendo el ^{62}Zn , ^{63}Zn , ^{65}Zn , ^{69}Zn , ^{70}Zn , ^{72}Zn y ^{73}Zn . De estos 6 radioisótopos sólo el ^{65}Zn , el ^{69}Zn y el ^{63}Zn tienen un tiempo de vida medio suficientemente largo para ser usados como marcadores radioactivos (245 días, 13.8 horas y 38 minutos respectivamente) (King y Keen, 1994).

El Zn participa en su estado de oxidación +II en todos los compuestos, en los sistemas biológicos y forma una gran variedad de sales inorgánicas y compuestos de organocinc al combinarse con sustancias orgánicas. El Zn forma complejos con un número de coordinación de 4 con una disposición tetraédrica de los ligandos alrededor del metal. Este elemento compleja fácilmente los aminoácidos, proteínas y nucleótidos (King y Keen, 1994). Tiene afinidad por los grupos tiol e hidroxilo y por ligandos que contienen nitrógeno rico en electrones como donador.

2.- Usos industriales del Zn

Su empleo principal en la mayor parte de los países es en la producción de acero galvanizado como anteriormente se había citado. Además se emplea en la protección del hierro y otros metales de la corrosión por aire y agua en la forma de acero galvanizado y hierro estado bajo el cual se emplea la mitad del Zn producido en la industria del motor.

Otros usos de los compuestos inorgánicos de Zn son los siguientes (Bertholf, 1987):

- ZnSO_4 en la producción de plásticos.
- ZnCl_2 en baterías.
- ZnCrO_4 como preservativos.
- ZnCO_3 como suplemento dietético en animales de granja.
- $\text{Zn}(\text{H}_3\text{C COO}^-)_2$ y $\text{Zn}(\text{MnO}_4)_2$ como antisépticos.
- Fosforo de Zn que es altamente venenoso debido a la liberación de fosfina, por lo que se emplea en los venenos de ratas y ratones.
- Compuestos de organocinc que se utilizan como fungicidas, antibióticos tópicos y

lubricantes.

3.- El Zn en el medio ambiente

3.1. El Zn en la corteza terrestre

El Zn es un elemento que aparece en la litosfera a unos niveles medios de 80 ppm, oscilando su concentración en el suelo entre 10-800 ppm.

Los principales minerales de Zn son el sulfuro de Zn, tanto el cúbico (blenda de Zn) como hexagonal (wurtzita), el carbonato de Zn y la hemimorfita ($Zn_4Si_2O_7(OH_2)H_2O$). Otros minerales minoritarios son el óxido de Zn (cincita) y el silicato de Zn (willenita). El contenido de este elemento en el suelo es considerablemente variable teniendo un valor medio de aproximadamente 51 ppm, y generalmente es superior cerca de las áreas industriales o carreteras debido a las emisiones o al desgaste de los neumáticos (Bertholf, 1987). También se ha encontrado quelado de forma natural por ácidos orgánicos tales como los ácidos fúlvicos y húmicos.

El suelo constituye la principal fuente de los metales que podemos encontrar en las plantas, de forma que todos los macro y micronutrientes que las plantas necesitan para su crecimiento, entre ellos el Zn son tomados directa desde el suelo (Reilly, 1980). Para ello, las plantas deben ser capaces de absorberlos y de transportarlos donde sea requerido, para lo que los metales han de ser liberados desde las reservas de la fase sólida del suelo en parte por solubilización de los minerales del suelo y de la materia orgánica y en parte por intercambio iónico (Reilly, 1980). Los minerales de Zinc se encuentran normalmente asociados con el cadmio y cuando son fundidos pueden producir una contaminación del medio ambiente en las proximidades. Esto se comprobó en una refinería de estos dos elementos donde los niveles de Zinc en el suelo colindante así como en los cultivos de maíz de dicha área, se incrementaban considerablemente (Reilly, 1980). Asimismo, se ha podido comprobar como la utilización de las cenizas de los residuos, municipales, tras su incinerización como fertilizantes, al adicionarse sobre los suelos de cultivo, conlleva un

incremento considerable en los niveles de Zinc en los mismos y por tanto en algunas especies de plantas en él cultivadas (Keith Furr y col. 1980), pudiendo en algunas ocasiones constituir una fuente importante de contaminación por este elemento.

3.2. El Zn en la atmósfera

La distribución atmosférica del Zn refleja a menudo la actividad industrial de la zona, que puede suponer en ciertas ocasiones un incremento de los niveles de este elemento en el aire. En este sentido, un trabajo realizado sobre 30 elementos, entre los que se incluye el Zn, en la atmósfera del Reino Unido mostró que incluso cuando los focos potencial de contaminación industrial se encuentran alejados contribuyen al incremento en el contenido en estos metales en el aire de los pueblos y ciudades (Reilly, 1980). Así, en el aire urbano de USA el Zn se ha determinado en una concentración media de 2 mg/m^3 , con valores máximos en algunas ciudades de 58 mg/m^3 (Beliles, 1973).

Una de las formas de intoxicación por este elemento en ambientes industriales es por inhalación directa y es capaz de provocar efectos tóxicos importantes tales como neumonitis y edema pulmonar. En este sentido los límites de exposición laboral para este elemento se establecen en: TLV-TWA = 1 mg/m^3 , TLV-STEL = 2 mg/m^3 (Soria y col. 1995).

3.3. El Zn en el agua

Las concentraciones de Zn en el agua tienen un valor medio de 8 mg/L para las saladas y de 64 mg/L para las superficiales dulces. En muchas ocasiones esta concentración puede verse aumentada por los residuos industriales, sobre todo en las aguas dulces. Esta presencia del Zn en las aguas residuales industriales, se atribuye en parte al desgaste de los tejados de hierro galvanizado, vallas y tuberías (Reilly, 1980).

En los últimos años ha habido un creciente interés por la utilización de estas aguas residuales (por su elevado contenido en nutrientes nitrogenados y fosfatados) como fertilizantes de los suelos de cultivo, lo cual ha supuesto una elevación de los niveles de Zn

en estos en más de 300 veces su contenido natural. Estas elevadas cantidades de Zn, tienen el inconveniente que pueden resultar perjudiciales para las plantas allí cultivadas (Berrow y Webber, 1972).

En las aguas de bebida de suministro doméstico en USA se han determinado unos niveles de Zn de 193.8 mg/L (Reilly, 1980).

4. El Zn en los alimentos

4.1. Fuentes alimentarias principales de Zn

El cinc es un elemento que se encuentra ampliamente distribuido tanto en el reino vegetal como animal, siguiendo en abundancia al hierro (Czjka-Narins, 1992).

Alrededor de un 80% de su aporte en la dieta humana se establece desde la carne pescado, aves, leche y derivados lácteos (Moser- Veillon, 1990).

En general los alimentos difieren en el contenido de este elemento con concentraciones que van desde 0,2 µg/g en el huevo, 10 µg/g en la pechuga de pollo, hasta 750 µg/g en ostras que constituyen unas de sus principales fuentes alimentarias (King y Keen, 1994).

Frecuentemente la ingesta de Zn está relacionada con la ingesta proteica. Se ha observado que dietas constituidas por huevos, leche, aves de corral y pescado tienen una relación Zn-proteína inferior a aquellas compuestas de marisco, carne de vaca y otras carnes. Una relación Zn proteína elevada la tienen cantidades adecuadas de legumbres, granos integrales nueces y queso, mientras que aquellas con baja relación la contienen principalmente las frutas y los vegetales. Con la consideración de todo lo expresado se ha podido comprobar que la dieta mixta de los individuos que elaboran sus propias comidas en USA supone un aporte en Zn que oscila entre 8,6-14 mg/día (Hambidge, 1986).

4.1.1. Zn y carne

Los productos animales, especialmente la carne, proporcionan alrededor del 70% del Zn consumido en USA (King y Keen, 1994).

Estudios llevados a cabo por Yokoi y col. (1994), demuestran que el consumo frecuente de carne roja estaba asociado con unas concentraciones elevadas de ferritina en el suero y una normal disminución del Zn plasmático. Estas investigaciones sugieren que la disminución de la carne roja en la dieta incrementa el riesgo de deficiencia de Zn y Fe, y que las concentraciones bajas de ferritina en el suero sugieren la posibilidad de bajos niveles de Zn.

De manera semejante Hunt y col. (1995), en sus estudios sobre la influencia del consumo de carne en la absorción del Zn y el estatus de hierro, apreciaron que un consumo elevado de carne incrementa la absorción y retención de Zn, además de un leve aumento de este micronutriente en la orina.

4.1.2. Zn y pescado

Estudios realizados en Burundi demuestran como la ingesta de cinc en la dieta del hombre pasaba de ser 9,2 mg a 12 mg cuando se incluía pescado en esta (Benemariya y col. 1993).

Este resultado nos hace pensar que el contenido de Zn en los peces debe ser elevado con respecto a su contenido en el resto de los alimentos. Entre los estudios realizados en este sentido destacamos el publicado por Camusso y col. 1995, acerca de la bioconcentración de metales pesados en la “trucha arco-iris” y en la que observaron que los mayores niveles de Zn se encuentran en las agallas de estos peces, como también encontraron Hogstrand y col. (1995) hecho que relacionaron con un aumento de los niveles de metalotionina a nivel branquial. Cosson y col. (1994), llevaron a cabo un estudio sobre el balance intracelular de metales pesados y su relación con la metalotionina en distintos órganos de peces. En sus conclusiones expresan que el Zn posee un efecto potenciador de la inducción de la metalotionina en las agallas.

Otros investigadores (Ipeis y col. 1995), estudiaron el contenido de Cd, Cu y Zn en tres especies de peces tomados en una zona próxima a una área industrializada

considerando su distribución en las diferentes fracciones en que aparecen en hígado y agallas, poniendo de manifiesto que era en la porción insoluble de las agallas donde más se acumulaban estos tres minerales. En referencia al cinc, aparecieron una mayor unión con los complejos resistentes al calor en el hígado probablemente debido al papel de las metalotioninas en la homeostasis del cinc y al hecho de que este elemento es el principal constituyente de estas proteínas. Dependiendo de la especie, entre una octava parte hasta un poco más de un cuarto de estos tres elementos, se unían a las fracciones termolábiles del hígado, debido posiblemente a la presencia de numerosos encimas que participan en las funciones metabólicas de este órgano.

El Zn también está implicado en el metabolismo lipídico de los peces, pudiendo incluso llegar a ser una causa de mala absorción de otros nutrientes cuando este primero es deficiente en la dieta. Así lo demuestran los trabajos llevados a cabo por Taneja y col. (1994), en la carpa común donde tras el estudio de la interacción entre la deficiencia de Zn y el consumo de lípidos, apreciaron que tanto la absorción intestinal de glucosa, como los niveles de ADN, ARN y la actividad de la fosfatasa alcalina en el intestino e hígado; eran significativamente menores en el grupo de carpas que poseían dietas hiperlipídicas y deficiente en Zn que en aquellas también con altos niveles de lípidos y suplementadas con este elemento. Los resultados de este estudio demuestran que en dietas con deficiencias en Zn, el exceso de lípidos hace que estos se acumulen en el intestino y reduzcan la absorción de glucosa en este animal. En cuanto a la reducción de los niveles de ARN y ADN y la actividad de la fosfatasa alcalina en el hígado y el intestino de las carpas deficientes en Zn parece ser debida más a la mala absorción de los nutrientes asociada a la acumulación de lípidos en el intestino que a los niveles de Zn en la dieta.

4.1.3. Zn y marisco

Tahan y col. (1995), llevaron a cabo la determinación de la concentración total de Al, Cr, Fe, Hg, Na, Pb y Zn en alimentos enlatados procedentes del mar, observando que la concentración de estos metales es mayor en los moluscos (considerando sólo la porción comestible), que en el tejido muscular de los peces, dada la capacidad manifiesta de los bivalvos de bioacumular estos metales en sus tejidos. Asimismo indicaron que la mayor concentración de este elemento se encuentran en los mejillones

(191 µg/g). Sin embargo, otros autores (King y Keen, 1994), afirman que la mayor concentración de Zn aparece en las ostras en las que se han determinado concentraciones de 750 µg/g.

4.1.4. Zn y leche

La leche junto con otros alimentos de origen animal parece ser que mejoran la absorción del Zn en dietas ricas en fitatos los cuales han sido descritos últimamente como antagonistas de este elemento. Hansen y col. (1996), observaron cómo la adición de la fosfopeptidasa de caseína mejoraba la absorción de Zn a partir de soluciones con fitatos y en dietas que contenían avena.

Juarez y col. (1996), llevaron a cabo un estudio sobre el efecto de la separación de la fase soluble en la distribución de minerales en la leche. Los resultados mostraron que el Zn era menor en el cuajo coagulado de la leche. En el fraccionamiento por diálisis los niveles de Zn eran mas elevados en la fase difusa que en las fracciones solubles obtenidas mediante ultracentrifugación y coagulación.

Las fórmulas lácteas (fórmulas de inicio y de continuación) son imprescindibles en el caso de no ser posible o ser insuficiente la lactancia materna.

Dada la importancia de la alimentación en las primeras etapas de vida es de gran interés conocer su composición nutritiva.

Climent y col.(1990), estudiaron la composición en mineral de distintas fracciones de las fórmulas de inicio y de continuación, obteniendo los siguientes resultados expresados en µg/g:

Tabla 2: Composición en mineral de distintas fracciones de fórmulas de inicio.

Fórmula de inicio	Cu	Ni	Zn	Mn
Lactosa	0,105	0,03	0,14	0,024
Conc. prot.	0,24	0,15	5,27	0,174
Prod. intermedio	0,15	0,13	13,62	0,2
Prod. final	0,34	0,25	10,03	0,4

Tabla 3: Composición en mineral de distintas fracciones de fórmulas de continuación.

Fórmula de continuación	Cu	Ni	Zn	Mn
Fécula	0,3	0,08	0,25	0,033
Maltodextrina	0,03	0,08	0,17	0,015
Producto intermedio	0,32	0,11	47,75	1,27
Prod. final	2,42	0,45	30,43	0,82

En los últimos años se están llevando a cabo fortificaciones en este elemento sobre todo en fórmulas infantiles, por lo que ciertos autores han establecido el límite superior de cinc en dichas fórmulas en 1,5 mg/100 Kcal (Hambidge y Krebs, 1989), puesto que pueden producirse síndromes de intoxicación aguda y/o crónica con altas sobredosis en este elemento.

Otros investigadores como Knudsen y col. (1995), llevaron a cabo un estudio sobre la biodisponibilidad de Zn tanto de leche humana como de fórmulas infantiles para niños con bajo peso al nacer, observando que la biodisponibilidad de este elemento en la leche humana y en las fórmulas infantiles para los niños estudiados era alta. Por lo tanto apreciaron como la fortificación en la leche humana incrementaba significativamente la biodisponibilidad del cinc.

Jochum y col. (1995), hacen un estudio comparativo sobre el estatus de elementos traza durante un período de tiempo que abarca desde el nacimiento hasta los cuatro meses de edad, en niños alimentados con leche humana, fórmula infantil basada en leche de vaca y una fórmula con suero de proteína parcialmente hidrolizada. Estos autores observaron que los valores de Zn disminuyen desde el nacimiento hasta la edad de cuatro meses en los tres grupos. Aunque los niveles de Zn en plasma de los bebés alimentados con una fórmula infantil basada en un hidrolizado parcial de suero de proteína eran similares a aquellos alimentados con leche materna, sin embargo los correspondientes a niños alimentados con leche de vaca, eran significativamente más bajo, a pesar de lo cual se concluye afirmando que a pesar de la diferencia de aporte de Zn, y de la presumible diferencia de biodisponibilidad, todos los niños estaban

perfectamente alimentados manifestándose en el hecho de que el incremento de peso y altura era similar para todos los grupos, y también en que los niños no mostraban ningún signo clínico de deficiencia.

Robberecht y col. (1995), en un estudio realizado sobre el aporte diario de cinc en mujeres de clase media de Burundi en África durante los diez meses de lactación, observaron una disminución de los niveles de Zn desde el calostro ($2,3 \pm 0,3$ mg) a la leche materna ($1,2 \pm 0,2$ mg); como también encontraron que estos valores eran superiores a los encontrados en otros países malnutridos.

Yokoi y col. (1994), encontraron que el frecuente consumo de leche en mujeres premenopáusicas estaba relacionado con una rápida desaparición de Zn en el plasma.

Por todo ello, en la actualidad se han planteado opciones alternativas al consumo de leche de vaca como la leche de soja o la leche de altramuz entre otras. Sin embargo, el problema que se plantea con el consumo de leche de soja en niños es su elevada relación Fe/Zn, que induce una disminución de los niveles de Zn en el plasma de los niños que la consumen debido al efecto antagónico del Fe sobre el Zn. Otro de los factores que probablemente puede provocar diferencias en la biodisponibilidad del cinc es la diferente fuente de proteínas y carbohidratos de la leche de soja frente a la leche de vaca (Craig y col. 1984).

De otra parte estudios realizados por Petterson y col. (1994), apreciaron que la absorción de Zn procedente de una base de leche de altramuz, era significativamente mayor que la de leche de guisante y soja, manifestando que la leche de altramuz se muestra como una alternativa importante al consumo de leche de soja en fórmulas infantiles.

4.1.5. Zn y vegetales

Los cereales integrales son relativamente ricos en Zn. En estos la mayor parte del Zn se encuentra dispuesto en las porciones del germen y el salvado por lo que casi un 80% es perdido durante las operaciones de molinería que conlleva el refinado de los granos de cereales (Hambidge y col. 1986). A pesar de la no existencia de directrices legales standar en el enriquecimiento para el Zn, algunos fabricantes de cereales de desayuno fortifican el contenido en este elemento en estos productos alimentarios en

cantidades que oscilan entre el 25 y el 100% de las ingestas recomendadas americanas (King y Keng, 1994).

Las legumbres y productos de grano entero, entre ellos el pan integral, de centeno, la avena y el maiz entero también lo proporcionan en la alimentación (un 20% del total).

El que se toma de fuentes vegetales es menos utilizable para la economía, y por eso los que consumen sobre todo dietas vegetarianas están más expuestos a una deficiencia que los que consumen muchos alimentos animales. (Cooper, 1985).

En las plantas hay una serie de factores que pueden incrementar su contenido en zinc como pueden ser:

- Cultivo en suelos con elevado contenido en Zn en forma natural.
- Cultivo en suelos tratados con fertilizantes ricos en Zn.
- Cultivos en suelos a los que se les ha adicionado aguas residuales o las cenizas obtenidas tras su tratamiento en plantas municipales (Keith Fun, 1980).
- Emisiones locales desde la industria de Zn (Benemariya y col. 1993).

Las leguminosas representan una importante fuente de proteínas de origen vegetal. Sin embargo, la presencia de ciertos factores antinutritivos con efectos adversos sobre la digestión, absorción y metabolismo de los nutrientes ha impedido una mayor utilización en la alimentación. Así, los fitatos, la fibra y algunos ácidos orgánicos contenidos en estas semillas podrían afectar a la biodisponibilidad de cationes divalentes como el Zn, cuya participación en la homeostasis y en el crecimiento es bien conocida.

Macarulla y col. (1989), hacen un trabajo para determinar los niveles de Zn en suero y diversos órganos de animales alimentados con dietas de caseína o leguminosas (*Vicia Faba*) con diferentes contenidos de Zn, para evaluar la utilización de este oligoelemento en función de la fuente de proteína.

Los resultados pusieron de manifiesto que la alimentación con esta leguminosa causa retrasos en el crecimiento en ratas machos (alrededor del 45%) y produce una

reducción significativa de los niveles de Zn en el suero, hígado y riñón. El contenido óseo de cinc (considerado como un buen indicador del aprovechamiento metabólico por el organismo), disminuye drásticamente. Sin embargo, el músculo no parece afectarse.

La suplementación de Zn mejora parcialmente la zinquemia y recupera ligeramente los niveles de Zn en hueso.

Todo ello parece indicar que existe una baja biodisponibilidad de Zn en las dietas de *Vicia Faba* que podría ser al menos en parte, el origen de algunas de las alteraciones fisiológicas y nutritivas observadas tras la alimentación con leguminosas, las cuales pueden ser, en cierta medida paliada por la suplementación con Zn en la dieta.

Suárez Fraga y col. (1990), hacen un estudio sobre el valor nutritivo del gofio (harina integral obtenida del grano de cereales previamente tostado). La mayor parte de la pérdida vitamínica y mineral de las harinas blancas se debe al proceso de elaboración, concretamente a la descorticación de los granos, ya que la corteza es el lugar donde se encuentran la mayoría de estos nutrientes. Sin embargo el gofio se obtiene a partir del grano entero, por lo que podría suponerse un contenido mineral y vitamínico completo.

Asímismo el ligero tueste va a aportar una mayor digestibilidad al alimento acabado.

Las ingestas recomendadas de zinc están establecidas en unos 15 mg diarios lo cual es difícil de conseguir con la dieta habitual. A pesar del alto contenido en fitatos (agentes complejantes de cationes divalentes) de las harinas integrales, personas sometidas a regímenes vegetarianos no suelen presentar deficiencias de cinc. Por ello podemos afirmar que el alto contenido de cinc del gofio permitirá cubrir un alto porcentaje de la recomendación diaria de este mineral.

5. Comportamiento del Zn en el organismo humano

5.1. Absorción del Zn

En la sangre, los niveles de cinc más elevados se encuentran en los leucocitos seguido de los eritrocitos y el suero. En este último su concentración media es de unos

1000 mg/l y no muestra diferencias relacionadas con la edad, exceptuando los dos primeros años de vida, época en la que hay fluctuaciones hasta que se estabiliza (Cooper, 1985). Couzy y col. (1993), en sus estudios sobre la absorción de cinc en ancianos sanos, encontraron que la edad no conduce a cambios nutricionales relevantes en la absorción de este mineral ni en los efectos inhibidores de la dieta sobre la absorción de cinc. Tampoco encontraron diferencias con el sexo.

La conservación de la homeostasia del cinc parece realizarse fundamentalmente en el aparato digestivo. Según Milne (1984) la suplementación de ácido fólico va a influir de manera significativa en la homeostasis de este mineral, quizás debido a la formación de complejos quelados insolubles que dificultan su absorción, que se produce fundamentalmente en el duodeno, pero también a lo largo del tubo digestivo. Esta se produce por transporte activo en el duodeno e intestino delgado proximal (King y Keng, 1994), no siendo necesarias las secreciones pancreáticas, para su adecuada absorción en el hombre. A estas mismas conclusiones llegaron Naveh y col. (1988) en un estudio realizado en perros.

Experiencias realizadas por Menard y col. (1993) sobre el transporte de cinc en vesículas del borde en cepillo de la membrana de células intestinales de ratas, establecieron que la velocidad de transporte del elemento es función inversa del estado dietético del cinc, por lo que a nivel de membrana parece ser activado un mecanismo homeostático debido a un mínimo aporte de Zn en la dieta.

El porcentaje que se absorbe varía mucho (10-90%; 20-30% por término medio), según la dosis y la presencia de factores inhibidores o facilitadores. De alguna manera, la cantidad de catión que se absorbe en el intestino estará en relación directa con las propias necesidades corporales del elemento en los humanos, de forma que cuanto más baja es la reserva corporal de cinc, tanto mayor es la cantidad del catión que se transporta por la mucosa intestinal (Linder, 1989) como también observó Ziegler y col. (1989); en su estudio del efecto del bajo consumo de cinc sobre la absorción y excreción de este mineral en niños, en los que se incrementaba la eficiencia en la absorción y se disminuía la excreción de Zn endógeno.

La concentración sérica de cinc, disminuye después de una comida sin este mineral, probablemente debido a que el páncreas retira el cinc de la circulación para producir las metaloenzimas necesitadas para la absorción y digestión (Dinsmore y col.

1985).

El mecanismo de absorción del cinc, parecer ser que se establece por la formación de complejos con diferentes agentes quelantes que favorecen el transporte de este catión a través de la mucosa intestinal (Lederer, 1985).

En este sentido, se piensa que un ligando enlazador es el responsable de la gran eficiencia en la absorción en la leche humana en comparación con la de vaca; este ligando ha sido identificado como **ácido picolínico** (Wapnir, 1981), un metabolito del triptófano. Evans (1980) supone que la síntesis del picolínico a partir del triptófano, en una vía dependiente de la vitamina B6 se secreta hacia el intestino en el jugo pancreático que participa en la absorción del cinc exógeno mediante la formación de dipicolinato de cinc, el cual transporta después el metal a través de la membrana epitelial en dirección de la célula de la mucosa.

Se sabe que un ligando proteínico, **la metalotionina**, interviene en la regulación del paso del cinc por la célula de la mucosa. La metalotionina enlazante del cinc se ha encontrado también en otros tejidos (hígado y riñones); aunque su función en el metabolismo de este mineral todavía no está claro, parece ser posible que participe en la detoxificación y almacenamiento de este elemento. Estas metalotioninas son un grupo de proteínas citosólicas que van a participar en la regulación de la captación de Zn y de Cu, siendo capaces de unirse a los metales para su almacenamiento en los tejidos y posterior participación en la síntesis de múltiples macromoléculas orgánicas. Tanto el Cu como el Zn son tóxicos para las células a altas concentraciones, por lo que cualquier mecanismo intracelular que limite su disponibilidad para participar en reacciones deletéreas del organismo tiene que considerarse un mecanismo de defensa (Di Silvestro y col. 1987).

En ratas con deficiencia de Zn se ha observado que el aporte de este metal induce la síntesis de metalotioninas de una manera dosis dependiente (Richards y col. 1976), al igual que dietas con alto contenido en Cu (Hall, 1979). Por otra parte un aumento brusco de la síntesis de metalotioninas provoca una disminución en la absorción de Zn y de cobre (Cousins y col. 1979; Menard y col. 1981), siendo un factor negativo en la regulación de estos metales. Parece ser que las metalotioninas juegan un papel muy importante en el antagonismo observado entre la absorción de Cu y de Zn, el cual sólo se hace evidente cuando las concentraciones de los dos metales en la luz

intestinal son muy diferentes, (Van Campen, 1969).

Conviene señalar que existen otros ligandos, como **el citrato**, que acelera el proceso de transporte activo del cinc. La leche humana, no la de vaca, contiene una cantidad considerable del elemento en forma de citrato de cinc, permitiendo al lactante aprovechar el catión mucho mas eficazmente que si este estuviera unido a proteínas (Hurley, 1982).

El cinc también forma complejos con el **EDTA** favoreciendo su absorción. En el estudio realizado por Davidsson y col. (1994), se investiga el efecto del NaFe(III)EDTA usado como un agente fortificante del hierro en harina de trigo en la absorción y retención de Zn y Ca en mujeres jóvenes y se observa que este complejo añadido a dietas de baja biodisponibilidad de cinc, incrementa la absorción de este mineral y aporta Fe disponible.

5.2. Distribución y transporte de Zn

Una vez que el catión se transfiere desde los eritrocitos al plasma, se fija a diferentes sistemas transportadores. La albúmina es el transportador mayoritario en el plasma, sin embargo, existen otros transportadores de cinc tales como la transferrina o la alfa-2-macroglobulina. El porcentaje en el que este elemento es transportado por estos transportadores es del 57%, 40%, para la albúmina y alfa-2-macroglobulina respectivamente, y en muy poca proporción por la transferrina. También va a ser ligado por unión a aminoácidos (3%), formando complejos sobre todo como Zn-cisteína o Zn-histidina (King y Keng, 1994). Es a partir de estos sistemas de transporte sanguíneos desde donde diferentes tejidos toman mayores o menores cantidades de catión, en función de sus necesidades (Linder, 1989).

Hay que destacar que el cinc plasmático es metabólicamente activo y varia en respuesta a un bajo consumo de este así como a factores fisiológicos, tales como un daño o una inflamación, de forma que sus niveles plasmáticos caen hasta el 50% en la fase aguda de la respuesta a un daño, probablemente debido al secuestro del cinc por el hígado (Solomons, 1988).

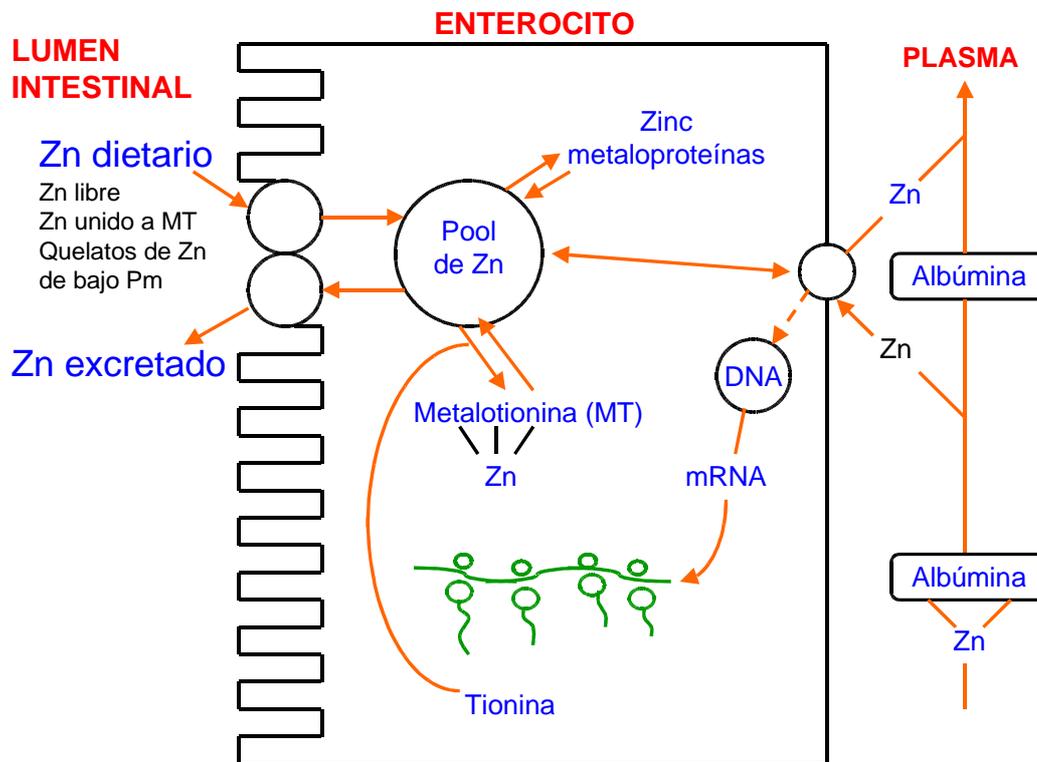


Figura 1: Distribución y transporte del Zn

5.3. Metabolismo del Zn

Los modelos cinéticos utilizando ^{65}Zn han aportado información sobre los pools de este elemento y su metabolismo. Un modelo de dos componentes explica mejor la eliminación del Zn absorbido por el cuerpo (Hambidge y col. 1986). La fase inicial rápida presenta una vida media en los seres humanos de 12,5 días y representa primeramente el consumo hepático del Zn circulante y su liberación.

La fase de renovación lenta posee una vida media del orden de 300 días y refleja diferentes porcentajes de Zn en varios tejidos diferentes de hígado. El consumo de Zn por parte del Sistema Nervioso Central y los huesos es relativamente bajo; el páncreas,

hígado, riñón y bazo presentan los mayores porcentajes de almacenamiento y renovación rápidos, por otro lado el consumo e intercambio de Zn en los glóbulos rojos y el músculo son menores que en las vísceras.

Se ha observado que una dieta pobre en Zn en las ratas intensifica la retención de este elemento en los tejidos blandos y órganos, excepto en el hueso, por una reducción de su turnover. Estos ajustes previenen una disminución medible (u ostensible) en la concentración de Zn en los tejidos.

El turnover del Zn lento, es acelerado en humanos por una sobrecarga diaria de 1,54 mmol (100 mg) de Zn.

Alrededor de 0,05 mmol (3 mg) de Zn está normalmente circulando en el plasma en cualquier momento. Este Zn está repartido entre la α -2-macroglobulina (40%), la albúmina (57%) y aminoácidos (3%) (Harris y col. 1989).

Estas pérdidas de albúmina del hueso y de fracciones de aminoácidos del Zn circulante proporcionan el transporte y distribución de Zn a los tejidos.

Las fracciones de aminoácidos del hueso determinan la cantidad que es filtrada por los riñones. La cantidad de Zn presente en la mayoría de los tejidos es mayor que la cantidad total que existe en el plasma. Por ejemplo, un incremento del 1% del Zn del hígado causado por el aumento de la retención del Zn, podría causar una disminución del 40% del Zn del plasma.

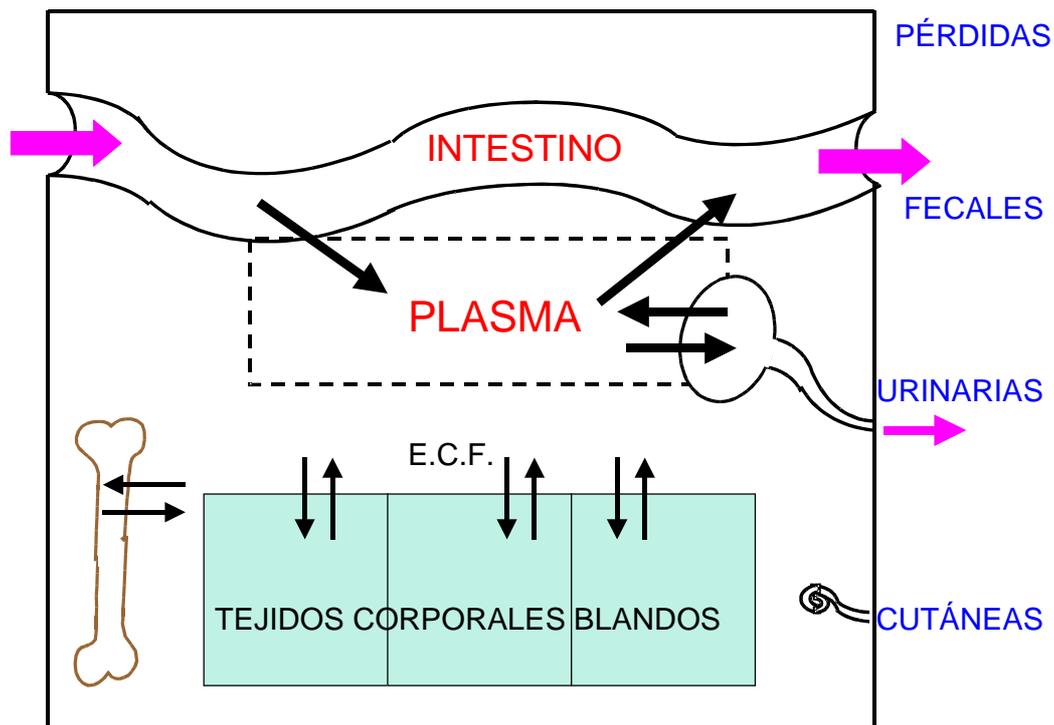


Figura 2: Representación esquemática del metabolismo del Zn en mamíferos

5.4. Eliminación del Zn

A diferencia de lo que sucede con el hierro, el Zn^{++} no se almacena, de hecho, en el organismo, y el exceso de catión se elimina fácilmente en el cuerpo.

Sólo en el caso de excesivo consumo de este mineral, o en los que el catión se administra por vía parenteral, se produce una cierta acumulación en las metalotioninas presentes en casi todas las células; en algunos tejidos se han identificado proteínas con alto contenido en cisteína y con un peso molecular de aproximadamente 6.700 daltons; estas proteínas parecen “activarse” como consecuencia de la administración de cinc, de manera análoga a lo que ocurre entre la ferritina y el hierro.

La principal ruta de eliminación endógena de Zn es en el tracto gastrointestinal

con la pérdida a través de heces. Cuando se administra una dosis de Zn ya sea por vía oral o intravenosa, sólo del 2-10% se elimina por la orina mientras que el resto lo hace por las heces (Hambidge y col. 1986).

Las pérdidas fecales de Zn son una combinación del Zn de la dieta que no se absorbe y las secreciones endógenas de este catión. Otras fuentes incluyen el flujo transepitelial de Zn procedente de la célula de la mucosa intestinal y los desechos de las viejas células de la mucosa gástrica (Hambidge y col. 1986).

Los estudios de perfusión han puesto de manifiesto que alrededor de 0.04 a 0.07 mmol de Zn son segregados en el duodeno tras la ingestión de una comida, presumiblemente como consecuencia del efecto estimulador de la comida sobre la secreción pancreática.

Gran parte del Zn secretado en el lumen intestinal es reabsorbido y utilizado.

El mantenimiento de una circulación enteropática intacta de Zn es fundamental para el mantenimiento de su estado corporal. Además las cantidades de Zn secretadas en el estómago dependen de su consumo.

En el hombre las pérdidas endógenas fecales de Zn oscilan entre <15 micro mol / día, en el caso de ingestas extremadamente bajas, a valores por encima de 80 µmol/día en el caso de ingestas muy altas (Baer y col. 1984; Jackson y col. 1984).

Normalmente se excretan de 6 a 9 micro moles de Zn al día a través de la orina.

Las pérdidas urinarias de Zn se verán afectadas por la ingesta de la dieta únicamente en el caso de que estas ingestas sean acusadamente altas o bajas. No obstante por debajo de las condiciones basales, más del 95% del Zn filtrado será reabsorbido en las partes distales de los túbulos renales (Victery y col. 1981). En definitiva la cantidad excretada en la orina está altamente correlacionada con la producción urinaria y la excreción de creatinina.

En estados catabólicos tales como quemaduras graves u otro trauma, se producen unas pérdidas clínicas significantes de este elemento. También se observa pérdidas urinarias en casos de inanición, o en pacientes con nefrosis, diabetes, alcoholismo, cirrosis hepática y porfiria. Los agentes quelantes tales como el EDTA también elevan sus pérdidas urinarias de Zn (Hambidge y col. 1986). Por otro lado las concentraciones de aminoácidos en plasma y orina, concretamente de cisteína e

histidina, y otros metabolitos, van a tener un papel muy importante en las pérdidas urinarias de Zn en estos pacientes.

Son de consideración también las pérdidas que se realizan también a través de otras vías tales como sudor, descamación de la piel, pérdida de cabello que junto con la orina suele suponer aproximadamente 1,5 mg/día.

Otras fuentes de pérdidas son el semen o las secreciones menstruales. Una eyaculación de semen contiene mas de 15 micromol de Zn (Baer y col.1984). Las pérdidas menstruales totales representan una pérdida aproximada de 1,5 a 8 micromoles por periodo menstrual (Hess y col. 1977).

En situaciones de embarazo y lactancia, cantidades apreciables de Zn son transferidas diariamente de la madre al feto (Martín-Lagos y col. 1997) o al lactante.

Es de subrayar el exhaustivo control homeostático del que es objeto el Zn en el cuerpo humano, lo cual se relaciona con su esencialidad, puesto que se ha comprobado cómo la disminución en la ingesta de este catión conlleva un descenso en su excreción urinaria (Johnson y col. 1993).

6. Biodisponibilidad

La biodisponibilidad de los nutrientes se entiende como la proporción que desde los alimentos es absorbida y utilizada por el organismo, de manera que si un nutriente no es absorbido en el tracto gastrointestinal y entra en la circulación sistémica, no estará disponible para su utilización metabólica. Los minerales esenciales en general, no son bien absorbidos presentando un rango de absorción que va desde menos del 1% hasta el 90% (Turnlund, 1991).

Este concepto de biodisponibilidad abarca por tanto la absorción y la utilización metabólica última en la célula (Ivor y col. 1993).

La biodisponibilidad de un nutriente está influida por varios factores como la forma química en la que aparece en la dieta y por la presencia de otros componentes en los alimentos que pueden aumentar o disminuir la absorción y utilización del mineral.

Con nutrientes inorgánicos en particular es importante conocer los factores físico-químicos que marcan la diferencia en la biodisponibilidad de algunos elementos traza de dietas de diferente composición, (así las principales recomendaciones dietéticas establecidas deberán fijarse para estos nutrientes de acuerdo con los hábitos alimenticios de cada país). En este sentido el Zn es especialmente digno de atención ya que su absorción puede estar influida en gran medida por la forma química, competencia con otros iones en los mecanismos de absorción, y la presencia de agentes quelantes favorables o desfavorables y ligandos en la dieta. (Ivor y col. 1993)

Según Linder (1989), la cantidad de Zn^{++} que se absorbe en el intestino es función directa de las propias necesidades corporales del elemento, de forma que cuanto mas baja es su reserva corporal, tanto mayor es la proporción que se transporta por la mucosa intestinal.

6.1. Factores que afectan a la biodisponibilidad de Zn

A. Factores físico-químicos

☐ Solubilidad en agua

La solubilidad en agua afecta de manera positiva a la biodisponibilidad del Zn. Así cuando administramos Zn en forma de sulfato de Zn, que es muy soluble, la absorción intestinal es muy buena, hecho por el cual esta forma química es una de las más utilizadas en las suplementaciones de este elemento en la dieta.

☐ Estado químico y forma farmacéutica

Se han realizado numerosos estudios en torno a la forma química y también farmacéutica en la que se administran estos compuestos, Oner y col. (1989), realizaron una evaluación comparativa entre la administración de sulfato de Zn en microcápsulas o en jarabe, llegando a la conclusión de que la administración en microcápsulas era capaz de prolongar la acción del compuesto.

En otros estudios se ha observado una mayor biodisponibilidad del Zn en las

fuentes orgánicas que inorgánicas. Rojas y col. (1995), estudian la biodisponibilidad relativa de dos fuentes de Zn orgánicas frente a dos inorgánicas, obteniendo como resultado la mayor biodisponibilidad del Zn en los compuestos orgánicos como también indicaron Scholmerich y col. (1987) y Neve y col. (1993).

Scholmerich y col. (1987) hicieron un estudio comparativo entre la biodisponibilidad del complejo Zn-histidina y el sulfato de Zn, en hombres sanos, observando una mejor absorción del Zn procedente del complejo Zn-histidina. Neve y col. (1993) obtuvieron una mayor biodisponibilidad del Zn procedente del gluconato de Zn que del sulfato.

B Factores que disminuyen la biodisponibilidad

▣ Competición por el mecanismo de absorción

Los nutrientes inorgánicos pueden ser absorbidos del lumen intestinal por un proceso o la combinación de varios procesos que pueden estar o no vinculados con la energía. La competencia entre diferentes iones elementales por el transporte por una vía común, puede reducir la eficiencia con la que estos iones son absorbidos y puede afectar gravemente a la biodisponibilidad cuando la competencia surge de la presencia de cantidades desproporcionadas de iones competitivos. Esto puede ocurrir durante la suplementación dietética excesiva con un solo mineral. El grado de antagonismo de estas especies iónicas depende en gran parte del número de uniones que ellos formen con las moléculas quelantes (nº de coordinación) y de su coeficiente electrónico. (Ivor y col. 1993).

Sobre esta base puede predecirse la competencia que existe entre Zn, Cu y Cd Johnson y col. (1982) también observan este antagonismo entre el Sn y el Zn, apreciando una disminución de la retención de Zn en aquellos sujetos suplementados con Sn en su dieta.

Con el hierro

Este mecanismo de competición también es el responsable del antagonismo existente entre el Zn y el Fe. Meadows (1983) a través de sus investigaciones sugirió que la reducción de la biodisponibilidad de Zn se debía a la competencia entre estos dos elementos en la pared del intestino. Solomons (1983) estudió el mecanismo por el cual se producía esta interacción intestinal apreciando que el hierro Fe^{3+} en relación 2:1 (Fe / Zn), reducía la absorción de Zn en plasma, pero en menor grado que el hierro Fe^{2+} . Además comprobó que la adición de un gramo de ácido ascórbico incrementaba el efecto inhibitorio de hierro Fe^{3+} . Pedrosa y col. (1993) llegaron también a la misma inferencia pero indicaron que esta dependía a su vez de las

características de la dieta y de las proporciones de Fe / Zn, tal como posteriormente estableció Solomons (1988) señalando que relaciones de Fe / Zn 2 :1 o mayores producen un efecto inhibitorio significativo en el Zn.

Por otra parte, Sandström y col. (1985) demostraron que cuando se administra un suplemento multimineral en un estómago vacío, los niveles altos de Fe afectaban negativamente a la absorción de Zn. Así el consumo de suplementos con una comida o con un ligando de Zn (tal y como la histidina) puede vencer el efecto inhibitorio. Este antagonismo entre el Fe y el Zn cobra mayor importancia cuando hablamos de mujeres embarazadas Hambidge y col. (1988) en las cuales es necesario un suplemento de Fe debido a las mayores necesidades durante la gestación.

Además debemos tener en cuenta que la concentración de Zn en el suero de una mujer embarazada, disminuye fisiológicamente durante el segundo y tercer trimestre de embarazo (Martín-Lagos y col. 1997) debido a un incremento normal del 30 al 50% en el volumen total de sangre. Esto marca la posible necesidad de suplementación en Zn en este estado fisiológico.

Por todo esto es muy importante alcanzar un equilibrio en la suplementación en embarazadas entre Fe y Zn, pues la depleción del Zn que podría producir el exceso de Fe puede tener como consecuencia malformaciones congénitas, bajo peso al nacer y otras complicaciones.

Dawson y col. (1988) establecen una recomendación de 18 mg de Fe/ día como

suplemento a las adolescentes embarazadas sin anemia pero que poseen una disminución en la concentración de Zn en el suero.

Hambidge y col. (1988), afirman que una suplementación de Fe elevada disminuye los niveles de Zn en el embarazo.

Especialmente los niños constituyen el grupo de población más afectado por el antagonismo entre el Fe y el Zn, ya que en su dieta la leche participa en un porcentaje muy elevado. Muchas de estas leches suelen estar enriquecidas con Fe lo que provoca una disminución en los niveles plasmáticos de Zn y en consecuencia en

el estado corporal. Craig (1984), hizo un estudio en el que compara un grupo de niños que consumen una fórmula a base de leche de vaca con otro que consume leche de soja, observando que los niveles de Zn en el plasma de los niños del primer grupo era mayor que los del segundo grupo. Este efecto es debido a los elevados niveles de Fe en las leches de soja, que aportan una relación Fe/Zn muy elevada junto con otro factor que puede ocasionar diferencias en la biodisponibilidad del Zn entre las dos fórmulas como es la diferente fuente de proteínas y carbohidratos.

Además el efecto inhibitorio del Fe en la biodisponibilidad del Zn se observa en que los niveles de Zn en el plasma de niños que consumen una fórmula a base de leche de vaca fortificada con Fe, tienden a ser menores que los correspondientes a los que consumen una misma fórmula no enriquecida en este elemento. La adición de 12 mg de Fe en la fórmula enriquecida le da al producto una relación Fe/Zn mayor de 2. Sin embargo la leche materna posee una relación Fe/Zn menor que 1, de ahí la mayor biodisponibilidad de Zn a partir de la misma.

En contraposición a esta teoría se encuentra el estudio realizado por Fairweather-Tait (1995) sobre la absorción de Zn en niños alimentados con fórmulas enriquecidas en Fe, después del destete. Esta llega a la conclusión de que la fortificación no reduce la absorción de Fe.

Con el calcio y el magnesio

Se ha estudiado la influencia de la presencia de otros minerales tales como el calcio y el magnesio sobre la biodisponibilidad del Zn en la dieta. Esta es la línea de

investigación que siguen los autores Larsen y col. (1992), habiendo observado que cuando el calcio está incluido en una dieta, los niveles intrínsecos de Zn en la dieta aparecen limitados, a pesar del hecho de que los niveles de Zn eran el doble de sus recomendaciones dietéticas. Esta interacción entre el calcio y el Zn parece ser debida a la formación de complejos con el fitato. La adición del calcio va a influir por tanto en el balance de el calcio, fósforo, magnesio, cinc y hierro aunque no del cobre. La

adición de calcio reduce la biodisponibilidad intrínseca del Zn, aunque no se observa ningún efecto en los grupos fortificados con cinc.

Con respecto al magnesio se ha observado un efecto menos pronunciado en la utilización del cinc que el calcio en las dietas que contienen fitatos (Richard, 1984).

Afortunadamente otros componentes de los alimentos pueden competir con estos quelantes antagónicos y mantener la solubilidad mejorando la biodisponibilidad de este elemento.

▣ Agentes quelantes

En los alimentos muchas sustancias forman complejos quelantes estables con nutrientes inorgánicos que pueden llegar a una potenciación o disminución en la biodisponibilidad de estos. Entre los que disminuyen la biodisponibilidad se encuentran:

- Fitatos y fibra

La concentración de fibra en la dieta, en su mayoría procedente de frutas y vegetales, normalmente aporta de 1 a 5g de fibra por cada 100g de producto fresco.

Los cereales, y en concreto algunos de sus derivados, son en general ricos en fibra conteniendo cantidades que oscilan en torno al 15% de producto fresco.

Además de la fibra de la dieta, estos productos pueden contener otras sustancias (ácido fítico, ácidos orgánicos, proteínas..), que pueden modificar de manera significativa los efectos de la fibra en la biodisponibilidad de minerales tales como el Zn (Torre y col. 1991).

Últimamente los nutriólogos están recomendando un incremento en la dieta de fibra, mucha de la cual esta asociada con la presencia de fitatos. El efecto negativo que ejercen los fitatos sobre la absorción de Zn ya fue indicado por (Cheryan, 1980). Wise (1995) va mas lejos indicando que la presencia de fitatos en el pan se encontraba asociada con la deficiencia de Zn en la mitad este de U.S.A.

La fibra y los fitatos son por tanto los componentes que de forma mas significativa reducen la biodisponibilidad del Zn, sobre todo en alimentos elaborados con cereales integrales (de soja), que contienen el Zn en una forma menos biodisponible. De hecho, se pueden obtener balances negativos en este elemento en personas alimentadas con dietas que contienen una elevada proporción de fibra (Kelsay y col. 1979). Sin embargo, es curioso observar que personas sometidas a regímenes vegetarianos no suelen presentar deficiencias de Zn (Anderson y col. 1981), quizás porque los cereales integrales contenidos en las dietas de estas personas, en general, poseen cantidades de Zn, y de otros elementos traza, considerablemente mas elevados de los que pueden apreciarse en otro tipo de dietas consumidas en norte América (Kelsay y col. 1979). De hecho después de las carnes y pescados, los cereales integrales (especialmente el germen de las semillas) constituyen la fuente mas importante de este micronutriente en la dieta.

El ácido fítico es el principal factor inhibidor de la absorción de Zn en los productos elaborados a base de soja, y la reducción de fitatos en las proteínas de soja incrementa la biodisponibilidad del Zn (Zhou y col. 1992).

En estudios realizados por Sandstrom y col. (1987), se administró a humanos una dieta rica en cebada, centeno y harina de avena. En todos los experimentos la cantidad de ácido fítico en las comidas era el principal determinante en la absorción de Zn.

Por otra parte el uso de radioisótopos ha mejorado considerablemente nuestro entendimiento sobre el mecanismo de absorción de el Zn. Con respecto a la fibra en la dieta y la biodisponibilidad del Zn, el tipo y cantidad de fibra de cereales tiene menor influencia en la absorción de Zn que la presencia de fitatos (Sandstrom, 1987).

El estudio realizado por Ferguson y col. (1989) en un grupo de niños del este de África con edades comprendidas entre 4 - 6 años, viene a corroborar estas conclusiones pues en sus trabajos observan que un consumo elevado de ácido fítico en la dieta,

compromete de manera significativa el estatus de Zn en niños.

Larsen y col. (1992) por su parte afirman que la adición de minerales a una dieta alta en fitatos puede ocasionar problemas en la utilización de minerales y en el normal crecimiento.

C. Factores que aumentan la biodisponibilidad del Zn

Existen una serie de estados fisiológicos y componentes dietéticos que incrementan de forma considerable el cinc disponible en los alimentos de la dieta. Entre los más importantes señalamos los siguientes:

▣ *Cantidad y tipo de proteínas en la dieta*

Las dietas con alto contenido en proteínas, basadas principalmente en proteínas de origen animal aumentan la biodisponibilidad del cinc (Sandstrom y col. 1989; Gibson, 1984) debido probablemente a la formación de complejos solubles con los L-aminoácidos, por lo que la exclusión de alimentos cárnicos en las dietas vegetarianas podría exacerbar la pobre biodisponibilidad del cinc en ellas (Gibson, 1994).

El estudio realizado por Stuart y col. (1986) sobre la biodisponibilidad del cinc en ratas alimentadas con distintas fuentes de proteínas (animal y vegetal respectivamente), llega a la conclusión de que en estos animales de experimentación, la biodisponibilidad del cinc procedente de una fuente de proteínas de origen animal era mayor que cuando son alimentadas con una fuente de proteínas de origen vegetal. Además, la retención corporal total de cinc en una dieta mixta con proteína de soja y de pollo (84%), era mayor que la correspondiente a una dieta elaborada únicamente a base de proteína de soja (76%); pero menor que cuando la dieta contiene exclusivamente proteína de pollo (93%). Estas investigaciones son paralelas a las realizadas por Meyer y col. (1983) en un estudio sobre la biodisponibilidad del cinc en tres dietas con distintas fuentes de proteínas como el huevo, soja, y mezcla de huevo y soja determinando el porcentaje de retención de cinc del 85%, 64% y 79%, respectivamente.

También se ha observado como las proteínas incluso en presencia de fitatos, aumentan la biodisponibilidad del cinc debido a la desorción del cinc desde los

complejos que forman con el ácido fítico por los aminoácidos histidina, cisteína y metionina (Clydesdale y col. 1991).

▣ Origen del mineral

También el origen animal es importante puesto que el Zn es más biodisponible en la leche humana que en la leche de vaca (Czjka-Narins, 1992).

▣ Tratamiento tecnológico

Tratamientos tecnológicos como el refinado de cereales que elimina la fibra, y la fermentación del pan que reduce el contenido en ácido fítico, aumentan la absorción del Zn (King y Keng, 1994).

▣ Ácido cítrico

El ácido cítrico, ya que favorece el proceso de absorción que es por transporte activo (Linder, 1989).

7. Funciones bioquímicas y fisiológicas

La acción bioquímica del Zn está ligada en gran parte a la presencia de cierto número de enzimas. Es necesario para el normal funcionamiento de más de 90 enzimas directamente implicadas en el metabolismo energético, y de los hidratos de carbono, en las reacciones de biosíntesis y degradación de las proteínas, en los procesos de biosíntesis de ácidos nucleicos y de compuestos de tipo Hemo, en el transporte del carbónico y en otras muchas reacciones (Linder, 1989).

Según este autor, "los efectos más inmediatamente visibles del Zn se manifiestan en el metabolismo, fisiología y mantenimiento de la piel (reparación de tejidos), páncreas y órganos relacionados con la reproducción en el varón (desarrollo sexual), aunque este elemento tiene importantes funciones en todas las células de la economía con función inmunológica y protectora. Por ello las deficiencias se traducen en manifestaciones fisiopatológicas muy amplias y significativas (Bertholf, 1987). En la glándula pancreática

exocrina el Zn está relacionado con la producción y secreción de abundante material hidrolítico indispensable para la digestión intestinal; desde el punto de vista endocrino, el catión interviene en los procesos celulares por los que se almacena la insulina en las células β de los islotes de Langerhans, aunque parece que el catión no interviene directamente en el mecanismo de acción de la insulina.

Es importante destacar su papel en relación con la función sexual masculina y concretamente con la testosterona. Efectivamente una vez que el esteroide ha difundido por la membrana de la célula efectora y penetra en el citosol, se convierte en dihidrotestosterona, compuesto que después de unirse con el receptor específico, emigra al núcleo y activa los procesos de replicación y transcripción del DNA. Pues bien, la conversión de testosterona en su derivado hidrogenado requiere la presencia de iones Zn.

Por otra parte el Zn tiene importantes efectos en el metabolismo y fisiología de los tejidos epitelial y conectivo, efectos precisamente fundamentados en la necesidad del elemento para la normal biosíntesis de las proteínas en general, y de colágeno en particular; posiblemente el Zn interviene en el proceso de división de las células de estos tejidos, aunque tal extremo no está completamente confirmado (Solomons, 1981). Son numerosos los enzimas que contienen Zn, esto hace comprender la importancia de las carencias de este elemento.

Lederer (1985) recoge una clasificación de las enzimas que contienen Zn:

A. Óxido-reductasas

*** Alcohol deshidrogenasa*

La actividad de la alcohol deshidrogenasa está condicionada por la NAD(H), y cataliza la oxidación de los alcoholes en su aldehído, por ejemplo el etanol en acetaldehído, el retinol en retinal, etc.

Es necesario por tanto el Zn en los mecanismos de desintoxicación corporal de alcohol etílico y en el metabolismo de la vitamina A (Linder, 1989).

**** *La superóxido dismutasa***

Esta enzima protege las células contra los efectos tóxicos del oxígeno. Se han identificado con metales diferentes al Zn, dependiendo de Zn y Cu, Zn y Mn, y Zn y Fe. Esta enzima se encuentra en todas las células de la economía, las formas citoplasmáticas del enzima son diméricas y cada subunidad contiene un ion Cu^{++} y otro Zn^{++} posibilitando la eliminación celular de aniones superóxidos muy tóxicos para el organismo.

B. Transferasas

**** *Aspartato transcarbamilasa***

Enzima que contiene 6 átomos de Zn y que cataliza la condensación del carbamil fosfato con L-aspartato en la síntesis de pirimidinas.

**** *Nucleótido polimerasa***

El Zn ejerce su principal efecto sobre las enzimas dependientes del mismo que regulan la biosíntesis y velocidad catabólica del RNA y DNA. Además dicho metal también puede desempeñar un papel en el mantenimiento de la conformación de los polinucleótidos (Ballester, 1983).

**** *La termolisina***

Es una endopeptidasa de origen bacteriano conteniendo un átomo de Zn.

**** *La colagenasa***

Los vertebrados y las bacterias contienen endopeptidasas que hidrolizan específicamente el colágeno y se les conoce con el nombre de colagenasas. Todas son metaloenzimas conteniendo Zn.

C. Liasas

*** Alcoholasas*

Catalizan la condensación reversible del fosfato de dihidroxiacetona con un aldehído para formar el correspondiente cetofosfato.

*** Anhidrasa carbónica*

Enzima que juega un papel importante en el mantenimiento del equilibrio ácido-base de los líquidos corporales. Cada molécula de enzima aloja un ion Zn que se encuentra formando un quelato con el centro activo del enzima.

Se han descrito también otras liasas como una deshidratasa S-aminolevulinasa que interviene en la biosíntesis del hemo, así como otras isomerasas y ligasas.

D. La metalotionina

Entre otras ha sido descrita por algunos autores como proteína que contiene Zn. Estos autores han comprobado como al inyectar Zn a las ratas inducen la formación de metalotionina, nivel que disminuye cuando existe carencia.

La metalotionina se forma también en la mucosa intestinal, después de la administración de Zn por boca. La medida de esta metalotionina formada en la mucosa está regulada por la absorción intestinal del Zn. Esto ha sido confirmado por Olafson (1983) en ratas.

De forma general y como funciones críticas fundamentales en las que participa el Zn aparte de en las que participa vía enzimática, habría que subrayar:

Participa en la estructura y funciones de las membranas biológicas. Así pues, se ha visto que una pérdida de Zn a nivel de membrana produce un aumento de la susceptibilidad al daño oxidativo, tensiones estructurales y alteraciones en los lugares de los receptores específicos y sistemas de transporte. Su influencia en la membrana se relaciona con la estabilización de los grupos -SH y fosfolípidos, la ocupación de los lugares que de otra forma podrían alojar metales de transición con potencial redox (tales

como el Fe) y encontrarse envuelto en la eliminación de radicales libres a través de su asociación con las metalotioninas (Linder, 1989; King y Keen, 1994).

Ayuda a la estabilización de las estructuras del RNA, DNA y ribosomas. Asimismo varios factores de transcripción contienen regiones en "forma de dedo" con Zn que parece ser son necesarias para la unión de esos factores al DNA.

Papel regulador en la polimerización de la tubulina, donde se ha apreciado su capacidad de estabilización de los neurotúbulos, in vitro, posiblemente a través de la formación de puentes mercaptido entre las subunidades diméricas de la tubulina.

8. Toxicidad del Zn

El Zn es el elemento menos tóxico de todos los oligoelementos. No se han descrito efectos tóxicos del catión, incluso en individuos que durante semanas consumieron cantidades de Zn 10 veces superiores a los requerimientos diarios aconsejados (Venugopal y Luckey, 1978). En animales a los que se les ha suministrado grandes dosis de Zn, se ha observado ciertas lesiones pancreáticas. Sin embargo el consumo de comprimidos de ZnSO₄ (u otros preparados farmacéuticos del catión) suelen provocar cierto malestar general, sobre todo si el Zn no se consume simultáneamente con la comida.

A pesar de ello se han descrito brotes aislados de toxicidad de Zn tras la ingestión de comidas o bebidas contaminados con Zn procedentes de recipientes galvanizados.

Los síntomas típicos de una toxicidad por este elemento incluyen dolor epigástrico, diarrea, náuseas y vómitos (Bertholf y col. 1988; Fosmire y col. 1990). Una dosificación en exceso (200mg /día) origina síntomas eméticos.

Tras la inhalación de humos de el óxido de Zn se observa la aparición de fiebre.

Los signos aparecen a las 8 horas e incluyen debilidad generalizada, hipernea y sudoración copiosa (Bertholf, 1988). Estos síntomas desaparecen normalmente después de que el individuo se aleja de la zona donde existe esta contaminación.

Por otra parte podemos hablar de una toxicidad de carácter crónico cuando se ingiere durante un período largo de tiempo un suplemento excesivo de Zn. La principal consecuencia de esta toxicidad es una deficiencia secundaria de Cu causada por una interacción competitiva entre estos elementos a nivel de su absorción intestinal.

Se han observado deficiencias de Cu inducidas tras la administración de dosis bajas de Zn (25 mg/día). La administración de suplementos de Zn en exceso de 150 mg/día provoca una disminución de los niveles de HDL en el suero, erosión gástrica y disminución de la respuesta inmune (Fosmire y col. 1990).

Si bien es cierto que se ha descrito en numerosas ocasiones el síndrome tóxico derivado de ingestas muy elevadas de Zn (en la mayoría de los casos accidentales), ha sido en los últimos 10 años cuando se ha empezado a demostrar un especial interés en las consecuencias adversas que pueden tener para la salud aportes superiores a la RDA, bien sea a dosis farmacológicas o como suplementos a concentraciones francamente moderadas.

En la actualidad es relativamente frecuente la prescripción de suplementos de Zn para la prevención y tratamiento de algunas enfermedades como el retraso del crecimiento, algunos tipos de cáncer, caso de enfermedad celíaca refractario al tratamiento habitual, la anemia de células falciformes, infecciones, determinadas alteraciones de la piel y como medio para acelerar y mejorar la cicatrización de heridas quirúrgicas.

Por otra parte cada vez es más frecuente la autoprescripción de suplementos vitamínicos y minerales entre la población en forma de comprimidos de fácil adquisición sin necesidad de receta médica. Muchos de ellos contienen de 1-7 veces las de la RDA (Kurzen y col. 1985) para el Zn (3-10 mg/día en el caso de niños y adolescentes, 15 mg/día para adultos de ambos sexos) y su uso no se realiza bajo control médico de ningún tipo, motivo por el cual los posibles efectos adversos de estas ingestas moderadamente excesivas no se han estudiado convenientemente durante años.

En diversas especies animales (Owen y col. 1982; Sandstead y col. 1978) incluido el hombre (Saylor y col. 1980) se ha encontrado que niveles elevados de Zn en

la dieta tienen un efecto antagonista en la absorción y almacenamiento de Cu interaccionando competitivamente con él en el intestino, lo que puede provocar un incremento en las pérdidas fecales de Cu o hipocupremia (Porter y col. 1977; Samman y col. 1987). Numerosos estudios muestran que únicamente se consigue llegar a un déficit en cobre severo secundario al uso de suplementos de Zn cuando éstos han sido utilizados durante periodos de tiempo prolongado (8-10 meses), y no cuando se han administrado dosis similares en un tiempo menor (4-6 semanas) (Saylor y col. 1980; Prasad y col. 1978).

Uno de los efectos más frecuentes de déficit de Cu, (como consecuencia del exceso de Zn), es la anemia sideroblástica (acompañada o no de leucopenia) con neutropenia (Patterson y col., 1985; Hoffman y col., 1988). El cobre es necesario para la incorporación del Fe al grupo hemo (Bottomley y col. 1982), por lo que este tipo de anemia inducida por la terapia con Zn no revierte con la incorporación de suplementos de Fe a la dieta (ya que no existe déficit) sino suspendiendo los aportes de Zn. Además mientras que las reservas orgánicas de Zn continúen elevadas, parece que tampoco puede resolver la anemia suplementos orales de Cu (sí en cambio los parenterales) ya que su absorción continuará bloqueada hasta que haya podido eliminarse el exceso de Zn lo que parece ser un proceso relativamente lento. (Hoffman y col. 1988).

Hooper (1980) describe una disminución de las lipoproteínas de alto densidad en el suero al cabo de varias semanas de suplemento diario de 80 a 150 mg.

Otros autores establecieron que en los adultos, suplementos 20 veces superiores a las ingestas recomendadas produjeron trastornos de varias respuestas inmunes (Chandra, 1984). Este investigador sugiere que un aumento en los niveles séricos de LDL colesterol; particularmente, si se acompaña de un cambio sustancial en la composición lipídica de las membranas celulares, podría estar implicado en la disfunción de linfocitos y leucocitos polimorfos nucleares observada durante la suplementación con Zn, ya que observó una correlación negativa entre la cantidad de LDL asociada a la membrana celular de los linfocitos en cultivo y la cantidad de calcio acumulado durante el proceso de prerreplicación inducido por la PHA. Por lo tanto, a mayor cantidad de Zn en el medio de cultivo, mayor es la cantidad de LDL unida a la membrana de los linfocitos y menor el acúmulo de calcio necesario para la activación del proceso de pre-replicación.

En definitiva el Zn es un mineral esencial con una gran actividad mitogénica cuya presencia es esencial para el normal funcionamiento del sistema inmunitario, pero dosis excesivas parecen tener un efecto negativo sobre la estimulación y activación de los leucocitos capaz de alterar la respuesta del organismo a agresiones externas como las infecciones bacterianas.

El Zn tiene afinidad por los grupos -SH y -OH, con gran capacidad complejante de aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos, y al estar fisiológicamente implicado en todas las rutas metabólicas, sus efectos son muy diversos. Es estabilizante del ADN, membranas, hormonas y ribosomas e interacciona con minerales esenciales como el Cu, Fe, Mg y Ca. Así, disminuye el contenido celular de Fe y Cu, y por lo tanto de ferritina, hemosiderina, citocromo oxidasa, catalasa, fosfolípido-P y ceruloplasmina. También inhibe la ATPasa dependiente de Mg (Soria y col. 1995).

Según estos autores como efectos tóxicos principales cabe señalar que:

- Localmente provoca neumonitis y edema pulmonar por inhalación y náuseas, diarreas y ulceraciones por ingestión.
- Sistemáticamente, por inhalación desencadena la fiebre del humo metálico; por vía parenteral o dialisis, náuseas, vómitos y fiebre; y por ingestión, úlceras venosas en piernas, anemia hipocrómica, leucopenia. A dosis elevadas provoca debilidad, hiporeflexia, depresión del SNC con tremor y parálisis de miembros. Es además teratogénico.

Los datos de toxicidad referentes al $ZnCl_2$ por la vía inhalatoria para el hombre es de un $CT_m = 4800 \text{ mg/m}^3/30m$. Los límites de exposición laboral son de $TLV-TWA = 1 \text{ mg(Zn)/m}^3$ y $TLV-STEL = 2 \text{ mg(Zn)/m}^3$.

De todo esto se desprende que a la hora de elaborar las recomendaciones nutricionales para la población general, no sólo es conveniente fijar unos requerimientos diarios mínimos de oligoelementos, sino también máximos. Estos últimos en la mayoría de las ocasiones son más difíciles de definir que los primeros debido a la dificultad que existe para establecer el punto crítico en que un elemento pasa de ser beneficioso para el organismo a representar una agresión externa que se deriva de su acúmulo excesivo en los órganos y sistemas de la economía.

8.1. Interacción del Zn con distintos fármacos

En los últimos años ha habido un desconcierto creciente sobre las posibles interferencias entre fármacos y la biodisponibilidad y metabolismo de elementos traza esenciales. (Williams, 1984; Akrivos y col. 1984).

Además, las sustancias orgánicas usadas con fines terapéuticos a menudo contienen grupos donantes que forman complejos estables con los iones metálicos en los fluidos biológicos.

Interacciones de este tipo pueden producir los efectos terapéuticos esperados en cada fármaco (Williams, 1984; Perrin y col. 1982; Cole y col. 1983; Cole y col. 1984; Sorenson y col. 1982).

Afortunadamente los últimos avances de las ciencias informáticas aplicadas a estos problemas bioquímicos, han hecho posible el diseño de ordenadores capaces de simular el porcentaje de distribución de varios cientos de complejos en distintos fluidos biológicos (Akrivos y col. 1984; May y col. 1982).

Con respecto a las tetraciclinas, este tipo de técnica ha sido usada recientemente para estudiar desde el punto de vista cuantitativo, la influencia de la coordinación de varios antibióticos de esta clase con distintos elementos traza.

Muchos artículos hacen referencia a la alta afinidad de estos antibióticos con el Zn. Existen investigaciones clínicas que se dedican a estudiar la influencia potencial del Zn en la absorción gastrointestinal de las tetraciclinas. (Mapp y col. 1976; Pemttila y col. 1975), demostrando poseer un importante antagonismo con la absorción de las mismas.

9. El Zn y las patologías asociadas a su deficiencia

La deficiencia de zinc, uno de los elementos traza necesarios para la vida celular, es un problema nutricional que permanece infradiagnosticado en muchos casos.

Su carencia en humanos da lugar a cuadros clínicos que varían mucho según la severidad del mismo, la edad de instauración, y el contexto en el que se establece. Esta deficiencia a pesar de estar extendida por todo el mundo, posee una mayor prevalencia en aquellas zonas que se alimentan a base de proteínas de cereales (Prasad y col. 1995).

La acrodermatitis enteropática es una enfermedad de transmisión genética autosómica recesiva en la que existe una deficiencia de Zinc (Barnes y col. 1973), que cursa con deficiencia de crecimiento, diarrea, depresión mental, alteraciones dérmicas, y gran susceptibilidad a las infecciones. Prasad y col. (1995) observaron que la no administración de Zn en pacientes con acrodermatitis enteropática puede llegar a tener consecuencias muy graves.

Asímismo, Prasad y col. (1961) pusieron de manifiesto en niños de Egipto e Irán, con talla baja e hipogonadismo, una severa deficiencia de zinc. Se ha apreciado también un déficit en distintos cuadros dermatológicos en adultos sometidos a tratamientos quirúrgicos o nutrición artificial (Okada y col. 1976), en alteraciones de la visión, olfato (Russel y col. 1983), y audición con audífonos, en alteraciones

severas de la inmunidad celular (Golden y col. 1977), y en muchos otros cuadros patológicos (Prasad y col 1983).

El cuadro clínico de deficiencia leve o larvada de zinc es muy sutil. Fue estudiado experimentalmente en voluntarios (Prasad y col. 1978) pero enmascarado en el contexto de otras situaciones es una deficiencia nutricional cuyo contexto es todavía difícil de evidenciar de forma precisa. Prasad y col. (1995) en un estudio sobre la deficiencia de Zn, observaron otras nuevas alteraciones asociadas a la misma como pueden ser cambios en la piel, disminución del apetito, letargia mental, alteraciones neurosensoriales y alteraciones inmunes mediados por células.

9.1. Zn y crecimiento

El cinc es un elemento esencial para el crecimiento y desarrollo debido a su implicación en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas metabólicas (Hambidge y col. 1986; O'Dell y col. 1992).

El retraso del crecimiento físico es un hecho ya evidenciado en las experimentaciones de animales jóvenes con deficiencia de cinc. También hay datos que manifiestan que el potencial máximo de crecimiento en bebés, niños y adolescentes puede ser limitado por la deficiencia en este elemento. Por ejemplo, el crecimiento en bebés varones alimentados con una fórmula enriquecida con cinc es mayor que el de un grupo control de bebés alimentados con la misma fórmula sin enriquecer.(Hambidge y col. 1989).

Walravens y col. (1983), realizaron un estudio cuyo principal objetivo era determinar el efecto de una suplementación en cinc con la velocidad de crecimiento en niños con bajos percentiles de crecimiento. Se realizó un estudio de doble ciego controlado con una duración de doce meses y se observaron diferencias significativas en la velocidad de crecimiento entre los grupos suplementados y el grupo control,

debidas fundamentalmente al incremento de las ganancias en altura en los varones suplementados aunque el aumento en altura en las hembras fue distinto entre los dos grupos.

Sin embargo, en otros estudios donde la suplementación con cinc se realizó en niños no seleccionados con respecto a los percentiles de crecimiento, no se apreció un aumento en su velocidad de crecimiento.(Hambidge y col. 1979).

En otros trabajos realizados por Kutumbale y col. (1976) y Sharda y Bhandari (1977), se pone de manifiesto que la deficiencia en cinc, de forma aislada, no es muy frecuente en países como la India, aunque si lo es al estar asociada a una malnutrición proteica - energética. Por ello es difícil diferenciar los efectos de la deficiencia de cinc *per se* en aquellos casos que aparecen como consecuencia de otras situaciones con deficiencias múltiples.

Hemalatha y col.(1992), realizaron un estudio experimental de doble ciego acerca del papel de la suplementación por cinc en la rehabilitación de varios niños malnutridos del hospital de Niloufer (Hiderabad), que sufren Marasmo y Kwashiorkor. Los resultados indicaron que la suplementación con este elemento junto con la dieta podrían producir una restauración rápida en el status de cinc, aunque no tenía ningún efecto en la ganancia de peso u otro tipo de resultados.

Golden y Golden (1981) también han descrito el efecto beneficioso de la

suplementación de cinc en niños. Estos investigadores observan un descenso de cinc en el suero, cuando se produce una ganancia de peso rápida en los niños malnutridos alimentados con una fórmula de leche, con bajo contenido en cinc, sin una suplementación adicionada de este mineral. En otros trabajos, los mismos autores manifiestan que la deficiencia de cinc también puede afectar a la calidad del crecimiento, de forma que la suplementación con este elemento en niños malnutridos reduce el coste energético del crecimiento, lo cual se relaciona probablemente con una mejora en la síntesis de tejido corporal magro (Golden y Golden, 1981).

Otros autores también han estudiado el efecto de la suplementación de cinc en personas con deficiencia de este mineral como efecto corrector. Hambidge (1988), Sachdev y col. (1988), Simmer y col. (1988), Behrens y col. (1990) y Prasad (1991).

Ferguson y col. (1989), establecen la existencia de una relación entre el bajo crecimiento en jóvenes y en adultos del este de África, y el estatus de cinc comprometido, y no con el déficit del aporte energético y proteico.

Otros investigaciones realizadas por Ferguson y col. (1993), al estudiar a niños preescolares de países africanos (Malawi y Ghana), indican que el riesgo de un consumo inadecuado de cinc, es alto en ambos países, y especialmente elevado en Malawi, donde la prevalencia del crecimiento retardado es mayor. La alta prevalencia de las bajas concentraciones de cinc en el pelo de los niños de Malawi, aporta argumentos que sostienen la teoría de la existencia de niveles de cinc por debajo de lo necesario.

De la misma manera el trabajo dirigido por Gibson y col. (1989) demuestra la existencia de un retraso en el crecimiento cuando existe deficiencia de cinc en una pequeña proporción, de chicos del sudeste de Ontario con bajos percentiles de crecimiento tras estudiar el efecto de la suplementación de cinc en la velocidad de crecimiento, comprobaron que sólo los chicos con una concentración inicial de cinc en el pelo menor a $1,68 \mu\text{mol}/\text{gramo}$ y una agudeza gustativa disminuida, mostraban una respuesta positiva en el crecimiento. Sin embargo, no se encontró una respuesta comparable en niños suplementados que tenían bajos percentiles de crecimiento y una concentración inicial de cinc en el pelo, superior a $1,68 \mu\text{mol} / \text{gramo}$.

La conclusión de este estudio es que existe un síndrome de bajo crecimiento asociado a la deficiencia de cinc en chicos con bajos percentiles de crecimiento y unos niveles de cinc en el pelo inferior a $1.68 \mu\text{mol} / \text{gramo}$ junto con una agudeza gustativa disminuida.

Sin embargo, Salmenpera y col. (1994) no encontraron ningún efecto positivo sobre la velocidad de crecimiento ni sobre la estatura en bebés de hasta un año de edad en Helsinki (Finlandia), sometidos a una suplementación de cinc a partir de fórmulas infantiles.

9.2. Zn y embarazo

La comida y los hábitos alimenticios junto con la deficiencia de elementos traza pueden afectar a la fertilidad de la población, lo que constituyó la principal causa de la disminución de la fertilidad en Europa entre 1875 y 1913. Durante este periodo los europeos consumían principalmente pan blanco y patatas, alimentos todos ellos deficientes en cinc.

Por ello el suplemento adecuado de cinc es importante para el crecimiento y desarrollo del feto. El 90% de los recién nacidos de ratas alimentadas con una dieta deficiente en este mineral durante el embarazo, desarrollan malformaciones congénitas (Hurley y Mutch, 1973), mientras que los neonatos de los monos con deficiencia de este elemento, nacen con reducción en el peso y en el tono muscular (Golub y col. 1984). Además en las ratas a las que no se les ha administrado cinc, se observan contracciones uterinas. (Simmer y col. 1991).

La deficiencia de este mineral en las mujeres puede conducir a dificultades en la síntesis y secreción de las hormonas FSH y LH, desarrollo anormal de ovarios, interrupción del ciclo estrogénico, abortos frecuentes, malformaciones congénitas en el feto, periodo de gestación prolongado, efectos teratogénicos, nacimientos de niños muertos, partos con excesiva sangría, dificultades en el parto, impulsos uterinos descoordinados o pobre actividad uterina, pre-eclamsia, toxemia y bebés con bajo peso al nacer (Bedwal y Banuguna, 1994).

Simmer y col. (1991), también apoyan esta teoría y establecen que mujeres con

bajos niveles de cinc en el suero poseen mayor posibilidad de complicaciones en el embarazo, incluyendo el retraso en el crecimiento intrauterino, en la etapa previa y posterior al parto y vagina sangrante (Jameson, 1976).

Los niveles de cinc en plasma son mas bajos en madres de bebés retrasados (Soltan y Jenkins, 1982) y en madres alcohólicas, en los cuales los niveles estan inversamente relacionados con la incidencia de malformaciones en los bebés (Flynn y col. 1981). El contenido de cinc de los leucocitos de sangre periférica, una buena medida del estado en cinc en los tejidos, (Jones y col. 1982), es menor en madres de bebés pequeños para su edad gestacional (Meadows y col. 1981; Simmer y Thompson, 1985; Wells y col. 1987).

Una dieta pobre puede contribuir a la deficiencia en este elemento (Simmer y col. 1987), combinada con factores que pueden inhibir la absorción intestinal de cinc, tales como los fitatos (Turulund y col. 1984) y suplementos de hierro/fítico (Simer y col. 1987). Al haberse relacionado la deficiencia de cinc con complicaciones, en concreto el retraso del crecimiento de los fetos en mujeres embarazadas, la suplementación de cinc podría tener un carácter beneficioso. En resumen, el estudio realizado por Simmer y col. (1991) llega a la conclusión de que la suplementación de cinc tiene un efecto significativo en la reducción de la incidencia en el retraso del crecimiento intrauterino, y en la mayoría de los índices de medida del parto y de salud fetal que eran mejores en los grupos suplementados.

Por otra parte Kuhnert y col. (1992), hacen un estudio en mujeres embarazadas fumadoras, con el objeto de poder establecer la posible relación existente entre fumar durante el embarazo y el consumo de cinc en las madres, con el estado corporal de cinc de la madre y el feto. El resultado de este estudio en consonancia con lo determinado por otros autores (Kuhnert y col. 1987 y 1988, Mukherjee y col. 1984; Lazebnik y col. 1988) sugiere la necesidad de evaluación de la suplementación por cinc en madres fumadores y que no pueden dejar el tabaco como un mecanismo potencial para incrementar el peso de niños al nacer.

Watanabe y col. (1983), establecieron que la deficiencia de cinc en las madres puede ser el resultado de una dieta inadecuada o puede ser secundario a alguna enfermedad tal y como la diabetes, lo que supone un riesgo sustancial para el desarrollo

de su descendencia.

Bedwal y Bahuguna (1994), observaron que mujeres que usan regularmente anticonceptivos orales, presentan niveles de cinc en plasma mas bajos que aquellas que no los usan. Por otra parte King (1987) apreció que no existían pérdidas de este elemento a nivel endógeno y que las funciones en las mujeres que consumían anticonceptivos orales no se veían afectadas.

Sin embargo, en las usuarias de anticonceptivos orales se pueden observar cambios tales como:

- Alteración de la absorción de Zn.
- Reducción del Zn circulante.
- Incremento de los niveles en algunos tejidos o disminuir la liberación de este elemento de otros tejidos.

A pesar de ello no hay ninguna evidencia que sugiera que estos cambios afectan a los requerimientos de Zn en la dieta. Jamesons y col. (1983) señalan que algunas de las complicaciones ocurridas durante el embarazo, pueden ser reducidas mediante una terapia de suplementación en forma de sulfato de cinc como también destacaron otros autores (Wolfe y col. 1994; Jamesons y col. 1983).

En contraposición a esta teoria, English-Westcott y col. (1991), compararon la absorción de cinc a partir de dosis equivalentes de sulfato y óxido de cinc respectivamente, sin observar diferencias.

Es de destacar el hecho de que las adolescentes embarazadas son especialmente vulnerables a un estado corporal subóptimo de cinc, ya que éstas tienen requerimientos adicionales para soportar el desarrollo del feto y su propia maduración esquelética.

La respuesta fisiológica del cuerpo frente al embarazo puede afectar al pool de Zn del cuerpo cuya concentración en el suero disminuye durante el primer y tercer trimestre de embarazo, aún cuando el status de este elemento sea el adecuado en la madre, (Swanson y col. 1987; Hambidge y col. 1983; Terrés Martos y col. 1998). Esto se atribuye a la expansión de volumen plásmatico, incremento de los niveles

plasmáticos y descenso de la albumina en el suero. El descenso del cinc sérico refleja una transferencia del mineral de la madre al feto como consecuencia de la demanda fetal. Sin embargo, la actividad de la Zn metaloenzima en el suero (fosfatasa alcalina) se incrementa a lo largo del embarazo. Este aumento es consecuencia de la contribución de la isoenzima de la placenta a la actividad del plasma. A veces se han observado bajos niveles séricos de este elemento en las madres que han alumbrado niños pequeños, hecho relacionado con una inadecuada transferencia de cinc desde la madre al feto (Mc Michael y col. 1982).

La deficiencia del cinc produce alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos y fosfolípidos y aumenta la peroxidación lipídica. (Bettger y col. 1980; Sullivan y col. 1980).

Es posible que los cambios en la estructura de la membrana asociados con la deficiencia de cinc interfieran en el proceso luteolítico. El proceso de lactación necesita un aporte de nutrientes, y por tanto los requerimientos nutricionales de la madre durante este periodo son superiores.

Durante la lactación, el cuerpo de la madre posee un aumento en la eficacia de los mecanismos de absorción para los elementos traza, y su utilización en la síntesis de la leche por lo que la disminución de estos minerales en el plasma durante la misma sugiere que la biosíntesis de la leche tiene prioridad en la distribución de los elementos traza.

En este sentido Outake y Tamura (1993), en mujeres japonesas durante la lactación, observaron un descenso paulatino de los niveles de cinc en la leche materna sobre todo en las primeras semanas y de forma gradual a lo largo de todo el periodo.

Donangelo y col. (1984), observan suaves descensos de la concentración total de este elemento y una disponibilidad menor del Zn en el suero de madres que amamantan a sus bebés y que no mantienen un peso adecuado en el primer mes de vida . Por tanto concluyen que el estado corporal de Zn de la madre puede limitar la tasa de crecimiento de los bebés que se alimentan únicamente de leche materna, y que tienen unos requerimientos de cinc relativamente elevados cuando son pequeños pero que disminuyen progresivamente durante el crecimiento.

9.3. Zn y aparato reproductor en el hombre

La deficiencia de cinc también se ha relacionado con el crecimiento inadecuado de los testículos (Gunn y col. 1970).

El contenido de cinc es mayor en los testículos de los animales adultos comparado con los inmaduros o con aquellos que poseen los conductos eferentes ligados (Srivastava, 1984).

En el hombre, la concentración de cinc se incrementa en la pubertad y alcanza su máximo a la edad de 34-40 años cuando la actividad funcional del organismo está en su cumbre.

El Zn parece ser un elemento indispensable en la reproducción porque las gónadas son los tejidos de mas rápido crecimiento en el cuerpo y las enzimas vitales que estan incluidas en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas son Zn metaloenzimas (Prasad y col. 1975; Slater y col. 1971).

Algunas de las enzimas importantes en el esperma son Zn metaloenzimas y pueden alterar su funcionalidad cuando existe una deficiencia en este elemento. Concretamente la LDH-X, posee una relación bastante importante con la movilidad de los espermatozoides.

El cinc, por tanto, juega un papel muy importante en la producción y secreción de LH, FSH y prolactina, siendo esto lo que en definitiva va a regular la producción de testosterona.

Curtiss y col. (1992) realizan un estudio para conocer la influencia de la disminución de cinc en la dieta en el volumen seminal de este elemento y sus pérdidas, la concentración de testosterona en el suero, y la morfología del esperma en hombres jóvenes. Sus investigaciones sugieren que la concentración de testosterona, el volumen seminal y las pérdidas seminales totales por la eyaculación pueden sufrir una depleción a corto plazo en hombres jóvenes con esa reducción dietaria de Zn.

Bertrand y col. (1921) fueron los primeros en describir la presencia de cinc en la próstata afirmaron además que este órgano poseía mayor contenido en este elemeto que cualquier otro órgano del cuerpo. El fluido prostático es rico en fosfatasa ácida y se sabe que el cinc influye en en la movilidad, viabilidad y morfología de los

espermatozoides.

También se ha descrito una relación del cinc con una cierta actividad antibacteriana ya que la concentración de este mineral existente en los fluidos prostáticos de hombres sanos, inhibe el desarrollo de *Trichomonas vaginalis*.

Otros autores como Bedwall y Balruguna (1994) también observan una disminución de la producción de testosterona y una inhibición de la espermatogénesis, asociada a la deficiencia de cinc.

9.4. Zn y diabetes

Se ha demostrado que en los diabéticos humanos y animales se producen modificaciones en el metabolismo del Zn. Existe una correlación entre el incremento del Zn y la insulina en el páncreas y se sabe que este mineral se encuentra abundantemente distribuido en los islotes de Langerhans formando complejos estables.

La hipercincuria así como la hiperglucemia han sido encontradas en pacientes con diabetes mellitus (Heise y col. 1988; Niewoehhner y col. 1986).

Kinlaw y col. (1983) han sugerido que la deficiencia de Zn en diabéticos podría ser consecuencia de la hiperglucemia, las dificultades en la absorción intestinal de Zn y la excesiva excreción renal de Zn. Además la existencia de una alteración del metabolismo de los elementos traza en diabetes, tanto del tipo I como

de tipo II, es una realidad bien establecida tanto en humanos como en animales de experimentación (Mooradian y col. 1987; Kinlaw y col. 1983; Garg y col. 1994).

Muchos de los pacientes con diabetes mellitus tipo II desarrollan fallos cardíacos congestivos durante el desarrollo de la enfermedad. Los regímenes terapéuticos incluyen diuréticos, los cuales producen una excesiva eliminación de Zn en la orina (Wester y col. 1980), y una inhibición de la enzima transformadora de la angiotensina, lo cual ha sido asociado en pacientes hipertensos, con una excesiva pérdida renal de Zn, así como con una importante pérdida del contenido de Zn eritrocitario. (Golik y col. 1993).

De igual manera, se ha observado que la excreción de Zn está muy incrementada

en pacientes con nefropatía diabética incipiente, que se detecta por la aparición de microalbúmina. (Brun y col. 1992).

Existen otras complicaciones asociadas a la diabetes tales como retinopatías, hipertensión o alteraciones macrovasculares (Walter y col. 1991) que no muestran una correlación consistente con los niveles de Zn en plasma.

La cingria es una característica de todas estas complicaciones pero no existe, según algunos autores, una correlación significativa con la concentración de glucosa en sangre, proteinuria o el uso de diuréticos.

Golik. y col. (1993) en su estudio sobre el status de zinc en pacientes con diabetes mellitus tipo II y fallos cardiacos congestivos, asumen que la combinación de estas dos enfermedades junto al uso de diuréticos e inhibidores de la enzima transformadora de la angiotensina puede producir una excesiva pérdida renal de zinc y alterar sus niveles en suero.

El-Yazigi y col. (1993) realizaron un estudio sobre el efecto de la diabetes asociada a otros desórdenes, sobre la excreción urinaria de Zn y Mg, observando que en los enfermos diabéticos de todos los tipos, insulino-dependientes y no insulino-dependientes, con o sin alteraciones asociadas a la enfermedad, existía una elevación significativa en la excreción de Zn respecto a los sujetos control, llegando

a la conclusión de que en enfermos diabéticos el Zn está asociado con pérdidas urinarias alta en los mismos. Kumar y col. (1974) afirmaron que la excreción de Zn era aproximadamente el doble a la observada en individuos controles, y aumentaba cuando la diabetes está peor controlada, presentando una relación positiva con el grado de glucosuria. En ausencia de mecanismos compensatorios esta excreción urinaria incrementada contribuye a inducir una deficiencia o una situación marginal de Zn (Ortega y col. 1995).

Los diabéticos tienen mas problemas de cicatrización y, aunque la razón principal del problema no sea la deficiencia de Zn, está claro que también en este sentido, conviene evitar esta deficiencia (Mazzotta y col. 1994).

Algunos de los casos de dermatosis aparecidos en individuos diabéticos pueden ser debidos a una deficiencia de Zn (Bouda y col. 1994).

En ratas adultas con diabetes genética o químicamente inducida por estreptocina se observa una acumulación de Zn en hígado y riñón y la aparición de hipercinuria (King y Keen, 1994). Esta hipercinuria también se observa en humanos con diabetes mellitus tipo I (El-Yazigi y col. 1994) y tipo II (Golik y col. 1993; El-Yazigi y col. 1994) aunque en algunos casos los niveles plasmáticos no se modificaron respecto a los controles (Golik y col. 1993). Sin embargo otros autores hablan de que la hipocinemia es relativamente frecuente en diabéticos no insulino-dependientes (Havivi y col. 1991; Walter y col. 1991; Terrés Martos y col. 1998) e incluso otros hablan de hipercinemia (Maldonado-Martín y col. 1991).

La hipercinuria y la baja absorción de Zn en animales y humanos diabéticos ha originado especulaciones sobre la mayor susceptibilidad de este colectivo de enfermos a presentar una deficiencia en Zn. Sin embargo existe muy poca información sobre el efecto de la diabetes en los mecanismos bioquímicos del transporte intestinal de Zn.

En el estudio realizado por Escobar y col. (1995) se evaluó la absorción del Zn en ratas con diabetes inducida basándose en un modelo de transporte de este

elemento en el cual una proteína intestinal rica en cisteína sirve como transportador intracelular que es inhibido por la metalotionina. Aunque la absorción fraccionada, en tanto por ciento, de Zn y Cu, era mas baja en ratas diabéticas, la absorción neta en $\mu\text{g}/100\text{g}$ de peso corporal/día, era mayor. Esta mayor absorción neta en las ratas diabéticas era contrarrestada por la elevada excrección urinaria, ya que la retención de Zn y Cu era similar en ambos grupos de ratas (diabéticas y no diabéticas).

La baja absorción fraccionada es atribuible al descenso de regulación intestinal del transporte de Zn, como indica la baja absorción de Zn^{65} en los segmentos intestinales aislados de las ratas diabéticas. La baja regulación del transporte intestinal es en parte atribuible a la elevada concentración intestinal de metalotionina, que desencadena una mayor cantidad Zn^{65} en el citosol de la mucosa unido a la metalotionina, una inhibición del transporte de Zn, y una disminución de la proteína intestinal rica en cisteína.

Existen estudios que demuestran la influencia de los radicales libres sobre las complicaciones de la diabetes mellitus. Así, Kakkar y col. (1996) realizaron un trabajo en el que investigaron la correlación entre la peroxidación lipídica y la actividad de

enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa), en la aorta del corazón y sangre de ratas control y ratas con diabetes inducida durante distintos estadios de desarrollo de la diabetes. En el grupo de diabéticas, existía una elevación significativa de la actividad de la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa desde la cuarta semana en adelante mientras que la actividad de la catalasa se incrementaba a lo largo de todo el periodo. En el corazón de las ratas diabéticas la actividad total de la superóxido dismutasa y del Cu-Zn superóxido dismutasa se elevaba significativamente desde la segunda semana en adelante mientras que la actividad de la Mn superoxidodismutasa disminuía a partir de la cuarta semana volviendo a elevarse en la sexta.

Estas investigaciones sugieren que el estrés oxidativo empieza tan pronto como comienza la diabetes y se incrementa progresivamente, y con el los requerimientos de minerales antioxidantes como el Zn.

En términos generales, muchas de las complicaciones comunes a los diabéticos, tales como la enfermedad coronaria, la aterosclerosis y el deterioro isquémico de los tejidos, asociadas con microangiopatía, pueden ser debidas a la existencia de una actividad oxidativa incontrolada (Baynes y col. 1991; Wolf y col. 1987).

La implicación del Zn en la progresión de la diabetes se relaciona principalmente con su papel como antioxidante. El Zn protege a los grupos sulfidrilo frente a la oxidación e inhibe la producción de especies reactivas al oxígeno por parte de los metales de transición pro-oxidantes, probablemente compitiendo con el hierro por los sitios de unión en las membranas celulares y en algunas proteínas (Bettger y col. 1993).

Igualmente existen numerosos trabajos sobre el efecto de la suplementación con Zn en pacientes diabéticos que es muy útil para aumentar la función inmune en estos pacientes (Kajanachumpol y col. 1995; Keen y col. 1990; Niewoehmer y col. 1986).

Faure y col. (1995) indicaron que la deficiencia de Zn en pacientes diabéticos insulino dependientes puede ser corregida mediante una suplementación por este elemento, lo que además disminuye peroxidación lipídica.

Se sabe que el Zn tiene importantes efectos sobre la actividad de la insulina, ya que incrementa la deposición grasa en el cuerpo y la conversión de las hormonas

tiroideas (T4 a T3) (Chen y col. 1991). Estos autores observan que los diabéticos no insulino dependientes tiene unos niveles de Zn sérico inversamente relacionados con los de la hormona tiroidea T3.

Otra de las complicaciones asociadas al padecimiento de la diabetes en las que puede estar implicado el Zn es la *teratogenicidad*, problema mas frecuente en las mujeres diabéticas o con deficiencia en Zn. Aunque el mecanismo responsable no está claro parece que diferencias en la ingesta materna se pueden asociar con diferentes resultados (Uriu-Hare y col. 1989). Los problemas se pueden ver agravados por el hecho de que las mujeres gestantes tienen aumentadas sus necesidades de Zn (Mooradian y col. 1994) y la mayoría no llegan a cubrir las ingestas recomendadas (Ortega y col. 1994). En las ratas diabéticas, durante el embarazo, se produce una disminución de los niveles de Zn, esta deficiencia ha sido asociada a la pobre eficacia reproductiva que conlleva la diabetes (Uriu-Hare y col. 1989).

Recientemente se ha sugerido que la formación de radicales libres mediada por oxígeno está implicada en la alta incidencia de malformaciones fetales que se observan entre los descendientes de gestantes diabéticas (Hagay y col. 1995). Ya que en gestantes diabéticas se encuentran niveles séricos mas bajos de Zn y menor actividad del enzima superóxido dismutasa, al comparar con controles, esto puede facilitar un incremento en la peroxidación lipídica y una falta de mecanismos compensatorios (Saucha y col. 1994). El estudio realizado por Hagay y col. puso de relieve que los niveles elevados de superóxido dismutasa (enzima que contribuye a eliminar los radicales libres) ejerce un efecto protector frente a la embriopatía asociada al padecimiento de diabetes.

9.5. Zn y piel

El Zn tiene efectos significativos sobre el metabolismo del tejido conectivo epitelial. La suplementación oral con sales de Zn se ha extendido popularmente como un remedio para un gran número de alteraciones relacionadas con la piel (Pfeifer, 1978; Bryce Smith y Hodgkinson, 1967). Estos compuestos han sido recomendados específicamente para el tratamiento de eczemas atópicos (Bland, 1983; Davis y Stewart

1987; Franklin y Blair 1988), sin embargo no parece existir ninguna base científica para ésto.

Las lesiones de piel son una consecuencia bastante importante de la deficiencia de Zn, pero estas lesiones normalmente no se parecen a las del eczema atópico (Hambidge, 1981; Weissmann, 1980), sin embargo, es muy frecuente una confusión en el diagnóstico (Munro y col. 1989). Además los estudios más recientes han demostrado niveles normales de Zn en sangre de niños (David y col. 1990; Di toro y col. 1987) y de adultos (Hinks y col. 1987) con eczema atópico.

Es bien sabido que las medidas realizadas en el laboratorio sobre los niveles de Zn en tejidos son unos indicadores imperfectos de la deficiencia de Zn, y se acepta como test definitivo de la deficiencia de Zn la respuesta clínica a la suplementación de Zn (Hambidge, 1981).

Para investigar la posibilidad de que la suplementación de Zn pueda tener un efecto benéfico en el eczema atópico, Ewing y col. (1991) llevan a cabo un estudio controlado con placebo a doble ciego en una terapia oral de Zn. Así en aquellos que recibían una suplementación oral de Zn no se observaba una mejora significativa en la superficie afectada ni disminución del eritema o en otros síntomas tales como alteraciones del sueño o enrojecimiento de la piel.

Por tanto el presente estudio demuestra la no existencia del efecto beneficioso de la suplementación oral con sulfato de cinc durante 8 semanas en una dosis superior a los requerimientos diarios. Así podemos decir que no existe ninguna base racional que avale los efectos beneficiosos de esta suplementación.

Ya en los tiempos de la Grecia antigua se conocían los efectos beneficiosos del metal: los griegos fueron los primeros en aplicar lociones de calamina (CO_3Zn) para curar lesiones cutáneas (Aggot y Harries, 1979). El uso terapéutico del Zn orientado a acelerar el proceso de curación de heridas tiene interés práctico en enfermos deficiarios del catión (Wacker, 1978).

Así por ejemplo la administración de dosis orales de 50mg de SO_4Zn tres veces al día en individuos operados parece tener algún efecto beneficioso sobre el proceso de curación y cicatrización de las heridas e incisiones quirúrgicas (Pories y col. 1967; Underwood, 1977). Sin embargo no se sabe si este es un efecto beneficioso debido *per se* al Zn o sólo se produce en casos de deficiencia de este elemento (Underwood, 1977;

Linder, 1989).

Una nutrición correcta ayuda en la cicatrización de las heridas y esto debe ser tenido en cuenta cuando se somete a un individuo a una intervención quirúrgica, pues de ser correcto su estado nutritivo el tiempo de recuperación y el coste post-quirúrgico será menor. Dado que el Zn, junto con otros nutrientes, intervienen en el proceso de cicatrización, su deficiencia se puede asociar con un perjuicio en este sentido (Mazzotta y col. 1994).

Se ha comprobado que el Zn mejora la cicatrización de las heridas, así en ratas deficitarias se ha observado una disminución de la síntesis de colágeno con la aparición de dermatitis (King y Keen, 1994).

La acrodermatitis enteropática también tiene su origen en una deficiencia de Zn, debido a una alteración de la absorción intestinal y transferencia de este elemento, con un descenso en las concentraciones de Zn en el plasma y suero por debajo de 6 mmol/L (40 mg/dl).

La terapia oral de Zn causa una rápida y completa remisión de los síntomas clínicos y bioquímicos de la acrodermatitis enteropática y tiene que continuarse indefinidamente hasta el normal restablecimiento del estado corporal en este elemento. Las cantidades requeridas de Zn a tal efecto oscilan entre 0.5 y 0.7 mmol/día aunque en el caso de niños pequeños tendrá que iniciarse la terapia con cantidades más bajas.

9.6. Zn y alteraciones hepáticas

La relación entre el estado corporal en Zn y las enfermedades hepáticas se puso de manifiesto por primera vez al demostrar la presencia de este metal en la enzima alcohol deshidrogenasa y glutámico deshidrogenasa, dado su carácter indispensable para la actividad de estas enzimas (Prasad, 1982). De esta forma el Zn se encuentra implicado en la oxidación del etanol y en el metabolismo amoniacal deteriorado, en las enfermedades hepáticas. Este investigador constata que los pacientes con cirrosis hepática alcohólica tenían niveles bajos de Zn en el suero y en el tejido hepático,

conjugados como una excrección urinaria aumentada en éste.

Los pacientes con cirrosis hepática se caracterizan usualmente por hipercincuria y bajas concentraciones corporales de cinc en comparación con los controles y con otros pacientes sin cirrosis (Halsted y col. 1990; Quick, 1993; El Yazigi, 1993). El mecanismo potencial esencial que produce la hipercincuria incluye el cambio de Zn en el plasma a los ligandos que son fácilmente excretados y que inhiben la reabsorción tubular de este elemento (Halsted y col. 1990; McClain y col. 1983). Sin embargo, y aunque la hipocinquemia posee mayor prevalencia en alcohólicos con alteraciones hepáticas (70%) (Halsted y col. 1990), también se ha observado en algunos pacientes sin alteraciones hepáticas (30-50%).

En el curso de la cirrosis etílica se han observado estados nutricionales deficientes y niveles séricos bajos de Zn (Martín-Lagos y col. 1998) situaciones ambas que pueden influir desfavorablemente sobre el sistema inmune (Solis, 1984).

En el trabajo realizado por Koyama y col. (1993) se estudia la posibilidad de que el estado nutricional de Zn pudiese alterar la respuesta individual de los lípidos y las apolipoproteínas al alcohol en hombres de mediana edad que regularmente beben alcohol.

Numerosos estudios han demostrado el efecto beneficioso del tratamiento con Zn sobre cualquiera de los síntomas de esta enfermedad en la que se manifiesta una deficiencia de este mineral (Russell y col. 1980; Herlong y col. 1981; Weissmann y col. 1979; JIchyshyn y col. 1982). Además el tratamiento con este elemento ha sido usado en pacientes con cirrosis producida como consecuencia de la enfermedad de Wilson (Brewer y col. 1983), habiéndose observado una mejora importante (Ramadori y col. 1985) con las distintas formas químicas empleadas en la suplementación. La mas usada en los pacientes con cirrosis fue el sulfato de Zn (Scholmerich y col. 1983; Solomons y col. 1984). Scholmerich y col. (1987) estudiaron la biodisponibilidad del Zn en complejos de Zn histidina 1:2 en pacientes con cirrosis hepática. Además evaluaron la influencia del tiempo de aplicación ya que se ha demostrado que la ingestión simultánea de comida con Zn puede reducir su biodisponibilidad. Los resultados obtenidos demostraron como los pacientes con cirrosis hepática absorbían cantidades relevantes de este elemento administrado como complejos de Zn histidina.

Asímismo no se observaron modificaciones significativas en el Zn sérico cuando

era administrado simultáneamente con la comida o una hora antes o 6 horas después comprobándose además que se necesitan menores dosis del complejo Zn histidina que del sulfato de Zn cuando se usa como suplemento en pacientes con cirrosis hepática.

El consumo de etanol o el daño hepático puede alterar el contenido en el hígado de varios elementos traza entre ellos el Zn. Esta alteración juega un papel muy importante en el avance de la fibrosis hepática. Basándose en este hecho Rodríguez-Moreno y col. (1996) determinaron los niveles de Zn en hígado, suero y orina, en un grupo de alcohólicos cirróticos y no cirróticos con funciones renales normales, comparándolos con un grupo control, observando tras la ejecución del estudio una disminución de los niveles de este elemento en cirróticos conjugados con un incremento en su excreción en orina.

La excreción urinaria de Zn se ha relacionado con la severidad de la cirrosis. También se han encontrado niveles de Zn reducidos en ratas con daño hepático en relación con las sanas (Garduno-Espinosa y col. 1991). Aunque en los seres humanos hay autores que establecen que los niveles séricos de Zn disminuyen en pacientes con afecciones derivadas del alcohol (Nemaia y col. 1991), habiéndose descrito el carácter inductor de la deficiencia de Zn en las enfermedades crónicas a nivel hepático posiblemente por producir alteraciones en el metabolismo de la urea (Capocaccia y col. 1991).

Se ha estudiado la mejoría de las alteraciones hepáticas inducida por diferentes sustancias en humanos, tras la suplementación con Zn debido a la disminución del metabolismo oxidativo a nivel hepático (Barry y col. 1991).

Dado que la expresión teratogénica de la deficiencia de Zn es semejante al síndrome alcohólico fetal, una hipótesis actualmente manejada es que el desarrollo de éste se debe a una deficiencia de este elemento inducida por el alcohol en el embrión (King y Keen, 1994). Por tanto sería recomendable controlar estrechamente el estatus en Zn en las mujeres alcohólicas embarazadas y en sus hijos.

Son múltiples los trabajos de investigación en los que se establece una correlación entre los niveles séricos y hepáticos de Zn y el desarrollo de alteraciones hepáticas. Cao y Chen (1991) realizaron un estudio en ratones sometidos a un programa de ejercicio adecuado controlando que éste aumentaba el metabolismo del Zn, y que la deficiencia de Zn derivada inducía un aumento en la generación de radicales libres y

peroxidación lipídica como consecuencia de un descenso en la actividad de la superóxido dismutasa.

Aunque el ejercicio no tiene un efecto en el nivel de los radicales libre en ratones con dietas de Zn adecuada, podría aumentar la formación del dialdehído malónico mitocondrial en los animales deficientes en este elemento y la deficiencia en Zn eliminaría el aumento de la actividad de la SOD inducida por el ejercicio que se encontró en ratones con una dieta de Zn adecuada. Huang (1991) observó como el contenido en Zn en el tejido hepático en humanos que sufren un carcinoma hepatocelular disminuye, y que la deficiencia en Zn puede conducir a un descenso de la actividad de la SOD.

Muchos autores hablan del efecto protector del Zn frente a afecciones hepáticas inducida por diferentes sustancias, protegiendo contra la peroxidación lipídica inducida por el Cd (Khan y col. 1991) en el hígado de ratones contra la hepatotoxicidad inducida por bromobenceno (Szymanska y col. 1991) y frente al daño hepático inducido por el tratamiento crónico con tetracloruro de carbono en ratas.

9.7. Zn y cáncer

La palabra cáncer se emplea para describir un amplio grupo de enfermedades caracterizadas por un crecimiento incontrolado y proliferación de tejidos anormales (Williams y Dickerson, 1990). Las células malignas no pueden ser bien definidas, aunque se conoce bien lo que las células hacen y como lo hacen, lo realmente desconocido es el por qué.

La actividad anticarcinógena de determinados elementos minerales esenciales para nuestro organismo es junto con las vitaminas, una de los aspectos de mayor interés hoy en día en el campo de la prevención del cancer a través de una adecuada alimentación.

Son numerosos los estudios experimentales que demuestran la actividad anticarcinógena in vitro. Asimismo los estudios epidemiológicos realizados en diferentes países del mundo por distintos autores, establecen la existencia de una cierta relación entre el consumo de determinados alimentos que contienen a estos minerales

con una menor incidencia de diferentes tipos de cáncer.

Los estudios mas recientes se estan centrando en el significado biológico de estos elementos traza en las tumores malignos. En estas investigaciones se ha observado una asociación entre concentraciones anormales de estos elementos traza y el diagnóstico precoz de tumores malignos, crecimiento celular, glicolisis anaerobia y concentraciones de ácidos nucleicos en tumores tisulares (Danks y col. 1988; Gray y col. 1987; Rizk y col. 1984).

Existen diversas publicaciones en torno a los niveles de Cu y Zn en el suero de pacientes con tumores, sin embargo existen pocas investigaciones que midan las concentraciones de estos elementos traza en tejidos (Canelas y col. 1968; Kaiser y col. 1980).

Yoshida y col. (1993) llevaron a cabo un análisis cuantitativo del Cu, Zn, y la relación Cu/Zn en tumores cerebrales humanos seleccionados. Llegando a la conclusión de que en los *gliomas* malignos existe una elevación significativa de la relación Cu/Zn en los tejidos.

En las neoplasias existen, asimismo, datos contradictorios, si bien en la mayoría de los trabajos se encuentra un descenso de los niveles plasmáticos y séricos de Zn (Martín-Lagos y col. 1998) que se relaciona con el avance de la enfermedad. Actualmente se ha señalado un efecto protector del Zn frente al cáncer, probablemente por su relación con la vitamina A, al activar este elemento la movilidad de esta desde el hígado, por su implicación en la protección frente a los radicales libres y por lo tanto frente a los procesos cancerígenos (Scy y col. 1991; Burke y col. 1985; Carmena y col. 1986; Mellow y col. 1983). Por lo tanto los bajos niveles periféricos de Zn no pueden ser considerados promotores del cáncer propiamente dichos sino mas bien suponen un descenso de los mecanismos de defensa del organismo durante el desarrollo de los disturbios nutricionales y metabólicos, y procesos de inflamación relacionados con el cáncer (Halvy y col. 1993).

Los estudios experimentales en roedores han demostrado el efecto inhibitorio de este elemento en el crecimiento de tumores inducidos químicamente, cuando se administran dietas deficitarias en Zn (Radiffe y col. 1987).

Ciertos estudios epidemiológicos de casos control no han encontrado diferencias significativas entre los niveles de Zn en suero de pacientes con cancer y el grupo control

(Haines y col. 1983; Gorodetsky y col. 1985). Sin embargo Mellow y col. (1983) observaron unos niveles medios de este elemento significativamente menores en pacientes con cancer de esófago que los hallados en el grupo control. Recientemente otros autores señalan un efecto protector del Zn frente al riesgo de padecer cáncer, cuando su concentración está elevada (Kok y cols. 1988), puesto que los niveles medios de este elemento en plasma, se encuentran disminuidos en pacientes con cáncer (Carmena y col. 1986; Mellow y col. 1983).

Leung y col. (1997) determinaron los niveles de Zn entre otros elementos traza en el pelo de voluntarios que sufren un cáncer nasofaríngeo y observan que las concentraciones de Zn, Cu, Mn y Co en el grupo de voluntarios con cáncer nasofaríngeo son menores que en individuos sanos. Estos resultados también demuestran que la diferencia entre los niveles de elementos traza entre el grupo de individuos sanos y los individuos con cáncer, disminuye al mismo tiempo que se incrementa el tratamiento lo que significaría un efecto beneficioso.

Hsu-Hy y col. (1994) también centran sus investigaciones en torno al cáncer nasofaríngeo.

Estudios realizados por Kirkpatrick y col. (1994) han demostrado que si a la ingesta de Zn desde los alimentos se asocia la suplementación mineral de este elemento se produce un descenso del riesgo de padecer melanoma.

Igualmente se han llevado a cabo múltiples trabajos sobre la determinación de los niveles de Zn en los distintos tejidos donde se desarrolla el cáncer considerado, y su correlación estadística con respecto a los sujetos sanos. Los resultados obtenidos son contradictorios, de una parte se han encontrado concentraciones de Zn superiores en los tejidos cancerosos frente a sus homólogos (correspondientes a los sujetos sanos), tal como pone de manifiesto en cáncer de laringe y en los tejidos adyacentes libres de cáncer (Darak y col. 1994), de cerebro en caso de carcinomas con metastasis ($84,97 \pm 11,6$ en enfermos por $48,57 \pm 4,06$ en controles sanos) (Yoshida y col. 1993). Otros autores por el contrario han determinado concentraciones histológicas inferiores en sujetos cancerígenos que en sujetos sanos, por ejemplo en cáncer de próstata (Picureli y col. 1991), de pulmón (Aldachi y col 1991), de riñón (tanto en la médula como en el cortex) (Hardell y col. 1994).

Lekili y col. (1991) concluyeron tras un tratamiento terapéutico del cáncer de

próstata en ciertos sujetos, que éste modificaba los niveles de Zn en plasma, y que por tanto, las concentraciones de este pueden ser un índice válido para el diagnóstico y terapia del carcinoma prostático.

Mei y col. (1991), teniendo en cuenta que el Zn sérico se encuentra normalmente disminuido en pacientes con cáncer y que la deficiencia de Zn puede reducir la función de las células T, de los granulocitos y de las células asesinas, establecieron que el Zn junto con el Se son buenos instrumentos para el restablecimiento de la inmuno competencia disminuída en pacientes cancerígenos.

En su interacción con otros elementos, es de destacar la establecida con el Cd, de forma que parece ser que una deficiencia dietética de Zn causa un incremento generalizado de los efectos tóxicos del Cd, y por tanto del potencial cancerígeno de este último como se ha observado en ratas macho Wistar (Waalkes y col. 1991).

9.8. Zn y sistema inmune

Debido a las funciones que desempeña el Zn en la respuesta inmunitaria, la administración de dosis farmacológicas de este elemento a pacientes con un deficit severo previo produce una mejora sustancial de la función inmunitaria (Allen y col. 1985). Algunos autores incluso concluyen que este efecto puede observarse también en personas sin carencia previa de este metal (Castillo-Durán y col. 1987; Wagner y col. 1983), pero todavía existen importantes discrepancias al respecto (Bogden y col. 1988).

En los pacientes que padecen la enfermedad de las células falciformes, se han observado la aparición de trastornos del sistema inmunitario mediados por células (Ballester y Prasad, 1982). Esta manifestación se revierte administrando suplementos de Zn, lo que sugiere un efecto de este sobre la función de los linfocitos dependientes del timo.

Prasad y col. 1995; en sus estudios llegan a la conclusión de que en los grupos suplementados con Zn se da una respuesta inmune humoral mas fuerte que en los no suplementados probablemente debido al efecto beneficioso de Zn en la interacción entre las células T y las células B.

Kajanachumpol y col. (1995) en un estudio sobre la suplementación con Zn en los pacientes con diabetes mellitus, observan que la suplementación con este mineral en estos pacientes produce un aumento del estatus inmune en los mismos.

En 1987, Rodríguez y col. estudiaron en un grupo de individuos con cirrosis hepática la concentración de linfocitos totales T entre otros y su relación con el estado de desnutrición y las tasas séricas de Zn, observándose una disminución de los niveles séricos de este elemento altamente significativa con los linfocitos T, lo que implica que el Zn representa un factor no único pero sí de gran importancia en la aparición de estas alteraciones inmunitarias, sobre todo teniendo en cuenta que es esencial para la correcta maduración de los linfocitos T. De hecho, su carencia puede producir una disminución de las defensas inmunitarias frente al cáncer (Jurado y Chacón, 1990).

Existen también diversas publicaciones en torno al efecto de la suplementación de Zn en ancianos sanos y su influencia en la respuesta inmune. Esto puede deberse a que, como es sabido, la edad viene asociada con cierta asiduidad con dificultades en la respuesta inmune y al incremento de muertes relacionadas con infecciones.

En 1992, Chandra lleva a cabo un estudio sobre el efecto de cantidades fisiológicas de vitaminas y elementos traza en la inmunocompetencia y en la frecuencia de infecciones asociadas a una enfermedad. Se observa que los sujetos del grupo suplementado tenían un mayor número de células T y de células asesinas, que aumenta la respuesta de proliferación a la mitogenia, incrementa la producción de interleukina-2, y aumenta la respuesta de los anticuerpos y la actividad de las células asesinas. Por tanto podemos decir que la suplementación con modestas cantidades fisiológicas de micronutrientes mejora la respuesta inmune y disminuye el riesgo de infección con la edad.

De otra parte dosis excesivas de Zn parecen tener un efecto negativo sobre la estimulación y activación de los leucocitos, siendo capaz de alterar la respuesta del organismo a agresiones externas como las infecciones bacterianas (Valtueña Marling, 1994).

También se ha visto que dosis farmacológicas de Zn administradas a individuos sanos cuyo estado nutricional es correcto tiene justamente el efecto contrario, es decir, comportan alteraciones de la función y respuesta inmunitarias como son una reducción de la respuesta linfocítica a la estimulación con fitohemaglutinina (PHA), disminución de la respuesta migratoria de los polimorfonucleares a la quimiotaxis y alteración de la fagocitosis, entre otros (Chandra y col. 1984).

Todos estos parámetros parecen recuperarse y alcanzar valores basales semanas después de suspender el tratamiento. Algún estudio parece haber encontrado algún ligero incremento en la respuesta de los linfocitos T a la PHA al inicio de la administración de suplementos, pero lo más probable es que esta observación sea un reflejo del conocido potencial mitogénico del Zn (Cunningham-Rundles y col. 1981) ya que este índice disminuye con el tiempo de tratamiento, como se acaba de decir.

Los mecanismos por los que se producen estas anormalidades inmunológicas no son del todo conocidos, pero es posible que los cambios anteriormente comentados en los niveles plasmáticos absolutos y relativos de las lipoproteínas plasmáticas durante la administración de Zn contribuya de alguna manera. Chandra y col. (1984) sugieren que un aumento de los niveles séricos LDL-colesterol, particularmente si se acompaña de un cambio sustancial en la composición lipídica de las membranas celulares, podría estar implicado en la disfunción de linfocitos y polimorfos nucleares observada durante la suplementación con Zn, ya que observó una correlación negativa entre la cantidad de LDL asociada a la membrana celular de linfocitos en cultivo y la cantidad de calcio acumulada durante el proceso de prerreplicación inducida por la PHA. Es, decir a mayor cantidad de Zn en el medio de cultivo, mayor es la cantidad de LDL unida a la membrana de los linfocitos y menor el acúmulo de calcio necesario para la activación del proceso de prerreplicación.

En definitiva, el Zn es un mineral esencial con un gran poder mitogénico cuya presencia es esencial para el normal funcionamiento del sistema inmunitario, pero dosis excesivas parecen tener un efecto negativo sobre la estimulación y activación de los leucocitos capaz de alterar la respuesta del organismo a agresiones externas como las infecciones bacterianas.

Existe también un interés potencial del Zn para el tratamiento de los resfriados. Hasta ahora 7 estudios controlados habían evaluado el interés del Zn en el tratamiento

de los resfriados. Tres de ellos habían demostrado un efecto positivo del Zn en el alivio de los síntomas y la duración de la enfermedad, mientras que los otros cuatro habían establecido la ineficacia del Zn para esta indicación.

Recientemente se han publicado los resultados de un nuevo estudio con 100 pacientes. 50 pacientes recibieron pastillas de gluconato de Zn (=13,3 mg de Zn por pastilla), los otros recibieron un placebo. Todos debían chupar una pastilla cada 2 horas hasta la desaparición de los síntomas (tos, cefaleas, afonías, dolor de garganta, rinorrea, estornudos, temperatura bucal mayor de 37,7°C). Según el análisis de los resultados, la toma de Zn supuso un alivio de los síntomas y redujo la duración de la enfermedad a casi la mitad; 39 pacientes del grupo tratado se quejaron del mal sabor de las pastillas contra 15 en el grupo placebo. El principal efecto adverso atribuible al Zn fueron las náuseas.

Según los autores, la toma de Zn a altas dosis y a corta plazo, podría tener un efecto favorable sobre la evolución de los resfriados. Se desconoce el mecanismo de acción del Zn para esta indicación y dada su compleja actividad biológica, se desaconseja su uso a largo plazo. (Arzneimittelbrief, 1997).

9.9. El Zn y enfermedades cardiovasculares

Powel y col. (1994) establecen tras un estudio realizado en corazones de ratas que el Zn posee capacidad protectora de las células cardíacas y que puede disminuir la formación de radicales hidroxilo por afectación de la actividad del Cu.

Los estudios epidemiológicos de casos control realizados en seres humanos han determinado resultados contradictorios en cuanto a los niveles séricos y plasmáticos de Zn y su correlación con la incidencia de las enfermedades cardiovasculares, si bien la mayoría de los trabajos encuentran un descenso de dichos niveles. Otros investigadores establecen la no existencia de diferencias significativas entre los niveles séricos de Zn en los individuos humanos que presentan una mayor posibilidad de padecer enfermedades cardiovasculares y los del grupo control en un estudio realizado en trabajadores de centros industriales de SlovaKia (Magolova y col. 1994), aunque establecen la relación positiva entre el Zn sérico y el HDL-colesterol en los hombres.

Underwood (1977) y Oberleas (1971) entre otros postulan que las enfermedades arterioscleróticas pueden ser tratadas con Zn, en pacientes con hipertensión, obteniéndose resultados favorables, sugiriéndose que el Zn puede aumentar el volumen sanguíneo de los vasos dañados que tengan un riesgo arterial restringido.

Se ha puesto de manifiesto con ratas deficientes en Zn, ratas con ingesta limitada y ratas controles alimentadas *ad libitum*, alteraciones significativas en la composición lipídica y apolipoproteica de HDL causadas por la deficiencia de Zn y no deducibles de la baja ingesta de comida (Koo, 1987).

La deficiencia en Zn producía efectos marcados en los contenidos de HDL (Koo, 1988). Estos cambios pueden influir significativamente en el transporte y metabolización del colesterol y podría ser la explicación de la alteración producida en la homeostasis del colesterol con la deficiencia en Zn.

Otros autores han sugerido también los efectos que tiene el Zn en la enfermedad coronaria. Así, Blak (1988) realiza el seguimiento de un grupo de población al que se les administra un suplemento de Zn. Los resultados obtenidos son similares a los descritos anteriormente por Hooper (1980), observándose una disminución del HDL-Colesterol plasmática y un aumento del índice aterogénico (HDL:LDL) en los grupos tratados. Algunos autores encuentran incluso un aumento significativo de las LDL plasmáticas en situaciones similares a las de este estudio con lo que el incremento del índice de riesgo aterogénico es todavía mayor. Falta aún por demostrar de una manera concluyente que la disminución del HDL-colesterol se deba a la administración de Zn y que incrementa efectivamente el riesgo de padecer una enfermedad coronaria (Magolova, 1994).

En la tabla 4 se recogen los resultados y las relaciones significativas o no significativas obtenidas durante estudios epidemiológicos con casos control, por diferentes autores en distintos países del mundo. Los resultados reflejan las correlaciones estadísticas entre los niveles séricos o plasmáticos de Zn en sujetos con determinadas enfermedades cardiovasculares de referencia y los sujetos sanos constituyentes del grupo control.

Tabla 4. Correlación estadística de los niveles séricos o plasmáticos de Zn en sujetos sanos y en los que sufren de afecciones cardiovasculares.

REFERENCIA	ZONA / PAIS	GRUPO	SIGNIFICANCIA
Govindaraju y col., 1993	India	Controles sanos Reumatismo crónico en corazón	SS SS/Inferior
Dementeva y col., 1993	Rusia	Isquemia cardíaca Isquemia con fallo cardíaco	SS SS/Inferior
Magalova y col., 1994	Slovakia	Controles sanos Cardiopatía	NS NS
Oster, 1993	Alemania	Controles sanos Cardiopatía difusa	SS SS/Inferior

Otros autores (Coudray y col. 1991) determinan en ratas, como la combinación de la deficiencia en Zn, provocada experimentalmente en estos animales a través de la dieta, con la administración conjunta de etanol de forma crónica poseen efectos muy dañinos, especialmente sobre la peroxidación lipídica y la función contráctil del corazón aislado y perfundido y en condiciones de preischemia. Dorup y Klausen (1991) observan como al mantener a las ratas con piensos deficientes en Zn se produce un descenso de la incorporación de leucina en el músculo cardíaco, cifrado entre un 57-64% al compararlo con los controles alimentados adecuadamente por lo que colabora en la disminución del crecimiento y de la síntesis proteica.

Faure y col. (1991) también observan un importante aumento en la fracción lipoproteica VLDL, HDL y LDL, debido a un aumento previo en el colesterol y los fosfolípidos al someter unos animales experimentales (ratas) a deficiencias agudas en Zn. Estos resultados confirman que en la deficiencia en este elemento, la fragilidad de las lipoproteínas es un factor agravante en la peroxidación y en la dislipoproteinemia que pueden conducir a un mayor riesgo aterogénico.

También, y en relación con lo expresado por otros investigadores (Govindaraju y col. 1993; Dementeva y col. 1993), López y col. (1991) establecen que las alteraciones cardiovasculares en humanos parece ser que disminuyen los niveles séricos de Zn, aunque la hipertensión se cree que los incrementa. En el curso de su investigación

también relacionan los niveles séricos de Zn aumentados con la obesidad así como con la glicemia.

No así, Chen y col. (1991) postulan lo contrario de forma que los obesos tienen menores niveles sanguíneos de Zn que los controles, lo cual establece la clara controversia todavía existente en esta materia.

10. Técnica analítica de determinación de Zn

La necesidad actual de cuantificación de los niveles de Zn como elemento esencial para el organismo humano, al constituir un componente esencial de gran cantidad de sistemas enzimáticos ha suscitado un considerable interés en la puesta a punto de técnicas analíticas altamente sensibles y selectivas, existiendo en la actualidad una gran variedad de ellas. El uso de una u otra depende del tipo de muestra a analizar, del número y de los recursos económicos e instrumentales del laboratorio. Los principales objetivos a conseguir son disminuir el límite de detección, incrementar la sensibilidad, facilitar el análisis multielemental y estudios de especiación y acoplar métodos de inyección de flujo que simplifiquen el análisis. Además es preciso tener en cuenta que la técnica sea realizable, rápida, de bajo coste y fácilmente aplicable en laboratorios de control de calidad. Sin embargo hay que considerar que en muchas ocasiones, los tratamientos previos de la muestra pueden resultar una etapa crítica. Las tendencias actuales en este sentido en química analítica están dirigidas hacia una disminución al máximo posible tanto del número de reactivos como de tratamientos previos de la misma a fin de aumentar la versatilidad del análisis y disminuir su manipulación, evitando de esta forma riesgos de pérdidas del analito y contaminaciones de la muestra problema.

Las técnicas mas utilizadas actualmente en la determinación de este elemento en muestras biológicas son las que a continuación se relacionan:

◆ **Técnicas electroquímicas**, donde se incluyen la amperometría, potenciometría, cronopotenciometría, polarografía y polarografía inversa (ASV).

◆ **Técnicas cromatográficas**, que acoge a la cromatografía de gases (GC), Líquida de alta resolución (HPLC) y de intercambio iónico.

◆ **Técnicas espectroscópicas**, que incluyen:

- Espectrofotometría ultravioleta - visible.
- Análisis de fluorescencia de rayos-X (XRF).
- Análisis por activación neutrónica (NAA).
- Espectroscopía atómica que a su vez se divide en:
 - * Espectroscopía de absorción atómica (AAS)
 - con atomización en llama (FAAS).
 - con atomización electrotérmica (ETA-AAS ó GF-AAS).
 - * Espectroscopía de emisión atómica.
 - * Espectroscopía de fluorescencia atómica.

De estos métodos analíticos los que han adquirido mayor relevancia para determinar Zn en muestras biológicas han sido las técnicas espectrofotométricas ultravioleta - visible y mas aún las espectroscópicas atómicas en todas sus variantes (Reilly, 1980; Ximenez-Herraiz, 1980; Skoog y West, 1984; AOAC, 1993).

10.1. Espectroscopía atómica

La relevancia que posee actualmente la espectroscopía atómica se debe a su gran versatilidad, ya que son muchos los campos de aplicación y numerosos los elementos que pueden ser cuantificados de forma directa. Se basa en la medida de la absorción, emisión o fluorescencia de la radiación electromagnética, proporcionada por átomos o iones elementales en un medio gaseoso. Es por esto que existen tres tipos de espectros posibles:

* **Espectros de absorción**: se producen cuando átomos que se encuentran en el estado fundamental, absorben su radiación característica con una determinada longitud de onda, pasando a estados superiores de energía, midiéndose la cantidad de radiación absorbida.

* **Espectros de emisión**, donde tras una excitación previa de la muestra se mide la emisión de la radiación correspondiente a transiciones de los átomos desde los niveles de energía excitados a niveles mas bajos. Las líneas de resonancia corresponden a transiciones que incluyen el estado fundamental.

* **Espectros de fluorescencia**: se producen cuando la radiación absorbida de una determinada frecuencia por los átomos en el estado fundamental, es parcialmente remitida al retornar los átomos a su estado inicial, con emisión de energía de fluorescencia de la misma o menor frecuencia.

Así, en unas determinadas condiciones, la intensidad de la línea de emisión, la absorbancia o la intensidad de fluorescencia son proporcionales a la concentración del analito, aquí el Zn, en la muestra original (Ximenez-Herraiz, 1980; Skoog y West, 1984).

No hay que olvidar que en las determinaciones espectroscópicas atómicas existen toda una gama de interferencias distintas que se agrupan de la siguiente forma:

⇒ Comunes a las tres técnicas: espectrales (sobre todo en emisión), físicas, químicas y variaciones de la temperatura en la célula de atomización.

⇒ Comunes a la absorción y fluorescencia atómica: dispersión de la luz incidente (scattering) que se suele corregir mediante el empleo de correctores de fondo como el arco de deuterio.

⇒ Típicas de la fluorescencia atómica: amortiguamiento de la intensidad de fluorescencia (quenching) que se suele solucionar evitando la llama y que se debe a la mezcla de diferentes compuestos en la llama.

Analíticamente, la principal ventaja de la fluorescencia atómica sobre la emisión, es que depende de las propiedades de los átomos en estado fundamental y no de los estados excitados de estos. En los métodos de absorción y emisión atómica se evapora rápidamente, una solución del analito a temperatura elevada hasta la obtención de átomos o iones elementales gaseosos. La eficacia y reproducibilidad de la fase de atomización determina en gran medida, la sensibilidad, precisión y exactitud, por lo que es la

atomización el paso crítico fundamental de la espectroscopía atómica.

No obstante, en general las tres modalidades presentan ventajas importantes tales como su amplia aplicabilidad a un elevado número de elementos, rapidez, facilidad de análisis, elevada selectividad (Skoog y West, 1988) y la multitud de campos de aplicación.

Sin embargo, hay que enumerar las dos grandes limitaciones comunes a la vez a todos los métodos de absorción atómica (Willard y col. 1991) tales como:

⇒ Su limitada capacidad para distinguir entre estados de oxidación diferentes y ambientes químicos de los elementos del analito.

⇒ Su insensibilidad a los elementos metálicos.

Las principales diferencias entre espectroscopia atómica y molecular ordinaria, radican en la fuente de radiación, en el recipiente para la muestra, y en la necesidad de restar el espectro de emisión de la llama a la señal observada (Harris y col. 1992).

A. Espectroscopía de absorción atómica

Es la técnica que ha sufrido un mayor desarrollo comercial, por su gran sensibilidad, fácil eliminación de interferencias y rapidez. Así, es una técnica muy sensible ya que el límite de detección depende de la fracción de Zn disponible que pueda interponerse en la fuente de radiación, y que si en el caso de la llama puede resultar muy pequeña, sin llama es muy elevada puesto que prácticamente la totalidad del elemento resulta efectiva.

Es la técnica más ampliamente empleada según se desprende de la bibliografía consultada y la recomendada por organismos internacionales (AOAC, 1993) entre los métodos analíticos oficiales para la investigación de este elemento así como para la validación durante la certificación de materiales de referencia estando hoy día a la vanguardia junto con MS-ICP y con la HPLC (sobre todo en técnicas de especiación) en el análisis de ultratrazas.

A.1. Espectroscopía de absorción atómica con atomización a la llama (FAAS).

Su uso para determinar los niveles de Zn en muestras biológicas aún continua siendo extenso a pesar de que los límites de detección alcanzados no son muy bajos. Es por esto que es la técnica oficial recomendada para la determinación de Zn (Fidanza, 1991) puesto que la concentración de este elemento es suficientemente elevada, de forma que la sensibilidad analítica no es un gran problema y resulta suficiente.

En la Tabla 5 se recogen toda una serie de estudios realizados en los últimos años acerca de la determinación de Zn en muestras biológicas, mediante la técnica de FAAS, como indicador del estatus en este elemento en seres humanos.

Hay que considerar que la mayoría de los procedimientos de cuantificación requieren una disolución del analito y una mineralización previa. Por tanto, en la tabla 5 se recogen los procedimientos específicos empleados por cada uno de los distintos autores para la mineralización de la muestra y su preparación para el análisis mediante FAAS.

Tabla 5.- Relación de publicaciones referentes a la determinación de Zn como indicador del estatus en este elemento en seres humanos, mediante FAAS.

REFERENCIAS	TRATAMIENTO	Zn ($\mu\text{mol/L}$)	INDIVIDUOS	MUESTRAS
Stepnick Gropper y col. 1988	Aspiración directa	11.5 \pm 0.9	Controles	Suero
		13.3 \pm 1.5	fenilcetonúricos	Suero
Deuster y col. 1989	Dilución 1:2 con agua desionizada	10.1-23.2	Muy entrenados	Plasma
		11.1-27.3	No entrenados	Plasma
Lukaski y col. 1990	Dilución con HCl 2%	13.5 \pm 0.6	Mujeres control	Plasma
		12.7 \pm 0.5	Mujeres nadadoras	Plasma
		13.4 \pm 0.4	Hombres control	Plasma
		13.7 \pm 0.5	Hombres nadadores	Plasma
Udamkesmalee y col. 1990	-	10.2 \pm 1.85	Escolares sanos	Suero
Wisker y col. 1991 ^a	Disolución de cenizas con 0.4 mL HNO ₃ y final dilución con agua desionizada	20.4 \pm 0.4	Dieta baja fibra	Suero
		20.8 \pm 0.7	Dieta alta fibra-alta proteína	Suero
		19.2 \pm 0.7	Dieta alta fibra-baja proteína	Suero
Ruz y col. 1991	-	-	Hombres adultos	Plasma
Hunt y col. 1992	Digestión húmeda y aspiración en llama	11.2-13.8	Hombres juvenes	Plasma
Srikumar y col. 1992 ^a	Dilución con agua desionizada 1:5	16.6 \pm 2.9	Dieta mixta	Plasma
		14.4 \pm 2.5	Dieta lactovegetariana	Plasma

REFERENCIAS	TRATAMIENTO	Zn ($\mu\text{mol/L}$)	INDIVIDUOS	MUESTRAS
Couzy y col. 1993	Digestión húmeda con HNO_3 14.4M en un sistema de baja presión	13.6 \pm 2.1 13.2 \pm 1.8	Jóvenes Ancianos	Suero Suero
King y col. 1994 ^a	Dilución 1:5 con agua desionizada y aspiración directa	11.5 \pm 0.6	Mujeres premenopáusicas	Plasma
Wolfe y col. 1994	Digestión hasta cenizas y resuspensión en HCl 0.125N	10.7	Adolescentes con 36 semanas de gestación	Plasma
Kauwell y col. 1995	-	12.5 \pm 1.4	Sujetos sanos	Plasma

Dentro de ellos, hay métodos en los que se lleva a cabo una aspiración directa del suero en la llama (Stepnick Gropper y col. 1988), otros realizan una dilución previa del suero mediante agua desionizada en proporción (1:2) (Deuster y col. 1989) o (1:5) (Srikumar y col. 1992; Kingetal, 1994), incluso otros proponen métodos semejantes al aplicado en la presente memoria en los que tras una mineralización previa de la muestra vía húmeda con HNO_3 14.4M (Couzy y col. 1993) u otros ácidos (Hunt y col. 1992) realizan una dilución final con agua desionizada para finalmente aspirar la muestra en la llama y llevar a cabo la determinación de la concentración del Zn en la muestra considerada.

Para determinar los niveles de Zn en las muestras de suero, una vez mineralizadas y sometidas a digestión, se aspiran directamente de la disolución analítica con el analito disuelto en la llama de aire-acetileno del espectrofotómetro. Esta llama facilita la atomización de los compuestos que poseen Zn en la matriz biológica, átomos de Zn en el estado fundamental que se sitúan por encima de la cabeza del mechero, y que pasan a un estado excitado al realizar la absorción de parte de la radiación de la lámpara de cátodo hueco de Zn, proporcionalmente a la concentración de analito en la muestra considerada.

A.2. Espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETA-AAS) u horno de grafito (GF-AAS).

Esta técnica se basa en la evaporación de unos microlitros de muestra de suero a baja temperatura en un atomizador electrotérmico, para posteriormente ser calcinados a temperatura superior. A continuación, la corriente se incrementa rápidamente elevándose la temperatura por encima de los 2000°C, produciéndose la atomización de la muestra en un corto período de tiempo (ms a s), y se mide la absorbancia de los átomos en la región inmediatamente superior al conductor calentado.

Se emplean distintos tipos de hornos calentados electrotérmicamente, si bien los más utilizados son del tipo horno de grafito (o de grafito pirolítico), donde la energía requerida se obtiene aplicando una corriente eléctrica a través del tubo de grafito hueco en el que se sitúa previamente la muestra (Beatty, 1979). Así, la radiación procedente de la fuente, pasa por el tubo donde el vapor atómico generado por la muestra absorberá dicha radiación. Uno de los avances introducidos en este sistema de atomización ha sido la inclusión de la plataforma de L'Vov en los tubos de grafito pirolizados lo que ha supuesto una demora de la volatilización y atomización hasta que el interior del tubo alcanza la temperatura de equilibrio adecuada (sistema SFPE, "Stabilized Temperature Platform Furnace").

Las ventajas más relevantes de la ETA-AAS (Willard y col. 1991) son su alta sensibilidad, capacidad para manejar pequeños volúmenes de muestras líquidas, posibilidad de analizar muestras sólidas directamente sin pretratamiento y el bajo ruido del horno. Desventajas son su baja precisión y su dificultad de empleo. Las interferencias más comunes que se suelen dar en esta técnica son las de matriz y las de absorción de fondo. La primera se produce porque a veces la temperatura necesaria para calcinar la matriz de la muestra, que es el medio que contiene el analito, también ocasiona la evaporación del analito. De este modo, la adición de modificadores de matriz apropiados puede retardar dicha evaporación hasta que la matriz se haya calcinado por completo (Harris y col. 1992). Así pues, Wagley y col. (1989) emplearon una muestra de 0.5% Mg (NO₃)₂ × 6H₂O + 0.5% NH₄H₂PO₄ + 3% Triton X - 100 en la determinación directa de Zn en leche y leche en polvo, para así formar compuestos de Zn estables, alcanzando unos límites de detección de 1700 ng/g (para el método de muestreo del sólido directamente) y de 2300 ng/g (para el método de los "slurries" o papillas).

Para corregir el ruido de fondo en la radiación emitida por las lámparas de cátodo hueco (Willard y col. 1991), se ha usado tanto el efecto Zeeman como la corrección de fondo en continuo. Este último fue el empleado por Dawson y col. (1989) en la evaluación de los cambios de los niveles séricos de Zn debidos a la suplementación por hierro durante el embarazo en quinceañeras obteniéndose resultados en el estudio del porcentaje de recuperación del $98\pm 2\%$. El-Yazigi y col. (1993) también usaron el ETA-AAS con corrector de fondo de deuterio en la evaluación de los niveles de Zn en orina en individuos diabéticos. Sin embargo, hay que tener en cuenta la superior capacidad de corrección del fondo del efecto Zeeman que del corrector continuo, por lo que si la dilución previa de la muestra no es suficientemente alta, de forma que los efectos de la matriz sean insignificante, y puedan ser determinados los elementos fácilmente mediante la GF-AAS convencional con un corrector de fondo de deuterio, se recomienda el empleo del efecto Zeeman (Subramanian, 1988).

10.2. Métodos para la determinación de elementos minerales en leches

La mayor parte de los procesos analíticos para la determinación de los elementos minerales son laboriosos (Juarez Iglesias y col. 1978), a pesar de lo cual es importante disponer de métodos sencillos y rápidos cuando es necesario analizar un número elevado de muestras, o bien cuando los análisis se realizan en el ámbito del control de calidad, y más expresamente del control de procesos.

A. Pretratamiento de las muestras

Uno de los principales problemas que plantea la determinación de minerales es la eliminación de la materia orgánica, etapa que puede ser fuente importante de contaminaciones y pérdidas que afectan a la validez de resultados (Laurent, 1981).

En el caso de la leche, y de la mayoría de los alimentos, el contenido mineral es bajo respecto a las materias orgánicas, por lo que la elección del método de mineralización es fundamental (Pomeranz y Meloan, 1994). Los factores que van a determinar dicha elección son:

- Las caseínas de la leche, que son muy difíciles de incinerar correctamente, por lo que han de mineralizarse en medio ácido.

- Si se quieren determinar elementos minoritarios hay que evitar de modo especial las pérdidas que se producirían con la incineración; en cambio, este procedimiento en principio, es mas cómodo para los elementos mayoritarios.
- Los riesgos de contaminación aumentan al incrementarse el número de reactivos y las transferencias entre recipientes necesarios, por lo que en las mineralizaciones por vía húmeda se deben utilizar volúmenes lo mas pequeños posible, siempre que lo permita la homogeneidad de la muestra y la sensibilidad del método (Amaro López y col. 1996).
- El tiempo es un factor importante a considerar ya que el procedimiento ideal de mineralización ha de ser rápido, fiable y ha de prestarse a una realización en serie (Laurent, 1981).

Jiménez y col. (1984), dividen los métodos de pretratamiento de la muestra en cinco grupos principales:

- * Los que implican la destrucción de la materia orgánica del alimento por vía húmeda (digestión).
- * Métodos de incineración por vía seca, que son junto con los anteriores los mas utilizados.
- * Obtención de filtrados libres de proteínas.
- * No destrucción o solo parcial de la materia orgánica.
- * Métodos híbridos entre los anteriores.

Mineralización por vía húmeda: digestión

Se fundamenta en la acción oxidante de ácidos fuertes, como los ácidos nítrico, sulfúrico y perclórico, solos o combinados entre sí con peróxido de hidrógeno. (Laurent, 1981).

La técnica mas utilizada a nivel mundial es la digestión en placa calefactora consistente en introducir la muestra en un vaso y cubrirla con un vidrio de reloj para evitar contaminaciones, aunque esto se obvie frecuentemente. Se trata en definitiva de un proceso simple y facil de controlar.

Objetivos

El Zn es un micronutriente esencial para el organismo animal y por tanto humano, siendo activador de numerosas enzimas. Se encuentra implicado en múltiples funciones biológicas: a nivel del páncreas se relaciona con el almacenamiento de insulina y sobre la piel estimula la síntesis de colágeno en la regeneración de heridas (Wacker, 1978). Además en el organismo tiene un importante papel en el sistema inmunitario (Jurado Chacón y col. 1990). Su carencia puede dar lugar a una disminución de las defensas inmunitarias frente al cáncer (Jurado Chacón y col. 1990).

Diferentes estudios epidemiológicos realizados indican su correlación con diferentes patologías y con diferentes tipos de cáncer (Yucel y col. 1994), enfermedades cardiovasculares (Govindaraju y col. 1993), cirrosis hepática (Capocaccia y col. 1991) y diabetes (El-Yazigi y col. 1993).

El Zn es por tanto un elemento esencial por sus muchas funciones metabólicas. Aunque sus ingestas recomendadas han sido establecidas (National Research Council, 1989) en un valor de 15 mg/día en el hombre y 12 mg/día en la mujer, y las cantidades de Zn en la dieta aparentemente son suficientes para una buena salud en la mayoría de los individuos, los requerimientos en este elemento así como los métodos para su determinación continúan siendo intensamente estudiados (Johnson y col. 1993). Por otro lado dada la capacidad del organismo para realizar ajustes homeostáticos para diferentes ingestas de Zn, es difícil determinar una ingesta de Zn que sea completamente adecuada, y por debajo de la cual el organismo no pueda compensar las bajas ingestas de este elemento.

Ésto justificaría en gran medida la realización de la presente memoria acerca del estudio del contenido de Zn en los alimentos, suelo y aguas de la costa granadina (Motril) y su correlación con la ingesta en la dieta diaria en este elemento, ya que hasta el momento y a pesar de su destacada importancia, no existen datos referentes a dicho tema en el área considerada.

Por todo ello se ha considerado oportuno el planteamiento de los siguientes objetivos:

◊ Puesta a punto de las técnicas analíticas adecuadas para la determinación del contenido de Zn en alimentos, bebidas y aguas.

Además se ha pretendido el estudio de los parámetros analíticos del método utilizado, para comprobar la validez del mismo en la detección de este elemento, en cada una de las diferentes muestras analizadas.

◊ Evaluación de los niveles de Zn en:

- Carnes y pescado, como importantes fuentes proteicas en la dieta diaria.
- Huevo, leche y derivados lácteos.
- Frutas y hortalizas.
- Cereales, legumbres y frutos secos.
- Bebidas y otros alimentos directamente seleccionados en los mercados de la zona considerada.
- Aguas potables, residuales, de riego y marinas.
- Suelos de cultivo, sedimentos y arenas del área de Motril.

◊ Determinación del pH en suelos, sedimentos y arenas de la zona para comprobar su correlación con el contenido en Zn de las muestras.

◆ Evaluación de la ingesta de Zn en la dieta diaria de los habitantes del área considerada, mediante la determinación de este elemento en los alimentos consumidos en la zona sur de la provincia de Granada (Motril) y el empleo de las tablas del consumo alimentario. Con este estudio se pretende:

- Calcular el aporte de Zn a partir de cada uno de los diferentes grupos de alimentos considerados.
- Determinar la ingesta media en Zn en la dieta diaria para los habitantes de la comarca sur de Granada.

Parte Experimental

1. MATERIAL

1.1. Aparatos

- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin - Elmer, mod. 1100B.

- Horno de grafito Perkin-Elmer, mod. HGA-700.

- Lámpara de cátodo hueco de Zn, Perkin Elmer.

- Placa de mineralización multiplazas selecta.

- Sistema Milli-Q de obtención de agua de grado reactivo Waters, mod. 2015.

- Balanza de precisión Mettler AE-200.

- Congelador Ariston.

- Estufa de desecación Heraeus RT- 500.

- Horno microondas, Moulinex F.M. 1535 E.

- Horno mufla, Heraeus MR - 170.
- Baño de arena
- Bomba de digestión ácida para microondas, Parr instrument company. Mod. 4782.

1.2. Material

- Material de vidrio de calidad contrastada.
- Tubos de polietileno cristalino.
- Recipientes de polietileno.

El material a utilizar se lava con agua destilada y a continuación se dispone en una disolución de ácido nítrico al 30% donde se mantiene con esta dilución durante 24 horas, se enjuaga con abundante agua desionizada y se deseca a temperatura ambiente en el caso de material aforado o en estufa a 90-100° C. Por último se almacena en un lugar limpio y seco, apartado de posibles contaminaciones (Jiménez y col. 1984; Laserna, 1985).

La habitación en que se realizan las pruebas debe ser de acceso restringido para evitar la contaminación ambiental. Igualmente es necesario el uso de guantes desechables. (Savory y Wills , 1992).

1.3. Reactivos y disoluciones

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica:

- Solución estándar de Zn (Tritisol, Merck) de 1000 mg/L, bajo la forma de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ en una disolución de HNO_3 de 0.5 M. El resto de las disoluciones se preparan por dilución a partir de ésta.
- Agua bidestilada de grado reactivo (Milli-Q).
- Ácido nítrico 65 % p/v, Carlo Erba.
- Ácido perclórico 65 % p/v, Carlo Erba.
- Patrón de referencia estándar con un contenido certificado de Zn.
 - El SRM nº 1572 Citrus Leaves.
 - El NBS N° 2704 River Sediment.
 - El CRM 063R Skim Milk powder.
 - El CRM N° 278 Mussel tissue (*Mytilus edulis*).

1.4. MUESTRAS

1.4.1. Carnes

Las muestras de carne fueron adquiridas del Mercado de Abastos, y de distintas carnicerías y supermercados de la ciudad de Motril.

Una vez tomadas se transportaron al laboratorio del Departamento de Nutrición

y Bromatología donde tras la separación de sus partes comestibles, se desecaron en horno microondas a una potencia del 75% durante los 4 primeros minutos y posteriormente se rebajó la potencia al 50% hasta su desecación total. Las partes desecadas se homogeneizaron y se dejaron en el desecador durante 24 horas para alcanzar un peso constante, almacenándose finalmente en contenedores de polietileno en la cámara fría, hasta el momento de su empleo en el análisis.

1.4.2. Alimentos marinos

El muestreo se ha realizado entre las especies de pescados, moluscos y cefalópodos más frecuentes y consumidos en la costa granadina. Estas muestras fueron adquiridas directamente en la lonja de Motril, desde donde se transportaron al laboratorio.

De las muestras, una vez limpias, se empleó su parte muscular comestible, la cual se sometió a un proceso de desecación en horno microondas según el procedimiento general antes descrito hasta su desecación total. Una vez desecadas se homogeneizaron y se dejaron en el desecador durante 24 horas para alcanzar un peso constante almacenándose en contenedores de polietileno en cámara frigorífica, hasta el momento de su empleo en el análisis.

1.4.3. Leches

Se han estudiado los distintos tipos de leche más frecuentemente consumidas en el área objeto de estudio, que corresponden a siete grupos diferentes.

- Leche entera pasteurizada.

- Leche entera UHT.

- Leche semidesnatada U.H.T. con vitaminas A y D.

- Leche desnatada U.H.T. con vitaminas A y D.

- Leche semidesnatada U.H.T. con vitaminas A y D + calcio.

- Leche desnatada U.H.T. con vitaminas A y D + calcio.

Todas las muestras llegaron al laboratorio en su envase original. Una vez recibidas se realizaron las determinaciones analíticas, refrigerándose durante un máximo de 24 horas, a 4°C, si no se iban a procesar inmediatamente (López Mahía y col. 1992).

La toma de muestra o submuestras previa al análisis no presentó excesivas dificultades, bastó con homogeneizar la leche por repetidas inversiones del recipiente que las contenía, tras haber alcanzado temperatura ambiente (Crosby, 1977). Otros autores (Juárez Iglesias y col. 1978) aconsejan homogeneizar calentando a 40°C, mezclando suavemente y enfriando a 20°C.

1.4.4. Huevo y derivados lácteos

Los derivados lácteos se adquirieron en distintos supermercados de la zona estudiada, seleccionando a la vez las marcas comerciales más consumidas.

Una vez en el laboratorio se sometieron a los procesos de desecación, homogeneización y almacenamiento anteriormente indicados.

1.4.5. Cereales y leguminosas

Las muestras de cereales y leguminosas también fueron obtenidas en los supermercados de Motril. Sin embargo, al contrario de las anteriores, no fueron desecadas, sino que directamente fueron homogeneizadas y almacenadas en frascos de polietileno en la cámara frigorífica hasta el momento del análisis.

1.4.6. Vegetales y frutas

Una parte de las muestras de vegetales y frutas fueron directamente tomadas en los cultivos del área considerada, en los puntos señalados en el mapa nº 1. En este caso, el muestreo tuvo un carácter no dirigido, pues la toma de muestras se realizó de una forma aleatoria, según el modelo propuesto por Bridges y Davidson (1982), donde cada Km² de la zona se divide en 15 puntos posibles de muestreo.

En este caso el número de muestras tomadas para cada especie vegetal dependió de la abundancia de su cultivo en la zona considerada.

Otra parte importante de las muestras vegetales analizadas fueron adquiridas directamente en los establecimientos comerciales de la población de Motril.

Una vez en el laboratorio, las muestras siguieron el modelo general de desecación.

1.4.7. Suelos, sedimentos y arenas

Las muestras se recogieron directamente a partir de los suelos de los cultivos y sedimentos del área estudiada (Motril), a nivel de los puntos señalados en el mapa nº 2, a una profundidad de 10 a 20 cm, en la denominada zona arable del terreno.

El muestreo se realizó de acuerdo con el modelo aleatorio propuesto por Bridges Davison (1982), según el cual, cualquier punto tiene la misma probabilidad de ser escogido dentro de un área delimitada (1 Km²). Posteriormente, tras su

transporte al laboratorio se desecaron a temperatura ambiental dispuestas en capas delgadas durante dos semanas, procediéndose a continuación a su tamización (tamiz con tamaño de poro de 340 µm) y conservación en contenedores de polietileno en la cámara fría hasta el momento de su empleo en el análisis.

1.4.8. Aguas

Las muestras de agua analizadas se tomaron de las acequias procedentes del río

Guadalfeo, ramblas y red de distribución municipal de Motril y playa de Poniente. La localización de los puntos de muestreo viene recogida en el mapa nº 3.

Para la toma de las muestras se utilizaron contenedores de polietileno, que fueron previamente mantenidos durante 24 horas, en una disolución de ácido nítrico al 30% y enjuagados posteriormente con agua destilada y desionizada.

Las muestras se tomaron a nivel superficial a una profundidad no superior a 15 cm, previamente los contenedores se enjuagaron 3 veces con la muestra de agua. En el momento de la toma se adicionaron 2 ml de HNO_3 c.c. por cada 100 mL de muestra, lo que equivale a una acidez de 1,3%, ideal para su conservación (Ahmed y Stoeppler, 1987). A continuación, fueron transportados al laboratorio donde se procedió a su análisis inmediato.

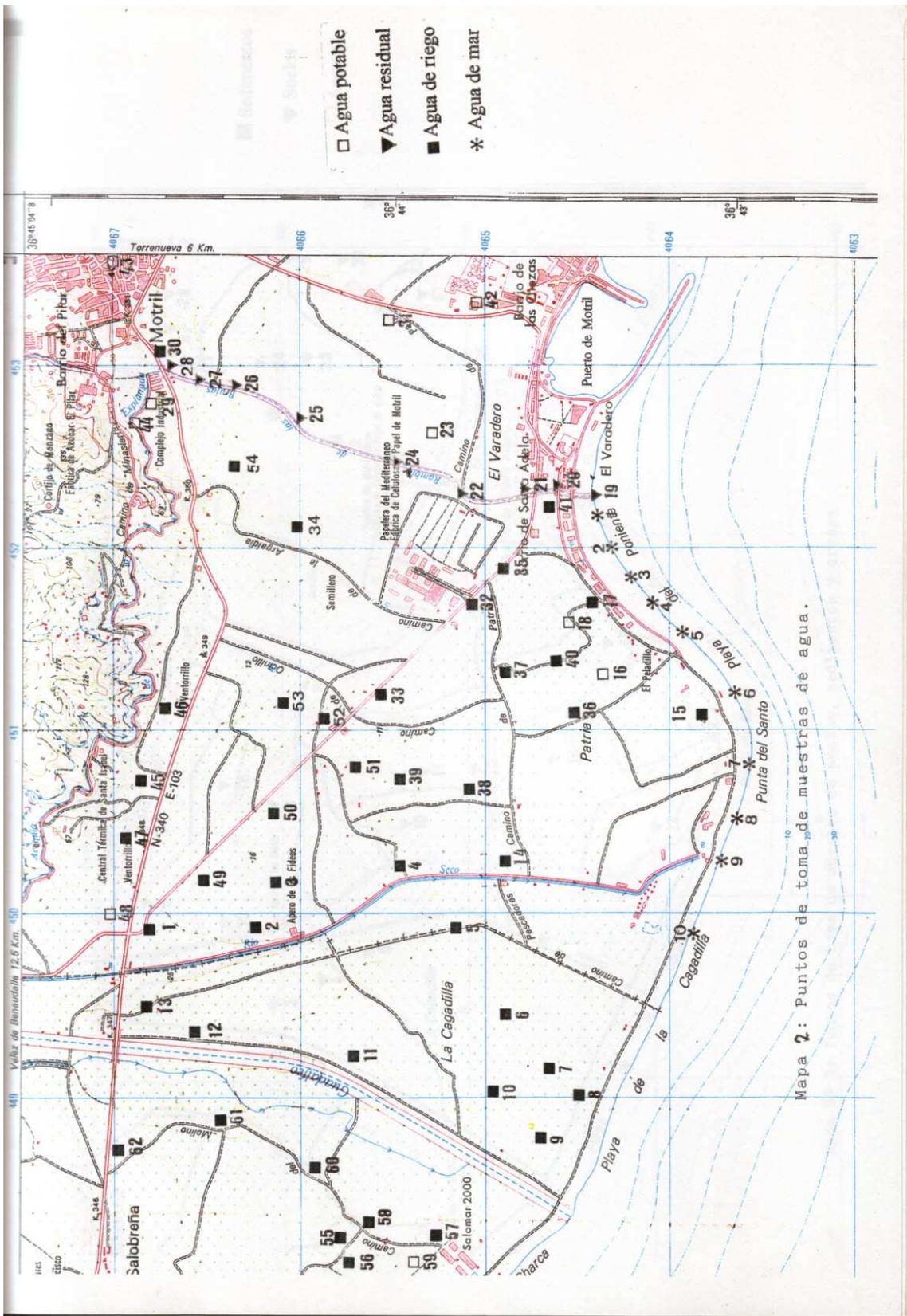
1.4.9. Bebidas

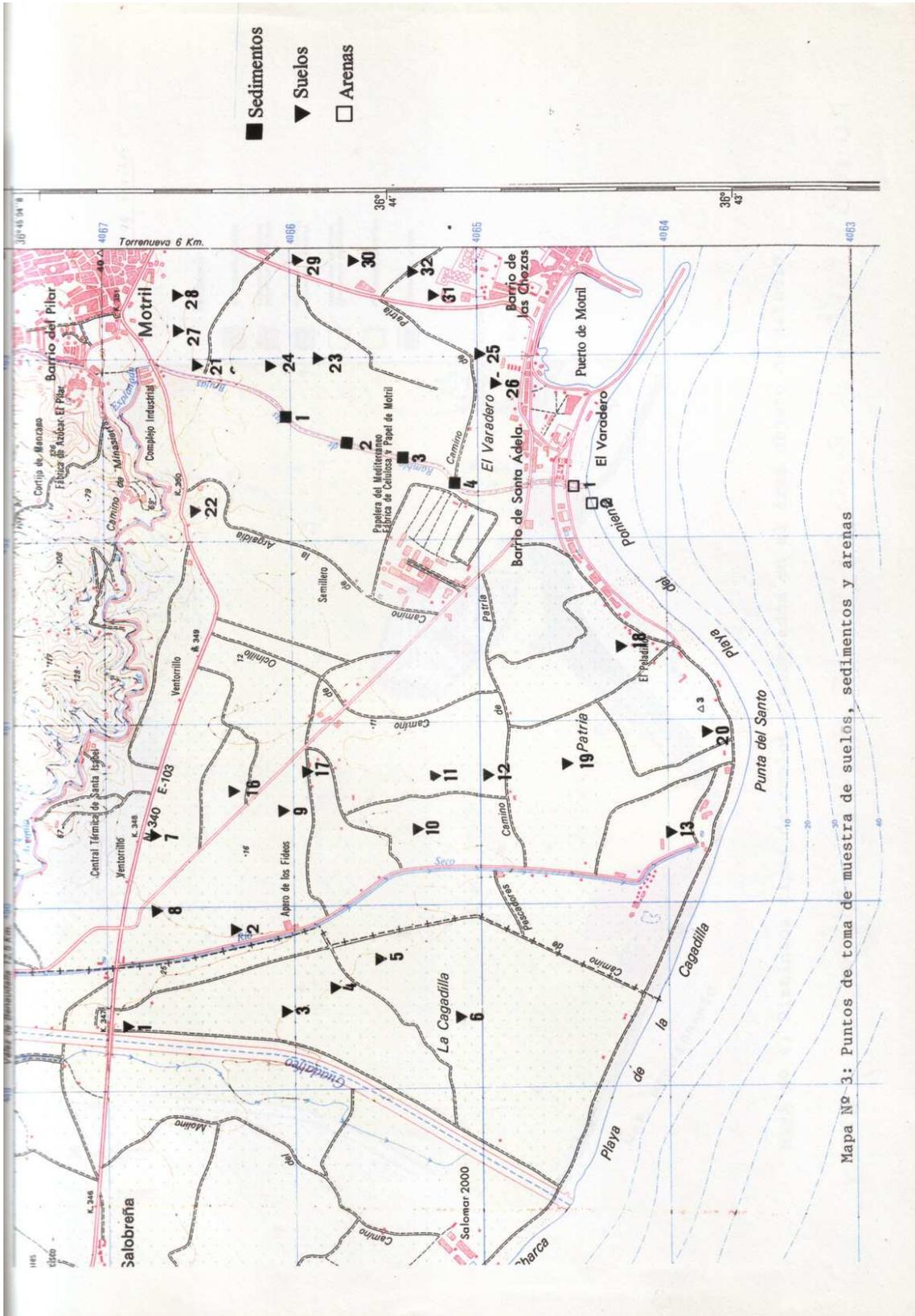
Las muestras de bebidas fueron obtenidas de los supermercados de la ciudad de Motril. Estas no se sometieron a ningún procedimiento de desecación ni homogeneización sino que directamente fueron almacenadas en contenedores de polietileno hasta el momento de su análisis.

1.5. Material informático

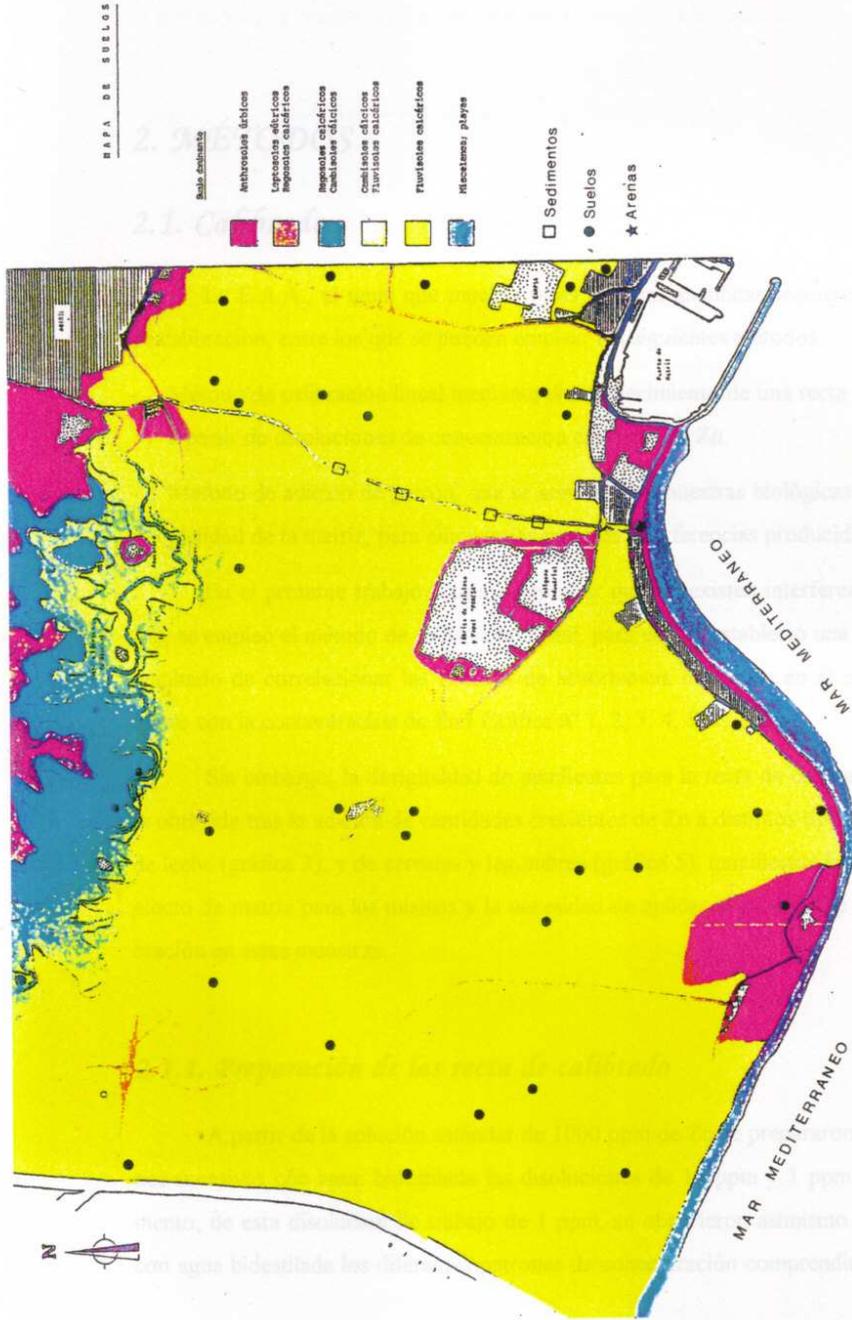
Los programas utilizados para el estudio estadístico de los resultados han sido el statgraphics 6.0 (Statgraphics, 1991) y Statgraphics 2.0 plus (Statgraphics, 1996).

Para la elaboración de los gráficos se ha empleado el programa Harvard Graphics 2.0. para Windows (Harvard Graphics, 1991-1993).





Mapa No 3: Puntos de toma de muestra de suelos, sedimentos y arenas



MAPA Nº 4: Distintos tipos de suelos presentados en el área objeto de estudio.

2. MÉTODOS

2.1. Calibrado

La E.A.A., al igual que muchas otras técnicas analíticas requiere un proceso de calibración, entre los que se pueden emplear los siguientes métodos:

- Método de calibración lineal mediante el establecimiento de una recta de calibrado a partir de disoluciones de concentración conocida en Zn.
- Método de adición de patrón, que se aconseja en muestras biológicas por la complejidad de la matriz, para eliminar las posibles interferencias producidas por ella.

En el presente trabajo y tras comprobar que no existen interferencias de matriz, se empleó el método de calibración lineal, para ello se estableció una recta patrón resultado de correlacionar las lecturas de absorbancia obtenidas en el espectrofotómetro con la concentración de Zn (Gráfica nº 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9).

Sin embargo, la desigualdad de pendientes para la recta de calibración lineal y la obtenida tras la adición de cantidades crecientes de Zn a distintos tipos de muestras de leche (gráfica 3), y de cereales y legumbres (gráfica 5), manifiestan la existencia de efecto de matriz para las mismas y la necesidad de aplicar el método de adición calibración en estas muestras.

2.1.1. Preparación de las recta de calibrado

A partir de la solución estándar de 1000 ppm de Zn se prepararon por diluciones sucesivas con agua bidestilada las disoluciones de 10 ppm y 1 ppm en este elemento; de esta disolución de trabajo de 1 ppm, se obtuvieron asimismo por dilución con agua bidestilada los diferentes patrones de concentración comprendidas

entre 0.1 ppm y 1 ppm. Todas estas disoluciones se prepararon en el momento de proceder a la medida.

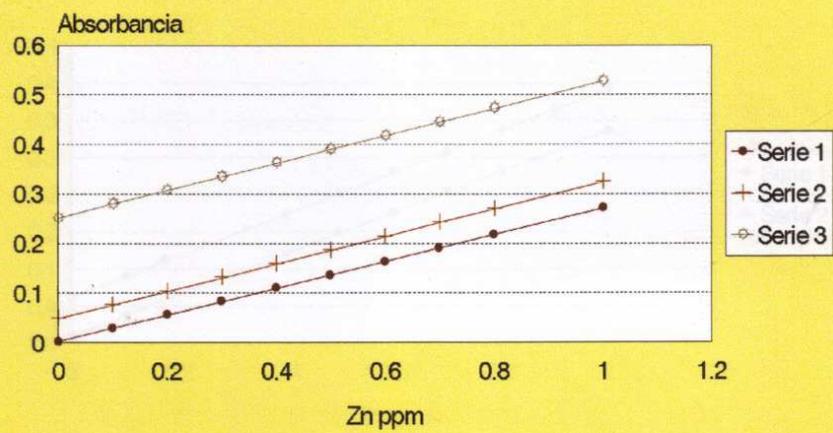
Asímismo, se midió previamente un blanco que contenía todos los reactivos empleados.

La medida obtenida para cada disolución estándar se midió en altura de pico.

2.1.2. Aplicación del método de adición de patrón

Para su ejecución se tomaron varias alícuotas de la misma muestra previamente digerida y diluida para los distintos tipos de alimentos. A continuación tras la adición de cantidades crecientes de la disolución patrón de Zn de 10 ppm y dilución a volumen final con agua Milli-Q dependiente de la concentración del analíto presente en cada tipo de muestra, se procedió a la determinación del contenido en Zn mediante la técnica de espectroscopía de absorción atómica a la llama.

Gráfica 1: Método de adición de patrón en carnes.

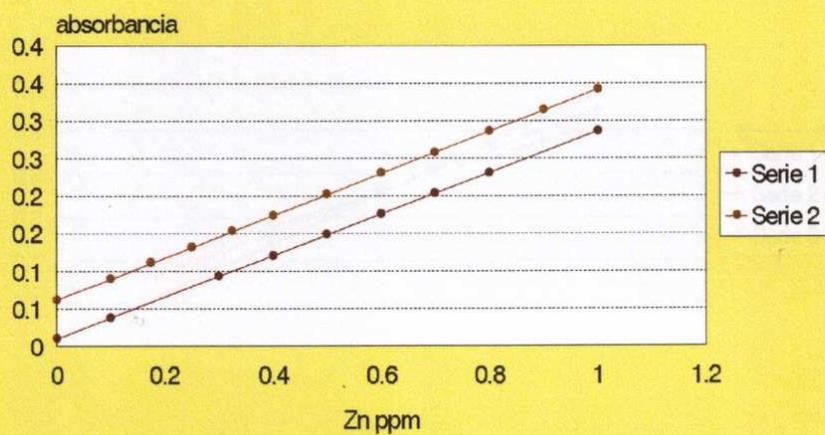


Serie 1: Recta de calibración.

Serie 2: Recta de adición-calibración de una muestra de pechuga de pollo.

Serie 3: Recta de adición-calibración de una muestra hígado de cerdo.

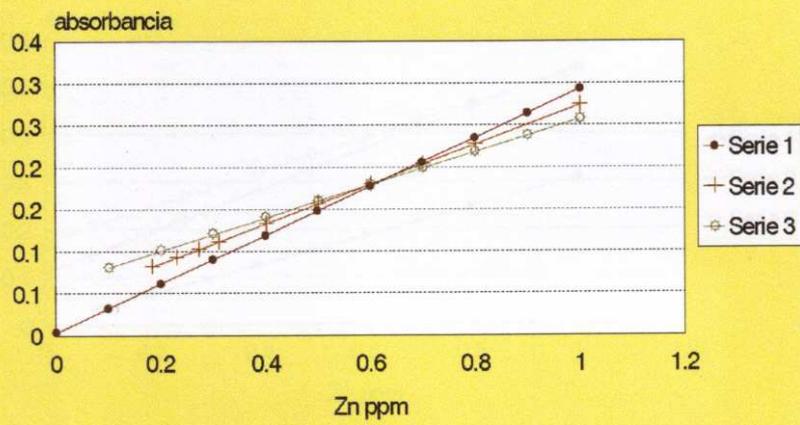
Gráfica 2: Método de adición de patrón en muestras de pescado.



serie 1:recta de calibración

Serie 2:recta de adición calibración de una muestra de caballa

Gráfica 3: Método de adición de patrón en lacteos.

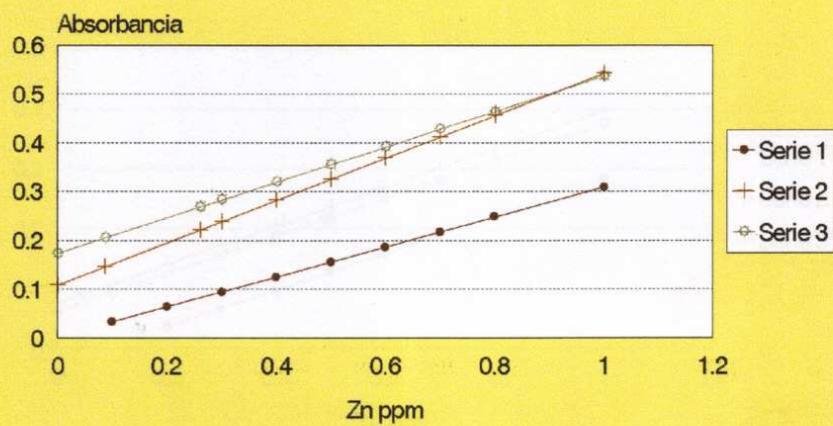


Serie 1: recta de calibración

Serie 2: recta de adición-calibración de una muestra de leche entera UHT

Serie 3: recta de adición-calibración de una muestra de leche desnatada enriquecida

Gráfica 4: Método de adición de patrón en derivados lacteos.

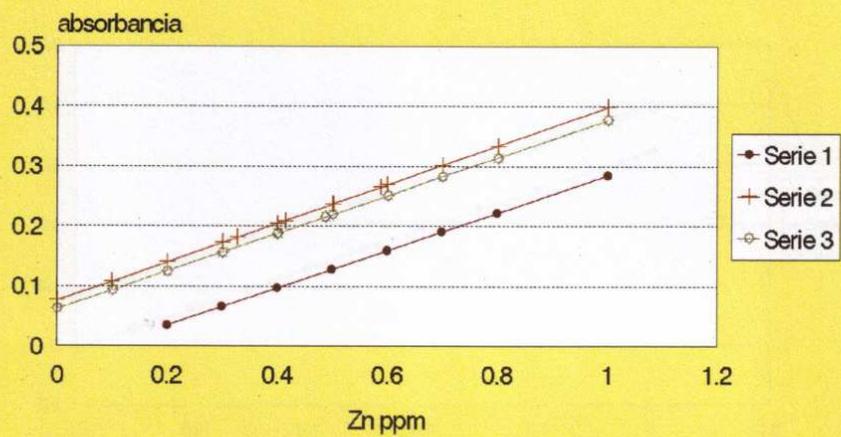


Serie 1: Recta de calibración.

Serie 2: Recta de adición-calibración de una muestra de natillas.

Serie 3: Recta de adición-calibración de una muestra de flan de huevo.

Gráfica 5: Método de adición de patrón en cereales y legumbres.

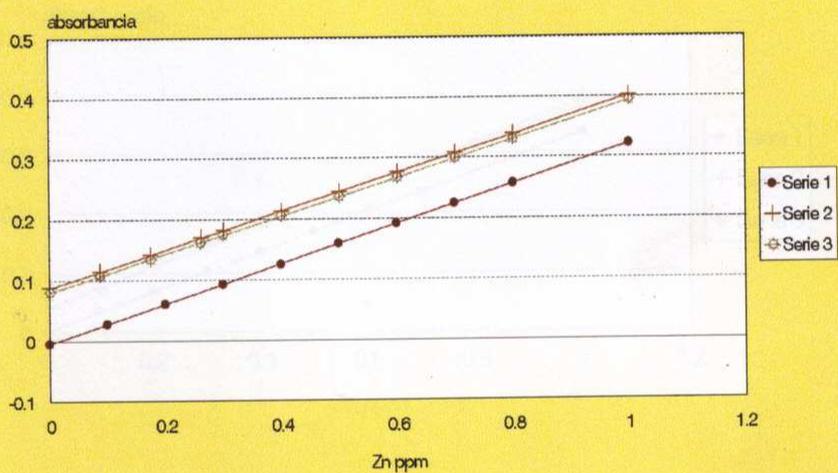


Serie 1: recta de calibració

Serie 2: Recta de adició-calibració de una muestra de garbanzos.

Serie 3: Recta de adició-calibració de una muestra de pan.

Gráfica 6: Método de adición de patrón en frutas y verduras.

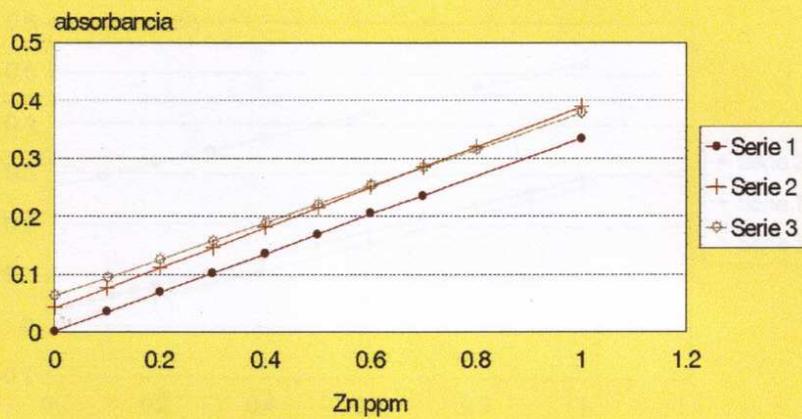


Serie 1: recta de calibración

Serie 2: recta de adición-calibración de una muestra de guisante.

Serie 3: recta de adición-calibración de una muestra de limón.

Gráfica nº 7: Método de adición de patrón en suelos y sedimentos

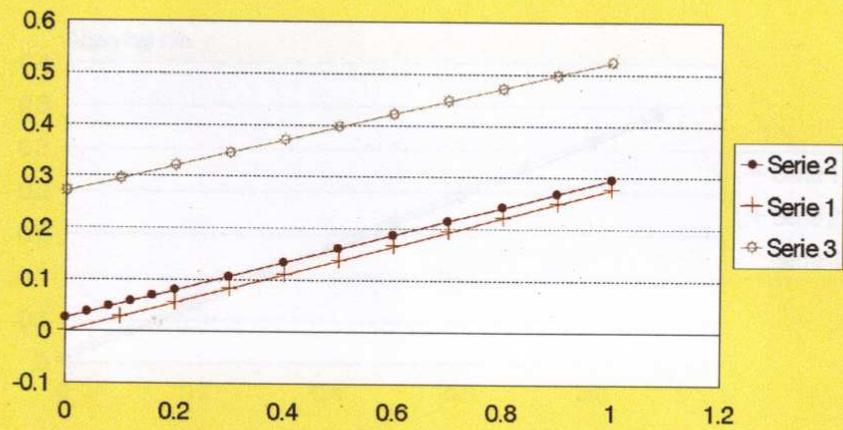


Serie 1: Recta de calibración

Serie 2: Recta de adición calibración de una muestra de suelo

Serie 3: Recta de adición alibración de una muestra de sedimento.

Gráfica 8: Método de adición de patrón en muestras de aguas

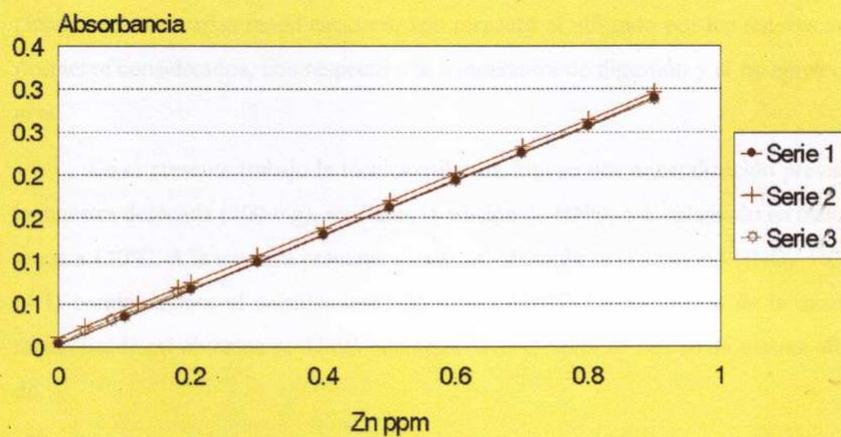


Serie 1: Recta de calibrado

Serie 2: Recta de adición - calibración en muestras de agua de riego

Serie 3: Recta de adición - calibración en muestras de agua de mar

Gráfica 9: Método de adición de patrón en bebidas.



- Serie 1: recta de calibrado
- Serie 2: recta de adición calibración en una muestra de vino tinto.
- Serie 3: recta de adición calibración en una muestra de ron.

2.2. FASE PREINSTRUMENTAL

2.2.1. Mineralización de las muestras de carnes, pescados, cereales y legumbres, frutas y verduras, bebidas y otros

La mineralización de las muestras se realizó mediante un método clásico de digestión ácida por vía húmeda, con HNO₃ c.c. y mezcla HNO₃ - HClO₄ (Olson y col. 1983; Palacios y col. 1985; Van Dokkum. y col. 1989). No obstante el método empleado presenta varias modificaciones, con respecto al utilizado por los autores anteriormente considerados, con respecto a la temperatura de digestión y al no empleo de urea.

En el presente trabajo la técnica utilizada supuso una mineralización previa de la muestra desecada (300 mg), mediante la adición de HNO₃ c.c. calentado en baño de arena a 130°C. A la muestra premineralizada así obtenida se le adicionó HNO₃-HClO₄ (4:1) continuándose el calentamiento 2h más a 130°C. La disolución de la muestra mineralizada así obtenida se diluyó con agua Milli-Q hasta 25 mL en un matraz aforado.

De la disolución mineralizada y diluída se tomaron diferentes alícuotas de distintos volúmenes que se diluyeron a un volumen final de 1 mL con agua Milli-Q en frascos de polietileno cristalino, la disolución obtenida de esta forma corresponde a la disolución analítica con el analito disuelto que fue la utilizada en la medida de la absorbancia.

2.2.2. Mineralización de las muestras de leche

Las muestras de leche fueron digeridas con una mezcla HNO₃-HClO₄ (4:1). Para ello y tras homogeneizar por inversión suave repetidas veces el envase con la muestra, se tomó una alícuota de la misma en tubo de ensayo. Tras añadir la mezcla ácida, se sometió a calentamiento en la placa de mineralización termostaticada

multiplazas Selecta durante 65 minutos a temperaturas comprendidas entre 100 y 120°C.

La muestra mineralizada se diluyó con agua bidestilada y se almacenó en la cámara fría hasta el momento de proceder a su medida.

Otros autores recomiendan que la homogeneización se realice calentando la muestra de leche a 40°C, mezclando suavemente y enfriando a 20°C (Juarez Iglesias y col. 1978), aunque Grosby (1977) indica que no es necesario.

En las muestras de leche también se ha aplicado el método de mineralización por vía seca con el fin de comparar la puesta a punto en el presente trabajo.

Según Crosby (1977), entre las ventajas de la vía seca hay que citar: el gran número de muestras que se pueden tratar simultáneamente, el no requerir atención constante y necesidad de poca cantidad de reactivos que por lo tanto implica blancos más bajos. Entre los inconvenientes destacan la volatización, adsorción, formación de compuestos insolubles y de núcleos de combustión incompleta, además de requerir un largo tiempo de tratamiento (Crosby, 1977; Laurent, 1981; Herrador y col. 1984).

En el tratamiento por vía seca las principales variables a controlar son: temperatura y tiempo de incineración, naturaleza del crisol, emplazamiento de los mismos en el horno y tipo de mezcla ácida empleada para disolver las cenizas (Beaton-Jones, 1994). De las variables citadas el tipo de crisol puede ejercer un cierto efecto sobre las recuperaciones de algunos minerales. En general, se observan mejoras porcentajes de recuperación en crisoles de níquel que en crisoles de porcelana o de cuarzo fundido (Rowan y col. 1982).

Para la recuperación de las cenizas, la totalidad de los autores consultados usan fundamentalmente dos tipos de ácidos, el ácido nítrico, que proporciona según Crosby (1977) cenizas blancas muy solubles (Mahieu y col. 1976; Juárez y Martínez Castro, 1979; Farré y Bayarri, 1984; Moreno Rojas y col. 1994; García y Olmedo y col. 1995) y el ácido clorhídrico (Hanni, 1967; López Mahía y col. 1992; Mozo y col. 1994). bien en forma individual, o bien mezclados en distintas proporciones (García Olmedo, 1986).

En nuestro estudio tomamos 1 ml de leche en el crisol de cuarzo que tras desecación en estufa, se calcinó en el horno mufla hasta obtención de cenizas blancas que fueron disueltas con HCl y diluidas al mismo volumen que en la técnica de vía húmeda antes descrita.

2.2.3. Mineralización de muestras de suelos, sedimentos y arenas

Para la mineralización de este tipo de muestras, se partió de 100 mg de muestra desecada de suelo o sedimento dispuestas en un frasco de vidrio a las que se les adicionó HNO₃ concentrado, la digestión se llevó a cabo en un baño de arena durante 45 minutos a 115°C. Transcurrido este tiempo se adicionó HNO₃/HClO₄ y se incrementó la temperatura a 130°C durante 75 minutos. Por último se mantuvieron otros 30 minutos a 150°C de temperatura.

2.2.4. Mineralización de muestras de bebidas

Para la determinación de Zn en el grupo de bebidas hemos realizado una técnica de digestión por vía húmeda semejante a la utilizada en otros casos pero con ligeras modificaciones.

Para ello se tomó 1 ml de la muestra líquida en un tubo de vidrio al que se adicionó HNO₃ c.c. y unos µg de pentóxido de vanadio como catalizador de la reacción.

La mineralización se realiza en la placa de mineralización termostatzada a 60°C durante 20 minutos, agitando suavemente los tubos cada cierto tiempo para evitar proyecciones de la muestra. Después llevamos la temperatura a 90°C y finalmente la incrementamos a 120°C.

La disolución de la muestra mineralizada así obtenida se diluyó en un matraz aforado de 25 ml con agua milli-Q. De esta disolución se tomaron alícuotas de la muestra mineralizada que se enrasaron hasta 1 ml con agua milli-Q en tubos de polietileno cristalino. La medida se realizó mediante espectrometría de absorción atómica a la llama.

2.2.5. Mineralización de muestras sólidas (sal, azúcar, café, cacao...)

En este caso se tomaron igualmente 0,100 g de la muestra objeto de estudio en un frasco de vidrio que se dispuso en el baño termostático multiplazas a 60°C. Posteriormente se incrementa la temperatura sucesivamente de 90 a 120°C, hasta finalizar la mineralización.

Figura 3. Modo operatorio empleado para la determinación del contenido en Zn en las muestras de alimento (carne, pescado, cereales, legumbres, frutas y verduras).

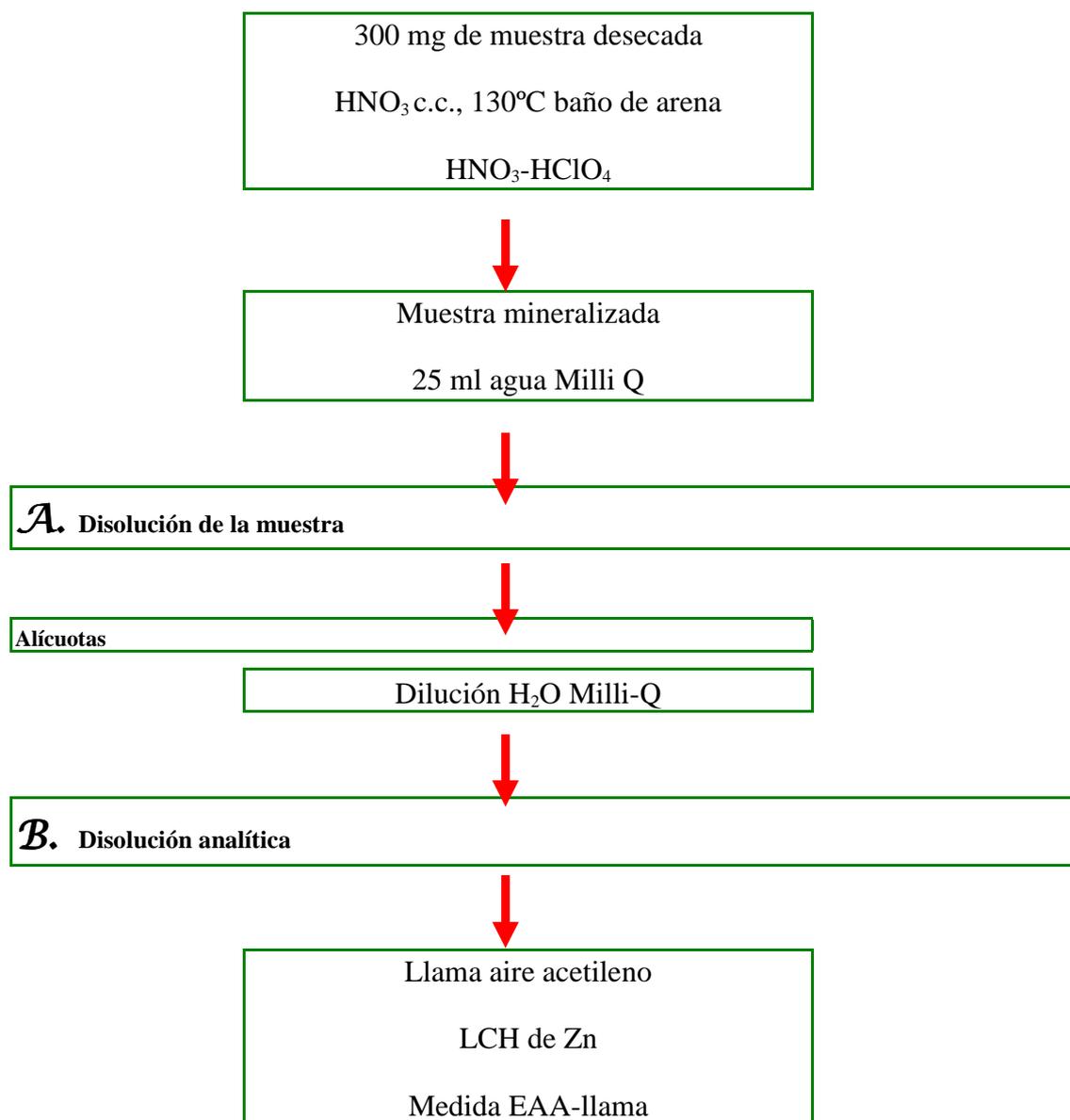


Figura 4. Modo operativo empleado para la determinación del contenido en Zn en las muestras de leche.

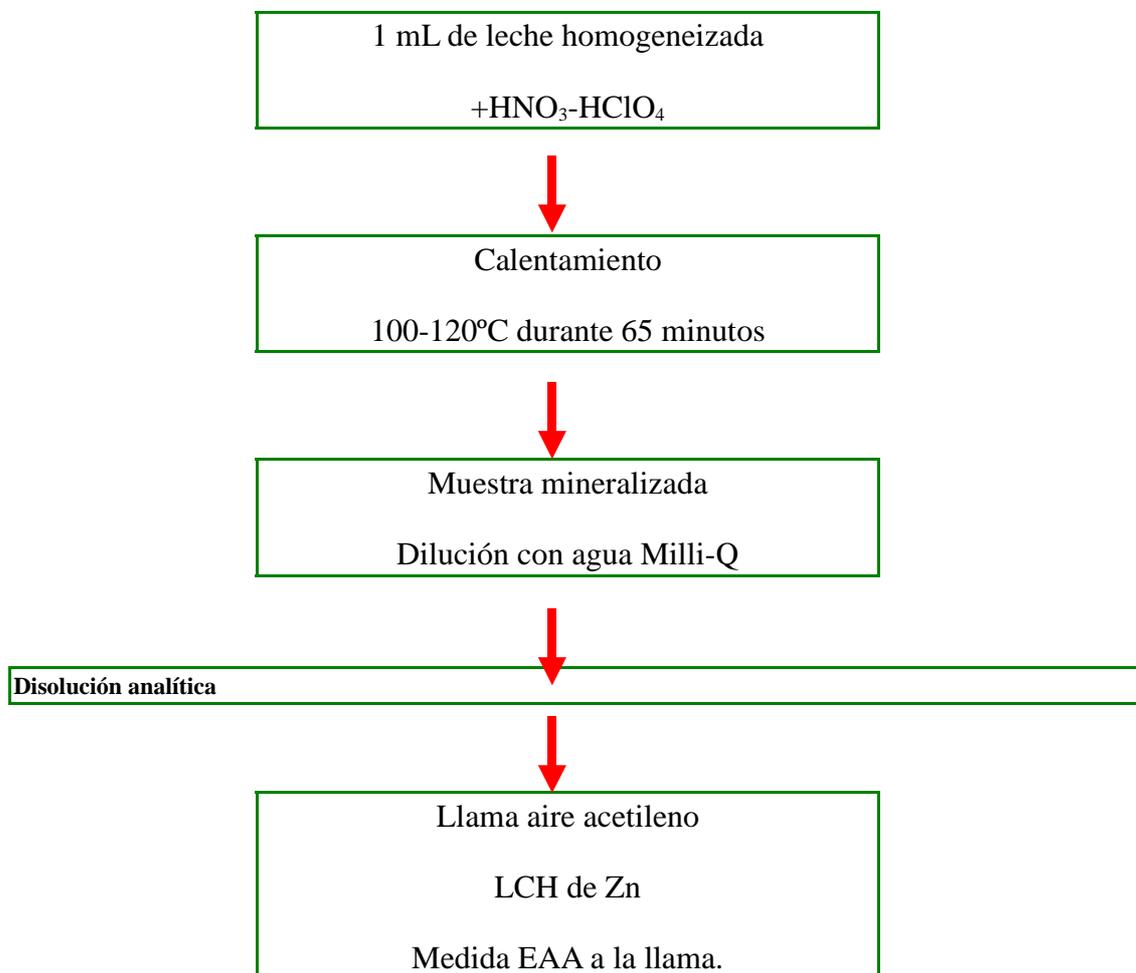


Figura 5 : Modo operatorio empleado para la determinación del contenido en Zn en las muestras de suelos y sedimentos.

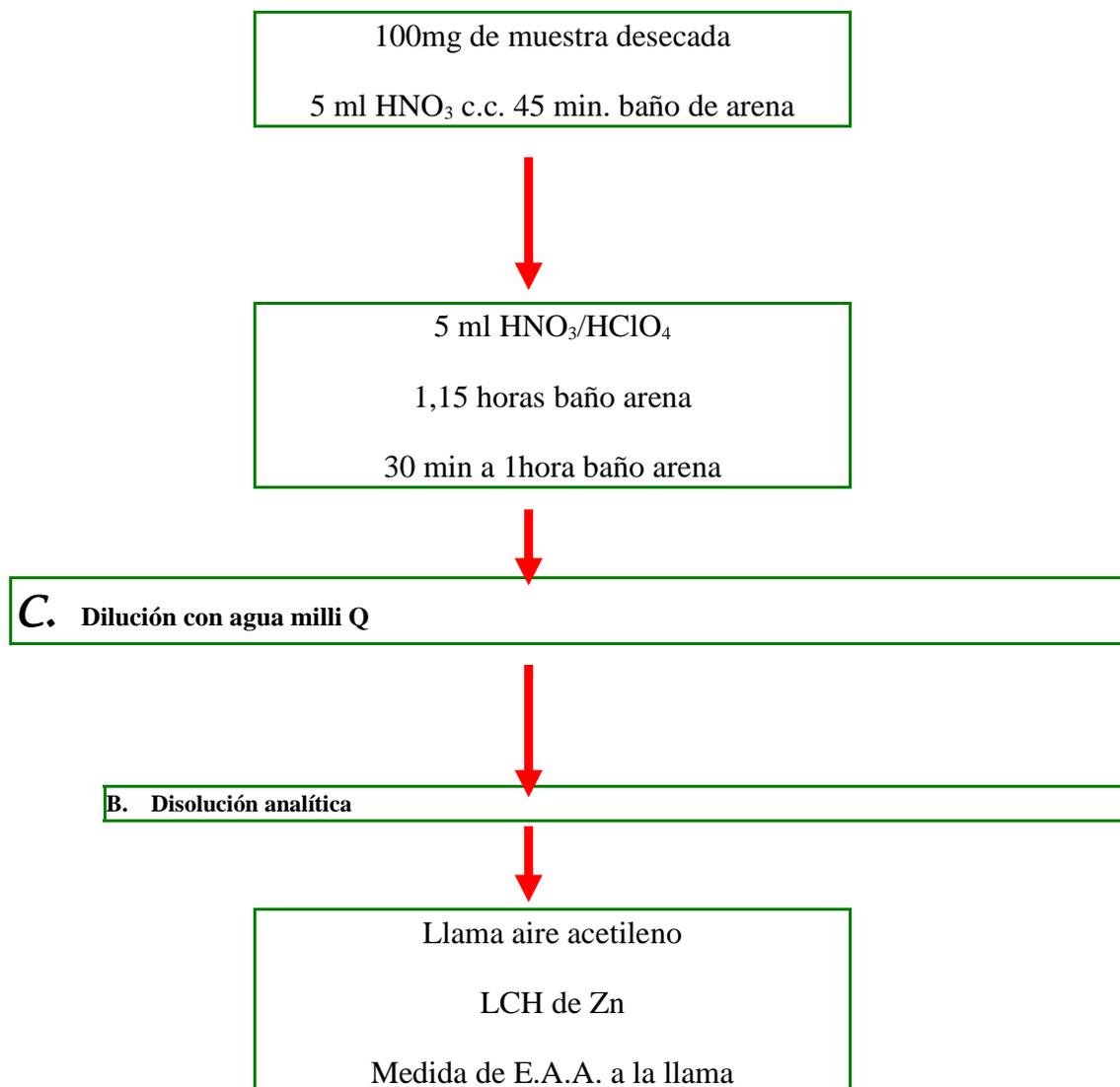
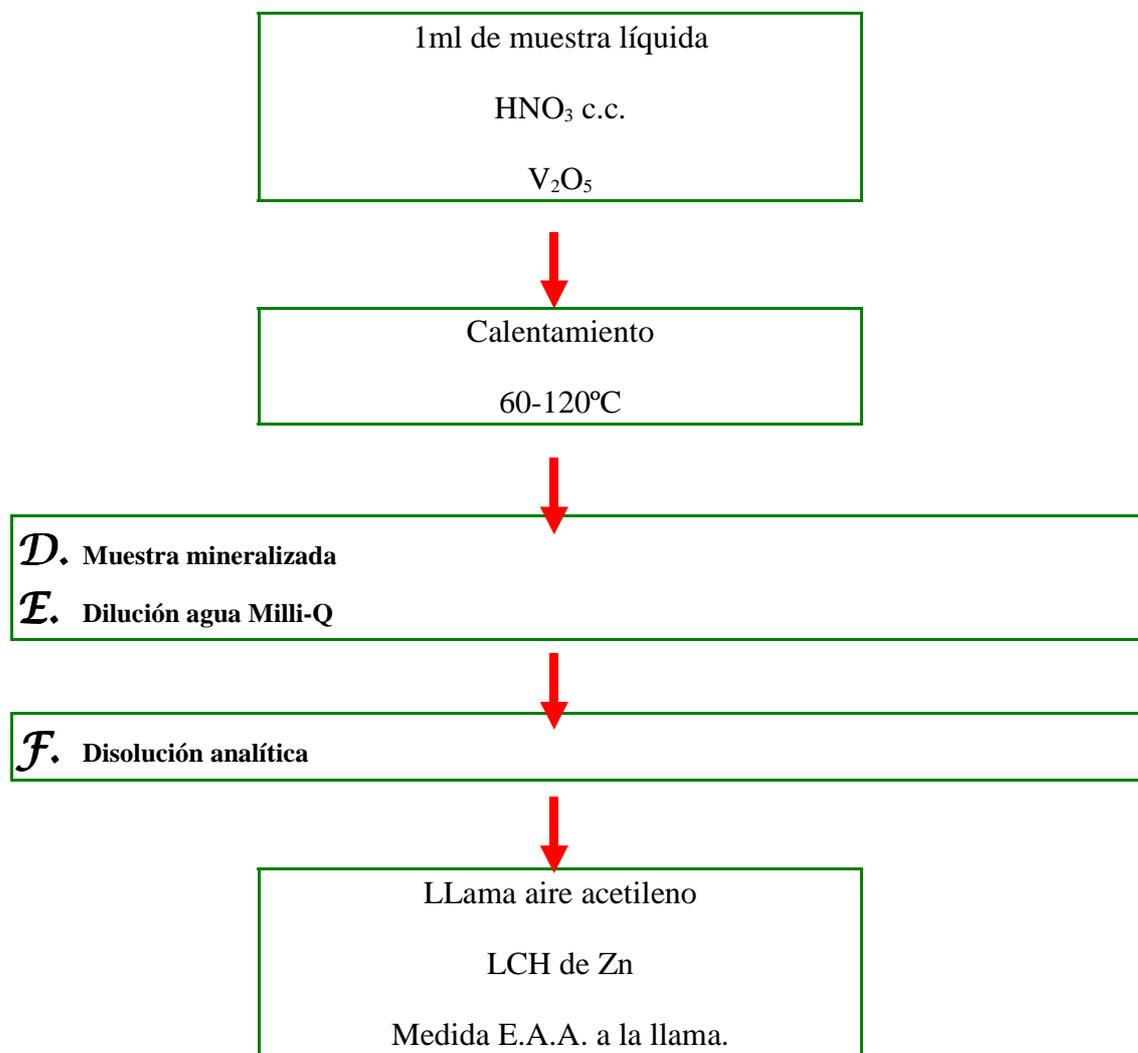


Figura 6: Modo operativo empleado para la determinación del contenido en Zn en las muestras de bebidas.



3. FASE INSTRUMENTAL

3.1. Medida de la concentración de Zn a la llama

La determinación de la concentración de Zn en la disolución analítica, se realizó por aspiración directa y atomización en la llama aire-acetileno del espectrofotómetro de absorción atómica. Los átomos del analito, absorben en estas circunstancias una parte de la radiación procedente de la lámpara de cátodo hueco de Zn, que es proporcional a la cantidad de este elemento presente en la muestra problema.

Las condiciones instrumentales de medida se detallan a continuación:

Tabla 6. Condiciones instrumentales de medida para EAA con atomización a la llama.

Fuente de radiación: Lámpara de cátodo hueco de Zn
Longitud de onda: 213,9 nm
Resolución de rendija: 1 nm
Intensidad de corriente de la lámpara: 3 mA

Lectura: altura de pico: Abs/s
Número de determinaciones por muestra : 3
Retraso de aparición de señal: Os
Tiempo de integración: 1s

Llama: Aire – Acetileno
Flujo de aire: 8 L/min
Flujo de acetileno: 2,5 L/ nm
Temperatura de atomización: 900°C

La correlación de la absorbancia con la concentración se realizó por contraste frente a una recta de calibrado en Zn obtenida para disoluciones patrón diferentes de este elemento y las rectas de adición de patrones en las muestras de leche, derivados

lacteos, cereales y leguminosas.

3.2. Características analíticas del método

El estudio de las características analíticas del método permite evaluar la validez de los procedimientos empleados, y su puesta a punto para las matrices problema. Incluye:

- Sensibilidad
 - Selectividad
 - Límite de detección
 - Exactitud
 - Precisión

3.2.1. Sensibilidad

Se define como la concentración absoluta del elemento que produce un 1% de absorción y equivale a 0,0044 unidades de absorbancia. Es la denominada “concentración característica” y delimita la zona de trabajo al preparar la línea de calibrado. Se deduce a partir de medidas repetitivas de la absorbancia producida por un patrón de concentración determinada. Para expresar la sensibilidad como masa característica (m_c), es decir, la masa de analito en nanogramos que genera una señal de absorbancia de 0.0044 unidades, basta con aplicar la siguiente fórmula:

$$m_c = \frac{V \times C \times 0,0044}{A}$$

siendo:

V= volumen de la alícuota

C = concentración de analito en la solución problema

A = medida de la absorbancia obtenida

El valor de sensibilidad obtenido en nuestro estudio es 0,0165 ppm y expresado

en ng es 165 ng.

3.2.2. *Selectividad*

La selectividad del método ha sido comprobada mediante el método de adiciones de patrón (método de adición-calibración en muestras de leche).

Las ecuaciones de las rectas correspondientes a las muestras problema adicionadas y el obtenido por los patrones en medio acuoso, determinan que los valores de las pendientes están muy próximos y por tanto la no existencia de interferencias de matriz.

Siendo:

r: coeficiente de correlación

a: ordenada en origen

b: pendiente

R: relación pendiente estándar y pendiente de muestra adicionada muestra.

Tabla 7 :Ecuaciones de la recta de calibración y las obtenidas tras la aplicación del método de adición de patrones a diferentes muestras de carne. Absorbancia = a + b (Zn mg/l).

Muestra	r	a	b	R
Estándar de Zn	0,999	0,108	0,284	1,000
Pechuga pollo	0,990	0,047	0,277	1,025
Hígado cerdo	0,997	0,245	0,282	1,008

Tabla 8: Ecuaciones de la recta de calibrado y las obtenidas tras la aplicación del método de adición de patrones a diferentes muestras de pescado.

Muestra	r	a	b	R
Estándar de Zn	0,998	0,006	0,288	1,000
Caballa	0,999	0,060	0,283	1,017

Tabla 9: Ecuaciones de la recta de calibración y las obtenidas tras la aplicación del método de adición calibración a diferentes muestras de leche.

Muestra	r	a	b	R
Estándar de Zn	0,999	-0,003	0,290	1
Leche entera	0,999	0,043	0,236	1,228
Leche desnatada + Ca	0,999	0,061	0,195	1,487
Leche semidesnatada	0,999	0,037	0,236	1,228
Leche semidesnatada + Ca	0,999	-0,000	0,236	1,228
Leche semidesnatada + Ca	0,999	0,044	0,239	1,213
Leche desnatada A+D	0,999	0,000	0,258	1,124
Leche entera pasteurizada	0,999	0,036	0,252	1,150

Tabla 10: Ecuaciones de las rectas de calibración y las obtenidas tras la aplicación del método de adición de patrones a diferentes muestras de derivados lácteos.

Muestra	r	a	b	R
Estándar de Zn	0,999	-0,002	0,322	1,000
Queso	0,999	0,367	0,300	1,073
Leche en polvo	0,998	0,163	0,345	0,933
Yoghurt natural	0,997	0,154	0,451	0,713
Natillas	0,998	0,107	0,434	0,741
Flan de huevo	0,999	0,173	0,363	0,887
Petit suisse	0,999	0,218	0,410	0,785

Tabla 11: Ecuaciones de las rectas de calibrado y las obtenidas tras la aplicación del método de adición de patrones a diferentes muestras de cereales y legumbres.

Muestra	r	a	b	R
Estándar de Zn	0,999	-0,033	0,317	1,000
Fideos	0,997	0,045	0,257	1,233
Alubias	0,997	0,099	0,283	1,120
Arroz	0,950	0,071	0,318	0,996
Macarrones	0,999	0,055	0,305	1,039

Tabla 12: Ecuaciones de las rectas de calibrado y las obtenidas tras la aplicación del método de adición de patrones a diferentes muestras de frutas, verduras y hortalizas.

Muestra	r	a	b	R
Estándar de Zn	0,999	-0,004	0,328	1,000
Coliflor	0,999	0,088	0,313	1,047
Habas	0,998	0,158	0,316	1,037
Apio	0,992	0,077	0,304	1,078
Calabaza	0,998	0,082	0,323	1,015
Plátano	0,999	0,024	0,309	1,061

Tabla 13: Ecuaciones de las rectas de calibrado y las obtenidas tras la aplicación del método de adición calibración a diferentes muestras de suelos y sedimentos.

Muestra	r	a	b	R
Estándar de Zn	0,999	-0,001	0,334	1,000
Sedimento	0,999	0,062	0,317	0,949
Suelo	0,990	0,065	0,330	0,988

Tabla 14: Ecuaciones de las rectas de calibrado y las obtenidas tras la aplicación del método de adición de patrones a diferentes muestras de agua.

Muestra	r	a	b	R
Estándar de Zn	1,000	-0,001	0,334	1,000
Agua de mar	1,000	0,024	0,322	0,964
Agua de riego	0,999	0,022	0,331	0,991

Tabla 15: Ecuaciones de las rectas de calibrado y las obtenidas tras la aplicación del método de adición de patrones a diferentes muestras de bebidas.

Muestra	r	a	b	R
Estándar de Zn	1,000	0,002	0,318	1,000
Vino tinto	0,999	0,010	0,317	0,996
Ron	0,999	0,005	0,316	0,996

3.2.3. Límite de detección

El concepto de límite de detección, fundamentado en el tratamiento estadístico del análisis del blanco o disoluciones de referencia, fue adoptado por la I.U.P.A.C. en 1975 (I.U.P.A.C. 1978) y por el ACS en el año 1980 (ACS, 1980).

El límite de detección de un procedimiento analítico se puede definir como la menor concentración, C_L , o la cantidad, q_L , que puede ser detectada en una disolución problema con una seguridad razonable, y se calcula utilizando la expresión:

$$C_L = \frac{K \cdot S_{BL}}{m}$$

en donde:

m = Sensibilidad analítica o pendiente de la recta de calibrado.

S_{BL} = Desviación estándar de las medias de absorbancia de al menos siete disoluciones

de referencia preparadas siguiendo el mismo procedimiento analítico.

K= Coeficiente que da la probabilidad de que una media de la absorbancia sea debida a la presencia del analito en la disolución problema, y no a fluctuaciones del blanco ($A_L > S_{med(BL)} + K.S_{BL}$), siendo A_L la absorbancia límite y A_{medBL} la absorbancia media del blanco.

Un valor de $K=3$ permite un nivel de confianza del 99,86% (Long y Winefordner, 1983).

También se suele usar el concepto de límite de cuantificación que responde a una cantidad superior, de forma que el error debido al ruido de fondo del aparato o técnica sea mínimo; se establece como diez veces la desviación estándar.

Para calcular el límite de detección en las medidas, se prepararon diez blancos, según el procedimiento recomendado (Long y Winefordner, 1983), y se midieron sus absorbancias.

El valor obtenido por el procedimiento descrito en nuestro estudio fue:

$$\mathbf{L.D. = 0,0134 \text{ ppm}}$$

3.2.4. Estudio de la exactitud del método

La exactitud se define como la proximidad entre el valor obtenido y el valor verdadero.

Su cálculo nos permite comprobar que no se producen pérdidas ni contaminaciones durante el proceso seguido. Su determinación se puede llevar a cabo mediante:

- El empleo de patrones con contenido de analito (Zn) certificados por estudios de calibración interlaboratorios.
- Estudios del porcentaje de recuperación de muestras, tras la adición de cantidades conocidas del elemento a determinar desde una disolución patrón de Zn, a varias fracciones iguales de la misma muestra y posterior sometimiento al procedimiento analítico completo. De esta forma, las cantidades de Zn determinadas en las muestras

adicionadas se comparan con los valores resultantes de la suma de los niveles medios de Zn en la muestra sin adicionar y de las cantidades absolutas añadidas.

Así pues:

$$\% \text{ Recuperación} = (A/B).100$$

en donde:

A= Cantidad en μg del elemento determinado en las muestras adicionadas con analito a partir de la disolución patrón de este.

B = Cantidad en μg del elemento presente correspondiente al contenido de las muestras más la cantidad adicionada.

- **Contraste con un patrón certificado**

En el presente trabajo se han realizado estudios con los patrones de referencia estándar siguientes:

* El CRM n° 278 de Mussel por Tissue (*Mytilus edulis*) certificado para el Zn por la CBR de la CEC, utilizado en el estudio de la exactitud de método en pescados, mariscos, cefalópodos, carnes y derivados.

* El SRM n° 1572 de Citrus Leaves con un valor de Zn no certificado por la NIST, ya que no se han encontrado todavía suficientes valores homogéneos para su certificación. Se utilizó como referencia para todos los productos de origen vegetal analizados.

* El NBS Buffalo river sediment (SRM 2704) certificado por el NIST en Zn y usado como patrón certificado para suelos, sedimentos y arenas.

* El CRM 063R powdered skimmed milk certificado en Zn por la BCR-CEC, empleado en el estudio de la exactitud del método en muestras de leche y derivados lácteos.

Se prepararon 10 fracciones de igual peso para cada uno de los estándares certificados considerados y se sometieron a los procedimientos analíticos de mineralización y determinación de Zn. El valor medio así obtenido, para cada determinación, se comparó con el correspondiente valor certificado (Tabla 16).

Tabla 16. Evaluación de la exactitud del método mediante el empleo de un patrón certificado de Zn.

Material de referencia	Concentración de Zn ($\mu\text{g/g}$)	
	Medido**	Certificado*
Mussel tissue CRM 278	76,2 \pm 5,5	76 \pm 2,0
Citrus leaves SRM 1572	27,4 \pm 3,1	29 \pm 2
River Sediment SRM 2704	424,7 \pm 5,8	438 \pm 12
Skimmed milk powder	50,5 \pm 2,2	49 \pm 0,6

(*) Media \pm Desviación estándar

(**) Media \pm Intervalo de confianza del 95% sobre la media (n=10).

- **Cálculo del porcentaje de recuperación**

Para su realización por cada grupo de muestras se eligieron 2 muestras al azar con diferente contenido de Zn. Se les adicionaron cantidades crecientes de dicho elemento desde las soluciones patrón de trabajo y se sometieron al procedimiento analítico empleado. Los resultados obtenidos para los distintos grupos de muestras se muestran en las tablas 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25.

Tabla 17. Cálculo del porcentaje de recuperación en la determinación de Zn en carnes.

Muestra	Presente (μg)	Añadido (μg)	Total (μg)	Medido (μg)	Recuperado %
Pulmón de cerdo	35,59	0,00	35,59	35,59	100,00
	35,59	3,00	38,59	38,64	100,13
	35,59	6,00	41,59	42,23	101,54
	35,59	9,00	44,59	44,56	99,93
Chuleta de cerdo	21,26	0,00	21,26	21,26	100,00

Muestra	Presente (μg)	Añadido (μg)	Total (μg)	Medido (μg)	Recuperado %
	21,26	3,00	24,26	24,19	99,71
	21,26	6,00	27,26	26,69	97,91
	21,26	9,00	30,26	30,79	101,75

Tabla 18. Cálculo del porcentaje de recuperación en la determinación de Zn en pescados.

Muestra	Presente (μg)	Añadido (μg)	Total (μg)	Medido (μg)	Recuperado %
Pescada	0,0852	0,000	0,085	0,085	100,590
	0,0852	0,015	0,100	0,098	98,400
	0,0852	0,030	0,115	0,116	101,480
	0,0852	0,045	0,130	0,129	99,540
Sardina	0,1993	0,000	0,193	0,199	100,000
	0,1993	0,050	0,249	0,260	104,530
	0,1993	0,100	0,299	0,302	100,940
	0,1993	0,150	0,349	0,343	98,310

Tabla 19. Cálculo del porcentaje de recuperación en la determinación de Zn en leches.

Muestra	Presente (μg)	Añadido (μg)	Total (μg)	Medido (μg)	Recuperado %
Desnatada	4,87	0,00	4,87	4,87	100,000
	4,87	2,00	6,87	6,94	101,200
	4,87	3,50	8,37	8,24	98,400
	4,87	5,00	9,87	9,94	100,670
Entera	4,92	0,00	4,92	4,92	100,000
	4,92	2,00	6,92	6,88	99,390
	4,92	3,50	8,42	8,48	100,600
	4,92	5,00	9,42	9,84	99,150

Tabla 20. Cálculo del porcentaje de recuperación en la determinación de Zn derivados lácteos.

Muestra (µg)	Presente (µg)	Añadido (µg)	Total (µg)	Medido (µg)	Recuperado (%)
Queso	33,590	0,000	33,590	33,590	100,000
	33,590	4,000	37,590	36,010	95,800
	33,590	8,000	41,590	40,510	97,400
	33,590	12,000	45,590	43,750	95,970
Flan de huevo	13,010	0,000	13,010	13,010	100,000
	13,010	4,000	17,010	17,000	99,980
	13,010	8,000	21,010	21,470	102,190
	13,010	12,000	25,010	25,180	100,690

Tabla 21. Cálculo del porcentaje de recuperación en la determinación de Zn en cereales y legumbres.

Muestra (µg)	Presente (µg)	Añadido (µg)	Total (µg)	Medido (µg)	Recuperado (%)
Galleta	2,266	0,000	2,266	2,266	100,000
	2,266	2,000	4,286	4,370	101,960
	2,266	4,000	6,266	6,244	99,650
	2,266	6,000	8,266	8,233	99,600
Garbanzos	12,995	0,000	12,995	12,995	100,000
	12,995	2,000	15,775	15,775	105,060
	12,995	4,000	16,995	17,300	101,800
	12,995	6,000	18,995	18,683	98,380

Tabla 22. Cálculo del porcentaje de recuperación en la determinación de Zn en frutas, verduras y hortalizas.

Muestra (µg)	Presente (µg)	Añadido (µg)	Total (µg)	Medido (µg)	Recuperado %
Sandía	0,092	0,000	0,092	0,092	100,000
	0,092	0,040	0,132	0,142	107,410
	0,092	0,080	0,172	0,170	98,720
	0,092	0,120	0,212	0,212	100,000
Melocotón	0,117	0,000	0,117	0,117	100,000
	0,117	0,040	0,157	0,162	103,100
	0,117	0,080	0,197	0,207	105,070
	0,117	0,120	0,237	0,260	109,700

Tabla 23. Cálculo del porcentaje de recuperación en la determinación de Zn en suelos.

Muestra	Presente (µg)	Añadido (µg)	Total (µg)	Medido (µg)	Recuperado %
Sedimento	35,11	5,00	40,11	39,00	97,23
	35,11	10,00	45,11	45,75	101,41
	35,11	15,00	50,11	52,66	105,08
	35,11	20,00	55,11	57,12	103,64
Suelo	47,12	5,00	52,12	48,33	92,72
	47,12	10,00	57,12	60,12	105,25
	47,12	15,00	62,12	61,80	99,48
	47,12	20,00	67,12	65,50	97,58

Tabla 24. Cálculo del porcentaje de recuperación en la determinación de Zn en muestras de aguas.

Muestra	Presente (μg)	Añadido (μg)	Total (μg)	Medido (μg)	Recuperado %
Agua de mar	0,103	0,000	0,103	0,103	100,000
	0,103	0,040	0,143	0,140	97,840
	0,103	0,080	0,183	0,177	96,890
	0,103	0,120	0,223	0,228	102,150
	0,103	0,160	0,263	0,262	99,660
	0,103	0,200	0,303	0,290	95,720
Agua de riego	0,098	0,000	0,098	0,098	100,000
	0,098	0,040	0,138	0,132	95,250
	0,098	0,080	0,178	0,179	100,170
	0,098	0,120	0,218	0,218	99,630
	0,098	0,160	0,258	0,256	98,880
	0,098	0,200	0,298	0,286	95,820

Tabla 25. Cálculo del porcentaje de recuperación en la determinación de Zn en muestras de bebidas.

Muestra	Presente (μg)	Añadido (μg)	Total (μg)	Medido (μg)	Recuperado (%)
Vino de Jerez	0,389	0,000	0,389	0,389	100,000
	0,389	0,080	0,469	0,468	100,210
	0,389	0,160	0,549	0,542	101,290
	0,389	0,240	0,629	0,629	100,000
Vino Tinto	0,063	0,000	0,063	0,063	100,000
	0,063	0,080	0,143	0,136	105,140
	0,063	0,160	0,223	0,221	100,900
	0,063	0,240	0,303	0,306	99,010

3.2.5. *Estudio de la precisión del método.*

El término de precisión hace referencia al grado de convergencia de los resultados generados por el método analítico. En él se incluyen los conceptos de repetibilidad y precisión intralaboratorio, referida a la precisión cuando se realizan repeticiones en idénticas condiciones, y el de reproducibilidad o precisión interlaboratorios, si las repeticiones lo son en condiciones diferentes. Por lo tanto la mayor concordancia entre determinaciones repetidas sobre una misma muestra, evitará la posibilidad de errores aleatorios.

Para la determinación de la repetibilidad, se realizaron una serie de medidas de un peso o volumen determinado de varias muestras elegidas al azar de entre las disponibles, con el fin de abarcar el rango completo de concentración de Zn presente en cada grupo de alimentos.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un tratamiento estadístico (Reyes-Castañeda, 1980; Martín y Luna, 1988), a fin de establecer la media (X_m) y la desviación estándar (S) correspondientes a cada una de las muestras y para cada una de las determinaciones realizadas.

De esta forma se pudo calcular el coeficiente de variación o desviación estándar relativa (RSD) y el intervalo del 95% de confianza, que expresa que el verdadero valor medio con un 95% de probabilidad se encontrara comprendido entre sus límites.

Se calculó también la desviación estándar media (S_m), y a partir de ella, el correspondiente error relativo (E.R.), mediante las siguientes expresiones matemáticas:

Desviación estándar media:
$$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Coeficiente de variación:
$$C.V. = \frac{\sigma}{x}$$

Error relativo:
$$E.R. = \frac{\sigma_m \cdot t}{x}$$

El E.R. y el C.V., como medidas de dispersión, dan idea de la distribución de los datos de un análisis. Para un intervalo del 95% de confianza ($\alpha= 0.05$), el verdadero valor medio con un 95% de probabilidad se encontrará entre los límites

$$x \pm S_m \cdot t$$

Para $n = 7$

y $\alpha = 0,05$

el coeficiente “t” (Student) tiene un valor de 2,450

Los resultados obtenidos en nuestro estudio para las siete medidas efectuadas en cada una de las muestras seleccionadas se indican en las siguientes tablas:

Tabla 26. Cálculo de la repetibilidad del método de determinación de Zn para la carne.

Estudio precisión	Mussel tissue CRM 278	Pechuga de pollo	Hígado de cerdo
(X_m)	76,24	7,90	49,69
(S)	5,50	0,49	0,58
(S_m)	2,07	0,18	0,22
($X_m \pm S_m \cdot t$)	76,24 \pm 5,09	7,90 \pm 0,45	49,69 \pm 0,54
(E.R., %)	6,65	5,58	1,08
(C.V., %)	7,21	6,23	1,18

(*) Valores en mg

Tabla 27 Cálculo de la repetibilidad del método de determinación de Zn para el pescado.

Estudio de precisión	Mussel Tissue CRM 278	Herrera
(X_m)	76,24	26,17
(S)	5,50	0,59
(S_m).	2,07	0,22
($X_m \pm S_m \cdot t$)	76,24 \pm 5,09	26,17 \pm 0,54
(E.R., %)	6,65	2,09
(C.V., %)	7,21	2,27

Tabla 28 Cálculo de la repetibilidad del método de determinación de Zn para la leche.

Estudio precisión	Skimmed milk powder	Leche semidesnatada + Ca	Leche entera UHT
(X_m)	50,485	4,710	3,900
(S)	2,226	0,290	0,113
(S_m)	0,841	0,109	0,042
($X_m \pm S_m \cdot t$)	50,480 \pm 2,060	4,710 \pm 0,267	3,900 \pm 0,104
(E.R., %)	4,080	5,600	2,600
(C.V., %)	4,410	6,160	2,900

Tabla 29. Cálculo de la repetibilidad del método de determinación de Zn para los derivados lácteos.

Estudio precisión	Skimmed milk powder	Queso 5	Queso 7
(X_m)	50,485	68,470	41,020
(S)	2,226	1,080	0,802
(S_m)	0,841	0,408	0,303
($X_m \pm S_m \cdot t$)	50,480 \pm 2,060	68,470 \pm 0,999	41,020 \pm 0,742
(E.R., %)	4,080	1,400	1,800
(C.V., %)	4,410	1,570	1,950

Tabla 30. Cálculo de la repetibilidad el método en la determinación de Zn para cereales y legumbres.

Estudio precisión	Citrus Leaves SRM 1572	Alubias	Macarrones
(X_m)	0,548	28,520	11,960
(S)	0,061	0,361	0,868
(S_m)	0,023	0,136	0,328
($X_m \pm S_m \cdot t$)	0,548 \pm 0,057	28,520 \pm 0,333	11,960 \pm 0,803
(E.R., %)	10,400	1,160	6,720
(C.V., %)	11,270	1,270	7,260

Tabla 31. Cálculo de la repetibilidad del método en la determinación de Zn para frutas y verduras.

Estudio precisión	Patrón	Albaricoque	Guisante
(X_m)	0,548	0,105	0,213
(S)	0,061	0,005	0,004
(S_m)	0,023	0,002	0,001
($X_m \pm S_m \cdot t$)	0,548 \pm 0,057	0,105 \pm 2,452	0,213 \pm 0,003
(E.R., %)	10,400	4,660	0,018
(C.V., %)	11,270	5,240	2,010

Tabla 32. Cálculo de la repetibilidad del método en la determinación de Zn para los suelos.

Estudio precisión	River sediment SRM 2704	Suelo	Sedimento
(X_m)	424,700	110,100	148,800
(S)	6,300	3,600	3,100
(S_m)	2,380	1,360	1,170
($X_m \pm S_m \cdot t$)	424,700 \pm 5,831	110,100 \pm 3,332	148,800 \pm 2,866
(E.R., %)	1,370	3,020	1,920
(C.V., %)	1,480	3,270	2,080

Tabla 33. Cálculo de la repetibilidad del método en la determinación de Zn para muestras de aguas de mar y riego.

Estudio precisión	Agua del mar	Agua de riego
(X _m)	0,032	0,032
(S)	8,160E ⁻⁴	5,340 E ⁻⁴
(S _m)	7,550 E ⁻⁴	2,020 E ⁻⁴
X _m ± S _{m.t}	0,032 ± 0,001	0,0320 ± 0,0005
(E.R., %)	5,780	1,550
(C.V., %)	2,500	1,670

Tabla 34. Cálculo de la repetibilidad del método en la determinación de Zn para muestras de bebidas.

Estudio precisión	Vino tinto	Vino Moscatell
(X _m)	1,774	1,260
(S)	0,127	0,239
(S _m)	0,048	0,090
(X _m ± S _{m.t})	1,774±0,118	1,260±0,220
(E.R., %)	6,650	17,570
(C.V., %)	7,190	18,970

3.3. Medida de la concentración de Zn mediante EAA-por atomización electrotérmica (horno de grafito).

Actualmente existen multitud de métodos de determinación de Zn en alimentos y bebidas. Como hemos subrayado anteriormente uno de los más empleados es el de espectrometría de absorción atómica en sus dos variedades de atomización a la llama o al horno de grafito. De los dos procedimientos, el utilizado normalmente debido a su menor costo y alta precisión y reproducibilidad es el de EAA a la llama, para concentraciones de Zn elevadas en los alimentos y bebidas; sin embargo cuando los niveles de Zn presentes en las muestras analizadas son bajos e inferiores al límite de

detección de esta técnica analítica, del orden de ppb como hemos observado en algunas muestras de agua, se hace necesario la utilización del segundo método de EAA con atomización electrotérmica, cuyas condiciones instrumentales de medida son las siguientes:

Tabla 35. Condiciones instrumentales de medida para EAA con atomización electrotérmica.

Fuente de radiación: Lámpara de cátodo hueco de Zn

Longitud de onda: 213,9 nm

Resolución de rendija: 0,7 nm

Lectura: altura de pico: Abs/s

Número de determinaciones por muestra : 3

Retraso de aparición de señal: 1 s

Tiempo de integración: 4 s

Gas portador: Argon (99,999% de pureza)

Técnica de medida: 10 µl de muestra de agua acidificada (1,3% de HNO₃) + 10 µl de modificador de matriz [Mg (NO₃)₂ en HNO₃ 0,5 M]

Corrector de fondo empleado: deuterio

Para la determinación de Zn en las muestras de agua fue necesario una optimización previa de un programa específico de tiempos y temperaturas según se establece en la tabla 36.

Tabla 36. Programa tiempo/temperatura para la medida de Zn en aguas mediante EAA con horno de grafito.

Etapa	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	Flujo (ml/min)
Desecación	60	130	300
Calcinación	40	600	300
Atomización	4	1800	0

El método de medida consistió en la inyección directa de 10 μl de cada una de las muestras de agua acidificadas con HNO_3 (1,3%) en el interior de la plataforma de L'Vov del tubo de grafito pirolizado dispuesto en el sistema de atomización electrotérmico del espectrofotómetro. Tras una segunda inyección de 10 μl del modificador de matriz constituido por $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 0,5 M, se sometieron al programa de determinación anteriormente descrito obteniéndose un valor de absorbancia que se correlaciona con la concentración del analito presente en la muestra, tras comparación con la recta de calibración lineal.

4. Resultados del análisis de muestras.

En las siguientes tablas se indican las concentraciones de Zn referidas a peso fresco de fracción comestible obtenidos para cada grupo de alimentos.

Tabla 37. Contenido en Zn en muestras de carnes y embutidos.

Muestra	Concentración media ($\mu\text{g/g}$)
Jamón york	17,98
Chorizo	26,59
Chopped	17,08
Salchichón	31,24
Mortadela	10,51
Jamón serrano	27,63
Riñón cerdo	30,52
Corazón pollo	20,13
Chuleta cerdo	23,37
Trasera conejo	26,72
Pulmón cordero	20,17
Filete cordero	28,79
Filete de ternera	35,81
Delantero conejo	14,32
Pechuga pollo	10,45
Pulmón cerdo	13,69
Hígado cerdo	71,01
Riñón conejo	13,67
Sesos conejo	12,51
Hígado pollo	33,42
Lengua conejo	26,72
Hígado conejo	38,45
Corazón cerdo	17,24
Sesos cerdo	10,55
Total de muestras	23,95

Tabla 38. Contenido en Zn en pescados.

Muestra	Concentración media (µg/g)
Pulpo (<i>Octopus vulgaris</i> Lamarck.)	10,85
Gibia (<i>Sepia officinalis</i> L.)	11,02
Camarón (<i>Crangon vulgaris</i>)	8,99
Araña (<i>Trachinus araneus</i> L.)	6,13
Chanquete (<i>Aphya minuta</i> Risso.)	5,36
Rape (<i>Lophius piscatorius</i> L.)	5,02
Pescada (<i>Merluccius merluccius</i> L.)	5,06
Rubio (<i>Aspitrigla cuculus</i>)	4,74
Boquerón (<i>Engraulius encrasicolus</i> L.)	9,35
Gallineta (<i>Helicolenus dactylopterus</i>)	5,89
Lisa (<i>Mugil sp.</i>)	7,21
Jureles (<i>Trachurus trachurus</i> L.)	7,76
Aguja (<i>Belone belone</i> L.)	5,77
Salmonetes (<i>Mullus surmuletus</i>)	4,97
Bacaladilla (<i>Gadus poutassou</i> L.)	4,89
Bonito (<i>Sarda sarda</i> Bloch.)	15,55
Sardina (<i>Sardina pilchardus</i> Valb.)	16,11
Chipirones (<i>Allotenthys media</i> L.)	8,29
Galera (<i>Squilla mantis</i>)	13,44
Caballa (<i>Escomber scombrus</i> L.)	7,46
Cinta (<i>Cepola rubescens</i>)	7,60
Potas (<i>Illex coindetti</i>)	10,94
Calamares (<i>Loligo vulgaris</i> Lamarck.)	7,88
Boga (<i>Boops boops</i> L.)	14,53
Brótola (<i>Urophycis bleunioides</i>)	3,15
Cazón (<i>Galeorhinus galeus</i> L.)	3,91
Japuta (<i>Brama raii</i>)	4,29
Emperador (<i>Luvarus imperialis</i> Ver.)	6,38
Gamba (<i>Parepenaeus longirostris</i> Leach.)	9,73
Quisquilla (<i>Leander serratus</i>)	10,81
Besugo (<i>Pagellus cantabricus</i> Asso.)	4,26
Gamba roja (<i>Aristeus antennatus</i>)	9,41
Lenguado (<i>Solea solea</i>)	4,26
Herrera (<i>Sparus aurata</i>)	6,50
Mejillón (<i>Mytilus edulis</i>)	4,18
Almeja de carril (<i>Venerupis decussatus</i>)	8,01
Almejas (<i>Tapes rhomboides</i>)	12,36
Total de muestras	7,78

- Los nombres científicos han sido tomados de la “Guía de especies de pescados y mariscos de consumo usual en España” Publicada por el Ministerio de Sanidad y Consumo, 1988.

Tabla 39. Contenido en Zn en muestras de leche.

Muestra	Concentración media (mg/l)
Entera pasteurizada	3,70
Entera U.H.T.	4,00
Semidesnatada+Ca	5,05
Semidesnat. no Ca	4,33
Desnatada no Ca	4,12
Desnatada + Ca	5,28
Total de muestras	4,60

Tabla 40. Contenido en Zn en muestras de leches mineralizadas mediante mufla.

Muestra	Concentración media (mg/l)
Entera pasteurizada	3,54
Entera U.H.T.	4,12
Semidesn. + Ca	5,76
Semidesnatada no Ca	4,57
Desnatada no Ca	3,83
Desnatada + Ca	5,01
Total de muestras	4,47

Tabla 41 Contenido en Zn en muestras de huevo y derivados lácteos.

Muestras	Concentración media (µg/g)
Queso	27,56
Yogourt natural	4,25
Natillas	4,05
Flan huevo	4,21
Petit suisse	10,11
Huevo	14,90
Total muestras	15,73

Tabla 42. Contenido en Zn en muestras de legumbres.

Muestras	Concentración media ($\mu\text{g/g}$)
Garbanzos (<i>Cicer arietinum</i>)	33,48
Alubias (<i>Phaseolus Multiglorus</i>)	35,40
Lentejas (<i>Lens esculenta</i>)	17,24
Total de muestras	28,70

Tabla 43. Contenido en Zn en muestras de cereales.

Muestras	Concentración media ($\mu\text{g/g}$)
Arroz	17,44
Macarrones	17,93
Fideos	13,27
Spagetti	17,24
Galletas	15,54
Pan	16,18
Pan rayado	8,92
Pan tostado	11,52
Harina	14,32
Total de muestras	14,70

Tabla 44. Contenido en Zn en muestras de frutos secos.

Muestras	Concentración media (µg/g)
Almendra (<i>Amigdalus communis</i>)	29,77
Cacahuete (<i>Arachis hypogea</i>)	31,88
Nuez (<i>Juglans</i>)	36,57
Pipa de girasol (<i>Helianthus annuus</i>)	64,62
Pistacho (<i>Pistacia vera</i>)	33,42
Total de muestras	39,29

* Los nombres científicos han sido tomados del libro “Frutos de la tierra, Atlas de las plantas alimenticias”(Bianchini y col. 1974)

Tabla 45. Contenido en Zn en muestras de hortalizas y verduras.

Muestras	Concentración media (µg/g)
Guisante (<i>Pisum sativum L.</i>)	4,77
Rábano (<i>Raphanus radícula</i>)	0,44
Pimiento rojo (<i>Capsium frutescens</i>)	1,56
Pimiento verde (<i>Capsium annuum</i>)	0,94
Cebolla (<i>Allium cepa</i>)	1,16
Champiñón natural (<i>Psalliota hortensis</i>)	3,61
Champiñón lata (<i>Psalliota hortensis</i>)	3,89
Espárrago (<i>Asparagus officinale L.</i>)	7,62
Berengena (<i>Solanum melongena</i>)	1,40
Boniato (<i>Ipomea batatas</i>)	2,30
Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	1,05
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	10,53
Lechuga (<i>Lactuca scariola</i>)	0,59
Seta (<i>Pleurotus ostreatus</i>)	4,98
Judía (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	2,50
Tomate (<i>Lycopersicum sculentum</i>)	1,75
Patata (<i>Solanum tuberosum</i>)	2,71
Coliflor (<i>Brassica oleracea var.botrytis</i>)	3,29
Haba (<i>Vicia faba</i>)	7,34
Apio (<i>Apium graveolens</i>)	1,11
Calabaza (<i>Lagenaria vulgaris</i>)	1,59
Col (<i>Brassica oleracea</i>)	2,04
Total de muestras	3,05

Tabla 46. Contenido en Zn en muestras de frutas.

Muestras	Concentración media (µg/g)
Plátano (<i>Musa paradisiaca</i>)	1,04
Kiwi (<i>Actinidia chinensis</i>)	0,60
Aguacate (<i>Persea gratissima</i>)	2,95
Granada (<i>Prunica paradisiaca</i>)	5,68
Naranja (<i>Citrus aurantium var. dulcis</i>)	0,91
Cereza (<i>Prunus auium</i>)	1,39
Fresa (<i>Fragaria vesca</i>)	4,09
Albaricoque (<i>Prunus armeniaca L.</i>)	1,76
Manzana (<i>Malus communis</i>)	0,36
Ciruela (<i>Prunus domestica</i>)	0,19
Melón (<i>Cucumis melo</i>)	0,63
Uva (<i>Vitis vinífera</i>)	0,31
Pera (<i>Pyrus communis</i>)	0,57
Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>)	5,48
Higo (<i>Ficus carica</i>)	3,58
Chirimoya (<i>Annona cherimola</i>)	0,80
Aceituna (<i>Olea europea</i>)	1,72
Melocotón (<i>Prunus persicaL.</i>)	1,13
Limón (<i>Citrus limonum</i>)	1,80
Total muestras	1,89

* Los nombres científicos han sido cogidos del libro “Frutos de la Tierra, Atlas de las plantas alimenticias”, (Bianchini y col. 1974).

Tabla 47. Contenido en Zn en muestras de suelos, sedimentos y arenas.

Muestras	Concentración media ^a (µg/g)
Suelos	121,31
Sedimentos	145,77
Arenas	69,3
Total de muestras	121,16

^a: concentración de Zn referida a peso seco.

Tabla 48. Contenido de Zn en muestras de aguas.

Muestras	Concentración media (mg/L)
Aguas potables	0,080
Aguas residuales	0,032
Aguas riego	0,035
Aguas de mar	0,023
Total muestras	0,042

Tabla 49. Contenido en Zn en muestras de bebidas

Muestras	Concentración media (mg/L)
Whisky	0,67
Ginebra	0,50
Ron	0,62
Vino	1,35
Vinagre	0,75
Cerveza	0,51
Refresco	0,67
Zumo	0,93
Brandy	1,05
Licor con alcohol	0,93
Licor sin alcohol	0,61
Total muestras	0,78

Tabla 50. Contenido de Zn en otros alimentos.

Muestras	Concentración media ($\mu\text{g/g}$)
Chocolate	5,23
Azúcar	0,53
Café	1,25
Té	8,45
Aceite de oliva	0,46
Sal	0,88
Miel	0,82
Total muestras	3,60

Estudio Estadístico

El estudio estadístico de los datos obtenidos en el presente trabajo, ha sido establecido a partir de los resultados de la concentración de Zn obtenidos en los suelos, sedimentos y arenas, aguas potables, residuales, de riego y marinas; bebidas; leches, caña de azúcar, frutas y verduras. Todas estas muestras pertenecen a la zona Sur de la Provincia de Granada, y son las únicas sobre las cuales se ha podido aplicar el estudio a fin de apreciar o no la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre diferentes niveles de una variable.

El paquete estadístico empleado a tal efecto ha sido el Statgraphics Plus 2.0, del cual nos hemos servido de los análisis estadísticos correspondientes a los métodos paramétricos mediante el A.N.O.V.A. de una sola vía, con un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$), y los métodos no paramétricos, en caso de no poder aplicar los paramétricos, mediante el Test de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia del 99% ($p < 0,01$).

Previamente a la aplicación de un método paramétrico o no paramétrico se ha establecido la aleatoriedad de los resultados experimentales obtenidos, y se ha comprobado en primer lugar la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Barlett con un nivel de significancia ($p > 0,05$), y en segundo lugar la normal distribución de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov con un nivel de significancia ($p > 0,05$).

Además, también se han realizado análisis de regresión entre dos diferentes variables experimentales a fin de establecer el tipo de correlación (lineal, multiplicativa, exponencial y recíproca) establecida entre las mismas.

1. Aplicación del análisis estadístico en carnes

Estudio comparativo entre los niveles de Zn de vísceras, músculo y embutidos.

La aplicación del ANOVA de una vía ha sido posible al haberse obtenido un resultado del test de Bartlett de $p = 0,1422$ ($p > 0,05$) y del test de Kolmogorov-Smirnov de $p = 0,6482$ ($p > 0,05$). Asimismo se ha obtenido el histograma de frecuencias para los valores de concentración de Zn (gráfica nº10) y la recta de probabilidad de distribución normal de los resultados (gráfica nº11). La aplicación del test de la t de Student dió un valor de $p = 0,8545$ ($p > 0,05$). Asimismo tras la observación del test de rango múltiple obtenido a partir del ANOVA se aprecia la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de Zn en los distintos tipos de muestra de carne considerados (Tabla 51).

Tabla 51. Análisis de la varianza para el estudio de la influencia del tipo de carne sobre las concentraciones de Zn (TEST ANOVA 1)

Análisis de varianza					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	d.f.	Media de cuadrados	F - ratio	Nivel de significancia
Entre grupos	57,3217	2	28,66083	0,158	0,8545
En el grupo	3798,343	21	180,87348		
	1				
Total (corregido)	3855,664	23			
	8				
C. Ningún valor ha sido excluido					
Test de rango múltiple					
D. Método intervalos de confianza del 95% sobre los valores medios					
Muestra	n	Media	Grupos homogéneos		
Embutidos (E)	6	21,841607	X		
Músculo (M)	6	22,825000	X		
Vísceras (V)	12	25,345000	X		
Contraste	Diferencia	±	Límites		
E – V	- 3,50333		13,9877		
E – M	- 0,98333		16,1515		
V – M	2,5200		13,9877		
* denota diferencias estadísticamente significativas					

2.-Aplicación del análisis estadístico en pescados

Estudio comparativo entre los niveles de Zn en pescados, mariscos y crustáceos.

No ha sido posible la aplicación del ANOVA de una vía al haberse obtenido un resultado del test de Bartlett de $p = 0,001$ ($p < 0,05$), lo que establece la no homogeneidad de las varianzas. Por lo tanto, se ha aplicado el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, habiéndose obtenido un valor de significancia de $p = 0,028$ ($p > 0,01$), lo que denota la no existencia de diferencias estadísticamente significativas de las concentraciones de Zn entre pescados, moluscos y crustáceos.(Tabla 52). El test de Kolmogorov-Smirnov dió un resultado de $p = 0,5862$ ($p > 0,05$), lo que supone la distribución normal de los resultados.

Tabla 52. Análisis de la varianza para el estudio de la influencia de tipo de especie marítima sobre la concentración de Zn (TEST KRUSKALL-WALLIS)

Análisis de varianza		
Análisis de Kruskal-Wallis		
Muestra	n	Rango medio
Pescados(P)	26	16,2692
Moluscos (M)	8	25,6250
Crustáceos (C)	4	28,2500
Test estadístico = 7,1081		Nivel de significancia = 0,0286

3.- Aplicación del análisis estadístico a leches

Estudio comparativo de los niveles de Zn con respecto al tratamiento tecnológico en las leches.

El test de Kolmogorov-Smirnov dió un resultado de $p = 0,1498$ ($p > 0,05$), lo que supone una normal distribución de los resultados.

Se ha obtenido el histograma de frecuencias de las concentración de Zn en leches (Gráfica 13).

Tras comprobar para el test de Bartlett un valor de $p = 6,04 \times 10^{-5}$ ($p < 0,05$), se aplicó el test no paramétrico de Kruskall-Wallis ya que no se cumple el segundo supuesto del ANOVA de la homogeneidad de las varianzas.

Hemos obtenido un valor en el test de Kruskall-Wallis de $p = 5,14 \times 10^{-3}$ ($p < 0,05$), (Tabla 53), por tanto podemos decir que existen diferencias estadísticamente significativas según el tratamiento tecnológico de higienización.

Tabla 53. Análisis de la varianza para el estudio de la influencia del método de higienización en la leche sobre la concentración de Zn (TEST DE KRUSKALL-WALLIS).

Análisis de varianza		
Análisis de Kruskall-Wallis		
Muestra	n	Rango medio
ENPA *	10	6,800
UHT *	10	14,200
Test estadístico = 7,8287		Nivel de significancia = $5,1421 \times 10^{-3}$

* ENPA (entera pasteurizada)

- UHT (esterilizada)

Estudio comparativo de los niveles de Zn con respecto a los distintos tipos de leches.

No ha sido posible la aplicación del ANOVA de una vía al haberse obtenido un resultado del test de Bartlett de $p = 4,72 \times 10^{-6}$ ($p < 0,05$) lo que supone la no homogeneidad de las varianzas, aunque sí que existe una normal distribución de los resultados ya que tras la aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov obtenemos un valor de $p = 0,1426$ ($p > 0,05$).

Se ha aplicado por tanto el análisis no paramétrico de Kruskall-Wallis, habiéndose determinado un nivel de significancia por muestra ($p < 0,01$), tal y como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 54. Análisis de la varianza para el estudio de la influencia del tipo de leche sobre la concentración de Zn (TEST DE KRUSKALL-WALLIS)

Análisis de varianza		
Análisis de Kruskall-Wallis		
Muestra	n	Rango medio
ENPA *	4	4,3750
EUHT *	4	7,2500
SNCA *	4	14,500
DNCA *	4	8,1250
DECA *	4	19,500
SDCA *	4	21,2500
Test estadístico = 19,3909		Nivel de significancia = $1,625 \times 10^{-3}$

DECA*: Leche desnatada mas calcio.
 SDCA*: Leche semidesnatada mas calcio.
 ENPA*: Leche entera pasteurizada.
 EUHT*: Leche entera uperizada.
 SNCA*: Leche semidesnatada no calcio.
 DNCA*: Leche desnatada no calcio.

Existen por tanto diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de Zn para los distintos tipos de leches (tal y como se puede observar en la tabla 54). Estas diferencias son más apreciables en las leches desnatadas y semidesnatadas

respectivamente. El proceso de desnatado, que incluye una eliminación total de la grasa en la leche y una reposición posterior de parte de ella para el caso de las leches semidesnatadas, influye como es lógico en el contenido de Zn.

De la misma manera podemos decir que influye la adición de Ca en la concentración de Zn en la leche tal y como vemos en la tabla.

Estudio de la influencia del desnatado sobre la concentración de Zn

La aplicación del ANOVA de una vía ha sido posible al haberse obtenido un resultado del test de Bartlett de $p = 0,294$ ($p > 0,05$) y del test de Kolmogorov-Smirnov de $p = 0,814$ ($p > 0,05$). La aplicación del test de la t de student dió un valor de $p = 0,0014$ ($p < 0,05$).

Podemos decir que el proceso de desnatado influye significativamente, como es de esperar, en el contenido de Zn en la leche. Concretamente podemos observar que en la leche U.H.T y en la desnatada, el contenido en Zn es inferior al de la leche semidesnatada. (Tabla 55).

Tabla 55. Análisis de la varianza para el estudio de la influencia del proceso de desnatado sobre la concentración de Zn (TEST ANOVA 1)

Análisis de varianza					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	d.f.	Media de cuadrados	F.ratio	Nivel de significancia
Entre grupos	0,5461	2	0,2730	8,553	0,0013
En el grupo	0,8620	27	0,0319		
Total (corregido)	1,4081	29			
E. Han sido excluidos 10 valores					
Test de rango múltiple					
F. Método intervalos de confianza del 95% sobre los valores medios					
Muestra	n	Media	Grupos homogéneos		
Entera	10	4,0050	X		
Desnatada	10	4,1270	X		
Semidesnatada	10	4,3320	X		
Contraste	Diferencia	±	Límites		
E – SD	- 0,3270		0,1640 *		
E – D	- 0,1220		0,1640		
SD - D	0,2050		0,1640 *		
* denota diferencias estadísticamente significativas					

Estudio de la influencia del enriquecimiento en calcio sobre el contenido en Zn de la leche.

Se ha aplicado el A.N.O.V.A. de una vía al haberse obtenido un resultado del test de Bartlett de $p = 0,943$ ($p > 0,05$) lo que supone la no homogeneidad de las varianzas, aunque sí que existe una normal distribución de los resultados ya que tras la aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov obtenemos un valor de $p = 0,128$ ($p > 0,05$) (Tabla 56).

De la observación de todos estos datos se deduce que el enriquecimiento en calcio influye significativamente en el contenido en Zn de la leche. (Gráfica 14)

Tabla 56. Análisis de la varianza para el estudio del enriquecimiento en Ca de la leche sobre la concentración de Zn (TEST ANOVA 1).

Análisis de varianza					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	d.f.	Media de cuadrados	F.ratio	Nivel de significancia
Entre grupos	8,9074	1	8,9074	32,794	0,000
En el grupos	12,2226	45	0,2716		
Total (corregido)	21,1301	46			
G. Ningún valor ha sido excluido					
Test de rango múltiple					
H. Método intervalos de confianza del 95% sobre los valores medios					
Muestra	n	Media	Grupos homogéneos		
No enriquecida (NC)	20	4,2295	X		
Enriquecida (EC)	27	5,1100	X		
Contraste	Diferencia	±	Límites		
EC – NC	- 0,8805		0,30975 *		
* denota diferencias estadísticamente significativas					

Estudio de la influencia del contenido en grasa de la leche sobre la concentración de Zn

La aplicación del A.N.O.V.A de una vía ha sido posible al haberse obtenido valores del test de Bartlett de $p = 0,943$ ($p > 0,05$) y del test de Kolmogorov Smirnov de $p = 0,792$ ($p > 0,05$).

La aplicación del test paramétrico de la t de student ha dado un valor de $p = 0,349$ ($p > 0,01$), lo que implica que el contenido en grasa de las leches no influye significativamente en la concentración de Zn.

Estudio estadístico respecto al método de mineralización

La aplicación del ANOVA de 1 vía ha sido posible al haberse obtenido valores del test de Bartlett de $p = 0,97$ ($p > 0,05$) y del test de Kolmogorov-Smirnov de $p = 0,178$ ($p > 0,05$).

La aplicación del test paramétrico de la t de Student ha dado un valor de $p = 0,7036$ ($p > 0,05$), lo que implica que el método de mineralización no influye en la concentración de Zn. (Gráfica 15).

Estudio de la influencia del tipo de muestra en la concentración de Zn en productos lácteos

La aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov dió un resultado de $p = 0,000$ ($p < 0,05$) lo que implica una normal distribución de los resultados. Sin embargo al aplicar el test de Bartlett obtenemos un valor de $p = 6,29 \times 10^{-6}$ lo que demuestra que no existe homogeneidad de varianzas y por tanto aplicaremos el test de Kruskal-Wallis y obtenemos un valor de $p = 7,88 \times 10^{-6}$ ($p < 0,01$), (Tablas 57, 58 y 59).

Los resultados establecen que las concentraciones de Zn determinadas en las muestras de leche y otros productos lácteos son significativamente inferiores a los

encontrados en las muestras de queso.

Tabla 57. Análisis de la varianza para el estudio de la influencia del tipo de producto lácteo sobre la concentración de Zn (TEST DE KRUSKALL-WALLIS)

Análisis de varianza		
Análisis de Kruskall-Wallis		
Muestra	n	Rango medio
Leche (L)	63	33,7778
Quesos (Q)	9	72,000
Otros (O)	4	37,5000
Test estadístico = 23,6042		Nivel de significancia = $7,8886 \times 10^{-6}$

Tabla 58. Análisis de la varianza para el estudio de la influencia del tipo de producto lácteo sobre la concentración de Zn (TEST ANOVA 1).

Análisis de varianza					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	d.f.	Media de cuadrados	F.ratio	Nivel de significancia
Entre grupos	4221,046	2	2110,5231	315,60	0,000
En el grupo	3	73	6,6872		
	488,1672				
Total (corregido)	4709,213	75			
	5				
I. Ningún valor ha sido excluido					
Test de rango múltiple					
J. Método intervalos de confianza del 95% sobre los valores medios					
Muestra	n	Media	Grupos homogéneos		
Leche (L)	63	4,4212	X		
Queso (Q)	4	5,6525	X		
Otros (O)	9	27,5444	X		
Contraste	Diferencia	±	Límites		
L – Q	- 23,1232		1,83697 *		
L – O	- 1,23123		2,65806		
Q - O	21,8919		3,09776 *		
* denota diferencias estadísticamente significativas					

Tabla 59: Concentración y desviación estándar de Zn en distintas muestras de productos lácteos.

Tipo Muestra	n	[Zn] ± DE (ppm)
Leche	61	4,43 ± 0,67
Queso	9	27,57 ± 7,37
Otros lácteos	4	5,65 ± 2,97

4. Aplicación del estudio estadístico a frutas y vegetales.

Tras la comprobación de la existencia de una distribución normal de los resultados y de la homogeneidad de las varianzas, se aplicó el A.N.O.V.A. por el test de la *t* de student obteniéndose un valor de $p > 0,05$ (Gráfica 16).

Este resultado expresa que las concentraciones de Zn en hortalizas son superiores aunque no significativamente distintas a las verduras y frutas.

Tabla 60. Concentración de Zn y desviación estándar en frutas, verduras y hortalizas

Tipo Muestra	n	[Zn] ± DE (ppm)
Fruta	19	1,84 ± 1,70
Verdura	5	1,90 ± 1,07
Hortalizas	17	3,38 ± 2,83

Estudio comparativo entre los niveles de Zn en la caña de azúcar y el área de procedencia.

No ha sido posible la aplicación del ANOVA de una vía al haberse obtenido un resultado del test de Bartlett de $p = 7,9 \cdot 10^{-3}$ ($p < 0,05$), lo que establece la no homogeneidad de las varianzas. Por lo tanto, se ha aplicado el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, habiéndose obtenido un nivel de significancia de $p = 0,5152$ ($p > 0,01$), lo que denota la no existencia de diferencias significativas entre el contenido de Zn de las muestras de caña tomadas del área industrializada respecto a las de las no industrializadas. El test de Kolmogorov-Smirnov dió un resultado de $p = 0,3833$ ($p > 0,05$).

En las gráficas 17 y 18 se incluyen el histograma de frecuencias y la recta de probabilidad de distribución normal de los valores de Zn obtenidos.

5. Aplicación del análisis estadístico en suelos, sedimentos y arenas

Estudio comparativo de los niveles de Zn en suelos de áreas industrializadas frente a las no industrializadas.

La ejecución del test de Kolmogorov-Smirnov dió un resultado de $p = 0,2797$, ($p > 0,05$) lo que implica la normal distribución de los datos.

Sin embargo, la aplicación del test de Bartlett nos dió un resultado de $p = 1,40 \cdot 10^{-4}$, ($p < 0,05$), lo que demuestra la no homogeneidad de las varianzas, por tanto no hemos podido aplicar el ANOVA de una 1 vía sino el test de Kruskal-Wallis (no paramétrico), habiéndose obtenido un nivel de significancia de $p = 2,53 \cdot 10^{-6}$ ($p < 0,01$), lo que denota la existencia de diferencias estadísticamente significativas de las concentraciones de Zn en los suelos con respecto a la actividad industrial. (Tablas 61 y 62).

Tabla 61. Análisis de la varianza para el estudio de la influencia del tipo de área industrializada o no sobre la concentración de Zn en el suelo (TEST DE KRUSKALL-WALLIS)

Análisis de varianza		
Análisis de Kruskall-Wallis		
Muestra	n	Rango medio
No industrializada (NI)	20	11,8000
Industrializada (I)	12	24,3333
Test estadístico = 13,3879		Nivel de significancia = $2,5326 \times 10^{-6}$

Tabla 62. Valores de concentración y D.E. en suelos de áreas industrializadas y no industrializadas

Tipo de áreas	n	Zn \pm DE
Área industrializada	12	157,31 \pm 46,06
Área no industrializada	20	99,72 \pm 15,36

Influencia de la actividad industrial en el pH.

La aplicación del ANOVA de 1 vía ha sido posible al haberse obtenido valores del test de Bartlett de $p = 0,5962$ ($p > 0,05$) y del test de Kolmogorov-Smirnov de $p=0,5011$ ($p > 0,05$).

Tras la aplicación del test de la t de Student para dos medias independientes, el nivel de significancia obtenido, $p = 0,0286$ ($p < 0,05$), expresa la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los valores de pH de los suelos y el área en la que estos se encuentran. (Tabla 63).

Se han observado niveles más elevados de pH en los suelos no industrializados que en los industrializados, lo cual implica la acidificación significativa del suelo incluido en la zona industrializada, debido probablemente a la presencia de residuos y a la utilización de distintos productos químicos en las industrias situadas en esta zona.

Tabla 63. Valores de pH y D.E. en suelos de áreas industrializadas y no industrializadas

Tipo área	n	pH ± DE
Área industrializada	12	7,42 ± 0,23
Área no industrializada	20	7,63 ± 0,26

Análisis estadístico de regresión entre los niveles de Zn en suelos y el valor del pH

Se ha realizado un análisis estadístico de regresión simple entre la concentración de Zn en las 32 muestras de suelo, y el valor de pH determinado en cada uno de ellos, observándose un ajuste a la función recíproca (Gráfica 19) con la ecuación:

$$1/(\text{Zn,ppm}) = 0,042 + 0,046 (\text{pH})$$

y un $r = 0,4496$.

Tras la aplicación del test de la t se ha obtenido un valor de $p = 0,0046$ ($p < 0,05$), lo que indica la existencia de una correlación inversa estadísticamente significativas entre la concentración de Zn del suelo y los valores de pH (Gráfica 19). Esto viene a corroborar las conclusiones obtenidas anteriormente acerca de que al aumentar la concentración de Zn en la zona industrializada, también se produce una acidificación del suelo, con un descenso significativo del pH en los suelos de dicha área.

Comparación de las concentraciones de Zn en las muestras de suelos, sedimentos y arenas.

Tras la aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov, hemos obtenido un valor de $p = 0,392$ ($p > 0,05$). Sin embargo, tras aplicar el test de Bartlett obtenemos un valor de $p = 0,014$ ($p < 0,05$); por tanto tendremos que aplicar el test de Kruskal-Wallis. Obtenemos un valor tras la aplicación de dicho test de $p = 0,01567$ ($p > 0,01$). Esto nos dice que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de Zn determinadas en las muestras de suelos, sedimentos y arenas. (Tablas 64 y 65).

Tabla 64. Análisis de la varianza para el estudio de la influencia del tipo de suelo sobre la concentración de Zn (TEST DE KRUSKALL-WALLIS)

Análisis de varianza		
Análisis de Kruskal-Wallis		
Muestra	n	Rango medio
Suelo	31	18,9032
Arenas	2	1,5000
Sedimentos	4	28,5000
Test estadístico = 8,31115		Nivel de significancia = 0,01567

Tabla 65. Valores de concentración de Zn en muestras de suelos, sedimentos y arenas.

Tipo Muestra	n	[Zn] ± DE (ppm)
Suelo	32	121,32 ± 40,06
Sedimento	4	145,77 ± 69,3
Arena	2	69,3 ± 0,14

Estudio comparativo de los valores de pH determinados en suelos, sedimentos y arenas.

La aplicación del A.N.O.V.A de una vía ha sido posible al haberse obtenido valores del test de Batlett de $p = 0,472$ ($p > 0,05$) y del test de Kolmogorov-Smirnov de $p = 0,880$ ($p > 0,05$).

Tras la aplicación del test de la t de Student para dos medias independientes, el nivel de significancia obtenido, $p = 0,0026$ ($p < 0,05$) (Tabla 66), expresa la existencia de diferencias estadísticamente significativas en los valores de pH según el tipo de muestra considerada. Así hemos observado que el pH de las muestras de arena es significativamente superior ($p < 0,05$) al encontrado en las muestras de suelo y sedimento tal y como observamos en la tabla 67.

Tabla 66. Análisis de la varianza para el estudio de la influencia del pH del suelo sobre el tipo de suelo (TEST ANOVA 1)

Análisis de varianza					
Fuente de variación	Suma de cuadrados	d.f.	Media de cuadrados	F.ratio	Nivel de significancia
Entre grupos	1,035679	2	0,5178397	7,065	0,0026
En el grupo	4	35	0,0732928		
	2,565246				
	9				
Total (corregido)	3,600926	37			
	3				
K. Ningún valor ha sido excluido					
Test de rango múltiple					
L. Método intervalos de confianza del 95% sobre los valores medios					
Muestra	n	Media	Grupos homogéneos		
Suelo (SU)	32	7,5496875	X		
Sedimentos (SE)	4	7,7050000	X		
Arenas (AR)	2	8,275000	X		
Contraste	Diferencia	±	Límites		

SU – AR	- 0,72531	0,40068 *
SU – SE	- 0,15531	0,29154
AR - SE	0,57000	0,47608 *
* denota diferencias estadísticamente significativas		

Tabla 67: Valores de pH ± DE en muestras de suelos, sedimentos y arenas.

Tipo Muestra	n	pH ± DE
Suelo	32	7,55 ± 0,27
Sedimento	4	7,70 ± 0,33
Arena	2	8,27 ± 0,08

6.- Aplicación del estudio estadístico en aguas.

Tras la aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov se ha obtenido un valor de $p = 1,386 \times 10^{-5}$ ($p < 0,05$) lo que indica que los resultados obtenidos de concentración no siguen una distribución normal. Tampoco existe homogeneidad de las varianzas ya que en el test de Bartlett se ha obtenido un valor de $p = 9,33 \times 10^{-9}$ ($p < 0,05$). Por ello hemos aplicado el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y hemos obtenido un valor de $p = 0,8423$ ($p > 0,01$) lo que nos indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de Zn y los distintos tipos de aguas consideradas (mar,riego,residual o potable).(Tablas 68 y 69).

Tabla 68. Valores de [Zn] ± DE en muestras de aguas.

Tipo Muestra	n	[Zn] ± DE, ppm
Agua potable	13	0,053 ± 0,096
Agua de riego	30	0,030 ± 0,030
Agua residual	6	0,037 ± 0,030
Agua marina	10	0,024 ± 0,016

Tabla 69. Análisis de la varianza para el estudio de la influencia del tipo de agua sobre la concentración de Zn (TEST DE KRUSKALL-WALLIS)

Análisis de varianza		
Análisis de Kruskall-Wallis		
Muestra	n	Rango medio
Marina (M)	10	29,6500
Riego (R)	30	29,9000
Desecho (D)	6	35,5833
Potable (P)	13	27,9231
Test estadístico = 0,829858		Nivel de significancia = 0,842313

7.- Aplicación del análisis estadístico en bebidas.

Estudio comparativo entre los niveles de Zn en los distintos tipos de bebidas.

No ha sido posible la aplicación del ANOVA de una vía al haberse obtenido un resultado del test de Bartlett de $p = 8,15 \times 10^{-3}$ ($p < 0,05$), lo que demuestra la no homogeneidad de las varianzas, y un valor de $p = 0,013$ ($p < 0,05$) en el test de Kolmogorov-Smirnov que indica una distribución anormal de los resultados.

Tras la aplicación del test de Kruskall-Wallis, se ha obtenido un valor de significancia de $p = 2,33 \times 10^{-3}$ ($p < 0,01$), lo que denota la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de Zn de los distintos tipos de bebidas (vino, brandy, whisky, ron, ginebra, licores, refrescos, cerveza o zumos) en la

zona considerada.(Tabla 70).

Al aplicar el test de rango múltiple se observa que las concentraciones de Zn en el whisky eran significativamente inferiores a las determinadas en el vino.

Este resultado nos hace pensar que la uva podría contribuir de manera significativa al aporte de este mineral en esta bebida.

Tabla 70. Análisis de la varianza para el estudio de la influencia de la concentración de Zn sobre el tipo de bebida (TEST KRUSKALL WALLIS)

Análisis de varianza		
Análisis de Kruskall-Wallis		
Muestra	n	Rango medio
Whisky	5	21,700
Ron	8	18,8125
Vino	30	48,1833
Licor con alcohol	9	29,3333
Llicor sin alcohol	4	20,1250
Brandy	4	39,5000
Vinagre	4	30,8750
Refrescos	4	24,7500
Cerveza	1	10,5000
Zumos	1	45,000
Test estadístico = 25,6502		Nivel de significancia = $2,33013 \times 10^{-3}$

Estudio comparativo de las concentraciones de Zn en bebidas alcohólicas destiladas, fermentadas y no alcohólicas.

Al aplicar el test de Kolmogorov-Smirnov nos da como resultado un valor de $p = 0,013$ ($p < 0,05$), lo que nos indica la no existencia de una normal distribución de los resultados, por lo que no se ha podido aplicar el test de la t de Student, además también, y tras la aplicación del test de Bartlett, hemos obtenido un resultado de $p = 0,023$ ($p < 0,05$). Por tanto en su lugar aplicamos el test de Kruskall-Wallis tal y como hemos hecho en otras ocasiones. Obtenemos un valor de $p = 1,3086 \times 10^{-3}$ ($p < 0,01$). Las

concentraciones de Zn en las bebidas alcohólicas fermentadas son significativamente superiores (Tabla 71) a las obtenidas en las destiladas (Tabla 72) (Gráfica 21).

Tabla 71. Análisis de la varianza para el estudio de la influencia del tipo de bebida sobre la concentración de Zn (TEST DE KRUSKALL-WALLIS)

Análisis de varianza		
Análisis de Kruskall-Wallis		
Muestra	n	Rango medio
Destilada (D)	28	27,8929
Fermentada (F)	33	44,8333
No alcohólica (NA)	9	24,9444
Test estadístico = 13,2775		Nivel de significancia = $1,3086 \times 10^{-3}$

Tabla 72: Valores de concentración de Zn \pm DE en muestras de bebidas fermentadas, destiladas y no alcohólicas.

Tipo Muestra	n	[Zn] \pm DE, ppm
Bebidas fermentadas	35	1,24 \pm 0,62
Bebidas destiladas	30	0,76 \pm 0,46
Bebidas no alcohólicas	5	0,73 \pm 0,18

Estudio comparativo entre los niveles de Zn y los distintos tipos de vinos.

En este caso tampoco hemos podido aplicar el ANOVA de una vía ya que hemos obtenido un valor en el test de Bartlett de $p = 4,46 \times 10^{-3}$ ($p < 0,05$), lo que indica la no homogeneidad de las varianzas.

Se ha aplicado por tanto el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, obteniéndose como resultado un valor de $p = 7,97 \times 10^{-3}$ ($p < 0,01$), lo que indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de Zn y el tipo de vino. (Tabla 73).

Tras la aplicación del análisis de rango múltiple podemos observar que estas diferencias se dan entre el vino de Jerez con respecto al vino de La Rioja y al vinagre de vino (Tabla 74).

Tabla 73. Análisis de la varianza para el estudio de la influencia de la concentración de Zn sobre el tipo de vino (TEST DE KRUSKALL-WALLIS)

Análisis de varianza		
Análisis de Kruskal-Wallis		
Muestra	n	Rango medio
Vino Jerez (VJ)	21	21,9286
Vino Rioja (VR)	5	8,9000
Vinos varios (VV)	4	14,3750
Vinagre (VN)	4	8,12500
Test estadístico = 11,834		Nivel de significancia = $7,97403 \times 10^{-3}$

Tabla 74. Test de rango múltiple para el estudio de la influencia del tipo de vino sobre la concentración de Zn

Test de rango múltiple			
M. Método intervalos de confianza del 95% sobre los valores medios			
Muestra	n	Media	Grupos homogéneos
VN	4	0,7592500	X
VR	5	0,7968000	X
VV	4	1,0492500	X X
VJ	21	1,5143810	X
Contraste	Diferencia	±	Límites
VJ – VR	0,71758		0,55558 *
VJ – VV	0,46518		0,60909
VJ – VN	0,75513		0,60909 *
VR – VV	- 0,252055		0,74896
VR – VN	- 0,03755		0,74896
VV – VN	0,29000		0,78947

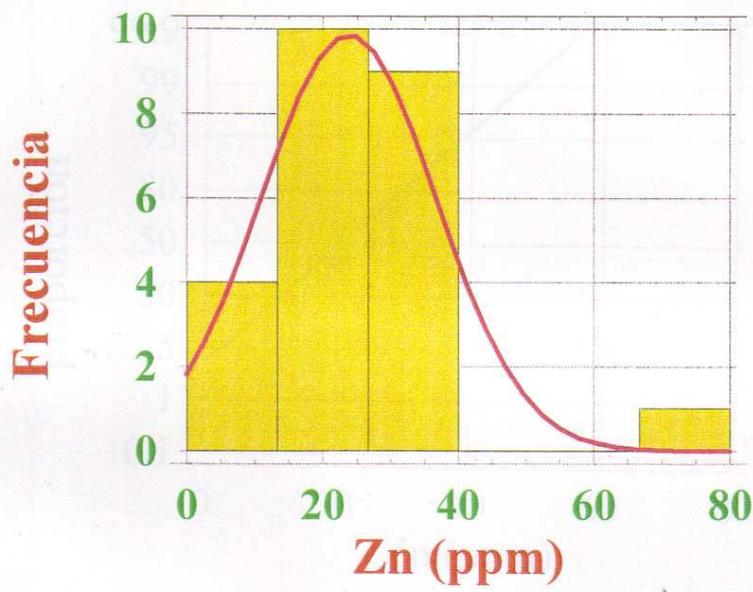
* denota diferencias estadísticamente significativas

Tabla 75. Valores de concentración de Zn en distintas muestras de vino.

Tipo Muestra	n	Media
Vino de Jerez	21	1.514
Vino de Rioja	5	0.796
Vinagre de vino	4	0.750

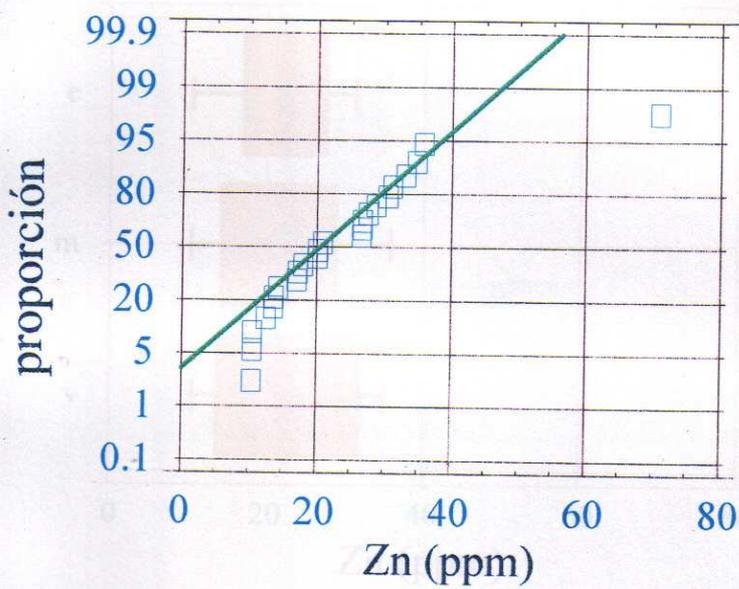
Esto puede deberse a la diferencia en la composición de los suelos. La región de Jerez es rica en yesos (CaCO_3) y es este calcio parece favorecer la mayor concentración de Zn. Este fenómeno también se ponía de manifiesto en el caso de las leches enriquecidas con calcio tal y como hemos observado en el capítulo que recoge la leche.

De otra parte los suelos de La Rioja además de yeso poseen en su composición hierro, limos y arcilla, por lo que la concentración de calcio en estos suelos será menor y por consiguiente también será menor la de Zn.

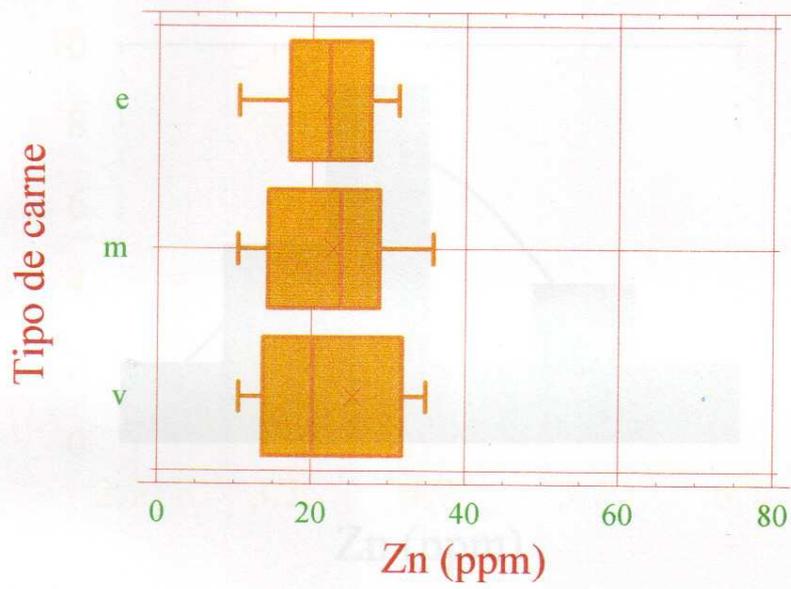


Gráfica 11. Recta de probabilidad normal de las concentraciones de Zn en carnes.

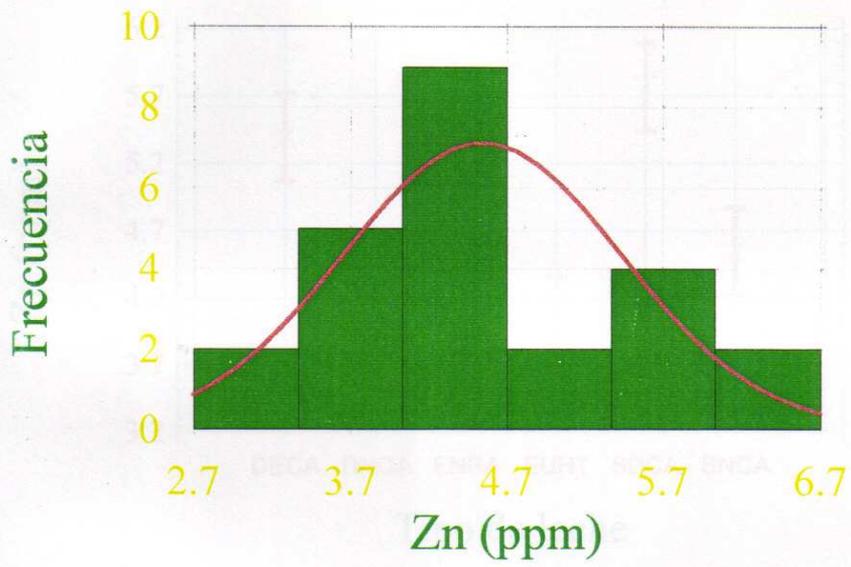
Gráfica 10. Histograma de frecuencias de las concentraciones de Zn en carnes.



Gráfica 11. Recta de probabilidad de distribución normal de las concentraciones de Zn en carnes

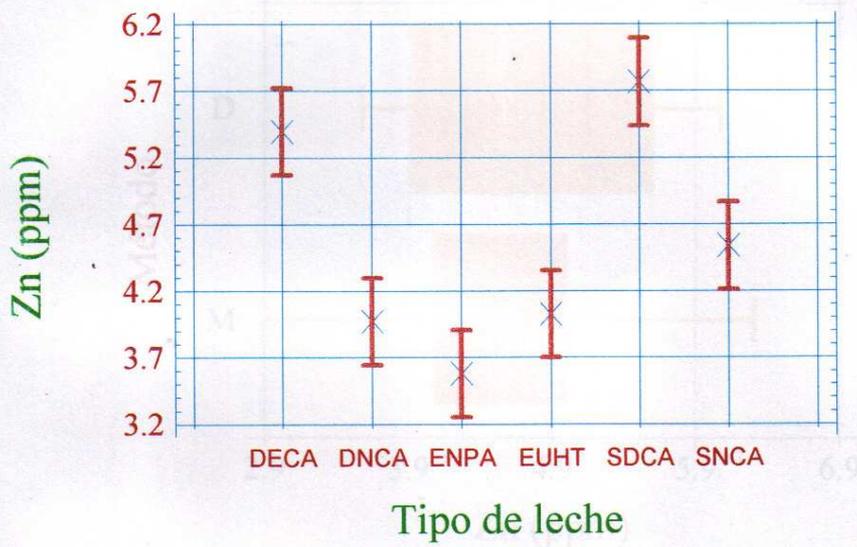


Gráfica 12. Representación mediante diagrama de cajas del análisis de varianza de los niveles de Zn en embutidos, músculo y vísceras comestibles

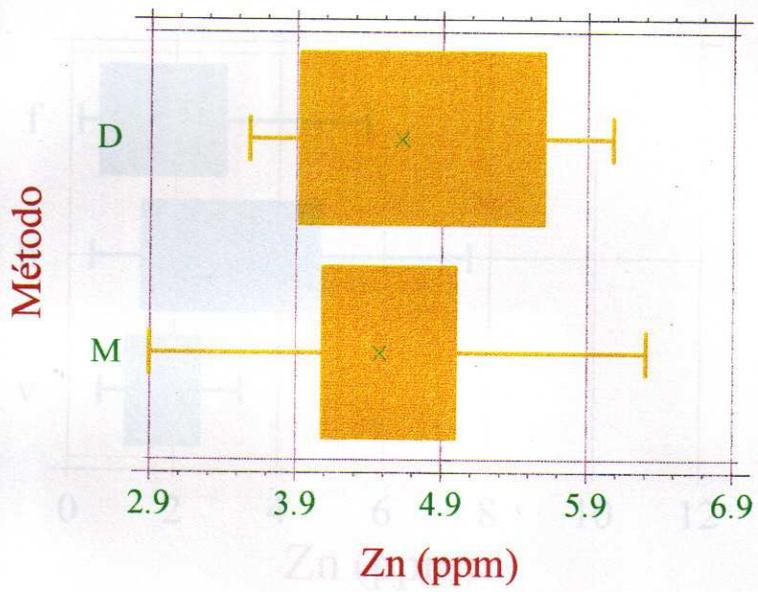


Gráfica 14. Representación mediante diagrama de caja del análisis de varianza de los niveles

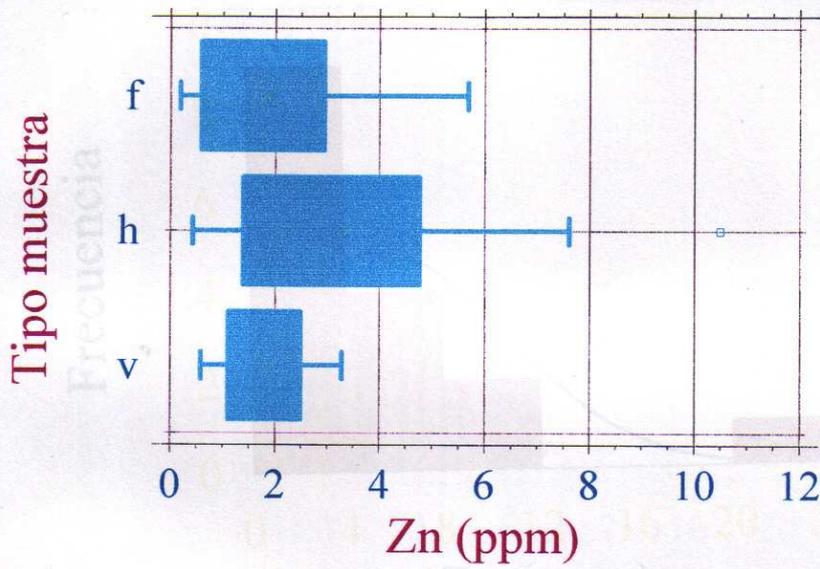
Gráfica 13. Histograma de frecuencias de la concentración de Zn en carnes.



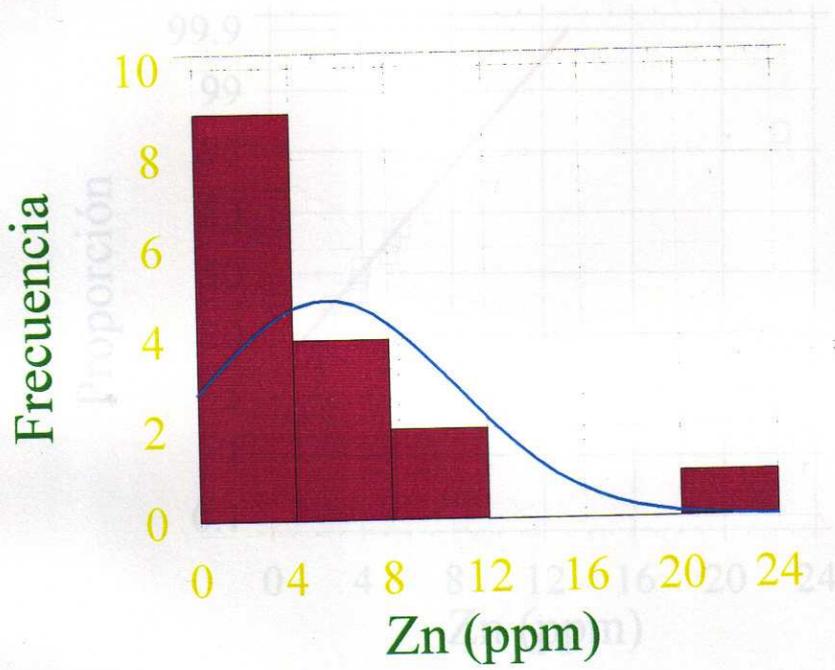
Gráfica 14. Representación mediante diagrama de cajas del análisis de varianza de los niveles de Zn en leches



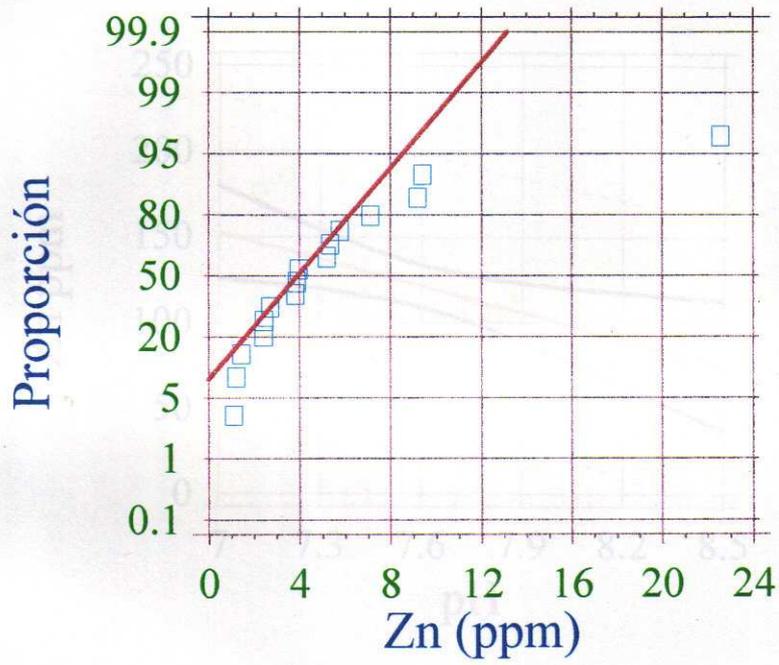
Gráfica 15. Representación mediante diagrama de cajas del análisis de varianza de los niveles de Zn respecto al método de mineralización en leches



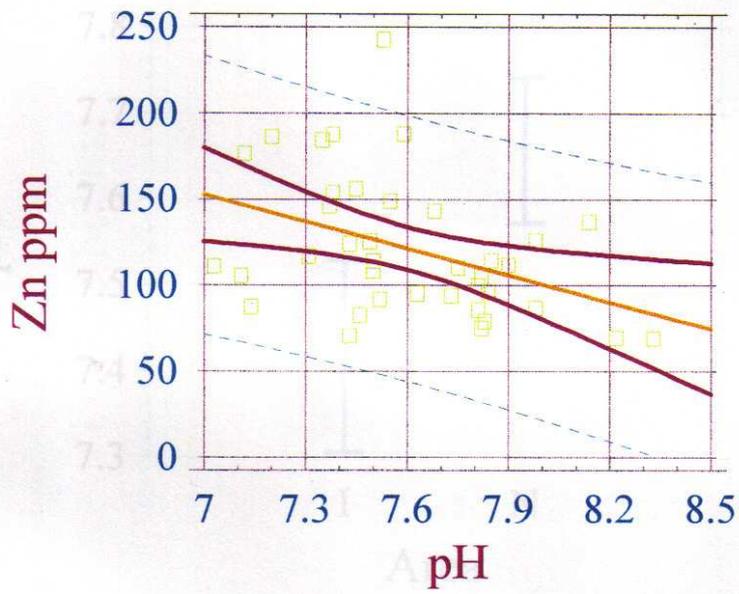
Gráfica 16. Representación mediante el diagrama de cajas de los niveles de Zn en frutas, hortalizas y verduras



Gráfica 17. Histograma de frecuencias de las concentraciones de Zn en muestras de caña de azúcar

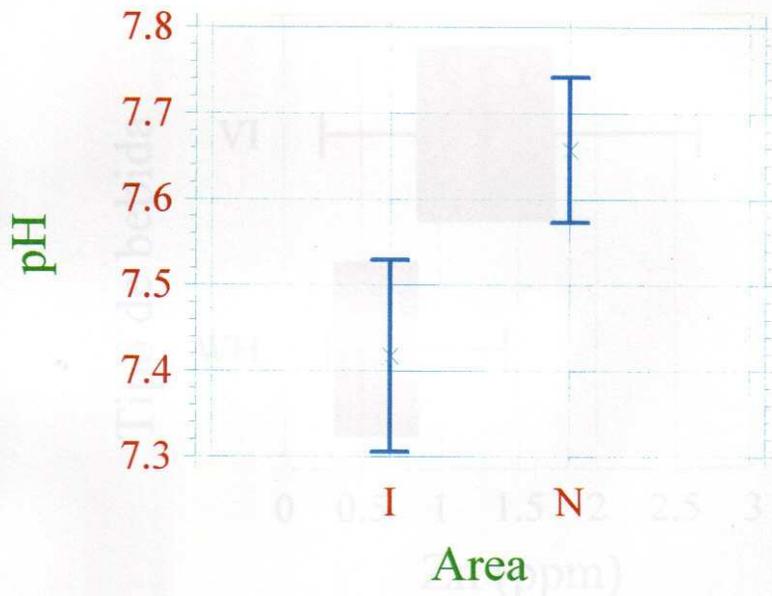


Gráfica 18. Recta de probabilidad de distribución normal de los valores de concentración de Zn en las muestras de caña de azúcar



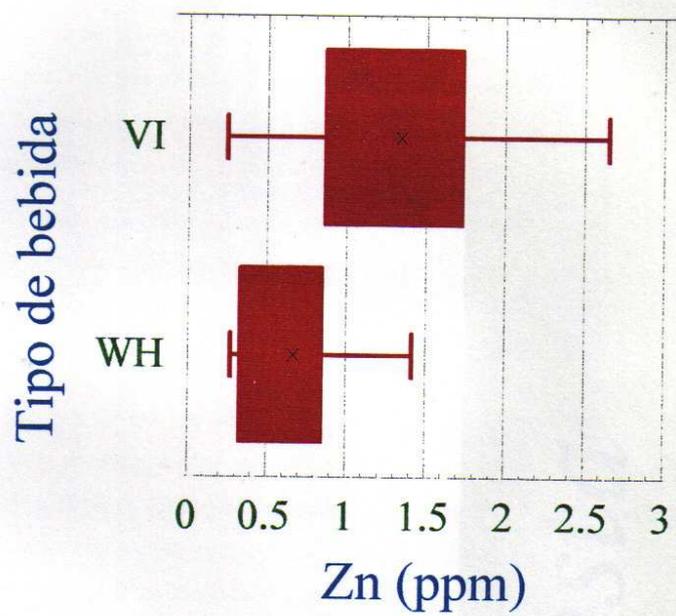
Gráfica 18. Representación mediante diagrama de cajas del pH de los suelos respecto al área en la zona estudiada.

Gráfica 19. Análisis de regresión de las concentraciones de Zn de las muestras de suelo con respecto al pH de los mismos



Gráfica 20. Representación mediante diagrama de cajas del pH de los suelos respecto al área en la que se encuentran

I = industrializada N = no industrializada



Gráfica 21. Representación mediante el diagrama de cajas de los niveles de Zn en muestras de vino y whisky

Ingesta

V. Ingesta

1. Cantidad media de Zn ingerido en la ración alimentaria

La determinación real de los constituyentes de los alimentos es necesaria para establecer la ingesta diaria de cada uno de los nutrientes, determinar el papel de estos en el binomio salud-enfermedad e investigar los efectos de la producción, procesamiento y contaminación ambiental sobre el valor nutritivo de los alimentos.

Debido a la dificultad que supone la medida de la ingesta de este elemento en la dieta alimentaria, se han creado diferentes procedimientos para su determinación. Entre ellos podemos citar los siguientes:

*** La técnica de las porciones duplicadas**, que consiste en observar las comidas consumidas por un individuo durante un período de tiempo más o menos prolongado y realizar un análisis del duplicado exacto de estas comidas. El inconveniente principal que presenta esta técnica es que cuando se realiza durante un largo período de tiempo, refleja una gran variación en el consumo de los alimentos y por lo tanto en la mayoría de los casos no se puede obtener una conclusión definitiva con respecto a la ingesta de un determinado alimento, a la vez que es cara y es difícil conocer la naturaleza exacta de las muestras recogidas (Corella y col. 1991).

*** La técnica de la composición equivalente**, consiste en formular teóricamente los ingredientes de las comidas características de una población y analizarlas pudiendo incluir o no los procesos del cocinado. El principal inconveniente es que la elección de los alimentos que componen la dieta de una determinada población no sea representativa y además esta técnica es inadecuada para estudios en los cuales las fuentes de alimentos están dispersados geográficamente, debido a la amplia variabilidad de la concentración de Zn en la dieta de los individuos, por las diferencias geológicas del Zn en el terreno.

* **Estudio de especímenes biológicos que reflejan el consumo de Zn**, tales como la sangre o la saliva. Estos han sido utilizados en numerosos estudios para determinar el nivel de Zn en distintos grupos de población. (Abdulla y col. 1983, Manson y col. 1979, Taylor y col. 1987, Klevay y col. 1987, Bales y col. 1990). Algunos autores tales como Contiero y Folin (1994), utilizan el pelo como un elemento de diagnóstico para el seguimiento del estado nutricional de elementos traza tales como el Zn. La determinación de la concentración de Zn fue llevada a cabo mediante espectrofotometría de absorción atómica a la llama.

* Otra forma de calcular la ingesta media diaria de Zn, es mediante el análisis del elemento considerado en los alimentos y el empleo conjunto de **tablas donde se especifique estadísticamente el consumo anual de alimentos de un país**, por categorías socio-profesionales y/o por regiones (Bratakos y col. 1987, Varo y col. 1988, Benamariya y col. 1993). Este método que es aproximativo, no especifica concretamente la ingesta en un pequeño núcleo de población.

En nuestro estudio hemos empleado este último método descrito para establecer de una forma aproximada, pero representativa, la ingesta de Zn por persona diariamente en la zona objeto de estudio, Motril (Andalucía). Para ello hemos utilizado las tablas estadísticas del Consumo Alimentario en España (Dirección General de Política Alimentaria, 1995), en las que quedan perfectamente establecido el consumo de cada alimento por persona y día, que se realiza en las distintas regiones de España. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las distintas muestras, se han calculado sus contribuciones a la ingesta media de Zn en Andalucía por persona y día, mediante la multiplicación del contenido medio en Zn en cada muestra de alimento, por el consumo medio de cada uno de ellos en la región andaluza por persona y día. Asimismo se ha considerado la porción comestible de cada especie analizada, mediante el empleo de las tablas de composición de alimentos del libro del Consumo Alimentario en España 1995, las determinaciones realizadas en los distintos grupos de alimentos quedan recogidas en las tablas 76, 77, 78, 79, 80, 81 y 82.

En base a los resultados obtenidos, podemos establecer que la cantidad media aproximada de Zn proporcionada por los distintos alimentos sería de 10,025

mg/persona/día.

No obstante hay que tener en cuenta que la fracción real de un alimento que será absorbida y empleada por el organismo dependerá de la biodisponibilidad del mismo. En este sentido se hacen necesarios estudios de biodisponibilidad ya que son muchos los factores que influyen en la absorción tales como la cantidad de este en la dieta, su estado de oxidación, su forma química y la presencia de factores que aumentan o disminuyen su absorción (Turnlund, 1991).

Tabla 76. Ingesta de Zn µg/persona y día, aportada por los productos cárnicos.

<i>Muestra</i>	Conc.media Zn µg/g	Consum. g/pers/día	Fracción comest. (%)	Ingesta Zn µg/pers/día
G. Carne vacuno	35,81	13,54	81,50	395,16
Carne pollo	10,45	45,37	74,00	350,89
Carne conejo	20,52	3,91	79,00	63,53
Carne ovino caprino	28,79	2,93	76,00	64,10
Carne cerdo	23,37	27,48	78,00	500,92
Carne transf.	21,83	51,22	96,00	1275,45
Despojos cárnicos	25,67	5,50	97,00	115,27
INGESTA TOTAL (mg/pers/día)				2,765

Tabla 77. Ingesta de Zn µg/persona y día aportado por productos de la pesca.

Muestra	Conc. media Zn µg/g	Consum. g/pers/día	Fracción comest. (%)	Ingesta Zn µg/pers/día
PESCADOS				
Pescadilla	5,65	8,95	58,00	29,35
Sardina	16,11	9,91	59,00	94,26

Boquerón	9,35	8,91	64,00	59,30
Bonito	15,55	0,13	61,00	1,29
Otros pescados	6,24	32	65,75	131,29
INGESTA TOTAL (mg/pers/día)				0,315
MOLUSCOS Y CRUSTÁCEOS				
<i>Marisco, moluscos y crustáceos</i>	9,36	12,93	64,00	77,45
INGESTA TOTAL (mg/pers/día)				0,077

INGESTA DE Zn A TRAVÉS DE PRODUCTOS DE LA PESCA 0,393
(mg/pers/día)

Tabla 78. Ingesta de Zn µg/persona y día aportada por la fruta.

Muestra	Conc. media Zn µg/g	Consum. g/pers/día	Fracción comest. (%)	Ingesta Zn µg/pers/día
Naranja	0,91	46,61	72,00	30,54
Limón	1,80	10,19	64,00	11,73
Plátano	1,04	27,95	67,00	19,47
Manzana	0,36	27,93	92,00	9,25
Pera	0,57	6,75	93,00	3,57
Melocotón	1,13	3,11	92,00	8,88
Albaricoque	1,76	1,14	91,00	1,83
Fresa	4,09	3,90	97,00	15,50
Melón	0,63	18,73	80,00	9,44
Sandía	1,11	18,54	44,00	9,05
Ciruela	0,19	2,35	94,00	0,42
Cereza	1,39	1,49	88,00	1,82
Uva	0,31	4,30	91,00	3,75
Aceitunas	1,72	4,92	80,00	6,77
Otras	1,92	9,28	54,00	9,62
INGESTA TOTAL (mg/pers/día)				0,141

Tabla 79. Ingesta de Zn µg/persona día aportada por las hortalizas y verduras.

Muestra	Conc. media Zn µg/g	Consum. g/pers/día	Fracción comest. (%)	Ingesta Zn µg/pers/día
Patata	2,71	180,72	80,00	391,08
Tomate	1,75	45,06	80,00	77,28
Cebolla	1,16	18,06	98,00	19,28
Ajo	10,53	5,28	92,00	48,97
Coles	2,66	3,11	78,00	6,45
Judías verdes	2,50	6,49	94,00	15,25
Pimiento	1,25	13,90	77,00	13,38
Champiñón	4,16	2,17	98,00	8,86
Lechuga	0,59	0,81	68,00	0,32
Espárragos	7,62	1,05	74,00	5,93
Otras	3,52	6,90	81,00	19,67
INGESTA TOTAL (mg/pers/día)				0,606

Tabla 80: Ingesta de Zn $\mu\text{g}/\text{persona}$ y día aportada por cereales, leguminosas y lácteos.

Muestra	Conc. media Zn $\mu\text{g}/\text{g}$	Consum. g/pers/día	Fracción comest. (%)	Ingesta Zn $\mu\text{g}/\text{pers}/\text{día}$
CEREALES				
Pan	8,87	192,30	100,00	1705,70
Galletas, bollería y pastelería	14,93	29,21	100,00	436,10
Arroz	17,44	15,30	100,00	266,83
Pastas alimenticias	16,14	9,08	100,00	146,55
INGESTA TOTAL (mg/pers/día)				2,555
HUEVO Y LÁCTEOS				
<i>Leche</i>	<i>4,11</i>	<i>311,81</i>	<i>100,00</i>	<i>1281,53</i>
<i>Yogur</i>	<i>4,25</i>	<i>35,51</i>	<i>100,00</i>	<i>39,76</i>
<i>Quesos</i>	<i>27,56</i>	<i>17,37</i>	<i>100,00</i>	<i>478,71</i>
<i>Otros lact.</i>	<i>6,12</i>	<i>13,35</i>	<i>100,00</i>	<i>81,72</i>
<i>Huevo</i>	<i>14,90</i>	<i>41,52</i>	<i>88,00</i>	<i>544,41</i>
INGESTA TOTAL (mg/pers/día)				2,425
LEGUMINOSAS				
<i>Garbanzos</i>	<i>33,48</i>	<i>7,12</i>	<i>100,00</i>	<i>238,37</i>
<i>Alubias</i>	<i>35,40</i>	<i>5,06</i>	<i>99,00</i>	<i>177,33</i>
<i>Lentejas</i>	<i>17,24</i>	<i>6,48</i>	<i>100,00</i>	<i>111,71</i>
INGESTA TOTAL (mg/pers/día)				0,527

Tabla 81: Ingesta de Zn μg /persona y día aportado por los frutos secos, bebidas y otros productos.

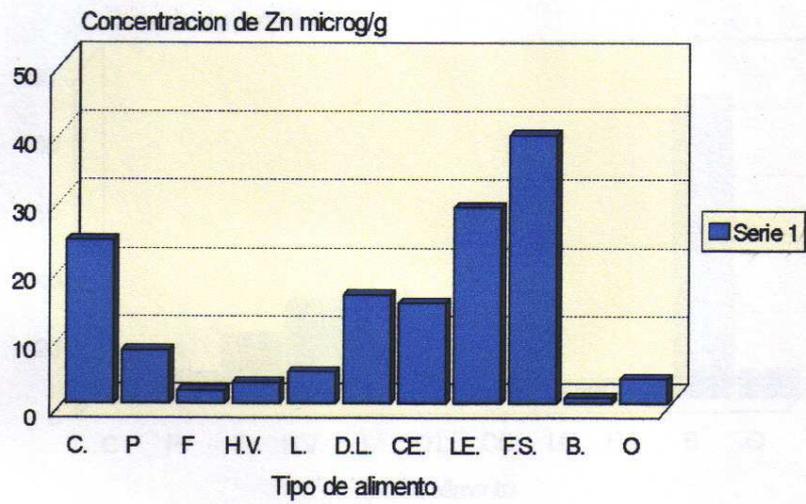
Muestra	Conc. media Zn $\mu\text{g/g}$	Consum. g/pers/día *	Fracción comest. (%)	Ingesta Zn $\mu\text{g/pers/día}$
FRUTOS SECOS				
Almendras	29,77	0,82	51,00	12,47
Cacahuetes	31,88	1,12	45,00	16,11
Nueces	36,57	0,95	43,00	15,01
INGESTA TOTAL (mg/pers/día)				0,043
BEBIDAS				
Vinos mesa	1,36	59,07	100,00	80,35
Zumos	0,93	51,59	100,00	47,97
Cerveza	0,51	279,09	100,00	142,33
Refrescos	0,67	226,68	100,00	151,87
Bebidas alcohólicas	0,77	15,61	100,00	12,02
Agua mineral	0,08	250,48	100,00	20,03
INGESTA TOTAL (mg/pers/día)				0,454
OTROS PRODUCTOS				
Miel	0,82	1,47	100,00	1,20
Azúcar	0,67	23,97	100,00	15,86
Aceite	0,46	29,47	100,00	13,56
Cacao	5,23	7,10	100,00	37,14
Café y té	5,16	8,91	100,00	46,00
INGESTA TOTAL (mg/pers/día)				0,113

* Para el caso de los vinos, el consumo corresponde a ml/persona/día

Tabla 82.- Ingesta total de Zn ($\mu\text{g/pers/día}$)

MUESTRA	INGESTA Zn ($\mu\text{g/pers/día}$)
Productos cárnicos	2765,32
Productos de la pesca	392,94
Fruta fresca	141,64
Hortalizas y verduras	606,47
Cereales	2555,18
Huevo	544,41
Leche	1281,53
Derivados lácteos	600,19
Leguminosas	527,41
Frutos secos	43,59
Bebidas	454,57
Otros	113,76
TOTAL DE Zn INGERIDO (mg/pers/día)	10,025

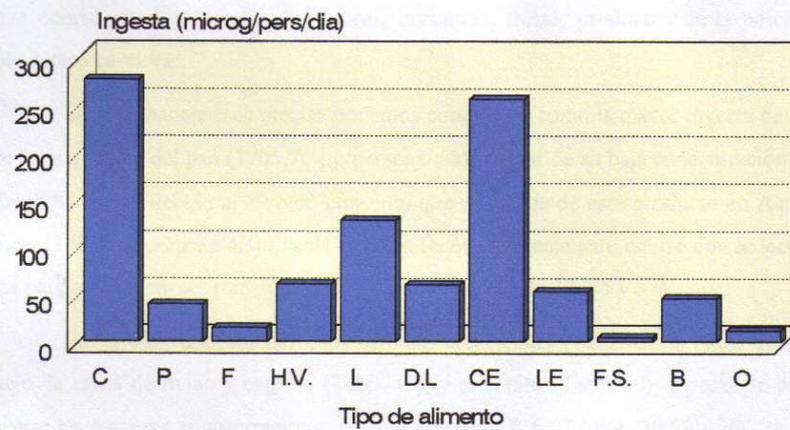
Gráfica 22 : concentración de Zn microg/g (bebidas g/l) en distintos alimentos



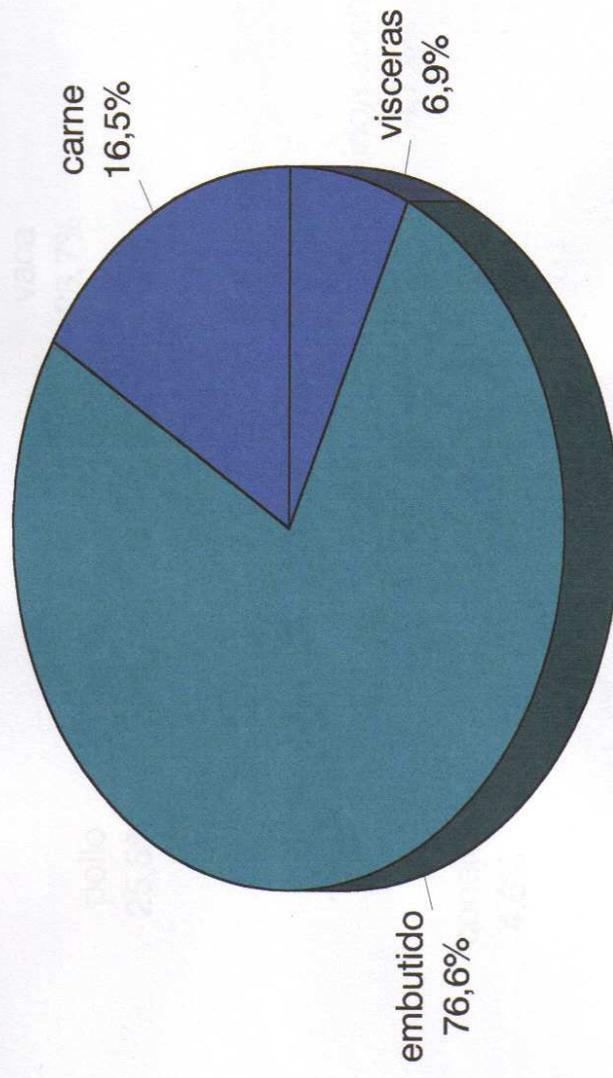
Grafica 23: Consumo de alimentos (g/pers/día)



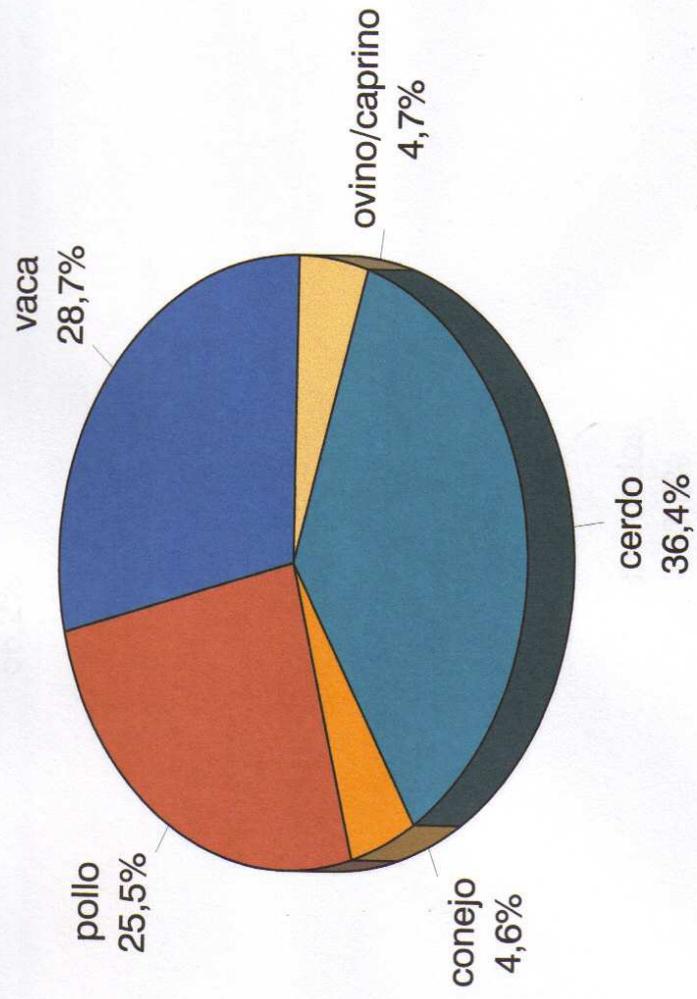
Grafica 24: Ingesta de Zn (microg/pers/dia) aportada por los alimentos



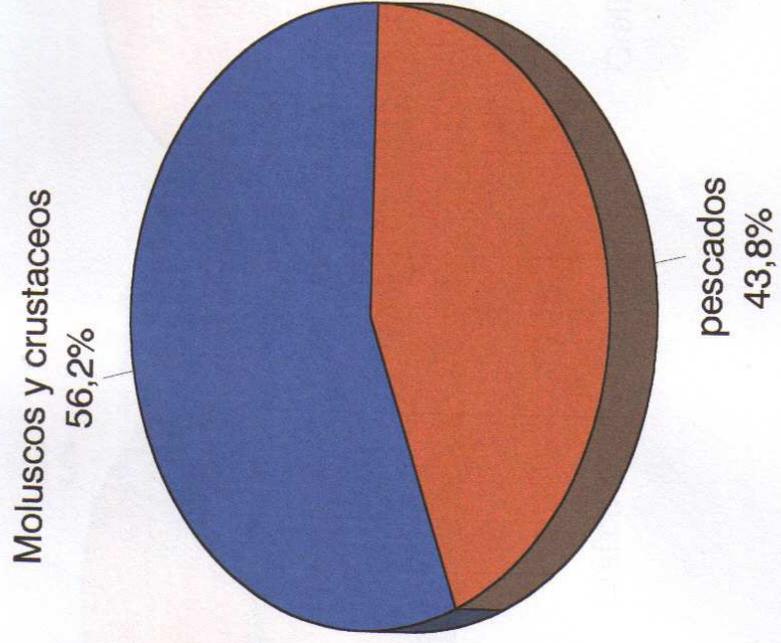
Gráfica 25: Ingesta de Zn a través de los productos cárnicos.



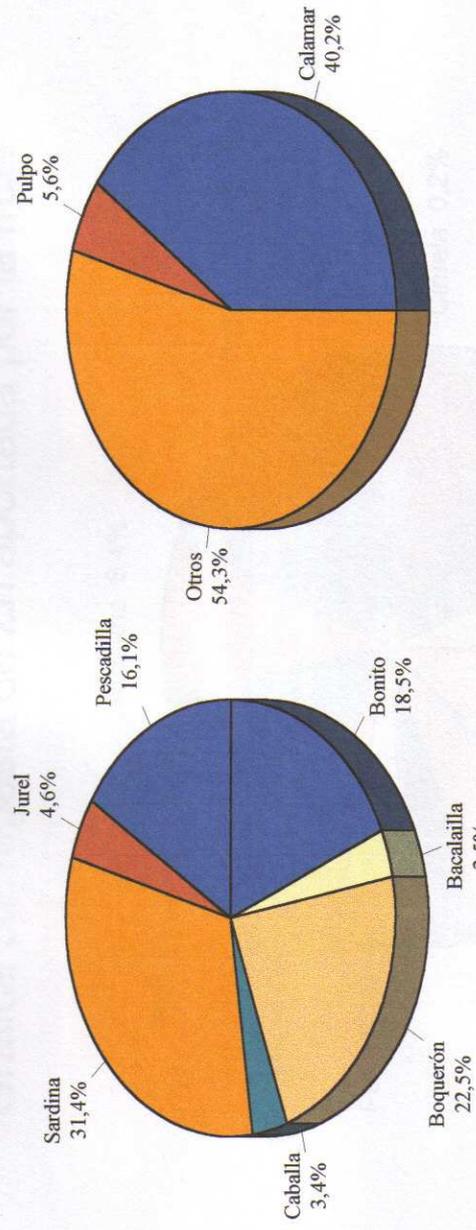
Gráfica 26: Ingesta de Zn a través de la carne.



Gráfica 27: Ingesta de Zn a través de los productos de la pesca.



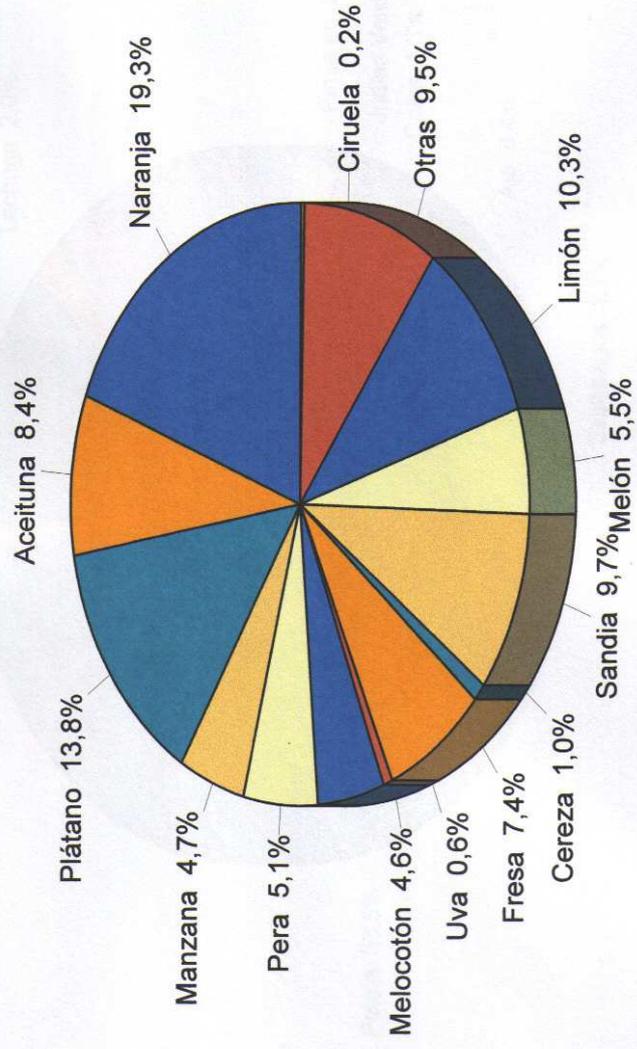
Ingesta de Zn aportada por pescados , moluscos y crustaceos



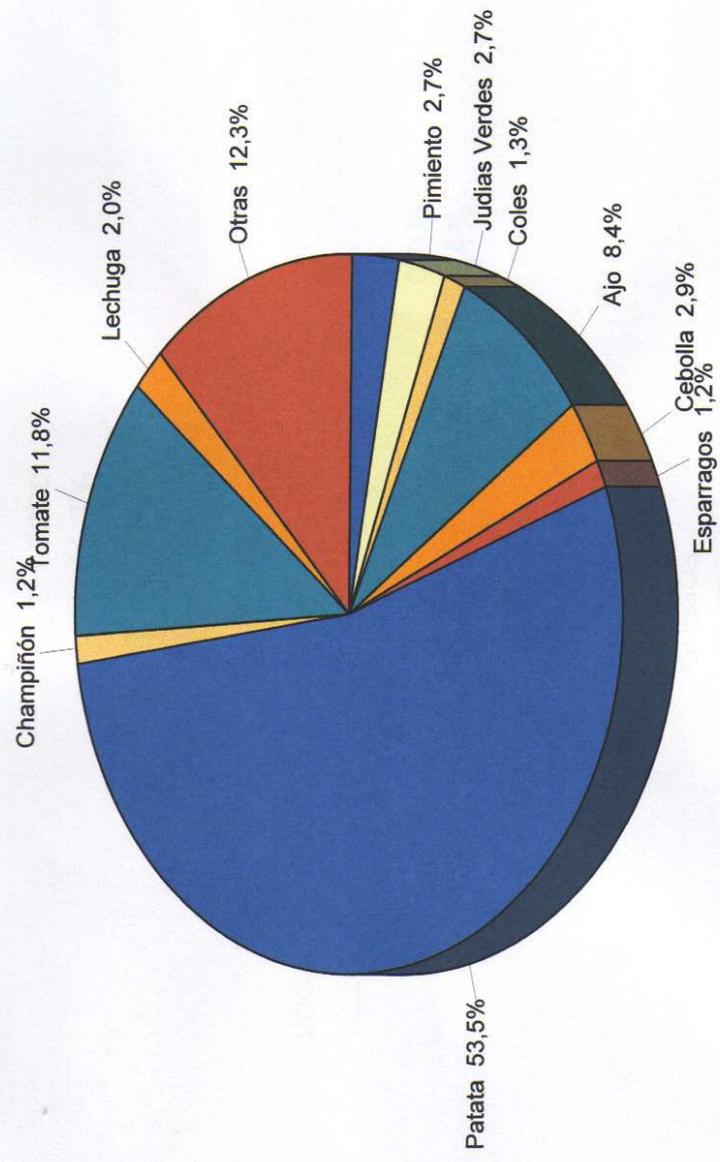
Gráfica 28

Gráfica 29

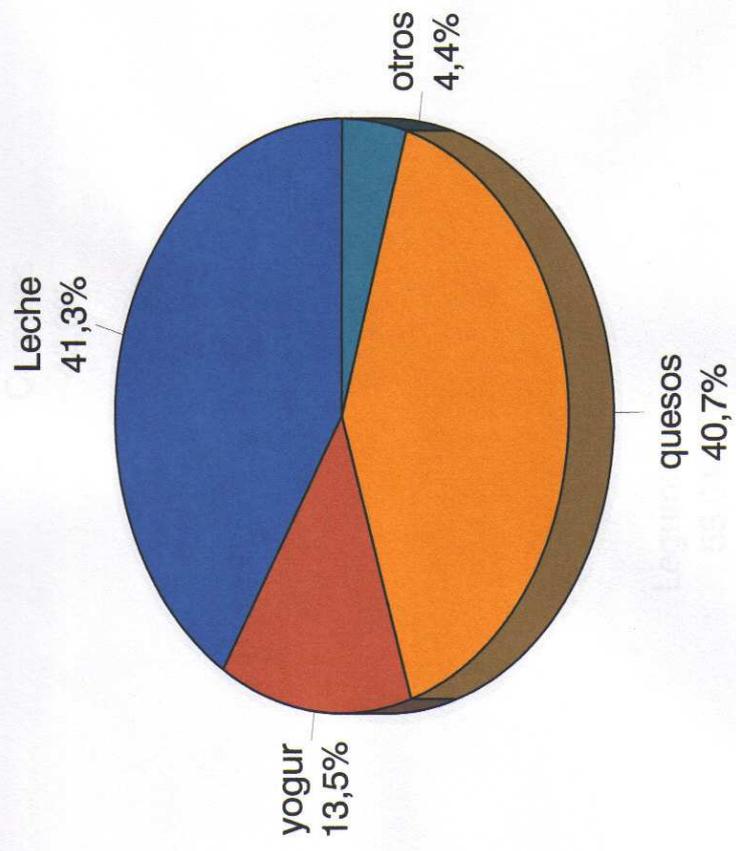
Gráfica 30: Ingesta de Zn aportada por la fruta



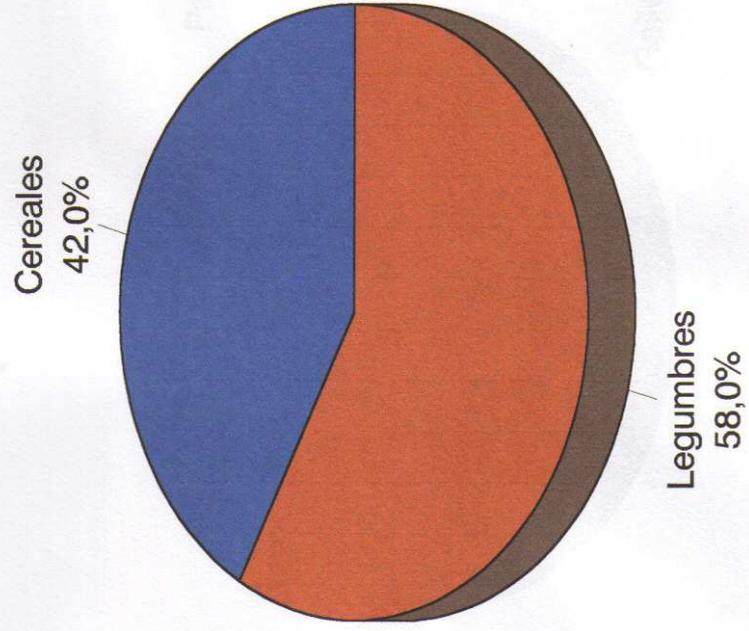
Grafica 31: Ingesta de Zn aportada por las hortalizas y verduras



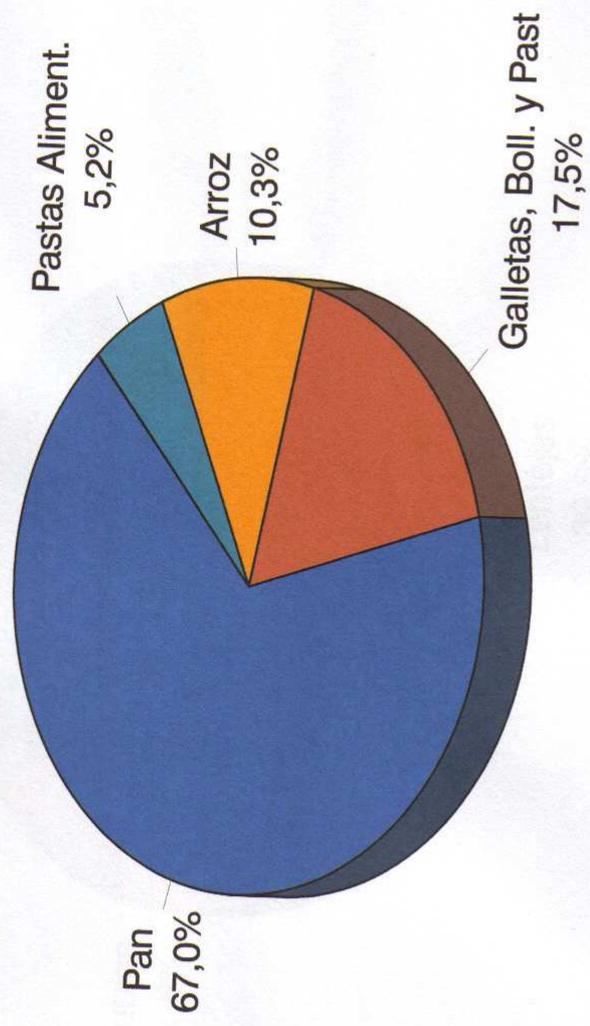
Gráfica 32: Ingesta de Zn a través de la leche y derivados lácteos.



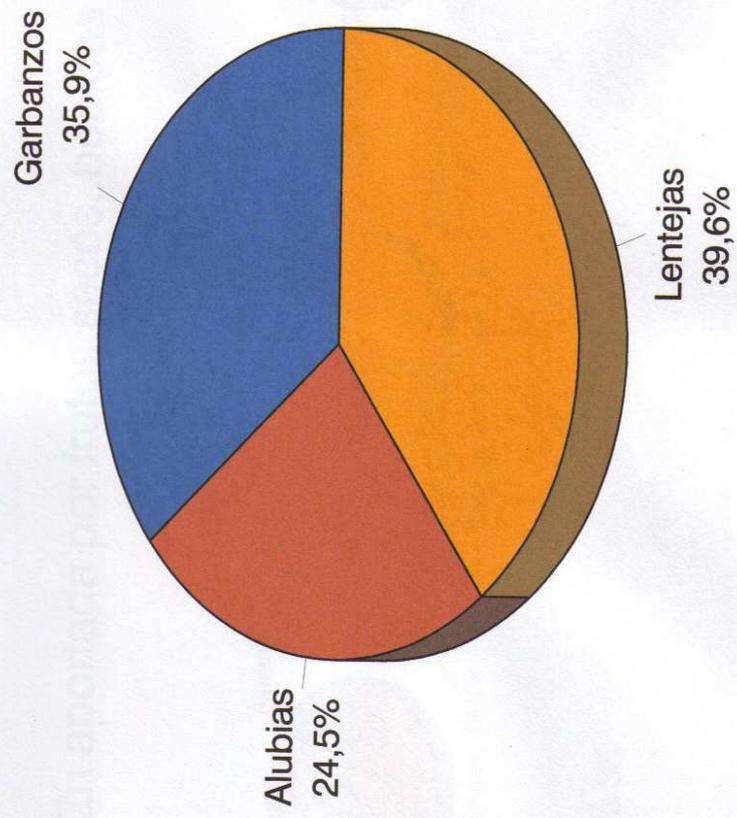
Gráfica 33: Ingesta de Zn a través de cereales y legumbres.



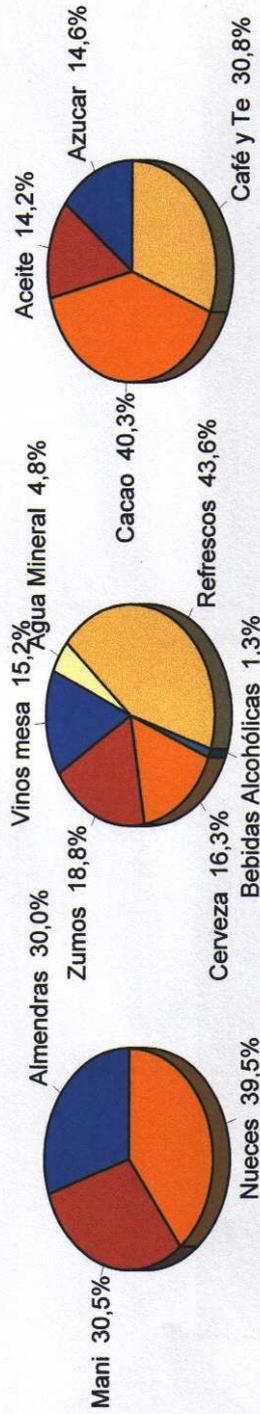
Gráfica 34: Ingesta de Zn aportada por cereales.



Gráfica 35: Ingesta de Zn a través de legumbres.



Ingesta de Zn aportada por frutos secos, bebidas y otros productos



Gráfica 36

Gráfica 37

Gráfica 38

Es interesante tener en cuenta a la hora de establecer la ingesta, que el hecho de que un alimento presente una concentración elevada de Zn, no quiere decir que el aporte de Zn en la ingesta mediante ese alimento sea mayor, ni viceversa, ya que es necesario tener presente el consumo por persona y día que se realiza del mismo. Así, si observamos las tablas, podemos comprobar como los frutos secos a pesar de presentar unas concentraciones más elevadas en Zn que los lácteos, el aporte en la ingesta mediante estos últimos es más elevado, debido a su mayor consumo, al igual que ocurre con los cereales, legumbres, hortalizas, frutas, productos de la pesca y productos cárnicos.

De una manera más precisa podemos comprobar como la mayor ingesta de Zn se hace a través del pan (1705,70 $\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$) a pesar de su baja concentración en Zn (8,87 $\mu\text{g}/\text{g}$), debido al elevado consumo que se realiza de este producto en Andalucía (192,30 $\text{g}/\text{persona}/\text{día}$) (Tabla 43). Un fenómeno semejante ocurre con la leche, las patatas y las carnes transformadas o embutidos. (Tabla 39, 45 y 37).

Por el contrario, los despojos cárnicos comestibles (vísceras), la carne de conejo, la carne de ovino y caprino (Tabla 37), y el bonito (Tabla 38), a pesar de presentar las mayores concentraciones de este elemento (25,67 $\mu\text{g}/\text{g}$, 20,52 $\mu\text{g}/\text{g}$, 28,79 $\mu\text{g}/\text{g}$ y 15,55 $\mu\text{g}/\text{g}$); su aporte a la ingesta es bajo y se sitúa en 115,27, 63,53, 64,10 y 1,29 $\mu\text{g}/\text{persona}$ y día, respectivamente, a consecuencia de su inferior consumo (5,50, 3,91, 2,93 y 0,13 g consumidos por persona y día respectivamente).

Finalmente en la tabla 82 podemos comprobar como por grupos de alimentos, son los productos cárnicos y los cereales, los que contribuyen a la mayor ingesta de Zn (pan principalmente), seguido de la leche y los derivados lácteos, las hortalizas y verduras (Gráfica 24). Por el contrario los grupos que menos contribuyen a la ingesta son los frutos secos y otros alimentos entre los cuales están incluidos azúcar, chocolate, infusiones, aceite y vinagre.

De la observación de la gráfica 25 en la que se muestran los porcentajes de aporte de Zn en la ingesta mediante los productos cárnicos, podemos comprobar cómo

en los productos cárnicos es la carne transformada (embutidos) la que nos proporciona una mayor ingesta de Zn, seguida de la carne de cerdo y de ternera siendo la carne de ovino, caprino y el conejo las que menos contribuyen a la ingesta quizás por su bajo índice de consumo. (Gráfica 26).

En los productos de la pesca (Gráfica 27), la ingesta menor de Zn se realiza a través del pescado y la mayor a través de moluscos y crustáceos. Dentro de los pescados (Gráfica 28), es la sardina la que realiza el mayor aporte de Zn a la dieta a través de la ingesta y la caballa es la que contribuye en menor medida, quizás debido a su bajo consumo.

En la gráfica 29 observamos cómo dentro de los moluscos y crustáceos es el grupo de otros el que contribuye mayoritariamente a la ingesta de este mineral en la dieta, seguido del calamar siendo el pulpo el que presenta el menor porcentaje de aporte de Zn a la dieta.

En las frutas (Gráfica 30), las que contribuyen a la mayor ingesta de Zn son la naranja, el plátano y el limón. Esto puede deberse al elevado cultivo de cítricos y frutas tropicales característico de esta zona que inducirían un elevado consumo de éstos.

De las hortalizas y verduras es la patata, la que sobresale respecto al resto, seguida del tomate y el ajo (Gráfica 31).

Se sabe que dentro de los vegetales las espinacas colaboran de manera importante sobre el total del aporte de Zn según han señalado (Ellen y col. 1990). Estos autores indican que dentro de los vegetales, las espinacas aportan el 10% del Zn total ingerido a través de los mismos.

Nosotros en nuestro estudio hemos obtenido un valor de concentración a partir de las hortalizas y verduras de 3,05 $\mu\text{g/g}$; y en estudios llevados a cabo por otros autores (Ellen y col. 1990) se han encontrado concentraciones que van desde 0,95-5,5 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco de la porción comestible. Así la concentración de Zn obtenida en nuestro estudio para este grupo de alimentos estaría dentro de los valores obtenidos por estos autores.

En los lácteos (Gráfica 32), observamos que el aporte de Zn de la leche y los quesos son muy similares a pesar de que la concentración de este mineral en los últimos es considerablemente mayor a la de la leche, sin embargo el consumo de la primera es

superior por lo que la diferencia de concentración queda compensada por su diferente consumo. En este sentido la bibliografía recoge los estudios realizados por autores como Richmond y col. (1993), que obtienen valores de ingesta de Zn a través de la leche de 1,3 mg/pers/día en un grupo de niños de Inglaterra. En nuestro estudio hemos obtenido un valor de ingesta ligeramente inferior aunque muy próximo al encontrado en el estudio anterior de (1,28 mg/persona/día).

En cuanto al aporte procedente de cereales y legumbres, es mucho más elevado el de las segundas (Gráfica 33). Este resultado no coincide con las conclusiones obtenidas en el estudio realizado por Chiplonkar y col. (1993). Estos autores realizan un estudio de la ingesta de este mineral en un grupo de jóvenes en una región de India y observan que los cereales representan el 67,7% del total del aporte de Zn para el caso de varones y el 60% en las mujeres. Además afirman que los hombres tienen una ingesta diaria de Zn cercana a las recomendaciones mientras que en las mujeres era de un 30 a un 60% inferior.

Dentro de los cereales es importante resaltar el gran aporte en la ingesta que realiza el pan (Gráfica 34) si consideramos el resto de alimentos de este mismo grupo. En el grupo de las leguminosas la ingesta a través de las lentejas y los garbanzos es similar, como se observa en la gráfica 35, variando en el caso de las alubias.

En el grupo de los frutos secos, el porcentaje mas elevado corresponde a las nueces y cacahuetes, se observa un porcentaje inferior en las almendras aunque no se puede considerar significativo.(Gráfica 36).

Con respecto a las bebidas (Gráfica 37), son los refrescos los que proporcionan la mayor ingesta de Zn y las bebidas alcohólicas las que menos contribuyen. Este resultado es lógico si tenemos en cuenta el elevado consumo que se hace de refrescos, sobre todo de los gaseosos, no sólo en esta zona sino también en todo el ámbito nacional. Es de destacar también el elevado aporte de Zn a la dieta a través de la cerveza, lo que es lógico al considerar que la cerveza se obtiene por una fermentación de la malta de la cebada, que es un cereal con un alto contenido en proteínas y por tanto de contenido en Zn apreciable.

Por último en el grupo recogido con otros alimentos, se aprecia fácilmente que el mayor aporte se realiza a través del té y el café seguido del cacao (Gráfica 38).

Si comparamos los resultados acerca de la ingesta en Zn en la dieta diaria de los

habitantes de la zona considerada con los obtenidos por distintos autores en otros países, podemos ver como la ingesta total media de este elemento determinada en nuestro estudio es de 10,025 mg/persona/día; este valor es inferior al obtenido por Barbera y col. (1989) de 11.5 a 14 mg/día en España. También es inferior a los determinados en Bélgica (Buchet y col.1983), Burundi (Benemariya y col. 1993), Dinamarca (Broy col. 1990), Gran Bretaña (Bunker y col. 1984), India (Soman y col. 1969), Nepal (Moser y col. 1988), Nueva Zelanda y Pakistan (Guthrie y Robinson, 1977).

Destacamos el elevado consumo de Zn que existe en EEUU y Noruega (16,8 mg/día y 13,7 mg/día respectivamente). Sin embargo a pesar de la elevada ingesta de Zn por persona y día que se observa en Noruega llama la atención la disminución de la misma en personas ovo-lactovegetarianas (7,6 mg/persona/día). Esto nos hace pensar en posibles problemas de carencia en este grupo poblacional lo cual es lógico si pensamos que su dieta está exenta de productos cárnicos que como ya hemos visto son los que participan de manera mayoritaria en el aporte de Zn en la dieta.

En este sentido, Gropper y col. (1988) realizaron un estudio sobre los niveles de elementos traza en niños fenilcetonúricos observando que aquellos que toman un sólo tipo de alimento como fuente de proteínas, poseen mayor riesgo de presentar deficiencias minerales.

Asímismo Donovan y col. (1995), estudian el estado nutricional de tres grupos de mujeres con edades comprendidas entre 14 y 19 años. El primer grupo realiza una dieta ovo-lacto-vegetariana; el segundo semi vegetariana; y el tercero sigue una dieta omnívora. Como resultado se obtiene que el 24% del primer grupo, el 33% del segundo grupo, y el 18% del tercer grupo, tienen niveles de Zn en el suero menores de 10,71 mmol/L. Puede observarse cómo los dos primeros grupos son los que presentan las mayores deficiencias en el aporte de Zn a través de la ingesta.

Por otro lado en Suecia encontramos distintos grupos poblacionales con diferencias en su ingesta. Así observamos niveles inferiores a los nuestros en los hombres suizos de 20 a 55 años (7,8 mg/día), e incluso también en el caso de personas mayores de 65 años (7,2 mg/día) en otros países (Abdulla y col. 1989). Swanson y col. (1988), también encuentran valores de ingesta inferiores al nuestro en los ancianos sanos de Suiza (9,2 mg/día). Hemos podido observar también niveles de ingesta

inferiores a los obtenidos en nuestro trabajo en los adolescentes de Chernobyl (6,8mg/día) donde los niveles de ingesta se sitúan dos veces por debajo de las recomendaciones dadas por WHO (Zaichick y col. 1996).

En Canadá la ingesta diaria de Zn está por encima del valor obtenido en nuestro estudio en el caso de mujeres las premenopáusicas (11,7 mg/día); sin embargo en las mujeres ancianas se aprecia una disminución de la misma hasta un valor de 7.6 mg/día (Gibson y col. 1985). Thomas y col. (1988), determinaron los niveles de la ingesta de Zn en individuos con edades comprendidas entre 63 y 89 años que comían en el hospital y observaron que los niveles de Zn eran inferiores a las recomendaciones oficiales y a los niveles de la ingesta determinada en un grupo de individuos de las mismas edades que había sido realizado siguiendo el mismo método por Bunker y col. (1984). Se han podido observar valores de ingesta algo superiores a los anteriores en un grupo de ancianos que viven en su casa aunque todavía siguen siendo insuficientes (Bunker y col. 1987).

A la vista de la revisión realizada, podemos indicar que en los ancianos, se encuentran valores más bajos de Zn al ser menor su ingesta, por lo que las recomendaciones nutricionales en este grupo poblacional debería tenerse en cuenta esta situación e intentar mejorar el estado nutricional de los mismos, con un aporte suplementario si fuera preciso.

Murthy y col. 1971, observaron deficiencias muy importantes en el aporte de este mineral en un grupo de niños americanos que almuerzan en los comedores escolares (3,9 mg/día). Estos bajos niveles de ingesta en USA también han sido descritas por Payette y Gray-Donald en 1991 (5 y 6.5 mg/día para mujeres y hombres respectivamente).

Nagy y col. (1987), han observado en el estudio realizado en adolescentes húngaros, valores insuficientes en la ingesta de Zn (2,39 mg), valor este muy por debajo de las recomendaciones establecida por la FAO/OMS.

En otros estudios realizados con niños, Jochum y col. (1995), intentaron establecer la relación existente entre niveles de Zn de tres grupos de bebés alimentados de diferente manera (con fórmulas de proteína de trigo hidrolizado, con leche materna o con leche de vaca) para ver si hay diferencias significativas en su crecimiento. Observan que los dos primeros grupos poseían niveles de Zn semejantes mientras que

los niños alimentados con leche de vaca tenían niveles de Zn inferiores. Sin embargo todos ellos siguieron un crecimiento adecuado estableciendo la no existencia de diferencias significativas entre la ingesta de este mineral y el crecimiento.

Se han realizado múltiples estudios sobre la ingesta de Zn en la dieta diaria y su correlación con diferentes patologías. En este sentido Celaya Pérez y col. (1989), en un estudio llevado a cabo en 57 pacientes sujetos a nutrición parenteral durante un periodo mínimo de 21 días comprobaron cómo los pacientes que manifestaban un estrés severo poseían inicialmente niveles más bajos de Zn los cuales posteriormente se incrementaban; sin embargo, si se mantenían o aumentaban las deficiencias se desarrollaban neoplasias y fístulas digestivas.

De la misma manera ha quedado completamente comprobado por diversos autores en diferentes países (Weight y col. 1988; y Deuster y col. 1989) que la suplementación con complejos multivitamínicos y multiminerales no tienen ningún efecto ergogénico si existe un estado nutricional adecuado y la ingesta de Zn por tanto es la idónea.

En general, la ingesta obtenida en nuestro trabajo, aunque es algo inferior a las recomendaciones establecidas por la U.S. National Research Council (1980), de ingesta diaria admisible (IDA) y estimada segura para el Zn, comprendida entre 12 y 15 mg para mujeres y hombres respectivamente, no debería presentar ningún riesgo para la salud.

Además, si comparamos nuestros datos de ingesta con las recomendaciones de la FAO/OMS, observamos que nuestro valor se encuentra comprendido entre los márgenes establecidos en dichas recomendaciones (9,4 – 13,1 mg/día para el hombre y de 6,5 – 10,3 mg/día para las mujeres).

Discusión de los resultados

VI. Discusión de resultados

Se ha llevado a cabo la puesta a punto de los métodos anteriormente descritos, para la determinación del elemento estudiado (Zn) en cada uno de los diferentes tipos de muestras consideradas. En cada caso se ha comprobado la reproducibilidad del método y se han buscado las condiciones óptimas y más idóneas para tales fines.

La mineralización de las muestras es un paso laborioso que puede conducir a pérdidas o contaminaciones (Laserna, 1985). En las técnicas seguidas en nuestro estudio, la naturaleza de las disoluciones finales y la limitación del número de reactivos, así como la velocidad de reacción, hacen que estas no sólo puedan ser aplicadas a la determinación de Zn, sino también a otros metales pesados.

Para la ejecución de los análisis, se han ensayado diferentes pesos de cada tipo de muestra desecada que se han determinado, comprobándose que la cantidad idónea para realizar dichos análisis, en las condiciones de trabajo aquí señalados, es de 300 mg.

Asimismo, se ha estudiado la proporción y tipos de ácidos-cantidad de muestra-temperatura de calentamiento-tiempo de permanencia en la placa de mineralización, siguiendo en cada caso la que se consideró más adecuada para la completa mineralización de las muestras (descritas anteriormente). A tal efecto, se ha empleado patrones de referencia estándar de pescados, vegetales y suelos, de matriz semejante a las muestras consideradas en este estudio. De la aplicación de los métodos analíticos considerados como más apropiados a las muestras analizadas, se ha puesto de manifiesto la existencia de un importante efecto de matriz en las muestras de lácteos. (Gráfica nº 3). Este hallazgo hizo necesario el empleo del método de adición de patrón.

De igual forma se ha comprobado la exactitud del método en cada tipo de muestra analizada, mediante el empleo de patrones de referencia estándar, encontrándose en todos los casos una acusada concordancia entre las concentraciones de Zn obtenidas por el método experimental establecido y los valores certificados.

Con esta misma finalidad, se ha estudiado también el porcentaje de recuperación del método, en las distintas clases de muestras consideradas.

1. Zn en productos cárnicos (carne, vísceras y embutidos)

Las concentraciones medias de Zn ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) e intervalos de concentración obtenidos en las distintas muestras de carne, vísceras y embutidos, vienen recogidos en la tabla 37.

En la tabla 83, se recogen los intervalos y concentraciones medias de Zn ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) en los tres tipos de productos cárnicos analizados.

Tabla 83. Valores de concentraciones medias e intervalos en los tres tipos de productos cárnicos analizados.

<i>Muestra</i>	Nº Muestras	Intervalo	Concentración media
Carne	6	7,80 – 37,00	23,24
Vísceras	12	10,55 – 95,71	25,98
Embutidos	6	10,51 – 40,19	21,83

Como puede apreciarse en la tabla las concentraciones de Zn más elevadas han correspondido al grupo de las vísceras dada su mayor capacidad de acumulación de los diferentes elementos minerales y entre ellos el Zn. Estas concentraciones como podemos observar en el test de rango múltiple (Tabla 51) no son significativamente superiores en vísceras y embutidos (en cuya elaboración también se incorporan vísceras) ($p > 0,05$, gráfica 12) respecto a las carnes.

Dentro de las vísceras es el hígado el que posee una mayor capacidad acumulativa de Zn con unas concentraciones medias determinadas en nuestro estudio de 71,01 y 33,42 $\mu\text{g/g}$ (peso fresco) para el hígado de cerdo y el hígado de pollo, respectivamente.

En la siguiente tabla se recogen las concentraciones medias obtenidas en las muestras de carne y vísceras analizadas en el presente trabajo junto con las obtenidas por otros autores, dentro y fuera de España (Tabla 84).

Tabla 84. Comparación de los niveles medios de Zn ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) obtenidos en carnes en nuestro estudio, con los de otros autores en otras partes del mundo.

Animal	País	Mcl.	Híg.	Riñ.	Cor.	<i>Referencia</i>
Vaca	Benin	23	---	----	----	Cresta y col., 1976
Vaca	Burundi	54	63	23	20	Benemariya y col., 1993
Vaca	Canadá	-----	42	21	----	Salisbury y col., 1991
Vaca	Finlandia	41	45	21	----	Nuurtamo y col., 1980
Vaca	Nueva Zelanda	38	39	21	---	Solly y col., 1981
Vaca	Noruega	81	----	----	----	Hellesnes y col., 1975
Vaca	Suecia	40	16	----	----	Jorhem y col., 1989
Vaca	USA	34	66	----	----	Lawler y Klevay, 1984
Vaca	España	35,81				Nuestro estudio
Cabra	Burundi	53	31	17	20	Benemariya y col., 1993
Cabra	U.S.A.	40	51	----	----	Park, 1988
Conejo	España	20,52	38,45	13,67	----	Nuestro estudio
Pollo	España	10,45	33,42	----	20,13	Nuestro estudio
Cerdo	España	23,37	71,01	30,52	17,24	Nuestro estudio
Cordero	España	28,79	-----	----	----	Nuestro estudio

En nuestro estudio hemos obtenido unos valores medios de ingesta de Zn a través de la carne por persona y día de 2765,3 μg , lo que supone un porcentaje elevado en la ingesta total de este elemento traza a través de la dieta.

Este dato se encuentra por encima del encontrado por Benemariya y col., (1993) en un estudio realizado en Burundi en un grupo de individuos universitarios (1800 μg), sin embargo se encuentra por debajo de la encontrada por estos mismos autores en personas hospitalizadas (8100 μg). Debemos tener en cuenta que en este dato ha sido incluido el aporte de Zn a través de los huevos además de la carne; no obstante sigue siendo un valor muy alto.

En esta región también se han observado diferencias entre la ingesta de Zn a

través de la carne en los hombres de clase media, madres y población rural (1,8, 0.9 y 0.2 mg, respectivamente) todos ellos por debajo del valor obtenido en nuestro estudio.

Tras la observación de la tabla 84, podemos decir que los niveles de este mineral en la ternera encontrado en nuestro estudio (en concreto en la parte muscular) se sitúa entre las concentraciones máximas y mínimas, encontradas en diferentes lugares aunque más cercanos a los niveles más bajos.

Así pues el valor detectado de 35,81 $\mu\text{g/g}$ que resulta intermedio entre los de U.S.A. (34 $\mu\text{g/g}$) Nueva Zelanda (38 $\mu\text{g/g}$), sin embargo se encuentra bastante por debajo de los valores obtenidos en otros países tales como Noruega, Burundi, o Finlandia con concentraciones de Zn de 81, 54 y 41 $\mu\text{g/g}$ respectivamente.

En general podemos decir que las concentraciones recogidas presentan una gran variabilidad para las distintas muestras animales estudiadas, hecho que parece bastante lógico, si se tiene en cuenta que el contenido de Zn del animal depende del tipo de alimentación que recibe, es decir, de las plantas y forrajes de las zonas de crianza, de las diferentes localizaciones geográficas correspondientes a los distintos países incluidos en la tabla.

De igual manera a lo manifestado anteriormente para el presente trabajo, estudios realizados por otros autores tal y como podemos observar en la tabla 89, muestran niveles de concentración de Zn más elevados en todos los países, para las muestras de vísceras y en concreto en el hígado con la excepción de lo apreciado en Suecia y en Burundi. En este sentido Salisbury y col. (1991), afirman que es en el hígado de los terneros donde se encuentra la mayor concentración de Zn. Esto es lógico si pensamos que el hígado es un órgano cuya principal función es la síntesis de proteínas en la que están implicadas toda una serie de enzimas que son Zn dependientes y por lo que la presencia de este elemento en este órgano es fundamental para su funcionamiento.

2. Zn en pescados, mariscos y cefalópodos.

Los niveles de Zn detectados en la parte muscular comestible de las diferentes especies de pescados analizados se muestran en la tabla 38.

De los resultados obtenidos podemos deducir que la mayor acumulación de Zn se encuentra en la sardina con una concentración de Zn de 16.11 $\mu\text{g/g}$ peso fresco, seguido del bonito (15.55 $\mu\text{g/g}$), la galera (13.44 $\mu\text{g/g}$) y el pulpo (10.85 $\mu\text{g/g}$), y la menor se encuentra en la brótola (3.15 $\mu\text{g/g}$) seguido del cazón (3.91 $\mu\text{g/g}$) y el lenguado (4.26 $\mu\text{g/g}$).

Dentro de este tipo de muestras podemos detectar diferencias entre los contenidos medios de Zn en las tres categorías de productos de la pesca considerados (pescado, marisco y cefalópodos) tal y como se puede apreciar en la tabla 85. Sin embargo tras la aplicación del estudio estadístico del mismo, observamos que estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Tabla 85: Contenido de Zn en las tres categorías de pescado.

Tipo de muestra	Nº Muestras	Concentración media
Pescado	26	16,26
Marisco	8	25,62
Cefalópodos	4	28,25

La mayor concentración media de Zn dentro de los productos de la pesca se encuentra en el grupo de los cefalópodos (28,25 $\mu\text{g/g}$).

Sin embargo el mayor aporte de Zn a través de la dieta se realiza por el consumo del grupo de pescados lo que supone una ingesta media de este mineral de 315,49 $\mu\text{g/}$ persona/día, posiblemente debido al elevado consumo de pescado en la zona estudiada al ser esta fundamentalmente pesquera. Así frente a las bajas concentraciones de este mineral en especies tales como la pescadilla (5,65 $\mu\text{g/g}$), encontramos elevados índices de consumo (8,95 g consumidos por persona y día) que van a contrarrestar esta baja concentración.

La concentración de Zn determinada en los mejillones por Tahan y col. (1995),

es muy superior a la encontrada en nuestro estudio ($191 \pm 23 \mu\text{g/g}$ y $4.18 \mu\text{g/g}$ respectivamente), lo que podría explicarse por la variación del contenido de Zn, que posiblemente sea menor en las aguas de Venezuela, que en la estudiada por nosotros y justificaría la diferencia encontrada entre ambas.

Se han observado diferencias significativas en la ingesta de este elemento entre los hombres de clase media, las mujeres y la población rural de Burundi, en el amplio estudio realizado por Benemariya y col. 1989.

Así en los hombres de clase media el pescado supone el 27.5% del total del aporte de Zn a través de la dieta mientras que en las madres de la misma región el aporte de Zn a través del pescado desciende hasta un 12,5% y en la población rural desciende hasta un 1.9%, seguramente por el menor consumo de pescado que se produce a medida que disminuye la clase social.

Podemos deducir por tanto que el pescado contribuye de una manera significativa al aporte de Zn en la dieta. Así lo pone de manifiesto el estudio realizado por este mismo autor entre dos grupos de hombres de esta misma región. En uno de ellos se da una dieta exenta de pescado y en el otro se administra una dieta con pescado. Puede observarse que la ingesta de Zn a través de la dieta oscila entre los 9,2 mg/día para el primer grupo (valor por debajo de las recomendaciones de 12 a 15 mg/día), y 12,5 mg/día para el grupo que había consumido pescado.

A pesar de esto no podemos decir que el consumo de pescado sea un factor determinante para asegurar un aporte adecuado de este elemento en la dieta ya que existen otros factores adicionales que van a afectar a la ingesta diaria de Zn tales como el contenido de este elemento en otros grupos de alimentos o bebidas, el área geográfica, las emisiones locales de Zn y las cantidades de comida y bebida que se ingieren.

3. Zn en productos lácteos.

Las concentraciones de Zn determinadas en distintas muestras de productos lácteos quedan recogidas en la tabla 41. Dentro de este grupo de alimentos podemos considerar cuatro categorías diferentes correspondientes a las muestras de leche, yogur, quesos y otros productos lácteos (donde hemos incluido natillas, petit suisse,..)

Tabla 86. Intervalos y concentración media de Zn ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) en leche, quesos y derivados lácteos.

<i>Muestra</i>	N° Muestras	Concentración media
N. Leche	61	4,11
Yogur	1	4,25
Queso	9	27,56
Otros	3	6,12

Si observamos la tabla podemos comprobar como la mayor concentración de Zn en este tipo de muestras corresponde al queso y la menor a la leche. Además estas concentraciones fueron significativamente superiores en el queso ($p < 0,01$) que en la leche. Este resultado se relaciona principalmente con la deshidratación de la leche de partida que tiene lugar durante la elaboración de este alimento que facilita la concentración de Zn. Dentro de los derivados lácteos, el que mayor nivel de Zn presenta es el petit suisse ($10,11 \mu\text{g/g}$) (Tabla 41) y el menor las natillas ($4,05 \mu\text{g/g}$). Ambos resultados tienen una significación lógica, ya que el petit suisse es un derivado lácteo de composición similar al queso, el cual presenta la mayor concentración de Zn en los alimentos de este grupo. De la misma manera si examinamos los componentes de las natillas comprobamos como en este caso es la leche la que participa de manera mayoritaria en su composición y por ello su contenido en Zn es considerablemente menor y de un orden semejante al nivel medio encontrado en la leche de vaca ($4,11 \mu\text{g/g}$).

En otros estudios, se evaluaron los niveles de Zn presentes en muestras de leche pertenecientes a otros animales distintos a la vaca, como la cabra. Se puede apreciar que los valores de Zn encontrados para la leche de cabra en Burundi eran similares a los encontrados en Nigeria ($4 \mu\text{g/ml}$) (Akinsoyinu y col. 1979) e inferiores a los determinados en los Estados Unidos ($5,6 \mu\text{g/ml}$) (Cönnerdal y col. 1981). Estos últimos a su vez son mas elevados que los encontrados en Grecia (Bratakos y col. 1987). En general observamos que estos niveles hallados en leche de oveja son de un orden semejante a los encontrados en leche de vaca.

Al comparar nuestros resultados de concentración media de Zn en leche de vaca (4,11 $\mu\text{g/g}$) con los obtenidos por otros autores observamos como nuestro valor está por encima del obtenido por Lavi y Alfassi (1990) en la leche de vaca comprada en un supermercado en Israel (3,4 $\mu\text{g/g}$). Asimismo el nivel medio determinado en nuestro estudio está dentro de los rangos de concentraciones de Zn encontrados por otros autores como Iyengar (1982) con (3,1-5,1 $\mu\text{g/ml}$), Lonnerdal y col. (1981) en investigaciones realizadas en Estados Unidos (3-5 $\mu\text{g/ml}$), y por Verheijden y col. 1983 (3-5,7 $\mu\text{g/ml}$) en muestras de leche de vaca de Noruega. A pesar de esto, las pequeñas modificaciones observadas en la concentración de este elemento en las distintas leches de vaca podrían estar relacionadas con su localización geográfica ya que las plantas de forraje de las que se alimentan las vacas, van a presentar distintas concentraciones de Zn en función de la geoquímica del suelo, que es diferente en las distintas áreas geográficas de los países. (Banuelos y Meek, 1989; Ari 1991).

Podemos destacar por otra parte el elevado contenido de Zn determinado en fórmulas lácteas de inicio y continuación, en un estudio llevado a cabo por Climent, y col. (1990). Los resultados expresados como contenido promedio ($\mu\text{g/g}$) se resumen como sigue:

Tabla 87: Composición de las fórmulas de inicio.

<i>Fórmulas de inicio</i>	<i>Zn</i>
Lactosa	0,14
Concentrado de proteínas	5,27
Producto intermedio	13,62
Producto final	10,03

Tabla 88. Composición de las fórmulas de continuación.

Fórmulas de continuación	Zn
Fécula	0,25
Maltodextrina	0,17
Producto intermedio	47,75
Producto final	30,43

Como puede apreciarse estas concentraciones son muy superiores a los niveles de Zn encontrados en el presente estudio en leche de vaca. Estos elevados niveles encontrados por Climent y col. (1990) y también por Cabrera y col. (1996) en leches infantiles son debidas a la suplementación que con este elemento se hace normalmente en estos alimentos.

En nuestro trabajo también se ha realizado un estudio comparativo entre las concentraciones de Zn en los distintos tipos de leche habiéndose apreciado una mayor concentración de este elemento en la leche desnatada enriquecida en calcio (5,28 $\mu\text{g/g}$) seguida de la semidesnatada también enriquecida en calcio (5,05 $\mu\text{g/g}$); mientras que las menores concentraciones se encuentran en la leche entera pasteurizada (3,70 $\mu\text{g/g}$) y la entera UHT (4,00 $\mu\text{g/g}$). (Tabla 89).

Tabla 89. Valores de concentración media y D.E. en Zn en muestras de leche

Variable	Nº Muestras	Media	Desviación estándar
ENPA	4	3,58	0,52
EUHT	4	4,02	0,15
SNCA	4	4,53	0,18
DNCA	4	3,97	0,51
DECA	4	5,39	0,54
SACA	4	5,76	0,51

Hemos realizado el estudio estadístico de los resultados para estudiar la influencia de algunos factores tecnológicos, tales como el tratamiento térmico de higienización (pasteurización o uperización), proceso de desnatado y enriquecimiento en Ca, sobre los niveles de Zn en la leche.

En relación al tratamiento térmico, la comparación de las muestras de leche pasteurizada con las de la leche entera U.H.T. reveló la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ellas, encontrándose concentraciones de Zn en la leche entera U.H.T. significativamente superiores (Tabla 54). Posiblemente este resultado está relacionado con el hecho de que el tratamiento térmico de uperización,

aunque es más drástico ya que utiliza temperaturas superiores a 130°C, es mucho más corto porque sólo dura unos segundos. Sin embargo la pasteurización conlleva el sometimiento de la leche a una temperatura de 70-80°C pero durante más tiempo (unos minutos), lo que podría originar una mayor precipitación y pérdida de Zn en la leche pasteurizada finalmente obtenida.

Para comprobar la influencia del proceso de desnatado sobre la concentración de Zn, hemos comparado los niveles de este elemento encontrado en las muestras de leche entera, semidesnatada y desnatada, por un lado, y las muestras de leche semidesnatada y desnatada enriquecidas en Ca por otro lado. En el primer caso, las concentraciones medias de Zn encontradas en la leche entera son significativamente inferiores a las determinadas en la leche semidesnatada y desnatada (Tabla 55). Resultado lógico de esperar. En el segundo caso, los niveles medios de Zn determinados en las leches enriquecidas en Ca semidesnatadas y desnatadas U.H.T., no fueron significativamente diferentes.

Finalmente, se analizó la influencia del enriquecimiento en Ca, mediante la comparación de las concentraciones de Zn en las leches no enriquecidas en Ca frente a las enriquecidas. Los resultados del estudio estadístico indicaron la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de Zn encontrados en los dos tipos de leche ($p < 0,05$). Las leches enriquecidas en Ca presentan también mayor concentración de Zn.

4. Zn en vegetales y frutas.

Los rangos y las concentraciones medias de Zn determinadas en las distintas especies de vegetales analizados están recogidos en la tabla 45. En la tabla 90 se recogen los rangos y las concentraciones medias pertenecientes a las dos categorías consideradas.

Tabla 90. Concentración total e intervalos de concentración de Zn ($\mu\text{g/g}$ peso fresco) en las frutas y los vegetales (hortalizas y verduras).

<i>Muestra</i>	Nº Muestras	Concentración media
Fruta	48	1,89
Vegetales	32	3,05

A la vista de los resultados recogidos en la tabla 45, se observan que los mayores niveles de Zn se encuentran en las muestras de ajo (10,53 $\mu\text{g/g}$) y espárrago (7,62 $\mu\text{g/g}$), seguido de las habas (7,34 $\mu\text{g/g}$) para las verduras; en el grupo de las frutas las concentraciones más altas se encuentran en la granada (5,68 $\mu\text{g/g}$) y la caña de azúcar (5,48 $\mu\text{g/g}$) seguido del higo (3,58 $\mu\text{g/g}$). Como podemos observar las concentraciones de este elemento traza son considerablemente superiores y estadísticamente significativas (Gráfica 16) en el grupo de vegetales, así las concentraciones más bajas corresponden a la ciruela (0,19 $\mu\text{g/g}$) seguida de la uva (0,31 $\mu\text{g/g}$) y de la manzana (0,36 $\mu\text{g/g}$).

Si comparamos los resultados obtenidos en el presente trabajo con los determinados por otros autores en otros países, se observa que la concentración media obtenida en nuestro estudio para el caso de la naranja (0,91 $\mu\text{g/g}$) se encuentra dentro del rango de concentración obtenido por Ajmal y col. (1997), en un estudio realizado en la India (0,393-1,262 $\mu\text{g/g}$).

De la observación de nuestros resultados podemos decir que los valores medios de concentración encontrados en nuestro estudio tanto para las frutas (3,07 $\mu\text{g/g}$) como para las verduras (3,49 $\mu\text{g/g}$), se encuentran dentro del rango de concentración obtenidas para las mismas por Ellen y col. (1990), en frutas y verduras de Holanda. En este trabajo se encontró un valor de concentración media de Zn en las frutas de 0,99 $\mu\text{g/g}$ y para las verduras se estableció un intervalo de concentración comprendido entre 0,95-5,5 $\mu\text{g/g}$.

En países tales como Burundi (África), en los que los vegetales constituyen una de las principales fuentes de alimento, estos van a ser determinantes en el aporte de Zn a través de la dieta. Así lo afirman Benemariya y col. (1993) en un estudio realizado en distintos grupos poblacionales de este país, comprobando porcentajes de aporte de Zn en la dieta a través de los vegetales de 9,2, 9,6 y 36,1 para los hombres de clase media,

mujeres y población rural, respectivamente.

Si nos fijamos el mapa nº 1, en el que vienen recogidos los puntos de muestreo de algunas de las muestras determinadas (puesto que otras fueron adquiridas directamente en el mercado de abastos de Motril), y lo contrastamos con las concentraciones obtenidas de Zn en cada una de las especies (tabla 45,46), se deduce que parece ser que la actividad industrial no influye sobre el aumento de los niveles de Zn en los cultivos, aunque si se ha observado niveles más elevados de pH en los suelos no industrializados que en los industrializados, lo cual implica la acidificación significativa del suelo incluida en la zona industrial, debido probablemente a la presencia de residuos y a la utilización de distintos productos químicos en las industrias situadas en esta zona.

Este hecho ha sido comprobado mediante la aplicación de un estudio estadístico en las muestras de caña de azúcar tomadas en el área industrializada y no industrializada al ser la especie de la que disponíamos del mayor número de muestras por constituir el principal cultivo de la zona. Tras la realización del estudio comprobamos la no existencia de diferencias estadísticamente significativas en el contenido de Zn en las muestras de caña de azúcar según la zona de procedencia de estas. Este resultado establece que no existe influencia de la actividad industrial en la concentración de Zn en las muestras de caña de azúcar. A pesar de ello, hemos comprobado que los niveles de Zn en las muestras recogidas en el área industrializada eran superiores aunque no significativamente diferentes a las halladas en la zona no industrializada (Gráfica 16).

Si comparamos el valor de concentración de Zn encontrado en los pimientos rojos en en el presente trabajo, con el determinado por Martín y col. (1990) en un estudio realizado en Tenerife, observamos como los valores obtenidos en el nuestro son ligeramente superiores con valores de 19,45 $\mu\text{g/g}$ peso seco frente la 17,48 $\mu\text{g/g}$ respectivamente. Este mismo resultado ha sido apreciado con los pimientos verdes habiéndose determinado concentraciones en nuestro estudio de 17,62 $\mu\text{g/g}$ frente a 16,62 $\mu\text{g/g}$.

De la observación de estos resultados se comprueba la gran variabilidad existente entre los niveles e Zn detectados en las muestras de vegetales y frutas. Estas diferencias se atribuyen al hecho de que el contenido de Zn en las plantas está

fuertemente relacionado con la cantidad de Zn biológicamente disponible en el suelo, en el cual las plantas crecen, y por tanto con su origen geográfico (Kajforz y Snymczyk, 1984; Banuelos y Meek, 1989; Ari, 1991).

5. Zn en cereales, legumbres y frutos secos.

Los intervalos y concentraciones medias de Zn en $\mu\text{g/g}$ peso seco para cada una de las muestras analizadas, vienen recogidas en las tablas 42, 43 y 44. En la tabla nº 91 se recogen asimismo las concentraciones medias y sus intervalos para cada categoría de alimentos encuadrados en este grupo.

Tabla 91. Intervalo y concentración media de Zn ($\mu\text{g/g}$ peso seco) en cereales, legumbres y frutos secos

Muestra	Rango de concentración	Concentración media
O. Cereales	8,92 – 17,93	14,70
Legumbres	17,24 – 35,40	28,70
Frutos secos	29,77 – 64,62	39,29

De los resultados obtenidos y recogidos en la tabla 91, se deducen que las mayores concentraciones de Zn corresponden a los frutos secos, y dentro de estos (tabla 44) a las pipas de girasol ($64,62 \mu\text{g/g}$), y a las nueces ($36,57 \mu\text{g/g}$), y las menores a las almendras ($29,77 \mu\text{g/g}$).

A los frutos secos le siguen las legumbres, de ellas las que presentan una mayor concentración (tabla 42), son las alubias ($35,40 \mu\text{g/g}$) y las que menos las lentejas ($17,24 \mu\text{g/g}$).

Por último estarían los cereales, dentro de los cuales el más significativo es la pasta como derivado de trigo ($17,58 \mu\text{g/g}$) seguido del arroz ($17,44 \mu\text{g/g}$). Por otra parte el que presenta menor concentración de este elemento es el pan rayado ($8,92 \mu\text{g/g}$).

Sin embargo, a pesar de que los cereales son el grupo de alimentos con menor concentración de Zn, su aporte a través de la ingesta es el mayor (2,55 $\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$). Esto se debe a que dentro de este grupo se encuentra el pan que a pesar de poseer una baja concentración de Zn, es un alimento muy consumido por la población estudiada (192,30 $\text{g}/\text{persona}/\text{día}$). Esto hace que su aporte a la ingesta sea el más elevado del grupo que estamos considerando (1705,70 $\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$).

En situación contraria figuran los frutos secos, ya que estos son los que menos contribuyen a la ingesta de Zn (0,043 $\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$), a pesar de ser el grupo de alimentos que presenta la concentración media más elevada. Esto se debe a su bajo consumo dentro del grupo poblacional que estamos estudiando de 2,89 $\text{g}/\text{persona}/\text{día}$.

6. Zn en bebidas.

En la tabla 49 quedan recogidas las concentraciones medias de las bebidas. En este grupo destaca el vino con una concentración media de Zn de 1,35 mg/L . En el otro extremo está la ginebra con 0,50 mg/L .

En la tabla 92 se recogen los intervalos y concentraciones medias de Zn en bebidas y vinagre (mg/L)

Tabla 92. Intervalo y concentración media de Zn ($\mu\text{g}/\text{g}$ peso seco) en bebidas y vinagre (mg/L)

Muestra	Rango de concentración	Concentración media
Bebidas alcohólicas	0,50 – 1,35	0,71
Bebidas analcohólicas	0,67 – 0,93	0,73
Vinagre	-	0,75

En la tabla 81 se recogen las ingestas de Zn ($\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$) aportadas por las bebidas y el vinagre. Observamos que la bebida que más contribuye a la ingesta de Zn a través de la dieta son los refrescos (151,87 $\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$), seguido de la cerveza y el vino con 142,33 y 80,35 $\mu\text{g}/\text{persona}/\text{día}$, respectivamente). Esto se debe a su elevado índice de consumo en la población de 226,68, 279,09 y 59,07 ml, respectivamente.

Tras la aplicación del estudio estadístico al grupo de los vinos, deducimos que existen diferencias significativas entre el vino de Jerez con respecto al vino de Rioja y al vinagre de vino. Lo que puede deberse a la diferencia en la composición de los suelos dada la mayor riqueza en yesos (CaCO_3) de los suelos de la región de Jerez.

Sin embargo, los suelos de La Rioja, además de yeso poseen en su composición hierro, limos y arcilla.

Si comparamos los valores de concentración de Zn de las muestras de los vinos de La Rioja estudiados por nosotros (0,796 mg/L) con los obtenidos por Arranz y col. en 1988 ($0,309 \pm 0,056$ mg/L), podremos observar cómo el valor de concentración de Zn obtenido en nuestro trabajo es superior al determinado por este autor, así como a los recogidos por Bruno y col. (1978), Galimowski y col. (1979) y Mohr y col. (1982), quienes encontraron unos valores medios en torno a 0,4 mg/L.

Por otro lado cabe considerar el estudio realizado por Arranz y col. (1988) sobre los compuestos inorgánicos presentes en vinos de Rioja, donde aprecian una mayor concentración de Zn en aquellos vinos que han permanecido en recipientes de acero inoxidable, respecto a los que han estado en tinas de cemento.

7. Zn en suelos, sedimentos y arenas.

Los intervalos, concentraciones medias y desviaciones de Zn total, para las muestras de suelos, sedimentos y arenas vienen recogidas en la tabla 47. De la observación de esta tabla se establece que las mayores concentraciones medias de Zn total obtenidas en las muestras consideradas han correspondido a sedimentos, seguidos de suelos y arenas.

El estudio estadístico de los resultados ha expresado que las concentraciones de Zn en las muestras de sedimentos y suelos de cultivo, no fueron significativamente superiores a los determinados en las arenas. ($p = 0,016$, $p < 0,01$). Este resultado expresa la proximidad existente a la significancia estadística de las arenas respecto a suelos y sedimentos, como se pone de manifiesto al aplicar el test de rango múltiple con el que se aprecia en la homogeneidad de grupos que las arenas son distintas a los suelos y sedimentos.

Este resultado se correlaciona con el tipo diferente de muestra correspondiente al área considerada, ya que las muestras de suelo correspondientes a las tierras de cultivo y las de sedimento de la zona, pertenecen al grupo de los fluviosales calcáricos (Cabrera y col. 1993) con un muy elevado contenido en materia orgánica, hecho en el cual estriba la elevada capacidad de retención de Zn y de otros metales pesados. Por el contrario, en las arenas (mapa 4) encuadradas dentro del grupo de las miscelaneas playas, se produce el efecto inverso y por lo tanto la concentración media en Zn debido al menor contenido en materia orgánica y a la menor capacidad de retención de este elemento coligada, se ve disminuida. Como conclusión a lo expuesto, se observa claramente la influencia que sobre el contenido total en Zn establece el tipo de muestra considerada.

De manera concreta los mayores niveles de Zn determinados en las muestras analizadas, han correspondido a las muestras tomadas en los puntos nº 25, 26 y 29, con una cantidad de 186, 242,5 y 176 $\mu\text{g/g}$ (peso seco) respectivamente, como puede observarse en el mapa correspondiente (mapa 3). Todas estas muestras corresponden a suelos incluidos en el área industrializada. A la vista de este hecho se hizo un estudio comparativo entre los niveles de Zn de los suelos del área industrializada y no industrializada, con el fin de comprobar la incidencia de la actividad industrial en los suelos de la zona. De la aplicación del análisis estadístico de Kruskal-Wallis (no paramétrico) se ha puesto de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0,01$), concretamente se ha comprobado, que los niveles de Zn en los suelos de cultivo del área industrializada son significativamente superiores a los del área no industrializada. Este resultado expresa que la actividad industrial manifestada por la industria papelera, tanques de petróleo, complejo industrial, central térmica y puerto de Motril, aumentan significativamente la concentración de Zn.

Se sabe además que el contenido de Zn en el suelo, además de depender del tipo de roca o el área en la que se encuentra puede estar influenciado por otros factores, tales como el pH del mismo o la naturaleza de las aguas de drenaje a través de estos. En este sentido, con el fin de comprobar la influencia que el pH podría establecer sobre el contenido de Zn total, se llevó a cabo la determinación de los valores de los mismos en las muestras consideradas. Los resultados obtenidos para el pH vienen recogidos en la tabla 92. De la observación de los mismos se observa el carácter alcalino de todas las muestras de suelos, sedimentos y arenas. La aplicación del análisis estadístico ANOVA

de una vía, ha puesto de manifiesto la existencia de diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el pH de los suelos y sedimentos, y el correspondiente a las arenas. También y como anteriormente apreciamos para las concentraciones de Zn para las muestras de suelo, se han observado diferencias significativas en los valores de pH de los suelos según el área a la que pertenecen (industrializada y no industrializada $p < 0,05$). Concretamente se han obtenido niveles mas elevados de pH en los suelos de la zona no industrializada que en los de la industrializada Este resultado implica una acidificación significativa del suelo incluido en la zona industrializada, debido probablemente a la presencia de residuos industriales y la utilización de distintos productos químicos acidificantes en las industrias situadas en la zona.

Tabla 93. Concentraciones de Zn ($\mu\text{g/g}$, peso seco).

<i>Muestra</i>	Nº Muestra	Media	Intervalo
Suelo	32	121,31	70,5-242,5
Sedimento	4	145,77	110,1-187,5
Arena	2	69,30	69,2-69,4

Mediante el estudio del análisis de regresión, al correlacionar el contenido en Zn con el pH en las muestras de suelo consideradas se ha observado la existencia de una correlación inversa estadísticamente significativa, observándose un ajuste a la función exponencial. (ecuación correlación). Esta concentración de Zn está relacionada de manera inversa con los valores de pH, lo que corrobora las conclusiones obtenidas anteriormente acerca de que la contaminación industrial supone una acidificación significativa de los suelos a la vez que un aumento en la concentración de Zn.

En cuanto a los niveles de Zn en suelos y sedimentos determinada por otros autores, en otras zonas, vienen recogidas en la tabla 94, estas concentraciones han sido comparadas con las encontradas en nuestro estudio.

Tabla 94. Niveles de Zn en suelos y sedimentos.

Muestra	Lugar	Media	Intervalo	Referencia
---------	-------	-------	-----------	------------

		($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	
Sedimento	Saguenay Fjord (Canadá)	148,94	36-232	National Water Research Institute, Burlington
Suelos	Llechryd	73 \pm 21		Bradley (1980)
Suelos	Pembrokeshire	71 \pm 21		Bradley (1980)
Suelos	Dyfed	94 \pm 33		Bradley (1980)
Suelos	Canadá	74	10-200	Mckeague (1980)
Suelos	U.S.A.	54		Mckeague (1980)
Suelos	Vinogradov	50		Mckeague (1980)
Suelos	Escocia	93,8	36-240	Ure, A.M (1978)
Suelos	Corteza Tierra		10-300	Reilly (1980)
Sedimento	Liverpool	47,9	9,4-327,0	Hockin (1988)
Sedimento	Estuario Mersey	319,0	8,8-944,0	Hockin (1988)
Sedimento	Indianapolis	300,62	90-680	Departament of public Works
Sedimento	Ría de Huelva	1152,6 3	77,2-5580	Tomas (1982)
Sedimento	San Francisco	563,8	170-1890	Luoma (1988)
Sedimento	Canadá	139	138-139	Thomas (1978)
Sedimento	Canadá	100	18-146	Thomas (1982)
Sedimento	Canadá	106	31-149	Thomas (1983)
Sedimento	Canadá	121	51-168	Issungnak Erickson (1983)
Sedimento	Canadá	152	149-157	Gulf (1984)
Sedimento	Canadá	102	18-157	Mudroch (1984)

Si observamos esta tabla, y comparamos estos resultados con los obtenidos en el presente trabajo comprobamos que en los sedimentos la concentración media obtenida en nuestro estudio de 145,77 $\mu\text{g/g}$ es inferior a las obtenidas por Gulf (1984) en Canada (152 $\mu\text{g/g}$), aunque ligeramente superior a la encontrada por Thomas en distintos estudios realizados en diversas zonas del país. Este investigador indica concentraciones de 139, 100 y 106 $\mu\text{g/g}$ respectivamente en estudios realizados en 1978, 1982 y 1983. También son inferiores a las determinadas por otros autores en este país (Erickson, 1983; Mudroch, 1984). Por otro lado se han encontrado concentraciones superiores de este mineral en muestras de sedimentos de la bahía de San Francisco

(563,8 $\mu\text{g/g}$), Indianapolis (300,62 $\mu\text{g/g}$) y Estuario de Mersey (319,0 $\mu\text{g/g}$). Sin embargo el dato más destacable de este estudio es la elevada concentración de Zn encontrada en muestras de sedimento de la Ría de Huelva (1152,63 $\mu\text{g/g}$). Esta anormalmente elevada concentración puede ser debido a que esta es una zona de gran desarrollo industrial con la presencia de un importante núcleo de industria química y minera, que constituyen las fuentes potenciales principales de Zn en el área.

También podemos destacar la escasa concentración de Zn determinada por Hockin (1988) en Liverpool (47,9 $\mu\text{g/g}$) que contrasta con las elevadas concentraciones encontradas en el resto de los casos.

En los suelos de cultivo del área hemos determinado una concentración media de 121,37 $\mu\text{g/g}$, nivel que se encuentra por encima de las concentraciones determinadas por otros autores en estudios semejantes realizados en otras zonas. Sin embargo se encuentra dentro del intervalo establecido como normal por Reilly (1980) en la corteza terrestre de 10-300 $\mu\text{g/g}$.

A la vista de todos estos resultados, cabría concluir que aunque en general los niveles de Zn determinados en los suelos de la zona sur costera de Granada son medios, la absorción y biodisponibilidad de este elemento por las plantas allí cultivadas son bajas. Este hecho establece un bajo aporte de Zn en la dieta diaria humana desde esta fuente alimentaria, lo que se relaciona con la baja cantidad de Zn aportada desde los alimentos vegetales cultivados en la zona considerada.

8. Zn en aguas potables, residuales, de riego y de mar.

Las concentraciones medias, así como el número de muestras y el rango de concentración de Zn en las cuatro categorías de muestras analizadas vienen recogidas en la tabla nº 95. De la observación de esta tabla se establece que las mayores concentraciones medias de Zn obtenidas corresponden al agua potable, seguida de la de riego, la residual y por último la de mar.

Tabla 95. Concentraciones medias e intervalos de concentración de Zn en muestras de aguas de la zona costera de Motril ($\mu\text{g/l}$).

Muestra	Nº Muestra	Concentración	Rango
Potable	8	0,080	0,002-0,343
Residual	8	0,032	0,002-0,077
Riego	33	0,035	0,001-0,174
Mar	10	0,023	0,001-0,041
<i>Total</i>	59	0,042	0,001-0,343

De la aplicación del análisis no paramétrico de Kruskall Wallis, con la obtención subsiguiente de un nivel de significancia de $p > 0,01$, se ha puesto de manifiesto la no existencia de diferencias significativas entre las concentraciones de Zn en las diferentes muestras de agua analizadas de la zona considerada.

Por lo general, las aguas recogidas en puntos cercanos a zonas industriales suelen presentar una mayor concentración de elementos traza, que las tomadas en puntos más distantes (Reilly, 1980; Jackson y col. 1986; Navarro Alarcón, 1990). Sin embargo, en nuestro trabajo, de acuerdo con lo obtenido en el estudio estadístico, no se observa una relación significativa entre los niveles de Zn determinados en las aguas de riego y residuales según la actividad industrial.

Si comparamos los datos obtenidos en nuestro estudio con los de otros autores observamos que en el caso de las muestras de agua de mar nuestro valor de concentración (0,023 $\mu\text{g/l}$) es superior al obtenido por Lee y col. (1988) en muestras de agua marina (0,0056-0,0229 $\mu\text{g/l}$).

También encuentran valores inferiores a los nuestros diversos autores que determinan concentraciones de Zn en agua de mar de 0,010; 0,0049 y 0,0004 $\mu\text{g/l}$.

En cuanto a las aguas potables, destacar que otros autores encuentran valores de concentración de Zn en aguas potables de U.S.A. superiores a las obtenidas en nuestro estudio (0,1938 $\mu\text{g/l}$). Por tanto tal y como puede apreciarse, las bajas concentraciones de Zn determinadas en las muestras de agua, y dentro de ellas las potables, establece que esta constituye una fuente poco importante en el aporte de este elemento en la dieta diaria.

Conclusiones

VII. Conclusiones

1. La espectroscopía de absorción atómica (a la llama y con atomización electrotérmica) es una técnica selectiva, rápida y de bajo coste instrumental para la determinación de Zn en distintas matrices: alimentos, bebidas y suelos.
La idoneidad del método se ha puesto de manifiesto por los resultados obtenidos en el estudio de los parámetros analíticos del mismo.
2. El proceso de digestión ácida aplicado es rápido y resulta adecuado para la gran variedad de muestras determinadas en este estudio, con las pequeñas modificaciones introducidas respecto al tiempo, temperatura y ácido utilizado. En las muestras de leche, el método de mineralización (vía húmeda o seca) no influye significativamente en la concentración de Zn ($p > 0,05$).
3. Los alimentos de origen proteico, tanto animal como vegetal, son los que presentan mayor concentración de Zn, habiéndose encontrado la siguiente secuencia: destaca el nivel de Zn medio determinado en los frutos secos con 39,29 $\mu\text{g/g}$, seguido de las legumbres con 28,70 $\mu\text{g/g}$, carne y derivados 23,68 $\mu\text{g/g}$, huevo 14,90 $\mu\text{g/g}$, cereales y derivados 14,70 $\mu\text{g/g}$, leche y derivados lácteos con 10,51 $\mu\text{g/g}$ y productos pesqueros 7,78 $\mu\text{g/g}$. En las hortalizas y verduras se han encontrado unos niveles de 3,05 $\mu\text{g/g}$, mientras que en las frutas fueron de 1,89 $\mu\text{g/g}$. Es de mencionar la baja concentración media determinada en las bebidas de 0,78 $\mu\text{g/g}$ de Zn.

4. Las concentraciones de Zn en las muestras de leche entera U.H.T. son significativamente superiores a las de leche entera pasteurizada ($p < 0,01$), debido posiblemente a que la pasteurización conlleva una pérdida de Zn por precipitación.
5. Las muestras de bebidas alcohólicas fermentadas presentan concentraciones de Zn significativamente superiores ($p < 0,01$) a las bebidas alcohólicas destiladas. Este hecho se justifica por las pérdidas atribuidas al propio proceso de destilación.
6. Los niveles medios de Zn determinados en los vinos de Jerez son significativamente superiores a los de los vinos de La Rioja ($p < 0,01$), lo que puede correlacionarse con las características edafológicas diferentes de las dos zonas.
7. Las muestras de agua potable presentan una concentración superior de Zn, con un valor medio de $0,080 \mu\text{g/L}$, le siguen las de riego ($0,035 \mu\text{g/L}$), residuales ($0,032 \mu\text{g/L}$) y marinas ($0,023 \mu\text{g/L}$). Pero no se han observado diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de agua ($p > 0,01$).
8. Las concentraciones de Zn encontradas en los sedimentos ($145,77 \mu\text{g/g}$) y suelos ($121,31 \mu\text{g/g}$), fueron superiores a las determinadas en las arenas ($69,3 \mu\text{g/g}$) ($p = 0,016$, $p > 0,01$). Sin embargo, mediante el test de rango múltiple se comprueba la no homogeneidad de las muestras de arena respecto a las de suelos y sedimentos, debido a los distintos grupos edafológicos en los que se incluyen, así como al pH de los mismos.

9. La actividad industrial de la zona aumentó significativamente los niveles de Zn en los suelos de cultivo del área estudiada ($p < 0,01$), y del mismo modo disminuyó el pH de éstos ($p < 0,05$). Este doble efecto se produce simultáneamente dada la correlación recíproca estadísticamente significativa ($p < 0,001$), establecida entre los niveles de Zn en el suelo y el valor de pH.

10. El aporte de Zn en la dieta de la población estudiada es de 10,025 mg/persona/día. Los productos cárnicos, cereales y derivados, leche y derivados lácteos, son los alimentos que contribuyen mayoritariamente a la ingesta de Zn debido a su mayor concentración y consumo, entre los que destaca el pan.

Bibliografía

ABDULLA, M.; BEHBEHANI, A.; DASHTI, H. (1989). Dietary intake and bioavailability of trace elements. *Biol. Trace. elem. Res.* 21: 173-178.

ABDULLA, M.; CHMIELNICKA, J. (1989). New aspect on the distribution and metabolism of essential trace elements after dietary exposure to toxic metals. *Biol. Trace. Elem. Res.* 23: 25-53.

ACS COMMITTEE ON ENVIRONMENTAL IMPROVEMENT. (1980). Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in the environmental chemistry. *Anal Chem.* 52: 2242.

AGGET, P.J. (1989). Severe zinc deficiency. *Zinc in human biology*. Edited by C.F. Mills. London International life Sciences Institute, pp259-280.

AHMED, R.; STOEPLER, M. (1987). Storage and stability of mercury and methylmercury in sea water. *Anal. Chim. Acta*, 192: 109-113.

AJMAL, M.; KHAN, A.; NOMANI, A.A.; AHMED, S. (1997). Heavy metals- leaching from glazed surfaces of tea mugs. *Elsevier Sci.* 207(1): 49-54.

AKRIVOS, F.; BLAIS, M.J.; HOFFELT, J. BERTHON, G. (1984). An assesment of the physiological significance of cimetidine interactions with cooper and zinc in biofluids as based on the computer-simulated distribution of the involved complexes at therapeutic levels of the drug. *Agents and action*, 15, 649-659. (1984).

ALLEN, J.L.; BELL, E.; BOOSALIS, M.G.; Y COL. (1985). Association between urinary zinc excretion and lymphocyte dysfunction in patients with lung cancer. *Am. J. Med.* 79, 209-215.

ANDERSON, B.N.; GIDSON, R.S.; SABRY, J.H. (1981). *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 1042.

AOAC INTERNATIONAL (1993) *Methods of analysis for nutrition labelling: Zinc*. Sullivan, D.M. and Carpenter, D.E. (eds.) AOAC International, Arlington, 595.

ARRANZ, A.; BARRIO, R.; GIL, J. (1988). Contribución al estudio de compuestos inorgánicos en vinos de Rioja. II. Metales pesados. *Anal. Bromatol.* XL-2: 375-381.

AUKE, M.; GROPPPEL, B.; KRAUSE, U.; ARNHOLD, W.; LANGER, M. (1991) Trace element intake (zinc, manganese, copper, molybdenum, iodine and nickel) of humans in Thuringia and Brandenburg of the Fed. Rep. of Germany. *J. Trace Elem. Electrolytes Health dis.* 5: 69-74.

BAER, M.T. KING, J.C (1984). Tissue Zn levels and Zn excretion during experimental Zn depletion in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* 39: 556-570.

BALES, C.W.; FREELAND-GRAVES, J.H.; ASKEY, S.; BEHMARDI, F.; POBOCK,

- R.S.; FICKEL, J.F.; GREENLEE, P. (1990) Zinc, magnesium, copper and protein concentrations in human saliva: age and sex-related differences. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 462-469.
- BALLESTER, O.B.; PRASAD, A.S. (1983). Energy, zinc deficiency and decreased nucleoside phosphorylase activity in patients with sickle cell anemia. *Annals of Internal Medicine.* 98(2): 180-182.
- BARBERA, R.; FARÉ, R.; LOZANO, A. (1989). Oral intake cadmium, lead, cobalt, chromium, nickel, copper, manganese and zinc in the spanish diet, estimated by a duplicate meal study. *J. Micronutr. Anal.* 6: 47-57.
- BARRY, M.G.; MACMATHUNA, P.; YOUNGER, K.; KEELING, P.W.; FEELY, J. (1991) The effect of zinc supplementation on oxidative drug metabolism in patients with hepatic cirrhosis. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 31: 488-491.
- BAYNES, J. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 40: 405-412.
- BEATY, R.D. (1979) Conceptos, instrumentación y técnicas en espectrofotometría de absorción atómica. Publicaciones Analíticas. USA.
- BEDWAL, R.S.; BAHUGUNA, A. (1994). Zn, copper and selenium in reproduction. *Experientia* 50: 626-640.
- BEHRENS, R. H.; TOMKINS, A.M.; ROY, S.K.; (1990). Zn supplementation during diarrhoea, a fortificator during malnutrition. *Lancet.* 442-443.
- BELILES, R.P. (1978) The lesser metals. En: Toxicity of the heavy metals in the environment. Part 2, Oehme, F.W. (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York.
- BENEMARIYA, H.; ROBBERECHT, H.; DEELSTRA, A. (1993) Daily dietary intake of copper, zinc, and selenium by different population groups in Burundi. *Africa. Sci. Total Env.* 136: 49-76.
- BENTON-JONES, J.C. (1994). Developments in the measurements of trace metals constituents in foods. En: Gilbert J. Analysis of Food contaminants. New York, Elsevier Applied Publishers.
- BERROW, M.L.; WEBBER, M. (1972) Trace elements in sewage sludges. *J. Sci. Food Agric.* 23: 93-100.
- BERTHOFF, R.G. (1987) Zinc. In: Handbook on toxicity of inorganic compounds. Marcel Dekker, Inc., New York.
- BERTRAND, G.; VLADESCO, R.; HEBD, C.R. (1921). Intervention probable du Zn dans les phénomènes de fécondation chez les animaux vertébrés. *C. R. Seanc. Soc. Biol.*

Fil. 173: 176- 180.

BETTGER, W.J.; REEVES, P.G.; MOSCATELLI, J.E.; SAVAGE, J.E.; L'ODELL, B. (1980). *J. Nutr.* 110-150.

BIANCHINI, F.; CORBETTA, F., PISTOIA, M., MESSEGUE, M. (1974). *Frutos de la tierra, atlas de las plantas alimenticias*. De. Aedos, Barcelona.

BIRES, J.; VRZGULA, L.; JUHASOVA, Z. (1991). Distribution of harmful metals in sheep after experimental administration of industrial emissions. *Vet. Med. (Praha)*. 36(6): 361-71.

BLAND, J. (1983). Hair tissue mineral analysis. An emergent diagnostic technique. 25-26.

BOGDEN, J.D.; OLESKE, J.M.; MUNRES, E.M.; Y COL. (1987). *Am. J. Clin. Nutr.*, 45: 101-109.

BOTTOMLEY, S.S. (1982). Sideroblastic anemia. *Clin. Hematol.* 11: 389-409..

BOUDA, M.; KRIZEK, M.; MALKUSOVA, Y.; MOTAN, J.; PIZINGER, K.; RUSAVY, Z. (1994). Zinc deficiency as a cause of dermatosis in a patient with type Y diabetes and renal insufficiency. *Vnitr. Lek.* 40: 445-447.

BRADDEY, A.F. (1986) Emisión por ICP o absorción atómica. ¿Cómo elegir?. *Química* 2000. 17: 56-60. 1986.

BRADLEY, R.I. (1980). Trace elements in soils around Llechyd, Dyfed, Wales. *Geoderma*, 24: 17-23.

BRATAKOS, M.S.; ZAFIROPOULOS, T.F.; SISKOS, P.A.; IOANNOU, P.V. (1987). Selenium in foods produced and consumed in Greece. *J. Food. Sci.* 52:817-822.

BREWER, G.J.; HILL, G.M.; PRASAD, A.S.; COSSAK, Z.T.; RABBANI, P.(1983). Oral Zn therapy for Wilson's disease. *Ann Intern. Med.* 99:314-318.

BRIDGES, E.M.; DAVIDSON, D.A. (1982). Principles and applications of soil geography. Longman Group Ltd., New York, 99-101.

BRO, S.; SANDSTRÖM, B.; HEYDORN, K. (1990) Intake of essential and toxic trace elements in a random sample of Danish men as determined by the duplicate portion sampling technique. *J. Trace Elem. Electrolytes Health. Dis.* 4: 147-155.

BRUN, J.F.; FONS, C.; FUSELLIER, M.; BORDET, L.; ORSETTI, A. (1992). Urinary zinc and its relationship with microalbumin in type Y diabetics. *Bilo. Trace. Elem. Res.* 32: 317-323.

BRUNO, P.; CASELLI, M.; FANE, A.; FRAGALE, G. (1978). *Analyst* 103: 868-871. (Tomado de Arranz A. y col. 1988).

- BRYCE-SMITH, D.; HODKINSON, I. (1987). *The Zn solution*. London. Arrow.
- BUCHET, J.P.; LAUWERRYS, R.; VANDERVOORDE, A.; PYCKE, J.M. (1983). Oral daily intake of cadmium, lead, manganese, copper, chromium, mercury, calcium, zinc and arsenic in Belgium: a duplicate meal study. *Fd. Chem. Toxic.*, 21: 19:24.
- BUNKER, V.W.; CLAYTON, B.E. (1989) Research review: studies in the nutrition of elderly people with particular reference to essential trace elements. *Age and Ageing*. 18: 422-429.
- BUNKER, V.W.; HINKS, L.J.; LAWSON, M.S.; CLAYTON, B.E. (1984). Assessment of zinc and copper status of healthy elderly people using metabolic balance studies and measurement of leucocytes concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 40: 1096-1102.
- BUNKER, V.W.; HINKS, L.J.; STANFIELD, M.F.; LAWSON, M.S.; CLAYTON, B.E. (1987). Metabolic balance studies for zinc and copper in housebound elderly people and relationship between zinc balance and leucocyte zinc concentrations. *Am. J. Clin. Nutr.* 46(2) 353-9.
- BURKE, J.P.; FENTON, M.R. (1985). Effects of a zinc deficient diet on lipid peroxidation in liver and tumor subcellular membranes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 179:187-191.
- BUXADERAS, S.; FARRE, R. (1985) Importancia del cinc en la alimentación humana. *Nutrición clínica*. 4: 61-70.
- CAMUSSO, M.; VIGANO, I.; BALESTRINI, R. (1995). Bioconcentration of trace metals in rainbow trout a field study. *Ecotoxicology and environmental Safety*. 31(2):133-141.
- CANELAS, H.; DEJORGE, F.; PEREIRA, W. SALLUM, J. (1968). Biochemistry of cerebral tumors: sodium, potassium, calcium, phosphorus, magnesium, copper and sulphur contents of astrocytoma, medulloblastoma and glioblastoma multiforme. *J. Neurochem* 15: 1455-1461.
- CAO, G.H.; CHEN, J.D. (1991) Effects of dietary zinc on free radical generation, lipid peroxidation, and superoxide dismutase in trained mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 291: 147-153.
- CAPOCACCIA, L.; MERLI, M.; PIAT, C.; SERVI, R.; ZULLO, A.; RIGGIO, O. (1991) Zinc and other trace elements in liver cirrhosis. *Ital. J. Gastroenterol.* 23: 386-391.
- CARMENA, R. (1986). Vitaminas y cancer. En: *Alimentación y cáncer*. Ministerio de Sanidad y consumo. Madrid, 77-84.

- CASTILLO-DURAN, C.; HERESI, G.; FISBERG, M.; UANY, R.(1987). Controlled trial of zinc supplementation during recovery from malnutrition: effects on growth and immune function. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 602-608.
- CELAYA, S.; ELOSEGUI, L.M.; PARDO, M.P.; SAGREDO, M.A.; TABUENCA, J.; MONTIS, F. (1989). Monitorización de cobre yzn en pacientes con NPT prolongada. *Nutr. Hosp.* 4(3): 137-141.
- CHANDRA, R.K. (1984). Excessive intake of zinc impairs immune response. *J. Am. Med. Assoc.* 252: 1443-1446.
- CHANDRA, R.K. (1992). Effect of vitamin and trace- element supplementation on immune responses and infection in elderly subjects. *The Lancet.* 340:1124-1127.
- CHEN, F.; COLE, P.; WEN, L.; MI, Z.; TRAPIDO, E.J. (1994) Estimates of trace element intakes in chinese farmers. *J. Nutr.* 124: 196-201.
- CHEN, M.D.; LIN, P.Y.; LIN, W.H. (1991) Investigation of the relationships between zinc and obesity. *Kao. Hsing. I. Hsyeh. Ko. Hsueh. Tsa. Chih.* 7: 628-634.
- CHEN, M.D.; LIN, W.H.; WANG, J.J.; TOSON, C.T. (1991) Investigation on the relationships among blood zinc, copper, insulin and tyroid hormones in non-insulin dependent diabetes mellitus and obesity. *Chung-Hua. I. Hsueh. Tsa. Chih. Taipei,* 48: 431-438.
- CHERYAN, M. (1980). *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.* 13, 297-335.
- CHIPLONKAR, S.A.; AGTE, V.V.; GOKHALE, M.K. (1993). Zinc, cooper & iron contents in cooked foods & stimated of their daily intakes in young hostel residents. *Indian. J. Med. Res.* 98: 283-289.
- CLYDESDALE, F.M.; HO, C.; LEE, C.Y.; MONDY, N.I.; SHEWFELT, R.L. (1991) The effects of postharvest treatment and chemical interactions on the bioavailability of ascorbic acid, thiamin, vitamin A, carotenoids and minerals. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30: 599-638.
- COLE, A.; MAY; WILLIAMS, D.R. (1983). Metal binding by pharaceuticals. *Agens and actions* 13, 91-97.
- COLE, A.; GOODFIELD, J.; WILLIAMS; D.R.; MIDGLEY, J.M. (1984). The complexation of transition series metals ion by nalidixy acid , *Inorg. Chim. Acta.* 92, 91-97 (1984).
- COLIN, M.A.; TAPER, L.J.; RITCHEY, J. (1983). Effects of dietary zinc and protein levels on the utilization of zinc and cooper by adults females. *J. Nutr.* 113:1480-1488.
- CONDE, M.; VAZQUEZ, M^a D.; TASCÓN, M^a L.; SANCHEZ BATANERO. (1986)

Determinación de Zn(II) y Cd(II) por voltamperometría de redisolución anódica de sus correspondientes ferrocianuros, sobre electrodo cilíndrico de platino. *Quim. Anal.* 5: 277-286.

CONTIERO, E.; FOLIN, M. (1994). Trace elements nutritional status. Use of hair as a diagnostic tool. *Biol. trace. Elem. Res.* 151-160.

CORELLA, D.; FRASQUET, Y.; TALAMANTE, S.; CALDERON, C.; CORTINA, P. (1991). Importancia actual del Se alimentario sobre la salud humana. *Nutrición y dietética*, 11(1): 57-63.

COSSON, R.P. (1994). Heavy metal intracelular balance and relationship with metallothionein induction in the gills of carp after contamination by Ag, Cd and Hg following pretreatment with Zn or not. *Biol. Trace. Elem. Res.* 46(3):229-245.

COUDRAY, C.; BOUCHER, F.; RICHARD, M.J.; ARNAUD, J.; DE-LEIRIS, J.; FAVIER, A. (1991) Zinc deficiency, ethanol and myocardial ischemia affect lipoperoxidation in rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 30: 103-118.

COUSINS, R.J. (1979). Regulatory aspects of zinc metabolism in liver and intestine, *Nutr. Rev.* 37:97-103.

COUZY, F.; KASTENMAYER, P.; MANSOURIAN, R.; GUINCHARD, S.; MUNOZ-BOX, R.; DIRREU, H. (1993) Zinc absorption in healthy elderly humans and the effect of diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 58: 690-694.

CRAIG, W.J.; BALBACH, L.; VYHMEISTER, N. (1984). Zinc bioavailability and infant formulas. *Am. J. Clin. Nutr.* 39: 981-983.

CROSBY, N.T. (1977). Determination of metals in foods. *The Analyst*, 102: 225.

CROSBY, N.T. (1977). Determination of metals in foods. *The analyst*, 102:225.

CUNNINGHAM-RUNDLES, C.; DUPONT, B., y col. (1981). Zinc induced activation of human B. lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 42: 332-335.

CURTISS, D.H.; JOHNSON, E.; HERBEL, J.; MULLEN, L. (1992). Effects of dietary Zn depletion on seminal volume and Zn loss, serum testosterone concentrations, and sperm morphology in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* 56: 148- 157.

CZIJKA-NARINS, D.M. (1992) Minerals. En: *Food nutrition and diet therapy*. MAHAN, L.K. ARLIN, M. (eds.). W.B. Saunders Company, Philadelphia, 123-126.

DANKS, D. Cooper deficiency in humans. (1988). *Annu rev. Nutr.* 8: 235-257.

DAVID, T.J.; WELLS, F.E.; SHARPE, T.C.; GIBBS; DEVLIN, J. (1990). Serum levels of trace metals in children with atopic eczema. *Brit. J. Dermatol.* 122, 485-489.

DAVIDSSON, L.; ALMGREN, A.; SANDSTROM, B.; HURREL, R.F.; (1995). Zn

absorption in adult humans- the effect of iron fortification. *Br. J. Nutr.* 74 (3): 417-425.

DAVIDSSON, L.; KASTENMAYER, P.; HURRELL, F. (1994). Sodium iron EDTA (NaFe(III)EDTA) as a food fortificant: the effect on the absorption and retention of Zn and calcium in women. *Am. J. Clin. Nutr.* 231-237.

DAVIES, S.; STEWARD, A. (1987). *Nutritional medicine. The drugg-free guide to better family health.* LONDON: pAN. 280-281.

DAWSON, E.B.; ALBERS, J.; MCGANITY, W.J. (1989). Serum zinc changes due to iron supplementation in ten-age pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 848-852.

DEMENTEVA, I.I.; ANCHIANOVA, M.I.; DZEMESH KEVICH, S.L.; IAVOROUSKII, A.G.; LOKSLIN, L.S. (1993) Changes in the content of microelements-copper, zinc and iron in the blood of patients following cardiopulmonary bypass. *Anesteziol. Reanimatol.* 4: 50-53.

DEUSTER, P.A.; DAY, B.A.; SINGH, A.; DOUGLAS, L.; MOSER-VEILLON, P.B. (1989) Zinc status of highly trained women runners and untrained women. *Am. J. Clin. Nutr.* 49: 1295-1301.

DHAWAN, D.; GOEL, A. (1996). Further evidence for zinc as a hepatoprotective agent in rat liver toxicity. *Exp. Mol. Pathol.* 63(2). P. 110-117.

DI SILVESTRO, R.A.; COUSINS, R.J. (1983). Physiological ligands for copper and zinc. *Annu. Rev. Nutr.* 3: 261-268.

DI TORO, R.; CAPOTORI, M.G.; GIALANELLA, G.; MIRAGLIA, M.; PERRONE, L. (1987). Zn and copper status of allergic children. *Acta paediatric. Scand.* 76, 612-617.

DIAZ-ALARCON, J.P. (1995) Determinación de selenio en alimentos, agua y suelos de cultivo del área de Motril y su relación con el aporte en la ingesta diaria. Tesis doctoral. Granada.

DINSMORE, W.W. (1985). The absorption of zinc of an standardized meals in alcoholics and in normal volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.* 42: 688.

DONANGELO, C.M. (1984). Zinc status of nursing mother and weight adequacy of their newborn babies. *Nutr. Rep. Int.* 30: 1157-1163.

DONOVAN, U.M.; GIBSON, R.S. (1995). Iron and zinc status of young women aged 14 to 19 years consuming vegetarian and omnivorous diets. *J. Am. Coll. Nutr.* 14(5): 463-472.

DORUP, I.; CLAUSEN, T. (1991) Effects of magnesium and zinc deficiencies on growth and protein synthesis in skeletal muscle and the heart. *Br. J. Nutr.* 66: 493-504.

ELLEN, G.; EGMOND, J.W.; VAN LOON, E.T.; SAHERHIAN & TOLSMA, K. (1990). Dietary intakes of some essential and non essential trace elements, nitrate, nitrite and n-nitrosamines by Dutch adults estimated via a 24-hours duplicate portions study. *Food Addit. Contam.* 7: 207-221.

ELLEN, G.; VAN LOON, J.W.; TOLSMA, K. (1990). Heavy metals in vegetables grown in the Netherlands and in the domestic and imported fruits. *Z. Lebensm Unters Forsch.* 190(1):34-39.

EL-YAZIGI, A.; HANNAN, N.; RAINES, D.A. (1993). Effect of diabetic state and relate disorders on the urinary excretion of magnesium and zinc in patients. *Diabetes Res.* 22: 67-75.

ENGLISH- WESTCOTT, J.L.; HAMBIDGE, K.M.; ELLENBOGEN, L. (1991). A comparison of zinc sulfate and oxide absorption in humans using and oral zinc tolerance test. *FASEB J.* 5: 938.

ENGLISH, J.L.; HAMBIDGE, K.M.; GODDALL, M.; NELSON, D. (1987). Evaluation of some factors that may affect plasma or serum zinc concentrations. *Pacific. Grove. C.A: Trace elements in man and animals* 6:88.

ERHEIJDEN, J.H.M.; SCHOTMAN, A.J.H.; VAN MIERT, A.; VAN DUIN, T. (1983). Zinc cincentration on skimmed milk and whole milk samples from healthy and mantitis cows. *Am. J. Vet. Res.* 44: 1637-1640.

ESCOBAR, O.; SANDOVAL, M.; VARGAS, A.; HEMPE, J.M. (1995). Role of metallothionein and cysteine rich intestinal protein in the regulation of zinc absortin by diabetics rats. *Pediatr. Res.* 37(3): 321-327.

EVANS, G.W.; JOHNSON, P.E. (1980). Zinc absorption in rat fed a low protein diet and a low protein diet supplemented with truptopham and psicolinic acid. *Journal Nutr.* 110: 1076-1080.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J.; WHARF, G.S.; FOX, T. (1995). Zn absorption in infants fed iron fortified weaning food. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 785-789.

FARRE Y BAYARRI (1984). Determinación de sodio, potasio, calcio y magnesio en leches y papillas destinadas a la alimentación infantil. *Alimentaria*, 158: 23-18.

FAURE, P.; BENHAMAU, P.Y.; PERARD, A.; HALIMI, S.; ROUSSEL, A.M.(1995). Lipid peroxidation in nisulin-dependent diabetic patients whith early retina degenerative lesions, effects of an oral zinc supplementation. *Eur. J. Clin. Nutr.* 49:282-288.

FAURE, P.; ROUSSEL, A.M.; RICHARD, M.J.; FOULOU, R.; GROSSLAMBERT, P.; HADJIAN, A.; FAVIER, A. (1991) Effect of an acute zinc depletion on rat lipoprotein

distribution and peroxidation. *Biol. Trace Elem. Res.* 28: 135-146.

FERGUSON, E.; GIBSON, R.; OBISAW, C.; OUPUU, S.; THOMPSON, L.; LEHRFELD, J. (1993). The zinc nutriture of preschool children living in two african countries. *J. Nutr.* 123: 1487-1496.

FERGUSON, E.L.; GIBSON, L.S.; THOMPSON, L.U.; OUNPUU, S. (1989). Dietary calcium, phytate, and Zn molar ratios of the diets of a selected group of east African children. *Am. J. Clin. Nutr.* 50. 1450-1456.

FIDANZA, F. (1991) Essential mineral and trace element nutriture methodology: zinc. In *Nutritional status assessment*. Chapman and Hall, 1st edu; London.

FLYNN, A.; MILLER, S.I.; MARTIER, S.S.; GLDEN, N.L.; SOKOL, S.J. & DELVILLANO, B.C. (1981). Zinc status of pregnant alcoholic women: a determinant of fetal outcome. *Lancet* 1, 572.575.

FOOD AND NUTRITION BOARD (Bational Research Council) (1989). *En: Recommended Dietary Allowance*, 10th ed.; National Academy Press; Washington, D.C.

FORBES, R.M.; PARKER, H.M.; ERDMAN,

FOSMIRE, C.J. (1990). Zinc toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 225.

FRANKLIN, A.J.; BLAIR, C. (1988). Atopic eczema and other allergic disorders of the skin. 6: 39-62.

GARCIA Y OLMEDO, R.; DIEZ MARQUES, C. (1986). Estudio del contenido de minerales en harinas lacteadas. *Alimentaria*, 3: 65-68.

GARDUNO,J.; PANIAGUA, R.; DIAZ, S.; LIFSH, A.(1991). Response of serum zinc and cooper to inflamatory stimulation in the rat with crhonic liver damage. *Arch. Invest. Med. Mex.* 22:289-294.

GARG,V.K.; GUPTA, R.; GOYAL, R.K. (1994). Hipozincemia in diabetes mellitus. *J. Assoc. phisicians India.* 42: 720-721.

GIBSON, R.; VANDERKOOY, P.; McDONALD, C.; GOLDMAN, A.; RYAN, B.; BERRY, M. (1989). A growth- limiting, mild zinc- deficiency syndrome in some Southern Ontario boys with low height percentiles. *Am. J. Clin. Nutr.* 49: 1266-1273.

GIBSON, R.S.; FERGUSON, E.L.; VANDERKOOY, P.D. & McDONALD, A.C. (1989). Seasonal variations in hair Zinc concentrations in canadian and african chilgren. *Sci. Total environ.* 84: 291-298.

GIBSON, R.S.; MARTINEZ, A.B.; McDONALD, A.C. (1985). The zinc, cooper and selenium status of a selected sample of canadian elderly women. *J. Gastroentrol.* 40:

296-302.

GOLDEN, B.E. & GOLDEN, M.H.N. (1981). Plasma Zn, rate of weight gain and energy cost of tissue deposition in children recovering from severe malnutrition on cow's milk or soya protein based diet. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 892-899.

GOLDEN, M.H.M.; JACKSON, A.A. (1977). Effect of zinc on thymus in recent malnourished children. *Lancet*, 2:1057.

GOLDEN, M.H.N.; GOLDEN, B.E. (1981). Effect of Zn supplementation on the dietary intake, rate of weight gain, and energy cost of tissue deposition in children recovering from severe malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 34: 900-908.

GOLIK, A.; COHEN, N.; RAMOT, Y.; MAOR, J.; MOSES, R.; WEISSGARTEN, J.; LEONOV, Y.; MODAI, D. (1993). Type II Diabetes mellitus, congestive heart failure, and Zn metabolism. *Biol. Trace element Research.* 39:171-175.

GOLIMOWSKI, J.; VALENTA, P.; STOEPLER, M.; NURNBERG, H.W. (1979). *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 168:439-443. (Tomado de Arranz A. y col. 1988).

GOLUP, M.S.; GERSHWIN, M.E.; HURLEY, L.S.; BALY, D.L.; HENDRICKX. (1984). Studies of marginal zinc deprivation in rhesus monkeys. II. Pregnancy outcome. *Am. J. Clin. Nutr.* 39, 879-887.

GONZALEZ, E.; SANTOLARIA, F.; PERÉZ, J.; RODRIGUEZ, F.; MARTINEZ, A.; HERNANDEZ, O., VALLADARES, F.; MOLINA, M.; (1996). Relative and combined effects of propylthiouracil, ethanol and protein deficiency on liver histology and hepatic iron, zinc, manganese and copper contents alcohol. *31:535-545.*

GONZALEZ, G.; BELTRAN, R.; GOMEZ ARIZA, J.L.; GUIRAUM PEREZ, A. (1989) Spectrophotometric determination of zinc with 1-(phenyl-2-pyridyl) carbilidene-5-resorcyldene thiocarbohydrazone in tap waters and pharmaceutical preparations. *Química Analítica*, 8: 81-90.

GOVINDARAJU, V.; PRABHUDEV, N.; GURAPPA, M.; JAWALI, V.S.; CHANDRASEKHARA, P.M.; MANJUNATH, C.N. (1993) Zinc in rheumatic heart valves. *J. Assoc. Physicians India*, 41: 653-654.

GRAY, B.; WALKER, C.R. (1987). Use of serum copper/zinc ratio in patients with large bowel cancer. *J. Surg. Onco.* 21: 230-232.

GROPPER, S.S.; ACOSTA, P.B.; SHEEHAM, N.; WENZ, N.; CHENG, M.; KOCH, R. (1988). Trace elements status of children with PKU and normal children. *J. Am. Diet. Assoc.* 88(4): 459-465.

GUNN, S.A.; GOULD, T.C.(1970). Cadmium and other mineral elements, in the

testis. Eds A. D. Johnson, W.R.; Gómez and N. L. Van Demark. Academic Press. 3: 377-481.

GUTHRIE, B.E.; ROBINSON, M.F. (1977). Daily intakes of manganese, copper zinc and cadmium by newzealand women. *Br. J. Nutr.* 38: 55-63.

HAGAY, Z.J.; WEISS, Y.; ZUSMAN, Y.; PELD, K.M.; REECE, E.A.; ERICSSON, V.J.; GRONER, Y. (1995). Prevention of diabetes-associated embryopathy by over expression of the free radical scavenger copper zinc superoxide dismutase in transgenic mouse embryos. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173: 1036-1041.

HALL, A.C.; YOUNG, B.W.; BREMNER, Y. J. (1979) *Inorg. Biochem.* 11,57.

HALSTED, C.H.; KEEN, C.L. (1990). *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2: 399-405.

HALSTED, J.A.; RONAGHY, H.A.; ABADI, P.; HAGHSHENASS, M.; AMIRHAKEMI, G.H.; BARAKAT, R.M.; RHEINHOLD, J.G. (1972). *Am. J. Med.* 53: 277.

HAMBIDGE, K.M. (1981). Zn deficiency in man: its origins and effects. *Phil Trans. R. Soc.* 294B, 129-144.

HAMBIDGE, K.M. (1988). Mild Zinc deficiency in human subjects. In *Zn in Human Biology*. 281-296

HAMBIDGE, K.M.; (1988). Mild deficiency in human subjects. *Zn in human biology*. 281-296.

HAMBIDGE, K.M.; WALRAVENS, P.A.; CASEY, C.E.; CLARE, E.; BROWN, R.M.; BENDER, C. (1979). Plasma Zn concentrations of breast-fed infants. *J. Pediatr.* 94: 607-608.

HAMBRIDGE, K.M.; KREBS, N.F. (1989) Upper limits of zinc, copper and manganese in infant formula. *J. Nutr.* 119: 1861-1864.

HANNI, H. (1967). Determination of traces manganese (in milk and cheese). *Milchztg.* 93(94). 113: 934-936.

HANSEN, M.; SANSTROM, B. (1996). The effect of casein phosphopeptides on zinc and calcium absorption from high phytate infant diets assessed in rat pups and caco-2 cells. *Pediatric Research* 40(4): 547-552.

HARDELL, L.; WING, A.M.; LJUNBERG, B.; OREIFALDT, A.C.; DEGERMAN, A.; HALMANS, G. (1994) Levels of cadmium, zinc and copper in renal cell carcinoma and normal kidney. *Eur. J. Cancer Prev.* 3: 45-48.

HARRIS, C.D. (1992) *Análisis químico cuantitativo*. Ed. Iberoamericana, México.

HARRIS, W.R.; KEEN, C. (1989) Calculations of the distribution of zinc in a computer

model of human serum. *J. Nutr.* 119: 1677-1682.

HARVARD GRAPHICS, (1997). Harvard graphics para windows. Software Publish. corp. U.S.A.

HAVIVI, E.; BAR-ON, H.; RESHEF, A.; STEIN, P.; RAZ, Y. (1991). Vitamins and trace metals status in non insulin dependent diabetes mellitus. *Int. j. Vitam. nutr. res.* 61: 328-333.

HEISE. C.C.;KING, J.C.; COSTA, J.M.; KILTZMILLER, J.L. (1988). *Diabetes care.* 11: 780-786.

HEMALATHA, P.; BRASKARAM, P.; KHAN, M.M. (1993). Role of zinc supplementation on the rehabilitation of severely malnourished children. *European Journal of Clinical Nutrition.* 47: 395-399.

HERRADOR, M.A.; JIMENEZ, A.M.; ASUERO, A.G. (1984). Determinación de elementos traza esenciales en leche mediante espectrofotometría de absorción atómica con llama. *Alimentaria,* 154: 21-28.

HESS, F.M.; KING, J.C.; MARGEN, S. J. *Ntr.* (1977): 107, 1610

HINKS, L.J.; YOUNG, S.; CLAYTON, B. (1987). Trace elements status in eczema and psoriasis. *Clin Expl. Dermatol.* 12, 93-97.

HOCKIN, D.C.; PARKER, D.M. (1988). The effects of development of a tidal barrage upon the water and sediment quality of the mersey estuary (U.K) and its biota.

HOFFMAN, H.N.; PHYLYKY, R.L.; FLEMING, C.R. (1988). Zinc-induced cooper deficiency. *Gastroenterology* 94: 508-512.

HONGSTRAND, C.; REID, S.D.; WOOD, C.M.; (1995). Ca^{+2} versus Zn^{+2} transport in the gills of fresh zater rainbow trout and the cost of adaptation to water borne Zn^{+2} .

HOOPER, P.L.; VISCONTI, L.; GARRY, P.J.; JOHNSON, G.E. (1980). Zinc lowers high-density lipoprotein-cholesterol levels. *J. Am. As.* 244: 1960-1962.

HSU-HY; LIN-SY; HUANG.CJ; LIAN-SL; HO-YHI. (1994). Changes of serum cooper and zinc levels in patients whith naso pharyngeal carcinoma by radio therapy. *Biol. Tr. El. Res.* 46: 1-13.

HUANG, C.C. (1991) Impaired superoxide dismutase activity and decreased content of lipid peroxides in hepatocellular carcinoma tissue. *Chuang. Hua. Wai. Ko. Tra. Chih.* 29: 195-197.

HUNT, C.D.; JOHNSON, P.E.; HERBEL, J.; MULLEN, L.K. (1992) Effects of dietary zinc depletion on seminal volume and zinc loss, serum testosterone concentrations and sperm morphology in young men. *Am. J. Clin. Nutr.* 56: 148-157.

HUNT, J.R.; GALLAGHER, S.K.; JOHNSON, L.K.; LYKKEN, G.L. (1995). High-versus -low meat diets- effects on zinc absorption, iron status, and calcium, cooper, iron, magnesium, manganese, nitrogen, phodphorus, and zinc balance in post menopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 62(3): 621-632.

HURLEY, L.S. & MUTCH, P.B. (1973). Prenatal and postnatal development after transient gestational zinc deficiency in rats. *J. Nutr.* 103, 649-656.

HURLEY, L.S.; GORDON, P.; KEEN, C.L. Y COL. (1982) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 170: 48-52.

I.U.P.A.C.(1978). Nomenclature, symbols,units and their usage in spectrochemical, analysis II. *Spectrochim. Acta*, 33B: 242.

INDIANAPOLIS DEPERTMENT OF PUBLICS WORKS (1989). Study of toxic componds in river bottoms at metropolitans areas. 43 Purdue Industrial Waste conference proceedings.

IVOR, E.; DREOSTI, S.C.; (1993). Recommended Dietary intakes of iron, Zn, and other inorganics nutrients and their chemical form and bioavailability. *Nutrition*. Vol. 9 N° 6. Pag 542-545.

IYENGAR, G.V.; TANNER, J.T.; WOLF, W.R.; ZEISLER, R. (1987). Preparation of a mixed human diet material for the detrmination of nutrient elements, selected toxic elements and organic nutrient: a preliminary report. *Sci. total. Envirom.* 61: 235-252.

JACKSON, M.J.; JONES, D.A.;EDWARDS, R.H.T. (1984). *Br. J. Nutr.* 51: 199-208.

JAMESON, S. (1976). Variations in maternal serum Zn during pregnancy and correlation to congenital malformations, dismaturity., and anormal parturiation. *Acta. Med. Scand. Suppl.* 593: 21-37.

JAMESON, S.; (1976). Effects of zinc deficency in human reproduction. *Acta. med. Scand. Suppl.* 593: 1-89.

JIMENEZ, A.M.; HERRADOR, M.A.; ASUERO, A.G.(1984). Elementos traza en alimentos. I. Aspectos metodológicos de su determinación. *Alimentaria.* 152: 107-111.

JOCHUM, F.; FUCHS, A.; CSER, A.; MENZEL, H.; LOMBECK, Y. (1995).

JOCHUM, F.; FUCHS, A.; CSER, A.; MENZEL, H.; LOMBECK, Y. (1995). Trace mineral status of full-term infants fed human milk, milk-based formula or partially hydrolysed whey protein formula. *Analyst.* 120(3): 905-909.

JOHNSON, M.A.; BAIER, B.S.; GREGER, J.L. (1982). Effects of dietary tin on zinc, cooper, iron, manganese, and magnesium metabolism of adult males. *Am. J. Cli. Nutr.* 35:1332-1338.

JOHNSON, P.E.; HUNT, C.D.; MILNE, D.B.; MULLEN, L.K. (1993) Homeostatic control of zinc metabolism in men: zinc excretion and balance in men fed diets low in zinc. *Am. J. Clin. Nutr.* 57: 557-565.

JUAREZ Y MARTINEZ CASTRO, I. (1979). Determinación de Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mn en leche de mercado por espectrofotometría de absorción atómica. *Rev. Agroquim. Technol. Aliment.* 19: 45.

JUAREZ, M.; MANZANO, T.; MAETINEZ, Y.(1978). Determinacion de calcio en leche por fotometria de llama y espectroscopía de absorción atómica. *Anal. Bromatol.*, XXX-1: 13-20.

JURADO-CHACON, D.; SERRANO DEL CASTILLO, Z.; LOPEZ FRIAS, M.; CAMPOS, M. (1990) Estudio de los minerales en la prevención del cáncer. *Nutr. Clin.* 10: 19-26.

KAISER, J.; GULLOTTA, F. (1980). Estimation of cooper content of astrocytoma and glioblastoma by cupran method. *Neurochirurgia (Stuttgart)* 23: 20-23.

KAJANACHUMPOL, S.; SRISURAPANON,S.; SUPANIT, Y.;

KAKKAR, R.; MANTHA, S.V.; KALRA, J.; PRASAD, K. (1996). Time course study of oxidative stress in aorta and heart of diabetic rat. 91 (4):441-448.

KEITH FURR, A.; PARKINSON, T.F.; BACHE, C.A.; GUTENMANN, W.H.; PAKKALA, I.S.; LISK, D.J. (1980) Multielement absorption by crops grown on soils amended with municipal sludge ashes. *J. Agric. Food Chem.* 28: 660-662.

KELSAY, J.L.; JACOB, R.A.; PRATHER, E.S. (1979). *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 2307.

KHAN, S.; KHAN, M.A.; BHATNAGAR, D.; YADAV, P.; SARKAR, S. (1991) Zinc protection against lipid peroxidation from cadmium. *Indian J. Exp. Biol.* 29: 823-825.

KING, J.C. (1996). Do women using oral contraceptive agents require extra Zinc?. *J. Nutr.* 117:217.

KING, J.C.; KEEN, C.L. (1994) Zinc. In: *Modern Nutrition in health and disease*, 8th edn. Lea and Febiger, London.

KINLAW, W.B.; LEVINE, A.S.; MORLEY, J.E.; SILVIS, S.E.; McCLAIN, C.J. (1983). Abnormal zinc metabolism in tipe II diabetes mellitus. *Am. j. med.*, 75: 273-277.

KIRPATRICK, C.S.; WHITE, E.; LEE, J.A. (1994) Case-control study of malignant melanoma in Washington State. II. Diet, alcohol, and obesity. *Am. J. Epidemiol.* 139: 869-880.

KKAKAR. R.; KOBAYASHI, T.; (1996). Changes in superoxide dismutase mRNA expresison by streptozotocin-induced diabetes. *Br. J. Pharmacol.* 119(3). P583-9.

- KLEVAY, L.M.; MOORE, R.J. (1990) Beer mitigates some effects of copper deficiency in rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 51: 869-72.
- KNUDSEN, E.; SANSTROM, B.; ANDERSEN, O. (1995). Zn and manganese bioavailability from human milk and infant formula used for very low birthweight infants, evaluated in a rat pup model. *Biol. Tr. El. Res.* 49 (1) : 52-65.
- KOK, F.J.; VAN DUIJN, C.M.; HOFMAN, A.; VAN DER VOET, G.B.; DE WOLFF, F.A.; POAYS, C.H.; VALKENGURG, H.A. (1988). Serum copper and zinc and the risk of death from cancer and cardiovascular disease. *American J. Epidemiol.* 128: 352-359.
- KOO, S.I.; LEE, D.A. (1988). Compositional changes in plasma high-density lipoproteins particles in marginally zinc-deficient male rats. *Am. J. Clin. Nutr.* 47: 120-127.
- KOYAMA, H.; HOSOKAI, H.; TAMURA, S.; SATOH, H.; (1993). Positive association between serum zinc and apolipoprotein AII concentrations in middle-aged males who regularly consume alcohol. *Am. J. Clin. Nutr.* 57:657-661.
- KUHNERT, B.R.; KUHNERT, P. M.; LAZEBNIK, N.; ERHARD, P.; (1988). The effect of maternal smoking on the relationships between maternal and fetal zinc status and infant birth weight. *J. Am. Coll. Nutr.* 7: 309 - 16.
- KUHNERT, B.R.; KUHNERT, P.M.; GROH-WARGO, S.L.; WEBSTER, S.; ERHARD, P.; LAZEBNIK, N. (1992). Smoking alters the relationships between maternal zinc intake and biochemical indices of fetal zinc status. *Am. J. Clin. Nutr.* 55:981-984.
- KUMMAR,S.; JAYA, R.K. (1974). Blood and urinary zinc levels in diabetes mellitus. *Nutr. metab* 17: 231-235.
- KURZEN, M.S.; CALLOWAY, D.H. (1985). Recommended dietary allowances. D.C. National Academy Press.
- KUTUMBALE, A.S.; CHAPARWAL, B.C.; MELITA, S.S.; VIFAYARAGAVAYYA, R.; MATHUR, P.S.; (1976). Zn levels in serum and erythrocytes in protein-calorie malnutrition. *Ind. Pediatr. B.* 837-840.
- LARSEN, T.; SANDSTRÖM, B. (1992). Effect of calcium, copper and Zn levels in a rapessed meal diet on mineral and trace element utilization in the rat. *Biological Trace Element Research.* 35:168-183.
- LASERNA, J.J.(1985). Pérdidas y contaminación de elementos trazas. *Química analítica*, 4:1-22.
- LAURENT, L. (1981). Elements minéraux. En: Deymie, E.; Multon, J.L.; Simon, A.

Techniques d'analyse et de controle dans les industries agroalimentaires. Vol. 4. Ed. Technique et documentation.

LAVI, N.; ALFASSI, Z.B. (1990). Determination of trace amount of cadmium, cobalt, chromium, iron, molybdenum, nickel, selenium, titanium, vanadium and zinc in blood and milk by neutron activation analysis. *Analyst*. 115:817-822.

LAZEBNIK, N.; KUHNERT, B.R.; KUHNERT, P.M. (1988). Zn status, pregnancy complications and labor abnormalities. *Am. j. Obstet Gynecol.* 158: 161-166.

LEDERER, J. (1985). Le zinc, en pathologie et en biologie. Ed. Nauwelaerts. Bruxelles.

LEUNG, P.; HUANG, H. (1997). Analysis of trace elements in the hair of volunteers suffering from naso-pharyngeal cancer. *Biol. Trace Elem. Res.* 1: 19-25.

LIKILI, M.; ERGEN, A.; CELEBI, I. (1991) Zinc plasma levels in prostatic carcinoma and BDH. *Int. Urol., Nephrol.* 23: 151-154.

LINDER, M.C. (1989) Nutrición y metabolismo de los elementos traza. In: Nutrición: aspectos bioquímicos, metabólicos y clínicos. Linder, M.C. (ed). Editorial Enunsa. Pamplona.

LONG, G.L.; WINEFORDNER, J.D. (1983). Limit of detection: a closer look at the I.U.P.A.C. definition. *Anal. Chem.* 55 (7) 713 A.

LÖNNERDAL, B.; KEEN, C.L.; HURLEY, L.S. (1981). Iron, copper, zinc, and manganese in milk. *Ann. Rev. Nutr.*, 1:149-174.

LOPEZ MAHÍA, P.; SIMAL LOZANO, J.; PASEIKO LOSADA, P.; VARELA RIAL, J.M. (1992). Evaluación de las interferencias en la medida de los cationes mayoritarios de la leche. *Anal. Bromatol*, XLIV-1: 15-19.

LOPEZ, C.; OCON, D.C.; MANGO, M.S.; FRASQUET, I.; DE-ARMINO, V.A. (1991) Study of zinc and copper serum levels in dislipemias. *Therapie* 46: 17-20.

LOPEZ-MAHIA, P.; PASEIRO, P.; SIMAL, J.; SIMAL, J. (1992). Calidad química e higiénico sanitaria de leche producida en la provincia de la Coruña. *Anal. Bromatol.*, XLIV-4: 223-227.

LUOMA, S.N.; PHILLIPS, J.H. (1988). Distribution, variability, and impacts of trace elements in San Francisco Bay. *Marine Pollution Bulletin*, volume 19, nº 9, pp 413-425.

MACARULLA, M.T.; MARTINEZ, J.A.; LARRALDE, J. (1989). Zinc supplementation on vicia faba fed mice. Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds. p.p. 368-370.

MACCLAIN, C.J.; ADAMS, L.; SHEDLOJSKY, S. (1988) Zinc in the gastrointestinal

system. En: Essential and toxic trace elements in human health and disease. Prasad, A. (ed). Ed. Alan R. Liss Inc.

MAGALOVA, T.; BRTKOVA, A.; BEDEROVA, A.; KAJABA, I.; PUCHONOVA, I. (1994) Serum copper and zinc in industrial centers in Slovakia. *Biol. Trace. Elem. Res.* 40: 225-235.

MAHIEU, H. (1991). Síntesis de la leche. En: Luquet, F.M. *Leche y productos lácteos*. Vol. 1. Zaragoza. Acribia.

MALDONADO-MARTÍN, A.; GIL EXTREMERA, B.; FERNADEZ SOTO, M.; RUIZ MARTINEZ, M.; GONZALEZ JIEMENZ, A.; GUIJARRO MORALES, A.; DE DIOS LUNA DEL CASTILLO, J. (1991). *klin. wochenschr.* 69: 640-644.

MANSON, J.E.; GAZIANO, J.M.; JONAS, M.A.; HENNEKENS, C.H. 1993. Antioxidants and cardiovascular disease: a review, *J. Am. Coll. Nutr.* 12 (4): 426-32.

MAPP, R.K.; McCARTHY, T.J. (1976). The effect of zinc sulphate and bicitropeptide on tetracycline absorption, *S. Afr. Med. J.* 50, 1829-1830.

MARTIN, A.; LUNA, J. (1989). *Bioestadística para ciencias de la salud*. Madrid, De. Norma.

MARTÍN-LAGOS, F.; NAVARRO, M.; TERRÉS, M.; LÓPEZ-G^a DE LA SERRANA, H.; LÓPEZ, M.C. (1997). Serum cooper and Zinc concentrations in serum from patients with cancer and cardiovascular disease. *Elsevier Science.* 204: 27-35.

MAY, P.M.; LINDER, P.W.; WILLIAMS, D.R. (1977). Computer simulation of metal ion equilibria in biofluids: model for the low molecular weight complex distribution of calcium(II), magnesium (II), manganese (II), iron (III), cooper (II), zinc (II) and lead (II) ions in human blood plasma, *J. Chem, Soc, Dalton*, 588-595.

MAZZOTTA, M.Y. (1994). Nutrition and wound healing. *J. Am. Pediatry. Med. Assoc.* 84: 456-462.

McCLAIN, C.; SU, L.C.; GILBERT, H.; CAMERON, D.(1983). Zn deficiency induced retinal dysfunction in Crohn`s disease. *Dig. Dis. Sci.* 29: 85-87.

MCKEAGUE, J.A.; WOLYNETZ, M.S. (1980). Background levels of minor elements in some canadian soils. *Geoderma*, 24: 299-307.

McMICHAEL, A.J.; DREOSTI, I.E.; GIBSON, G.T. (1982). *Early hum dev.* 7: 59-69.

MEADOWS N.J.; GRAINGER, S.L.; RUSE, W.; KEELING, P.W.; THOMPSON, R.P. (1983). Oral iron and the bioavailability of Zn. *Br. Med. J.* 287: 1013-1014.

MEADOWS, K.; RUSE, W.; KEELING, P.; SCOPES, J.; THOMPSON, R. (1983). Peripheral blood leukocyte zinc depletion in babies with intrauterine growth retardation.

Arch. Dis. Child. 53: 807-809.

MEADOWS, N.J.; RUSE, W.; SMITH, M.; KEELING, P.; SCOPES, J.; THOMPSON, R. & BLOXAN, D. (1981). Zinc and small babies. *Lancet* 2, 1123-1137.

MEI, W.; DONG, Z.M.; LIAO, B.L.; XU, H.B. (1991) Study of immun function of cancer patients influenced by supplemental zinc or selenium-zinc combination. *Biol. Trace. Elem. Res.* 26: 11-19. 1991.

MELLOW, M.H.; LAYNE, E.A.; CIPMAN, T.O.; KAUSKIK, M.; HOSTETLER, C.H.; SMITH, J.C. (1983). Plasma zinc and vitamin A in human squamous carcinoma of the esophagus. *Cancer*, 51: 1615-1620.

MENARD, M.P.; COUSINS, R.J. (1983) Zinc transport by brush border membrane vesicles from rat intestine. *Journal Nutr.* 113: 1443-1442.

MENARD, M.P.; McCORNICK, C.C.; COUSINS, R.J. (1981). Regulation of intestinal methionine biosynthesis in rats by dietary Zn. *J. Nutr.* 111: 1353-1361.

MEYER, N.R.; STUART, M.A.; WEAVER, C.M. (1983). Bioavailability of Zn from defatted soy flour, soy hulls and whole eggs as determined by extrinsic and intrinsic labeling techniques. *J. Nutr.* 113: 1255-1264.

MILNE, D.B.; CANFIELD, W.K.; MAHALTO, J.R.; SANDSTED, H.H.; (1984). Effect of oral folic acid supplements on Zn, copper, and iron absorption and excretion. *Am. J. Clin. Nutr.* 39: 535-538.

MOORODIAN, A.D.; HORLEY, J.E. (1987). Micronutrient status in diabetes mellitus. *Am. J. Clin Nutr.* 45: 877-895.

MORENO Y ROJAS, R.; AMARO LOPEZ, M.A.; CAÑAS RUIZ, C.; GARCIA GIMENO, R.M.; ZURENA COSENO, G. (1994). Mineral content in Spanish sterilized milk. *Rev. Española de Ciencia y Tecnología Alimentos*, 34: 323-333.

MORH, H. (1982). *Anal. Chem.* 37(4): 275. (Tomado de Arranz A. y col. 1988).

MORO, R.; ALV-BARTOLOME, M.L.; FERNANDEZ, M.T.; VARGAS, A. (1994). Determinación de fósforo en alimentos por reducción del molibdofosfato con ácido ascórbico. *Alimentaria*, 252: 53-54.

MOSER, P.B.; REYNOLDS, R.D.; ACHARYA, S.; HOXARD, M.P.; ANDON, M.D.; LEWIS, S.A (1988). Copper, iron zinc and selenium dietary intake and status of nepalese lactating women and their breast fed infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 47: 729- 734.

MOSER-VEILLON, P.B. (1990) Zinc: consumption pattern and dietary recommendations. *J. Am. Diet. Assoc.* 90: 1089.

MUKHERJEE, M.D.; SANDSTEAD, H.H.; RATNAPARKHI, M.V.; JOHNSON, L.V.;

- MILNE, D.B.; STELLING, H.P. (1984). Maternal zn, Fe, Folic acid and protein nutriture and outcome of human pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 40: 496-507.
- MUMCU, T.; GÖKMEN, I.; GÖKMEN, A.; PARR, R.M.; ARAS, M.K. (1988) Determination of minor and trace elements in turkish diet by duplicate portion technique. *J. Radioanal. Nuclear Chem.* 124: 289-299.
- MUNRO, C.S.; LAZARO, C.; LAWRENCE, C.M. (1989). Symptomatic zinc deficiency in breast fed premature infants. *Br. J. Dermatol.* 121, 773-778.
- MURTHY, G.K.; RHEA, U.; PEELER, J.T. (1971). Levels of antimony, cadmium, chromium, cobalt, manganese and zinc in institutional ttal diets. *Environ. Sci. Tachnol.* 5: 436-442.
- NAGY, L. (1987). 31(1): 3-10. Examination of the iron, cooper and zinc contents in the daily menu of teen agers. *Hahrung.* 31(1):3-10.
- NATIONAL WATER RESEARCH INSTITUTE, BURLINGTON, ONTARIO, CANADA (1988). Water Quality Centre. Department of Scientific and industrial research, Hamilton, New Zealand. Trace metals in surface sediment on the saguenay Fjord, Canada. *Marine Pollution Bulletin*, volume 19, n°7, p.p. 336-338.
- NAVEH, Y.; BENTUR, L.; DIAMOND, E. (1988). Site of zinc absorption in dog small intestine. *Journal Nutr.* 118: 61-64.
- NEMAIA, ALESHKO-OZHEVSKII, I.; BEIUL, E.A.; MAKHOVA, N.N.; SHEVIAKOVA, L.V. (1991) Effect of diet on serum macroelements levels in patients with alcoholic lesions of the liver. *Vopr. Pitau.* 5: 21-24.
- NEVE, J.; HANOCQ, M.; PERETZ, A.; ABI KHALIL, F.; PELEN, F. (1993). Etude de quelques facteurs influencant la biodisponibilite du Zn dans les formes pharmaceutiques a usage oral. *J. Pharm. Belg.* 48, 1: 5-11.
- NEVE, J.; PERETZ, A. (1988). Importance nutritionnelle et physiopathologie du zn chez l'homme. *J. Pharm. Belg.* 43, 466-477, 1988.
- NIEWOEHNER, C.B.; ALLEN, J.I.; BOOSALIS, M.; LEVINE, A.S.; MORLEY, J.E. (1986). *Am. J. med.* 81, 63-68.
- O'DELL B.L. (1992). Zn plays both estructural and catalyc roles in metalloproteins. *Nutr. Rev.* 50: 48-50.
- OBERLEANS, D.; SEYMOUR, J.K.; LENAGHAN, R.; HOVANESIAN, J.; WILSON, R.F.; PRASAD, A.S. (1971). Effect of zinc deficiency on wound healing in rats. *Am. J.* 121: 566-568.
- OKADA, A.; TAGAKI, A.; Y COL. (1976). Skin lesions during intravenous

hyperalimentation-zinc deficiency. *Surgery*, 80:629.

OLAFSON, R.W. (1983). Intestinal metallothionein: effect of parenteral and enteral zinc exposure on tissue levels of mice on controlled zinc diets. *J. Nutr.* 113: 268-275.

OLSON, O.E.; EMERICK, R.J.; PALMER, I.S. (1983). Measurement of selenium in plants of high selenium content by flame atomic absorption analysis. *Atomic Spectroscopy*, 4 (2): 446-452.

ONER, L.; ARCASOY, A.; KAS, H.S.; HINCAL, A.A. (1989). Studies on Zn sulphate microcapsules: (III). In vivo evaluation. *European Journal of Drug metabolism and Pharmacokinetics*. 14: 107-110.

ORTEGA, R.M.; LÓPEZ SABALER, A.M.; REQUEJO, A.M.; ANDRÉS, P.; GONZÁLEZ-FERNANDÉZ, M. (1995). Valoración dietética del estado nutritivo de un colectivo de adolescentes en Madrid. *Nutr. Clin.* 15: 53-60.

OUTAKE, M.; TAMURA, T. (1993). Changes in zinc and copper concentrations in breast milk and blood of Japanese women during lactation. *J. Nutr. Sci. Vitam. Tokio*, 39 : 189-200.

OWEN, C. (1982). *Biology aspects of copper: occurrence, assay and interrelationships*. N.J.: Noyes Publications. 117-128.

PARDO, R.; BARRADO, E.; TASCÓN, M.L.; VAZQUEZ, M.D. (1989) Adquisición y tratamiento de métodos polarográficos. Aplicación a la determinación de metales pesados en agua. *Quim. Anal.* 8: 99-107.

PATTERSON, K.Y.; HOLBROOK, J.T.; BODNER, J.E.; KELSAY, J.L.; SMITH, J.C. Jr.; VEILLON, C. (1984). Zinc, copper, and manganese intake and balance for adults consuming self-selected diets. *Am. J. Clin. Nutr.* 40: 1397-1403.

PATTERSON, W.P.; WINKELMAN, B.; PERRY, M.C. (1985). Zinc induced copper deficiency: megamineral sideroplastia anemia. *Ann. Inter. Med.* 103: 385-386.

PEDROSA, F.C.; COZZOLINO, M.F. (1993). Effects of supplementation with iron on the bioavailability of Zn in the regional diet of northeastern Brazil. *Rev. Saude Republica* 27 (4): 266-270.

PELUS, E.; ARNAUD, J.; DUCROS, V.; FAURE, H.; FAVIER, A.; ROUSSEL, A.M.; (1994). Trace element (Cu, Zn, Fe, Mn, Se) intakes of a group of French men using the duplicate diet technique. *International J. of Food Sciences and nutrition*. 45, 63-70.

PENTTILÄ, O.; HURME, H.; NEUVONEN, P.J. (1975). Effects of zinc sulphate on the absorption of tetracycline and doxycycline in man, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 9, 131-134.

PERRIN, D.D.; STÜNZI, H. (1982). Metal ions and chelating agents in antiviral

chemotherapy. In metal ions in biological systems. 14: 207-241.

PETTERSON, D.S.; SANSTROM, B.; CEDERBLAD, A. (1994). Absorption of zinc from lupin (*lupinus angustifolius*) based foods. *J. Nutr.* 72 (6): 865-871.

PFEIFFER, C.C. (1978). zinc and other micronutrients. Keats publishing Inc.

PICURELLI, L.; OLCINA, P.V.; ROIG, M.D.; FERRER, J. (1991) Determination of Fe, Mg, Cu and Zn in normal and pathological prostatic tissue. *Actas Urol. Esp.* 15: 344-350.

PORIES, W.J.; HENZEL, J.H.; ROB, C.J.; STRAIN, W.H. (1967). *Lancet* 1:121.

PORTER, K.G.; MC CASTER, D.; ELMES, M.E.; LOVE, A.H. (1977). Anemia and low serum copper during zinc therapy. *Lancet*, 2:508-512.

POWELL, S.R.; HALL, D.; AINTO, L.; WAPNIR, R.A.; TEICHBERG, S.; TORTOLANI, A.J. (1994) Zinc improves postischemic recovery of isolated rat hearts through inhibition on oxidative stress. *Am. J. Physiol.* 226: H2497-H2507.

PRASAD, A.S. (1977). *Critical Reviews in Clin. Lab. Sci.* 8, 1.

PRASAD, A.S. (1982). Papel del zinc en las enfermedades gastrointestinales y hepáticas.

PRASAD, A.S. (1983). Clinical, biochemical and nutritional spectrum of zinc deficiency in human subjects and update. *Nutr. Rev.* 41: 197-208.

PRASAD, A.S. (1991). Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 403-412.

PRASAD, A.S.; BREWER, G.J.; SCHOOMAKER, E.B.; RABBANI, P. (1978) Hypocupremia induced by zinc therapy in adults. *J. Am. Med. Assoc.* 240: 2166-2168.

PRASAD, A.S.; OBERLEAS, D.; LEI, K.Y.; MOGHISSI, K.S.; STRYKER, J.C. (1975). Effects of oral contraceptive agents on nutrients. *Y. minerals. Am. J. Clin.* 28: 377-384.

PRASAD, S.; BREWER, G.; SCHOOMAKER, E.B.; RABBANI, P.(1978). Hypocupremia induced by zinc therapy in adults. *J.A.M.A.* 240: 2166-2168.

PRASAD, T. (1995). Serum IgG and IgM response to sheep red blood cells (SRBC) in weaned calves fed milk supplemented with zinc and Cu. *Nutrition.* 11: 712-715.

RADIFFE, J.D.; SNEDEKER, S.M. (1987). Growth inhibition of a methyl cholantrene-induced sarcoma by dietary zinc deficiency in the Fisher rat. *Nutr. Reports International.* 36: 41-48.

RAMADORI, G; KEIDL, E.; HÜTTEROTH, T.; DORMEYER, H.H.; MANNS, M.; BÜSCHEMFELDE, K.H. (1985). Orale Zn therapie bei morbus Wilson-eine alternative

zu D penicillamin. *Z Gastroenterol* 23: 25-30.

REILLY, C. (1980) Zinc: the unassuming nutrient. En: *Metal contamination of food*. Applied Science Publishers Ltd. London.

REYES CASTAÑEDA, P. (1980). *Biostatística aplicada*. Mexico, De. Trillas.

RIBEIRE, F.; AMIARDTRIQUET, C; BOUDOU, A.; AMIARD, J.C.; (1995).

RICHARDS, M.P.; COUSINS, R.J. (1976). Zn-bindingprotein: relationship to short term changes in zinc metabolism. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 153: 52-56.

RICHMOND, J.; STREHLOW, C.D.; CHALKLEY, S.R. (1993). Dietary intake of Al, Ca, Cu, Fe, Pb and zn in infants. *Br. J. Biomed. Sci.* 50(3):178-186.

RIZK, S.; SKY PECK, H. (1984). Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast cancer. *Cancer. Res.* 44: 5390-5394.

ROBBERECHT, H.; BENEMARIYA, H.; DEEELSTRA, H. (1995). Daily dietary intake of cooper,zinc, and selenium of exclusively breast fed infants of middle class women in Burundi, Africa. *Biol. Trace. Elem. Res.* 49(2-3): 151-159.

RODRIGUEZ FELIX, L.; MARTIN SANTANA, A.; GUTIERREZ FERNANDEZ, J.; ZAMORA MADARIA, E. (1987). Alteraciones de la inmunidad celular, estado de nutrición y déficit de zinc en la cirrosis hepática etílica. *Rev. Clin. Esp.* 180: 496-501.

RODRIGUEZ, F.; GONZALEZ, E.; SATOLARIA, F.; GALINDO, L.; HERNANDEZ, O.; BATISTA, N.; MOLINA, M.(1997). Zinc, cooper, manganese and iron in crhonic alcoholic liver disease. *Clinical Trial.* 14:39-44.

ROJAS, L.X.; McDOWELL, L.R.; COUSINS, R.J.; MARTÍN, F.G.; WILKINSON, N.S.; JOHNSON, A.B.; VELAZQUEZ, A.B. (1995). Relativa bioavailability of two organics and two inorganics zinc sources fed to sheep. *J. Anim. Sci.* 73: 1202-1209.

ROWAN, C.A.; ZAFICEK, O.,T.; CALABRESSE, E. (1982). Dry ashing vegetables for the determination of sodium and potasium by atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.* 54: 149-151.

RUSSEL, R.M.; COY, M.E.; SOLOMON, M. (1983). Zinc and special senses. *Ann. Intern. Med.* 99:227-230.

SACHDEV, H.P.; MITTAL, N.K.; YODAV, H.S.; (1988). A controlled trial on utility of oral Zn supplementation on acute dehydrating diarrhea in infants. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* 877-881.

SALISBURY, C.D.C.; CHAN, W.; SASCHENBRECKER, P.W.; (1991). Multielements concentrations in liver and kidney tissues from five species of canadian slaughter animals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74: 587-591.

SALMENPERÄ, L.; PERHEENTUPA, J.; PAKARINEN, P.; SIIMES, M. (1994). Zn supplementation of infant formula. *Am. J. Clin. Nutr.* 59: 985-9.

SALVIA, A.; VON BOHLEN, A.; KLOCKENKAMPER, R.; KLOCKOW, D. (1993) Multielement analysis of airborne particulate matter by total reflection x-ray fluorescence. *Quim. Anal.* 12: 57-62.

SAMMAN, S.; ROBERTS, D.C. (198). The effects of zinc supplements on plasma zn and cooper levels and the reported symptoms in healthy volunteers. *Med. J. Aust.*

SANDSTRÖM, B.; ALURGREN, A.; KIVISTÖ, B.; CADERBLAD, A. (1989) Effect of protein level and protein source on zinc absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 119: 48-53.

SANDSTRÖM, B.; ARVIDSSON, B.; CEDERBLAD, A.; BJÖRN-RASMUSSEN, E. (1980) Zinc absorption from composite meals. I. The significance of wheat extraction rate, zinc, calcium, and protein content in meals based on bread. *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 739-45.

SANDSTRÖM, B.; CEDERBLAD, A. (1980) Zinc absorption from composite meals. II. Influence of the main protein source. *Am. J. Clin. Nutr.* 33: 1778-83.

SANDSTRÖM, B.; DAVIDSSON, L.; CEDERBLAD, A.; LÖNEERDAL, BO. (1985). Oral iron, dietary ligands and Zn absorption. *J. Nutr.* 115: 411-414.

SANDSTROM, B.; KIVISTO, B.; CEDERBLAD, A. (1987). Absorption of zinc from soy protein meals in humans. *J. Nutr.* 117: 321-327.

SANSTEAD, H.H. (1978). Zn interference with cooper metabolism. *JAMA* 240: 2188-2189.

SANZ-MEDEL, A. (1984) Generación y características fundamentales de los diversos plasmas utilizados en el análisis espectroquímico. *Quim. Anal.* 114: 245-279. 1984.

SAUCHA, T.K.; GRZESZCZAK, W.; CACKA, B.; FROEHLICH, J.; KRYWULT, D. (1994). Lipid peroxidation, antioxidant enzyme activity and trace element concentration in II and III trimester of pregnancy in pregnant women with diabetes. *Pol. Arch. Med. Wewn.* 92: 313-321.

SAYLOR, W.W.; LEACH, R.M. (1980). Intracelullar distribution of cooper znd Zinc in sheep, effects of age and dietary levels of the metals. *J. Nutr.* 110:448-459.

SCHOLMERICH, J.; FREUDEMANN, A.; KOTTGEN, E.; WIETHOLTZ, H.; STEIERT, B.; LOHLE, E.; HAUSSINGER, D.; GEROK, W. (1987). Bioavailability of Zn fron Zn-Histidine complexes. Y Comparison with Zn sulfate in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 1480-1486.

- SCHOLMERICH, J.; BECHER, M.S.; KOTTGEN, E. (1983). The influence of portosystemic shunting on Zn and vitamin A metabolism in liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology* 30: 143-147.
- SCHÖLMEIERICH, J.; KRAUSS, E.; WIETHOLTZ, H.; KÖTTGEN, E.; LÖHLE, E.; GEROK, W. (1987). Bioavailability of Zn from Zn- histidine complexes. II. Studies on patients with liver cirrhosis and the influence of the time of application. *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 1487-1491.
- SHARDA. B.; BHANDARI. B. (1977): Serum Zn in protein calorie malnutrition. *Ind. Pediatr.* 14. 195-196.
- SHRIVASTAV, P.; SWANN, J.; JEREMY, J.; THOMPSON, C.; SHAW, R.; DANDONA, P. (1989). Sperm function and structure and seminal plasma prostanoid concentrations in men with IDDM. *Diabetes care.* 12: 742- 744.
- SIEVERS, E.; OLDIGS, H.D.; DORNER, K.; SCHAUB, J. (1992). Longitudinal zinc balances in breast-fed and formula-fed infants. *Acta. Pediatr.* 81(1): 1-6.
- SIMMER, K.; ILLES, C.A.; JAMES, C.; THOMPSON, R.P.H. (1987). Are iron folate supplements harmful? *Am. J. Clin. Nutr.* 45: 122-125.
- SIMMER, K.; KHANUM, S.; CARLSON, L. & THOMPSON, R.P.H. (1988). Nutritional rehabilitation in Bangladesh, the importance of zinc. *Am. J. Clin. Nutr.* 47, 1036-1040.
- SIMMER, K.; PHILLIPS, L.; JAMES, C.; THOMPSON, R.P.H. (1991). A double-blind trial of Zn supplementation in pregnancy. *Eur. J. Clin. Nutr.* 45: 139-144.
- SIMMER, K.; THOMPSON, R. (1985). Maternal Zn and intrauterine growth retardation. *Clin. Sci.* 68. 395-399.
- SKOOG, D.; WEST, D. (1988) *Química Analítica*, 4ª ed. McGraw-Hill, Madrid.
- SKOOG, D.A.; WEST, D.M. (1984) *Análisis instrumental*. Ed. Interamericana, México, D.F.
- SLATER, J.P.; MILDVAN, A.S.; LOEB, L.A. (1971). Zn in DNA polymerases. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 44:37-43.
- SOLIS HERRUZO, J.A.; CASTELLANO TORTAJADA, G.; MORILLAS SAINZ, J.D.; MONTABAN PALLARES, M.A.; MUÑOZ YAGÜE, M.T. (1984). Efecto de los suplementos orales de zinc sobre los linfocitos circulantes en la cirrosis hepática. *Gastroenterol Hepatol.* 7: 123-130.
- SOLOMONS, N.W. (1981). *Nutrition in the 1980: Constraints on our knowledge*. New York; Alan R. Liss.

SOLOMONS, N.W. (1988) Zinc and Copper. In Modern nutrition and health disease, 7th edn, SHILS, M.E.; YOUNG, V.R. (Eds.), Lea and Febiger, Philadelphia.

SOLOMONS, N.W.; PINEDA, O.; VITERI, F.; SANDSTEAD, F. (1983). Studies of the bioavailability of Zn in humans: mechanism of the intestinal interaction of nonheme iron and Zn. *J. Nutr.* 113: 337- 349.

SOMAN, S.D.; PANDAY, V.K.; JOSEPH, K.T.; RAUL, S.J.; (1969). Daily intake of some major and trace elements. *Health. Phys.*, 17: 35-40.

SORENSEN, J.R.J. (1982). Cooper complexes as the active metabolites as the antiinflammatory agents. In *Inflammatory Diseases and cooper*, p.p. 289-301. The humana press inc.

SORIA, M.L.; REPETTO, G.; REPETTO, M. (1995) Revisión general de la toxicología de los metales. En: *Toxicología avanzada*, Repetto, M. (ed.). Diaz de Santos, S.A. Madrid.

SRIKUMAR, T.S.; JOHANSSON, G.K.; öCKERMAN, P.; GUSTAFSSON, J.; AKESSON, B. (1992) Trace element status in healthy subjects switching from a mixed to a lactovegetarian diet for 12 months. *Am. J. Clin. Nutr.* 55: 885-890.

STATGRAPHICS. (1991) Statgraphics Version 6.0, Reference Manual; STSC, Inc.; USA.

STATGRAPHICS. (1996) Statgraphics plus, 2.0.

STEPNICK GROPPER, S.; ACOSTA, P.B.; CLARKE-SHEEHAN, N.; WENZ, E.; CHENG, M.; KOCH, R. (1988) Trace element status of children with PKV and normal children. *J. Am. Diet. Assoc.* 88: 459-465.

STUART, M.; KETELSENS, S.; WEAVER, C.; WERDMAN, J. (1986). Bioavailability of Zn to rats as affected by protein source and previous dietary intake. *J. Nutr.* 116: 1423-1431.

SUAREZ FRAGA, M.A.; ALVAREZ MORANTE, R., HARDISSON DE LA TORRE, A.; SIERRA LÓPEZ, A. (1990). Valor nutritivo del gofio. *Nutr. clín.* 4: (10): 31-44.

SUBRAMANIAN, K.S. (1988) Determination of trace metals in blood by graphite furnace atomic absorption spectrophotometry: recent studies. *At. Spectros*; 9: 169-178.

SWANSON, C.A.; KING, J.C. (1987). Zinc and pregnancy outcome. *Am. J. Clin. Nutr.* 46: 763-771.

SWANSON, C.A.; MANSOURIAN, R.; DIRREN, H.; RAPIN, C.H. (1988). Zinc status of healthy elderly adults: response to supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* 48: 343-349.

SZYAMSKA, J.A.; SWIETLICKA, E.A.; PIOTROWSKI, J.K. (1991) Protective effect of zinc in the hepatotoxicity of bromobenzene and acetaminophen. *Toxicology*, 66: 81-91.

TAHAN, J.E.; SANCHEZ, J.M.; GRANADILLO, V.A.; CUBILLAN, H.S.; ROMERO, R.A. (1995). Concentration of total Al, Cr, Cu, Fe, Hg, Na, Pb and zinc in commercial canned seafood determined by atomic spectrometric means after mineralization by microwave heating. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 43 (4): 910-915.

TANEJA, S.K.; ARYA, P.; (1994). Lipid deposition in intestine as a possible cause of malabsorption of nutrients in Zn deficient common carp (*Cyprinus carpio*). *British Journal of nutrition*. 72(5):153-762.

TAYLOR, P.R.; LI, B.; DAWSEY, S.M.; LI, J.Y.; YANG, C.S.; GUO, W.; BLOT, W.J. (1994). Prevention of esophageal cancer: the nutrition intervention trials in Linxian, China. Linxian Nutrition Intervention Trials study Groups. *Cancer Res.* 54 (7 suppl.) 2029s-2031s.

THOMAS, A.J.; BUNKER, V.W.; HINKS, L.J.; SODHA, N.; MULLEE, M.A.; CLAYTON, B.E. (1988). Energy, protein, zinc and copper status of twenty one elderly patients: analysed dietary intake and biochemical indices. *Br. J. Nutr.* 59(2): 181-191.

TOMAS, X.; OBIOLS, J.; PEIRÓ, L. (1982). La contaminación por metales pesados en sedimentos de la ría de Huelva. Análisis de resultados. *Afinidad*, tomo xl, 413-420.

TORRE, M.; RODRIGUEZ A.R. (1991) Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral bioavailability. *Food Science and Nutrition*, 1(1): 1-22.

TURNLAND, J.R.; KING, J.C.; KEYES, W.R.; GONG, B.; MICHEL, M.C. (1984). A stable isotope study of Zn absorption in young men; effects of phytate and alpha-cellulose. *Am. J. Clin. Nutr.* 40, 1071-1077.

TURNLUND, J.R. (1991) Bioavailability of Dietary minerals to humans: The stable isotope approach. *Food Science and Nutrition* 30(3): 387-396.

UDOMKESMALEE, E.; OHANAMITTA, S.; YHOUNG-AREE, J.; ROJRSONGWASINKUL, N.; SMITH, J.C. (1990) Biochemical evidence suggestive of suboptimal zinc and vitamin A status in school children in Northeast Thailand. *Am. J. Clin. Nutr.* 52: 564-7.

UNDERWOOD, E.J. (1977). Trace elements in human and animal nutrition (4th edition). New York: Academic.

URE, A.M.; BACON, J.R.; BERROW, M.L.; WATT, J.J. (1978). The total trace element content of some Scottish soils by spark source mass spectrometry. *Geoderma*, 22:1-23.

URIU-HARE, J.; WALTER, R.; KEEN, C. (1992). Zn metabolism is altered during diabetic pregnancy in rats. *J. Nutr.* 122: 1988-1998.

VALTUEÑA, S.; SALAS, J. (1994). Toxicidad inherente a la ingesta de cantidades de Zn moderadamente superiores a las recommended dietary allowances (RDA) y equivalentes a dosis terapéuticas para el tratamiento de ciertas enfermedades y suplementos dietéticos. *Nutrición clínica.* 5:7-21.

VAN CAMPEN, D.R. (1969). Copper interference with the intestine absorption of zinc-65 rats. *J. Nutr.* 97: 104-108.

VAN DOKKUM, W.; DE VOS, R.W.; MUYS, T.; WESSTRA, J.A. (1989) Mineral and trace elements in total diet in The Netherlands. *Br. J. Nutr.* 61: 7-15.

VENUGOPAL, B.; LUCKEY, T.D. (1978). Metal toxicity in mammals, vol. 2. New York: Plenum.

VICTERY, W.; SMITH, J.M.; VANDER, A.J. (1981). *Am. J. Physiol.* 241: 532-539.

WACKER, W.C. (1978). Zinc and copper in clinical medicine. Medical and scientific books, p:15.

WACKER, W.C.; HAMBIDGE, K.M.; NICHOLS, B.L.(1978). Zinc and copper in clinical medicine. Medical and scientific book.

WAGLEY, D.; SCHMIEDEL, G.; MAINKA, E.; JOACHIM, ACHE, H. (1989) Direct determination of some essential and toxic elements in milk and milk powder by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *At. Spectrosc.* 10: 106-111.

WAGNER, P.A.; JERNIGAN, J.A.; BAILEY, L.B.; NICKENS, C.; BRAZZI, G.A. (1983). Zinc nutrition and cell-mediated immunity in the aged. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 53, 94-101.

WALRAVENS, P.A., KREBS, N.F. & HAMBIDGE K.M. (1983). Linear growth of low income preschool children receiving a Zn supplement. *Am. J. Clin. Nutr.* 38: 195-201.

WALTER, R.M.; URIU-HARE, H.Y.; OLIN, K.L.; OSTER, M.H.; ANAWALT, B.D.; CRITCHFIELD, J.W.; KEEN, C.L. (1991). Copper, zinc, manganese, magnesium status and complications of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 14:1050-1056.

WAPNIR, R.A.; WANG, J.; EXEN, R.A.; Mc VICAR, M. (1981). Experimental evaluation of ligands for the intestinal absorption of zinc in vivo. *Amer. J. Clin. Nutr.* 34: 651.

WEIGHT, L.; NOOKES, T.; LABADARIOS, L.; GRAVES, J.; JACOBS, P.; BERMAN, P. (1988). Vitamin and mineral status of trained athletes including the effects of supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.* 47: 186-191.

- WEISMANN, K. (1980). Zn metabolism and the skin. In recent advances in dermatology, eds A Rook & J Savin, 5 (5): 109-129.
- WEISMANN, K., HOE, S.; NIKKELSEN, H.I.; Y COL. (1979). Br. J. Dermatol., 101: 573-579.
- WELLS, J.L.; JAMES, D.K.; LUXTON, R.; PENNOCK, C.A. (1987). Maternal leukocyte zn deficiency at start of third trimester as a predictor of fetal growth retardation. Br. Med. J. 294, 1054-1056.
- WILLARD, H.H.; MERRITT, L.L.; DEAN, J.A.; SETTE, F.A. (1991) Métodos instrumentales de análisis. Ed. Iberoamérica, Belmont, California.
- WILLIAMS, C.M.; DICKERSON, J. (1990). Nutrition and cancer- some biochemical mechanisms. Nutr. Res. Rev. 3: 75-100.
- WILLIAMS, D.R. (1984). Biofluid speciation models correlated with pharmaceutical activity. Proc. Sum. Conf. Comp. Simul. Boston. 2:792-797.
- WISE, A. (1995). Phytate and Zn bioavailability. Food Sciences and Nutrition, 46: 53-63.
- WISKER, E.; NAGEL, R.; TANUDJAJA, T.K.; FELDHJEIM, W. (1991) Calcium, magnesium, zinc and iron balances in young women: effects of a low-phytate barley-fiber concentrate. Am. J. Clin. Nutr. 54: 553-559.
- WOLFE, S.A.; GIBSON, R.S.; GADOWSKY, S.L.; O'CONNOR, D.L. (1994) Zinc status of a group of pregnant adolescents at 36 weeks gestation living in southern Ontario. J. Am. Coll. Nutr. 13: 154-164.
- WOLFF, S.P. (1987). The potential role of oxidative estress in the diabetic complications: novel implications, scientifics and clinical aspects. Crabbe, M.J.C., de. churchill. Livingstone: Edimburgh: 167-220.
- XIMENEZ HERRAIZ, L. (1980) Espectroscopía de absorción atómica, Tomo I y II. Publicaciones Analíticas, Madrid.
- YOKOI, K.; ALCOCK, N.W.; SANSTEAD, H.H. (1994). Iron and zinc nutriture of premenopausal women- associations of diet with serum ferritin and plasma zinc disappareance and of serum ferritin with plasma zinc and plasma zinc disppareance. Journal of laboratory & Clinical Medicine. 124(6): 852-861.
- YOSHIDA, D.; IKEDA, Y.; NAKAZAWA, S. (1993). Quantitative analysis of cooper, zinc, and cooper/zinc ratio in selected human brain tumors. J. Neuro-Oncology 16: 109-115.
- YUCEL, I.; ARPACI, F.; OZET, A.; DONER, B.; KARAYILANOGLY, T.; SAYAR, A.;

BERK, O. (1994) Serum copper and zinc levels and copper/zinc ratio in patients with breast cancer. *Biol. Trace. Elem. Res.* 40: 31-38.

ZAICHICK, V.; TSYB, A.; MATVEENKO, E.; cHERNICHENKO, Y. (1996). Instrumental neutron activation analysis of essential and toxic elements in child and adolescent diets in the chernovil disaster territories of the kaluga regions. *Sci. total. Environ.* 192 (3): 269-274.

ZHOU, J.R.; FORDYCE, J.; RABOY, V.; DICKINSON, D.B.; WONG, M.S.; BURNS, R.A.; ERDMAN, J.W. (1992). Reduction of phytic acid in soybean products improves zn bioavailability in rats. *J. Nutr.* 122: 2466: 2473.

ZIEGLER, E.E.; SERFASS, R.D.; NELSON, S.E.; FIGUEROA-COLON, R.; EDWARDS, B.B.; JOUK, R.S.; THOMPSON, J.J. (1989) Effect of low zinc intake on absorption and excretion of zinc by infants studied with ⁷⁰Zn as extrinsic tag. *J. Nutr.* 119: 1647-1653.