

APLICACIÓN DE FLUORESCENCIA DE RAYOS-X POR REFLEXIÓN TOTAL EN LA  
DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE ZINC EN CABELLO DE NIÑOS  
PARA LA ESTIMACIÓN DE NIVELES NUTRICIONALES

DETERMINATION OF ZINC CONCENTRATIONS IN CHILDREN'S HAIR  
TO ESTIMATE NUTRITION LEVELS  
USING TOTAL REFLECTION X-RAY FLUORESCENCE

C. A. TELLERÍA NARVÁEZ<sup>†</sup>, S. FERNÁNDEZ ALCÁZAR, F. G. BARRIENTOS ZAMORA, & A. O. MUÑOZ GOSÁLVEZ  
Centro de Investigaciones y Aplicaciones Nucleares (CIAN-Viacha)  
Viacha, Bolivia

L. E. ROMERO BOLAÑOS  
Instituto Boliviano de Ciencia y Tecnología Nuclear  
Av. 6 de Agosto 2905. La Paz, Bolivia

G. M. RAMÍREZ ÁVILA<sup>‡</sup>  
Instituto de Investigaciones Físicas, Carrera de Física  
Universidad Mayor de San Andrés  
c. 27 Cota-Cota, Campus Universitario, Casilla de Correos 8635  
La Paz - Bolivia  
(Recibido 5 de Septiembre de 2013; aceptado 6 de Marzo de 2014)

### RESUMEN

Se realizaron mediciones de las concentraciones de zinc en el cabello de niños de regiones altiplánicas (en el rango de edades de 8 a 13 años), mediante la técnica de fluorescencia de rayos X por reflexión total. Estas mediciones permiten una primera evaluación de los niveles nutricionales en niños que se combina con la determinación del índice de masa corporal. Esta evaluación se caracteriza por su simplicidad y no-invasividad. Aunque los resultados nos permiten hacer una buena clasificación de individuos nutricionalmente normales de los que no lo son, también se observa la gran sensibilidad de los resultados con la edad. Este trabajo es complementario a otras pruebas biológicas y médicas.

Código(s) PACS: 41.50.+h — 78.70 En

*Descriptor:* Haces de rayos-x — Fluorescencia de rayos-x.

### ABSTRACT

Using the X-ray fluorescence by total reflection technique, we carried out measurements of zinc concentrations in the hair of children living in the Bolivian high plateau regions (within the age range from 8 to 13 years old). The results allow us to make a first assessment of nutritional levels in children; the latter combined with the determination of the body mass index, results in a measure characterized by its simplicity and non-invasiveness. This work is complementary to other biological and medical tests.

*Subject headings:* X-ray beams — X-ray fluorescence.

### 1. INTRODUCCIÓN

La fluorescencia de rayos-X (FRX) se basa en la irradiación de muestras por rayos-X (Rx) primarios. Los átomos individuales al ser excitados por esta radiación emiten Rx secundarios, propios de cada elemento, que pueden ser cualificados y cuantificados en un espectro. Este método es rápido y

puede ser aplicado a una gran variedad de matrices; por ejemplo, sólidas, analizadas con poca o ninguna preparación. Excluyendo los elementos livianos, los elementos comprendidos entre los números atómicos 14 y 42 pueden ser detectados en sus emisiones  $K_{\alpha}$  empleando un cátodo de molibdeno y para  $Z > 42$ , en sus líneas  $L_{\alpha}$ , esto depende mucho del blanco del tubo de Rx con el que se esté trabajando. El método es sensible a trabajar en niveles de detección que se encuentran en el orden de magnitud de  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

<sup>†</sup>ctelleria@ibten.gob.bo

<sup>‡</sup>http://www.fiumsa.edu.bo/docentes/mramirez/

La FRX se ha convertido en un poderoso método para el análisis espectrométrico; sin embargo, esta técnica tiene limitaciones al momento de realizar el análisis de trazas de elementos en una muestra. Debido a esto, nuevas técnicas de espectrometría atómica óptica se han desarrollado, superando a la técnica convencional de FRX en muchos aspectos. Una de estas técnicas consiste en usar reflexión total para la excitación por FRX. Esta idea ingeniosa fue descubierta por Compton (1923), quien encontró que la reflectividad de un blanco liso se incrementa significativamente para valores por debajo del ángulo crítico ( $\approx 0.1^\circ$ ). Posteriormente, Yoneda & Horiuchi (1971) propusieron el análisis de pequeñas cantidades de muestra sobre portamuestras lisos de reflectancia total. Esta técnica fue después desarrollada y se la denominó fluorescencia de Rx por reflexión total (FRXT) que es la técnica empleada en el trabajo y que es descrita en detalle por Klockenkamper (1996). El artículo está estructurado como sigue: en §2 se da una explicación de la FRXT y se detalla el método experimental empleado, lo que incluye la obtención de cabello, la calibración del equipo y la preparación de las muestras; en §3 se dan los detalles del equipo empleado y se dan a conocer las lecturas de las muestras que se utilizan para evaluar los resultados que se exponen en §4. Finalmente, en §5 se dan las conclusiones y perspectivas de este estudio.

## 2. MÉTODO EXPERIMENTAL

La FRXT es una variación de la técnica de dispersión de energía de FRX con una diferencia significativa consistente en el hecho que, en contraste con el método convencional (FRX) donde el haz primario impacta en la muestra con un ángulo de  $40^\circ$  (Figura 1(a)), en la FRXT se utilizan haces rasantes por debajo de  $0.1^\circ$  (Figura 1(b)). Debido a su configuración única, la principal ventaja de la FRXT sobre la FRX convencional es la reducción en el ruido de fondo mediante la eliminación de la dispersión en la muestra; lo que resulta en una mayor sensibilidad de la medición elemental. Para la obtención de reflexión total en el portamuestras (reflector de cuarzo), el haz primario debe incidir en el reflector con ángulos rasantes. Para fotones de Rx de 60 keV, el ángulo de incidencia debe estar alrededor de  $0.015^\circ$ , mientras que la divergencia del haz debe darse incluso en ángulos de menor valor. Este ángulo se denomina crítico  $\Phi_{\text{crit}}$  y se lo puede calcular usando la siguiente relación mencionada por Klockenkamper (1996):

$$\Phi_{\text{crit}} \approx \frac{1.65}{E} \sqrt{\frac{Z}{A}} \rho, \quad (1)$$

donde  $E$  representa la energía en keV de los Rx incidentes, que en nuestro sistema se originan en un tubo con blanco de Mo; mientras que las otras cantidades están referidas al portamuestras:  $\rho$  la densidad del material expresada en  $\text{g/cm}^3$ ,  $Z$  el número atómico y  $A$  el peso atómico. En nuestro caso, el portamuestras es de cuarzo ( $\text{SiO}_2$ ) por lo que se tiene:  $\rho = 2.65 \text{ g/cm}^3$ ,  $Z = 30$  y  $A = 60.09 \text{ g/mol}$  tal como se

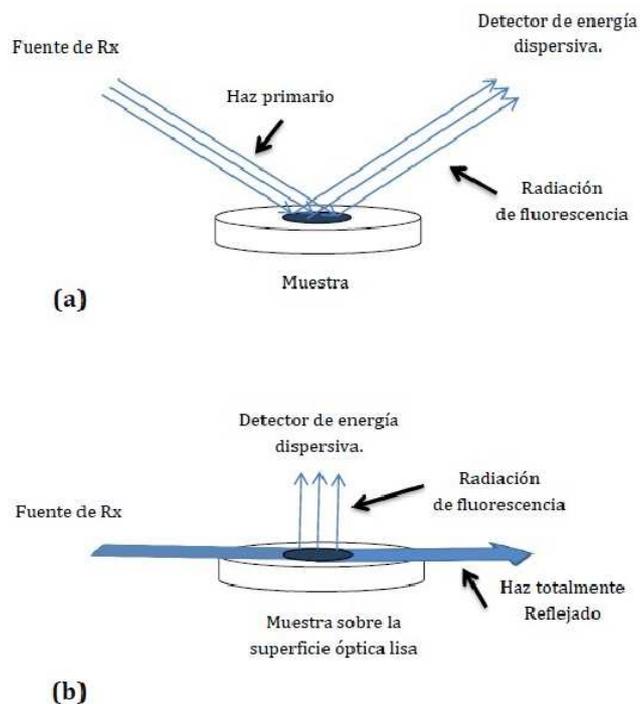


FIG. 1.— (Color online) Arreglo experimental para (a) FRX convencional y (b) FRXT.

cita en Nascimento Filho *et al.* (1999). Esta aproximación es válida para fotones de energía por encima de los límites de absorción del material.

### 2.1. Obtención de cabello

Se colectaron cabellos de niños de ambos sexos con edades comprendidas entre los 8 y 13 años, en la localidad de Viacha (Aprox. 3876 msnm) ubicada en la región altiplánica del departamento de La Paz. El muestreo de cabello comprendió dos escuelas, una situada en la parte urbana (96 muestras) y la otra en la Comunidad Collagua (12 muestras) correspondiente al área rural de Viacha. De manera paralela al proceso de recolección de cabello se tomaron los datos antropométricos de cada niño: masa corporal y estatura, así como también se registraron la edad y el grado escolar.

### 2.2. Calibración del equipo

Para la calibración del equipo de FRX se obtuvo inicialmente la curva característica (tasa de conteje en cuentas/seg vs. intensidad de corriente en mA), en la que se efectuó el test de linealidad consistente en la verificación de la relación lineal entre ambas magnitudes. El intervalo de intensidad de corriente seleccionado es el que satisface el criterio de linealidad. Posteriormente y tal como lo muestra la Figura 2, se determinó el límite de detección para diferentes elementos: Fe, Ni, Zn y Co, utilizando la relación propuesta en Nascimento Filho *et al.* (1999)

$$LOD_i = \sqrt{\frac{I_i(BG)}{t}} \cdot \frac{C_{Ga}}{I_{Ga}S_i}, \quad (2)$$

donde:

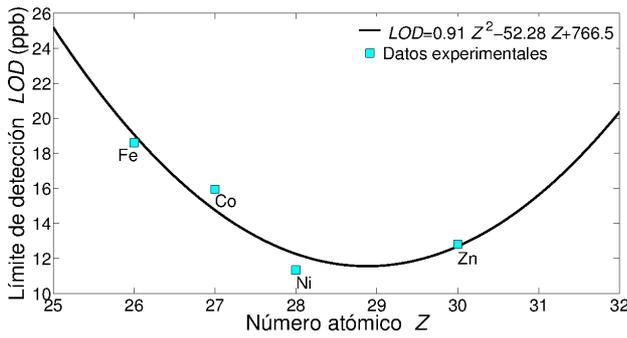


FIG. 2.— (Color online) Curva del límite de detección de muestras líquidas de algunos elementos, usando 10  $\mu\text{l}$  de alícuota en reflectores de cuarzo y analizadas durante 200 s.

TABLA 1

VALORES DE LOS PESOS ATÓMICOS Y LÍMITES DE DETECCIÓN (LOD) EN PARTES POR BILLÓN (PPB) CON 1 PPB =  $10^{-9}$ .

	Peso atómico	LOD (ppb)
Co	27	16
Zn	30	13
Ni	28	11
Fe	26	19

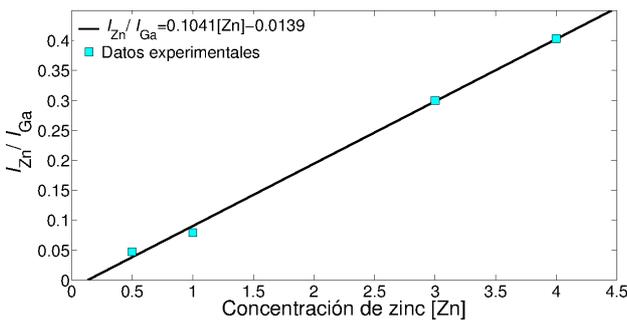


FIG. 3.— (Color online) Curva de calibración para el Zn. Donde  $I_{Zn}$  e  $I_{Ga}$  son los valores máximos de los picos de intensidad de Zn y Ga respectivamente.

- $I_i(BG)$  es la intensidad en cuentas por segundo del elemento  $i$  en la muestra.
- $C_{Ga}$  es la concentración en ppm (partes por millón) del estándar interno (Ga).
- $I_{Ga}$  es la intensidad en cuentas por segundo correspondientes al Ga.
- $S_i$  es la sensibilidad relativa del sistema para el elemento  $i$ .

Los valores se muestran en la Tabla 1.

Para la determinación de la concentración de Zn en cabello, se calibró el equipo utilizando estándares conteniendo 0.5, 1.0, 3.0 y 4.0 ppm de concentración en Zn, a los cuales, se añadieron suficientes cantidades de Ga, con el fin de obtener 10.0 ppm de Ga en todos los casos como estándar interno. Para la determinación de las áreas correspondientes a las líneas  $K_{\alpha}$  del Zn y Ga, se empleó tanto el software AXIL como el QXAS. Con esta información se obtuvo la curva de calibración que se muestra en la Figura 3.

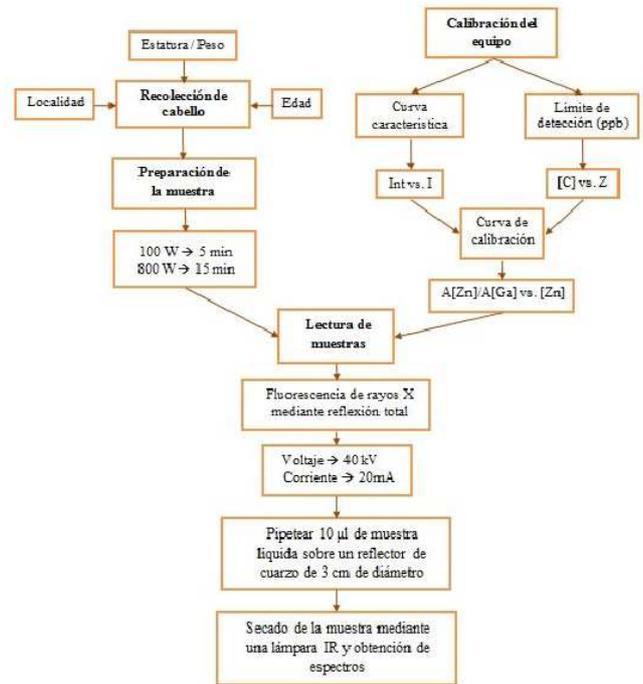


FIG. 4.— (Color online) Esquema de los procedimientos usados para la obtención de los espectros energéticos.

### 2.3. Preparación de muestras

Las muestras se prepararon mediante el proceso de digestión empleando microondas (MWD) sugerido por Memon *et al.* (2007). Se emplearon 200 mg de cabello y como oxidantes 3 ml de una mezcla compuesta por  $\text{HNO}_3$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrada (2:1,  $v/v$ ) dejándolas reposar durante 5 min. Para la digestión se empleó un MWD Anton Paar (Instruments), en el cual se programa una secuencia de digestión de dos etapas: la primera a 100 W de potencia durante 5 min y la segunda a 800 W de potencia durante 15 min; teniendo en cuenta que la potencia máxima del equipo es de 1000 W y las condiciones de digestión son de  $300^\circ\text{C}$  como temperatura máxima y 75 bares de presión. Concluida la digestión se completa la preparación de la muestras agregando 0.25 mg de Ga para alcanzar 10 ppm de concentración como estándar interno.

### 3. DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO DE FRX Y LECTURA DE LAS MUESTRAS

Para el análisis por el método de reflexión total se utilizó un generador de Rayos-X ITAL STRUCTURES modelo COMPACT 3K5, cuyos rangos operativos de voltaje y amperaje son: 10 a 60 kV y 1 a 50 mA respectivamente, con 3 kW de salida y con un blanco de Mo. Para la lectura de muestras se utilizan reflectores de cuarzo, los cuales son previamente preparados mediante un procedimiento de lavado especial. Una vez limpios los reflectores se coloca una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  de la muestra sobre el reflector la cual es secada empleando una lámpara infrarroja durante 10 min. La muestra seca se la deja enfriar durante 5 min para su posterior lectura obteniéndose de esa manera los espectros correspondientes. La Tabla 2 muestra un ejemplo de los valores de con-

TABLA 2

CONCENTRACIONES DE ZINC EN LA MUESTRA LÍQUIDA DE CABELLO, VOLUMEN DE AFORO Y MASA PROMEDIO DE LOS CABELLOS PARA CADA EDAD Y GÉNERO DE LOS INDIVIDUOS.

Edad	Género	$\overline{[Zn]} \pm \Delta[Zn]$ (ppm)	$\bar{V} \pm \Delta V$ (ml)	$\bar{M} \pm \Delta M$ (g)
8	M	$0.833 \pm 0.008$	$25 \pm 0.04$	$0.1584 \pm 0.0001$
	F	$0.450 \pm 0.010$	$25 \pm 0.04$	$0.2005 \pm 0.0001$
9	M	$1.001 \pm 0.011$	$25 \pm 0.04$	$0.1729 \pm 0.0001$
	F	$2.132 \pm 0.012$	$25 \pm 0.04$	$0.1826 \pm 0.0001$
10	M	$1.071 \pm 0.013$	$50 \pm 0.06$	$0.1873 \pm 0.0001$
	F	$1.803 \pm 0.014$	$50 \pm 0.06$	$0.2006 \pm 0.0001$
11	M	$1.314 \pm 0.015$	$26 \pm 0.04$	$0.1842 \pm 0.0001$
	F	$2.005 \pm 0.014$	$25 \pm 0.04$	$0.2003 \pm 0.0001$
12	M	$1.159 \pm 0.014$	$32 \pm 0.05$	$0.1832 \pm 0.0001$
	F	$2.106 \pm 0.015$	$25 \pm 0.04$	$0.2004 \pm 0.0001$
13	M	$0.736 \pm 0.011$	$10 \pm 0.03$	$0.1772 \pm 0.0001$
	F	$1.668 \pm 0.016$	$10 \pm 0.03$	$0.2007 \pm 0.0001$

TABLA 3

CONCENTRACIONES DE ZINC PROMEDIO EN LAS MUESTRAS DE CABELLO SEGÚN LA LA EDAD Y EL GÉNERO DE CADA NIÑO.

Edad	Género	$\overline{[Zn]} \pm \Delta[Zn]$ (ppm)
8	M	$119.4 \pm 1.7$
	F	$180.8 \pm 1.6$
9	M	$125.8 \pm 1.6$
	F	$379.7 \pm 3.4$
10	M	$154.5 \pm 2.2$
	F	$225.8 \pm 2.2$
11	M	$195.8 \pm 2.9$
	F	$243.3 \pm 2.2$
12	M	$180.5 \pm 2.4$
	F	$262.8 \pm 2.4$
13	M	$119.9 \pm 2.4$
	F	$207.8 \pm 2.4$

centración de zinc promedio para cada edad y género (M, masculino y F, femenino) que se obtuvieron usando el software QXAS.

#### 4. RESULTADOS

Una vez obtenidas las lecturas en el equipo de FRX, se calculó la concentración de Zn en cabello de cada individuo, resultados que se muestran en forma detallada en la Tabla 3

Considerando los resultados antropométricos que se muestran en la Tabla 4 y que fueron obtenidos para los individuos utilizando WHO AnthroPlus, software que es descrito en de Onis *et al.* (2007), se construyen diagramas de “caja y bigote” para la concentración de Zn ( $[Zn]$ ), el índice de masa corporal (IMC) y la talla en función de la edad, los mismos que se muestran en la Figura 5. Se puede observar que  $[Zn]$  para la mayoría de los individuos, tanto varones como mujeres, está comprendida en los límites aceptados desde el punto de vista nutricional que se mencionan en Bertazzo *et al.* (1996), donde para el rango etario de 6–11 años se tienen  $[Zn] = 188.18 \pm 9.54$  ppm y  $[Zn] = 211.62 \pm 9.73$  ppm para varones y mujeres respectivamente. También se observa que  $[Zn]$  tiende a ser mayor en las mu-

TABLA 4

VALORES DEL ÍNDICE DE MASA CORPORAL PROMEDIO (IMC), DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESPECTO A LA MEDIA DEL IMC (zsIMC), TALLA DE CADA NIÑO (H) Y DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESPECTO A LA MEDIANA DE LAS TALLAS (zSH), PARA LAS DIFERENTES EDADES (E) Y GÉNEROS (G)

E	G	$\overline{IMC} \pm \Delta IMC$ (kg/m <sup>2</sup> )	$zsIMC \pm \Delta zsIMC$	$\bar{H} \pm \Delta H$ (m)	$zsH \pm \Delta zsH$
8	M	$17.52 \pm 0.57$	$0.87 \pm 0.30$	$1.28 \pm 0.02$	$-1.25 \pm 0.49$
	F	$16.35 \pm 0.56$	$0.02 \pm 0.28$	$1.29 \pm 0.01$	$-1.07 \pm 0.32$
9	M	$18.75 \pm 1.46$	$0.94 \pm 0.47$	$1.28 \pm 0.02$	$0.04 \pm 0.30$
	F	$17.36 \pm 0.96$	$0.25 \pm 0.37$	$1.29 \pm 0.02$	$-1.03 \pm 0.31$
10	M	$17.43 \pm 0.61$	$0.22 \pm 0.28$	$1.35 \pm 0.02$	$-0.88 \pm 0.25$
	F	$15.09 \pm 0.43$	$-1.16 \pm 0.27$	$1.38 \pm 0.03$	$-0.68 \pm 0.5$
11	M	$19.03 \pm 0.68$	$0.61 \pm 0.26$	$1.42 \pm 0.01$	$-0.67 \pm 0.28$
	F	$18.45 \pm 1.09$	$-0.42 \pm 0.31$	$1.43 \pm 0.03$	$-0.74 \pm 0.32$
12	M	$19.17 \pm 0.69$	$0.42 \pm 0.28$	$1.47 \pm 0.02$	$-0.80 \pm 0.21$
	F	$18.47 \pm 0.53$	$-0.05 \pm 0.28$	$1.48 \pm 0.02$	$-1.30 \pm 0.07$
13	M	$20.03 \pm 1.25$	$0.50 \pm 0.50$	$1.50 \pm 0.03$	$-0.51 \pm 0.35$
	F	$18.76 \pm 1.88$	$-0.19 \pm 0.84$	$1.45 \pm 0.01$	$-1.18 \pm 0.89$

TABLA 5

INDICADORES PARA LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO.

Género	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
M	100%	73.47%	27.78%	100%
F	66.67%	94.74%	50.00%	97.30%

eres que en los varones, resultado que concuerda con otros trabajos como por ejemplo en Heinersdorff & Taylor (1979); Gibson, Skeaff & Williams (2000). Se nota que la presencia de valores atípicos en el IMC y la talla, ocurre principalmente para varones entre 8 y 9 años; lo anterior puede ser debido a que la edad en estos casos juega un rol mayor en la determinación de los parámetros antropométricos. Finalmente, se ve que la presencia de valores atípicos en  $[Zn]$  para varones y mujeres de 12 años es importante, situación que puede estar ligada a los cambios físicos y fisiológicos típicos de esta edad.

Para realizar el análisis discriminante, se consideró que los límites de corte mínimo y máximo para la concentración de Zn eran de 150 ppm y 250 ppm respectivamente. Por otra parte, se tomó para el IMC, una unidad tipificada ( $z$ -score) mínima de 1.8 desviaciones estándar; en otras palabras, se considera a un individuo normal (negativo en cuanto a problemas nutricionales) si su  $[Zn]$  satisface ( $150 \leq [Zn] \leq 250$ ) ppm de acuerdo con Weber (1990),  $zsIMC \leq 1.80$ ; caso contrario se lo considera anormal (positivo en cuanto a problemas nutricionales). Bajo estas condiciones, se procedió a un análisis discriminante cuadrático tanto para varones como para mujeres, obteniéndose las regiones de discriminación mostradas en la Figura 6, tanto para varones (a) como para mujeres (b). En ambos casos, se observa que la mayoría de los individuos son normales, lo cual no es sorprendente puesto que la mayoría se encuentran en el el rango ( $150 \leq [Zn] \leq 250$ ) ppm. Cabe aclarar que se realizó este análisis solo para las 96 muestras de la parte urbana de Viacha, ya que

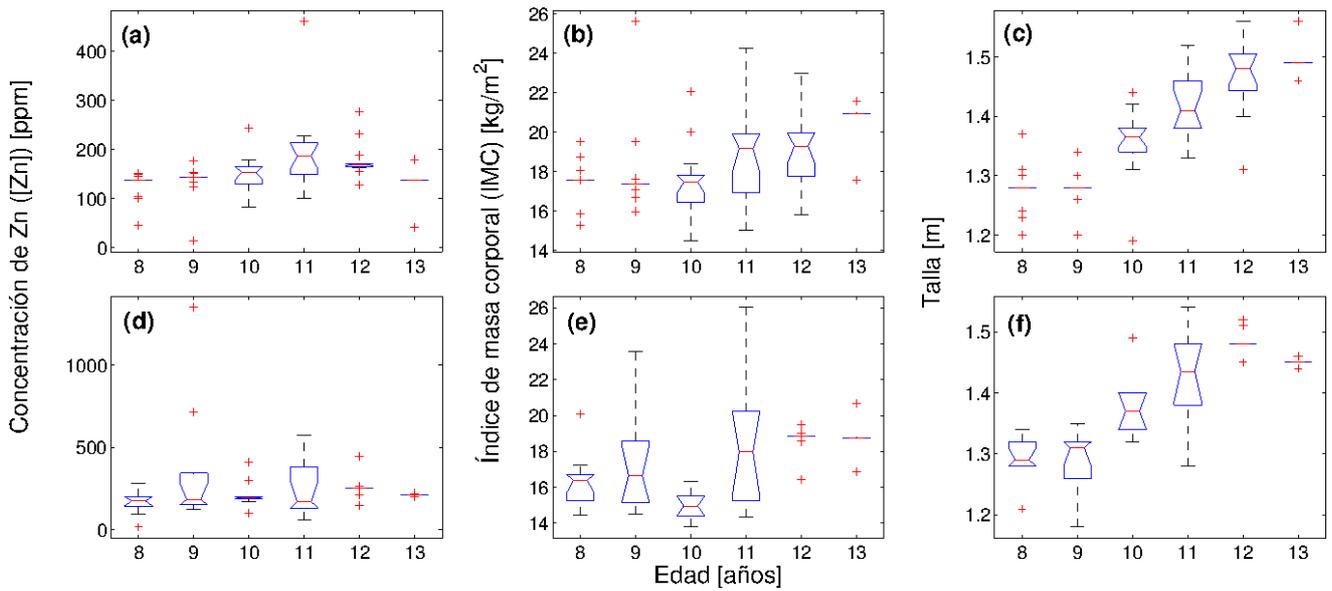


FIG. 5.— (Color online) Diagramas de "caja y bigote" de 1.5 veces el rango intercuartil para (a),(d) [Zn], (b), (e) IMC y (c), (f) talla. Para niños (fila superior) y niñas (fila inferior).

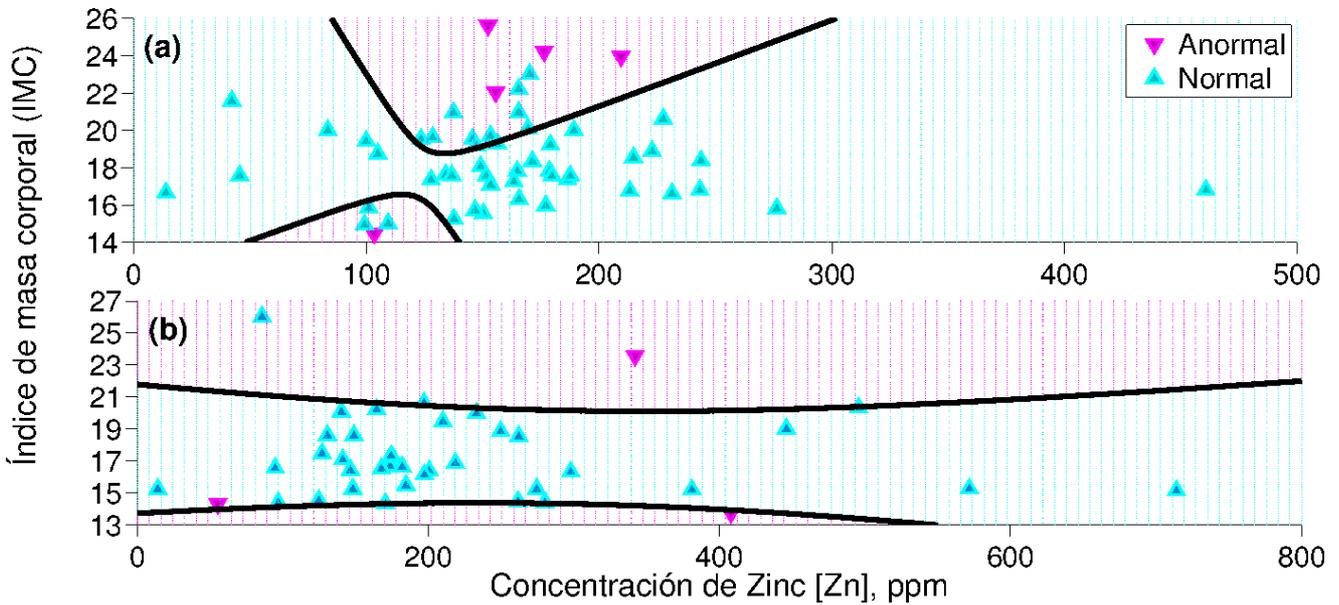


FIG. 6.— (Color online) Análisis discriminante utilizando el IMC y [Zn], para (a) niños y (b) niñas.

las 12 restantes no eran suficientes para observar la discriminación cuadrática. Para la cuantificación de este análisis se utilizan pruebas de diagnóstico mediante el cálculo de la sensibilidad (proporción de verdaderos positivos que han sido correctamente identificados) y de la especificidad (proporción de verdaderos negativos que han sido correctamente identificados); también se pueden calcular valores predictivos como el valor predictivo positivo (VPP) que es la proporción de pacientes positivos que han sido

correctamente identificados o el valor predictivo negativo (VPN) que es la proporción de pacientes negativos que han sido correctamente identificados. Los resultados obtenidos para este análisis se muestran en la Tabla 5.

De acuerdo con los valores obtenidos en la Tabla 5, se tiene una buena discriminación entre individuos que presentan características normales de aquellos que tienen potenciales problemas nutricionales. A pesar de estos buenos resultados, no se puede afir-

mar que exista una correlación entre la [Zn] y el IMC. Este tipo de resultados negativos fueron reportados en otros trabajos tales como Weisstaub *et al.* (2004); Weber (1990)

#### 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Entre las principales contribuciones del presente trabajo desde el punto de vista experimental, se puede mencionar que se puso a punto la técnica de FRXT para la determinación de concentración de zinc en cabellos; se estandarizó un protocolo que va desde la recolección de cabello hasta la preparación de la muestra pasando por la calibración del equipo de FRX, lo que en el futuro permitirá realizar mediciones de manera más rápida y eficiente. En lo referente a los resultados obtenidos, si bien no se halló una correlación directa entre [Zn] y los parámetros antropométricos como se esperaba, no se descarta que esta correlación pueda existir si en los estudios se incluyen un mayor número de variables que incidan en el nivel nutricional de los individuos, tales como edad exacta en meses, composición nutricional,

entorno familiar y habitat, etc.; así como variables que representen una respuesta al nivel nutricional, como ser el grado de aprovechamiento académico. Con todo lo anterior, se espera hallar correlaciones que puedan indicar las posibles soluciones a problemas nutricionales. Se espera que con los nuevos datos mencionados anteriormente, se pueda mejorar aún más el análisis discriminante. Se tiene la perspectiva de ampliar este estudio a otras regiones de Bolivia.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la invaluable y desinteresada colaboración prestada por el personal del Centro de Investigaciones y Aplicaciones Nucleares, en especial a Jorge Chungara, Isaac Luna y Heidi Mamani de la Unidad de Análisis y Calidad Ambiental así como a Eusebio Mita de la Unidad de Investigaciones y Aplicaciones Nucleares. También al Dr. José Luis San Miguel del Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo de la UMSA por proporcionarnos el software WHO AntroPlus.

#### REFERENCIAS

- Compton A. H. (1923), *Philos. Mag.* **45**, 1121.  
 Yoneda Y. & Horiuchi T. (1971), *Rev. Sci. Instrum.* **42**, 1069.  
 Klockenkamper R. (1996), *Total reflection x-ray fluorescence analysis* (Nueva York: Wiley)  
 Memon A-ur-R., Kazi T. G., Afridi H. I., Jamali M. K., Arain M. B., Jalbani N. & Syed N. (2007), *Clin. Chim. Acta* **379**, 66  
 Nascimento Filho V. F., Poblete V. H., Parreira P. S., Matsumoto E., Simabuco S. M., Espinoza E. P. & Navarro A. A. (1999), *Biol. Trace. Elem. Res.* **71**, 423  
 de Onis M., Onyango A. W., Borghi E., Siyam A., Chizuru N., Nishida C. & Siekmann J. (2007), *B. World Health Organ.* **85**, 660.  
 Bertazzo A., Costa C., Biasolo M., Allegri G., Cirrincione G. & Prestim G. (1996), *Biol. Trace. Elem. Res.* **52**, 37.  
 Heinersdorff N. & Taylor T. G. (1979), *Arch. Dis. Child.* **54**, 958.  
 Gibson R. S., Skeaff M. & Williams S. (2000), *Biol. Trace. Elem. Res.* **75**, 65.  
 Weisstaub S. G., Bustos M., Olivares M., Castillo D. C. & Araya M. (2004), *Rev. Bol. Ped.* **42**, 77.  
 Weber C. W., F. W., Nelson G. W., de Vaquera M. & Pearson P. B. (1990), *J. Trop. Pediatrics* **36**, 230.