

## COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE ZINC SÉRICO DETERMINADOS CON EL MÉTODO COLORIMÉTRICO UTILIZANDO ZINCON Y LOS OBTENIDOS POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

COMPARISON OF SERUM ZINC LEVELS WITH CERTAIN Zincon COLORIMETRIC METHOD USING AND OBTAINED BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETRY

Sergio Luis Coronado Reyes<sup>1</sup>, Fredis Gonzalez Santiago<sup>1</sup>, Carmiña L. Vargas Zapata<sup>2</sup>

---

<sup>1</sup>. Estudiantes de Biología

<sup>2</sup>. Docente coordinadora. Grupo de investigación Biología de Nutrientes. Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Atlántico.

---

Recibido: Octubre 31 de 2014

Aceptado: Noviembre 05 de 2014

\*Correspondencia del autor. Grupo de investigación Biología de Nutrientes. Facultad de Ciencias Básicas, Universidad del Atlántico.

### RESUMEN

La cuantificación de los niveles de zinc sérico es el más usual para la valoración nutricional del mineral en el organismo humano. El método de referencia para su valoración es la espectrofotometría de absorción atómica (EAA), método de alto costo que impiden a algunas instituciones realice estos análisis, siendo la colorimetría con zincon una alternativa más económica, pero no se ha evaluado su comparación con el método de EAA. En el presente trabajo se cuantifico las concentraciones de zinc en 120 muestras de suero sanguíneo humano por el método colorimétrico utilizando zincon y comparadas con las obtenidas por el método EAA. Las muestras de sangre fueron obtenidas en ayunas de 12 horas de mujeres adultas mediante punción venosa y jeringas desechables, obteniéndose el suero mediante centrifugación después de la coagulación sanguínea. Para la determinación de los niveles de zinc se adaptó técnica descrita por William *et al* (1) y Methods for the examination of wáter and waste wáter(2), el cual consistió en desnaturalizar las proteínas de la muestra con TCA 10% y disolución del zinc presente con HCL 1N. En el filtrado correspondiente se determinó la concentración del zinc con el uso del zincon. Se obtuvo una media±SD de 104,45±19,34 µg/dL, niveles superiores estadísticamente cuando comparados con los niveles obtenidos con absorción atómica (65,7±14.8 µg/dL) ( $p>0.005$ ), dando como resultado que las concentraciones fueron diferentes mostrando una correlación débil entre ellas con un  $R^2=0.1644$ , indicando que el método de zincon adaptado no es comparable con el de espectrofotometría de absorción atómica.

**Palabras clave:** zinc sérico, método colorimétrico, zincon

**ABSTRACT**

The quantification of serum zinc is the most usual for nutritional assessment of the mineral in the human body. The reference method for assessment is the atomic absorption spectrophotometry (AAS), a high cost method that some institutions refuse to implement. The colorimetric zincon is a cheaper alternative, but its comparison with the method EA has not been evaluated. In this study, zinc concentrations were quantified in 120 samples of human blood serum by the colorimetric method using zincon and compared with those obtained by AAS method was quantified. Blood samples were obtained in 12 hours fasting of adult female by venipuncture and disposable syringes, serum obtained by centrifugation following blood clotting. To determine the levels of zinc, it was adapted a technique described by William *et al*, (1) and Methods for the examination of toilet and waste toiled (2), which consisted of denaturing the proteins in the sample with TCA 10 % solution of zinc present and with 1N HCl. Filtering the corresponding zinc concentration was determined with the use of zincon. An average of  $\pm$  SD of  $104.45 \pm 19.34$  mg / dL was obtained. Statistically higher levels when compared to the levels obtained with atomic absorption ( $65.7 \pm 14.8$  mg / dL) ( $p > 0.005$ ) were obtained. As a result, concentrations were different showing a weak correlation between them with a  $R^2 = 0.1644$ , indicating that the method adapted zincon is not comparable to that of atomic absorption spectrophotometry.

**Keywords:** serum zinc, colorimetric method, zincon

**INTRODUCCIÓN**

El Zinc (Zn) es un elemento traza esencial para el buen funcionamiento del organismo humano forma parte estructural de un grande número de enzimas que se encuentran relacionada con la división, diferenciación y desenvolvimiento celular, con el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos, regulación del olfato, gusto, apetito y consumo de alimentos, está involucrado en la síntesis y acción de la hormona de crecimiento (GH), factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1), alcalina fosfatasa, colágeno, y oateocalcina. Así como también interactúa con hormonas relacionadas con el crecimiento del hueso tales como testosterona, hormona tiroidea, insulina y vitamina D (3,4,5).

Para el análisis de este ion en especímenes biológicos se han empleado métodos como el de espectrofotometría de absorción atómica (EAA), espectrofotometría de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS), espectrofotometría de masa con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), espectrofotometría de emisión atómica acoplado inductivamente a plasma (ICP-AES), análisis instrumental de activación de neutrones (NAA), espectrofotometría de rayos x y Anodic Stripping Voltammetry (ASV) (6,7). Sin embargo, aunque estas técnicas son sensibles y confiables en todos estos métodos se requiere de equipos especiales,

costosos (considerando la compra y mantenimiento de los equipos) y el procesamiento de las muestras requiere procedimientos muy dispendiosos (8).

Es por ello, que además de estos, y como una alternativa viable y menos costosa, se han propuesto diversos reactivos orgánicos, siendo los más habituales la ditizona, el 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) (9) y el zincon, este último ampliamente reconocido por ser un excelente reactivo colorimétrico utilizado para la determinación del ion zinc en soluciones acuosas (8), mostrando ser un método rápido y de una elevada sensibilidad tanto en agua (2) como en suero (1). Sin embargo, no se ha verificado la comparabilidad de las concentraciones con el método de espectrometría de absorción atómica,

método considerado como el referente para la cuantificación de zinc en muestras biológicas.

En esta investigación se adaptó un protocolo para cuantificar el zinc en muestras de suero sanguíneo humano mediante técnica colorimétrica utilizando zincon, con la finalidad de establecer una metodología alternativa y confiable que pueda ser utilizado por aquellas instituciones que carecen de laboratorios dotados de equipos sofisticados (costosos) y que requieren hacer estudios de gran impacto social.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Obtención y conservación de la muestra

Las muestras de sangre (n=120) eran procedentes de 40 mujeres gestantes que fueron atendidas durante la gestación en el Hospital local público de Baranoa E.S.E. DE J. GÓMEZ HEREDIA, las cuales fueron colectadas por estudiantes semillero de investigación del Grupo Biología de Nutrientes, en ayunas de 12 horas, a través de jeringas desechables, procesadas para la obtención del suero correspondiente. El suero fue dividido en alícuotas y congeladas a -20°C hasta el análisis. Los estudiantes que colectaron las muestras determinaron también los niveles de zinc por espectrofotometría de absorción atómica (10).

### 2.2. Análisis de laboratorio

El protocolo que se adaptó para la determinación de zinc en las muestras de suero por el método colorimétrico utilizando zincon fue según los descritos (1,2). El cual consiste en desnaturalizar las proteínas de la muestra con TCA 10% y disolución del zinc presente con HCl 1N. En el filtrado correspondiente se determinó la concentración del zinc con el uso del zincon, cuyo principio se basa en la formación de un complejo azul que se produce al reaccionar el zinc con el zincon en una solución básica de pH entre 8,5 y 9,5, después del enmascaramiento del ión con NaCN y estabilización del complejo con ciclohexanona antes y después de 1 minuto de reacción, determinándose la absorbancia a 620nm y relacionándose a una curva patrón. Todo el material tanto de plástico como de vidrio se lavaron en solución NHO3 1:4 en agua desionizada.

### 2.3. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos aplicados en esta investigación fueron: Análisis descriptivo de cada variable para su caracterización general; análisis de comprobación de normalidad de los datos a través de la prueba de Kolmogorov- Smirnov que fue positiva para datos normales, análisis de comparación de medias y Análisis de correlación de Pearson entre los dos valores obtenidos por el método colorimétrico utilizando zincon y los obtenidos por espectrofotometría de absorción atómica (zincon-EAA), valores de  $P \leq 0,05$ , se consideraron significativas con un nivel de confianza del 95.0%.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Adaptación del protocolo para la determinación del zinc por colorimetría utilizando zinc

El zincon utilizado se disolvió en metanol grado reactivo, el complejo con zinc dio una mayor absorbancia con las condiciones del laboratorio de experimentación a 620nm, se utilizó un volumen de ciclohexanona para estabilizar el complejo de color en la proporción 1/40 diferente a lo utilizado por *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2). Para la curva de concentración de zinc se realizaron desde 0.1: 0.2: 0.3; 0.4; 0.5; 0.75; 1.0; 1.5; 2.0 mg/dL en replica de 10 dando mejor linealidad en las concentraciones de 0.3; 0.5 y 0.75 mg/dL, visualizada en la figura 1.

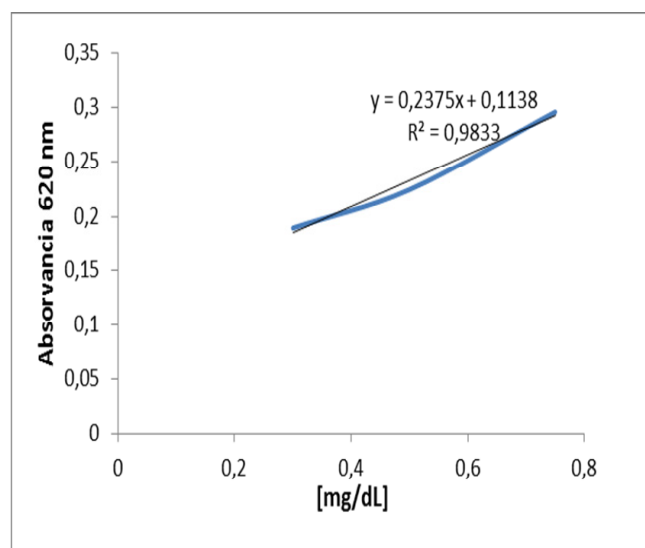


Figura 1. Curva patrón de zinc por el método colorimétrico utilizando zincon.

### 3.2. Niveles de zinc sérico cuantificados por el método colorimétrico utilizando zincon.

En la tabla 1. Se puede observar el análisis estadístico descriptivo de los valores de zinc que se obtuvieron por el método de espectrofotometría de luz visible utilizando zincon y su comparación con los obtenidos por EAA.

Observamos que los valores obtenidos por colorimetría se presentaron en media un 37% mayor a los obtenidos por EAA. La media  $\pm$  SD fue de  $104,45 \pm 19,34$   $\mu$ g/dL en el método colorimétrico y de  $65,37 \pm 16,07$   $\mu$ g/dL para el método de EAA, el valor mínimo y máximo fue de 54,50 - 150,70  $\mu$ g/dL para el método colorimétrico y de 29,80 - 106,35  $\mu$ g/dL para EAA, respectivamente. En ambos métodos se observa una variabilidad interindividual en ambos métodos. Estos valores nos

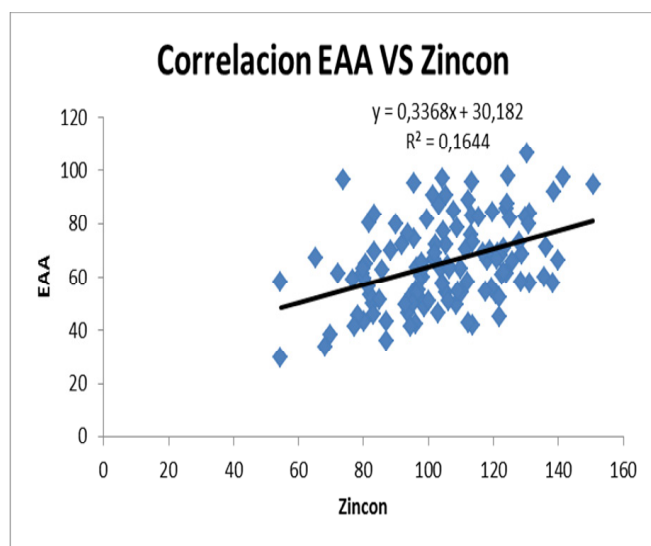
indican que el método colorimétrico no es comparable con el método de EAA, dato que se confirma por una correlación débil entre los valores obtenidos de ambos métodos (figura 2).

**Tabla 1.** Descripción y comparación estadística de los niveles de zinc sérico humano cuantificados mediante el método colorimétrico y EAA

Parámetro estadístico	Metodo de determinación*	
	Colorimétrico	EAA
No de muestras	120	120
Media±SD ( µg/dL)	104,45± 19,34	65,37±16,07**
Mediana ( µg/dL)	104,34	63,50
Mínimo ( µg/dL)	54,50	29,80
Máximo ( µg/dL)	150,70	106,35
Rango ( µg/dL)	96,20	76,55

\*Valores son dados en media±SD.

\*\*Diferencia significativa entre los dos métodos (p<0.005) por test-t



**Figura 2.** Correlación de los niveles de zinc sérico determinados entre el método EAA y el de Colorimetría (Zincon).

#### 4- DISCUSION

En este trabajo se ha comparado los niveles de zinc sérico humano determinado por los métodos colorimétrico (zincon) y de espectrofotometría de absorción atómica.

Esto con el propósito de establecer un método alternativo y confiable que pueda ser utilizado por aquellas instituciones interesados en realizar estudios de gran impacto social sobre el estado nutricional del zinc en humanos o en cualquier ser vivo.

Debido a que el zinc presente en suero y plasma se en-

cuentran unido a diversas proteínas es importante tener en cuenta que las determinaciones espectrofotométricas de iones metálicos utilizando zincon y otros cromógeno usualmente requiere la remoción de estos iones desde la matriz biológica antes de su análisis (Sabel y cols, 2010). En la adaptación del protocolo de esta investigación se ha llevado a cabo el procesamiento de las muestras que consiste en una desnaturalización de las proteínas con TCA al 10% así como una disociación de él ion utilizando HCl 1N siguiendo el protocolo descrito por (1), quienes previo al uso de estos reactivos calentaron las muestras sometiendo a baño maría, sin embargo en este trabajo las muestras no fueron sometidas a calentamiento debido a que otros estudios muestran que no hay diferencia significativa cuando las muestras son tratadas con o sin calentamiento (8,11,13).

En la vigésimo primera edición de Standard methods for the examination of water and wastewater(2), se propone un tratamiento de las muestras que consiste en filtrar estas a través de una membrana con ayuda de una jeringa, Caro y Alfaro (14) han utilizado este método para la determinación de zinc en suero y orina, sin embargo en esta investigación se siguió el procedimiento descrito por Willian y cols, (1962) debido a que este procedimiento corresponde más a la naturaleza de matriz sérica ya que el 0,1% del zinc a nivel de la circulación se encuentra siendo transportado por proteínas, el resto está dentro de las células (Sabel y cols, 2009) y es por esto importante la remoción de este ion desde las proteínas antes de realizar las determinaciones.

El espectro de absorción del método en el presente trabajo muestro un máximo de absorbancia a 620nm. Säbel *et al* (8) estudiaron el espectro de absorción del complejo zinc-zincon en presencia de urea y guanidina hidrociorada, dos desnaturalizantes de proteínas muy utilizados encontrando que cuando el complejo se encontraba en presencia de guanidina hidrociorada, se observó un espectro de absorción máxima de 632nm, con urea fue de 628 mientras que cuando se encontraba solo en presencia del buffer borato los resultados mostraron un máximo a 620nm coincidiendo con lo reportado en este trabajo, y lo recomendado en *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (2).

En la realización de la curva de calibración se observó linealidad incluso a concentraciones de zinc de 750 µg/dL (figura 2), Johnson *et al* (15) proponen un método que es lineal hasta una concentración de 400

$\mu\text{g/dL}$ . En este caso el reactivo de color utilizado fue el 4-(2-pyridylazo) resorcinol y el propuesto por Caro y Alfaro (14) quienes determinaron zinc en suero y orina de mujeres gestantes mostrando linealidad hasta  $500 \mu\text{g/dL}$ . La ecuación de regresión lineal y el coeficiente de correlación para esta recta es en esta investigación es:  $y = 0,2375X + 0,138 \mu\text{g/dl}$  y  $r = 0,9833$  respectivamente. La Figura 1 muestra que en este estudio se obtuvo linealidad con sueros que presenten absorbancias de al menos 0.30 Este valor corresponde a una concentración aproximada de  $750 \mu\text{g/dl}$  de zinc. A concentraciones más altas se perdió la linealidad esto probablemente porque no se tiene la cantidad estequiométrica de zincon necesaria para la reacción con el ion metálico. En consecuencia, a altas concentraciones de zinc, la cantidad de zincon limita la formación del complejo zincon-zinc y la absorbancia, que es proporcional a la cantidad de complejo formado, disminuye, en concordancia con la ley de Beer (16).

Al comparar los valores obtenidos en este trabajo con los reportados por (15). Se observó que son similares. Estos autores determinaron los niveles de zinc en muestras de suero de 31 personas saludables utilizando clorhidrato de guanidina como desnaturalizante químico, seguido de la complejación de los metales liberados con cianuro, desmascaramiento selectivo con hidrato de cloral y finalmente llevaron a cabo la reacción colorimétrica entre el zinc y 4-(2-pyridylazo) resorcinol. Los valores estuvieron en un rango que va desde  $83 \mu\text{g/dL}$  hasta  $129 \mu\text{g/dL}$  con una media de  $99 \mu\text{g/dL} \pm 9 \mu\text{g/DL}$ .

Ujiiea *et al* (17) desarrollan un método colorimétrico para la determinación de zinc en suero utilizando como agente cromogénico el 2-(2-pyridylazo)-5-dimethylaminophenol (PADAP), las muestras fueron obtenidas a partir de 50 adultos saludables (38 mujeres y 12 hombres) obteniendo valores que van desde 63 hasta  $116 \mu\text{g/dL}$ , en comparación con los obtenidos en este estudio.

Comparando los niveles de zinc obtenidos por colorimetría utilizando zincon con los evaluados por EAA, se observa en la tabla 1 que los rangos, por el método colorimétrico fueron de  $54,50 - 150,70 \mu\text{g/d}$ , en cambio por EAA fue de  $29,80 - 106,35 \mu\text{g/dL}$ , mostrando que además de que sus valores se encuentran alejados,

la comparación de la media presentó diferencia significativa entre ellas, indicando que los métodos no serían comparables, reforzando el resultado por la existencia de una correlación muy débil (Figura 2). El promedio de los niveles se presentaron en un 37% superior a los obtenidos por EAA, posiblemente a una interferencia de la reacción del zincon con otros minerales presente en el suero. Es conocido que durante la gestación los niveles de zinc sérico disminuyen a medida que avanza la gestación, pero pueden aumentar otros iones como el cobre (18) el cual puede ser la causa del aumento de la absorbancia del complejo zinc-zincon.

Los niveles de zinc (media $\pm$ SD), obtenidos por el método colorimétrico en este estudio fue de  $104,45 \pm 19,34$ , valores que estuvieron cercanos a los obtenidos en muestra de suero sanguíneo humano reportados en otros estudios utilizando EAA, tales como Sinha y Gabrieli (19), quienes obtuvieron valores (media $\pm$ SD) de  $120 \pm 22 \mu\text{g/dL}$  en 200 muestras de suero sanguíneo, Pekarek *et al* (20) de  $102 \pm 17 \mu\text{g/dL}$  en 99 muestras de personas saludables. Mientras que otros reportaron valores más bajos tales como Vieira y Hansen, (1981). Quienes obtuvieron una media de  $92 \pm 0.17 \mu\text{g/dL}$  de zinc en suero en 105 personas sanas utilizando un volumen de solo  $10 \mu\text{l}$  de muestra.

Rodríguez *et al* (22), obtuvieron valores de  $83 \pm 19 \mu\text{g/dL}$  en una población de 292 menores de 15 años, los cuales tenían una dieta habitual baja en zinc. Kilic y saraymen (23), encontraron niveles de  $62 \pm 2 \mu\text{g/dL}$  en hombres que presentaron el parasito *B. hominis* ( $n=28$ ) mientras que el grupo control ( $n=10$ ) para este mismo género presentó valores de zinc séricos de  $82 \pm 1 \mu\text{g/dL}$  por otro lado en mujeres que presentaron el parasito ( $n=24$ ) las concentraciones fueron de  $61 \pm 2 \mu\text{g/dL}$  y de  $60 \pm 2 \mu\text{g/dL}$  para el grupo control ( $n=50$ ) sin embargo se debe tener en cuenta que además de la presencia de una condición patológica, en este caso el número de muestra es bajo en comparación con el utilizado en este estudio.

El método de colorimetría utilizando zincon no presentó una comparación positiva con el método de EAA, indicando que el protocolo adaptado parece no ser adecuado para ser utilizado como una alternativa para las investigaciones de la homeostasis del zinc en humanos por instituciones que tengan bajos recursos financieros.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Caro R. D & P. N Alfaro 2009. Determinación colorimétrica de zinc en muestras de suero Sanguíneo y orina humana utilizando 2-carboxi-2'hidroxi-5' sulfóformacil benceno (zincon). Tesis de pregrado. Barranquilla-Colombia, Universidad Del Atlántico, Facultad de ciencias básicas.
2. D'Haese P C, L V Lamberts, A O Vanheule and M E De Broe 1992. Direct Determination of Zinc in Serum by Zeeman Atomic Absorption Spectrometry with a Graphite Furnace. *Clin. Chem.* 38 (12) 2439-2443.
3. Florea D I, J López, E Millán, Sáez L, A Pérez de la Cruz, P Planells, J I Salmerón y E Planells 2012. Nosotros y el cinc. *Nutr Hosp.* 27(3). 691-700.
4. García M, Il Holst, K Schosinsky & R Rodríguez 1993. Optimización de un método colorimétrico para la cuantificación de cobre en suero. *Rev. Costarric. Cienc. Méd.* 14(3/4). 33-42.
5. Gómez S A, LL D Márquez & C L Vargas 2009. Caracterización de indicadores bioquímicos relacionados con el metabolismo del zinc en mujeres gestantes de bajo nivel socioeconómico del municipio de baranoa – atlántico. Tesis de pregrado. Barranquilla-Colombia, Universidad Del Atlántico, Facultad de ciencias básicas.
6. Izquierdo A, S García, M Calvo, E Fuertes, P Bocos, Y González, E García and B García 2007. Updating of normal levels of copper, zinc and selenium in serum of pregnant women. Elsevier. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21 S1, 49–52
7. Johnson D J, YY Djuh, J Bruton & H L Williams 1977. Improved Colorimetric Determination of Serum Zinc. *Clin. CHEM.* 23/7, 1321-1323.
8. Kilic E, S Yazar AND R Saraymen 2003. Serum Zinc and Magnesium Levels in Patients with Blastocystosis. Department of Biochemistry and Clinical Biochemistry and Parasitology. Erciyes University. Medical Faculty. Turkey.
9. López D de R, C D Castillo, D Diazgranados 2010. El zinc en la salud humana. *Rev Chil Nutr Vol.* 37, N°2.
10. Mariños F B 2011. Diseño Y Validación De Un Método De Análisis Por Espectrofotometría UV-VIS Para Cinc (II) Y Mercurio (II) En Muestras Acuósas. Tesis de grado. Pontificia Universidad Católica Del Perú. Facultad De Ciencias E Ingeniería.
11. Kelso J R and R J Shamberger 1978. Methods Compared for Determining Zinc in Serum by Flame Atomic Absorption Spectroscopy. *Clin. Chem.* 24(2). 240-244.
12. Pekarek R S, W. R Beisel, P J Bartelloni, and, K A Bostian 1972. Determination of serum zinc concentrations in normal adult subjects by atomic absorption spectrophotometry. *Am. J. Gun. Pathol.* 57, 506-510.
13. Pereira N S 2012. Alteraciones Inmunoinflamatorias En La Desnutrición Infantil. Efecto Biológico De La Recuperación Nutricional. Tesis Doctoral. Alcalá De Henares. Universidad De Alcalá Departamento De Medicina Unidad I+D Asociada Al CNB-CSIC.
14. Rodríguez D, J Papale, G Dellan, M Torres, Y Berné, N Mendoza, J Moreno, Salazar J & N Cardinale-Randazzo 2004. Deficiencia De Zinc Y Cobre En Menores De 15 Años En Una Población Rural De Venezuela. UCLA. Decanato de Medicina. Barquisimeto – Venezuela. *Boletín Médico de Postgrado.* Boletín Médico de Postgrado. Vol. XX N° 2 Abril – Junio
15. Säbel C E, J L Shepherd & S Siemann 2009. A direct spectrophotometric method for the simultaneous determination of zinc and cobalt in metalloproteins using 4-(2-pyridylazo)resorcinol. *Analytical Biochemistry* 391. 74–76
16. Säbel C E, J M Neureuther & S Siemann 2010. A Spectrophotometric method for the determination of zinc, copper, and cobalt ions in metalloproteins using Zincon. *Analytical Biochemistry.* 397. 218-226.
17. Sharma R D AND S Amlathe 2012. Quantitative Determination And Removal Of Zinc Using Disposable Colorimetric Sensors: An Appropriate Alternative To Optodes. *Journal Of Chemical And Pharmaceutical Research* 1097-1105. 4(2).
18. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. APHA 2005. AWWA and

24. WEF, 21st Edition,
25. Ujiiia M, I Mikamib, T Gemba, A Nomurac, M Tokudomec & A K Fujiic1978. new micromethod for colorimetric determination of zinc in serum. Volume 87, Issue 1, 1. Pages 71–76.
26. Vielra N E and J W Hansen 1981. Zinc Determined in 10-/2L Serum or Urine Samples by
27. Flameless Atomic Absorption Spectrometry. Clin. Chem. 27(1), 73-77.
28. Williams L A, J S Cohen & B Zak 1962. Study of a differential demasking technic for serum Zinc. Clinical Chemistry. 8, 502-