

DESARROLLO DE UN SISTEMA EN FLUJO MEDIANTE INYECCIÓN SECUENCIAL (SIA) PARA LA DETERMINACIÓN DE ZINC EN LECHE EN POLVO Y FÓRMULAS INFANTILES

DEVELOPMENT OF A SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS (SIA) FLOW SYSTEM FOR THE DETERMINATION OF ZINC IN POWDERED MILK AND INFANT FORMULAE

Mariela Pistón y Moisés Knochen

Universidad de la República, Facultad de Química, Departamento "Estrella Campos"
Cátedra de Química Analítica, Av. Gral. Flores 2124 – 11800 Montevideo – Uruguay
(e-mail: mpiston@fq.edu.uy)

Recibido: 02/12/2010 - Evaluado: 26/01/2011 - Aceptado: 18/02/2011

RESUMEN

Se presenta el desarrollo y optimización de un sistema en flujo con inyección secuencial (SIA) para la determinación de zinc en leche en polvo y fórmulas infantiles. La determinación se basa en la reacción de Zn(II) con zincon a pH 9 en presencia de citrato de sodio para enmascarar interferentes de la matriz con detección espectrofotométrica a 612 nm. El sistema fue optimizado mediante experimentos multivariantes. El sistema validado presentó un rango lineal de 0.4 a 10 mg L⁻¹, la precisión del método fue mejor que 5% (s_r,%; n=10). El límite de detección fue 0.13 mg L⁻¹. Los resultados obtenidos utilizando el método propuesto y el de referencia fueron estadísticamente equivalentes. La frecuencia de muestreo fue de 75 muestras/hora y el consumo de muestra y reactivo 0.24 mL por determinación. El método propuesto resultó veraz, simple, rápido y está de acuerdo a los principios de la química verde, generando apenas 0.24 mL de residuos químicos.

ABSTRACT

The development and optimization of a sequential injection analysis (SIA) flow system is presented for the determination of zinc in milk powder and infant formulae. The determination is based on the reaction of Zn(II) with zincon at pH 9 in the presence of sodium citrate to mask the interfering matrix with spectrophotometric detection at 612 nm. The system was optimized by multivariate experiments. The validated system presented a linear range from 0.4 to 10 mg L⁻¹ and the precision of the method was better than 5% (s_r(%), n = 10). The detection limit was 0.13 mg L⁻¹. The results obtained using the proposed and reference methods were found to be statistically equivalent. The sampling frequency was 75 samples per hour and the sample and reagent consumption of 0.24 mL per determination. The proposed method was accurate, simple, fast and according to the principles of green chemistry generating just 0.24 mL of chemical waste.

Palabras clave: flujo con inyección secuencial; leche; zinc; zincon

Keywords: sequential injection analysis; milk; zinc; zincon

INTRODUCCIÓN

El zinc es un metal esencial para los seres vivos, por lo que tanto su ausencia como una exposición excesiva pueden traer efectos nocivos. Es un oligoelemento necesario para el crecimiento normal y desarrollo del hombre. Las deficiencias de zinc se manifiestan en la regulación de la síntesis de ADN y ARN, y es importante en la replicación celular y en los procesos de crecimiento y reparación de tejidos.

La primera deficiencia de zinc reportada en Medio Oriente se manifestó en anemia, disfuncionalidad e inmadurez sexual. Existen más de 200 enzimas que utilizan zinc como cofactor por lo que su deficiencia traerá problemas en el funcionamiento de las mismas. Tiene además un rol fundamental en la regulación de la transcripción, uniéndose a proteínas nucleares, para formar complejos llamados "zinc fingers" (Soares da Silva, 2003).

El zinc es un constituyente natural en la leche de vaca. Los productos lácteos en general son considerados una buena fuente de este elemento ya que aportan zinc asimilable a la dieta.

La determinación analítica de zinc y otros metales en leche se realiza mediante Espectrometría de Absorción Atómica con llama (AAS) de acuerdo a los métodos de referencia de los organismos reconocidos internacionalmente como la Federación Internacional Láctea (FIL/IDF) y AOAC International (Bueno, 1996). Estos métodos también se han aplicado en trabajos publicados de investigación (Ferrer et al., 2001).

La AOAC recomienda también realizar las determinaciones de zinc y otros metales mediante Espectrometría de Emisión Atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (Bueno, 1996). En la literatura se reportan determinaciones empleando las técnicas tanto ICP-OES como ICP-MS (Chiao-Yu y Jiang, 2002; Nóbrega et al., 1997).

Las técnicas de Absorción y Emisión Atómica si bien son rápidas implican disponer en el laboratorio de equipamiento relativamente costoso.

Existen alternativas para realizar estas determinaciones mediante espectrometría molecular en el visible, donde solo se requiere un espectrofotómetro UV-visible. Este es un instrumento mucho más económico y que en general es muy común encontrarlo en los laboratorios de análisis.

Las reacciones que involucran la formación de compuestos coloreados estudiadas para la determinación de zinc en diversas matrices son pocas y en general son poco selectivas y mucho menos específicas (Marczenko y Balcerzak, 2000).

Debido a la gran cantidad de interferencias que presentan estos métodos, sobre todo cuando en la misma matriz se encuentran cobre y zinc, hace necesario la separación previa de estos elementos de la matriz para su determinación o utilizar agentes enmascarantes. Esto lleva a que para la determinación de zinc en presencia de cobre, se hayan buscado diferentes estrategias para su determinación sin que se interfieran mutuamente (Cadore, 1986; Ruedas-Rama et al., 2005).

El Análisis por Inyección Secuencial (SIA) (Ruzicka y Marshall, 1990) ha sido utilizado ampliamente para la determinación de metales en diversas matrices (Lenehan et al., 2002). Estas técnicas permiten además acoplar etapas en fase sólida ya sea para la separación de los metales como para la preconcentración de los mismos.

La determinación simultánea de cobre y zinc mediante técnicas de análisis en flujo ha sido reportada utilizando un reactivo orgánico conocido como zincón (2-carboxi-2' hidroxí-5' sulfoformacilbenceno). Esta es una reacción muy estudiada y aplicada. La determinación está basada en la variación de la estabilidad de los complejos formados por el zincón y los metales a diferentes pH y posterior detección espectrofotométrica del producto de reacción (Richter et al., 1997; Shpigun et al., 2006).

Recientemente se han incorporado nuevas estrategias que involucran la formación de los complejos metal-zincón en fase sólida con detección del complejo en la misma (Richter et al., 2002). Esta estrategia se ha asociado al análisis en flujo lográndose la técnica conocida como Bead Injection Spectroscopy-Flow Injection Analysis o BIS-FIA) (Ruedas-Rama et al., 2005).

En este trabajo se desarrolló un método basado en el uso de un sistema SIA para la determinación de zinc en leche en polvo y fórmulas infantiles. El único antecedente hallado en la literatura reportando el empleo de SIA para la determinación de zinc es el trabajo de van Staden y Tlowana (2002). Estos autores no utilizan el reactivo zincón como agente complejante y su trabajo se refiere a la determinación de zinc en fertilizantes utilizando un sistema SIA. No se han encontrado antecedentes aplicación optimizada de SIA a la determinación de zinc en leche de la forma propuesta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica o superior.

Se utilizó agua purificada (ASTM Tipo I), obtenida de un purificador Millipore (São Paulo, Brasil) Simplicity 185 alimentado con agua destilada en destilador de vidrio.

El reactivo cromogénico zincón se preparó pesando 0.050 g del sólido (sal disódica) que se disolvió en 100 mL de NaOH 0.1 % (m/v) y posteriormente se completó a 200 mL con agua purificada (concentración de zincón: 0.025 % (m/v)). Este reactivo se preparó diariamente y se guardó en frasco de vidrio ámbar durante la jornada de trabajo.

Se preparó una disolución buffer pH 9 (*Clark y Lubs*) con agregado de citrato que actuó como agente enmascarante. Para su preparación se agregó en un recipiente con agitación continua 21.3 mL de NaOH 0.5 mol L⁻¹ a 50 mL de ácido bórico 0.2 mol L⁻¹ en cloruro de potasio 0.2 mol L⁻¹ junto con 8 g de citrato de sodio que se disolvieron en esta mezcla. Una vez disuelto el sólido se completó a 200 mL con agua purificada.

Se prepararon disoluciones patrón stock de zinc de 1000 mg L⁻¹ a partir de zinc metálico (Aldrich 99.99%), disolviéndolo con ácido clorhídrico 1+1 (v+v) y diluyendo con agua a la concentración indicada. Las disoluciones de calibración se prepararon diariamente realizando las diluciones correspondientes a partir de la disolución stock de 1000 mg L⁻¹.

Las disoluciones para evaluar interferencias se prepararon por dilución a partir de disoluciones stock de 1000 mg L⁻¹ de hierro (DILUTE-IT®, J.T. Baker), magnesio (a partir de barra metálica 99.99%, Sigma) y calcio (a partir de CaCO₃, Merck).

Todo el material de vidrio y porcelana se trató para su descontaminación con ácido nítrico 10% (v/v) durante la noche, y antes de usarlo se lavó exhaustivamente con agua purificada.

Instrumentación y software

Para las determinaciones mediante absorción atómica de llama se utilizó un espectrómetro Perkin Elmer (Norwalk, CT, USA) modelo 5000 con quemador de 10 cm y llama acetileno-aire, lámpara de cátodo hueco de Zn (Photron, Narre Warren, Australia), longitud de onda de medida 213.9 nm, ancho de banda 0.7 nm.

Otros instrumentos utilizados fueron: balanza analítica (Precisa, Dietikon, Suiza, modelo XB 220 A, mínima división 0.1 mg), agitador magnético (Thermolyne, Iowa, USA, modelo Nuova), mufla (Atec (Montevideo, Uruguay) modelo HFA10).

Sistema SIA

Para el sistema SIA se utilizó una bomba de jeringa controlada por microprocesador (Cavro, Männedorf, Suiza, modelo XP-3000), con una jeringa de 2.5 mL. Se utilizó además una válvula selectora Valco Cheminert (Houston, TX, USA) de 10 puertos con actuador microeléctrico.

Como detector se empleó un espectrofotómetro para el visible Beckman B con celda de flujo de 80 μL (Hellma, Müllheim, Alemania). El mismo estaba dotado de electrónica modificada y de una salida analógica (3V a plena escala) proporcional a la intensidad luminosa detectada. Por este motivo en el programa desarrollado se previó el ajuste de 0%T (corriente oscura) y el de 100%T que se realizó al comienzo del trabajo, obteniéndose la absorbancia por cálculo en tiempo real.

Todas las conexiones y las bobinas de mezclado de tipo doble helicoidal fueron construidos con tubos de Teflon PFA de 0.8 mm de diámetro interno y conectores Cheminert (Valco).

Se realizó el control del sistema y la adquisición de datos desde un PC (Pentium III-600 MHz) con dos puertos seriales y dotado de una interfase analógica-digital (A/D) de 12 bits (Measurement Computing CIO-DAS08Jr) y un programa compilado en Visual Basic 6.0.

El programa permitió controlar la bomba de jeringa y la válvula selectora mediante los puertos seriales RS232 y capturó los datos analógicos provenientes del espectrofotómetro. Estos datos fueron escalados, transformados en absorbancia y mostrados en pantalla en tiempo real. Los datos se guardaron en archivos de formato ASCII en el disco duro.

Para el procesamiento de datos (medida de altura de pico, suavizado, corrección de línea de base) se utilizó el programa Peak Simple (SRI Instruments, Torrance, CA, USA). Se imprimió un reporte impreso en cada jornada de trabajo.

Descripción del sistema

El sistema en flujo mediante inyección secuencial se muestra en la Figura 1. Consiste en una válvula selectora multiposición (V), una bomba de jeringa, una bobina de retención (HC) y un espectrofotómetro como detector.

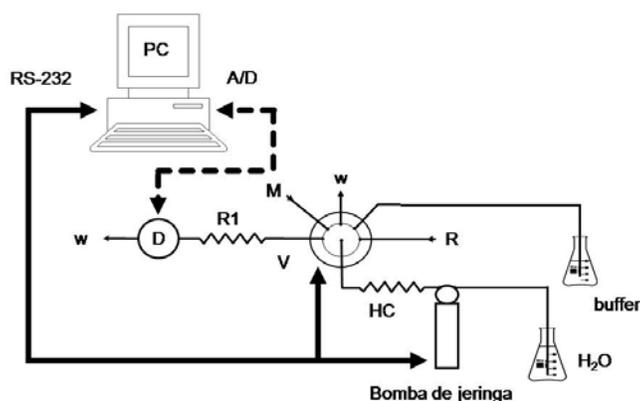


Fig. 1: Esquema sistema SIA. V: válvula selectora, R: reactivo de color (zincón), W: descarte, M: muestra, HC: 100 cm, R1: 150 cm. — conexión RS-232, señal analógica.

Método

Debido a que el zincón no es un reactivo específico para zinc o cobre, es necesaria la separación de los iones que interfieren, generalmente mediante el uso de una resina de intercambio iónico o utilizando agentes enmascarantes que formen complejos más estables con el metal interferente.

La interferencia del Cu es uno de los mayores problemas cuando se determina Zn con zincón, debido a las semejanzas en la naturaleza química de estos dos elementos.

Si se agrega citrato de sodio en la preparación de las soluciones buffer es posible enmascarar el complejo Cu (II)-zincón a pH 9 casi completamente, así como otros metales constituyentes de la matriz que podrían interferir (Richter et al., 1997).

Las determinaciones se realizaron a 612 nm, longitud de onda que corresponde al máximo de absorción del complejo metal-zincón.

La mineralización de las muestras se realizó según el método oficial AOAC 985.35 (Bueno, 1996). Este método, basado en la determinación de zinc mediante espectrometría de absorción atómica de llama (AAS) se tomó como método de referencia para la validación.

Secuencia de análisis

Se estudiaron varias secuencias para la determinación de zinc. Todas ellas basadas en la estrategia de armar un "sandwich" con la muestra, o sea encerrarla entre segmentos de reactivo y buffer en este caso.

La secuencia que presentó mejor desempeño fue la que se detalla a continuación:

- Paso 1: Se aspiró agua (portador) hacia la bomba de jeringa, 2.1 mL.
- Paso 2: Se aspiró reactivo (zincón) hacia la bobina de retención, 40 µL.
- Paso 3: Se aspiró buffer pH 9 hacia la bobina de retención, 40 µL.
- Paso 4: Se aspiró muestra hacia la bobina de retención, 80 µL.
- Paso 5: Se aspiró buffer pH 9 hacia la bobina de retención, 40 µL.
- Paso 6: Se aspiró reactivo (zincón) hacia la bobina de retención, 40 µL.
- Paso 7: Se invirtió la dirección de flujo y el contenido de la bobina de retención avanzó una distancia equivalente a desplazar 0.3 mL con la bomba de jeringa. A continuación retrocedió la misma distancia, esto se repitió 3 veces (mezclado por avance y retroceso del flujo).
- Paso 8: Se invirtió la dirección de flujo y se dispuso el contenido de la bobina de retención (HC), hacia el sistema de detección a través de una bobina de mezclado (R1) impulsado por el portador.

El siguiente esquema muestra el orden de los segmentos en la bobina de retención:

zincón	buffer	muestra	buffer	zincón
--------	--------	---------	--------	--------

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización

Se probaron otras secuencias respecto a la indicada bajo "Secuencia de Análisis", aumentando el volumen de la muestra. Esta variación se tradujo en señales con dobles y triples picos. Esto no pudo mejorarse aún aumentando el tamaño de las bobinas para favorecer el mezclado.

Al aumentar el volumen de buffer o reactivo se generaron señales de blanco muy altas y con picos de forma irregular incluso desdoblados. Esto puede explicarse debido a que el buffer contiene citrato y el cambio de índice de refracción da lugar al efecto Schlieren.

Se estudió la influencia del pH y la concentración de citrato agregado al buffer en su preparación. Para ello se realizó un experimento multivariante del tipo central compuesto de 5 niveles y 2 variables (Massart et al., 1997).

En las Figuras 2 y 3 se muestra la representación gráfica mediante superficies de respuesta del experimento. En la Figura 2 se graficó la influencia sobre la sensibilidad del pH y concentración de citrato expresada en mol L⁻¹. Se buscó el valor óptimo de pH y concentración de citrato para alcanzar la máxima sensibilidad. En la figura 3 se muestra la superficie de respuesta para las mismas variables, pero usando la precisión instrumental como variable dependiente. Se consideró óptimo aquél valor que presentó mínima dispersión (s_r (%)). Teniendo en cuenta ambos criterios las coordenadas óptimas fueron: pH 9 y concentración de citrato 0.1 mol L⁻¹.

Se observó que cuando las curvas de calibración se realizaron sin agregado de citrato al buffer la sensibilidad aumentó. Este efecto se atribuye a que también se forma complejo de citrato con zinc aunque en poca extensión. Sin embargo en ausencia de citrato el efecto de las interferencias que presentó la matriz debido a la presencia de cobre y otros metales no se canceló. La utilización de citrato como agente enmascarante resultó ser imprescindible.

Se verificó que, trabajando en las condiciones óptimas, la disolución preparada conteniendo interferentes produjo señales del orden de las del blanco.

Superficie de respuesta estimada para sensibilidad analítica (rango 0-10 mg.L⁻¹) en función del pH y de la concentración de agente enmascarante de acuerdo a un diseño central compuesto

$$z = -2,718 + 0,7467 * x - 5,0577 * y - 0,0506 * x * x + 0,7197 * x * y - 2,7234 * y * y$$

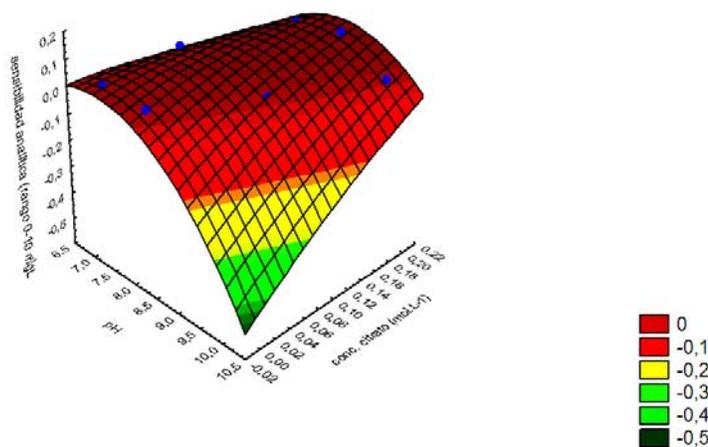


Fig. 2: Superficie de respuesta para sensibilidad en función de pH-concentración de citrato

También se estudió la influencia del tamaño de las bobinas de retención y mezclado. Se evaluó la altura y forma de pico del blanco y de un patrón de zinc de 4 mg L⁻¹. La concentración de este patrón coincidió aproximadamente con el punto medio del rango lineal. La forma de pico se consideró aceptable cuando no se observó deformado o desdoblado en doble pico lo que se puede atribuir a un mezclado ineficiente.

La mayor altura de pico del patrón con una señal de blanco aceptable y con adecuada forma de pico se obtuvo cuando se utilizó una bobina de retención de 100 cm y una de mezclado de 150 cm. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Superficie de respuesta estimada para Sr % en función del pH y de la concentración de agente enmascarante de acuerdo a un diseño central compuesto
 $z = 41,9998 - 9,9127 * x + 39,6175 * y + 0,6286 * x * x - 7,9669 * x * y + 120,5063 * y * y$

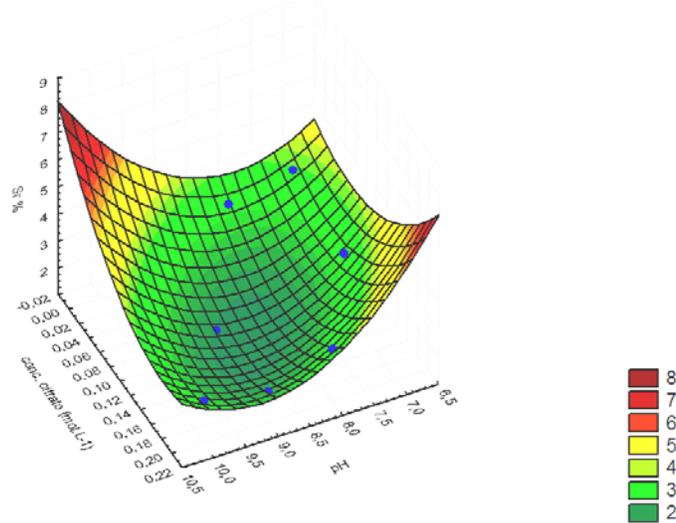


Fig. 3: Superficie de respuesta para s_r (%) en función de pH-concentración de citrato.

Tabla 1: Estudio de la influencia del tamaño de las bobinas de retención y mezclado.

Bobina de retención HC (cm)	Bobina de mezclado R1 (cm)	Altura de pico del blanco (absorbancia)	Altura de pico de un patrón de 4 mg L ⁻¹ (absorbancia)
100	150	0.074	0.159
100	50	0.081	0.147
100	100	0.084	0.155
100	200	0.062	0.089
100	25	0.100	0.133
100	250	0.060	0.072
150	200	0.062	0.091
150	100	0.055	0.092
150	150	0.067	0.135
150	50	0.076	0.140
150	25	0.086	0.145
150	250	0.070	0.083

Validación

Para evaluar la linealidad se midió un blanco y 6 disoluciones patrón en el rango de 1-10 mg L⁻¹ (n=5). La recta de mejor ajuste fue: $H = 0.0041 C + 0.0001$ ($r^2 = 0.998$, H= altura de pico, C= concentración, mg L⁻¹). Este modelo lineal fue comprobado mediante el test de hipótesis de *lack of fit* (Miller y Miller, 2002).

En la Figura 4 se muestra el registro de señales correspondientes a la curva de calibración hasta 3 mg L^{-1} y dos disoluciones conteniendo potenciales interferentes. La disolución de interferentes fue preparada a partir de disoluciones stock según se indica en reactivos. La misma contuvo Ca, Fe y Mg en concentraciones similares a las que se encuentran en la matriz leche. La disolución de cobre 2 mg L^{-1} se midió para verificar que dicho analito tampoco interfería en las medidas. Se observa en la figura 4 que ambas disoluciones arrojaron valores de altura de pico comparable con el blanco.

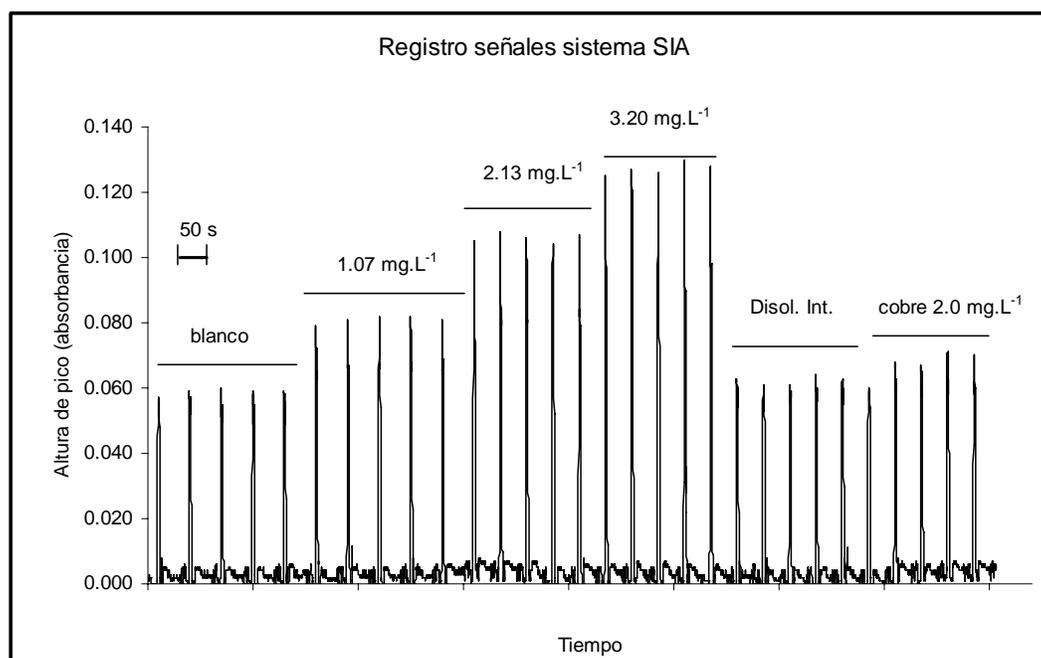


Fig. 4: Registro en función del tiempo correspondiente a una curva de calibración para la determinación de zinc utilizando un sistema SIA y señales obtenidas para una disolución conteniendo interferentes (Disol. Int.) y cobre 2.0 mg L^{-1} .

Se estudió el posible efecto de interferencias producidas por la reacción de otros metales presentes en altas concentraciones en la matriz leche con zincón. El resultado indicó que en las condiciones optimizadas utilizando el agente enmascarante citrato no existen interferencias.

Los límites de detección y cuantificación se estimaron a partir de la desviación estándar de las determinaciones del blanco ($3s$ y $10s$ respectivamente, $n=10$) y refiriéndola a la curva de calibración.

La precisión instrumental se estimó a partir de la dispersión de las señales correspondientes a inyecciones en condiciones de repetibilidad ($s_r(\%)$, $n=5$). La precisión del método se obtuvo a partir de los resultados obtenidos de 5 determinaciones independientes realizadas a cada uno de los materiales de referencia certificados. La Tabla 2 resume las principales cifras de mérito.

Para evaluar la veracidad de la determinación en las matrices leche en polvo y fórmulas infantiles, los resultados obtenidos utilizando la técnica SIA fueron comparados con los obtenidos realizando el método de referencia AOAC mediante absorción atómica de llama (AAS). Para ello se utilizó material de referencia certificado, NIST-1549 Non-Fat Milk Powder y NIST-1846 Infant Formula.

Se realizó una prueba de significación t al nivel de confianza 95% ($n=6$ para NIST 1549 y $n=5$ para NIST 1846), Se calculó el cociente entre los valores obtenidos por el método SIA y AAS. El valor de dicho cociente se comparó estadísticamente con el valor teórico 1. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 2: Cifras de mérito de la metodología desarrollada.

Cifra de mérito	Resultado
Rango lineal (mg L ⁻¹)	0.4-10 (r>0.998)
Precisión (s,(%), n=10)	<5
Límite de detección, LD (3σ, en disolución, mg L ⁻¹)	0.13
Límite de cuantificación, LQ (10σ, en disolución, mg L ⁻¹)	0.43
Frecuencia de muestreo (muestras/hora)	75
Consumo de muestra (mL) por determinación	0.08
Consumo de reactivos (zincón y buffer) (mL) por determinación	0.16

Por otro lado se compararon los valores obtenidos de determinaciones independientes utilizando SIA y el valor certificado de los materiales de referencia, el resultado se muestra en la Tabla 3 mediante el cálculo del porcentaje de recuperación aparente (%R). El %R se calculó realizando el cociente entre el valor obtenido utilizando el método SIA y el valor de referencia certificado. El resultado de la prueba indicó que los resultados obtenidos por el método en flujo no difieren significativamente del obtenido utilizando el método de referencia ni del valor certificado.

La diferencia entre los resultados obtenidos mediante los métodos en flujo propuestos y el método de referencia AOAC 985.35, en general menores al 10%, se consideraron aceptables para la aplicación al control de calidad de la producción.

Tabla 3: Estudio de exactitud del método propuesto

Muestra	Material de referencia leche descremada (NIST 1549 - Non-Fat Milk Powder). Valor certificado: 4.61 ± 0.22 mg/100g Concentración mg/100 g (base seca)				Material de referencia Fórmula Infantil (NIST 1846 - Infant Formula) Valor certificado: 6.00 ± 0.32 mg/100 g Concentración mg/100 g (base seca)			
	SIA	AAS	Cociente SIA/AAS	% R SIA	SIA	AAS	Cociente SIA/AAS	% R SIA
1	4.447	4.417	1.01	96.5	6.12	6.25	0.98	102.0
2	4.812	4.679	1.03	104.4	5.92	6.01	0.99	98.7
3	4.728	4.652	1.02	102.6	5.90	6.39	0.92	98.3
4	4.671	4.726	0.99	101.3	6.22	6.70	0.93	103.7
5	5.031	4.819	1.04	109.1	5.66	5.58	1.01	94.3
6	4.588	4.570	1.00	99.5				

CONCLUSIONES

Se diseñó y optimizó un sistema SIA para la determinación de zinc en leche vacuna en polvo y fórmulas infantiles. El mismo resultó exacto y eficiente para dicha determinación. El método propuesto arrojó resultados equivalentes a los obtenidos mediante el método actual de referencia (AAS) con mayor productividad, menor costo y menor generación de efluentes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA) por el apoyo económico y a Carolina Pioda por su colaboración en las determinaciones de zinc mediante absorción atómica de llama.

REFERENCIAS

- Bueno M.P. (Ed.). (1996); Official Methods of Analysis of AOAC International. Method 985.35. *Minerals in Ready-to-Feed Milk-Based. Infant Formula and Pet Food*. p 14 (Capítulo 50). AOAC International, Maryland, USA.
- Cadore, S. (1986); *Estudo da Determinação Espectrofotométrica de Zinco e Cobre com Zincon em Sistemas de Análise por Injeção em Fluxo*. Tese de Mestrado. pp. 19-22 Campinas: Unicamp. Disponible desde: <http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/ficha7076.htm>. Acceso 2 de febrero 2011.
- Chiao-Yu, H.; Jiang, S. (2002); *Determination of Cr, Zn, Cd, and Pb in milk powder by slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry: 17, 688-692.
- Ferrer, R. de; Weisstaub, P.A.; López, N.; Ceriani Cernadas, J.M. (2001); *Niveles de zinc en leche humana de término y pretérmino*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición: 51(1), 33-36.
- Lenahan, C.E.; Barnett, N.W.; Lewis, S.W. (2002): *Sequential injection analysis*, Analyst: 127, 997-1020
- Marczenko, Z.; Balcerzak, M., (2000); *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis*. Analytical Spectroscopy Library. Netherlands: Elsevier Science (pp. 466).
- Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, L.M.C.; De Jong, S.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J. (1997); *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Amsterdam: Elsevier Science B.V. (pp. 711)
- Miller, J.N.; Miller, J.C. (2002); *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 4ª ed. Madrid. Prentice-Hall. (pp.43).
- Nóbrega, J.A.; Gélinas, Y.; Krushevska, A.; Barnes, R.M. (1997); *Direct Determination of Major and Trace Elements in Milk by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission and Mass Spectrometry*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry: 12, 1243-1246.
- Richter, P.; Toral, M.I.; Castro, H. (2002); *Solid Phase Spectrophotometric Determination of Copper in Water by Using Immobilized Zincon in a Sephadex A25 Resin*. Analytical Letters: 35(4), 635-646.
- Richter, P.; Toral, M.I.; Tapia, A.E.; Fuenzalida, E. (1997); *Flow Injection Photometric Determination of Zinc and Copper With Zincon Based on the Variation of the Stability of the Complexes With pH*. The Analyst: 122, 1045-1048.
- Ruedas-Rama, M.J.; Ruiz-Medina, A.; Molina-Diaz, A. (2005); *Resolution of Biparametric Mixtures Using Bead Injection Spectroscopic Flow-through Renewable Surface Sensors*. Analytical Sciences: 21, 1079-1084.
- Ruzicka, J.; Marshall, G.D. (1990); *Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays*. Anal. Chim. Acta: 237, 329-343.
- Shpigun, L.K.; Shushenachev, P.M.; Kamilova, P.M. (2006); *Kinetic separation in flow injection spectrophotometry: Simultaneous determination of copper and zinc in a single run*. Analytica Chimica Acta: 573-574, 360-365.
- Soares da Silva, E. (2003); Zinco. En De Azeredo, F.A. y Da Matta Chasin, A.A. (Ed.). *Metais, Gerenciamento da Toxicidade* (pp. 187-201). San Pablo: Editora Atheneu.
- Van Staden, J.F.; Tlowana, S.I. (2002); *On-line separation, simultaneous dilution and spectrophotometric determination of zinc in fertilisers with a sequential injection system and xylenol orange as complexing agent*. Talanta: 58, 1115-1122.