

Valores de zinc en el pelo en una muestra no seleccionada de niños y adolescentes sanos

Por los Dres.:

MANUEL AMADOR*, ALINA GONZÁLEZ** y MIRTA HERMELO***

Amador M. et al. *Valores de zinc en el pelo en una muestra no seleccionada de niños y adolescentes sanos*. Rev. Cub. Ped. 45: 4, 5, 6, 1973.

Se estudia la concentración de zinc en el pelo de 241 niños y adolescentes normales comprendidos entre 0 y 14 años de edad. Se obtuvo el pelo, de la región de la nuca, y fue procesado siguiendo una modificación del método de Strain. La lectura se hizo por espectrofotometría de absorción atómica. Se destaca que los valores obtenidos fueron algo más elevados que los reportados en la literatura y tuvieron la peculiaridad de corresponderse sus cifras medias más elevadas con los periodos de mayor crecimiento en el niño. Sin embargo, no se halló, aplicando al test de F, diferencia significativa entre los grupos etarios, exceptuando el de 3-5 años con el de 12-14, donde los valores mayores correspondieron al último grupo ($209, 19 \pm 53, 14$ y $244, 08 \pm 67, 14 \mu\text{g/g}$ respectivamente). Se analiza que por coincidir el perfil de los valores medios de zinc en el pelo con el que dibujan los incrementos de peso anual en el periodo de la vida estudiado, se plantea la hipótesis de que la concentración de zinc en el pelo, refleja el desarrollo de la masa tisular, más que el crecimiento longitudinal del individuo. Se concluye que la modificación impuesta al método de procesamiento de la muestra, que lo simplifica y abarata, sin afectar su exactitud, precisión y reproducibilidad, permite su aplicación para el estudio, en el terreno, de los trastornos nutricionales del crecimiento.

INTRODUCCION

El zinc es, entre los elementos traza presentes en el organismo, uno de los que actualmente reciben mayor atención por investigadores de todo el mundo.

Muchas enzimas esenciales han sido hoy identificadas como zinc-proteínas, siendo la primera, de todas las descritas, la anhidrasa carbónica,¹¹ seguida de la fosfatasa alcalina y de las deshidrogenasas alcohólicas.^{14,37}

También el zinc se reconoce como factor limitante en la síntesis proteica y de DNA en cultivos microbiológicos,⁴⁰

sabiéndose que juega un importante rol en el crecimiento de muchos animales.^{16,33,34}

De hecho, existen observaciones que se remontan a fines del siglo pasado e inicios del actual sobre la participación de este metal en el crecimiento de distintas especies vegetales.^{5,22,28}

Su importancia en patología humana comenzó a reconocerse al describir Prasad,¹⁸ en 1961, once iraníes adultos del sexo masculino con un síndrome caracterizado por anemia ferripriva, hepatoesplenomegalia, baja talla y marcado hipogonadismo. Dos años después, en Egipto, Prasad y Miale,^{19,20} encontraron que un grupo de pacientes, con cuadro clínico similar, tenían deficiencia de zinc en el plasma. El hipogonadismo y la baja talla han sido relacionados al déficit de zinc, al apreciarse mejoría en el cuadro clínico después de una suplementación dietética con sales de este metal.^{10,21}

* Jefe del Servicio de Nutrición. Hospital Pediátrico Docente "William Soler". Ave. San Francisco 10 112, Habana 8, Cuba.

** Jefa del Laboratorio de Espectroscopia. Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Universidad de La Habana, Habana 16, Cuba.

*** Bioquímica Clínica. Laboratorio de Bioquímica Clínica Centro Nacional de Investigaciones Científicas. Universidad de La Habana, Habana 16, Cuba.

Han sido descritas diversas patologías donde se han reportado bajos niveles de zinc plasmático, tales como el kwashiorkor;²⁰ la diabetes mellitus;⁷ la cirrosis y otras hepatopatías,^{9,35,36} hallazgos no confirmados por otros autores. También se ha descrito esta disminución de los niveles de zinc en algunas afecciones malignas.^{2,4,32,38}

Todos los reportes anteriores se refieren a niveles de zinc plasmático o sérico.^{18,26,37,40,41} La observación de que en puercos con déficit de zinc, esta carencia se reflejaba en una disminución del contenido de zinc en el pelo y en el hueso,^{11,14,34,36,40} con más fidelidad que en el plasma,¹³ llevó a Strain en 1966³⁰ a estudiar el pelo de los pacientes reportados en Egipto, por Prasad, antes y después de la dieta suplementada, encontrando que el análisis del pelo permite un método confiable, atraumático y simple para evaluar las reservas de zinc del organismo.

En 1970, Klevay¹² realizó un estudio en la población de Panamá, demostrando que el pelo puede usarse como material de biopsia para estudiar el estado de las reservas de zinc en un individuo.

La finalidad de este trabajo es determinar las concentraciones de zinc en el pelo de niños normales, de nuestra población, con el propósito de utilizar estos valores como punto de referencia en el estudio de las reservas de zinc en algunas patologías que afectan el crecimiento y desarrollo.

MATERIAL Y METODO

Se obtuvieron muestras de pelo de niños comprendidos entre 0 y 10 años de edad que acudieron durante tres días consecutivos a una peluquería infantil, y de adolescentes de 11 a 14 años, internos en una escuela secundaria básica de La Habana escogidos al azar. Se de-

secharon aquellos niños que referían ser portadores de enfermedades crónicas que pudieran influir sobre el crecimiento.

El pelo se obtuvo de la región de la nuca, previo lavado y enjuague con agua abundante.

La determinación de zinc se llevó a cabo en muestras de 0,1 a 0,5 g de pelo. Estas muestras antes de ser procesadas fueron lavadas con éter etílico hasta la total eliminación de todo vestigio de suciedad o grasa, secándose después al aire.

Posteriormente el pelo fue pesado en balanza analítica, llevándose a una mufla, a 450°C durante 2 horas. Una vez fría, se le añade a la muestra 1 ml de HNO₃ 1:1 evaporándose en baño de agua, manteniéndose durante una hora en la mufla a 450°C. Las cenizas así obtenidas, se hirvieron durante 2 ó 3 minutos con HCl 2N, filtrándose y enrasándose una vez frías a 25 ó 50 ml, de acuerdo con el peso inicial. Se hicieron pruebas que demostraron la notable precisión y exactitud de este método (Cuadros I y II), que es una modificación del reportado por Strain.³⁰

La lectura se llevó a cabo en un espectrofotómetro de absorción atómica Unicam 900-A, usando una mezcla de aire y acetileno en la línea 213,9 mμ del zinc.³⁹

El agua usada para las diluciones y el lavado de la cristalería, fue destilada y deionizada en una columna de resina mixta.

La curva patrón se hizo con soluciones patrones preparadas con metal de alta pureza (Spectrographically Standardised Zinc rod of the Johnson Matthey Chemicals, Limited).

Los niños fueron clasificados en cinco grupos de edades que comprendían tres

CUADRO I
ZINC EN PELO RECOBRADO (PPM)

Pelo solo	Pelo + 1 ppm de Zn.	Pelo + 1,5 ppm de Zn.	Pelo + 2 ppm de Zn
Nº 28 - 1,32	2,36	2,78	3,05
1,30	2,36	2,78	3,05
1,30	2,20	2,78	3,15
1,35	—	—	—
1,32	—	—	—
1,30	—	—	—
1,20	—	—	—
1,30	—	—	—
1,50	—	—	—
1,30	—	—	—
$\bar{X} = 1,32$	2,30	2,78	3,08
1 D.S. = 0,074			
% recobrado	99,10	98,50	90,50

CUADRO II
ZINC EN PELO RECOBRADO (PPM)

Pelo solo	Pelo + 1 ppm de Zn.	Pelo + 1,5 ppm de Zn.	Pelo + 2 ppm de Zn.
Nº 183 - 2,90	3,90	—	—
2,90	3,80	—	—
3,18	4,10	—	—
$\bar{X} = 2,99$	3,93	—	—
1 D.S. = 0,16			
% recobrado	98,4	—	—

años cada uno (0-2; 3-5; 6-8; 9-11; y 12-14).

Los valores de la concentración de zinc en el pelo fueron expresados en partes por millón ($\mu\text{g/g}$) de pelo.

Los resultados obtenidos para cada grupo etario fueron procesados estadísticamente por medio de un análisis de varianza completamente aleatorizado con superposición de los intervalos de confianza de las medias.²⁷

RESULTADOS

Se analizaron 245 muestras. De ellas, fueron eliminadas, mediante el método de los errores groseros, 4 valores extremos que no pertenecen a la misma población que el resto.

En el Cuadro III se puede apreciar la distribución por grupos de edades de los 241 niños objeto de este estudio. Analizando los estadígrafos en el propio cuadro referido, y comparando los valores de la concentración de zinc en el pelo de los diferentes grupos de edades a través del test de comparación de medias,²⁷ se observa que:

Existen diferencias significativas entre los siguientes grupos de edades:

0-2 años con 3-5
($p < 0,05$) donde $0-2 > 3-5$

3-5 años con 12-14
($p < 0,01$) donde $12-14 > 3-5$

6-8 años con 12-14
($p < 0,05$) donde $12-14 > 6-8$

9-11 años con 12-14
($p < 0,05$) donde $12-14 > 9-11$

Los valores más altos, como puede apreciarse, están en los dos grupos de edades extremos, no habiendo diferencias significativas entre ambos.

Estudiando estos mismos datos por un análisis de varianza completamente aleatorizado, por ser la F un test mucho más preciso, obtuvimos que sólo existen diferencias significativas entre el grupo de 3-5 años y el de 12-14 años, donde $12-14 > 3-5$, ($p < 0,05$).

CUADRO III

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS VALORES DE LA CONCENTRACION DE ZINC EN EL PELO EN 241 NIÑOS DE 0 A 14 AÑOS, POR GRUPOS DE EDADES*

Estadígrafos	Grupo etáreo, años	0-2 años	3-5 años	6-8 años	9-11 años	12-14 años
$\bar{X}_1$		237,10	209,19	217,67	211,52	244,08
S_2		4026,55	2823,96	2743,32	2940,16	4507,78
S		63,455	53,141	52,377	54,223	67,139
CV		26,76	25,40	24,06	25,63	27,50
$S\bar{X}_1$		10,033	7,299	7,808	8,367	8,596
N		40	53	45	42	61

* La concentración de zinc está expresada en $\mu\text{g/g}$ de pelo.

DISCUSION

En nuestro trabajo debemos analizar dos aspectos distintos, pero indudablemente complementarios: el método utilizado y los resultados obtenidos. Como ya señalamos con anterioridad, el método empleado es una modificación del descrito por Strain.³⁰

En los Cuadros I y II pueden apreciarse la exactitud, precisión y reproducibilidad del mismo lo que, unido a su mayor simplicidad que permite procesar un mayor número de muestras en un día, lo hace más accesible, menos costoso y aplicable a estudios de terreno.

La obtención de la muestra de pelo es uno de los aspectos fundamentales.

Debe utilizarse pelo recién brotado y cortado al ras de la piel, ya que próximo al bulbo se encuentra la mayor concentración de zinc con actividad metabólica, pues a medida que nos alejamos de la raíz del pelo, el zinc pierde la capacidad para ser movilizado del tejido,⁸ de ahí que se recomiende obtener la muestra de la región de la nuca, donde el pelo es corto, joven y fácil de cortar al ras.

Del análisis de los resultados, podemos apreciar que los valores obtenidos por nosotros son, en términos generales, más elevados que los reportados por Klevay,¹² Strain,³⁰ Addink y Frank¹ y Reinhold y Col.,²³ aunque debe aclararse que ninguno de los autores precedentes, ni nosotros, hemos empleado los mismos métodos de procesamiento de la muestra.^{15,25,29} Eminias y Col.⁸ reportan valores algo más elevados, sobre todo en su grupo de 6 a 10 años, donde se aproximan a nuestras cifras.

También llama la atención el amplio rango de los valores en cada grupo etario reportado por los distintos autores. Esto se ha atribuido a distintos factores, tales como: sexo;^{3,12} estación del año;¹² edad;^{3,12,36,40} color del pelo;¹ procedencia urbana o rural;^{8,23} dieta,^{19,28} aunque estas mismas variaciones hacen que ninguna de estas consideraciones sean del todo concluyentes.

Podemos suponer que algunos de estos factores mencionados pueden influir en las diferencias entre los valores publicados y los nuestros. En particular, la dieta parece ser un factor determinante en los bajos niveles de zinc reportados en el Medio Oriente, atribuidos a la riqueza en fitatos de las dietas típicas de la región.¹⁰ Los fitatos, al unirse al catión Zn^{++} , impiden su absorción y consecuente utilización.

Es lógico plantear que, dadas las estrechas relaciones del zinc con el crecimiento de plantas, animales y humanos, exista, durante las etapas de la vida en que el ritmo de crecimiento es más activo, una mayor concentración de zinc en los tejidos, lo cual ya parece confirmarlo el trabajo de Klevay¹² donde los valores más elevados de zinc en el pelo fueron hallados en los grupos de 0 a 5 años y de 16 a 20, experimentando una declinación en la edad adulta.

En el presente trabajo, donde hemos agrupado a los niños en periodos de edades más pequeños (de tres años solamente), se perfila con más claridad lo anteriormente expuesto.

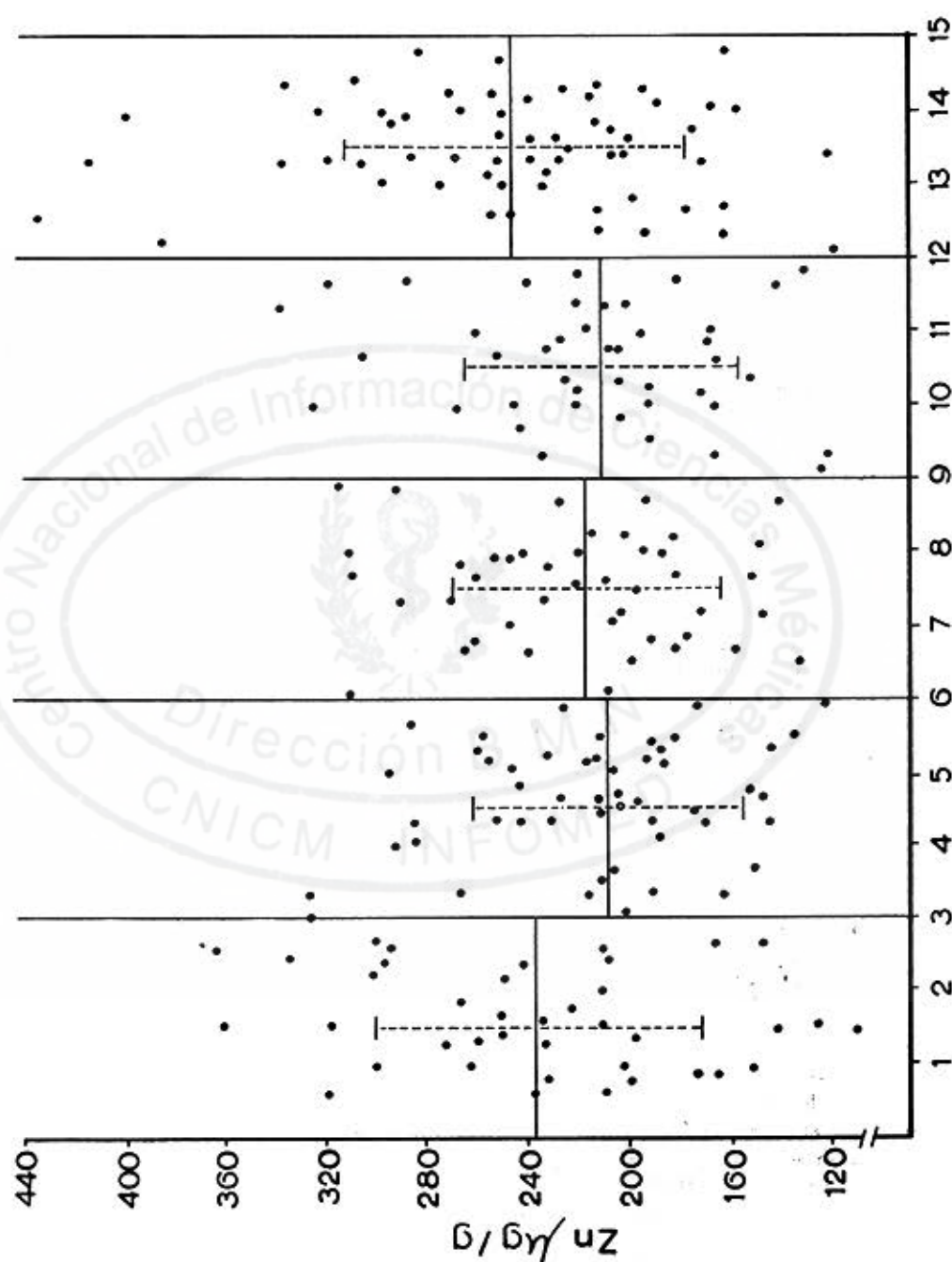
Los valores medios en los dos grupos extremos son los más elevados y no difieren significativamente entre sí. En el grupo de 3-5 años las cifras caen a su valor más bajo, manteniéndose a ese nivel hasta los 12 años en que vuelven a elevarse.

Si comparamos la curva de estos valores medios con histogramas donde se represente el incremento anual de talla y peso, desde el 1º hasta el 15º año de acuerdo a las tablas de Stuart y Meredith,³¹ veremos que dibujan un perfil semejante (gráficos 1, 2 y 3). La mayor coincidencia se verá con el gráfico de incrementos de peso.

Esta superposición del perfil de los valores medios de zinc en el pelo con la curva de incrementos de peso anual, nos lleva a plantear la hipótesis que la concentración de zinc en el pelo pudiera estar en relación más estrecha con los incrementos de masa tisular, que con el crecimiento longitudinal del individuo.

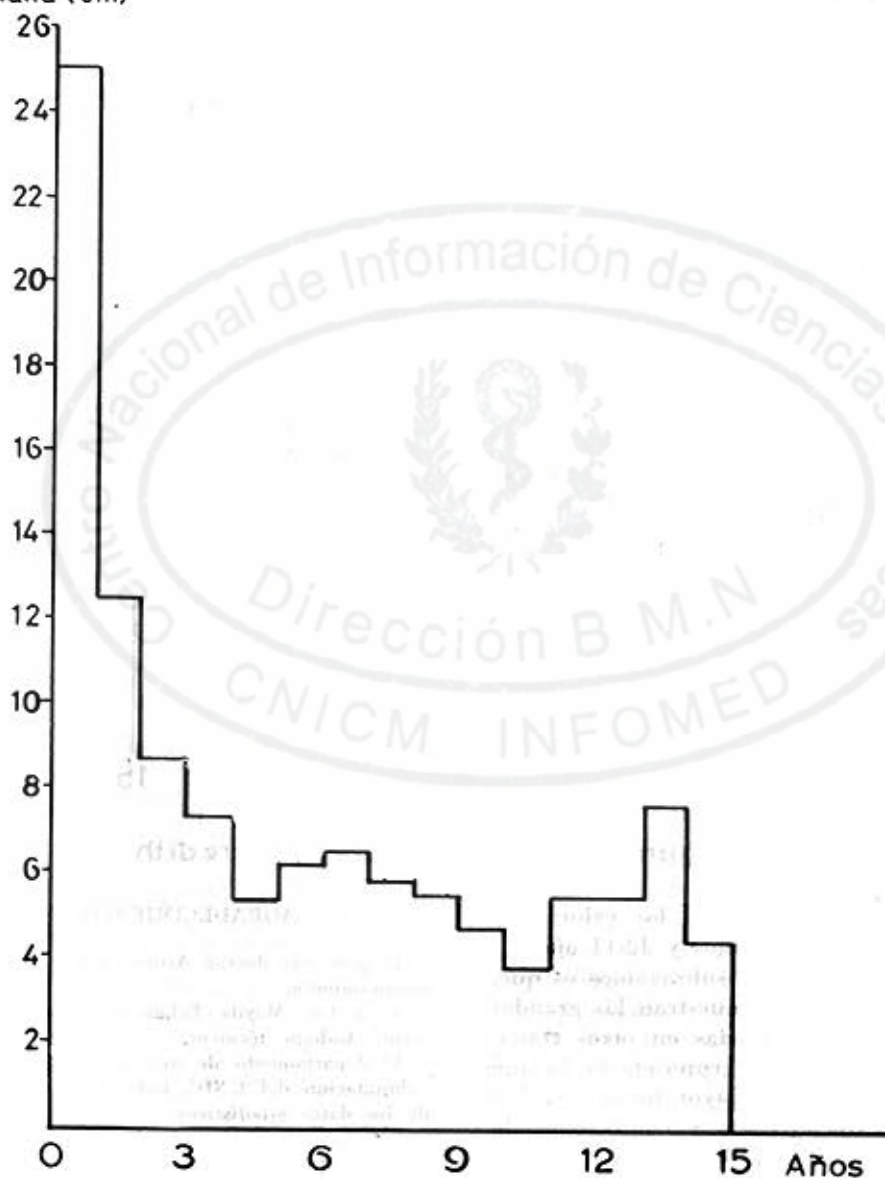
Sin embargo, debe aclararse que, si bien el hecho referido es cierto, sólo se han detectado, por los métodos estadísticos más precisos (test de F), diferen-

GRÁFICA Nº I
CONCENTRACIÓN DE ZINC EN EL PELO EN 241 NIÑOS
NORMALES DE 0 A 14 AÑOS



Gráfica Nº 2
INCREMENTOS DE TALLA ANUALES DE NIÑOS
DE 0 A 15 AÑOS +

Incrementos en
talla (cm)

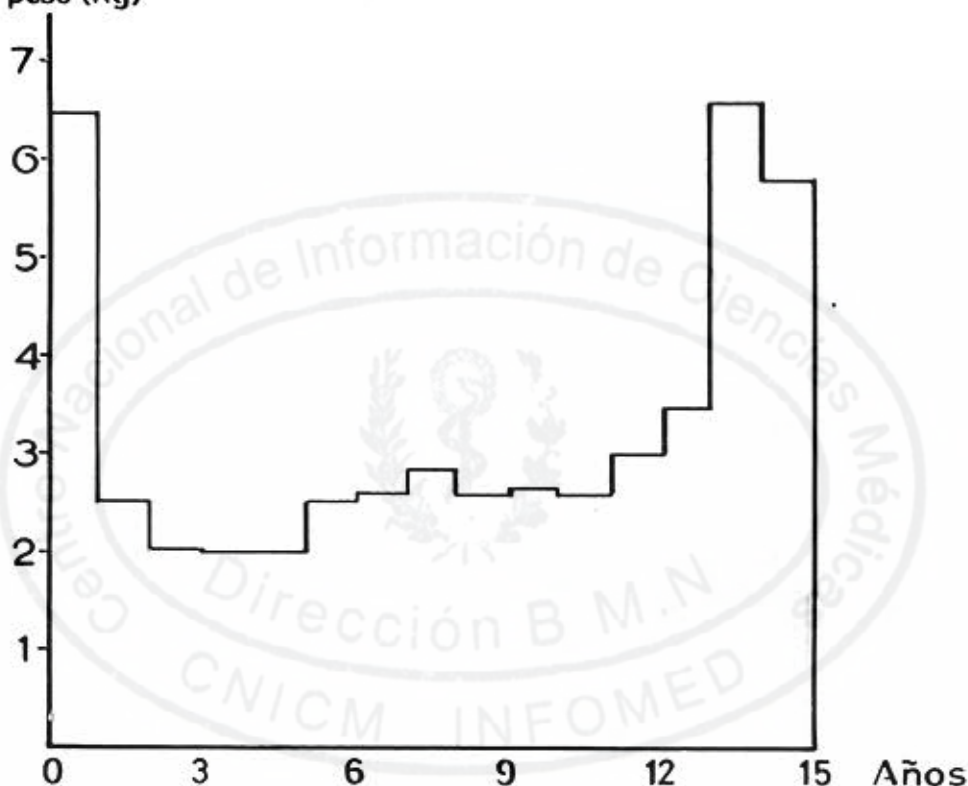


+ Varones, según tablas de Stuart y Meredith.

Gráfica Nº 3

INCREMENTOS DE PESO ANUALES EN NIÑOS DE 0 A 15 AÑOS +

Incrementos de peso (Kg)



+ Varones, según tablas de Stuart y Meredith

cias significativas entre los valores de los grupos de 3-5 años y 12-14 años.

Otro aspecto que subrayamos es que, nuestras cifras no muestran las grandes oscilaciones reportadas en otros trabajos para un mismo grupo etario, lo que atribuimos a una mayor homogeneidad en las características y condiciones de nuestra muestra y de la estabilidad de factores que pudieran haber influido sobre los resultados.

AGRADECIMIENTO

Al profesor, doctor Arturo Amaral, por su asesoramiento.

A la Co. Mayda Echevarría, por su eficiente trabajo técnico.

Al departamento de matemática aplicada y computación del CNIC, por el procesamiento de los datos estadísticos.

A la administración de la peluquería infantil "Ismaelillo" y a la dirección de la escuela secundaria básica "Manuel Bisbé" por su colaboración en la obtención de las muestras.

SUMMARY

Amador M. et al. Zinc values in a non-selected hair sample from healthy children and adolescents. Rev. Cub. Ped. 45: 4, 5, 6, 1973.

A study is made of hair zinc concentration in 241 healthy male children and adolescents between 0 and 14 years of age.

Hair samples were taken from the nape and processed according to modified Strain's method. Reading was performed by atomic absorption spectrophotometry. Values obtained were somewhat higher than those reported in foreign literature. The highest mean figures correspond with periods of increased growth in pediatric age. Nevertheless, according to F test, no significant differences were found among age groups except 3-5 years versus 12-14 years ($209, 19 \pm 53, 14$ and $244, 08 \pm 67, 14$ $\mu\text{g/g}$ respectively). As a coincidence was found between mean zinc values outline and annual weight increase, the hypothesis that hair zinc concentration reflects more closely tissue mass increase than longitudinal growth is proposed. Modification of sample processing makes it simpler and cheaper, without affectation of its accuracy, exactness and reproductiveness, allowing its application for field studies of nutritional growth disorders.

RESUME

Amador M. et al. Valeurs du zinc dans un exemple non sélectionné des cheveux d'enfant et adolescents sains. Rev. Cub. Ped. 12: 4, 5, 6, 1973.

Les auteurs étudient la concentration de zinc dans les cheveux de 241 enfants et adolescents normaux, âgés de 0 à 14 ans. Ils obtiennent le cheveu de la nuque et l'élaborent suivant la méthode de Strain. La lecture est menée à bien avec le spectrophotomètre d'absorption atomique. Il faut tenir compte de ces valeurs obtenues qu'ont été plus élevées que celles de la littérature; les chiffres moyennes ont eu la particularité d'être en rapport direct avec les périodes de croissance chez l'enfant, mais cependant on n'a pas trouvé des différences remarquables en appliquant le test F entre les groupes d'âges, sauf ceux de 3 à 5 ans et de 12 à 14 ans dont les valeurs les plus élevées appartenaient au dernier groupe ($209, 19 \pm 53, 14$ et $244, 08 \pm 67, 14$ $\mu\text{g/g}$). Ils analysent que la courbe des valeurs moyennes de zinc, du cheveu coïncide avec celle qui représente les élévations du poids annuelle. Ils présentent l'hypothèse de la concentration de zinc dans les cheveux, qui reflète le développement de la masse tissulaire, plus que l'accroissement longitudinal de l'individu. On conclut que la modification imposée, simplifiée et rend moins cher le méthode d'élaboration de l'échantillon et n'altère pas son précision et productivité, ce qui permet son application.

РЕЗЮМЕ

Амадор М., и др. Величины цинка в волосе у неподобранной группы здоровых детей и подростков. Rev. Cub. Ped. 45: 4-5-6, 1973.

Проводится изучение концентрации цинка в волосе у 241 ребенка и подростка, находящихся в нормальном состоянии в возрасте 0-14 лет. Волосы взяты из области затылка и обрабатывались модифицированным методом Стрейна. Показания получались путем спектрофотометрии атомной абсорбции. Отмечается, что полученные величины были несколько выше указанных в литературных сообщениях. Наблюдалась особенность, что наиболее высокие средние величины соответствовали периодам наибольшего роста у детей. Однако, при использовании теста не наблюдалось значительной разницы между возрастными группами, за исключением группы 3-5 лет по отношению к группе 12-14 лет. В этом случае наибольшие величины отнеслись к последней группе ($209,19 \pm 53,14$ и $244,08 \pm 67,14$ г/г соответственно). Так как профиль средних величин цинка совпадает с соответствующим ростом и увеличению веса в изученном периоде жизни, ставится гипотеза о том, что концентрация цинка в волосах отражает развитие тканевой массы больше, чем продольный рост человека. В заключение отмечается, что модификация метода обработки образца, которая делает его проще и дешевле и не влияет на годность, позволяет применение на практике данного метода для изучения расстройств питания в период роста.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Addink, N. W. H.; Frank, L. J. P. Zinc content of hair from the head of carcinoma patients. *Nature (London)* 193: 1190, 1962.
- 2.—Alexander, F. W.; Delves, H. T.; Loy, H. Plasma copper and zinc in acute leukemia. Spring meeting —Pediatric Research Society (march 1972). *Arch. Dis. Childh.* 47: 671, 1972.
- 3.—Anke, M.; Schneider, H. Untersuchungen über den Mineralstoffgehalt der frauen und männerhaare. *Deut. Z. Verdauungs-Stoffwechselerkrankh.* 22: 31, 1962.
- 4.—Auerbach, S. Zinc content of plasma, blood and erythrocytes in normal subjects and in patients with Hodgkin's disease and various hematologic disorders. *J. Lab. Clin. Med.* 65: 628, 1965.
- 5.—Bertrand, G.; Javillier, M. Influence du zinc et du manganèse sur la composition minérale de l'*Aspergillus niger*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 152: 1337, 1911.
- 6.—David, D. J. The determination of zinc and other elements in plants by atomic absorption spectroscopy. *Analyst*, 83: 655, 1958.
- 7.—Davies, I. J. T.; Musa, M.; Dormandy, T. L. Measurements of plasma zinc. *J. Clin. Path.* 21: 359, 1968.
- 8.—Eminians, J.; Reinhold, J. G.; Kfoury, G. A.; Amirhakim, G. H.; Sharif, H.; Ziai, M. Zinc Nutrition of children in Fars province of Iran. *Amer. J. Clin. Nutr.* 20: 734, 1967.
- 9.—Halsted, J. A.; Hackley, B.; Rudzki, C.; Smith, J. C. Plasma zinc concentration in liver diseases. *Gastroenterology*, 54: 1098, 1968.
- 10.—Halsted, J. A.; Ronaghy, H. A.; Abadi, P.; Haghshenas, M.; Amirhakimi, G. H.; Barakat, R. M.; Reinhold, J. G. Zinc deficiency in man: The Shiraz Experiment. *Amer. J. Med.* 53: 277, 1972.
- 11.—Keilin, D.; Mann, T. Carbonic Anhydrase. *Nature (London)* 144: 442, 1939.
- 12.—Klevay, L. M. Hair as a biopsy material. I—Assessment of zinc nutriture. *Amer. J. Clin. Nutr.* 23: 284, 1970.
- 13.—Lewis, P. K. Jr.; Hoekstra, W. O.; Grummer, R. H. Restricted calcium feeding versus zinc supplementation for the control of parakeratosis in swine. *J. Animal Sci.* 16: 578, 1957.
- 14.—Mathies, J. C. Preparation and properties of highly purified alkaline phosphatase from swine kidneys. *J. Biol. Chem.* 233: 1121, 1958.
- 15.—Miller, W. J.; Powell, G. W.; Pitts, W. J.; Perkins, H. F. Factors affecting zinc content of bovine hair. *J. Dairy Sci.* 48: 1091, 1965.
- 16.—Ott, E. A.; Smith, W. H.; Stob, M.; Beeson, W. M. Zinc deficiency syndrome in the young lamb. *J. Nutr.* 82: 41, 1964.
- 17.—Petering, H. G.; Yeager, D. W. Zinc, copper, cadmium and lead content of hair of a sample of U.S. urban population. *Proc. Western Hemisphere Nutr. Congr.* II: 1969, p.38.
- 18.—Prasad, A. S.; Halsted, J. A.; Nadimi, M. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Amer. J. Med.* 31: 532, 1961.
- 19.—Prasad, A. S.; Miale, A. Jr.; Farid, Z.; Sandstead, H.; Schulert, A. R.; Darby, W. J. Biochemical studies on dwarfism, hypogonadism and anemia. *Arch. Intern. Med.* 111: 407, 1963.
- 20.—Prasad, A. S.; Miale, A. Jr.; Farid, Z.; Sandstead, H.; Schulert, A. R. Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, dwarfism and hypogonadism. *J. Lab. Clin. Med.* 16: 537, 1963.
- 21.—Prasad, A. S. Metabolism of Zinc and its deficiency in human subjects. In "Zinc Metabolism". A. S. Prasad, Editor. Springfield, Charles C. Thomas 1966, pp. 250.
- 22.—Raulin, J. Etudes Cliniques sur la végétation. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Végétale*, 11: 93, 1869.
- 23.—Reinhold, J. G.; Kfoury, G. A.; Ghahambar, M. A.; Bennett, J. C. Zinc and copper concentrations in hair of Iranian villagers. *Amer. J. Clin. Nutr.* 20: 734, 1967.
- 24.—Reinhold, J. G.; Kfoury, G. A.; Thomas, T. A. Zinc, copper and iron concentrations in hair and other tissues: effects of low zinc and low protein intakes in rats. *J. Nutr.* 92: 173, 1967.
- 25.—Reinhold, J. G.; Kfoury, G. A.; Arslanian, M. Relation of zinc and calcium concentrations in hair to zinc nutrition in rats. *J. Nutr.* 96: 519, 1968.
- 26.—Sandstead, H. H.; Shukry, A. S.; Prasad, A. S.; Gabr, M. K.; Hifney, A. E.; Mokhtar, N.; Darby, W. J. Kashiorkor in Egypt. I—Clinical and biochemical studies with special reference to plasma zinc and serum lactic dehydrogenase. *Amer. J. Clin. Nutr.* 17: 15, 1965.
- 27.—Snedecor, G. W. Statistical methods. 5th. Ed. Iowa State University Press. Ames, Iowa, 1962.
- 28.—Sommer, A. I.; Limpan, C. B. Evidence on indispensable nature of zinc and boron for higher green plants. *Plant Physiol.* 1: 231, 1926.
- 29.—Sprague, S.; Slavin, W. Determination of iron, copper and zinc in blood serum by an atomic absorption method requiring

- ing only dilution. Atomic Absorption Newsletter 4228 (1965) —Perkin-Elmer Corp. Norwalk Conn.
- 30.—Strain, W. H.; Steadman, L. T.; Lankau, C. A.; Berliner, W. P.; Pories, W. J. Analysis of zinc levels in hair for the diagnosis of zinc deficiency in man. *J. Lab. Clin. Med.*, 68: 244, 1966.
 - 31.—Stuart, H. C.; Meredith, H. V. *Tratado de Pediatría de W. E. Nelson*, 5ta. Ed. en español. Edición R., La Habana, 1966.
 - 32.—Szmigielski, S.; Litwin, H. The histochemical study of zinc content in granulocytes in normal adults and in hematologic disorders. *Blood*, 25: 56, 1965.
 - 33.—Todd, W. R.; Elvehjem, C. A.; Hart, E. B. Zinc in the nutrition of the rat. *Amer. J. Physiol.*, 107: 146, 1934.
 - 34.—Underwood, E. J. *Trace Elements in animal and human nutrition*. Academic Press Inc., New York-London, 1962.
 - 35.—Vallee, B. L.; Wacker, W. E. C.; Bartholomay, A. F.; Robin, E. D. Zinc metabolism in hepatic dysfunction. I—Serum zinc concentration in Laënnec's cirrhosis and their validation by sequential analysis. *New Eng. J. Med.* 225: 403, 1956.
 - 36.—Vallee, B. L.; Wacker, W. E. C.; Bartholomay, A. F.; Hoch, F. L. Zinc metabolism in hepatic dysfunction. *New Eng. J. Med.*, 257: 1055, 1957.
 - 37.—Vallee, B. L. Biochemistry, physiology and pathology of zinc. *Physiol. Rev.*, 39: 443, 1959.
 - 38.—Vikbladh, I. Studies on zinc in blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, suppl. 2, 3: 1, 1951.
 - 39.—Walsh, A. The application of Atomic Absorption Spectra to Chemical Analysis. *Spectrochem. Acta.*, 7: 108, 1955.
 - 40.—Winder, F.; Denny, J. M. Effect of iron and zinc on nucleic acid and protein synthesis in *Mycobacterium smegmatis*. *Nature (London)*, 184: 743, 1959.
 - 41.—Wolff, H. P. Untersuchungen zur Pathophysiologie des Zinkstoffwechsels. *Klin. Wehrschr.*, 34: 410, 1956.