

OPTIMIZACION DE UN METODO COLORIMETRICO PARA LA CUANTIFICACION DE COBRE EN SUERO

Mario García,** Ileana Holst,** Karl Schosinsky*** y Rocío Rodríguez.****

Key words index: copper serum, Wilson's disease, zinc dibenzylthiocarbamate, references values.

RESUMEN

Se optimizó y adaptó un método colorimétrico para la determinación de cobre sérico con dibenzilditiocarbamato de zinc. El método presenta linealidad por lo menos hasta 400 g/dl de cobre. La recuperación promedio obtenida fue de 102%, con un intervalo de 98 a 108%. El hierro II y III, zinc, magnesio, mercurio, ácido ascórbico, calcio y plomo no producen interferencia. Por el contrario, la bilirrubina sí interfiere en la reacción, obteniéndose resultados más elevados que con el método de absorción atómica. Por esta razón, es indispensable montar un blanco de muestra con el método colorimétrico siempre que el suero esté icterico. Las precisiones para muestras con valores de cobre bajos, normales y altos mostraron coeficientes de variación de 5,78, 3,09 y 0,89% en un mismo día, y 9,02, 5,71 y 2,45% día a día respectivamente. Con una

* Laboratorio de Química Clínica. Hospital Nacional de Niños. San José, Costa Rica.

** Departamento de Análisis Clínicos. Hospital San Juan de Dios. Universidad de Costa Rica.

*** Centro de Investigación en Hemoglobinas Anormales y Trastornos Afines (CIHATA). Hospital San Juan de Dios. Universidad de Costa Rica.

**** Laboratorio Cruz Roja Costarricense.

población de 200 adultos aparentemente sanos de uno u otro sexo y utilizando el percentil 95, se obtuvieron los intervalos de referencia de cobre sérico siendo éstos en 100 hombres de 50 a 142 µg/dl y en 100 mujeres de 73 a 142 µg/dl. El método propuesto correlaciona adecuadamente con el de absorción atómica. (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1993; 14 (3, 4): 33-42).

Descriptores: cobre, enfermedad de Wilson, dibenzilditiocarbamato de zinc, valores de referencia.

INTRODUCCION

El cobre es considerado como un elemento traza esencial para el organismo (1). Su cuantificación en los diferentes tejidos y fluidos orgánicos se realiza con el fin de diagnosticar fundamentalmente la enfermedad de Wilson (EW) y evaluar la actividad en linfomas de Hodgkin (2). Aunque el defecto básico en la E.W. aún no se conoce con certeza (3), se sabe que hay una acumulación excesiva de cobre en los tejidos, principalmente en hígado, córnea, cerebro y riñón (4, 5). Los análisis de laboratorio realizados a estos pacientes en suero revelan una concentración de ceruloplasmina disminuida y una reducción del cobre total con respecto a las personas normales. Además, el cobre en la biopsia hepática se encuentra aumentado, así como la excreción urinaria de este catión (6). Un valor de cobre mayor de 250 mg/g de tejido hepático seco es diagnóstico de la enfermedad de Wilson,

siempre que una cirrosis biliar u otro síndrome colestásico queden excluidos (2).

Dentro de las metodologías utilizadas para la cuantificación de cobre se encuentran la absorción atómica (7), los métodos cinéticos (8, 9) y los colorimétricos (10, 11, 12).

Debido a la alta incidencia de esta enfermedad en Costa Rica (13) y a la importancia que tiene el análisis de cobre en su diagnóstico, se propuso optimizar (14) y adaptar el método colorimétrico de Giorgio *et al.* (15) para el análisis de este catión en suero, con el objeto de que pueda ser introducido y utilizado en los laboratorios clínicos del país. El principio del método se basa en liberar el cobre sérico de las proteínas plasmáticas. Por la acción del ácido clorhídrico concentrado, el cual reacciona con el dibenzilditiocarbamato de zinc en tetracloruro de carbono produciendo un complejo coloreado con un máximo de absorbancia a 450 nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de cobre en suero. La solución salina saturada mantiene a las proteínas precipitadas entre la fase acuosa y la orgánica.

MATERIALES Y METODOS

Obtención y preservación de la muestra: Las muestras de sangre se extrajeron por punción venosa en tubos sin anticoagulante. En un período no mayor de una hora fueron centrifugadas, y el suero obtenido se analizó de inmediato o se mantuvo en congelación a -15°C .

Equipo: Las mediciones fotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Shimadzu modelo UV 160 con cubetas de cuarzo rectangulares de 10 mm de paso de luz. Las sales utilizadas en la preparación de los reactivos se pesaron en una balanza analítica Shimadzu NL-200.

Lavado de cristalería: Toda la cristalería fue lavada y sumergida en ácido clorhídrico diluido 1:2 por 24 horas y luego enjuagada

escrupulosamente con agua desionizada.

Reactivos

1. Solución de reserva de cobre 1 g/l: disolver 3,9283 g de sulfato de cobre pentahidratado grado analítico (E. Merck Darmstad) con 1000 ml de agua desionizada en un balón aforado de 1 litro.
2. Solución patrón de cobre 200 $\mu\text{g}/\text{dl}$: verter 1,0 ml de solución de reserva de cobre (1 g/l) en un balón aforado de 500 ml y diluir hasta la marca con agua desionizada.
3. Acido clorhídrico concentrado: HCl 12,08 mol/l grado analítico (E. Merck Darmstad).
4. Solución saturada de cloruro de sodio: agregar 300 g de cloruro de sodio grado analítico (E. Merck Darmstad) en un balón aforado de 1000 ml, disolver con 500 ml de agua desionizada y diluir hasta la marca. En caso de que el cloruro de sodio se disuelva completamente adicione la cantidad necesaria para lograr sobresaturación.
5. Reactivo de color (dibenzilditiocarbamato de zinc 0,015 por ciento): agregar 0,075 g de dibenzilditiocarbamato de zinc (BDH Chemicals Ltd., Poole, England) en un balón aforado de 500 ml y disolver con 400 ml de tetracloruro de carbono, aforar y agitar. Este reactivo es estable por seis meses si se mantiene en botella ámbar a 4°C .

Procedimiento

La cuantificación de cobre sérico se llevó a cabo utilizando el siguiente método:

1. Depositar en tres tubos de ensayo con rosca previamente marcados (blanco de reactivos, patrón y muestra) 0,5 ml de agua desionizada, solución patrón de cobre 200 $\mu\text{g}/\text{dl}$ y suero respectivamente.

2. Agregar 0,1 ml de ácido clorhídrico concentrado a cada tubo, mezclar, tapar y poner en baño a ebullición por 5 minutos.
3. Añadir 0,5 ml de solución salina al 30 por ciento, mezclar y enfriar a temperatura ambiente en baño de agua a 25°C.
4. Agregar 2 ml de reactivo de tetracloruro de carbono a cada tubo y agitar en Vortex por 30 segundos exactos.
5. Centrifugar todos los tubos a 1500 rpm por 5 minutos.
6. Extraer la fase acuosa (superior) y determinar la absorbancia de la fase orgánica del patrón y de la muestra en un espectrofotómetro a 450 nm, ajustando el cero de absorbancia con el blanco de reactivos.

En los sueros ictericos, es necesario utilizar un blanco de muestra, el cual se prepara de igual manera que el procedimiento anterior pero se le añaden 2,0 ml de tetracloruro de carbono en lugar del reactivo de color. Leer contra tetracloruro de carbono y la absorbancia obtenida debe sustraerse a la de la muestra.

Cálculos:
$$Cu^{+2} (\mu g/dl) = \frac{Abs. M \times [P]}{Abs. P}$$

Abs. M = Absorbancia de la muestra
 Abs. P = Absorbancia del patrón
 [P] = Concentración del patrón de cobre en $\mu g/dl$.

En el estudio se realizaron diversos experimentos, a saber: espectro de absorción y estabilidad del producto final coloreado, intervalo analítico, respuesta del método ante diferentes volúmenes de suero, optimización del volumen de ácido clorhídrico concentrado, efecto del tiempo de calentamiento y

del tiempo de agitación, así como pruebas de recuperación, precisión e interferencia de varios componentes séricos. Con el fin de determinar la correlación y la ecuación de regresión lineal, se analizaron 30 muestras por el método del dibenzilditiocarbamato de zinc y por el método de absorción atómica (7) utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 2380 (Norwalk, Connecticut 06858, USA). Finalmente, se determinaron los valores de referencia de cobre obtenidos en una población de 200 adultos sanos de uno u otro sexo (100 hombres y 100 mujeres) para el método colorimétrico.

RESULTADOS

Espectro de absorción del producto final coloreado: Los espectros de absorción de una solución patrón de 200 $\mu g/dl$ y de una muestra de suero con una concentración similar de cobre fueron realizados en un intervalo de longitudes de onda comprendidas entre los 300 y los 650 nm. Ambas presentaron el pico máximo de absorción entre 445 y 450 nm.

Estabilidad del producto final coloreado: Se determinó el cambio en la intensidad del color final de la reacción en la solución patrón de cobre de 200 $\mu g/dl$ así como en una muestra de suero. La formación del producto coloreado es inmediata y su intensidad es constante al menos durante 30 minutos.

Intervalo analítico: La Figura 1 muestra una reacción lineal al menos hasta 400 μg de cobre por 100 ml de agua desionizada. Aún más, al variar los volúmenes de suero de 0,2 a 1,0 ml, se observó una respuesta lineal hasta una absorbancia de 0,30.

Efecto de la concentración de ácido clorhídrico: A seis tubos de ensayo con 0,5 ml de suero se agregaron diferentes volúmenes de ácido clorhídrico concentrado para

obtener concentraciones finales de ácido de 0 - 0,25 - 0,5 - 0,75 - 1,0 - 1,5 y 2,0 mol/l. El resto del procedimiento no fue modificado. Se encontró que la concentración de cobre permanece prácticamente invariable al trabajar con concentraciones de ácido clorhídrico comprendidas entre 0,5 y 2,0 mol/l. A concentraciones inferiores el precipitado proteico se mantiene en la fase orgánica y no en la acuosa, por lo que se recomienda utilizar un volumen de 0,1 ml de ácido clorhídrico concentrado.

Efecto del tiempo de calentamiento: Las muestras y la solución patrón fueron sometidas a diferentes tiempos de calentamiento en agua a ebullición: 0 - 5 - 10 - 15 y 20 minutos. Como se observa en el Cuadro 1 no existe una diferencia apreciable en las absorbancias ni en las concentraciones finales de cobre registradas para las muestras con

respecto a los datos obtenidos en las soluciones sin calentar antes de adicionar el reactivo de color. Sin embargo, en algunas muestras la separación proteica de la fase orgánica no fue completa en aquellos tubos que no se calentaron, por lo que se recomienda hervir al menos por 5 minutos.

Efecto del tiempo de agitación en la extracción de cobre: Tanto las muestras como las soluciones patrón fueron sometidas a diferentes tiempos de agitación en vortex: 0, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 segundos. Con excepción de las muestras que no se agitaron, todos los demás tiempos de agitación producen concentraciones de cobre en la muestra muy similares. Sin embargo, se observó tanto en las muestras como en los patrones un ligero aumento en las absorbancias conforme aumenta el tiempo de agitación (Cuadro 2).

CUADRO 1

EFFECTO DEL TIEMPO DE CALENTAMIENTO EN LA DETERMINACION DE COBRE

Tiempo de calentamiento (minutos)*	Absorbancia de la muestra	Absorbancia del patrón (200 µg/dl)	Concentración de cobre (µg/dl)
0	0,056	0,134	83,6
5	0,057	0,134	85,1
10	0,055	0,135	81,5
15	0,058	0,134	85,6
20	0,058	0,135	85,9

* Análisis realizado por triplicado.

CUADRO 2**EFEECTO DEL TIEMPO DE AGITACION EN LA EXTRACCION DEL COBRE**

Tiempo de calentamiento (segundos)	Absorbancia de la muestra	Absorbancia del patrón (400 µg/dl)	Concentración de cobre (µg/dl)
0	0,007	0,124	23
10	0,052	0,254	82
20	0,053	0,261	81
30	0,054	0,261	82
40	0,054	0,269	80
50	0,057	0,276	83
60	0,060	0,283	85

Recuperación: Como se observa en el Cuadro 3, la recuperación estuvo cercana al 100% para todas las concentraciones de

cobre, encontrándose el valor promedio en 102%, con un intervalo de 98 a 108%.

CUADRO 3**RECUPERACION DEL COBRE AGREGADO AL SUERO**

Cobre agregado (µg/dl)	Absorbancia	Concentración de cobre obtenido (µg/dl)	Porcentaje de recuperación
0	0,077	117	–
25	0,093	142	100
50	0,090	171	108
75	0,130	197	107
100	0,145	220	103
150	0,174	264	98
200	0,210	318	100
300	0,276	418	100
400	0,345	523	100

Porcentaje de recuperación promedio = 102%.

Especificidad analítica: El Cuadro 4 muestra que sustancias como zinc, hierro, magnesio, mercurio, ácido ascórbico, calcio y plomo; aún a concentraciones mucho mayores que las que se encuentran en condiciones patológicas, no producen interferencia con el método propuesto.

A diferencia de los elementos antes mencionados, la bilirrubina sí produce interferencia, pues en las muestras ictericas, los resultados obtenidos mediante el método espectrofotométrico propuesto son más altos que los obtenidos por el método de absorción atómica.

CUADRO 4
ESPECIFICIDAD ANALITICA

Sustancia	Concentración máxima	Interferencia
Zinc (µg/dl)	250	No
Hierro II (µg/dl)	500	No
Hierro III (µg/dl)	400	No
Magnesio (mg/dl)	10	No
Mercurio (µg/dl)	400	No
Acido ascórbico (mg/dl)	20	No
Calcio (mg/dl)	20	No
Plomo (µg/dl)	250	No

Imprecisión del método: El Cuadro 5 muestra la precisión realizada a tres lotes de suero con concentraciones bajas, interme-

dias y altas de cobre tanto en un mismo día, como día a día (20 días).

CUADRO 5
IMPRECISION DEL ANALISIS DE COBRE POR EL METODO DEL DIBENZILDITIOCARBAMATO DE ZINC

Imprecisión en un mismo día				Imprecisión día a día			
Nº de análisis	\bar{X} (µg/dl)	D.S. (µg/dl)	C.V. (%)	Nº de análisis	\bar{X} (µg/dl)	D.S. (µg/dl)	C.V. (%)
20	41,4	2,39	5,78	22	52,4	4,73	9,02
20	101,0	3,12	3,09	22	107,3	6,13	5,71
20	181,2	1,61	0,89	22	207,5	5,09	2,45

\bar{X} = promedio.
D.S. = desviación estándar.
C.V. = coeficiente de variación.

Estudio comparativo del método del dibenzilditiocarbamato de zinc con un método por absorción atómica: Se determinó que entre ambos métodos existe un coeficiente de correlación (r) de 0,98: la ecuación de regresión lineal es $y = 0,828 \cdot X + 18,2$ y el error estandar ($5 y/x$) = 7,03 $\mu\text{g/dl}$.

Valores de Referencia: Utilizando el percentil 95 (P_{95}) se determinaron los valores de referencia para cobre sérico con el método propuesto siendo éstos en hombres de 50 a 142 $\mu\text{g/dl}$ y en mujeres de 73 a 142 $\mu\text{g/dl}$.

DISCUSION

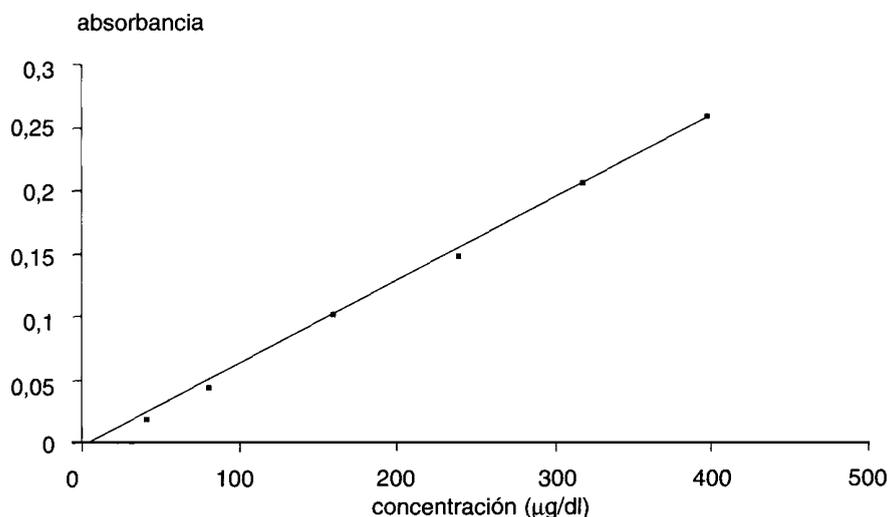
El espectro de absorción del método muestra un máximo de absorbancia a 450 nm. Este pico ofrece una sensibilidad adecuada, superior a la presentada por el método de Gubler (7). Como los espectros de absorción de la muestra y la solución patrón se traslapan, se puede concluir que el comportamiento de la reacción no es afectado por la matriz proteica del suero.

El producto final coloreado es estable al menos por media hora, tanto para el patrón como para la muestra, lo que permite realizar las lecturas en cualquier tiempo comprendido en un período de al menos 30 minutos.

El método es lineal inclusive a concentraciones de cobre de 400 $\mu\text{g/dl}$ (Figura 1). Abe *et al.* (10) proponen un método que es lineal hasta una concentración de cobre de 500 $\mu\text{g/dl}$ y el propuesto por Makino e Itoh (11) hasta al menos 300 $\mu\text{g/dl}$. A pesar que la línea se desvía ligeramente del punto de origen, no es indispensable utilizar una curva de calibración para determinar las concentraciones de las muestras, ya que las variaciones obtenidas no exceden los 4 μg de cobre por cien mililitros de suero a las concentraciones que normalmente se encuentran en sangre. La ecuación de regresión lineal y el coeficiente de correlación para esta recta es $y = 0,000663 \cdot X - 0,0087$ p.g/dl y $r = 0,9997$ respectivamente.

La Figura 1 muestra que por el método propuesto se obtiene linealidad con sueros que presenten absorbancias de al menos

Figura 1. Curva de calibración de cobre a 450 nm por el método colorimétrico.



0,30. Este valor corresponde a una concentración aproximada de 400 µg/dl de cobre. Al modificar los volúmenes de suero, la respuesta lineal se mantuvo, lo que sugiere que los componentes séricos (proteínas, electrolitos, etc.) no interfieren en la reacción de color.

Las concentraciones de HCl entre 0,5 y 2,0 mol/l no muestran variación significativa en las lecturas, lo que garantiza que 0,5 mol/l de HCl en la mezcla de reacción es suficiente para disociar el cobre unido a las proteínas. Para asegurar la liberación total del catión, recomendamos utilizar una concentración de 1 molde HCl por litro de solución acuosa. Al no añadir HCl se obtuvo una concentración de cobre de 9 µg/dl. Si se compara este valor con el obtenido al adicionar dicho reactivo (aproximadamente 90 µg/dl), representaría el 10% del valor total de la muestra que coincide con el porcentaje de cobre no unido a ceruloplasmina descrito en la literatura (16). Este hallazgo y el papel del ácido clorhídrico de liberar el cobre unido a la ceruloplasmina, sugieren que de esta manera se podría medir el "cobre lábil", no unido a la apoenzima.

Los resultados presentados en el Cuadro 1 muestran que el calentamiento no es indispensable para la liberación del cobre. El método original de Giorgio (15) recomienda este paso en la determinación de cobre en orina, lo que consideramos no es necesario. Sin embargo, en muestras de suero se prefiere el calentamiento para separar mejor la fase proteica de la orgánica. En este caso es preferible utilizar tubos con tapa de rosca. Después de añadir el reactivo de color, se debe agitar fuertemente de 10 a 40 segundos, pues como se observa en el Cuadro 2, los tiempos de agitación comprendidos en este intervalo producen resultados de concentración de cobre similares. Sin embargo, los valores de absorbancia del patrón varían en forma constante al aumentar el tiempo de agitación. Es por ello, necesario establecer un tiempo de agitación único (de 20 ó 30 segundos) para el patrón y la muestra, obteniéndose de esta manera una mayor reproducibilidad en los resultados.

El porcentaje de recuperación (Cuadro 3) para cada concentración de cobre agregada es cercano al 100% y el valor promedio resultante es de 102%. En otras técnicas se reportan porcentajes de recuperación similares. Williams *et al.* (12) describen un 95% de recuperación promedio; Abe *et al.* (10) un 98% y Makino e Itoh (11) un 101,7%.

En los experimentos realizados para determinar si otros componentes del suero causan algún efecto en la medición de cobre, se demostró que el zinc, el hierro II y III, el magnesio, el mercurio, el ácido ascórbico, el calcio y el plomo no producen interferencia en dicha determinación (Cuadro 4). Al determinar el efecto de la bilirrubina sérica se pudo constatar que cada mg/dl de bilirrubina no conjugada produce un aumento aproximado de 30 µg/dl en la concentración final de cobre. Por esta razón, debe analizarse un blanco de muestra con todos los sueros ictericos.

Los resultados de los coeficientes de variación presentados en el Cuadro 5 muestran que el método es aceptable en términos de variabilidad y que presenta mayor precisión cuando las concentraciones de cobre son altas. Abe *et al.* (10) encontraron coeficientes de variación de 1,6 y 3,3% en dos muestras que se analizaron diez veces cada una, y cuyas concentraciones eran de 103 y 72 µg/dl de cobre respectivamente. Makino e Itoh (11) reportaron coeficientes de variación de 2,79; 1,90 y 1,57% para tres muestras con concentraciones de 69,3; 106,1 y 167,1 µg/dl que se analizaron 10 veces en un mismo día, y 2,85; 2,00 y 2,16% para tres muestras con concentraciones de 68,0; 106,7 y 165,2 µg/dl que se analizaron una vez durante seis días.

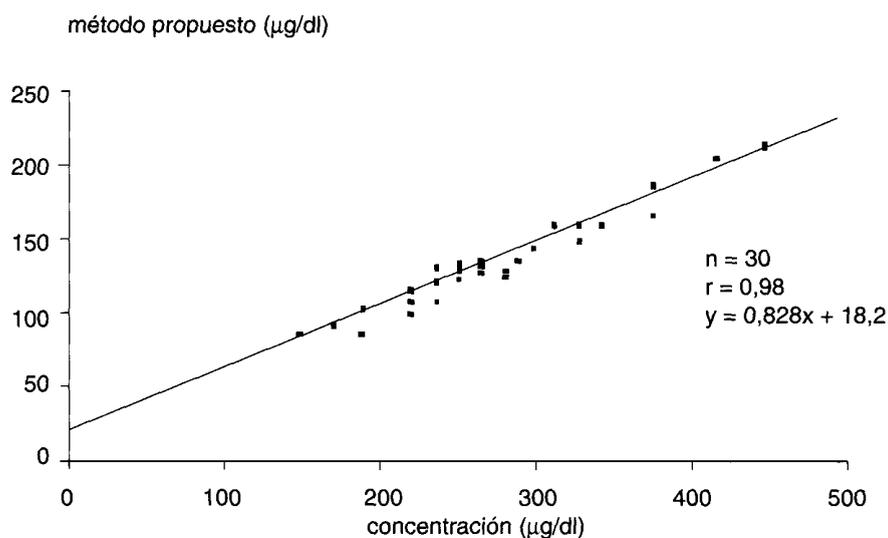
La correlación ($r = 0,98$) que presenta este método con el de absorción atómica es aceptable (Figura 2). El método tiene un error constante de +18,2 µg/dl que interactúa con otro proporcional, de 17,2%, de manera que estos errores se compensan entre sí, fundamentalmente con valores de cobre cercanos a los 100 µg/dl.

Es importante comentar las cualidades que tiene el reactivo de color utilizado en esta técnica, que aparte de ser fácil de adquirir y

preparar, es estable al menos durante 6 meses si se mantiene a 4°C. Esto, aunado a la fácil aplicación de la metodología, el equipo requerido y las características de precisión y correlación propias de la determinación, le dan las cualidades para aplicarlo en los análisis rutinarios del laboratorio clínico.

Otra de las ventajas del método estriba en que permite realizar análisis de cobre en fluidos con concentraciones muy bajas de este catión, debido a la propiedad que tiene el reactivo de color de extraer el cobre presente en soluciones acuosas. Además, esta técnica ha sido empleada (con ciertas modi-

Figura 2. Estudio comparativo del método propuesto con el de absorción atómica.



ficaciones) en la cuantificación de cobre en orina, en biopsias de tejido y aguas, obteniéndose excelentes resultados.

Los valores de referencia de cobre sérico encontrados (hombres: 50-142 $\mu\text{g/dl}$; mujeres: 73-142 $\mu\text{g/dl}$) coinciden con los reportados en la literatura (17, 18).

ABSTRACT

A colorimetric method with zinc dibenzylidithiocarbamate for the determination of copper in serum was adapted and optimized. The reaction is linear at least up to 400 $\mu\text{g/dl}$ of copper. The average recovery was 102 percent, with a range of 98 to 108 percent. Iron II, III, zinc, magnesium, mercury, ascorbic acid, calcium, and lead do not interfere.

Bilirubin was the only component that interfered in the reaction, obtaining higher values of copper than with the atomic absorption method. For this reason, it is important to prepare a sample blank when an icteric serum is analyzed by the colorimetric method. Within-run precision (C.V.) was 5,78%; 3,09% and 0,89%; and day-to-day precision was 9,02%; 5,71%, and 2,45% for samples with low, normal and high values of serum copper, respectively. The reference values for serum copper with the colorimetric method were obtained from an outpatient population of 200 apparently healthy adult individuals of either sex (50-142 $\mu\text{g/dl}$ in 100 men and 73-142 $\mu\text{g/dl}$ in 100 women). The proposed method highly correlates with the atomic absorption procedure.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. Marta Sánchez del Laboratorio de Nefrología del Hospital San Juan de Dios por su colaboración con los análisis de cobre sérico por absorción atómica; al Banco de Sangre por facilitar las muestras de suero para obtener los valores de referencia de cobre con el método colorimétrico y a los señores Miguel Chavarría Lobo y Alfredo Artavia por su invaluable ayuda en el laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. Underwood, E. J.: *Trace elements in human and animal nutrition*. 3^a ed., New York, United States: Academic Press, 1971.
2. *El Manual Merck*. 8^a ed., Barcelona, España. Ediciones Doyma, 1990: 1058-1323.
3. Reinhold, J. G.: Trace elements: a selective survey. *Clin. Chem.* 1975; 21(4): 484-487.
4. Bearn, A. G.: Wilson's disease an inborn error of metabolism with multiple manifestations. *Ann. J. Med.* 1957; 22: 747-757.
5. Scheinberg, I. H.; Sternlieb, I.: Wilson's disease. *Ann. Rev. Med.* 1965; 16: 119-134.
6. Stanbury, J. B.; Wyngaarden, J. B.; Fredrickson, D. K.; Goldstein, J. L.; Brown, M. S.: *The metabolic basis of inherited disease*. 5^a ed., New York, United States: Mc Graw -Hill Book Co., 1983: 1251 -1266.
7. Gubler, C. J.; Lahey, M. E.; Ashenbrucker, H.; Cartwright, G. E.; Wintrobe, M. M.: Studies on copper metabolism: I. A method for the determination of copper in whole blood, red blood cells and plasma. *J. Biol. Chem.* 1952; 196: 209-220.
8. Boza, F. L.; Luque, M. D.; Valcárcel. M.: Catalytic-fluorimetric determination of copper at the nanograms per millilitre level by flow injection analysis. *Analyst* 1984; 109: 333-337.
9. Rodríguez, J.; García A.; Cano-Pavon, J.: Selective spectrophotometric kinetic determination of copper with 2-methyl-1, 3-cyclohexanedionebis (4-phenyl-3-thiosemicarbazone) *Analytica Chimica Acta*. 1984; 156: 319-322.
10. Abe, A.; Yamashita, S.; Noma, A: Sensitive, direct colorimetric assay for copper in serum. *Clin. Chem.* 1989; 35(4): 552-554.
11. Makino, T.; Itoh, J. I.: A highly sensitive colorimetric determination of serum copper using a, β -, d - tetrakis (4N-trimethyla-minophenyl)-porphine. *Clinica Chimica Acta*. 1981; 111:1-8
12. Williams, H. L.; Johnson, D. J.; Haut, M. J.: Simultaneous spectrophotometry of Fe^{+2} and Cu^{+2} in serum denatured with guanidine hydrochloride. *Clin. Chem.* 1977; 23 (2): 237-240.
13. Schosinsky, K.; Vargas, M.; Esquivel, A. L.; Grant, S.; Artavia, A.; Chavarría, M.: Hallazgos de laboratorio en 61 casos de enfermedad de Wilson en Costa Rica. *Rev. Cost. Cienc. Méd.* 1989; 10 (3): 11- 21.
14. Peters, T.; Westgard, J. O.: Evaluation of Methods. En: Tietz N. W. *Textbook of Clinical Chemistry*, Philadelphia. W. B. Saunders Company; 1986: 411.
15. Giorgio, A. J.; Cartwright G. E.; Wintrobe, M. M.: Determination of urinary copper by means of direct extraction with zinc dibenzildithiocarbamate *Am. J. Clin. Pathol.* 1964; 41: 22-26.
16. Burch, R. E.; Hahn, K. J. H.; Sullivan, J. F.: Newer aspects of the roles of zinc, manganese and copper in human nutrition. *Clin. Chem.* 1975; 21(4): 512-517.
17. Henry, R.J.; Cannon, D.C.; Winkelman, J. W.: Eds. *Clinical Chemistry: Principles and Technics*. Second Edition. New York Harper and Row Publishers, Inc., 1974, pp. 702-703.
18. Tietz, N. W.: *Textbook of Clinical Chemistry*. W. B. Saunders Company Philadelphia 1986, p. 984.