

**IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DEL
HERBICIDA PARAQUAT (GRAMOXONE) EN SALIVA HUMANA A TRAVÉS DE
UNA ESCALA COLORIMÉTRICA.**

**Jorge Uzcátegui¹, Ariana Márquez¹, Dariana Erazo¹, Alí Javier Sulbarán¹, Johanna
Peña¹, Reinaldo Zambrano², Raphael Arias¹, José Luna³, Fidel Echeverría**

- 1. Laboratorio de Físico-Química Orgánica, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes.**
- 2. Grupo Multidisciplinario de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes,**
- 3. Facultad de Farmacia, Cátedra De Toxicología, Universidad de Los Andes. Mérida 5101, Venezuela.**

Correspondencia: Universidad de Los Andes, Núcleo Universitario Dr. Pedro Rincón Gutiérrez, Sector La Hechicera, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Investigación en Físicoquímica Orgánica, Teléfono 0274-2401377. Fax: 0274-2401286.

Email: jorevzca@gmail.com

RESUMEN

El presente trabajo muestra los resultados de la investigación que se realizó con el objetivo de implementar un método para determinar grados de intoxicación por herbicida gramoxone mediante una escala colorimétrica usando como medio diagnóstico saliva humana. El método colorimétrico generado propone inicialmente un tratamiento de homogenización para el fluido oral con centrifugación y agitación por vortex de las muestras de saliva. Para la generación del

complejo coloreado del paraquat, se reduce el herbicida a un estado monocatiónico usando como agente reductor una solución básica de glucosa 0,025 M. La solución azulada obtenida posee un máximo de absorción en una longitud de onda de 604 nm. El método presenta una precisión de 1,64% (CV%) y un error relativo asociado de 1,28%. El método es lineal en el intervalo de trabajo propuesto (0 mg/L y 2 mg/L) con límite de detección y cuantificación de 0,006 mg/L y 0,016 mg/L respectivamente. Para diferentes concentraciones de paraquat en saliva humana dentro del intervalo lineal de trabajo y menores al umbral de sobrevivencia, se obtienen diferentes tonalidades azuladas que hacen del método una posibilidad clínica para ser aplicado en forma periódica a individuos expuestos al uso continuo o estacional del herbicida.

PALABRAS CLAVE: gramoxone, paraquat, intoxicación, saliva humana.

**IMPLEMENTATION OF A METHOD FOR DETERMINATION OF THE
HERBICIDE GRAMOXONE (PARAQUAT) IN HUMAN SALIVA THROUGH A
COLORIMETRIC SCALE.**

ABSTRACT.

This paper presents the research results conducted with the aim of developing of a method for determine degrees of poisoning the herbicide paraquat (gramoxone) by a color scale using human saliva as diagnosing tool. The colorimetric method, initially propose an homogenization treatment for the oral fluid by centrifugation and vortex agitation. For the generation of colored paraquat complexes is necessary to reduce the herbicide to a monocationic state, using as reducing agent a basic solution of 0.025 M glucose. The bluish solution obtained has a maximum absorption at a wavelength of 604 nm. The method has a precision of 1.64% (CV%) and a relative error associated of 1.28%. The method is linear in the proposed work range (0

mg/L and 2 mg/L) with a detection and quantitation limit of 0.021 mg/L and 0.073 mg/L respectively. For different concentrations of paraquat in human saliva within the linear range of work and under the threshold for survival, we get different blue tones, that allow the possibility of the method could be applied periodically to individuals exposed to continuous or seasonal use of the herbicide.

KEYWORDS: Gramoxone, paraquat poisoning, human saliva.

INTRODUCCIÓN.

La mayoría de los herbicidas son sustancias químicas que se encargan de inhibir algún mecanismo importante para el desarrollo de las plantas, como el mecanismo fotosintético y respiratorio; o bloqueando síntesis vitales, como la síntesis de proteínas y aminoácidos. Entre los herbicidas más utilizados a nivel mundial, se encuentra el paraquat. Este es un herbicida de contacto no selectivo y no sistémico que se distribuye en el país con el nombre comercial de gramoxone. Su importancia se debe a que es uno de los plaguicidas de uso frecuente para los agricultores; y es también, uno de los que causa mayores problemas en la

salud. El paraquat es un plaguicida de alta toxicidad que puede causar envenenamiento severo y en muchos casos mortal; la persona puede verse afectada al tenerlo en contacto con la piel y es peligrosamente venenoso si es ingerido, ya que puede causar serios daños en los pulmones, riñones, cerebro, e hígado (1). Químicamente el paraquat es un catión divalente de amonio cuaternario que posee dos anillos piridílicos en su estructura. Normalmente este herbicida se presenta como sal de cloruro o como dimetilsulfato, en ambos casos soluble en agua. Durante los últimos 40 años, las propiedades únicas del paraquat lo han convertido en uno de los productos químicos agrícolas preferidos en todo

el mundo, y actualmente está en uso en más de 120 países. El paraquat como herbicida, ejerce su acción interfiriendo con el proceso de fotosíntesis; esto lo logra debido a que se convierte en su forma de radical libre por acción de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (abreviada NADP^+ en su forma oxidada y NADPH^+ en su forma reducida), presente en las plantas y reacciona con el oxígeno generando radicales superóxidos (O_2^-), los cuales son potencialmente citotóxicos (2). Las ventajas que posee el gramoxone sobre otros herbicidas son: altamente efectivo en el control de malezas y muy accesible por su bajo costo a nivel comercial. Dichas características convierten a este herbicida en un producto de uso común en el sector agrícola del país; con especial énfasis, en las zonas agrícolas del Estado Mérida, originando como consecuencia, afectación en la salud de los trabajadores del campo. La ingesta de paraquat es de las principales causas

de intoxicaciones accidentales y suicidas por plaguicidas en el estado Mérida, atendándose entre 1982 y 1999, en el Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), 190 casos en la emergencia pediátrica y de adultos. Los efectos tóxicos del paraquat en el organismo de los humanos varían según la cantidad ingerida, siendo letal en concentraciones de 35 mg por kg de peso corporal (3). El paraquat y su metabolito diquat han sido determinados por diversos métodos analíticos en diferentes matrices tales como: orina (3-9), plasma (3,5,6,10-14), suero sanguíneo (5,10,15), tejido humano (16), meconio (17) y otros materiales biológicos (18). En la presente investigación se desarrolla un kit de reactivos de fácil manejo que utiliza la saliva como matriz analítica, con el cual sea posible determinar diversos grados de concentración para la intoxicación por gramoxone en usuarios de este herbicida o cualquier

persona expuesta constantemente a este agroquímico.

METODOLOGIA

Recolección de muestras.

Las muestras fueron recolectadas por esputo sin estimulación en un envase colector de orina sellado y esterilizado. Se preservan en un baño de agua-hielo-sal para su transporte, luego se conservan en un refrigerador a una temperatura de -10°C hasta el momento de ser usada. Las muestras de saliva (19) para la implementación del método fueron obtenidas de personas aparentemente sanas, no expuestas a la aplicación de paraquat, considerándose este segmento de la población como población no expuesta. En estos casos, el volumen de saliva por muestra varía entre 15 y 30 mL.

Determinación del herbicida paraquat.

La intoxicación aguda de paraquat se puede determinar de manera sencilla mediante una prueba colorimétrica por espectrofotometría (20) que sigue el método del ditionito (21), usado para determinar en orina cuantitativamente la cantidad de paraquat y diquat absorbida. En ambos casos, si existe paraquat en la orina, la mezcla se torna de un color azulado debido a la formación de metilviologen. Una prueba similar para orina se realiza usando como reactivo reductor una solución de glucosa (20) ya que esta posee ventajas sobre el ditionito como agente reductor, en vista de que la glucosa no pierde actividad con la luz ni con el oxígeno, es más económica, no tóxica y origina mayor estabilidad del cromógeno. El complejo coloreado se evidencia después de su incubación en baño de María a 70°C . En esta investigación se sigue el método experimental desarrollado por Rai y

colaboradores (20). Las diferentes tonalidades azuladas del complejo dependen directamente de la concentración de paraquat. Las determinaciones espectrofotométricas se registraron en un equipo de espectroscopia UV-Visible, marca Perkin Elmer, modelo Lambda 2, equipado con una lámpara UVS 54.

RESULTADOS

Espectros de absorción.

Los espectros de absorción en la región UV-Vis de glucosa y paraquat no muestran máximos de absorción significativos. Por otra parte, el complejo coloreado presenta el máximo de absorción en 604 nm, siendo esta la longitud de onda de trabajo.

Construcción de la curva de calibrado para el herbicida paraquat en soluciones acuosas.

Establecimiento del intervalo lineal de trabajo.

La DL_{50} de paraquat en humanos es aproximadamente 3 a 5 mg/kg, lo cual se traduce a tan sólo 10 a 15 ml en una solución al 20% (3). Para los propósitos de este trabajo de investigación, la curva de calibrado para paraquat, se debe construir en un intervalo de concentraciones que sea mucho menor a la DL_{50} , por lo tanto se preparan soluciones acuosas de paraquat entre 0,0 mg/L (ppm) y 20,0 mg/L (ppm). Para cada solución de concentración conocida, se mide la absorbancia por triplicado. De los resultados promedio de absorbancia, se construye la correspondiente curva de calibración. La recta obtenida posee un coeficiente de correlación igual a 0,9989 indicando que existe una buena linealidad en el método.

Intervalo dinámico de trabajo.

El método es lineal en un intervalo de concentraciones amplio (0 mg/L a 20

mg/L). El intervalo dinámico de trabajo para el estudio de la determinación de intoxicación de paraquat en saliva humana se establece desde una concentración nula (paciente no intoxicado) hasta una concentración de paraquat en saliva igual a 2,00 mg/L (paciente altamente intoxicado). El valor de referencia de 2,00 mg/L se considera la concentración umbral de sobrevivencia (3).

Límite de detección y límite de cuantificación:

La desviación estándar de diez medidas del blanco es $5,68 \times 10^{-4}$. De la ecuación de la recta de la curva de calibración $y = 0,0767x + 0,0014$, se obtiene el límite de detección y el límite de cuantificación del método colorimétrico en medio acuoso, con valores de 0,021 mg/L y 0,073 mg/L respectivamente.

Repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad

La repetibilidad se obtiene realizando las medidas de la curva de calibración por triplicado, en condiciones idénticas y a intervalos de tiempo entre medidas similares lo más cortos posibles. El coeficiente de variación es menor al 5% con un valor promedio calculado de 0,541%.

Reproducibilidad

El parámetro que se varía en este caso es el tiempo de análisis. Cada solución de diferentes concentraciones de paraquat en agua, se estudia por triplicado en condiciones de análisis idénticas en periodos de tiempo distanciados de hasta veinticuatro (24) horas.

Optimización del tratamiento de las muestras de saliva.

Se usan muestras de saliva de personas no expuestas. Estas muestras se inoculan con concentraciones conocidas de paraquat para determinar

el coeficiente de variación entre las muestras tratadas. Se evaluaron experimentos con dilución, filtración al vacío, centrifugación, y agitación por vortex con centrifugación complementaria. Al realizar la homogenización de las muestras de saliva con agitación por vortex y posterior centrifugado ($n = 3$) se observa homogeneidad en las muestras y en el color de las soluciones de metilviologen. En este estudio se obtuvo un coeficiente de variación porcentual igual de 2,26%, por tanto, éste es el tratamiento elegido para la homogenización de las muestras de saliva humana para determinar paraquat por el método colorimétrico.

Resistencia y estabilidad del complejo coloreado.

En este estudio se midió la absorbancia del complejo coloreado por triplicado, de una solución inicial de paraquat de

1 mg/L por un lapso de tiempo igual a veinticuatro (24) horas para conocer la estabilidad del paraquat monocatiónico. En la tabla 1 se puede observar los valores de absorbancia obtenidos en cada caso y el coeficiente de variación entre el valor a $T=0$ y a $T=n$ ($n= 3$ h, 6 h, 9 h, 12 h y 24 h). Antes de realizar cada medida, se calienta la solución a una temperatura de 70°C por un tiempo de 1 minuto. De los datos de la tabla se deduce que el complejo azulado de paraquat es estable hasta aproximadamente tres horas de su preparación presentando un coeficiente de variación porcentual entre las medidas igual a 1,26% a $t=0$ y $t=3$ horas. Para optimizar el tiempo al cual el complejo coloreado permanece estable luego de formarse en la saliva humana se realiza el estudio de estabilidad con intervalos menores de tiempo entre intervalos definidos hasta cumplir tres horas.

Tabla 1. Estabilidad del complejo de paraquat en el tiempo. Medidas de absorbancia tomadas durante 24 horas.

Horas	Absorbancia			Abs. Promedio	Desviación Estándar	CV(%) Abs(t=0) y Abs(t=n)
t=0	0,079	0,075	0,073	0,076	3,06E-03	-
t=3	0,079	0,071	0,073	0,074	4,16E-03	1,26%
t=6	0,073	0,069	0,066	0,069	4,00E-03	6,52%
t=9	0,073	0,063	0,062	0,069	5,51E-03	6,18%
t=12	0,058	0,060	0,051	0,056	4,73E-03	20,71%
t=24	0,042	0,044	0,040	0,044	4,73E-03	37,92%

Lapso de estudio 3 horas.

En este estudio se realizaron medidas del complejo monocatiónico de paraquat en intervalos de tiempo de quince (15) minutos con la finalidad de determinar el tiempo óptimo para la lectura espectrofotométrica del mismo. De los datos de absorbancia registrados experimentalmente se obtiene que el tiempo óptimo para realizar la medida de la lectura espectrofotométrica de las

muestras oscila entre 15 minutos y 60 minutos.

Procedimiento experimental para el análisis de muestras de saliva.

1. Descongelar las muestras de saliva humana en un baño de María a temperatura ambiente;
2. Las muestras se dejan reposar por espacio de 20 a 30 minutos y se toman 5 mL del sobrenadante;
3. El blanco se prepara con 2,5 mL de la muestra de saliva, la cual se diluye con 0,6 ml de agua;
4. A

los otros 2,5 mL de la muestra se le agregan 0,6 mL de la solución de glucosa; 5. Ambas soluciones se agitan por separado en un vortex por un tiempo de 2 minutos a una velocidad de 8 unidades de vibración; 6. Las soluciones se centrifugan por un tiempo de 4 minutos a una velocidad de 4.000 rpm; 7. La solución a estudiar y el blanco se calientan en un baño de María a 70 °C por un tiempo de 1 minuto; 8. Se realiza la medida de absorbancia de la muestra a temperatura ambiente a 604 nm en un espectrofotómetro UV-Visible.

Optimización del método en muestras de saliva.

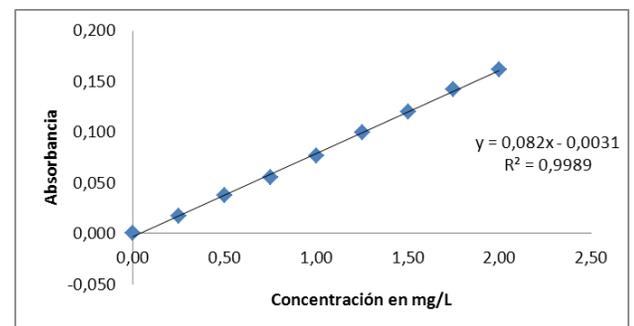
Precisión

La precisión del método se evaluó analizando repetidamente (n=10) una muestra de saliva inoculada con paraquat, bajo las mismas condiciones en un mismo día, por el mismo analista y en el mismo equipo. Los valores obtenidos de absorbancia de diez

soluciones diferentes con concentración igual a 1 mg/L poseen un coeficiente de variación de 1,64% entre las medidas.

Linealidad del método colorimétrico.

Se determinó la linealidad del método experimental realizando una curva de calibrado sencilla mediante la reducción de soluciones de paraquat en saliva a diferentes concentraciones (intervalo de 0 mg/L a 2 mg/L). Los valores de absorbancia obtenidos permiten trazar la respectiva curva de calibrado que se muestra en la figura 1. El coeficiente de correlación (R^2) obtenido por el método colorimétrico propuesto en saliva es 0,9989.

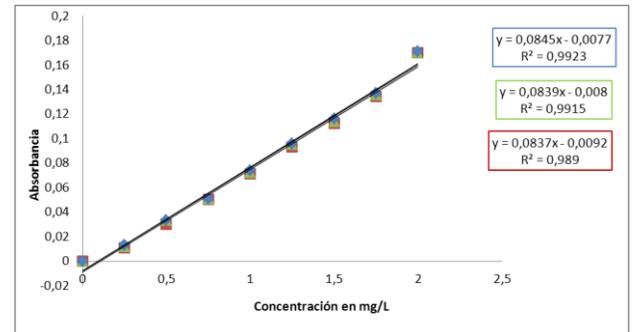


**Figura 1. Curva de calibración sencilla:
Linealidad del método colorimétrico en
saliva humana.**

**Repetibilidad y reproducibilidad del
método colorimétrico en saliva.**

Repetibilidad

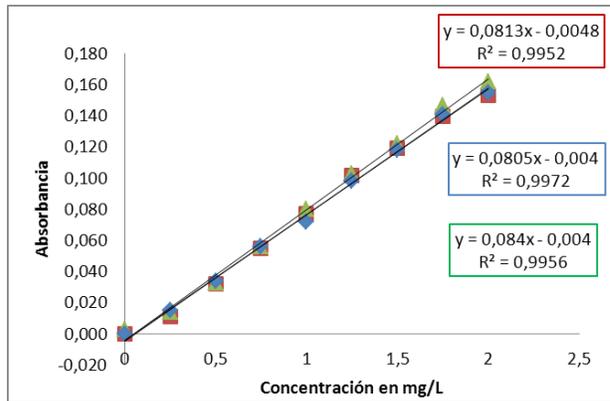
Se obtuvo mediante el análisis por triplicado de disoluciones de paraquat en saliva a diferentes concentraciones en condiciones de análisis idénticas a tiempos cortos (1 minuto) entre las medidas. De los datos obtenidos se construyen un gráfico para obtener curvas de calibrado sencillas y se compararon entre ellas. Como se observa en la figura N° 2, el coeficiente de variación entre las pendientes de las curvas es igual a 1,35%.



**Figura 2. Curvas de calibración sencilla:
Repetibilidad del método colorimétrico**

Reproducibilidad

El parámetro que se varía es el tiempo de análisis. En este caso, se realiza la preparación de las muestras cada 24 horas. Se obtuvo mediante el análisis por triplicado de disoluciones de diferentes concentraciones de paraquat en saliva en condiciones de análisis idénticas. Con los resultados de las mediciones de absorbancia se grafican las tres curvas de calibración expuestas en la figura 3. Los resultados indican que el coeficiente de variación porcentual entre sus pendientes es de 2,24%.



**Figura 3. Curvas de calibración sencilla:
Reproducibilidad del método colorimétrico**

Límite de detección y límite de cuantificación del método.

La determinación de los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) se realiza utilizando la desviación estándar de diez medidas blanco y la medida promedio de los mismos. El promedio de los blancos y la desviación estándar es igual a 0,002 y $1,4 \times 10^{-3}$ respectivamente; la ecuación de la recta generada por el estudio de

linealidad del método colorimétrico en saliva es $y = 0,082x - 0,0031$, por tanto el límite de detección es 0,006 mg/L y el límite de cuantificación es 0,016 mg/L.

Exactitud.

Experimentalmente se compararon el promedio de una serie de muestras de saliva inoculadas con paraquat (1 mg/L) con otra preparada con patrón certificado a la misma concentración. La exactitud se expresa en función del error absoluto o el error relativo. El error absoluto y el error relativo del método colorimétrico para la determinación de concentración de paraquat en saliva humana resultaron ser iguales a 0,001 y 1,28% respectivamente; indicando que el método es exacto. Los valores de la optimización del método se muestran en la tabla 2.

Tabla N° 2. Resultados de la validación del método analítico.

Parámetro analítico	Resultado
Precisión (CV%)	1,64%
Linealidad (R ²)	R ² = 0,9989 (0 mg/L a 2 mg/L)
Repetibilidad (CV%)	<5% en soluciones de concentración mayor a 0,50 mg/L
Reproducibilidad (CV%)	<5% en soluciones de concentración mayor a 0,50 mg/L
Límite de detección (mg/L)	0,006 mg/L
Límite de cuantificación (mg/L)	0,016 mg/L

Efecto matriz de la saliva en el método colorimétrico.

Se estudió el efecto matriz generado por la saliva humana sobre el método colorimétrico estudiando inicialmente el medio de reacción. Este estudio se realizó experimentalmente mediante la medición de soluciones a diversas concentraciones del herbicida paraquat (n=3) en agua y en saliva humana. Los resultados obtenidos se grafican en curvas de calibrado sencillas y se comparan sus pendientes superponiendo las rectas obtenidas en

un mismo gráfico. Las rectas obtenidas se pueden observar en la figura 4.

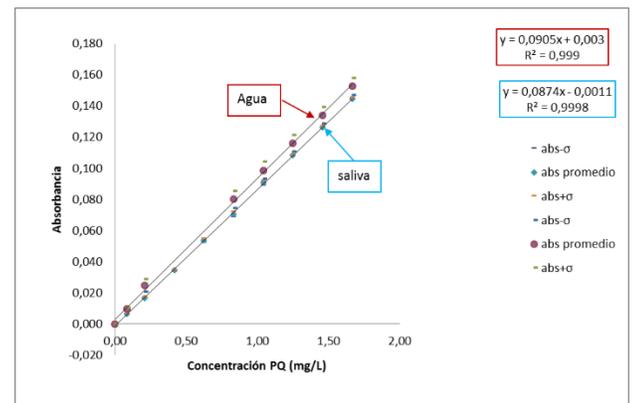


Figura 4. Efecto matriz. Comparación de curvas de calibrado sencilla del método en agua y el método optimizado en saliva.

Como se aprecia en la figura, es notable que ambas rectas poseen pendientes similares, sin embargo presentan diferencias en sus puntos de corte y en la absorbancia medida para cada concentración. De los resultados, se obtiene que el coeficiente de variación porcentual entre las pendientes de la rectas graficadas es igual a 2,46%. Este valor indica que el efecto matriz generado por el paraquat en la saliva humana comparado con el método con soluciones acuosas de paraquat no es cuantitativamente importante.

Escala colorimétrica

La obtención de la escala colorimétrica se relaciona con concentraciones definidas de paraquat en saliva, las cuales proporcionan una tonalidad en una escala de azules. La escala colorimétrica se construyó en un intervalo de concentraciones desde 0,0 mg/L hasta 2,0 mg/L. Se observa que a medida que aumenta la concentración de paraquat la tonalidad azulada se hace más intensa. Sin embargo, la diferencia entre las

tonalidades para valores sucesivos no es fácil de observar a simple vista. Es posible indicar que la coloración de las soluciones va desde el incoloro pasando por diferentes tonalidades de azul, que se tornan más intensas a medida que aumenta la concentración de paraquat en saliva. Los resultados obtenidos de la escala colorimétrica se pueden disgregar en intervalos de tonalidades que están concatenados con valores de concentración de paraquat en saliva y con las limitaciones de diferenciación visual humana. En consecuencia se puede considerar cuatro tonalidades de azul para determinar el grado de intoxicación de paraquat en saliva de un paciente en los intervalos definidos de concentración: 0,00 mg/L – 0,25 mg/L; 0,25 mg/L – 1,00 mg/L; 1,00 mg/L-1,75 mg/L; 1,75 mg/L-2,00 mg/L. Estas tonalidades se eligen por la similitud a simple vista entre el color generado para una serie consecutiva de soluciones de diferentes concentraciones de paraquat en saliva humana. La escala colorimétrica en cuestión luce de la siguiente manera:

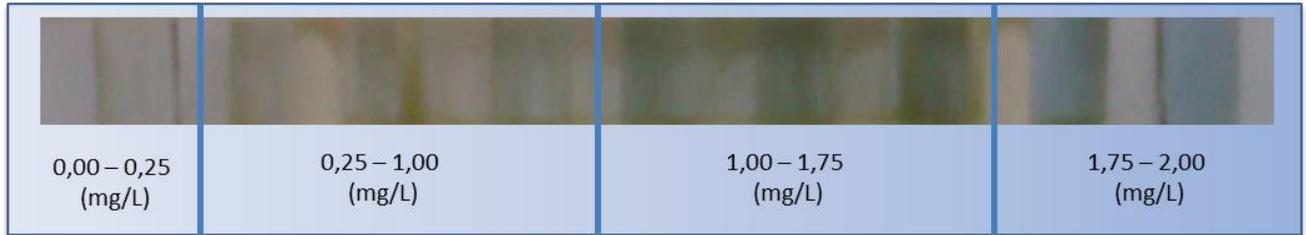


Figura 5. Escala colorimétrica.

CONCLUSION

En el presente trabajo de investigación, se ha logrado implementar un método para determinar niveles de concentración del herbicida gramoxone en saliva humana mediante una escala colorimétrica por la técnica de UV-Visible, que permite relacionar intervalos de concentraciones de paraquat en muestras de fluido oral. Las condiciones ideales para el tratamiento de las muestras de saliva para generar una muestra homogénea del complejo coloreado en saliva humana, se logran por intermedio de agitación con vortex y centrifugación. No existe efecto matriz entre el método colorimétrico en fluido biológico y su equivalente en medio acuoso. Se logra

proponer una escala colorimétrica de tonos azulados que establece diferencias entre intervalos de concentración de paraquat en saliva humana. Mediante esta escala es posible determinar grados de intoxicación semi-cuantitativos que se confirman haciendo uso de la técnica de UV-Visible. La implementación del método para determinar niveles de concentración de gramoxone en saliva humana permite monitorear con mayor frecuencia a los trabajadores del campo expuestos al herbicida en sus labores de cultivo.

REFERENCIAS

1. Bonvia, R., Sanez, V., Guitart, P., López, C., Rondon, J., Trilla, V.,

Antonin, J. Revista Clínica Veterinaria de Pequeños Animales. (3):137-158, 1991.

2. Martinez-Cayuela, M. Ars Pharmaceutica 39(1): 5-18, 1998.

3. Lanaro, R; Costa, J; Fernandez S, L; Resende, R; Tavares, M., Journal of Analytical Toxicology, 35(5): 274-279, 2011.

4. Pryde, A; Darby, F. Journal Chromatography, 115: 107-16, 1975.

5. Fuke, C; Ameno, K; Ameno, S; Kinoshita, H; Ijiri, I., Arch Toxicol, 70(8):504-7, 1996

6. Almeida, R; Yonamine, M, J Cromatogr B. 853, (1-2), 260-264, 2007.

7. Luna, J; Bernardo, L; Garcia, M; Oalles, F; Calderon, L, Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 42(2): 251-9, 2008.

8. Whitehead R; Montesano, A; Jayatilaka, N; Buckley, B; Wininik, B;

Needham, L; Barr, D, J Cromatogr B, 878(27): 2548-2553, 2010.

9. Almeida, R; Yonamine, M, Toxicology Mechanisms and Methods, 20(7): 424-427, 2010.

10. Paixao, P; Costa, P; Bugalho, T; Fidalgo C; Pereira, L., J Chromatogr B, 775(1): 109-113, 2002.

11. Brunetto, M; Morales, A; Gallignani, M; Burgera, J; Burguera, M., Talanta, 59(5): 913-921, 2003.

12. Hara, S; Sasaki, N; Takase, D; Shiotsuka, S; Ogata, K; Futagami, K; Tamura, K., Analytical Science, 23(5): 523, 2007.

13. Zhao-Hui, F; Xue-Xiang, H; Shun-Geng M., Agrochemicals, 11, 2008.

14. Zou, Y; Shi, Y; Bai, Y; Tang, J; Chen, Y; Wang, L., J Cromatogr B. 879(20): 1809 – 1812, 2011.

15. Li, C; Li X; Wang, Z; Jiang C; Peng., A. World J Emerg Med, 2(3):179-184, 2011.

16. Ito, S; Nagata, T; Kudo, K; Kimura, K, Imamura, T., Journal of Chromatography, 617(1): 119-123, 1993.

17. Posecion, N; Ostrea, E; Bielawski, M., J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 862(1-2): 93-99, 2008.

18. Fuke C, Arao T, Mprianga Y, Takaesu H, Ameno K, Miyazaki T., Leg Med, 4(3):156-63, 2002.

19. Schipper, R; Silletti E; Vingerhoeds M., Archives of Oral Biology, 52: 1114-1135, 2007.

20. Rai, K; Das, Joyce; Gupta, V., Talanta 45:343-348,1997.

21. Luna, J; Di Bernardo, M; Garcia A, M; Yanez, C; Mejias, R; Morales, A; Rodriguez, L, Ovalles, F., Retel, 13:30-42, 2007.