

## Uso de un método colorimétrico rápido para la determinación del balance nitrogenado

Anna M. Cioccia<sup>1</sup>, Daniela Carias<sup>2</sup> y Patricio Hevia<sup>3</sup>

### INTRODUCCION

La determinación de proteínas es necesaria en la estimación de los requerimientos proteicos ya sea a partir de las pérdidas obligatorias de nitrógeno o con balances de nitrógeno (1), es esencial en estudios del metabolismo proteico en humanos y en animales de experimentación y representa la base para la medición de la digestibilidad y calidad de la proteína dietaria (2). En todos estos casos, debe determinarse el contenido de nitrógeno en dietas, heces y orinas y en los animales de experimentación utilizados para medir la calidad de la proteína dietaria también puede ser necesario medir el nitrógeno corporal.

Existen muchos métodos para determinar proteínas, que permiten una rápida determinación de proteínas solubles. Sin embargo, en las muestras que nos interesan las proteínas son insolubles y el método tradicionalmente usado para determinar este tipo de proteínas en materiales biológicos es el método de Kjeldahl.

El método de Kjeldahl fue desarrollado por el químico Danés Johan Kjeldahl en 1886 y es el método oficial para la determinación del nitrógeno en diversos materiales biológicos (3). Este método consta de tres etapas: 1) Digestión: el nitrógeno de la muestra se transforma en sulfato de amonio por acción del ácido sulfúrico concentrado en caliente. 2) Destilación: se destila el amoníaco liberado después de alcalinizar con hidróxido de sodio. 3) Titulación: en donde la cantidad de amoníaco liberado se determina por titulación con ácido clorhídrico de normalidad conocida.

La gran ventaja del método Kjeldahl es que los resultados son muy precisos y reproducibles. Sin embargo tiene algunas desventajas: utiliza un equipo voluminoso, exclusivo para este uso y costoso; usa grandes cantidades de muestras y de reactivos; consume mucho tiempo. Todas estas condiciones hacen que no se pueda aplicar a un gran número de muestras, lo que limita su aplicación en estudios nutricionales como el balance nitrogenado, donde se requiere determinar tanto la ingesta de nitrógeno, como las pérdidas de nitrógeno en heces y orina (4).

Para resolver algunas desventajas del Kjeldahl se ideó el MicroKjeldahl. En este método se reduce la cantidad de reactivos y muestras, el equipo es más pequeño, pero sigue siendo específico y al igual que en el MacroKjeldahl las etapas de digestión, destilación y titulación consumen mucho tiempo, lo cual limita su uso en el análisis de muchas muestras.

En los años 70 aparecieron los bloques digestores termostatzados como el Tecator BD-29 (5), Tecator AB (6), Technicon BD-20 (7) que tienen la ventaja de aumentar la capacidad de digestión, se puede digerir un mayor número de muestras a la vez, pero la digestión sigue siendo lenta, usa tubos especiales calibrados que consumen grandes cantidades de reactivos y mantiene las etapas de destilación y titulación que representan las etapas más lentas del proceso.

Algunos autores han hecho esfuerzo para reemplazar las dos últimas etapas del Kjeldahl por la determinación colorimétrica del amonio presente en la digestión. En 1971 Shahinian y Reinhold (8) publicaron un estudio de la aplicación colorimétrica de los reactivos fenol-hipoclorito en muestras digeridas de suero y tejido humano, obteniendo resultados comparables al Kjeldahl, pero este método tiene la desventaja que utiliza tubos grandes (más de 50 ml) por lo que se consume gran cantidad de reactivos y además la digestión es igual a la del Kjeldahl y esto hace que el tiempo de digestión sea largo.

En vista de la necesidad de contar con un método alternativo al Kjeldahl aplicable a estudios nutricionales, donde se requiere analizar un gran número de muestras, en el Laboratorio de Nutrición de la Universidad Simón Bolívar se ha venido estudiando un método Colorimétrico (9). Este método Colorimétrico se basa en la medida de la intensidad del color azul formado en la reacción de Berthelot, extensamente usada para determinar amoníaco urinario (10). El amoníaco proveniente de muestras digeridas de dietas, heces, orina y cuerpo reacciona con Fenol-Hipoclorito formándose un compuesto coloreado Azul Indofenol, y se lee la absorbancia de este compuesto a 625 nm.

Las ventajas de este método Colorimétrico son las siguientes: 1) Elimina las etapas de destilación y titulación 2) Usa tubos de ensayos normales (16x150mm) que se calientan en bloques de aluminio pequeños. 3) Ahorro substancial de reactivos. 4) La digestión es rápida ya que usa ácido perclórico como oxidante. 5) No requiere equipos especiales 6) Disminuye el tiempo de análisis 6) La mayor ventaja del método colorimétrico es que permite analizar un mayor número de muestras a la vez, por lo que es ideal para estudios nutricionales como los de balance nitrogenado o evaluación de la calidad proteica por los métodos de Valor Biológico o Utilización Proteica Neta. Por todas estas ventajas lo usamos desde hace más de 15 años, tanto en estudios nutricionales como en la enseñanza de la nutrición experimental.

El método Colorimétrico (9) ha sido comparado con éxito contra el método Kjeldahl en una gran variedad de muestras y el objetivo de este trabajo es ilustrar las ventajas de este método, para ello se compararon el método Colorimétrico con el método Kjeldahl en la determinación del nitrógeno en productos alimenticios, dietas purificadas, dietas normales, cuerpos y excretas de animales de experimentación y en excreta de humanos.

1. Profesor Asociado

2. Investigador

3. Profesor Titular

Laboratorio de Nutrición. Universidad Simón Bolívar, Caracas Venezuela.  
Apartado Postal 89000

## MATERIALES Y METODOS

### Ensayos biológicos

#### 1) Ratas:

Se midió la calidad proteica de la caseína tanto por los métodos que miden crecimiento (Índice de Eficiencia Proteica, PER y Relación Proteica Neta NPR) como por los métodos que miden retención de nitrógeno (Valor Biológico VB y Utilización Proteica Neta, NPU) (2). Así como también la digestibilidad aparente y verdadera de la caseína. Para este ensayo biológico se utilizó 12 ratas de la cepa Sprague Dawley distribuidos al azar en dos grupos con 6 ratas cada uno. El grupo 1 consumió la dieta con caseína (11) y el grupo 2 una dieta apteica. El tiempo de experimentación fue de 15 días y durante los últimos 5 días se recolectaron las heces y orinas de las ratas.

#### 2) Humanos:

Las heces y orinas fueron recolectadas en diferentes intervalos de tiempo de 12 hombres adultos en el Western Human Nutrition Research Center en San Francisco, California. El contenido de nitrógeno en estas muestras fue determinado por el método Kjeldahl automatizado en San Francisco, California y por el Colorimétrico en nuestro Laboratorio.

#### Preparación de las muestras de dietas, cuerpo y excretas de animales de experimentación y heces y orinas de humanos.

Previamente a la determinación del nitrógeno las muestras de heces y cuerpos se secaron en estufa a 105°C y luego se pulverizaron. Los cuerpos además se desgrasaron (12). Las orinas se diluyeron a 120 ml con agua destilada, mientras que las muestras de dietas se analizaron sin ningún tratamiento previo.

#### Preparación de las muestras de alimentos comerciales.

Los productos secos no molidos como trigo, maíz, cereales, salvado y germen de trigo, pasta, galletas, caraotas negras y garbanzos fueron finamente molidos en un molino de café. Los panes fueron tratados similarmente después de ser secados hasta peso constante a 105°C. Las harinas de maíz y trigo y productos molidos como aislado proteico de soya y leche entera en polvo fueron usadas tal cual y los productos lácteos fluidos fueron diluidos (3 g se diluyeron a 10 ml con agua destilada). Luego 40 mg y 500 mg de material seco se colocaron en tubos de ensayo de 16 x 150 mm o en balones Kjeldahl de 1 L para la determinación del nitrógeno colorimétrico y MacroKjeldahl respectivamente. En caso de los productos lácteos fluidos y orinas 100 ul de los productos diluidos y 400 ul de los productos lácteos no diluidos fueron usados para la digestión del método Colorimétrico y MacroKjeldahl respectivamente.

#### Preparación de los menús del comedor universitario.

Se analizaron doce menús que se ofrecen en el comedor de la Universidad Simón Bolívar. Cada menú incluía una sopa, un segundo plato con carne (pollo, res, cerdo o hamburguesa) y acompañamiento (arroz, papas, hallaquitas o pasta), una ensalada de vegetales, un pan, una fruta y un jugo de frutas.

Se pesó la parte comestible de cada uno de los menús estudiados y se homogeneizó con 300 ml de agua en una licuadora. De cada uno de los homogeneizados se tomó 1 ml y se llevó a 10 ml con agua destilada y luego se tomó 150 ul para la digestión del método Colorimétrico y 500 ul para el MacroKjeldahl.

### Determinación de nitrógeno

Después que todas las muestras fueron preparadas como se indicó anteriormente, el nitrógeno fue determinado por el método MacroKjeldahl (3) y por el método Colorimétrico (9).

### Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como media con sus errores estándares y las diferencias en el contenido de proteínas obtenidas por el método Kjeldahl y el Colorimétrico fueron comparadas usando la prueba del Test de Student al 95 % de confianza (13).

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se presenta una de las primeras comparaciones en dietas purificadas, heces, orinas y cuerpos de ratas entre el Kjeldahl y el Colorimétrico. Aquí se observa un buen acuerdo entre el nitrógeno determinado por el Kjeldahl y el Colorimétrico en el análisis de la dieta, heces, orinas y cuerpos de animales de experimentación.

TABLA 1  
Determinación de nitrógeno en dietas, heces, orinas y cuerpos de ratas usando los métodos colorimétrico y Kjeldahl

	Colorimétrico	Kjeldahl
N Dietario (%)	1,58±0,09	1,62±0,06NS
N Consumido (g/4días)	1,03±0,06	1,07±0,04NS
N Fecal (mg/4 días)		
Ratas con caseína	68,32±2,09	69,22±2,42NS
Ratas con apteica	27,83±1,02	29,21±1,32NS
N urinario (mg/4 días)		
Ratas con caseína	265,70±4,20	266,92±3,92NS
Ratas con apteica	79,63±3,03	81,22±2,41NS
N Corporal (g)		
Ratas con caseína	2,79±0,11	2,88±0,10NS
Ratas con apteica	0,69±0,04	0,73±0,03NS

Los valores representa la media ± el ES de seis ratas. Nitrógeno determinado por duplicado para los dos métodos.

NS. Las diferencias entre los dos métodos no fueron significativas con el Test de Student al 95% de confianza

Resultados similares se obtuvieron en la determinación de la calidad proteica y la digestibilidad de la caseína por ambos métodos (Tabla 2).

TABLA 2  
Calidad proteica y digestibilidad de la caseína en ratas por métodos colorimétrico y Kjeldahl para la determinación de nitrógeno en dietas, heces, orinas y cuerpos

	Colorimétrico	Kjeldahl
PER	3,99±0,18	3,93±0,18NS
NPR	4,79±0,17	4,69±0,12NS
NPU (N corporal)	72,86±1,63	71,30±1,04NS
NPU (N fecal y urinario)	79,76±2,27	80,89±1,76NS
VB	81,20±2,34	82,43±2,04NS
Digestibilidad (%)		
aparente	94,95±2,10	94,62±2,15NS
Verdadera	96,70±1,99	96,52±2,02NS

Los valores representa la media ± el ES de seis ratas. Nitrógeno determinado por duplicado para los dos métodos.

NS. Las diferencias entre los dos métodos no fueron significativas con el Test de Student al 95% de confianza

Luego se comparó el método Colorimétrico con el Kjeldahl en muestras más complejas que las dietas purificadas usadas para medir calidad proteica. Así, se determinó proteínas en una gran variedad de alimentos comerciales.

En la Tabla 3 se presenta los resultados de seis productos lácteos estudiados. Aquí podemos observar que el contenido de proteínas medido por el MacroKjeldahl es muy similar al obtenido por el Colorimétrico y no hubo diferencias significativas entre estos dos métodos.

**TABLA 3**  
Contenido de proteína (g/100g) en productos lácteos determinado por los métodos colorimétrico y Kjeldahl

Productos lácteos	Colorimétrico		Kjeldahl	
	Media	ES	Media	ES
Leche entera líquida	3,38	0,06	3,12	0,04NS
Leche fermentada	3,25	0,06	3,32	0,02NS
Leche descremada	3,37	0,05	3,47	0,06NS
Yogurt	4,61	0,07	5,18	0,05NS
Leche evaporada	6,23	0,04	6,50	0,05NS
Leche entera en polvo	25,02	0,09	24,98	0,09NS
Media del grupo	7,64	3,12	7,76	3,49NS

La tabla muestra la media y el error estándar de 3 determinaciones.

NS. No hubo diferencias significativas entre los dos métodos con el Test de Student al 95% de confianza

El contenido de proteínas en 10 productos de maíz y 11 de trigo aparecen en las Tablas 4 y 5. En todos estos alimentos se observa valores similares para el Kjeldahl y el Colorimétrico y también las diferencias entre los dos métodos no fueron significativas. Resultados similares se obtuvieron para las leguminosas estudiadas: caraotas negras, garbanzos y aislado proteico de soya (Tabla 6)

**TABLA 4**  
Contenido de proteína (g/100g) en productos de maíz determinado por los métodos colorimétrico y Kjeldahl

Productos de maíz	Colorimétrico		Kjeldahl	
	Media	ES	Media	ES
Top form	5,44	0,04	5,47	0,04NS
Hojuelas de maíz	7,35	0,61	6,89	0,02NS
Harina de maíz blanco	7,26	0,15	7,13	0,13NS
Maíz blanco pelado	7,25	0,39	7,18	10,02NS
Maíz amarillo pelado	7,52	0,11	7,22	0,04NS
Maíz blanco entero	9,46	0,14	9,09	0,03NS
Maíz amarillo entero	9,69	0,16	9,15	0,05NS
Harina de maíz tostada	9,62	0,19	9,45	0,09NS
Maíz de cotufa	10,72	0,27	10,55	0,05NS
Media del grupo	8,26	0,68	8,01	0,54NS

La tabla muestra la media y el error estándar de 3 determinaciones.

NS. No hubo diferencias significativas entre los dos métodos con el Test de Student al 95% de confianza

**TABLA 5**  
Contenido de proteína (g/100g) en productos de trigo determinado por los métodos colorimétrico y Kjeldahl

Productos de trigo	Colorimétrico		Kjeldahl	
	Media	ES	Media	ES
Trigo entero	8,68	0,15	8,76	0,18NS
Pan integral	9,81	0,16	9,55	0,08NS
Galletas de soda	9,50	0,35	9,76	0,06NS
Harina de trigo tostada	11,37	0,74	11,15	0,07NS
Pan francés blanco	12,53	0,49	12,78	0,02NS
Pasta	13,31	0,25	13,21	0,01NS
Sémola	13,47	0,22	13,56	0,06NS
Harina de trigo blanca	13,51	0,56	13,74	0,09NS
Salvado de trigo	15,28	0,47	14,97	0,09NS
Germén de trigo	27,98	0,62	27,32	0,22NS
Media del grupo	13,54	1,74	13,48	1,67NS

La tabla muestra la media y el error estándar de 3 determinaciones.

NS. No hubo diferencias significativas entre los dos métodos con el Test de Student al 95% de confianza

**TABLA 6**  
Contenido de proteína (g/100g) en leguminosas determinado por los métodos colorimétrico y Kjeldahl

Leguminosas	Colorimétrico		Kjeldahl	
	Media	ES	Media	ES
Caraotas negras	24,72	0,23	23,57	0,13NS
Garbanzos	21,60	0,35	20,82	0,09NS
Aislado proteico soya	91,43	0,95	90,56	0,90NS
Media del grupo	45,92	22,80	44,98	22,83NS

La tabla muestra la media y el error estándar de 3 determinaciones.

NS. No hubo diferencias significativas entre los dos métodos con el Test de Student al 95% de confianza

Los resultados obtenidos con los productos comerciales estudiados indican que el método Colorimétrico es útil en la determinación de proteínas en alimentos crudos y procesados con un alto (90,56% aislado proteico de soya, Tabla 6) y bajo (3,12% leche líquida, Tabla 1) contenido de proteínas, que son considerablemente más complejos que las dietas purificadas. Estas aplicaciones son importantes, porque ellas abren la posibilidad de usar esta técnica en el control de calidad en la industria de alimentos.

En la Tabla 7 se presenta la comparación de los métodos Colorimétrico y Kjeldahl en la determinación de proteínas en 12 menús ofrecidos en el comedor de la Universidad Simón Bolívar. Los datos indican que existe gran variación en cuanto al aporte de proteínas por menús de 16,33 g para el menú 1 (papas rellenas con carne) a 35,91 g para el menú 12 (carne guisada). En general existe un buen acuerdo entre los métodos Colorimétrico y Kjeldahl usados para la determinación de proteínas en mezclas de alimentos cocidos.

TABLA 7

Contenido de proteína (g/servicio) de 12 menús ofrecidos en el comedor de la U.S.B. determinado por los métodos colorimétrico y Kjeldahl

Menú	Colorimétrico		Kjeldahl	
	Media	ES	Media	ES
1	16,33	0,98	15,06	0,47NS
2	16,67	1,11	17,69	1,08NS
3	19,97	2,51	18,42	1,83NS
4	20,23	1,34	22,00	1,01NS
5	20,39	1,56	19,89	0,94NS
6	21,28	1,01	19,41	0,29NS
7	22,15	1,68	20,55	1,25NS
8	24,08	3,98	25,22	4,45NS
9	25,85	1,54	26,60	1,70NS
10	29,16	6,60	30,61	3,99NS
11	31,93	3,53	29,77	2,29NS
12	35,91	2,87	38,06	2,07NS
Media total	23,66	6,03	23,61	6,64NS

La tabla muestra la media y el error estándar de 15 determinaciones. NS. No hubo diferencias significativas entre los dos métodos con el Test de Student al 95% de confianza

Estos datos sugieren que el método Colorimétrico podría usarse en la vigilancia nutricional de comedores institucionales. Además, este método podría ser usado en la cuantificación de la ingesta proteica en humanos consumiendo dietas normales y esto es un componente clave en el cálculo del balance nitrogenado.

En la Tabla 8 se muestra las pérdidas de nitrógeno fecal y urinario en hombres adultos medidas por el Kjeldahl automatizado en el Western Human Nutrition Research Center y por el Colorimétrico en el Laboratorio de nutrición de la U.S.B. Se observa que las excreciones de nitrógeno en heces y orinas de humanos determinadas por el Colorimétrico fueron estadísticamente similares a las obtenidas por el Kjeldahl automatizado en San Francisco, obteniéndose un alto coeficiente de correlación entre los dos métodos.

TABLA 8

Pérdida de nitrógeno fecal y urinario en hombres adultos medidas por el Kjeldahl en el Western Human Nutrition Research Center y por el Colorimétrico en el Lab. de Nutrición de la U.S.B.

	Fecal		Urinario	
	Kjeldahl	Colorim.	Kjeldahl	Colorim.
Media	0,886	0,812	7,853	8,061
DS	0,335	0,305	1,092	1,527
ES	0,035	0,032	0,130	0,183
Coef. (r)	0,95		0,80	
n	92	92	70	70

Las diferencias entre el Colorimétrico y el Kjeldahl no fueron significativas con el Test de Student al 95% de confianza

El estudio de la digestibilidad y retención de nitrógeno en niños con diarrea que se muestra en la Tabla 9, ilustra una importante aplicación del método Colorimétrico. En esta Tabla se observa que en comparación con un niño normal (14), durante la diarrea la absorción y retención de nitrógeno está substancialmente reducida, particularmente en la fase aguda de la enfermedad.

TABLA 9

Pérdida de nitrógeno en orina y heces y absorción y retención de nitrógeno en niños con diarrea aguda y persistente estudiados durante las primeras 48 horas de tratamiento

	n	Niños				Pérdida de Nitrógeno				Nitrógeno			
		edad (meses)		peso (Kg)		orina (g/24h)		heces (g/24h)		absorción (%)		retención (%)	
		Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES	Media	ES
Aguda*	43	7,14	0,51	7,67	0,14	0,88	0,05	1,25	0,08	61,33	2,22	33,24	2,69
Persist**	15	6,08	0,41	6,64	0,22	0,89	0,12	0,51	0,04	85,79	1,44	62,20	3,71

\* Las pérdidas de N en orina y heces fueron determinadas separadamente durante el 1er. y 2do. día de tratamiento.

\*\* Las pérdidas de N fueron determinadas solamente después del 2do. día de tratamiento.

Las muestras fueron analizadas por duplicado, lo que representa 202 determinaciones de N en orina y 202 en heces más el análisis de las fórmulas usadas.

Es importante destacar que en este estudio se realizaron 202 determinaciones de heces y 202 determinaciones de nitrógeno en orina, más el análisis de las fórmulas usadas. El análisis de tantas muestras sería imposible de realizar por el método Kjeldahl. Por esta razón, en estudios clínicos las pérdidas de nitrógeno se estiman de la urea urinaria (15), aunque este método es insensible (16-18) e inapropiado cuando la producción de urea es limitada, como es el caso de enfermedades hepáticas o cuando el consumo de proteínas es bajo debido a problemas renales o diarreas. Por lo tanto el método Colorimétrico discutido aquí es una excelente alternativa para este tipo de estudios.

De estos resultados se concluye que el método Colorimétrico empleado en la determinación de proteína, es comparable y estadísticamente similar al método Kjeldahl, observándose buena precisión y reproducibilidad en todas las muestras analizadas. Debido a las ventajas de orden práctico y económico del método Colorimétrico sobre el Kjeldahl, este método es muy útil para estudios nutricionales en humanos y animales de experimentación donde se requiere analizar un gran número de muestras, como es el caso del balance nitrogenado.

## REFERENCIAS

1. FAO/WHO/UNU. Expert consultation. Energy and Protein Requirements. Tech. Report Series 724. World Health Org. Geneva. 1985.
2. National Academy of Sciences. Evaluation of Protein Quality. Publication 1100. Wash. D.C. 1963.
3. AOAC. Association of Oficial and Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 14th Edition, Washington D.C. 1984.
4. Allison, JB & JC Bird. Elimination of nitrogen from the body. En: Mammalian Protein Metabolism. Editado por HN Munrho and JB Allison. New York Academic Press, pp. 483-512. 1964.
5. McCracken, MS & HV Malmstadt. Reaction-rate method for determining protein nitrogen in grains and feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62(1):23. 1979.
6. Hambreus, L, E Forsum, L Abrahamsson & B Lonnerdal. Automatic total nitrogen analysis in nutritional evaluations using a block digester. Anal. biochem. 72:75. 1976.
7. Hambleton, LG & RG Noel. Collaborative study of semiautomated method for the determination of crude protein in animal feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 59(1):134. 1976.
8. Shahinian, A & J Rehinold. Application of the phenol-hipoclorite reaction to measurement of ammonia concentration in Kjeldahl digests of serum and various tissues. Clin. Chem. 17:1077-1081. 1971.
9. Hevia, P & AM Cioccia. Application of a colorimetric method to the determination of nitrogen in nutritional studies with rats and humans. Nut. Rep. Int. 38(6):1129 -1136. 1988.
10. Chaney, AL & EP Marbach. Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin. Chem. 8:130 -132. 1962.
11. American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies. J. Nutr. 107:1340 -1348. 1977.
12. Blight, EG & WJ Dyer. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian J. Biochem. Physiol. 37:911. 1958.
13. Snedecor, GN & WG Cochran. Statistical Methods, 6th Ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press. 1973.
14. Huang, PC, CPL Lin & JY Hsu. Protein requirements of normal infants at the age of about 1 year: Maintenance nitrogen requirements and obligatory nitrogen losses. J. Nutr. 110:1727-1735. 1980.
15. Blackburn, GL, BR Bistran & BS Maini. Nutritional and metabolic assessment of the hospitalized patient. J. of Parenteral and Enteral Nutr. 1:11-22. 1977.
16. Konstantinides, FN, NN Konstantinides, JCLi, MEMyaya & FB Cerra. Urinary urea nitrogen: Too insensitive for calculating nitrogen balance studies in surgical clinical nutrition. J. of Parenteral and Enteral Nutr. 15:189 -193. 1991.
17. Velasco, N, CL Long, DA Otto, N Davis, JW Geiger & WS Blackburn. Comparison of three methods for the estimation of total nitrogen losses in hospitalized patients. J. of Parenteral and Enteral Nutr. 14:517-522. 1990.
18. Kasanovich, JM, FDumler, MHorst, CQuandt, JA Sargent & N Levin. Use of urea kinetics in the nutritional care of acute ill patients. J. of Parenteral and Enteral Nutr. 9:165-169. 1985.