

ESTRATEGIAS PARA LA FORTIFICACIÓN DE ALIMENTOS CON ZINC*

STRATEGIES FOR ZINC FOOD FORTIFICATION

HERNÁNDEZ F¹, TESÁN F¹, WEILL R², SALGUEIRO MJ¹, BOCCIO J¹.

1-Laboratorio de isótopos estables aplicados a biología y medicina, Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

2-Departamento de Investigación y Desarrollo, Danone Argentina SA, Argentina.

*Este trabajo fue financiado por Danone Argentina en el marco del acuerdo de servicio técnico con la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

RESUMEN

En esta revisión se describen los principales factores a tener en cuenta a la hora de implementar un programa de fortificación de alimentos, las herramientas disponibles a escala de laboratorio para la correcta elección del alimento a fortificar y de la fuente del nutriente a utilizar, como también los principales aspectos del zinc en su rol como micronutriente esencial. Se discuten las causas y consecuencias de la deficiencia de zinc, y las posibles estrategias de intervención aplicables, en caso de ser necesarias, con la finalidad de afrontar los estados de deficiencia, con las ventajas y desventajas asociadas a cada una.

Palabras clave: Zinc, deficiencia, fortificación, alimento, biodisponibilidad

English

Português

STRATEGIES FOR ZINC FOOD FORTIFICATION

SUMMARY

In this review we describe the main factors that should be taken into account when implementing a food fortification program. We also show the tools available in the laboratory for a correct choice of products that are more suitable for fortification and of the most adequate nutrient source. The main aspects of zinc as an essential macronutrient are also described. The causes and consequences of zinc deficiency, the possible strategies that may be applied in this case, and the advantages or disadvantages associated to each of these strategies are also discussed.

Keywords: zinc, deficiency, fortification, food, bioavailability

ESTRATÉGIAS PARA A FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS COM ZINCO

RESUMO

Nesta revisão, descrevem-se os principais fatores que devem levar-se em conta no momento de implantar um programa de fortificação de alimentos, as ferramentas disponíveis a escala de laboratório para a escolha certa do alimento para fortificar e da fonte do nutriente que vai utilizar-se, assim como os principais aspectos do zinco na sua função de micronutriente essencial. Além disso, analisam-se as causas e as conseqüências da deficiência do zinco e as possíveis estratégias de intervenção aplicáveis, caso necessárias, visando atender aos estados de deficiência, com as vantagens e desvantagens associadas a cada uma delas.

Palavras-chave: zinco, deficiência, fortificação, alimento, biodisponibilidade.

Epidemiología de la deficiencia de zinc

La deficiencia de zinc constituye un problema nutricional de relevancia mundial.¹ Se estima que aproximadamente un 20 % de la población mundial podría estar en riesgo de padecerla.² Si bien ciertos grupos se consideran de riesgo, la deficiencia de este micronutriente puede afectar a todas las franjas etarias.

Según los datos publicados por IZiNCG (*Internacional Zinc Nutrition Consultative Group*), aproximadamente un tercio de la población mundial vive en países calificados como de alto riesgo de deficiencia de zinc, y la mitad vive en países con un riesgo moderado (Figura 1).

El zinc como micronutriente esencial

Las primeras menciones acerca de la relevancia del zinc en el desarrollo microbiano datan de 1869. Posteriormente otros estudios confirmaron su carácter esencial tanto en el desarrollo vegetal como en el animal. Sin embargo, recién en el año 1961 se plantearon, por primera vez, sospechas acerca de la deficiencia de zinc en humanos y sus consecuencias.³ La esencialidad del zinc deriva de la gran cantidad y ubicuidad de funciones que desempeña al intervenir como cofactor en la actividad de múltiples enzimas ampliamente distribuidas por el organismo.^{1,4,5} Asimismo, participa en los procesos de estabilización de membranas pertenecientes a estructuras celulares y subcelulares y se encuentra íntimamente relacionado con procesos de elevada complejidad como el metabolismo de hidratos de carbono, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.⁶ Esta diversidad de funciones explica el amplio espectro de consecuencias

observadas sobre la salud humana, en los casos de deficiencia de zinc.

Causas de la deficiencia de zinc

Entre las causas más representativas de la deficiencia de zinc se puede mencionar la ingesta inadecuada debido al consumo de alimentos con bajo contenido o baja biodisponibilidad del mineral.⁷ La biodisponibilidad del zinc puede verse disminuida por la presencia de inhibidores de su absorción en alimentos. Un ejemplo conocido y muy estudiado lo constituyen los fitatos, ampliamente distribuidos en alimentos de origen vegetal.⁸

El estado de deficiencia también se puede desencadenar como consecuencia de aumentos en los requerimientos, en las pérdidas ó a causa del padecimiento de patologías que puedan generar síndromes de malabsorción, como la acrodermatitis enterohepática, una enfermedad genética que afecta específicamente la absorción de zinc.⁷

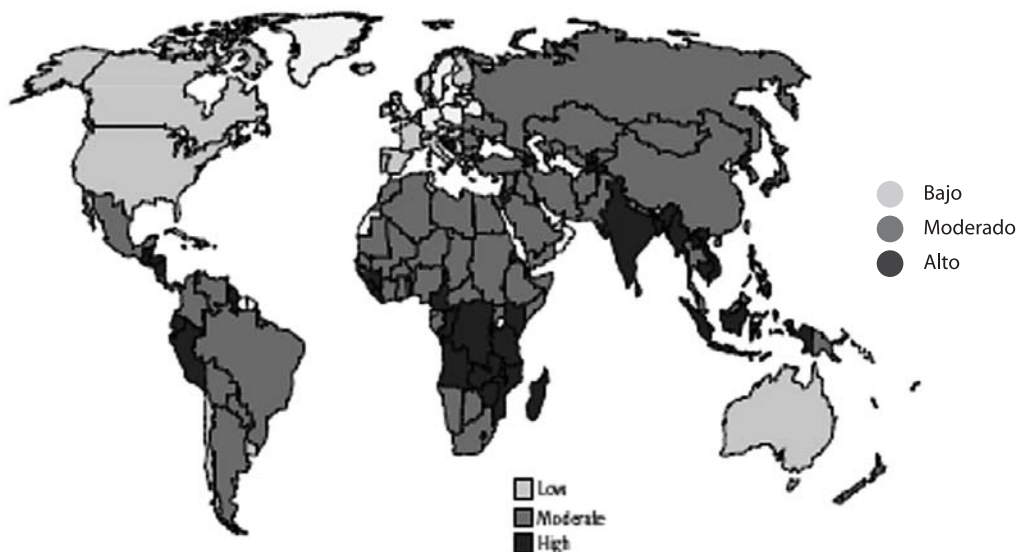
Consecuencias de la deficiencia de zinc

El zinc pertenece al grupo de nutrientes cuya carencia se expresa en un modelo de deficiencia de tipo II. Es decir, la falta de estos nutrientes produce retraso en el crecimiento y disminución en la talla.⁶ Por otro lado, en los últimos años se ha encontrado mayor evidencia acerca de las consecuencias de la deficiencia de zinc en el desarrollo cognitivo e intelectual, en la capacidad física, la protección ante el estrés oxidativo y la competencia inmunológica.⁹⁻¹² Este último punto es sumamente importante puesto que la deficiencia de este micronu-

FIGURA N°1

Representación del riesgo de deficiencia de Zinc mundial confeccionado a partir de la combinación de la prevalencia de la baja estatura infantil para la edad y porcentaje de personas con riesgo de tener una ingesta de zinc inadecuada.

Adaptado de *Assesment of the risk of Zinc deficiency in populations in Food and Nutrition Bulletin, 2004 [17]*.



triente se relaciona con el aumento en la incidencia de infecciones o sus complicaciones, principalmente sobre cuadros de diarrea en niños y respiratorios en adultos mayores.¹³⁻¹⁶

Evaluación de riesgo de deficiencia

Si bien la deficiencia de este micronutriente es un problema global, ésta no se manifiesta en igual proporción en los distintos grupos poblacionales. La evaluación de riesgo es una herramienta útil para la identificación de aquellos grupos a los que se deberán dirigir los programas de intervención nutricional. Las estrategias con las que se cuenta a la hora de evaluar el riesgo de deficiencia de zinc incluyen¹⁷:

- Presencia o prevalencia de manifestaciones clínicas compatibles con la deficiencia de zinc: diarrea, infecciones respiratorias ó retardo en el crecimiento.
- Evaluación de la adecuación de la ingesta de zinc a los requerimientos teóricos según edad y sexo.
- Determinación del contenido de zinc en fluidos (suero o plasma), cabello ó de la actividad de enzimas dependientes de zinc.
- Evaluación de la respuesta ante una suplementación adecuada con zinc (crecimiento físico, función inmune, tasa de infecciones específicas, actividad física, performance en tests psicométricos y respuestas hormonales).

Estrategias para combatir la deficiencia de Zinc

Si bien la experiencia disponible actualmente acerca de programas de intervención sobre deficiencia de zinc es escasa, se emplean estrategias semejantes a las ya implementadas para otros minerales como el hierro y el yodo, entre las cuales se encuentran¹⁸:

- Suplementación: implica la administración de suplementos nutricionales a individuos con una deficiencia nutricional comprobada.
- Fortificación de alimentos: implica la adición de nutrientes específicos a los alimentos de manera de incrementar su/s ingesta/s.
- Diversificación o modificación dietaria: implica un cambio en los hábitos alimenticios de una población de manera de incrementar el consumo de alimentos ricos en el nutriente para el cual existe un estado de malnutrición.

De todos ellos, la fortificación de alimentos ha demostrado ser una estrategia exitosa a la hora de afrontar distintas deficiencias de nutrientes. Esto se debe tanto al amplio grupo poblacional que se ve beneficiado por la implementación de un programa de fortificación, como a la relación costo beneficio que el mismo implica.¹⁹ Sin embargo, esto requiere que el programa sea diseñado

para cubrir las demandas en los grupos blanco y resulte exitoso. En este sentido, la consideración más importante a tener en cuenta es la elección racional del binomio fuente – matriz, ya que ambos factores son determinantes sobre la eficiencia en la asimilación del nutriente.

Para el caso de la matriz o vehículo, ésta debe alcanzar a todos los grupos poblacionales en riesgo y ser consumida por una alta proporción de su población, por lo cual los hábitos alimenticios, los gustos y los costos de los alimentos a ser fortificados deben ser tenidos en cuenta. Respecto de la fuente utilizada, debe reunir características que posibiliten su incorporación dentro de procesos productivos en la elaboración de alimentos. Finalmente, el alimento fortificado debe conservar las propiedades y características originales o al menos no producir modificaciones negativas que resulten en un detrimento de su consumo o su valor nutricional.

Dentro de este marco complejo de consideraciones, los estudios de biodisponibilidad y toxicidad se consideran herramientas fundamentales a la hora de evaluar las distintas combinaciones de fuentes y vehículos puesto que aportan información sobre la eficiencia y seguridad de un proyecto de fortificación a la vez que constituyen un fuerte aval científico para la efectividad de la estrategia.

Biodisponibilidad de zinc

El concepto de biodisponibilidad de un mineral alude a la porción del mismo que puede ser absorbida y que alcanza la circulación para convertirse en un pool disponible y sensible a las necesidades del organismo. Por tanto y en el caso del zinc, será fisiológicamente relevante aquella porción consumida que sea absorbible y utilizable para llevar a cabo todas las funciones en las que se ve involucrado. Es por esto que el análisis de la biodisponibilidad de zinc no sólo debe abarcar la estimación de su ingesta sino cuan biodisponible se encuentra en los alimentos que habitualmente lo proveen, puesto que ésta se verá afectada según la matriz nutricional en la que se encuentre ó la forma química de la que se trate.²⁰

Para estudiar el impacto nutricional que posee el zinc en el organismo se suelen realizar ensayos de absorción ó de biodisponibilidad. Los primeros incluyen técnicas de marcación extrínseca e intrínseca que dan idea de cuál es la proporción de la ingesta de zinc que no es eliminada y por lo tanto permanece en el organismo. Los segundos consisten en el monitoreo de distintos parámetros relacionados con las funciones y distribución normal del zinc. Entre estos últimos, los más representativos incluyen aumento de peso y contenido de zinc en fémur en modelos animales. Otros parámetros analizados por algunos autores incluyen zinc plasmático y en el cabello, aunque es limitada hasta el momento la correlación entre este último y el estado nutricional respecto del mineral.

Experiencia en nuestro laboratorio

Nuestra experiencia en la realización de estudios de metabolismo, toxicidad y biodisponibilidad de nutrientes se ve reflejada en los numerosos ensayos realizados a lo largo de varios años, evaluando diversas fuentes de hierro, calcio y zinc en distintas matrices alimentarias.

Para el caso del zinc, se realizan estudios para la estimación de biodisponibilidad relativa en modelos animales, cuyo objetivo fundamental radica en comparar la capacidad de producir una respuesta determinada en el organismo (peso corporal, peso del fémur y contenido de zinc en fémur) de una fuente mineral en estudio respecto de la fuente de referencia. Esta respuesta es evaluada en función de la ingesta del mineral, y la relación ingesta-respuesta (análoga a una curva dosis-respuesta) puede ser descrita por una función matemática que permite no sólo cuantificar la biodisponibilidad sino también obtener valores predictivos de esta.^{21,22} Dichas funciones se caracterizan por parámetros de ajuste que permiten comparar la eficiencia de las distintas fuentes en relación a la respuesta obtenida.

Para ilustrar los resultados obtenidos en estudios de biodisponibilidad de zinc realizados en nuestro laboratorio, se muestran a continuación las figuras 2, 3 y 4. En estas se pueden observar las curvas dosis-respuesta obtenidas durante el estudio de diferentes fuentes de zinc, como el sulfato de zinc (referencia) y el gluconato de zinc estabilizado con glicina (fuente en estudio), en matrices alimentarias lácteas como el yogurt, el queso petit-suisse y una leche fermentada con agregado de probiótico de la familia de *Lactobacillus*, realizados dentro del marco de distintos proyectos de fortificación de alimentos.

En los casos presentados en las figuras 2, 3 y 4, los parámetros de ajuste correspondientes a las funciones obtenidas para las curvas dosis-respuesta permitieron obtener datos sobre a) respuesta máxima (valores máximos de respuesta) y b) eficiencia para alcanzar la respuesta máxima (relación entre la respuesta máxima y concentración de zinc que produce la mitad de la respuesta máxima). Estos parámetros fueron utilizados para los cálculos de biodisponibilidad relativa, poniendo en evidencia que esta varía según la fuente que provee el mineral y también según la matriz nutricional que lo aporta, siendo indispensable la realización de estudios que sustenten la mejor combinación.

Procesos tecnológicos en la industria de alimentos

Cada alimento es, en sí mismo, una matriz compleja en la cual se encuentran coexistiendo innumerables compuestos. Los alimentos, al ser procesados a escala industrial, son sometidos a distintos tipos de procesos. Dependiendo de las características de cada alimento, estos procesos pueden incluir filtraciones, pasteurizaciones, esterilización a ultra-alta temperatura, cocción,

congelado y desecación, entre otros procesos. Hay que tener en cuenta que el hecho de someter los alimentos a los procesos antes mencionados se puede asociar a la aparición de modificaciones en las interacciones normales de los distintos componentes que lo constituyen. El agregado de un componente adicional para llevar a cabo una fortificación puede modificar las interacciones entre los componentes de la matriz nutricional de muy diversas formas, alterando las características organolépticas normales del alimento, modificando su estabilidad o la biodisponibilidad del nutriente agregado o de otros nutrientes presentes, entre otras formas. En el caso de los minerales, ésta situación resulta más crítica, ya que los mismos poseen una mayor reactividad con la matriz nutricional que la observada en otros nutrientes.

Por lo tanto, cuando el vehículo es un alimento procesado hay que tener en cuenta que la fortificación y el procesamiento industrial coexistirán, pudiendo resultar de ello la potenciación de las modificaciones causadas por ambos factores o incluso la aparición de nuevos fenómenos no esperados.

Por todo lo mencionado anteriormente, a la hora de evaluar el impacto de la incorporación de un aditivo a un alimento, es fundamental el conocimiento detallado de los procesos a los cuales será sometido dicho alimento a escala industrial y la elección de la fuente y del vehículo deja de ser un hecho meramente acotado a la interacción entre estos dos componentes para convertirse en un análisis global de todo el proceso de elaboración del nuevo alimento funcional.

Discusión

La fortificación de alimentos constituye una estrategia prometedora a la hora de combatir deficiencias nutricionales, considerando los resultados obtenidos en experiencias desarrolladas en varios países.²³⁻²⁸ La elección de esta estrategia se justifica por las ventajas comparativas que presenta frente a otras alternativas como la suplementación o la modificación en los hábitos alimentarios.

Los principales inconvenientes de la suplementación radican en el costo que implica la adquisición del suplemento y la necesidad de un compromiso sólido por parte del paciente para su consumo. Para el caso de la modificación en los hábitos alimentarios, el inconveniente mayor es el costo de las políticas de concientización o de reeducación, el largo período de tiempo necesario para generar el cambio en los hábitos de consumo y las dificultades reales que se enfrentan hoy en día para comprometerse con un plan de alimentación constante y estable por parte de los individuos. Este análisis lleva a otras dos ventajas fundamentales de la fortificación como estrategia. Por un lado, los individuos consumen mayor cantidad del nutriente sin modificar sus dietas regulares y por otro, teniendo en cuenta que el zinc per-

FIGURA N°2

Curva dosis-respuesta para aumento de peso corporal para combinaciones de sulfato de zinc (SZ) y gluconato de zinc estabilizado con glicina (GZ) en queso petit-suisse, yogurt y leche fermentada con agregado de probiótico de la familia *Lactobacillus*. El recuadro en el sector inferior derecho muestra los valores de biodisponibilidad relativa de zinc en las diferentes matrices.

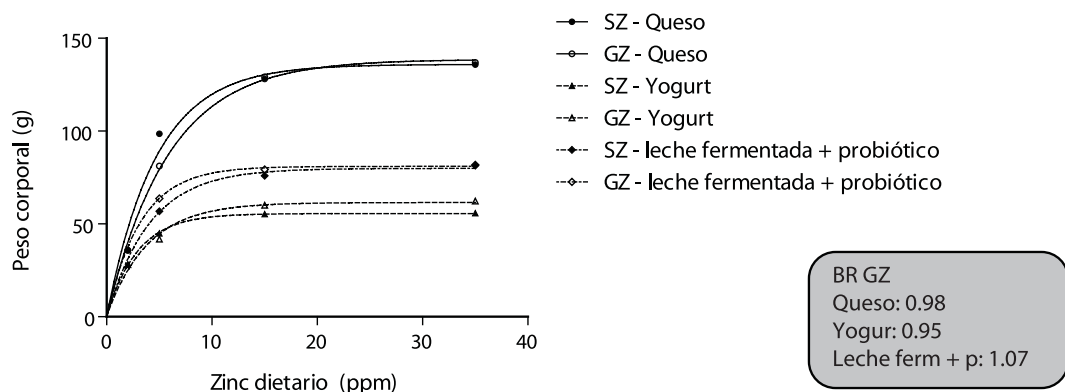


FIGURA N°3

Curva dosis-respuesta para peso del fémur para combinaciones de sulfato de zinc (SZ) y gluconato de zinc estabilizado con glicina (GZ) en queso petit-suisse, yogurt y leche fermentada con agregado de probiótico de la familia *Lactobacillus*. El recuadro en el sector inferior derecho muestra los valores de biodisponibilidad relativa de zinc en las diferentes matrices

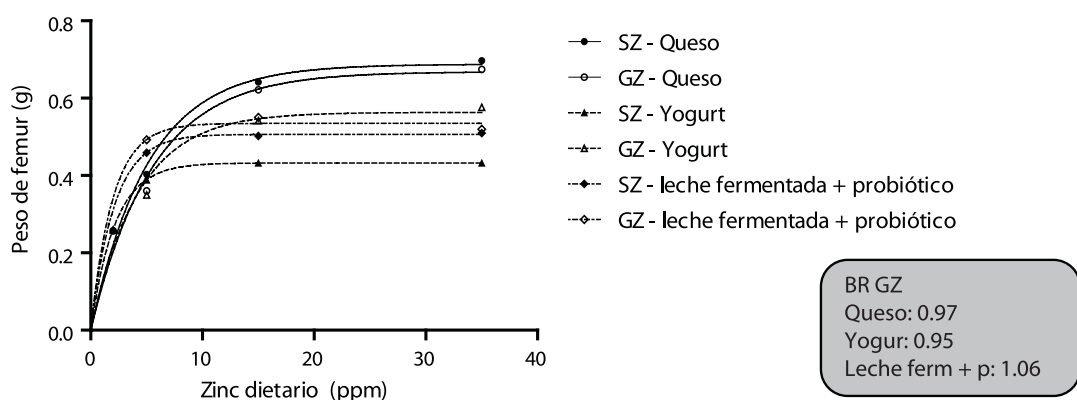
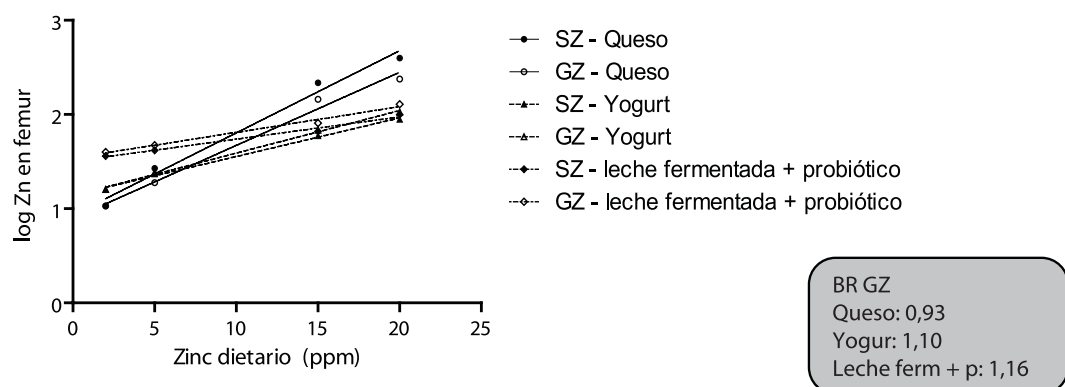


FIGURA N°4

Curva dosis-respuesta contenido de zinc en fémur para combinaciones de sulfato de zinc (SZ) y gluconato de zinc estabilizado con glicina (GZ) en queso petit-suisse, yogurt y leche fermentada con agregado de probiótico de la familia *Lactobacillus*. El recuadro en el sector inferior derecho muestra los valores de biodisponibilidad relativa de zinc en las diferentes matrices



tenece al grupo de los micronutrientes, la incorporación del mismo en las cantidades necesarias para alcanzar los niveles deseados en la fortificación no trae aparejado un impacto significativo en los costos finales de los alimentos. Otra ventaja de la fortificación radica en la posibilidad de aprovechar los mecanismos de distribución utilizados por los alimentos, hecho que contribuye a la disminución de los costos del proceso.

Para el caso particular de las matrices alimentarias evaluadas en nuestro laboratorio, los vehículos lácteos resultaron ser una opción adecuada debido a que se trata de alimentos de consumo masivo, de costo accesible y factibles de ser procesados en grandes cantidades de manera de asegurar el abastecimiento y control de la fortificación.

Respecto de la elección del fortificante, el cloruro de zinc, gluconato de zinc, óxido de zinc, estearato de zinc y sulfato de zinc se encuentran listadas como compuestos reconocidos como seguros (GRAS) por la Administración de Alimentos y Drogas de EE.UU. (FDA), los cuales presentan diferente solubilidad en medios acuosos, parámetro que se utiliza a modo preliminar de evaluar biodisponibilidad y presumir interacciones con la matriz nutricional.¹⁹

Pese a que los compuestos con elevada solubilidad en agua (acetato, cloruro, gluconato y sulfato) presentan generalmente una mayor absorción que los menos solubles (citrato y lactato) o insolubles (óxido), esta característica se suele asociar a una mayor reactividad de dichos compuestos, dando lugar a diversos tipos de interacciones con el vehículo, entre las cuales se encuentran las tan mencionadas características oragolépticas.

Respecto de las fuentes evaluadas por nuestro laboratorio, en todas las matrices ensayadas, el gluconato de zinc estabilizado ha demostrado tener una biodisponi-

bilidad similar al sulfato de zinc. La diferencia fundamental entre ambos radica en el proceso de estabilización al cual es sometido el gluconato de zinc, por medio del cual su agregado en los alimentos no se ve asociado a la aparición de los sabores desagradables característicos de otras fuentes solubles de zinc.

Otra alternativa a la hora de evitar variaciones en el sabor de los alimentos es la utilización de óxido de zinc como fortificante, ya que a causa de su baja solubilidad no tiene la capacidad de interactuar con la matriz a la cual se lo incorpora y presenta la ventaja de ser la fuente mas económica de zinc. Sin embargo, si bien hay estudios en los cuales se demuestra una biodisponibilidad similar para el óxido de zinc y el sulfato de zinc, la absorción del óxido de zinc es dependiente de la acidez estomacal, razón por la cual se puede ver drásticamente disminuida en aquellos individuos en los cuales el pH gástrico se encuentra incrementado, como quienes padecen patologías digestivas como infección por *H. pylori* o aclorhidria.^{19,29-32} Otro inconveniente presentado por esta fuente radica en el acotado espectro de alimentos en los cuales puede ser incorporada, ya que a causa de su baja solubilidad no es compatible con vehículos líquidos. Finalmente, su biodisponibilidad es dependiente del tamaño de partícula del óxido de zinc utilizado, ya que un tamaño elevado de partícula disminuye la solubilidad del mismo a nivel gástrico, y por ende va en detrimento de su biodisponibilidad, mientras que un tamaño muy pequeño puede generar interacciones con el alimento y aparición de sabores desagradables.

Por todo esto, resulta indispensable evaluar la combinación alimento - fortificante mediante estudios de biodisponibilidad y pruebas piloto de producción a escala industrial, para asegurar resultados satisfactorios en la fortificación de alimentos con zinc.

Bibliografía

- 1- Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Sarabia MI, Caro R, De Paoli T, Hager A, Weill R, Boccio J. Zinc as essential micronutrient: a review. *Nutr Res* 20 (5); 737-55, 2000.
- 2- Sanghvi T, Ross J, Heymann H. Why is reducing vitamin and mineral deficiencies critical for development?. En: *Vitamin and mineral deficiencies technical situation analysis: a report for the Ten Year Strategy for the Reduction of Vitamin and Mineral Deficiencies*. *Food Nutr Bull* 28(1-suppl); S167-173, 2007.
- 3- Prasad AS. A Century of Research on the Metabolic Role of Zinc. *Am J Clin Nutr* 22(9); 1215-1221, 1969.
- 4- Vitamin and mineral requirements in human nutrition: report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand, 21-30 September 1998.
- 5- Hess SY, Lönnerdal B, Hotz C, Rivera JA, Brown KH. Recent advances in knowledge of zinc nutrition and human health in *Food Nutr Bull* 30(1-suppl); S5-11, 2009.
- 6- Carmuega E, O'Donnel AM. El zinc y el cobre en nutrición infantil. *Boletín CESNI*: 3-24, 2001.
- 7- Hotz C, Brown KH. Overview of Zinc Nutrition. En: *Assesment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control*. *Food Nutr Bull* 25(1-suppl 2); S99-129, 2004.
- 8- Hurrell RF. Influence of Vegetable Protein Sources on Trace Element and Mineral Bioavailability. *J Nutr* 133 (suppl); S 2973-29777, 2003.
- 9- Song Y, Leonard SW, Traber MG, Ho E. Zinc deficiency

- affects DNA damage, oxidative stress, antioxidant defenses, and DNA repair in rats. *J Nutr* 139; 1626-1631, 2009.
- 10- Ho E, Ames BN. Low intracellular zinc induces oxidative DNA damage, disrupts p53, NFκB, and AP1 DNA binding, and affects DNA repair in a rat glioma cell line. *PNAS* 99(26); 16770-5, 2002.
- 11- Prasad AS. Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Exp Gerontology* 43; 370-7, 2008.
- 12- Tuerk MJ, Fazel N. Zinc deficiency. *Current Opinion in Gastroenterology* 25; 136-43, 2009.
- 13- Black RE. Therapeutic and preventive effects of zinc on serious childhood infectious diseases in developing countries. *Am J Clin Nutr* 68(suppl); S476-479, 1998.
- 14- Black RE. Zinc and childhood infectious disease morbidity and mortality. *Br J Nutr* 85(2); S125-9, 2001.
- 15- Prasad AS, Beck FWJ, Bao B, Fitzgerald JT, Snell DC, Steinberg JD, Cardozo LJ. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *Am J Clin Nutr* 85; 837-844, 2007.
- 16- Barnett JB, Hamer DH, Meydani SN. Low zinc status: a new risk factor for pneumonia in the elderly? *Nutr Rev* 68(1); 30-37, 2009.
- 17- Hotz C, Brown KH. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations. En: *Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control*. *Food Nutr Bull* 25(1-suppl 2); S130-62, 2004
- 18- Hotz C, Brown KH. Developing zinc intervention programs. En: *Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control*. *Food Nutr Bull* 25(1-suppl 2); S163-73, 2004.
- 19- Salgueiro MJ, Zubillaga M, Lysionek A, Caro R, Weill R, Boccio J. Fortification strategies to combat Zinc and Iron deficiency. *Nutr Rev* 60(2); 52-8, 2002.
- 20- International bank for reconstruction and development. *Ebriching lives: overcoming vitamin and mineral malnutrition in developing countries*. Washington, DC, World Bank, 1994.
- 21- Franz KB, Kennedy BM, Fellers DA. Relative Bioavailability of Zinc using Weight Gain of rats. *J Nutr* 110; 2263-71, 1980.
- 22- Mercer LP, Flodin NW, Morgan PH. New methods for comparing the Biological efficiency of Alternate Nutrient Sources. *J Nutr* 108; 1244-9, 1978.
- 23- O'Donnell S, Cranney A, Horsley T, Weiler HA, Atkinson SA, Hanley DA, Ooi DS, Ward L, Barrowman N, Fang M, Sampson M, Tsertsvadze A, Yazdi F. Vitamins, minerals, and phytochemicals. Efficacy of food fortification on serum 25-hydroxyvitamin D concentrations: systematic review. *Am J Clin Nutr* 88(6); 1528-34, 2008.
- 24- Hess SY, Brown KH. Impact of zinc fortification on zinc nutrition. *Food Nutr Bull* 30 (1 Suppl); S79-107, 2009.
- 25- Brown KH, Hambidge KM, Ranum P. Zinc fortification of cereal flours: current recommendations and research needs. *Food Nutr Bull*. 31(1 Suppl); S62-74. 2010.
- 26- Quinlivan EP, Gregory JF. Effect of food fortification on folic acid intake in the United States. *Am J Clin Nutr* 77(1); 221-5, 2003.
- 27- French AE, Grant R, Weitzman S, Ray JG, Vermeulen MJ, Sung L, Greenberg M, Koren G. Folic acid food fortification is associated with a decline in neuroblastoma. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 74; 288-94, 2003.
- 28- Mannar V, Gallego EB. Iron Fortification: Country Level Experiences and Lessons Learned. *J Nutr* 132; 856S-8S, 2002.
- 29- Hotz C, DeHaene J, Woodhouse LR, Villalpando S, Rivera JA, King C. Zinc Absorption from Zinc Oxide, Zinc Sulfate, Zinc Oxide + EDTA, or Sodium-Zinc EDTA Does Not Differ When Added as Fortificants to Maize Tortillas. *J. Nutr.* 135: 1102-1105, 2005.
- 30- Diaz M et al. Bioavailability of zinc sulfate and zinc oxide added to corn tortilla. A study using stable isotopes. *FASEB Journal*, 15:A578.5, 2001. (Abstract).
- 31- Lopez de Romana D, Lonnerdal B, Brown KH. Absorption of zinc from wheat products fortified with iron and either zinc sulfate or zinc oxid. *Am J Clin Nutr*, 78:279-283, 2003.
- 32- Guidelines on food fortification with micronutrients. Editado por Lindsay Allen, Bruno de Benoist, Omar Dary y Richard Hurrell. World Health Organization y Food and Agricultural Organization of the United Nations. Part III. Fortificants: physical characteristics, selection and use with specific food vehicles. Cap 6: Zinc, folate and other B vitamins, vitamin C, vitamin D, calcium, selenium and fluoride: 124-34, 2006.