

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA**

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE HIERRO SOBRE LA
ABSORCIÓN DE ZINC EN LA TORTILLA DE MAÍZ**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA
KARLA ELENA GONZÁLEZ ROMERO**

MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Ciencia Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por haber proporcionado todas las facilidades para que este proyecto se llevara a cabo.

Al Dr. Jorge Luis Rosado Loría, por compartir sus conocimientos y darme todo el apoyo necesario, pero sobretodo por su valiosa amistad.

A Maggie, por haber asesorado mi trabajo día a día y compartir momentos inolvidables.

A todos aquellos compañeros y grandes amigos del Instituto quienes me apoyaron en la realización de este trabajo y estuvieron motivándome en los momentos difíciles, gracias Gladis, Lulú, Ade, Clau, Reina, Eva, Sarita, Rodri, Juan, Silvia, Elsa, Martita, Lau, Pepe, Angely, Eli y Laura.

A Maricarmen Caamaño por su valiosa ayuda en la realización de este trabajo.

A todos los amigos que han compartido la vida conmigo.

GRACIAS

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo de tesis:

- ❖ A Dios que es el principal motor en mi vida.

- ❖ A mis queridos padres por su amor y apoyo incondicional.
Gracias por todo Genaro y Flor, los Amo.

- ❖ A mis hermanos Alma, Ivan y Omar por ser mis compañeros de ruta en todo momento.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. GENERALIDADES	4
2.1 Deficiencia de minerales en el mundo	4
2.2. Implicaciones funcionales por deficiencia de zinc	6
2.3. Estrategias mundiales para corregir la deficiencia de vitaminas y minerales	8
2.3.1. Adición de hierro	11
2.3.1.1. Formas de hierro más empleadas en alimentos	12
2.3.1.2. Alimentos que se adicionan con hierro	19
2.3.2. Adición de zinc	19
2.3.2.1. Formas de zinc más empleadas en alimentos	20
2.3.2.2. Alimentos que se adicionan con zinc	21
2.3.3. Adición de vitaminas	21
2.4. Adición de vitaminas y minerales a la harina de maíz en México	23
2.4.1. Dosis de adición	23
2.4.2. Forma química de adición	25
2.5. Biodisponibilidad de zinc en la dieta mexicana	27
2.6. Interacción hierro y zinc	29
3. OBJETIVOS	31
4. HIPÓTESIS	32
5. METODOLOGÍA	33
5.1. Tipo de estudio	33
5.2. Diseño experimental	33
5.2.1. Tratamientos experimentales	35
5.2.2. Intervención con los sujetos	37
5.2.2.1. Preparación y administración de dietas	37

	Pág.
5.2.2.2. Recolección de muestras de heces	42
5.2.3. Post- intervención	43
5.2.3.1. Procesamiento de muestras fecales	43
5.2.3.2. Determinación de zinc por Espectrofotometría de Absorción Atómica	45
5.2.3.3. Purificación de muestras de heces y tortillas	46
5.2.3.4. Envío de muestras de heces y tortillas para determinar isótopos de zinc	48
5.3. Variables de medición	48
5.3.1. Zinc consumido	48
5.3.1.1. Isótopos de zinc consumidos	50
5.3.2. Zinc excretado	53
5.3.2.1. Fracción de isótopo excretado	55
5.3.2.2. Fracción acumulada de isótopo excretado	56
5.3.3. Fracción absorbida de zinc	58
5.3.4. Zinc absorbido	59
5.3.5. Ác. fítico consumido y su relación molar con zinc	60
5.4. Análisis de datos	61
6. RESULTADOS DISCUSIÓN	62
6.1.Descripción de sujetos	62
6.2.Administración de dietas	64
6.3.Recolección de heces	65
6.4.Consumo de zinc por tratamiento	66
6.5.Consumo de isótopos de zinc por tratamiento	69
6.6.Zinc excretado	71
6.7.Fracción absorbida de zinc	73
6.8.Cantidad absorbida de zinc	76
6.9.Cantidad de ácido fítico consumido	81

	Pág.
CONCLUSIONES	87
BIBLIOGRAFÍA	88
ANEXOS	96
I	96
II	97
III	98
IV	103

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha observado que la deficiencia moderada de algunas vitaminas y minerales se presenta en varias regiones del mundo en una proporción elevada de individuos. En México se asocia básicamente con la pobreza y las consecuencias se manifiestan en un retraso en el crecimiento, una mayor susceptibilidad a padecer enfermedades o en una disminución de la capacidad neurocognitiva.

Como medida para frenar dicho problema, la Secretaría de Salud en 1999 inició un programa para promover la adición de nutrimentos a las harinas de trigo y de maíz procesadas industrialmente. Por medio de esta medida se busca mejorar el valor nutricional de las harinas y productos que se elaboran a partir de las mismas y por tanto favorecer la salud y el bienestar de los individuos que las consumen. Se debe aclarar que de ninguna manera se considera que esta medida por sí sola, eliminará la deficiencia de vitaminas y minerales pero constituye una medida relativamente sencilla y barata que puede contribuir a aumentar la ingestión de nutrimentos en las poblaciones con riesgo de sufrir estas deficiencias.

Dentro de los minerales que se han propuesto adicionar a las harinas se encuentran el hierro y zinc los cuales pueden presentar competencia entre sí para ser absorbidos por el organismo, específicamente la adición de hierro a los cereales podría disminuir la absorción de zinc por tal motivo, Rosado et al desarrollaron en México un proyecto de investigación donde se pretende conocer el efecto de la adición de hierro sobre la absorción de zinc utilizando la técnica de marcado con isótopos estables para determinar su biodisponibilidad con la finalidad de generar resultados que apoyen con más fuerza la adición de micronutrimentos

en los alimentos y así esperar que indirectamente el consumo de la tortilla de maíz ayude a mejorar el estado nutricional de los individuos.

El presente trabajo tuvo como objetivo apoyar directamente en el desarrollo del estudio en la etapa de intervención con los sujetos y post-intervención, la aportación fue la siguiente:

- ✓ Elaborar y administrar las dietas a los sujetos del estudio
- ✓ Recolectar durante 13 días todas las muestras fecales de cada sujeto
- ✓ Procesar y almacenar las muestras fecales
- ✓ Determinar zinc en muestras fecales por Espectrofotometría de Absorción Atómica
- ✓ Determinar zinc en muestras de tortillas de maíz por Espectrofotometría de Absorción
- ✓ Purificar las muestras de heces para la determinación de los isótopos estables de zinc
- ✓ Recolectar los resultados de los análisis y elaborar la base de datos

Con las actividades mencionadas se pudo determinar:

- ✓ El zinc consumido por sujeto
- ✓ El zinc excretado por sujeto
- ✓ La Fracción absorbida de zinc
- ✓ La cantidad absorbida de zinc en cada tratamiento
- ✓ La cantidad de ácido fólico consumido
- ✓ La relación molar ácido fólico: zinc

Cabe destacar que el presente escrito menciona todas las aportaciones que fueron necesarias para poder alcanzar el objetivo principal del

estudio, aunque no fueron realizadas directamente por la responsable de este trabajo son necesarias incluirlas para poder calcular y comentar algunos resultados. Las actividades complementarias estuvieron a cargo por el grupo de investigadores del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) que colaboraron en el estudio con excepción, del análisis de isótopos de zinc el cual fue realizado en la Universidad de Denver Colorado.

Las actividades complementarias fueron las siguientes:

- ✓ La adición de nutrimentos a la harina de maíz
- ✓ El marcado de harina de maíz con el isótopo estable de zinc
- ✓ La selección de sujetos
- ✓ El diseño de la dieta para los sujetos
- ✓ La toma de muestra de sangre
- ✓ El análisis de zinc en plasma y eritrocitos
- ✓ El análisis para determinar los isótopos de zinc
- ✓ El análisis para determinar ácido fólico
- ✓ El análisis estadístico

2. GENERALIDADES

2.1. DEFICIENCIA DE MINERALES EN EL MUNDO

La desnutrición y las deficiencias de micronutrientes constituyen problemas importantes de salud pública en varios países del mundo incluyendo México. Existe evidencia sobre prevalencias elevadas de retardo en crecimiento, anemia, deficiencias de vitamina A y de yodo en países en vías de desarrollo. Datos obtenidos durante el último decenio indican que un 56% en mujeres embarazadas, 43% en mujeres en edad fértil, 34% en menores de 5 años, 43% en niños entre 5 y 14 años y 34% en varones adultos presentan anemia por deficiencia de hierro (1). La deficiencia de minerales en los humanos puede deberse a una disminución en la ingestión de algún micronutriente, a un aumento en las necesidades del organismo, o bien, a una disminución en la biodisponibilidad por la forma en la que se encuentran presentes en los alimentos (2).

En el caso de México que es un país de grandes contrastes en donde prevalece la heterogeneidad geográfica, económica, social y cultural de su población se ha visto que en el aspecto de nutrición, los contrastes no son la excepción, existiendo deficiencias de nutrientes específicas (3).

El nutriente cuya deficiencia ha sido más estudiada en México es el hierro (4,2). Rosado y cols. realizaron una revisión de los estudios relacionados con la deficiencia de minerales en México que se publicaron entre 1948 y 1994, en 25 estudios se evaluó el estado nutricional de hierro en diferentes poblaciones del país. Los estudios en conjunto muestran una frecuencia muy alta de anemia en la población mexicana que puede ir desde el 10 % hasta el 70 %, dependiendo de la región, y se presenta

en poblaciones tanto en zona rural como en zona urbana. La alta deficiencia de hierro en el país ocurre a pesar de que en la mayoría de los casos la ingestión del mineral está por arriba de las cantidades recomendadas (5).

En 1999, la Encuesta Nacional de Nutrición documentó prevalencias de anemia de 20.2% para mujeres en edad fértil; 26.2% para mujeres embarazadas y 20% para mujeres no embarazadas. La prevalencia de anemia fue menor en las zonas urbanas (26.1%) que en las rurales (29.5%) (6).

Datos actuales reportados en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición-2006 refieren prevalencias de anemia de alrededor del 17.3% para mujeres en edad fértil; 20.6 % para mujeres embarazadas y 15.5% para mujeres no embarazadas (7) y aunque es evidente que la anemia se ha reducido en los últimos años es necesario contar con medidas preventivas y correctivas.

En el caso de zinc, la deficiencia se asocia sobre todo con la ingestión de dietas altas en ácido fólico y fibra dietética que reducen su biodisponibilidad (8).

En general, en México se han realizado muy pocos estudios que evalúen el estado nutricional de zinc en la población. Un estudio inicial informó una incidencia de valores bajos de zinc en plasma de 24% en un grupo de 219 niños en una zona rural del Estado de México en mujeres en edad reproductiva, la incidencia de deficiencia fue de 22% (5). En 1999, la Encuesta Nacional de Nutrición evaluó el estado nutricional de zinc en una muestra representativa de varias zonas del país y a diferentes edades, aproximadamente 25% de la población estudiada presenta

concentraciones de zinc en plasma por debajo de 65 $\mu\text{g/dL}$, valor que se considera deficiente, se encontró deficiencia de 33% en niños menores de 2 años y de aproximadamente 22% en preescolares; en mujeres embarazadas, la deficiencia es de casi 31%, mientras que en mujeres no embarazadas es de 29%. En general, la deficiencia de zinc es ligeramente mayor en zonas rurales que en zonas urbanas (6).

2.2. IMPLICACIONES FUNCIONALES POR DEFICIENCIA DE ZINC

La deficiencia de zinc fue primero caracterizada en varones jóvenes en Irán y Egipto quienes mostraron estatura corta, hipogonadismo, anemia y concentraciones bajas de zinc en plasma (9). La deficiencia severa de zinc se ha visto en pacientes con acrodermatitis enterohepática y en pacientes con nutrición paraenteral total con carencias de zinc (8). Las formas leves y moderadas de deficiencia de zinc, aunque es controversial, pueden causar retraso de crecimiento, afectar la respuesta inmune, el comportamiento y la respuesta cognitiva por tal motivo, se requieren estudios epidemiológicos que identifiquen la magnitud de estas deficiencias y quizá las de otros minerales que no han sido estudiados (5,9,10,11).

Las consecuencias funcionales de la deficiencia de zinc aparecen antes de que los niveles en plasma y/o en algún otro tejido se vean disminuidos (8,12).

También en presencia de diarrea se afecta el estado de zinc mediante una disminución en la ingestión, cambios en la absorción intestinal y un incremento en las pérdidas en heces, por lo que durante la diarrea aumentan las necesidades de zinc para mantener un balance positivo.

De esta manera, en los niños con alta incidencia de diarrea se presenta un ciclo de deprivación de zinc en el que se inicia un balance negativo del nutrimento que aumenta la incidencia de diarrea; esto, a su vez, produce un mayor deterioro en el estado nutricional de zinc, lo que incrementa la diarrea y la desnutrición (8,13).

La deficiencia de zinc retrasa el crecimiento (11) y la maduración sexual (14) así como la maduración de las neuronas afectando la actividad electrofisiológica y de transmisión en el cerebro mediante mecanismos que no han sido plenamente identificados; el efecto que ello produce en la capacidad cognoscitiva sólo ha sido sugerido en estudios muy preliminares en China (8).

En niños mexicanos se aplicaron pruebas de desarrollo cognoscitivo a 219 niños de entre 30 y 48 meses de edad, de una zona rural del Estado de México, y las calificaciones obtenidas se asociaron con diferentes indicadores del estado nutricional, incluyendo el zinc. Los resultados de las pruebas de desarrollo cognoscitivo que están asociadas con mecanismos mentales que demandan mayor procesamiento de la información, como lo es la prueba de Peabody, se asociaron con los niveles de zinc en eritrocitos, en una asociación altamente significativa ($p < 0.012$). Esta relación sugiere que la deficiencia de zinc en niños mexicanos puede afectar algunas áreas de su desarrollo cognoscitivo (8,12).

2.3. ESTRATEGIAS MUNDIALES PARA CORREGIR LA DEFICIENCIA DE VITAMINAS Y MINERALES

Actualmente existen tres estrategias propuestas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y UNICEF para abordar las deficiencias de micronutrientes, la fortificación de alimentos, la suplementación y la diversificación de la dieta. De estas estrategias, generalmente se reconoce que la fortificación de los alimentos es el método más eficiente, así como el medio de mayor rendimiento económico para eliminar las deficiencias de micronutrientes (4,15).

En el mundo, la fortificación de alimentos se practica ampliamente y puede clasificarse en tres tipos de programas: 1) La fortificación obligatoria de los alimentos de consumo masivo, 2) La fortificación focalizada para grupos determinados , como la fortificación de alimentos complementarios, cereales para niños y alimentos que forman parte de programas de bienestar social, leche en polvo y alimentos para almuerzos escolares, como los atoles y las galletas, finalmente, 3) La fortificación voluntaria (16).

La fortificación de los alimentos ha sido responsable de la erradicación de varias deficiencias de vitaminas y minerales en los países desarrollados (17,18).

La fortificación consiste en agregar uno o varios nutrientes a un alimento utilizado como acarreador o transporte, el cual debe ser cuidadosamente seleccionado en función de los hábitos alimentarios de la población, así como también del grupo poblacional considerado de riesgo. La ventaja fundamental que posee este procedimiento consiste en que la población que está afectada por la deficiencia de uno o varios

nutrimentos en particular incorpora una cantidad adicional del mismo a través de la dieta que habitualmente está acostumbrada a ingerir, sin que se modifiquen sus costumbres alimentarias (19).

Los alimentos más utilizados como acarreadores deben ser ampliamente consumidos por los grupos de riesgo, los más utilizados para este fin son principalmente los cereales y los productos lácteos y en menor proporción la sal, el azúcar y los condimentos (19).

Los cereales, sus harinas y los productos derivados de ellos, son los más utilizados en la fortificación con hierro, zinc y otros nutrientes, ya que son alimentos que se consumen por la población. Generalmente la cantidad de nutrimentos adicionada a los productos refinados de los cereales es muy baja, ya que habitualmente se les agrega la cantidad necesaria que originalmente poseía el grano entero antes de su refinamiento. En el caso de la fortificación de harina de trigo y maíz, estas cantidades son sustancialmente mayores, del orden de los 55 a 65 mg/Kg de harina (20).

Una de las principales desventajas de utilizar harinas como vehículo de transporte para el hierro y/o zinc radica en su contenido de ácido fítico, el cual llega a ser hasta en un 1% en el grano entero y de 100mg/Kg en harinas refinadas. Este posee un potente efecto inhibitorio sobre la absorción de los nutrimentos, disminuyendo consecuentemente su biodisponibilidad (19, 21)

Otra desventaja que posee la fortificación de harinas y cereales con hierro es su elevada susceptibilidad al enranciamiento. En general, con el fin de evitar este proceso se agregan compuestos inertes de hierro, como pirofosfato férrico y hierro elemental, con la desventaja que los

mismos poseen baja biodisponibilidad. Por esta razón, es necesario agregar cantidades significativamente superiores de hierro (200-500mg/Kg de harina) (22, 23).

Los compuestos más utilizados para fortificar alimentos son el hierro, el yodo y la vitamina A, seguidos por vitaminas del complejo B, vitamina C, selenio, zinc y calcio (17).

La elección del compuesto a utilizar se basa en la biodisponibilidad del mismo, en los cambios sensoriales que pueda producir en el alimento además de su incidencia en el costo final del alimento fortificado (19).

Finalmente, para que cualquier programa de intervención obtenga éxito, debe ser mutuamente aceptable para los proveedores (gobierno, industria, organizaciones de salud pública) y los receptores. En este aspecto la fortificación de alimentos presenta ventajas adicionales, ya que dichos programas son socialmente aceptables en los países desarrollados y políticamente atractivos (4). Además, al utilizar un programa de fortificación no se necesita modificar significativamente la conducta de las personas como lo requeriría un programa de suplementación y diversificación de dieta, lo cual hace que el programa sea rápidamente implementado en la población (19).

Las organizaciones internacionales como la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud, así como la Comisión de Alimentos y Nutrición de los Estados Unidos, han elaborado los siguientes criterios para que un alimento básico sea considerado adecuado para ser fortificado (4, 15,24):

- El alimento debe ser consumido por la población objetivo.
- La ingestión diaria del alimento per capita debe ser estable y uniforme.
- El alimento fortificado debe ser estable bajo condiciones estándares de almacenamiento y uso.
- La fortificación no debe producir cambios sensoriales indeseables en las características del alimento (en olor, color, textura, apariencia).
- La fortificación no debe aumentar significativamente el precio del alimento.
- La fortificación debe ser económicamente factible a través de un proceso industrial.

2.3.1. Adición de hierro

Desde hace tiempo la adición de hierro es el método más usado como medida de salud pública para prevenir anemia. En la actualidad, muchos alimentos, incluidas las fórmulas para lactantes y las que se emplean como sustitutos de la lactancia materna, se enriquecen de acuerdo a normas y principios definidos por organismos internacionales como la OMS y UNICEF (4,16,25).

La absorción de hierro puede incrementarse al aumentar la cantidad de hierro en la dieta pero sobre todo al consumir hierro más biodisponible para el organismo así como algunos compuestos que ayudan a mejorar su absorción como el ác. Ascórbico (16,24).

2.3.1.1. Formas de hierro más empleadas en alimentos

El éxito de la fortificación con hierro depende en gran parte de la forma química del compuesto así como del alimento que se usará como vehículo. La fortificación con hierro es técnicamente más difícil que la de otros nutrimentos ya que las formas biodisponibles de hierro se encuentran en forma química reactiva y producen frecuentemente efectos indeseables en el alimento, los compuestos inertes son los que comúnmente se utilizan pero son pobremente absorbidos y producen un efecto casi nulo en el status de hierro. Por lo anterior, cabe destacar que un paso crítico en un alimento que será fortificado, es la selección de la forma química apropiada de hierro que se va a adicionar al alimento (16,19,25).

Los metales usados para la fortificación en alimentos son clasificados por la FDA y generalmente aceptados por la GRAS. Se clasifican basándose en las recomendaciones de expertos calificados y en la experiencia científica al evaluar la seguridad de las sustancias directamente o indirectamente adicionadas a los alimentos (2,26).

Para clasificar los compuestos se utilizan dos categorías: los compuestos de hierro inorgánico y los compuestos de hierro protegido (16,19).

A su vez los compuestos de hierro inorgánico que pueden utilizarse para la fortificación de alimentos se agrupan de acuerdo a su solubilidad: solubles en agua, poco solubles en agua e insolubles en agua:

- Compuestos de hierro solubles en agua

Sulfato ferroso

Lactato ferroso

Gluconato ferroso

Los compuestos de hierro muy solubles en agua aportan hierro de alta biodisponibilidad y en consecuencia serían los compuestos de elección primaria para ser utilizados en la fortificación de alimentos. Sin embargo, este tipo de compuestos son altamente reactivos provocando la oxidación de las grasas y de algunos aminoácidos y vitaminas del alimento fortificado. En consecuencia, se producen cambios desagradables de las características sensoriales del alimento, además de disminuir el valor nutricional del mismo (19,21)

Esta clase de compuesto, son ampliamente utilizados para fortificar alimentos sólidos deshidratados, que se conservan en envases herméticos aislantes de humedad, como son las fórmulas infantiles. También pueden ser utilizados para fortificar harinas que se utilizan en la elaboración de productos de panificación que se consumen rápidamente. En general este tipo de compuestos no pueden ser utilizados en alimentos líquidos, como agua o bebidas gaseosas, ya que provocan sabores metálicos desagradables (19,21, 27)

Los cereales y derivados, al igual que los productos lácteos frescos fortificados con este tipo de compuestos, son afectados como consecuencia de la oxidación de las grasas, provocando la rancidez del alimento a los pocos días de haber sido fortificado.

También, muchos alimentos fortificados como la sal, el azúcar y productos lácteos, al ser mezclados con otros alimentos que contienen

polifenoles como el té y el café, cambian el color del alimento de tonos negros-grisáceos a violáceos, que los vuelven inaceptables para su consumo (19, 21.)

Por lo tanto, si bien desde el punto de vista de su biodisponibilidad estos compuestos serían la mejor opción para ser utilizados en la fortificación de alimentos, su alta reactividad con los componentes de la matriz nutricional limita significativamente el uso de los mismos como fortificantes alimentarios.

- Compuestos de hierro poco solubles en agua pero muy solubles en soluciones ácidas diluidas como el jugo gástrico

Fumarato ferroso

Succinato ferroso

Estos compuestos son menos reactivos que los compuestos altamente solubles en agua y como se disuelven totalmente en el jugo gástrico poseen, en consecuencia, una elevada biodisponibilidad. Estos compuestos se disuelven lentamente en la concentración ácida normal del estómago. Se absorben tan bien como el sulfato ferroso en los adultos y adolescentes, pero los datos recientes indican que se absorben menos en las personas con una concentración de ácido gástrico inferior, en particular los niños pequeños (16,46).

Estos compuestos han demostrado ser efectivos en la fortificación de cereales ya que no se han detectado problemas de enranciamiento de los mismos. También han sido utilizados exitosamente para fortificar algunas formulas infantiles, al igual que en la cocoa en polvo. Sin embargo, al ser utilizados en la fortificación de harina de trigo, luego de

un periodo prolongado de tiempo de almacenamiento, se ha detectado enranciamiento probablemente como consecuencia de su contenido de humedad. Por otra parte, este tipo de compuestos no pueden ser utilizados en medios líquidos neutros, ya que precipitan debido a su baja solubilidad. Tampoco pueden ser utilizados en la fortificación de productos lácteos frescos, ya que el elevado contenido de humedad sumado a su contenido de grasa, provoca que la fracción de hierro libre produzca el enranciamiento del alimento (19).

En los últimos años diversos estudios han demostrado que la vitamina A **y más aún los β -carotenos** aumentan significativamente la solubilidad de este tipo de compuestos de hierro a un pH prácticamente neutro o ligeramente ácido (pH = 6). Además de disminuir el efecto inhibitorio que provocan los fitatos y polifenoles presentes en la dieta. Si bien, no se conoce claramente el mecanismo por el cual estos compuestos producen dicho efecto, se puede suponer que podría ocurrir a través de la formación de complejos que mantendrían soluble al hierro en el lumen intestinal, previniendo de esta forma los efectos inhibitorios de los taninos y polifenoles en la absorción de hierro. Por lo que la fortificación de determinados alimentos como los cereales y derivados con el **agregado de vitamina A o de β -carotenos** podría resultar una estrategia exitosa para aumentar la biodisponibilidad del hierro.

- Compuestos de hierro insolubles en agua y poco solubles en soluciones ácidas diluidas

Fosfatos de hierro

Ortofosfato férrico

Pirofosfato de sodio férrico

Pirofosfato férrico

Hierro elemental en polvo

Hierro Electrolítico

Carbonílico

Reducido

Estos compuestos son los más utilizados en la fortificación de alimentos, siendo su principal ventaja no causar cambios en las características sensoriales del alimento. Sin embargo, su principal desventaja es la de poseer una muy baja solubilidad en el jugo gástrico y en consecuencia una baja biodisponibilidad.

Estos compuestos, debido a su baja reactividad con la matriz nutricional, son empleados para fortificar una amplia gama de alimentos, especialmente cereales y harinas, que deben ser almacenados por periodos prolongados. Sin embargo, diversos estudios experimentales han demostrado que la absorción de estos compuestos *per se* es variable, siendo en general muy baja del orden del 5 al 40% con respecto al sulfato ferroso. Esta variabilidad de la absorción es consecuencia de la secreción gástrica individual y del tamaño de las partículas del compuesto, ya que para una masa determinada de un cierto compuesto, cuanto menor sea el tamaño de la partícula mayor es la superficie que queda en contacto con el ácido clorhídrico del estómago y en consecuencia mayor será la disolución y absorción del hierro contenido en el compuesto. Sin embargo, cuando disminuye el tamaño de partícula aumenta el precio del compuesto y la reactividad del hierro con el alimento, razón por la cual, la industria alimentaria en general utiliza compuestos de mayor diámetro de partícula.

Como consecuencia de su baja biodisponibilidad cuando estos compuestos son utilizados para la fortificación de algunos cereales

infantiles la cantidad de metal agregado suele ser del orden de los 200 a 550 mg de hierro /Kg juntamente con cantidades generosas de ácido ascórbico como promotor de la absorción (19,21)

- Compuestos de hierro protegido (16)

- Hemoglobina

- EDTA-Fe (III)

- Quelatos de aminoácidos

- Sulfato ferroso estabilizado

- Compuestos de hierro encapsulados

- Sulfato ferroso estabilizado

- Fumarato ferroso

Surgen de la necesidad de utilizar compuestos que aporten hierro con alta biodisponibilidad, como la que poseen los compuestos solubles en agua y que además posean una baja reactividad con la matriz nutricional, con el fin de ser tecnológicamente aptos para ser utilizados en los procesos industriales de fortificación alimentaria (19)

Los cambios sensoriales que se presentan al fortificar los alimentos con estos compuestos son mínimos, presentan buena biodisponibilidad pero en combinación con algunos compuestos pueden cambiar su absorción (28, 29).

La hemoglobina, es un compuesto de hierro naturalmente protegido, esta posee una elevada biodisponibilidad aún en presencia de los inhibidores de la absorción de hierro presentes en la dieta. Sin embargo, su principal desventaja es la de ser un compuesto intensamente coloreado lo que limita significativamente su uso, otra desventaja

resulta de la dificultad de obtener la hemoglobina en condiciones higiénicas adecuadas (19, 21,30).

El EDTA-Fe (III) posee una elevada biodisponibilidad aún en presencia de los inhibidores de la absorción de hierro y es relativamente estable a los procesos industriales de elaboración y almacenamiento. Sin embargo, este compuesto presenta serias desventajas con respecto a los cambios que produce el color de ciertos alimentos cuando este es adicionado a los mismos (16,30).

Compuestos quelados a aminoácidos como el bisglicinato ferroso y el tris glicinato férrico, tienen como ventaja respecto al EDTA-Fe (III) de estar formados por componentes naturales que habitualmente se encuentran en los alimentos, sin embargo, no hay estudios concluyentes con respecto a su biodisponibilidad, a los cambios en las características sensoriales de los alimentos fortificados con estos compuestos, como así también de estabilidad de los mismos a los procesos industriales de producción (16,19,21,31).

El sulfato ferroso encapsulado y el fumarato ferroso encapsulado están disponibles en el mercado para la fortificación de alimentos. En estos compuestos, la sal de hierro está cubierta por capas de aceite hidrogenado, etilcelulosa o maltodextrina, las cuales impiden que los átomos de hierro entren en contacto con otras sustancias en la matriz alimentaria hasta que puedan ser liberados y absorbidos en el intestino delgado. El revestimiento previene o retrasa muchos de los cambios sensoriales adversos que se asocian con estos compuestos de hierro. El sulfato ferroso encapsulado podría ser un compuesto útil para la fortificación de harina de cereal, ya que previene la oxidación de grasas durante el almacenamiento. El costo de sulfato ferroso encapsulado es 3

a 4 veces más que el sulfato ferroso para una cantidad equivalente de hierro y recientemente se ha demostrado que es sumamente eficaz para mejorar el nivel de hierro en los niños que consumen sal fortificada (16,32).

A pesar de los problemas organolépticos que generalmente produce el uso de sulfato ferroso en la fortificación de alimentos, es el compuesto de hierro más utilizado debido a sus niveles de absorción comprobados y bajo costo, seguido del hierro reducido a pesar de su baja biodisponibilidad ya que es menos caro, causa problemas organolépticos mínimos y tiene una larga vida de anaquel. Finalmente, ha ido en aumento el uso de fumarato ferroso porque es muy estable en alimentos a comparación con el sulfato ferroso y tiene una alta biodisponibilidad más que el hierro reducido, aunque este es más caro y puede catalizar la oxidación de grasas y crear problemas organolépticos en cereales durante el almacenamiento (2,16, 19,33).

2.3.1.2. Alimentos que se adicionan con hierro

Los alimentos comúnmente fortificados con hierro incluyen las harinas, productos de panadería, arroz, pastas, cereales para desayuno y fórmulas infantiles (2).

2.3.2. Adición de zinc

La propuesta de adicionar zinc en los alimentos se basa en tratar de ayudar a disminuir la incidencia de deficiencia de zinc ya que estudios recientes demuestran que la deficiencia moderada de zinc aumenta la presencia de enfermedades infecciosas en niños (8,33).

2.3.2.1. Formas de zinc más empleadas en alimentos

Con respecto a la utilización de compuestos de zinc en fortificación de alimentos. La Food and Drug administration (FDA) ha considerado, independientemente de la biodisponibilidad de los mismos, a 5 compuestos de zinc como GRAS para ser utilizados en la fortificación de alimentos (2,26):

- Óxido de zinc
- Sulfato de zinc
- Cloruro de zinc
- Gluconato de zinc
- Estearato de zinc

El óxido de zinc es comúnmente usado en la fortificación de alimentos. En los países industrializados este es un polvo blanco de bajo precio, que no causa problemas organolépticos cuando se agrega en cantidades pequeñas a alimentos sólidos, Sin embargo, este compuesto posee una baja biodisponibilidad .

El sulfato de zinc, es mucho mejor absorbido que el óxido de zinc, pero es más costoso que este, además de producir cambios en las características sensoriales del alimento.

Lamentablemente a diferencia de lo que ocurre en el caso de los compuestos de hierro, no se han desarrollado extensamente los compuestos protegidos de zinc. Los únicos compuestos que se ha desarrollado e investigado es el gluconato de zinc estabilizado con glicina y el zinc unido a metionina, los cuales se utilizan para fortificar lácteos y distintos jugos de frutas. Estos compuestos poseen una

adecuada biodisponibilidad, no producen cambios en las características organolépticas, lo que los convierten en compuestos útiles desde un punto de vista tecnológico-industrial (19).

2.3.2.2. Alimentos que se adicionan con zinc

Los alimentos más utilizados para este fin son principalmente los cereales y los productos lácteos (19) además de algunos jugos hechos a base de frutas (21). Sin embargo, algunos estudios realizados en Brasil demostraron la factibilidad de utilizar eficientemente el agua potable como vehículo de fortificación (21,30,34,35).

2.3.3. Adición de vitaminas

Existen evidencias internacionales sobre la fortificación de alimentos con vitaminas. En Estados Unidos la fortificación de leche con vitamina A y D se inició en los años 40, en esa misma época en el Reino Unido fue obligatoria la adición de vitaminas A y D a la margarina, para dar los valores de nutrimentos similares a los de la mantequilla. Estas medidas fueron acompañadas de importantes campañas de salud pública para prevenir el raquitismo. La adición de vitamina A y D es obligatoria en Bélgica, Dinamarca, Holanda, Noruega y Suecia. También se adicionan vitaminas a la harina de trigo que se utiliza en la elaboración de pan, a los cereales y pastas. Otros productos que se adicionan con vitaminas son los helados ,golosinas, margarina, chocolate, refrescos, yogurt, jugos, malvaviscos, gelatinas y gomas de mascar entre otros. La adición de vitaminas al té se hace preferentemente en la India. En Chile se adicionan a la harina de trigo que se utiliza para elaborar pan vitaminas y micronutrimentos; algunos países latinoamericanos, como Guatemala utiliza la tortilla como parte de la dieta fortificando la harina (36).

En lo que toca a nuestro país, el Gobierno de México ha aplicado un gran número y variedad de políticas y programas de alimentación y nutrición, incluyendo políticas económicas y de precios de alimentos, subsidios a la producción y el consumo de alimentos, programas de distribución de alimentos, incluyendo desayunos escolares, distribución de despensas y de canastas de alimentos, programas de distribución de suplementos con micronutrientes y en 1999 un programa de enriquecimiento de alimentos (1).

En Septiembre de 1999 el Gobierno y representantes de los productores de harina de trigo y maíz nixtamalizado celebraron un convenio en el que se establecieron los lineamientos y las bases técnicas para la fortificación de dichas harinas con una mezcla de micronutrientes que son deficientes en la dieta de amplios sectores del país. La adición de dichos micronutrientes es de carácter voluntario a partir de Septiembre de 1999. La población que se beneficiará principalmente con esta intervención son los grandes grupos de niños en edad escolar, adolescentes y adultos en condiciones de pobreza que consumen ampliamente productos elaborados con harinas enriquecidas. Algunas poblaciones posiblemente no se verán beneficiadas en forma importante por dicho programa. Por ejemplo, las poblaciones rurales que se encuentra aisladas, para quien consume tortillas elaboradas artesanalmente en el hogar o a los niños menores de 3 años quienes consumen habitualmente pequeñas cantidades de tortilla. Sin embargo, por el tamaño de la población potencialmente beneficiaria, el programa es de gran trascendencia para la Salud Pública de México. (1,33).

2.4. ADICIÓN DE VITAMINAS Y MINERALES A LA HARINA DE MAÍZ EN MÉXICO

Las razones más importantes para adicionar nutrimentos a los cereales tienen que ver con la restauración de los nutrimentos que se pierden durante el proceso de molienda de los granos, que se practica en forma generalizada para la obtención de las harinas. Esa restauración puede alcanzar los niveles que existían originalmente en el grano o, en muchos casos, niveles ligeramente mayores dependiendo de las circunstancias y características de la región donde se lleve a cabo el proceso. La segunda razón, consiste en la utilización de los cereales como vehículo para aumentar el consumo de uno o varios nutrimentos, cuya deficiencia es reconocida en la población en general, o bien, en un segmento importante de ella (28,33,36).

2.4.1. Dosis de adición

Para definir las dosis de adición a la harina de maíz, se consideró el criterio de restauración similar a lo que se hace en otros países: tiamina, riboflavina, niacina y hierro (37). El nivel de restauración de la Tiamina de acuerdo con los estudios internacionales es aproximadamente 4.4 mg/Kg donde se consideró el grado máximo de extracción en la obtención de la harina. Esta pérdida de nutrimentos debido a la molienda y refinación se incrementa en la elaboración de productos finales como pan o pastas, en el caso del trigo, y tortilla, en el caso del maíz; la pérdida de tiamina en la transformación de la harina de maíz en tortilla puede ser de hasta 40% del valor inicial en la primera (38). Al tomar en cuenta los niveles de pérdida de nutrimentos en la molienda de los granos y en la elaboración de los productos finales, así como los niveles que se adicionan en otros países, se propone un nivel de adición

de tiamina de 5 mg/Kg de harina producida tanto en el trigo como en el maíz. Las pérdidas de riboflavina durante la molienda son aproximadamente 0.6 g/ Kg (60%) en el trigo y de 0.5 g / Kg (55%) en el maíz. Sin embargo, existen pérdidas muy importantes durante la elaboración de alimentos a partir de la harina, (39) por lo que la mayoría de los países adicionan entre 1.5 y 3 mg/Kg. Además, en la elaboración de la tortilla se puede perder hasta 50% de la riboflavina, (38) de tal manera que se recomienda una adición de riboflavina de 3 mg/Kg. La pérdida de niacina es de aproximadamente 22mg/Kg en la molienda del trigo, y de cerca de 7 mg/Kg en la del maíz; es de todos sabido que el maíz constituye una fuente pobre de niacina y triptofano (40) y si bien la nixtamalización aumenta la biodisponibilidad de la niacina, (41) se considera benéfico adicionar la misma cantidad de niacina a las dos harinas, a pesar que desde el punto de vista puramente de restauración el maíz podría llevar menos. El nivel recomendado es de 35 mg/Kg de harina (28,33).

De hierro se pierde aproximadamente 25 y 13 mg/Kg de harina durante la molienda para el trigo y el maíz, respectivamente. Considerando las pérdidas posteriores en proceso y debido a que, en materia de deficiencias de nutrimentos, la de hierro es la más importante en México (5,16,28), se recomienda la adición de 30 mg/Kg para ambas harinas. Esta recomendación es compatible con los niveles de adición que se observan en la mayoría de los países (5,33,35).

Además de los nutrimentos incluidos en la restauración, se consideró benéfica la adición de ácido fólico y de zinc a las harinas de trigo y maíz (28,33). Para la adición de ácido fólico a la harina de trigo se propone el nivel que ya había sido determinado en la norma oficial mexicana NOM 147-SSA1 1996 que es de 2 mg/Kg de harina, considerado el más

adecuado para contribuir a prevenir el riesgo de defectos del cierre del tubo neural. Este nivel de ácido fólico sería excesivo para el maíz dado que se consume, en general, en mucho mayor cantidad por lo cual se propone un valor de 0.5 mg/Kg, muy similar al de riboflavina y niacina de acuerdo con la proporción de las recomendaciones que aportan. Este valor es similar al propuesto recientemente en los EUA para la harina de trigo, que constituye el cereal de mayor consumo en aquel país (33,37). Finalmente, se sugiere una adición de zinc de 20 mg/Kg para ambas harinas (33). En la tabla 1 (ver anexo I) se muestra la fórmula para fortificar harina de maíz en México.

2.4.2. Forma química de adición

Como se ha visto, uno de los aspectos críticos que hay que tomar en cuenta para definir una mezcla de nutrimentos que se utiliza para adicionar al alimento que se pretende fortificar, es la selección de la forma química del nutrimento. En general, las harinas de maíz y trigo se fortifican con vitaminas hidrosolubles como tiamina, riboflavina, niacina y ácido fólico. Se adicionan en forma cristalina directamente a la harina o en forma de premezcla utilizando las sales más comunes como mononitrato de tiamina, hidroclorehidrato de riboflavina, ácido nicotínico y ácido fólico (16,28,33,36).

En cuanto a la selección de la fuente más apropiada de minerales, la definición es menos obvia y requiere la consideración de varios factores, entre los que destacan la reactividad de la fuente de nutrimentos, la biodisponibilidad del nutrimento (grado de absorción y utilización del nutrimento en el organismo humano) y el costo del compuesto, que afectará al costo total de la fortificación (16,28,33).

En lo tocante a fuentes de hierro, las formas más utilizadas para ser adicionadas a las harinas de maíz, son el sulfato ferroso y el hierro reducido (42). El sulfato ferroso presenta una mejor biodisponibilidad pero es muy soluble, lo que lo hace más reactivo y puede causar el deterioro de algunos productos de harina de maíz o reducir su vida de anaquel (43). Se han notificado problemas de deterioro en el color y de rancidez con el uso de sulfato ferroso (44). Por otro lado, el uso de hierro reducido en harinas de maíz y trigo ha aumentado ya que se ha visto que utilizando polvo extrafino de hierro (el tamaño de las partículas está definido para que 95% del hierro pase a través de una **malla estándar de 3.25 μ cas**) se mejora la biodisponibilidad alrededor de 90% comparada con sulfato ferroso (45). El uso de hierro reducido extrafino mantiene cierta ventaja sobre el uso del sulfato ferroso considerando su larga vida de anaquel, los cambios mínimos que ocasiona en las propiedades organolépticas del alimento y su costo (16,26,28,33).

Por otra parte, existen varios compuestos que pueden utilizarse para la adición de zinc a las harinas de maíz. Los dos más empleados que han demostrado tener una efectividad muy similar para el caso de las harinas, son el sulfato de zinc y el óxido de zinc. De manera similar a lo que ocurre con el hierro, el sulfato de zinc es más soluble y, por lo tanto, más disponible y más reactivo, lo cual incrementa el riesgo de deterioro en el producto (33).

2.5. BIODISPONIBILIDAD DE ZINC EN LA DIETA MEXICANA

El estado nutricional de zinc depende de la cantidad ingerida y de su biodisponibilidad. (8) Los alimentos de origen animal, particularmente las carnes, los mariscos y el pescado, son fuentes ricas en zinc, y su biodisponibilidad es alta ya que durante su digestión se liberan ciertos aminoácidos y péptidos que contienen lisina y que forman complejos solubles con el zinc (11,50). En México la contribución de los alimentos de origen animal a la dieta es muy limitada, en particular en la población rural y en la marginal urbana, cuya dieta se restringe al maíz y al frijol, adicionados con cantidades variables de verduras y frutas (81). Estas dietas presentan concentraciones elevadas de ácido fítico y de fibra dietética que inhiben la absorción de zinc. El ácido fítico es la forma principal en la que se almacena el fósforo en los cereales, las leguminosas y las oleaginosas y es el inhibidor más potente de la absorción de zinc (47-50), ya que forma complejos insolubles a pH fisiológico. En relación con las fibras dietéticas, se ha sugerido que las insolubles, como la celulosa y la lignina que se encuentran sobre todo en los cereales, contribuyen a disminuir la absorción del zinc. Otro factor que puede afectar su absorción y que es relevante en las dietas que se consumen en México es el calcio, cuyos niveles elevados en la dieta pueden formar complejos de Ca:Zn:fitatos que son menos solubles que los complejos formados por los minerales solos(8,51).

En la tabla 2 (ver anexo II), se muestra el consumo de zinc y de sus principales inhibidores en modelos de dietas típicas tanto rurales como urbanas. Puede observarse que a pesar de que no hay una gran diferencia en el contenido de zinc entre ambos modelos de dieta, la rural contiene cuatro veces más fibra dietética, 18 veces más ácido fítico y 1.8 veces más calcio; este último proviene de la adición de hidróxido de

calcio durante la nixtamalización de la tortilla. Así, es de esperar que la dieta rural típica constituya un factor que disminuya la absorción de zinc y un factor potencial de riesgo para la existencia de deficiencia moderada de zinc en la población del país (8).

Con el objeto de evaluar la absorción de zinc en las dietas que se consumen en México, Rosado y colaboradores (52) diseñaron modelos de dietas rural y urbana, ambas representantes del consumo habitual de alimentos en las zonas respectivas del país de acuerdo con los resultados de las encuestas nacionales de alimentación. Con ambas dietas se determinó el contenido, la absorción y la utilización de zinc mediante estudios de balance realizados en 16 mujeres en edad reproductiva. Como puede observarse en la tabla 2, la ingestión de zinc fue muy similar con ambas dietas; sin embargo, 96 % del zinc ingerido se excreta en las heces con la dieta rural, mientras que con la urbana ese valor es de 84 %. La cantidad absorbida de zinc fue tres veces mayor con la dieta urbana que con la rural, y el balance fue doce veces mayor. Estos resultados demuestran que la dieta que se consume normalmente en las zonas rurales de México ejerce un efecto negativo importante en la biodisponibilidad del zinc, y que esta disminución en la absorción y en la retención del nutrimento puede ser un mecanismo que ocasione deficiencia de zinc en una porción importante de la población nacional (8).

2.6. INTERACCIÓN HIERRO Y ZINC

En la literatura se han reportado dos tipos de interacción que pueden ocurrir en sistemas biológicos entre diferentes minerales (26):

El primero se presenta cuando dos elementos comparten mecanismos de absorción, lo cual significa que a una alta concentración de un elemento puede interferir con la absorción del otro. Elementos esenciales como el zinc y hierro pueden interactuar y en algunos estudios se ha observado que el hierro en exceso puede inducir la deficiencia de zinc, ya que comparten una configuración electrónica similar. (53)

El segundo tipo de interacción ocurre cuando una deficiencia de uno de los elementos afecta el metabolismo de otro elemento por ejemplo, cuando existe deficiencia de cobre puede causar una disminución dramática en la actividad de la ferroxidasa, la cual se encarga de movilizar hierro de los depósitos de almacenamiento y de incorporarlo a la hemoglobina pudiendo tener como consecuencia una deficiencia de hierro.

Desde el punto de vista para programas de salud, el primer tipo de interacción es el más importante a considerar, ya que si se utilizan suplementos o se fortifican alimentos, pueden crear efectos adversos en la utilización o aprovechamiento de otros elementos esenciales, sin embargo, el segundo tipo de interacción puede ser considerado porque la pre-existencia de un elemento debilita el estatus del otro elemento.

En varios reportes, se ha demostrado que los elementos de transición que tienen una configuración electrónica similar, interactúan en el tracto

gastrointestinal a nivel de la absorción. Múltiples interacciones pueden darse entre metales traza tales como hierro, cobre, zinc y manganeso (11).

El posible efecto inhibitorio del hierro sobre la absorción de zinc se ha estudiado en diseños en los cuales se ingieren en forma simultánea estos minerales como suplemento o en alimentos fortificados obteniendo como resultado que cuando ambos minerales se administran en solución acuosa o matrices alimentarias simples existe una inhibición en la absorción o en el estado nutricional de zinc cuando la relación molar de hierro inorgánico es 2 veces a la del zinc (2). Sin embargo, cuando ambos minerales son administrados en matrices alimentarias complejas este efecto inhibitorio sólo es significativo en relaciones molares Fe:Zn muy altas, 25:1 (54).

3. OBJETIVOS

GENERALES

- Determinar la cantidad absorbida de zinc en tortillas de harina de maíz con diferentes contenidos de hierro
- Evaluar el efecto de la adición de diferentes cantidades de hierro en la absorción de zinc en la tortilla de harina de maíz.

ESPECÍFICOS

- Elaborar tortillas de harina de maíz marcadas con un isótopo de zinc
- Preparar y administrar las diferentes dietas de cada participante
- Procesar y preparar las muestras de heces y tortillas para el análisis de zinc por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA)
- Determinar zinc en muestras de heces fecales y tortillas de harina de maíz por EAA
- Purificar muestras de tortillas y heces para el análisis de isótopos estables de zinc
- Determinar la cantidad de zinc consumido por sujeto
- Determinar la cantidad de ácido fítico consumido por sujeto y su relación molar con zinc
- Determinar zinc excretado por sujeto
- Calcular la fracción absorbida de zinc por tratamiento y sujeto

4. HIPOTESIS

- No se encontrará un efecto inhibitorio en la absorción de zinc cuando se adiciona hierro en cantidades mayores a las recomendadas ya que la tortilla de maíz se puede considerar como una matriz compleja que evita la interacción de hierro y zinc.

5. METODOLOGÍA

5.1. TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio ciego simple aleatorizado en 10 mujeres mexicanas adultas aparentemente sanas con una edad entre 18 a 45 años, que vivían en la Ciudad de México, a las cuales se les explicó clara y detalladamente la naturaleza del estudio.

5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Todas las actividades que se realizaron durante el estudio se mencionan en el presente escrito pero se explicarán exclusivamente las metodologías que se desarrollaron para la presente tesis (marcadas por un *)

Etapa 1. Realizada antes de la intervención con los sujetos

ACTIVIDADES
Adición de harina de maíz con nutrimentos
Marcado de harina de maíz con un isótopo de zinc
Diseño de dieta experimental (basado en el recordatorio de 24 h)
Selección de sujetos (aplicación de Consentimiento Informado, Historia Clínica, evaluación de los criterios de inclusión y antropometría)

Etapa 2. Intervención con los sujetos

ACTIVIDADES	DIA					
	1	2	3	4	5-14	15
Preparación y consumo de cena estándar*	X	X	X	X		
Recolección de muestra de sangre (5mL)		X				
Preparación y consumo de dieta experimental marcada con un isótopo en desayuno y comida*		X				
Preparación y consumo de dieta experimental marcada con un isótopo en desayuno y comida*			X			
Preparación y consumo de dieta experimental marcada con un isótopo en desayuno y comida*				X		
Recolección de muestra de heces*		X	X	X	X	
Término de la participación del sujeto*						X

Etapa 3. Realizada después de la intervención con los sujetos

ACTIVIDADES
Procesamiento de muestras fecales y muestras de tortilla de harina de maíz*
Determinación de zinc en heces y tortillas de harina de maíz por EAA*
Purificación de muestras de heces*
Análisis de isótopos de zinc en muestras purificadas de heces
Determinación de zinc consumido*
Determinación de Zinc excretado*
Determinación de la fracción absorbida de zinc*
Determinación de la cantidad absorbida de zinc en cada tratamiento*
Análisis de ácido fítico en tortillas de harina de maíz
Determinación de ácido fítico consumido por tratamiento y sujeto*
Determinación de la relación molar ácido fítico: zinc en cada tratamiento*
Análisis de datos

5.2.1. TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES

Cada sujeto consumió tres diferentes tortillas de harina de maíz en tres días, la única variable fue el contenido de hierro en la harina de maíz utilizada para elaborar las tortillas y el isótopo marcador de zinc dentro de una dieta constituida principalmente por pico de gallo (cebolla, chile y jitomate) y jugo.

Tratamiento	Descripción
A	500g de tortillas de harina de maíz adicionada con 20 mg ZnO/Kg de harina de maíz marcadas con 0.6 mg Zn ⁷⁰ /sujeto
B	500g de tortillas de harina de maíz adicionada con 20 mg ZnO + 30 mg de Fe reducido/Kg de harina de maíz marcadas con 1.3 mg Zn ⁶⁷ /sujeto
C	500g de tortillas de harina de maíz adicionada con 20 mg ZnO +60 mg de Fe reducido/Kg de harina de maíz marcadas con 1.3 mg Zn ⁶⁸ /sujeto

Los tratamientos se asignaron al azar y posteriormente se siguió un orden de administración en forma de cuadrado latino como se muestra a continuación:

Día	1	2	3
Sujeto	Tratamiento		
1	A	B	C
2	B	C	A
3	C	A	B
4	A	B	C
5	B	C	A
6	C	A	B
7	A	B	C
8	B	C	A
9	C	A	B
10	A	B	C

5.2.2. INTERVENCIÓN CON LOS SUJETOS (etapa 2)

5.2.2.1. Preparación y administración de dietas experimentales (día 1-4).

Una vez que fue seleccionada y asignada la muestra, se formaron 3 grupos de 4, 3 y 3 sujetos para iniciar por semana el periodo de intervención.

A cada grupo en el día 1, se les pidió que asistieran al lugar y fecha indicado para entregarles su primer cena estándar y darles algunas recomendaciones para que se presentaran a desayunar y comer al día siguiente.

La cena se elaboró el mismo día de intervención en el área de evaluación sensorial del INCMNSZ siguiendo las buenas prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos (83). Todos los alimentos y utensilios necesarios para elaborar y administrar las dietas se almacenaron en esta área contando con un acceso restringido de personal. Los alimentos que requerían refrigeración (jamón, queso, melón, jugo y verduras) fueron almacenados en un refrigerador con temperatura y acceso controlado.

La cena estándar para cada sujeto consistió en un sándwich de jamón de pavo y jamón de pierna con queso fresco, un té de limón y un poco de melón picado. Todos los alimentos fueron pesados de forma individual en una báscula digital marca SARTORIUS previamente verificada y se empacaron para su transporte personal en una lonchera identificada con

las iniciales y código de cada sujeto. La cena fue la misma durante los siguientes 3 días de intervención.

A cada participante se le indicó que debería cenar todos sus alimentos aproximadamente entre 8:00 y 9:00 pm, no consumir ningún otro alimento con excepción de agua pura y ningún medicamento durante los 3 días de consumo de dietas experimentales.

Finalmente, se les pidió que se presentaran al día siguiente (día 2) en ayunas y con su lonchera para registrar los posibles residuos de la cena anterior y empezar a consumir las dietas experimentales.

La cantidad de alimentos administrados en cada cena fue la siguiente:

Alimento	Cantidad (g)
Pan de caja	25
Jamón de pavo	20
Jamón de pierna	20
Queso fresco	20
Melón	100
Te de limón	1

Todos los sujetos desayunaron durante los 3 días aproximadamente de 9:00 a 10:00 am y comieron de 14:00 a 15:00 pm en el área de tecnología de alimentos del INCMNSZ

El desayuno y la comida de los siguientes 3 días consistió en una dieta compuesta básicamente de tortillas de harina de maíz adicionada con una premezcla de vitaminas y minerales marcadas con un isótopo estable de zinc, pico de gallo (jitomate, cebolla y chile serrano) y jugo de manzana.

Las dietas fueron diseñadas por un co-investigador del estudio en el INCMNSZ considerando el promedio de ingesta calórica por día de los sujetos, el cual se obtuvo mediante la aplicación de un recordatorio de 24 horas, que consiste en preguntar a cada uno de los participantes todos los alimentos consumidos durante un día.

Un total de 1768 Kcal (7390.24 KJ) por día estuvieron consumiendo cada uno de los participantes durante los siguientes 3 días de intervención.

Las dietas administradas en desayuno y comida fueron las siguientes:

Tratamiento	Alimento	Cantidad (g)
A	Tortillas de harina de maíz adicionada con 20 mg ZnO/Kg de harina, marcada con 0.6 mg de Zn ⁷⁰	250
	Jitomate	100
	Cebolla	5
	Chile serrano	5
	Jugo de manzana o uva	300
B	Tortillas de harina de maíz adicionada con 20 mg ZnO + 30 mg de Fe reducido/Kg de harina, marcada con 1.3 mg de Zn ⁶⁷	250
	Jitomate	100
	Cebolla	5
	Chile serrano	5
	Jugo de manzana o uva	300
C	Tortillas de harina de maíz adicionada con 20 mg ZnO +60 mg de Fe reducido/Kg de harina, marcada con 1.3 mg de Zn ⁶⁸	250
	Jitomate	100
	Cebolla	5
	Chile serrano	5
	Jugo de manzana o uva	300

Para preparar las dietas de cada sujeto, fue necesario elaborar las tortillas de maíz un día antes de iniciar su consumo. Cada semana se solicitaron los 3 diferentes tratamientos (3 lotes de harina adicionada con diferentes cantidades de zinc y hierro y marcados con un isótopo de zinc) las cuales se recibían empacadas en bolsas selladas y perfectamente identificadas.

La adición y enmarcado de cada lote de harina fue realizada por un co-investigador del estudio del INCMNSZ, el cual empacó los 3 lotes considerando el número de sujetos que se trabajaría por semana y almacenó el producto en congelador a -20°C hasta su uso.

Las tortillas se prepararon de forma independiente según el tipo de tratamiento. Todo el material que se utilizó para su elaboración se lavó previamente con ácido nítrico al 30% y posteriormente se enjuagó con agua desionizada.

Cada harina de maíz adicionada y marcada se colocó sobre una mesa protegida por un plástico y se formó una fuente. Posteriormente se agregó poco a poco agua desionizada en una proporción 1:1.5 respectivamente, mientras se amasaba (aproximadamente 5 min) para incorporar los ingredientes. Una vez que se obtuvo la masa, se dejó en reposo aproximadamente 15 min., se elaboraron testales de 40 g y con ayuda de una prensa se formaron las tortillas, las cuales se cocinaron a fuego medio durante 10s por una cara y 30s para la segunda cara. El peso de cada tortilla fue alrededor de 30g.

Se prepararon 3 diferentes paquetes (tratamiento A, B y C) de aproximadamente 500g de tortillas para cada sujeto los cuales fueron consumidos en 3 días diferentes. Cada paquete se dividió en 2

porciones, una para consumirse en el desayuno y la otra para la comida. Se etiquetaron y se guardaron bajo refrigeración hasta su consumo. De cada lote de tortillas se guardó una muestra para evaluar el contenido de zinc y los isótopos estables. Estas muestras fueron almacenadas a -20°C para su uso posterior.

Todos los alimentos que complementaron la dieta se prepararon antes de cada tiempo de comida, registrando la cantidad administrada y los residuos en caso de existir.

Durante 3 días consecutivos los sujetos desayunaron y comieron dentro de las instalaciones del INCMNSZ una de las tres dietas experimentales según el cuadro de asignación, por la tarde se les otorgaba su cena y se preguntaba si en el transcurso del día habían consumido algún otro alimento o medicamento. A partir del día 5, todos los sujetos continuaron consumiendo su dieta habitual.

5.2.2.2. Recolección de muestras de heces (día 2-14)

En el día 2, antes de su primer desayuno experimental se le pidió a cada participante que pasara al área de toma de muestras biológicas para que un especialista le tomara una muestra de sangre venosa de aproximadamente 5 mL donde un Co-investigador del INNCMSZ evaluó zinc en plasma y en eritrocitos. Además se les indicó que a partir de este momento deberían recolectar todas sus heces de los siguientes 13 días. Inmediatamente después pasaron al comedor para desayunar una de las dietas experimentales.

Antes del desayuno y por las tardes se otorgaba un tiempo para que cada participante entregara todas las muestras de heces recolectadas,

se verificaban y se registraba la fecha y hora de recolección, posteriormente se almacenaban a -20°C para su análisis posterior. A su vez se limpiaban las hieleras y se entregaban nuevos contenedores y congeladores para continuar con la recolección. Si durante el día el sujeto requería de contenedores extras, podía acudir al área de recolección de muestras biológicas y proveerse en el momento que lo requiriera. Finalmente, se le preguntaba a cada sujeto si había tenido algún problema con la recolección de heces.

Una vez que los sujetos consumieron sus tres dietas experimentales (día 2, 3 y 4) durante los siguientes 10 días (día 5 al 14) se presentaban diariamente por la mañana y tarde en el área de recolección de muestras biológicas dentro de las instalaciones del INCMNSZ para entregar sus muestras fecales. Un total de 13 días duró la recolección de muestras de heces.

El día 15 cada sujeto terminó su participación dentro del estudio y recibió una compensación por el interés prestado.

5.2.3. Post-intervención con los sujetos (etapa 3)

5.2.3.1. Procesamiento de muestras fecales

Una vez que se recolectaron todas las muestras de heces de 13 días por sujeto, se inició con el procesamiento el cual incluyó una homogeneización, secado, calcinación y reconstitución para finalmente determinar zinc por Espectrofotometría de Absorción Atómica.

Para eliminar cualquier error en el manejo de las muestras de heces, se utilizó una lista control donde se verificó la existencia de cada una de las

muestras recolectadas, posteriormente se agruparon por sujeto, fecha y hora de recolección.

Todas las heces recolectadas en un día de cada sujeto se pesaron y mezclaron en una licuadora. Se preparó una solución homogénea con agua desionizada en una proporción 1:1, de esta mezcla se tomaron 2 alícuotas de aproximadamente 30-40g cada una y se colocaron en un vaso de precipitado de 250mL previamente pesado. Un total de 13 alícuotas con su duplicado se obtuvieron por cada sujeto, las cuales representaban los 13 días de recolección.

Cada alícuota se llevó a peso constante en un horno de secado a 100 °C y posteriormente se sometió a una calcinación controlada en una mufla marca Thermolyne 53600, Modelo FA1740; Duburque, Iowa, USA. La temperatura de calcinación fue aumentando gradualmente de la siguiente manera: (200 °C/ 3 hrs , 300 °C/1 h , 400 °C/1 h y 450 °C/24 hrs).

Si al final de la calcinación se observaba que las cenizas presentaban puntos negros, se agregaba ácido nítrico concentrado lo suficiente para cubrir las, cuidadosamente se evaporaba el ácido en una parrilla de calentamiento hasta obtener las cenizas libres de materia orgánica.

Cada ceniza fue reconstituida cuantitativamente en una pequeña cantidad de HCl 6N, esta solución se transfirió a un matraz volumétrico y se aforó a 50 mL (volumen de reconstitución). Finalmente, la solución se traspasó a un tubo de plástico libre de zinc y se almacenó a temperatura ambiente para su análisis posterior.

Las muestras de tortillas fueron procesadas de manera similar a las muestras de heces, se agruparon por sujeto y tratamiento para posteriormente secarlas y tomar el peso exacto de la muestra (alícuota), calcinarlas y finalmente reconstituirlas en HCl 6N para su almacenamiento y análisis posterior. Un total de 30 muestras de tortillas se procesaron (3 tortillas representando cada tratamiento consumido por sujeto).

5.2.3.2. Determinación de zinc por Espectrofotometría de Absorción Atómica en muestras de heces y tortillas previamente procesadas

Para evaluar zinc en las muestras de heces y tortillas se utilizó el método de Espectrofotometría de Absorción atómica de acuerdo con la AOAC (55), utilizando un equipo de Absorción atómica marca Perkin Elmer, Modelo 2380; Norwalk, CT 06859-0029, USA.

Todas las muestras procesadas (alícuotas de la muestra total de heces recolectada) fueron previamente agrupadas por sujeto y por día. Mediante una lista de chequeo se fue trabajando por sujeto y de cada muestra procesada de heces se preparó una dilución 101 en la cual se agregaron **100 µL** de muestra procesada de heces y 10 mL de HCl 0.125N. Todas las diluciones se prepararon por duplicado y se colocaron en una gradilla para su análisis inmediato.

Antes de analizar cada muestra se ajustó y calibró el Espectrofotómetro de Absorción Atómica posteriormente se preparó una curva patrón por sujeto con 5 concentraciones de zinc (0.2,0.4,0.6,0.8 y 1 ppm o µg/g) utilizando una solución estándar de zinc marca Perkin Elmer y se determinó la absorbancia de cada concentración, se graficó el valor de

absorbancia contra concentración y se evaluó la linealidad. Si el valor del coeficiente de correlación (r) se encontraba igual o mayor a 0.999 se consideró como una recta aceptable y sólo entonces se programaba el equipo de Absorción Atómica para iniciar con la lectura de las diluciones.

Se evaluó cada una de las diluciones preparadas de cada sujeto junto con sus duplicados y no se aceptó una desviación estándar mayor a 0.001 entre los resultados de absorbancia obtenidos de cada dilución y su duplicado. Finalmente, se hizo un promedio entre las 2 mediciones y se extrapoló la concentración de zinc de cada muestra procesada de heces por sujeto y por día. Si se encontraba alguna absorbancia fuera de la curva estándar se cambiaba la dilución. Cada vez que se leían 6 o 7 diluciones se analizaba una muestra blanco (agua desionizada) para identificar cualquier problema de contaminación o del equipo.

La concentración de zinc en las diluciones se obtuvieron directamente del equipo una vez que el Espectrofotómetro fue programado con la curva estándar de zinc como referencia.

De forma similar se evaluó la concentración de zinc en las tortillas, se preparó una curva patrón y se extrapoló la concentración de zinc.

5.2.3.3. Purificación de muestras de heces y tortillas previamente procesadas

Para la purificación se utilizó la separación en columna por intercambio iónico utilizando una resina aniónica conocida como AG1-X8 marca BioRad.

Se montaron 13 columnas de separación una para cada muestra de heces procesada por sujeto. Primero se colocó un poco de fibra de vidrio en la punta de cada columna (aproximadamente 0.5 a 1 cm de alto) posteriormente se agregó lentamente la resina de intercambio iónico AG1-X8 marca BIORAD poniendo una pequeña cantidad de resina y posteriormente agua, resina, agua y así sucesivamente hasta alcanzar una columna de unos 8 cm de alto. Posteriormente, se limpió la columna empacada agregando lentamente 10mL de agua desionizada, se recolectó una pequeña muestra de eluyente (1mL) y se verificó por espectrofotometría de Absorción Atómica cualquier contaminación evidente de zinc, se consideró como una columna limpia y libre de zinc **si se encontraba $<2\mu\text{g/dL}$ de zinc** en el eluyente.

Una vez limpia la columna y sin trazas de zinc, se adicionaron 2mL de HCl 6N para activar la resina e inmediatamente después se agregó la muestra procesada de heces de cada sujeto, seguida de un lavado de 4mL de HCl 0.5N.

Después se lavó la columna con 1, 10 y 4 mL de agua desionizada, se recuperaron los 3 eluyentes en tubos de plástico libres de zinc con tapa previamente etiquetados. En el primer y tercer eluyente se verificó por Espectrofotometría de Absorción Atómica la inexistencia de zinc y en el segundo eluyente se midió el volumen recolectado (aproximadamente 10 mL) y posteriormente se preparó una dilución 143.85 donde se **agregaron 70 μL de muestra recolectada y 10 mL de HCl 0.1N** para evaluar por Espectrofotometría de Absorción Atómica la concentración de zinc presente y así poder asegurar que se recolectó la mayor parte del contenido de zinc de la muestra procesada de heces.

De la misma forma se llevó a cabo la purificación de las muestras de tortillas para su análisis posterior.

5.2.3.4. Envío de muestras de heces y tortillas purificadas para determinar los isótopos estables de zinc (Zn^{67} , Zn^{68} , Zn^{70}) por Espectrofotometría de absorción de masas

Cada muestra de heces purificada por día y sujeto se colocaron en gradillas de unicel, se forraron con plástico y se empacaron en una caja de unicel con congelantes para enviarse a la Universidad de Denver Colorado en EUA donde se les determinó el por ciento de enriquecimiento de cada isótopo de zinc (Zn^{67} , Zn^{68} , Zn^{70}) por espectrofotometría de Absorción de masas. De la misma forma se empacaron las muestras de tortillas purificadas enviándolas por separado para evitar posibles confusiones o contaminaciones.

5.3. VARIABLES DE MEDICIÓN

5.3.1. Zinc consumido en tortillas de harina de maíz

Una vez que se determinó por Espectrofotometría de Absorción Atómica la concentración de zinc presente en las diluciones de las muestras de tortillas procesadas se calculó la cantidad de zinc presenten un gramo de tortilla en base seca:

$$C_{ZntBS} = Conc\ Znt * dil * Vr * 1 / Ptbs$$

Donde;

$C_{Znt\ BS}$ = Cantidad de zinc (μg) presente en un gramo de tortilla en base seca

$Conc\ Znt$ = concentración de zinc (ppm o $\mu g/g$) presente en la dilución de muestra de tortilla procesada

dil = Factor de dilución (se expresa como volumen final de dilución (mL) / volumen de muestra de tortilla procesada (mL))

Vr = Volumen de reconstitución (muestra de tortilla calcinada y reconstituida en HCL 6N, expresado en mL)

Ptbs = Peso de tortilla en base seca tomada para ser procesada (g)

Después se calculó la cantidad de zinc presente en toda la muestra seca de tortilla que fue procesada:

$$\mathbf{CZnTBS = CZnt BS * PATBS}$$

Donde;

CZnTBS = Cantidad de zinc (μg) presente en toda la muestra de tortilla procesada (alícuota) expresado en base seca

CZnt BS= Cantidad de zinc (μg) presente en un gramo de tortilla en base seca

PATBS= Peso (g) de tortilla (alícuota) expresado en base seca

Posteriormente se calculó la cantidad de zinc presente en un gramo de tortilla fresca (base húmeda):

$$\mathbf{CZntBH = CZnTBS * 1 / PATBH}$$

Donde;

CZntBH = Cantidad de zinc (μg) presente en un gramo de tortilla (base húmeda)

PATBH = Peso (g) de tortilla (alícuota) expresado en base húmeda

La cantidad de zinc administrada a cada sujeto en los 3 tratamientos diferentes fue calculada conociendo la cantidad real consumida de tortillas:

$$\mathbf{ZnA = CZntBH * PTTC}$$

Donde;

ZnA = Zinc administrado (μg) por sujeto y tratamiento

CZntBH = Cantidad de zinc (μg) presente en un gramo de tortilla (base húmeda)

PTTC = Peso total (g) de las tortillas consumidas por sujeto y tratamiento

5.3.1.1. Isótopo de zinc consumido por sujeto y tratamientos

Con la cantidad de zinc administrado por tratamiento y sujeto y los análisis realizados en la Universidad de Denver Colorado donde se determinó el por ciento de enriquecimiento de cada isótopo presente en las muestras de tortillas (base seca) se calculó la cantidad de isótopo estable administrado en cada tratamiento:

$$\mathbf{CZn^{67}TBS = \%E Zn^{67} * CZnTBS / 100}$$

Donde;

CZn⁶⁷TBS = Cantidad de zinc 67 (μg) presente en la alícuota de tortilla de maíz (en base seca) correspondiente al tratamiento B de un sujeto.

%E Zn⁶⁷ = Por ciento de enriquecimiento del isótopo zinc 67 encontrado en la alícuota de tortilla etiquetadas como tratamiento B para un sujeto

CZnTBS = Cantidad de zinc (μg) presente en toda la muestra de tortilla procesada (alícuota) expresado en base seca

$$\mathbf{CZn^{68}TBS = \%E Zn^{68} * CZnTBS / 100}$$

Donde;

CZn⁶⁸TBS = Cantidad de zinc 68 (μg) presente en la tortilla de maíz (en base seca) correspondiente al tratamiento C de un sujeto.

$\%E \text{ Zn}^{68}$ = Por ciento de enriquecimiento del isótopo zinc 68 encontrado en la alícuota de tortilla etiquetada como tratamiento C para un sujeto

CZnTBS = Cantidad de zinc (μg) presente en toda la muestra de tortilla procesada (alícuota) expresado en base seca

$$\mathbf{CZn^{70}TBS = \%E \text{ Zn}^{70} * CZnTBS / 100}$$

Donde;

$CZn^{70}TBS$ = Cantidad de zinc 70 (μg) presente en la tortillas de maíz (en base seca) correspondiente al tratamiento A de un sujeto

$\%E \text{ Zn}^{70}$ = Por ciento de enriquecimiento del isótopo zinc 70 encontrado en la alícuota de tortilla etiquetada como tratamiento A para un sujeto

CZnTBS = Cantidad de zinc (μg) presente en toda la muestra de tortilla procesada (alícuota) expresado en base seca

Para conocer la cantidad de isótopo administrado por sujeto y tratamiento, se calculó la cantidad de isótopo presente en las alícuotas de tortillas (base húmeda):

$$\mathbf{CZn^{67}TBH = CZn^{67}TBS * 1 / PTBH}$$

Donde;

$CZn^{67}TBH$ = Cantidad (μg) de zinc 67 consumido en un gramo de tortillas frescas (base húmeda)

$CZn^{67}TBS$ = Cantidad de zinc 67 (μg) presente en las tortillas de maíz (en base seca) consumido por un sujeto con tratamiento B.

$PTBH$ = Peso (g) de la muestra de tortilla procesada (alícuota) expresado en base húmeda para un sujeto del tratamiento B

$$\mathbf{CZn^{68}TBH = CZn^{68}TBS * 1 / PTBH}$$

Donde;

$CZn^{68}TBH$ = Cantidad (μg) de zinc 68 consumido en un gramo de tortillas frescas (base húmeda)

$CZn^{68}TBS$ = Cantidad de zinc 68 (μg) presente en las tortillas de maíz (en base seca) consumido por un sujeto con tratamiento C.

PTBH = Peso (g) de la muestra de tortilla procesada (alícuota) expresado en base húmeda para un sujeto del tratamiento C

$$CZn^{70}TBH = CZn^{70}TBS * 1 / PTBH$$

Donde;

$CZn^{70}TBH$ = Cantidad (μg) de zinc 70 consumido en un gramo de tortillas frescas (base húmeda)

$CZn^{70}TBS$ = Cantidad de zinc 70 (μg) presente en las tortillas de maíz (en base seca) consumido por un sujeto con tratamiento A.

PTBH = Peso (g) de la muestra de tortilla procesada (alícuota) expresado en base húmeda para un sujeto del tratamiento A

Finalmente se calcula la cantidad de cada isótopo de zinc administrado por tratamiento y sujeto considerando la cantidad de tortillas consumidas:

$$CZn^{67}A = CZn^{67}TBH * PTC$$

Donde;

$CZn^{67}A$ = Cantidad de zinc 67 (μg) administrado a cada sujeto en el tratamiento B

$CZn^{67}TBH$ = Cantidad (μg) de zinc 67 consumido en un gramo de tortillas frescas (base húmeda)

PTC = Peso (g) de las tortillas consumidas por sujeto y tratamiento

$$CZn^{68}A = CZn^{68}TBH * PTC$$

Donde;

$CZn^{68}A$ = Cantidad de zinc 68 (μg) administrado a cada sujeto en el tratamiento C

$CZn^{68}TBH$ = Cantidad (μg) de zinc 68 consumido en un gramo de tortillas frescas (base húmeda)

PTC = Peso (g) de las tortillas consumidas por sujeto y tratamiento

$$CZn^{70}A = CZn^{70}TBH * PTC$$

Donde;

$CZn^{70}A$ = Cantidad de zinc 70 (μg) administrado a cada sujeto en el tratamiento A

$CZn^{70}TBH$ = Cantidad (μg) de zinc 70 consumido en un gramo de tortillas frescas (base húmeda)

PTC = Peso (g) de las tortillas consumidas por sujeto y tratamiento

En todas las muestras de tortillas se determinaron los 3 isótopos de zinc con la finalidad de asegurarnos que no existiera alguna contaminación y verificar que cada lote se hubiera marcado con el isótopo correspondiente, así pues en el tratamiento A se encontró la mayor proporción del isótopo Zn^{70} , en el B se encontró el isótopo Zn^{67} y en el C el isótopo Zn^{68} .

5.3.2. Zinc excretado en muestras fecales

La cantidad de zinc presente en las heces que se recolectaron por día y por sujeto se determinó considerando la cantidad de zinc presente en la alícuota que se utilizó para procesar y el peso de la muestra total de heces recolectada (homogeneizado con agua desionizada).

Se calculó la cantidad de zinc presente en un gramo de alícuota de heces procesadas:

$$\mathbf{CZna = Conc Zn * dil * Vr * 1 / Pa}$$

Donde;

CZna = Cantidad de zinc (μg) presente en un gramo de alícuota

Conc Zn = concentración de zinc (ppm o $\mu\text{g/g}$) presente en la dilución de muestra de heces procesada

dil = Factor de dilución (se expresa como volumen final de dilución (mL) / volumen de muestra de heces procesada (mL))

Vr = Volumen de reconstitución (muestra de heces calcinada y reconstituida en HCL 6N, expresado en mL)

Pa = Peso de alícuota de heces tomada para ser procesada (g)

La cantidad de zinc presente en la alícuota (CZnap) se obtuvo considerando la cantidad de zinc encontrada en un gramo de alícuota y el peso de la alícuota:

$$\mathbf{CZnap = CZna * Pa}$$

Donde;

CZnap = Cantidad de zinc (μg) presente en la alícuota procesada

Pa = Peso de la alícuota (g)

Finalmente, se calculó la cantidad de zinc presente en toda la muestra de heces de un día que fue homogeneizada en agua desionizada (homogenado).

$$\mathbf{CZnH = CZnap * PH}$$

Donde;

CZnH = Cantidad de zinc (μg) presente en toda la muestra de heces recolectada en un día y homogeneizada con agua desionizada (homogenado).

PH = Peso de homogenado (g)

5.3.2.1. Fracción de isótopo de zinc en heces

De las muestras purificadas que se enviaron a la Universidad de Denver Colorado, se obtuvo el por ciento de enriquecimiento de cada isótopo de zinc (Zn^{67} , Zn^{68} , Zn^{70}) presente en cada muestra de heces por día y por sujeto. Los resultados del análisis se capturaron en la base de datos previamente elaborada y se calculó la cantidad de isótopo de zinc presente en las heces recolectadas y homogeneizadas con agua desionizada por día y por sujeto de la siguiente manera:

$$CZn^{67} H = \%E Zn^{67} * CZnH / 100$$

Donde;

$CZn^{67} H$ = Cantidad de zinc 67 (μg) presente en el homogenado

$\%E Zn^{67}$ = Por ciento de enriquecimiento del isótopo de zinc 67

$CZnH$ = Cantidad de zinc (μg) presente en el homogenado

$$CZn^{68} H = \%E Zn^{68} * CZnH / 100$$

Donde;

$CZn^{68} H$ = Cantidad de zinc 68 (μg) presente en el homogenado

$\%E Zn^{68}$ = Por ciento de enriquecimiento del isótopo de zinc 68

$CZnH$ = Cantidad de zinc (μg) presente en el homogenado

$$CZn^{70} H = \%E Zn^{70} * CZnH / 100$$

Donde;

$CZn^{70} H$ = Cantidad de zinc 70 (μg) presente en el homogenado

$\%E Zn^{70}$ = Por ciento de enriquecimiento del isótopo de zinc 70

$CZnH$ = Cantidad de zinc (μg) presente en el homogenado

Conociendo la cantidad de cada isótopo de zinc presente en cada homogenado y la cantidad de isótopo administrado en los tres días de intervención, se calculó la fracción de dosis administrada de cada

isótopo presente en la muestra total de heces recolectada en un día por sujeto:

$$\mathbf{FA Zn^{67}H = CZn^{67} H * 1 / CA Zn^{67}}$$

Donde;

FA Zn⁶⁷H = Fracción de dosis administrada de Zn⁶⁷ presente en la muestra total de heces recolectada en un día por sujeto (homogenado).

CZn⁶⁷ H= Cantidad de zinc 67(μg) presente en el homogenado

CA Zn⁶⁷ = Cantidad administrada de zinc 67 (μg)

$$\mathbf{FA Zn^{68}H = CZn^{68} H * 1 / CA Zn^{68}}$$

Donde;

FA Zn⁶⁸H = Fracción de dosis administrada de Zn⁶⁸ presente en la muestra total de heces recolectada en un día por sujeto (homogenado).

CZn⁶⁸ H= Cantidad de zinc 68 (μg) presente en el homogenado

CA Zn⁶⁸ = Cantidad administrada de zinc 68 (μg)

$$\mathbf{FA Zn^{70}H = CZn^{70} H * 1 / CA Zn^{70}}$$

Donde;

FAZn⁷⁰H = Fracción de dosis administrada de Zn⁷⁰ presente en la muestra total de heces recolectada en un día por sujeto (homogenado).

CZn⁷⁰ H= Cantidad de zinc 70 (μg) presente en el homogenado

CA Zn⁷⁰ = Cantidad administrada de zinc 70 (μg)

Después se calculó la fracción de cada isótopo de zinc que se iba acumulando por día en las muestras de heces durante los 13 días de recolección:

5.3.2.2. Fracción acumulada de isótopo de zinc en heces

Fracción acumulada de isótopo de zinc en las heces del día 1

$$\mathbf{FAA Zn^{67}_{d1} = FA Zn^{67}H_{d1} = FA Zn^{67}H}$$

Donde;

FAA Zn⁶⁷_{d1} = Fracción acumulada de zinc 67 en las muestras de heces del día 1 considerando la dosis administrada de zinc 67

FA Zn⁶⁷H_{d1} = Fracción de dosis administrada de zinc 67 en el homogenado del día 1

Fracción acumulada de isótopo de zinc en las heces del día 2

$$\mathbf{FAA Zn^{67}_{d2} = FA Zn^{67}H_{d1} + FA Zn^{67}H_{d2}}$$

Donde;

FAA Zn⁶⁷_{d2} = Fracción acumulada de zinc 67 en las muestras de heces del día 1 y 2 considerando la dosis administrada de zinc 67

FA Zn⁶⁷H_{d1} = Fracción de dosis administrada de zinc 67 en el homogenado del día 1

FA Zn⁶⁷H_{d2} = Fracción de dosis administrada de zinc 67 en el homogenado del día 2

Fracción acumulada de isótopo de zinc en las heces del día 13 días

Sumando sucesivamente hasta el último día de recolección se obtiene la fracción acumulada del isótopo en las muestras de heces:

$$\mathbf{FAA Zn^{67}_{\Sigma d1 \rightarrow d13} = FA Zn^{67}H_{d1} + FA Zn^{67}H_{d2} + FA Zn^{67}H_{d3} + \dots + FA Zn^{67}H_{d13}}$$

De la misma forma se hizo el cálculo para los otros isótopos de zinc:

$$FAA \text{ Zn}^{68}_{\Sigma d1 \rightarrow d13} = FA \text{ Zn}^{68}H_{d1} + FA \text{ Zn}^{68}H_{d2} + FA \text{ Zn}^{68}H_{d3} + \dots + FA \text{ Zn}^{68}H_{d13}$$

$$FAA \text{ Zn}^{70}_{\Sigma d1 \rightarrow d13} = FA \text{ Zn}^{70}H_{d1} + FA \text{ Zn}^{70}H_{d2} + FA \text{ Zn}^{70}H_{d3} + \dots + FA \text{ Zn}^{70}H_{d13}$$

Por sujeto y tratamiento (marcado por un isótopo) se graficó el tiempo de recolección (días transcurridos) contra la fracción acumulada de isótopo. Se consideró como la fracción máxima acumulada de isótopo de la dosis administrada cuando se obtuvo una fracción constante la cual se definió graficando los últimos 4 a 6 días de recolección y eligiendo la mejor linealidad ($r \geq 0.9$) de la recta graficada.

5.3.3. Fracción absorbida de zinc por tratamiento y sujeto

Una vez que obtuvo la fracción máxima acumulada de cada isótopo de zinc en las muestras de heces mediante una diferencia se obtuvo la fracción de zinc absorbida en cada tratamiento:

$$FAZn^{67} = FmAAZn^{67} - 1$$

Donde;

$FAZn^{67}$ = Fracción absorbida de zinc 67

$FmAAZn^{67}$ = fracción máxima acumulada de isótopo en las muestras de heces a partir de la dosis administrada de zinc 67

$$FAZn^{68} = FmAAZn^{68} - 1$$

Donde;

$FAZn^{68}$ = Fracción absorbida de zinc 68

$FmAAZn^{68}$ = fracción máxima acumulada de isótopo en las muestras de heces a partir de la dosis administrada de zinc 68

$$\mathbf{FAZn^{70} = FmAAZn^{70} - 1}$$

Donde;

FAZn⁷⁰ = Fracción absorbida de zinc 70

FmAAZn⁷⁰ = fracción máxima acumulada de isótopo en las muestras de heces a partir de la dosis administrada de zinc 70

5.3.4. Zinc absorbido por tratamiento y sujeto

La cantidad de zinc absorbido por sujeto en cada tratamiento se calcula considerando la cantidad de zinc consumido y la fracción absorbida de zinc.

$$\mathbf{CAbsZnA = Zn_c * FAZn^{70}}$$

Donde;

CAbsZnA = Cantidad de zinc absorbida (μg) de las tortillas de harina de maíz adicionada con 20 mg ZnO/Kg de harina marcada con Zn⁷⁰(tratamiento A) por el sujeto 1

Zn_c = Cantidad de Zinc (μg) consumida por el sujeto 1 del tratamiento A

FAZn⁷⁰ = Fracción absorbida de zinc 70 por el sujeto 1

$$\mathbf{CAbsZnB = Zn_c * FAZn^{67}}$$

Donde;

CAbsZnB = Cantidad de zinc absorbida (μg) de las tortillas de harina de maíz adicionada con 20 mg ZnO + 30 mg de Fe reducido/Kg de harina marcada con Zn⁶⁷ (tratamiento B) por el sujeto 1

Zn_c = Cantidad de Zinc consumida(μg) por el sujeto 1 del tratamiento B

FAZn⁶⁷ = Fracción absorbida de zinc 67 por el sujeto 1

$$\mathbf{CAbsZnC = Zn_c * FAZn^{68}}$$

Donde;

$CAbsZnC$ = Cantidad de zinc absorbida (μg) de las tortillas de harina de maíz adicionada con 20 mg ZnO + 60 mg de Fe reducido/Kg de harina marcada con Zn⁶⁸ (tratamiento C) por el sujeto 1

Zn_c = Cantidad de Zinc consumida (μg) por el sujeto 1 del tratamiento C

$FAZn^{68}$ = Fracción absorbida de zinc 68 por el sujeto 1

5.3.5. Ácido fítico consumido y su relación molar con zinc

Una vez que se estandarizó el proceso de elaboración de tortillas se elaboraron algunas muestras para que en el INCMNSZ se les determinara el contenido de ácido fítico. El resultado del análisis (141mg de ácido fítico en 100g de tortillas frescas) fue necesario para calcular el ácido fítico consumido por tratamiento y sujeto de la siguiente forma:

Ác.Fítico $_c A = CTCA * 141 \text{ mg} / 100 \text{ g}$

Ác.Fítico $_c A$ = Ácido fítico consumido por sujeto en el tratamiento A

CTCA = Cantidad(g) de tortilla consumida por sujeto en el tratamiento A

De la misma forma se calculó la cantidad de ácido fítico consumido por sujeto en el tratamiento B y C.

Por último se calcularon los moles de ácido fítico y zinc consumidos por sujeto y tratamiento para determinar la relación molar entre ellos:

$RmA_{\text{ác.fítico:zinc}} = m_{\text{ác. fítico}} / m_{\text{Zn}}$

Donde;

$RmA_{\text{ác.fítico:zinc}}$ = Relación molar entre ácido fítico y zinc en el tratamiento A para un sujeto

$m_{\text{ác. fítico}}$ = moles de ácido fítico consumidos por sujeto en el tratamiento A

m_{Zn} = moles de zinc consumidos por sujeto en el tratamiento A

$$\mathbf{RmB_{\text{ác.fítico:zinc}} = m_{\text{ác. fítico}} / m_{\text{Zn}}}$$

Donde;

$RmB_{\text{ác.fítico:zinc}}$ = Relación molar entre ácido fítico y zinc en el tratamiento B para un sujeto

$m_{\text{ác. fítico}}$ = moles de ácido fítico consumidos por sujeto en el tratamiento B

m_{Zn} = moles de zinc consumidos por sujeto en el tratamiento B

$$\mathbf{RmC_{\text{ác.fítico:zinc}} = m_{\text{ác. fítico}} / m_{\text{Zn}}}$$

Donde;

$RmC_{\text{ác.fítico:zinc}}$ = Relación molar entre ácido fítico y zinc en el tratamiento C para un sujeto

$m_{\text{ác. fítico}}$ = moles de ácido fítico consumidos por sujeto en el tratamiento C

m_{Zn} = moles de zinc consumidos por sujeto en el tratamiento C

5.4. ANÁLISIS DE DATOS

Una vez que se recolectaron todos los datos se comparó la fracción absorbida de zinc entre tratamientos, la cantidad absorbida de zinc y la cantidad de ácido fítico presente en la dieta mediante un análisis de varianza.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección, se presentan de manera secuencial los resultados obtenidos del estudio in vivo el cual evaluó el efecto de la adición de hierro en la absorción de zinc en la tortilla de harina de maíz.

6.1. DESCRIPCIÓN DE SUJETOS

En el estudio participaron 10 sujetos con una edad promedio de 34.3 ± 9.7 años, las cuales presentaron un IMC (Índice de Masa Corporal) normal, según los rangos que se consideran en México (IMC 18-24.9) y la OMS (IMC 19-25). La tabla 3. muestra las características descriptivas de los participantes

Tabla 3 . Descripción de los sujetos.

Característica	Valor
Tamaño de muestra	10 mujeres
Edad	34.3 ± 9.7 años
Peso	57.7 ± 9.9 Kg.
Estatura	158.8 ± 8.3 cm
IMC = $\text{Peso} / \text{Talla}^2$	22.725 ± 2.028 Kg/m ²

Como indicador del estado nutricional de zinc se utilizó el nivel de zinc en plasma bajo un criterio de concentración adecuada por arriba de 70 $\mu\text{g/dL}$ para muestras en ayuno (12, 76), también se determinó zinc en eritrocitos pero esta medición sólo se utilizó como un parámetro de apoyo pues no se considera como un buen indicador del estado nutricional de zinc ya que presenta algunas limitaciones para su uso pues la concentración de zinc en sangre está finamente regulada por un mecanismo de homeostasis, lo que hace que, aun durante episodios largos de restricción de zinc en la dieta, no exista cambio en los niveles de zinc en sangre aunado a que no se han establecido niveles de corte. Generalmente, su concentración es aproximadamente diez veces mayor al valor en plasma (10).

En el estudio, 80% de los niveles de zinc en plasma de los sujetos se encontraron por debajo del nivel normal, lo cual indica que la población presentaba al inicio del estudio una deficiencia leve de zinc (Ver Tabla 4). El nivel de eritrocitos en sangre se encontró 16 veces mayor ($1128 \pm 115 \mu\text{g/dL}$) al nivel de zinc en plasma recomendado para un estado normal, dicho dato no refleja la deficiencia moderada encontrada en los niveles de zinc en plasma.

Tabla 4. Promedio de niveles de zinc en sangre en los sujetos al inicio del estudio

Zinc en plasma	$64.9 \pm 5.83 \mu\text{g/dL}$
Zinc en eritrocitos	$11.28 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$

En primera instancia podemos considerar que debido al estado inicial de los sujetos, la absorción se vio favorecida ya que se ha visto que existe un aumento en la velocidad de transporte cuando los estados de zinc se encuentran depletados y sugieren que la absorción de zinc a este nivel puede variar al tipo de alimento y al estado nutricional del organismo en relación con este mineral (8,11,77,78).

6.2. ADMINISTRACIÓN DE DIETAS

La dieta experimental que se administró durante 3 días no presentó ningún problema para seguirla, todos los sujetos consumieron sus porciones de alimentos sin dejar residuos. A cada participante se le recomendó mantener o incrementar su ingestión de líquidos por lo menos 2 L/día, para evitar complicaciones gastrointestinales debido a la ingestión elevada de fibra.

En el estudio no se registró ninguna desviación al protocolo por consumo de otro alimento que no estuviera contemplado en la dieta experimental o por la administración de algún medicamento.

Se consumió un promedio de 502.57 ± 11.29 g de tortillas de harina de maíz marcadas con zn^{70} , 487.50 ± 9.99 g tortillas de harina de maíz marcadas con Zn^{67} y 482.61 ± 7.06 g de tortillas de harina de maíz marcadas con Zn^{68} (ver tabla 5).

Tabla 5. Tortillas consumidas por sujeto y tratamiento

Sujeto	Tratamiento A. Tortillas de harina de maíz marcadas con Zn70 (g)	Tratamiento B. Tortillas de harina de maíz marcadas con Zn67 (g)	Tratamiento C. Tortillas de harina de maíz marcadas con Zn68 (g)
1	485.83	483.93	486.35
2	497.80	466.09	466.39
3	503.36	475.98	482.54
4	500.05	486.60	477.40
5	493.12	491.55	491.88
6	495.11	488.45	482.28
7	499.14	493.35	488.75
8	512.69	497.69	483.90
9	516.23	495.10	480.24
10	522.35	496.26	486.34
Prom	502.57	487.50	482.61
DE	11.29	9.97	7.06

6.3 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE HECES

Ningún Sujeto reportó alguna pérdida de muestra fecal y todos completaron sus 13 días de recolección. Al sujeto C se le pidió que continuará la recolección por un día más ya que nos indicó que por lo general no acude diariamente al baño, lo cual se confirmó con el registro de muestras de heces recolectadas por día (Tabla 6):

Tabla 6. Número de muestras recolectadas por día y sujeto

Sujeto	Días de recolección													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Número de muestras de heces recolectadas en un día													
A	2	2	2	1	1	4	2	2	2	2	1	2	2	
B	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	
C	1	0	1	1	0	2	1	0	3	1	1	0	2	2
D	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	
E	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
F	1	1	1	4	0	2	1	1	2	1	2	1	1	
G	2	1	2	1	2	2	1	1	1	1	2	1	2	
H	1	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	1	2	
I	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
J	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	

El sujeto I recolectó una muestra extra el día 15 antes de la reunión donde se les dio las gracias por participar en el estudio. Esta muestra se incluyó en el procesamiento y en el análisis.

6.4. CONSUMO DE ZINC POR TRATAMIENTO

A partir de las tortillas que se almacenaron por sujeto y tratamiento y después de procesarlas se determinó la concentración de zinc en las alícuotas de cada muestra por Espectrofotometría de absorción Atómica. La cantidad de zinc consumido por sujeto y tratamiento incluye el zinc presente en la harina de maíz, el zinc en la premezcla de vitaminas y minerales que fue adicionada a la harina y el isótopo de zinc que se utilizó para marcar cada tratamiento (Ver tabla 7,8 y 9).

Tabla 7. Zinc consumido en tortillas de harina de maíz marcadas con Zn⁷⁰ (Tratamiento A)

Sujeto	Peso de la muestra de tortilla fresca para análisis (g)	zinc en un gramo de muestra de tortilla fresca (µg)	Zinc consumido (µg)
1	24.64	28.04	13625.09
2	24.30	27.92	13900.37
3	23.45	25.74	12957.19
4	24.16	28.09	14044.35
5	31.66	26.69	13160.76
6	29.00	29.14	14425.90
7	31.12	27.35	13651.80
8	31.09	26.78	13729.89
9	32.52	23.70	12235.56
10	32.06	25.01	13061.80
Promedio	28.40	26.85	13479.27
DE	3.79	1.64	632.60

Tabla 8. Zinc consumido en tortillas de harina de maíz marcadas con Zn⁶⁷ (Tratamiento B)

Sujeto	Peso de la muestra de tortilla fresca para análisis (g)	zinc en un gramo de muestra de tortilla fresca (µg)	Zinc consumido (µg)
1	28.31	30.80	14906.90
2	37.40	30.33	14135.18
3	35.44	29.89	14227.30
4	27.86	32.42	15776.27
5	29.04	29.95	14720.87
6	28.30	35.02	17106.33
7	28.10	28.97	14292.40
8	32.34	29.19	14525.50
9	31.63	27.69	13709.90
10	33.04	28.94	14362.36
Promedio	31.15	30.32	14776.30
DE	3.39	2.08	986.98

Tabla 9. Zinc consumido en tortillas de harina de maíz marcadas con Zn⁶⁸ (Tratamiento C)

Sujeto	Peso de la muestra de tortilla fresca para análisis (g)	zinc en un gramo de muestra de tortilla fresca (µg)	Zinc consumido (µg)
1	29.75	29.10	14154.24
2	35.80	25.58	11930.11
3	31.05	32.03	15456.06
4	33.08	29.19	13936.46
5	28.61	28.24	13889.44
6	29.45	27.64	13331.23
7	34.54	28.40	13880.52
8	31.56	33.00	15968.80
9	32.19	28.17	13528.15
10	31.64	31.59	15363.30
Promedio	31.77	29.29	14143.83
DE	2.26	2.27	1185.87

La cantidad promedio de zinc consumida por cada tratamiento fue de, 13.48 ± 0.63 mg Zn, 14.78 ± 0.99 mg Zn y 14.14 ± 1.19 mg Zn para las tortillas adicionadas con 20mg de ZnO/ Kg de harina de maíz (tratamiento A), tortillas adicionadas con 20 mg de ZnO y 30 mg de hierro reducido/ Kg de harina de maíz (tratamiento B) y tortillas adicionadas con 20 mg de ZnO y 60 mg de hierro reducido/Kg de harina de maíz (tratamiento C) respectivamente.

Los resultados muestran que el consumo de zinc de los participantes se encuentra ligeramente por arriba de la ingesta diaria recomendada pero dentro del límite aceptable de ingestión diaria de zinc para mujeres de 31-50 años de edad el cual se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 10. Ingestión diaria recomendada (IDR) de zinc para mujeres (12).

Grupo de edad (años)	IDR Recomendada (mg/día)	Límite superior de consumo (mg/día)
9-13	11.6	24
14-18	12.2	34
19-30	11	34
31-50	11	34
51-70	11	34
Más de 70	11	34
Embarazo	14	40
Lactancia	14	40

6.5. CONSUMO DE ISÓTOPOS DE ZINC

La cantidad de isótopo consumido se calculó considerando la cantidad de zinc consumido por sujeto y el por ciento de enriquecimiento de cada isótopo.

Las tablas 11, 12 y 13 muestran que el consumo promedio de isótopo Zn⁷⁰ fue de 0.671 ± 0.035 g para las tortillas adicionadas con 20mg de ZnO/ Kg de harina de maíz (tratamiento A), 1.454 ± 0.155 g de isótopo Zn⁶⁷ para las tortillas adicionadas con 20 mg de ZnO y 30 mg de hierro reducido/ Kg de harina de maíz (tratamiento B) y 1.344 ± 0.111 g de isótopo Zn⁶⁸ para las tortillas adicionadas con 20 mg de ZnO y 60 mg de hierro reducido/Kg de harina de maíz (tratamiento C). Estos resultados cubren la cantidad de isótopos necesario que se indicó para marcar cada tratamiento en el estudio, además cumplen con las dosis típicas utilizadas para marcar tratamientos en diferentes estudios de absorción que van de 1 a 3 mg/sujeto para Zn⁶⁷ y Zn⁶⁸ y < 1 mg/sujeto para Zn⁷⁰ en adultos sanos (70,82).

Tabla 11. Zinc 70 consumido en tortillas de harina de maíz marcadas con Zn⁷⁰ (Tratamiento A)

Sujeto	% de enriquecimiento de Zn 70 en la muestra de tortilla enviada para análisis	µg de Zn 70 en un gramo de tortilla fresca	µg de Zn 70 consumido en tortillas
1	5.001	1.403	681.391
2	5.024	1.403	698.410
3	5.054	1.301	654.857
4	4.963	1.394	697.063
5	5.016	1.339	660.196
6	4.985	1.452	719.146
7	5.036	1.377	687.505
8	4.892	1.310	671.708
9	4.831	1.145	591.125
10	4.999	1.250	652.973
Promedio	4.980	1.337	671.437
DE	0.069	0.090	35.292

Tabla 12. Zinc 67 consumido en tortillas de harina de maíz marcadas con Zn⁶⁷ (Tratamiento B)

Sujeto	% de enriquecimiento de Zn 67 en la muestra de tortilla enviada para análisis	µg de Zn 67 en un gramo de tortilla fresca	µg de Zn 67 consumido en tortillas
1	10.592	3.263	1578.983
2	10.549	3.199	1491.106
3	10.634	3.178	1512.874
4	10.571	3.427	1667.678
5	9.661	2.893	1422.110
6	9.704	3.398	1659.930
7	9.738	2.821	1391.737
8	8.984	2.622	1305.000
9	8.838	2.447	1211.668
10	9.046	2.618	1299.162
Promedio	9.832	2.987	1454.025
DE	0.720	0.352	155.750

Tabla 13. Zinc 68 consumido en tortillas de harina de maíz marcadas con Zn⁶⁸ (Tratamiento C)

Sujeto	% de enriquecimiento de Zn 68 en la muestra de tortilla enviada para análisis	µg de Zn 68 en un gramo de tortilla fresca	µg de Zn 68 consumido en tortillas
1	9.998	2.910	1415.155
2	10.164	2.600	1212.576
3	9.943	3.185	1536.781
4	10.067	2.939	1402.941
5	9.179	2.592	1274.967
6	9.167	2.534	1222.021
7	9.316	2.646	1293.151
8	9.121	3.010	1456.547
9	9.148	2.577	1237.541
10	9.084	2.869	1395.541
Promedio	9.519	2.786	1344.722
DE	0.458	0.225	111.482

6.6. ZINC EXCRETADO

El zinc se excreta principalmente por heces y sólo un 2% (0.3-0.5 mg/día) por vía urinaria (10) en adultos sanos, las pérdidas por descamación y pérdida de sudor son rutas excretorias menores. Considerando entonces que se excrete cerca de un 98% de zinc en heces al día (14.7 a 24.5 mg de zinc) se puede observar que sólo un sujeto excretó un promedio de zinc dentro del rango calculado, el resto de los sujetos tuvieron una excreción menor de 7.68 mg hasta 12.6 mg lo cual nos puede indicar que el zinc que se esperaba encontrar en heces fue absorbido debido al estado inicial de los sujetos.

En el anexo III se muestra el zinc excretado por sujeto durante los 13 días de recolección determinado por Espectrofotometría de Absorción Atómica. El promedio de excreción de zinc por sujeto se muestra en la tabla 14.

Tabla 14. Promedio de zinc excretado en el periodo de recolección.

Sujeto	Promedio Zinc excretado en el periodo de recolección (µg)
1	12291.22 ± 4817.276
2	7682.53 ± 4983.136
3	10169.30 ± 5441.190
4	9741.33 ± 3882.827
5	8634.90 ± 6932.300
6	12610.87 ± 7766.308
7	10484.25 ± 4722.466
8	10119.32 ± 3861.220
9	7924.66 ± 2016.616
10	22859.12 ± 16387.495

6.7. FRACCIÓN ABSORBIDA DE ZINC (FAZ)

Primero se determinó la cantidad de cada isótopo presente en la muestra de heces recolectada por día y sujeto y posteriormente la fracción excretada y acumulada durante la recolección (ver anexo IV)

La FAZ se determinó mediante una diferencia conociendo la fracción máxima acumulada de cada isótopo (ver tabla 15)

Para el caso del sujeto 2 se encontró una FAZ negativa lo cual nos indica que teóricamente el sujeto excretó todo el zinc consumido y parte del zinc endógeno. Posiblemente este resultado se deba a una falla en los procedimientos que debía seguir el sujeto en cuanto a la restricción de consumo de otros alimentos, a una contaminación durante el procesamiento de las muestras de heces o que específicamente la homeostasis de este sujeto fue regulada como respuesta a la variación de la ingesta dietética, incrementando la excreción debido a una ingestión excesiva. Se decidió eliminar este caso para efectos de análisis estadísticos ya que es un parámetro que no expresa absorción de zinc.

Tabla 15. Fracción absorbida de zinc por tratamiento

Sujeto	Fracción máxima acumulada en heces de Zinc 67	Fracción absorbida de zinc 67	Fracción máxima acumulada en heces de Zinc 68	Fracción absorbida de zinc 68	Fracción máxima acumulada en heces de Zinc 70	Fracción absorbida de zinc 70
1	0.771	0.229	0.697	0.304	0.717	0.283
2*	1.362	-0.362	0.832	0.168	0.694	0.307
3	0.541	0.459	0.514	0.486	0.629	0.371
4	0.662	0.338	0.678	0.323	0.673	0.327
5	0.892	0.108	0.916	0.084	0.609	0.391
6	0.633	0.367	0.765	0.235	0.675	0.325
7	0.792	0.208	0.739	0.261	0.723	0.277
8	0.757	0.243	0.633	0.367	0.720	0.281
9	0.364	0.636	0.537	0.463	0.480	0.520
10	0.685	0.316	0.574	0.426	0.727	0.273
Prom	0.677	0.323	0.672	0.328	0.662	0.338
DE	0.155	0.155	0.126	0.126	0.080	0.080

*Se elimina al sujeto para efectos de análisis

Tomando en cuenta la eliminación del sujeto 2, se observa un promedio de FAZ de 0.338 ± 0.080 , 0.323 ± 0.155 y 0.328 ± 0.126 para las tortillas adicionadas con 20mg de ZnO/Kg de harina de maíz, tortillas adicionadas con 20mg de ZnO y 30mg de hierro reducido/Kg de harina de maíz y Tortillas adicionadas con 20mg de ZnO y 60 mg de hierro reducido/Kg de harina de maíz respectivamente. No se encontró diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Los valores de FAZ obtenidos en el estudio se encuentran ligeramente por debajo de los establecidos por la Academia Nacional de Ciencias de los EUA la cual utiliza un promedio de 0.41 y 0.48 para hombres y mujeres respectivamente según estudios con diferentes dietas experimentales (12,79). En México, se encontró una FAZ en tortilla de maíz de 0.22 en un estudio con mujeres adultas en edad reproductiva donde se utilizaron isótopos estables, este valor se extrapoló de manera similar a la publicación para la población de EUA (80) y se obtuvieron valores de absorción fraccional de acuerdo a la edad o estado fisiológico.

En la tabla 16 se muestra la absorción fraccional obtenida para mujeres de 31 a 50 años la cual es muy parecida a la FAZ encontrada en el estudio.

Tabla 16. Fracción absorbida de zinc en mujeres (12).

Grupo de edad (años)	Absorción fraccional
9-13	0.22
14-18	0.29
19-30	0.35
31-50	0.35
51-70	0.35
Más de 70	0.35
Embarazo	0.35
Lactancia	0.35

La FAZ difiere en cuanto a los alimentos que se ingieren. En un estudio realizado por Lopez de Romaña y cols. (68) donde se evaluó en niños la absorción de zinc en diferentes productos de trigo fortificado con hierro y diferentes cantidades de zinc se encontraron fracciones absorbidas de zinc de alrededor de 0.1, 0.2 y 0.3 mientras que en el estudio utilizando maíz adicionado se encontraron fracciones absorbidas alrededor de 0.3.

6.8. CANTIDAD DE ZINC ABSORBIDA

La tabla 17, muestra la cantidad en mg de zinc absorbido por cada sujeto y tratamiento, los promedios encontrados son 4.514 ± 0.885 , 4.768 ± 2.179 y 4.768 ± 1.980 para las tortillas adicionadas con 20 mg ZnO/Kg de harina de maíz (tratamiento A), tortillas adicionadas con 20 mg ZnO y 30mg de hierro reducido/Kg de harina de maíz (tratamiento B) y tortillas adicionadas con 20 mg de ZnO y 60 mg de hierro reducido/Kg de harina de maíz (tratamiento C) respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$). Tomando en cuenta los requerimientos nutrimentales promedio de la

población mexicana descritos en la tabla 18 y la cantidad de zinc absorbida en los tratamientos del estudio, se puede observar que el consumo de tortillas de harina de maíz adicionada con vitaminas y minerales puede ayudar a cubrir las pérdidas intestinales y urinarias de zinc en mujeres de 31 a 50 años de edad pudiendo ocupar la adición como una estrategia atractiva para prevenir y combatir la deficiencia de zinc, sobretodo en zonas del país que usualmente se consume un alto porcentaje de cereales (1,4). Sin embargo, cabe destacar que por sí sola la adición no es suficiente ya que una dieta que es baja en consumo de origen animal y que está básicamente constituida por cereales y leguminosas, puede causar severas deficiencias (57). Los productos de origen animal son usualmente los que proveen la mejor fuente de zinc en términos de contenido y biodisponibilidad (28).

Tabla 18. Requerimientos nutrimentales de zinc en mujeres (12)

Grupo de edad (años)	Requerimientos nutrimentales (mg/d)
9-13	2.12
14-18	2.94
19-30	3.3
31-50	3.3
51-70	3.3
Más de 70	3.3
Embarazo	4.03
Lactancia	4.65

Tabla 17. Zinc absorbido

	Tortillas de harina de maíz adicionada con 20mg ZnO/Kg de harina marcadas con Zn 70			Tortillas de harina de maíz adicionada con 20 mg de ZnO y 30 mg de hierro reducido/Kg de harina marcadas con Zn 67			Tortillas de harina de maíz adicionadas con 20 mg de ZnO y 60 mg de hierro reducido/Kg de harina marcadas con Zn68		
Sujeto	Zn total consumido (mg)	FAZ	mg Zn absorbido	Zn Total consumido (mg)	FAZ	mg Zn absorbido	Zn total consumido (mg)	FAZ	mg Zn absorbido
1	13.63	0.283	3.850	14.91	0.229	3.420	14.15	0.304	4.296
2	13.90	0.307*	4.260*	14.14	-0.362*	-5.114*	11.93	0.168*	1.999*
3	12.96	0.371	4.802	14.23	0.459	6.525	15.46	0.486	7.507
4	14.04	0.327	4.591	15.78	0.338	5.331	13.94	0.323	4.495
5	13.16	0.391	5.143	14.72	0.108	1.594	13.89	0.084	1.167
6	14.43	0.325	4.686	17.11	0.367	6.280	13.33	0.235	3.136
7	13.65	0.277	3.776	14.29	0.208	2.976	13.88	0.261	3.628
8	13.73	0.281	3.851	14.53	0.243	3.533	15.97	0.367	5.867
9	12.24	0.520	6.365	13.71	0.636	8.719	13.53	0.463	6.262
10	13.06	0.273	3.565	14.36	0.316	4.531	15.36	0.426	6.551
Promedio	13.48	0.338	4.514	14.776	0.323	4.768	14.144	0.328	4.768
DE	0.63	0.080	0.885	0.987	0.155	2.179	1.186	0.126	1.980

*No se tomó en cuenta para calcular promedio y DE

En el estudio, no se encontró algún efecto en la absorción de zinc en presencia de 30 y 60mg de hierro reducido, debido tal vez al tipo de alimento ya que varias publicaciones han reportado que puede existir un efecto en la absorción de zinc en presencia de hierro cuando se consumen en soluciones, Solomons demostró que cuando se utilizan 25 mg de hierro se observa una disminución en la absorción de zinc cuando este se consume en solución (61,73), sin embargo, cuando son consumidos en alimentos, dicho efecto varía (1,57).

En otro estudio realizado por Cuong y col. donde se evaluó la absorción de zinc administrado en solución acuosa a diferentes dosis en 8 hombres y mujeres saludables, se encontró que a una dosis de 20mg de sulfato de zinc existe una absorción de $11.0 \text{ mg} \pm 4.4$ en el presente estudio, se encontró una absorción alrededor de 4 mg de zinc, lo cual nos indica que la absorción de zinc en solución acuosa es sustancialmente mayor que en matrices alimentarias complejas (60) sin embargo, evaluando la fracción absorbida de zinc vemos que a dosis de 30 mg de zinc administradas en solución acuosa existe una fracción absorbida de zinc de 0.37 muy similar a la encontrada en este estudio donde se adiciona zinc sin presencia de hierro (0.33) lo cual nos puede indicar que la tortilla a pesar de ser considerada como una matriz alimentaria compleja puede ser un alimento factible para ser adicionado el cual presenta una biodisponibilidad considerable de zinc.

Tal vez no se encontró un efecto en la absorción de zinc en presencia de hierro debido a que la relación molar entre los dos minerales no es suficientemente grande, en el estudio se consideró una relación molar de hierro:zinc de 0:1, 2:1 y 4:1 para las tortillas adicionadas con 20mg de ZnO/Kg de harina de maíz, tortillas adicionadas con 20 mg de ZnO y

30 mg de hierro reducido/Kg de harina de maíz y tortillas adicionadas con 20mg de ZnO y 60mg de hierro reducido/Kg de harina de maíz respectivamente.

En varios estudios donde se ha evaluado la absorción a través de técnicas utilizando isótopos estables (71,74), en diseños en los cuales se ingiere en forma simultánea estos minerales como un suplemento o en un alimento fortificado, han demostrado que cuando ambos minerales se administran en una solución acuosa o matrices alimentarias simples existe una inhibición de la absorción de zinc cuando la relación molar del hierro inorgánico es 2 veces a la de zinc. (2,11,62,63). Sin embargo, cuando ambos minerales son administrados en matrices alimentarias complejas en la cual podríamos incluir a la tortilla este efecto inhibitorio sólo es significativo en relaciones molares Fe:Zn muy altas (25:1) (11,53,54,64). Otro reportes mencionan que la absorción de zinc disminuye cuando existe una relación molar de Fe: Zn (3:1 respectivamente) y el hierro se administra diluido en agua (2,12).

En general, se ha demostrado que los elementos de transición, que tienen una configuración electrónica similar, interactúan en el tracto gastrointestinal a nivel de la absorción mediante un proceso saturable (11), tal vez la causa por la cual el hierro llega a interferir en la absorción de zinc sea que existe una competencia entre los dos metales por los sitios ligandos del transportador de metales divalentes (DMT1) a nivel intestinal el cual se encarga de facilitar su transporte al enterocito. (65,66) sin embargo, en el estudio este efecto es poco probable ya que los sujetos presentaban deficiencia de zinc y puede esperarse que se presenten diversas adaptaciones en el organismo que contribuyan al incremento en las necesidades de zinc, donde se puede incluir un aumento en la capacidad de absorción intestinal (8,77).

La forma química utilizada en la fortificación de harina de maíz puede estar favoreciendo la absorción de zinc ya que el óxido de zinc aunque es poco soluble a pH ácidos se favorece su disociación facilitando la captación del metal al transportador de metales divalentes (DMT1)

En el estudio, se observa que la absorción de zinc no se ve afectada por la presencia de hierro y aunque la absorción obtenida es alta posiblemente se deba principalmente al estado inicial de los niveles de zinc en la población estudiada y a la presencia de otros agentes que pudieran estar favoreciendo la absorción como las proteínas que contiene el alimento ya que en varios estudios se ha reportado que en presencia de aminoácidos como histidina, metionina y cisteína se favorece la absorción de zinc (11).

6.9. CANTIDAD DE ÁCIDO FÍTICO CONSUMIDO

La tortilla, es un alimento básico en la dieta mexicana fuente importante de proteína y energía y que se puede utilizar como vehículo para aumentar la ingestión de otros nutrimentos ya que es el alimento de mayor consumo per capita en México, sin embargo este alimento presenta un alto contenido de ácido fítico y fibra los cuales pueden afectar la absorción de zinc ya que los fitatos y la fibra forman compuestos insolubles a pH fisiológico inhibiendo su absorción. (11,48,56,67,75). Por tal motivo se decidió medir la cantidad de ácido fítico consumido por sujeto y por tratamiento para poder evaluar su efecto.

En las tablas 19,20 y 21 se muestra el consumo promedio en mg de ácido fítico por tipo de tratamiento, los cuales fueron 709.90 ± 17.48 ,

690.71 \pm 9.78 y 683.00 \pm 6.27 para tortillas adicionadas con 20 mg de ZnO/Kg de harina de maíz (tratamiento A), tortillas adicionadas con 20mg de ZnO y 30 mg de hierro reducido/Kg de harina de maíz (tratamiento B) y tortillas adicionadas con 20mg de ZnO y 60 mg de hierro reducido/Kg de harina de maíz (tratamiento C) respectivamente. No hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Para evaluar el efecto del ácido fítico sobre la absorción de zinc hay que considerar la relación molar entre ácido fítico:zinc (69). En un estudio realizado por Adams y cols. (71) donde se compararon 2 tipos de maíz con diferente contenido de ácido fítico en una población de mujeres y hombres adultos de 24 a 39 años de edad, se encontró una mayor absorción fraccional en el maíz con menor cantidad de ácido fítico (0.30 \pm 0.13) comparada con un maíz promedio que se utilizó como control (0.17 \pm 0.11) ($P < 0.005$) (58). Otro estudio realizado por López de Romaña y col. (72) donde se compararon dos alimentos (pan y papilla) en adultos con diferente contenido de ácido fítico, se encontró mayor absorción de zinc en los productos con menor contenido de ácido fítico.

Considerando este criterio, la Organización Mundial de la Salud (48,59) ha propuesto una clasificación de biodisponibilidad de zinc esperada según la relación ácido fítico:zinc para dietas vegetarianas, lacto y ovo vegetarianas, se espera una alta biodisponibilidad de zinc (45 a 55% de absorción) cuando la relación molar es < 5 , una biodisponibilidad moderada cuando la relación molar se encuentra en 5-15 (30-35% de absorción) y una baja biodisponibilidad (10-15% absorción) cuando la relación molar es > 15 (48). En el estudio se encontró una relación molar de ácido fítico: zinc de 5.25 \pm 0.35, 4.63 \pm 0.32 y 4.72 \pm 0.30 y un porcentaje de absorción de zinc como se muestra en la figura 2 de 34, 32 y 33% para tortillas adicionadas con 20mg de ZnO/Kg de harina de

maíz, tortillas adicionadas con 20 mg de ZnO y 30mg de hierro reducido/Kg de harina de maíz y tortillas adicionadas con 20mg de ZnO y 60 mg de hierro reducido/Kg de harina de maíz respectivamente. Los datos obtenidos coinciden con la clasificación propuesta por la OMS y nos indica que la tortilla de maíz es un alimento que presenta una biodisponibilidad moderada de zinc (48).

Para conocer si entre tratamientos existe diferencia significativa con respecto a la relación molar, se realizó un análisis estadístico donde se consideró la razón molar de ácido fítico:zinc como covariable y se consideró una correlación intrasujetos, encontrando que principalmente la razón molar hace que el tratamiento de tortillas de harina de maíz adicionada con 20 mg de ZnO y 30mg de hierro reducido/Kg de harina presente un efecto significativo ($p < 0.05$).

Tabla 19. Relación molar ácido fítico:zinc en tortillas adicionadas con 20 mg de ZnO/Kg de harina de maíz marcada con Zn⁷⁰ (tratamiento A)

Sujeto	Zinc consumido (mg)	Ác.Fítico consumido (mg)	Ác.fítico consumido (mmol)	Zinc consumido (mmol)	Relación mmolar Ác.fítico: Zinc
1	13.63	685.00	1.038	0.208	4.98
3	12.96	709.60	1.075	0.198	5.42
4	14.04	705.10	1.068	0.215	4.97
5	13.16	695.30	1.053	0.201	5.23
6	14.43	698.10	1.058	0.221	4.79
7	13.65	703.60	1.066	0.209	5.10
8	13.73	722.90	1.095	0.210	5.21
9	12.24	733.00	1.111	0.187	5.93
10	13.06	736.50	1.116	0.200	5.58
Promedio	13.43	709.90	1.08	0.21	5.25
DE	0.65	17.48	0.03	0.01	0.35

Tabla 20. Relación molar de ácido fólico:zinc en tortillas adicionales con 20 mg de ZnO y 30mg de hierro reducido/Kg de harina de maíz marcada con Zn⁶⁷ (tratamiento B)

Sujeto	Zinc consumido (mg)	Ác.Fólico consumido (mg)	Ác.fólico consumido (mmol)	Zinc consumido (mmol)	Relación mmolar Ác.fólico: Zinc
1	14.91	682.30	1.034	0.228	4.53
3	14.23	671.13	1.017	0.218	4.67
4	15.78	686.10	1.039	0.241	4.31
5	14.72	693.10	1.050	0.225	4.66
6	17.11	688.70	1.043	0.262	3.99
7	14.29	695.60	1.054	0.219	4.82
8	14.53	701.80	1.063	0.222	4.79
9	13.71	698.10	1.058	0.210	5.04
10	14.36	699.60	1.060	0.220	4.82
Promedio	14.85	690.71	1.05	0.23	4.63
DE	1.02	9.78	0.01	0.02	0.32

Tabla 21. Relación molar de ácido fítico:zinc en tortillas adicionadas con 20 mg de ZnO y 60 mg de hierro reducido/Kg harina de maíz marcada con Zn⁶⁸ (tratamiento C)

Sujeto	Zinc Consumido (mg)	Ác.Fítico consumido (mg)	Ác.fítico consumido (mmol)	Zinc consumido (mmol)	Relación mmolar Ác.fítico: Zinc
1	14.15	685.800	1.04	0.22	4.80
3	15.46	680.300	1.03	0.24	4.36
4	13.94	673.100	1.02	0.21	4.78
5	13.89	693.600	1.05	0.21	4.95
6	13.33	680.000	1.03	0.20	5.05
7	13.88	689.100	1.04	0.21	4.92
8	15.97	682.300	1.03	0.24	4.23
9	13.53	677.100	1.03	0.21	4.96
10	15.36	685.700	1.04	0.24	4.42
Promedio	14.39	683.00	1.03	0.22	4.72
DE	0.95	6.27	0.01	0.01	0.30

CONCLUSIONES

La absorción de zinc no se ve afectada ni en la fracción absorbida de zinc ni en la cantidad absorbida de zinc cuando hay una adición de hierro, inclusive por arriba de los niveles que se han establecido para adicionar este mineral en las harinas de maíz.

La absorción de zinc se ve afectada por la presencia de ácido fítico, en particular por la relación molar ácido fítico: zinc presente en el alimento.

Se recomienda adicionar a la harina de maíz 20mg de óxido de zinc, 30 mg de hierro reducido / Kg de harina.

En el estudio, se observó que el método de monitoreo fecal ofrece determinar la biodisponibilidad de zinc en la dieta por medio de un proceso complicado para el participante y el analista ya que se debe recolectar toda la muestra de heces por trece días para determinar la fracción acumulada de cada isótopo de zinc y la posibilidad de realizar una mala recolección o perder alguna muestra es muy alta. Por lo anterior, antes de realizar un estudio de investigación, se debe considerar siempre la comodidad del sujeto y si el diseño y presupuesto del proyecto lo permite es recomendable ajustar la técnica.

BIBLIOGRAFIA

1. Rivera J. Estrategias y acciones para corregir deficiencias nutricias. Bol Med Hosp Infant. Méx., Vol 57, No 11, Nov. 2000
2. Whittaker P. Iron and Zinc interactions in humans. Am J Clin Nutr 1998; 68 suppl: 442S-6S
3. Casanueva E, Kaufer-Horwitz M, Pérez- Lizaur AB, Arroyo P. Nutriología Médica. Ed. Panamericana 2001
4. Freire W.B. La anemia por deficiencia de hierro: Estrategias de la OPS/PMS para combatirla. Salud Pública de México. Vol.40, no.2, marzo-abril 1998
5. Rosado JL, Bourges H, Saint-Martin B. Deficiencias de vitaminas y minerales en México. Una revisión crítica del estado de la información: I. Deficiencia de minerales. Salud Pública de México. Vol. 37, no.2, marzo-abril 1995
6. Encuesta Nacional de Nutrición 1999. Estado nutricional de niños y mujeres en México. Instituto Nacional de Salud Pública
7. Encuesta Nacional de Nutrición 2006. Instituto Nacional de Salud Pública ENSANUT-2006
8. Rosado JL. Deficiencia de zinc y sus implicaciones funcionales. Salud Pública de México 1998; 40 (2): 181-188
9. Torres R, Bahr P. el zinc: la chispa de la vida. Rev Cubana Pediatr 2004; 76 (4)
10. Santini M. Zinc, su uso parenteral. Biotecnoquímica. Medicamentos naturales C.A. MSDS Venezuela. Nov 2002. www.biotecnoquimica.com
11. Pizarro FA, Olivares G, Kain JB. Hierro y zinc en la dieta de la población de Santiago. Rev Chil Nutr 2005; 32 (1): 19-27

12. Bourges H R, Casanueva E, Rosado JL. Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana, bases fisiológicas. 2005. Ed. Panamericana.
13. Hambidge MK, Krebs N. Zinc , diarrea y neumonía. J Pediatr 1999; 135:661-664
14. Aballí A. Función del zinc en la recuperación inmunonutricional de lactantes malnutridos. Rev Cubana Aliment Nutr 2000; 14 (1):65-70
15. Organización Mundial de la Salud. Estrategias Nacionales contra la malnutrición de micronutrientes. Proyecto de resolución propuesto por los relatores del directorio 89. Sesión. Ginebra, Suiza; 1992
16. Organización Panamericana de la Salud. Compuestos de hierro para la fortificación de alimentos: Guías para América Latina y el Caribe. Washington, D.C.:OPS, 2002 ISBN 9275324247
17. Hernán C. Malnutrición de micronutrientes. Estrategias de prevención y control. Colomb Med; Vol 32, no.2;32:95-98,2001
18. Guamuch M. Programas de Salud Pública de fortificación de alimentos en Centroamérica. Nota Técnica. Oct 2003
19. Boccio J, Monteiro JB. Fortificación de alimentos con hierro y zinc: pros y contras desde un punto de vista alimenticio y nutricional. Rev. Nutr., Campinas, 17 (1): 71-78, jan/mar., 2004
20. Scrimshaw NS. La fortificación de alimentos: una estrategia nutricional indispensable. An Venez Nutr 2005; 18
21. Salgueiro M, Zubillaga M, Lysionek A, caro R, Weill R, Boccio J. Strategies to combat zinc and iron deficiency. Nutr Rev 2002;60: 52-8
22. SUSTAIN. Guías para la fortificación con hierro de alimentos típicos basados en cereales.2001
23. Verster A. Food fortification:good to have or need to have?. Eastern Mediterranean Health Journal. 2004; 10 (6).

24. Codex Alimentarius. Principios generales para la adición de nutrientes esenciales a los alimentos CAC/GL 09-1987 (enmendados en 1989,1991)
25. Guidelines for iron fortification of cereal food staples. Washington, DC: SUSTAIN,2001. Disponible en: <http://sustaintech.org>.
26. U.S. agency for International Development, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Micronutrient Interactions, Impact on child health and nutrition. Washington, DC, 1996
27. Hurrell R. Preventing iron deficiency through food fortification. Nutr. Rev. 1997;55:210-222
28. Bressani R, Rooney LL W, Serna SS. Fortification of corn masa flour with iron and/or other nutrients. A literature and industry experience review. SUSTAIN 1997. Washington D.C.
29. Cook JD, Reusser ME. Iron Fortification: an update. Am J Clin Nutr 1983;38:648-659
30. Hurrell R, Preventing iron deficiency through food fortification. Nutr Rev 1997; 55:210-22
31. Fox T, Eagles J, Fairweather-Tait S. Bioavailability of iron glycine as a fortificant in infant foods. Am J Clin Nutr 1998; 67:664-668
32. Boccio J, Zubillaga M,Caro R, Gotelli C, Gotelli M,Weill R. New procedure to fortify fluid milk and dairy products with high-bioavailable ferrous sulfate. Nutr Rev 1997; 55:240-246
33. Rosado JL, Camacho R, Bourges H. Adición de vitaminas y minerales a harinas de maíz y de trigo en México. Salud Pública de México. Marzo-Abril 1999; Vol. 41, No.2:130-137
34. Dutra De Oliveira J, Ferreira J, Vasconcellos V, Marchini J. Drinking water as an iron carrier to control anemia in preschool children in a day-care center. J Am Coll Nutr 1994; 13: 198-202

35. Bauernfeind JC. Nutrification of food. En: Shils ME, Olson JA, Shike M, ed. Moder nutrition in health and disease, 8^a.edición. Philadelphia: Lea&Febiger, 1994: 1579-1592
36. Figueroa JD. La tortilla vitaminada. INFOTEC, Avance y perspectiva, Mayo-Junio 1999, Vol.18: 149-158
37. Emodi AS, Scialpi L. Quality of bread fortified with ten micronutrients. Cereal Chem 1980; 51: 1-3
38. Serna -Saldívar SO, Gomez MH, Rooney LW. The chemistry, technology and nutritional value of alkaline-cooked corn products. En: Pomaranz Y, ed. Advances in Cereal Chemists. St. Paul (MN): 1990; 10: 201-203
39. Steele CJ. Cereal Fortification. Technological problems. Cereal Foods World 1976; 21 (4): 538-540
40. Lorenz K, Lee V. The nutritional and physiological impact of cereal products in human nutrition. CRC Crit Rev Food Sci Nutr 1977; 8 (4): 383-456
41. Gómez MH, Rooney LW, Waniska RD, Pflugfelder RL. Dry corn masa flours for tortilla and snack food. Cereal Foods World 1987; 32 (5): 372-377
42. Clydesdale FM, Wiemer KL. Iron fortification of foods. Orlando (FA): Academic Press, 1985
43. Buernfeind JC, DeRitter E. Foods considered for nutrientt addition: Cereal grain products. En: Bauernfeind JC, Lachance PA, ed. Nutrient additionons to food. Nutritional, technology and regulatory aspects. Trumbull, Connecticut: Food and Nutrition Press, 1991: 143-209
44. Hurrel RF. Nonelemental sources En: Clydesdale FM, Wiemer KL, ed. Iron fortification of Foods. Orlando (FA): Academic Press, 1985: 39-53
45. Patrick J. Elemental sources. En: Clydesdale FM, Wiemer KL, ed. Iron fortification of foods. Orlando (FA) Academic Press, 1985: 31-38

46. Davison L, Sarker SA, Fuschs GJ, Walczyk T, Hulrrell RF. Helicobacter pylory infection and iron absorpction in Bangladeeshi children (Abstract). Bioavailability of micronutrientents in relation to public health. Interlaken 2001. Suiza, 30 may-01 Jun.
47. Nalubola R, Nestel P. Manual for wheat fortification with iron: Part 2. Technical and operational guidelines. Most, The USAID Micronutrient Project. Arlington, VA, 2000. Disponible en <http://www.mostproject.org>.
48. Hunt JR. Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets. Am J Clin Nutr 2003; 78 (suppl): 633S-9S
49. FAO/WHO expert consultation on human vitamin and mineral requirements. Zinc. 1996. Chapter 16
50. Patterson K, Veillon C. Stable isotopes of mineral as metabolic traces in human nutrition research. Experimental Biology and medicine 2001; 226:271-282
51. Cattlemen´s Beef Borrad and Nacional Cattlemen´s Beef Association. Zinc: Dietary sources and bioavailability. 2001. www.beefnutrition.org
52. Rosado JL, López P, Morales M, Muñoz E, Allen LH. Bioavailability of energy, nitrogen, fat, zinc, iron and calcium from rural and urban mexican diets. Br J Nutr 1992; 68: 45-58
53. Fischer C, Kordas K, Stoltzfus R, Black R. Interactive effects of iron and zinc on biochemical and functional outcomes un supplementation trials. Am J Clin Nutr 2005; 82:5-12
54. Sandstrom B, Davidsson L, Cederblad A, Lonnerdal B. Oral iron, dietary ligands and zinc absorption. J Nutr 1985; 115: 411-414
55. AOAC. Oficial Methods of Análisis. 15 th ed; Helrech E. Ed: Association of Official Analytical Chemist: Washington DC, 1990.
56. Solomons NW. Biological availability of zinc in humans. Am J Clin Nutr. 1982; 35:1048-1075.

57. Herman S, Griffin I, Suwarti S, Ernawati F, Permaesih D, Pambudi d, Abrams S. Cofortification of iron-fortified flour with zinc sulfate, but not zinc oxide, decreases iron absorption in Indonesian Children. *Am J clin Nutr* 2002; 76:813-7
58. Adams C, Hambidge MK, Roboy V, Dorsch J, Sian L, Wescott J and Krebs N. Zinc absorption from a low-phytic acid maize. *Am J Clin Nut* 2002; 76: 556-9
59. World Health Organization. Trace elements in human nutrition and health. Geneva: WHO, 1996
60. Tran CD, Miller LV, Krebs NF, Lei S, Hambidge KM. Zinc absorption as a function of the dose of zinc sulfate in aqueous solution. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:1570-3
61. Solomons NW. Competitive interaction of iron and zinc in the diet: Consequences for human nutrition. *J Nutr* 1986; 116: 927-935.
62. Lind T, Lönnerdal Bo, Stenlund H, Ismail D, Seswandhana R, Ekström E and Persson L. Acommunity-based randomized controlled trial of iron and zinc supplementation in Indonesian infants: interactions between iron and zinc. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 883-90
63. Boccio J, Salgueiro J, Zubillaga M, Pharm A, Caro R, Antoine J and Eng R. Zinc and iron interactions evaluated between different mineral sources in different nutritional matrices. *Food and Nutrition Bulletin* 2002; 23(3): 195-198
64. Sandstrom B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *Br J Nutr* 2001: 85(suppl): S181-5
65. Troost FJ, Brummer RJ, Dainty JR, Hoogewerff JA, Bull VJ and Saris W. Iron Supplements inhibit zinc but not copper absorption in vivo in ileostomy subjects. *Am J Clin Nutr* 2003; 78: 1018-23
66. Pérez G, Vittori D, Pregi N, Garbossa G, Nesse A. Homeostasis del hierro. Mecanismo de absorción, captación celular y regulación. *Acta Bioquím. Clín Latiniam* 2005; 39 (3): 301-14

67. Lestienne I, Besacon P, Caporiccio B, Lullien-Péllierin V, Tréche S. Iron and zinc in Vitro availability in peral Mollet flours (*Pennisetum glaucum*) with varying phytate, tannin, and fiber contents. J.Agric. Food Chem. 2005; 53: 3240-3247
68. López de Romaña D, Salazar M, Hamdidge KM, Penny ME, Peerson JM, Krebs NF and Brown KH. Longitudinal measurements of zinc absorption in peruvian children consuming wheat products fortified with iron only or iron and 1 of 2 amounts of zinc. Am J Clin Nutr 2005; 81: 637-47
69. Davies NT, Olpin SE. Studies on the phytate: zinc molar contents in diets as a determinant of Zn availability to young rats. Br J Nutr 1979; 41:590-603
70. Abrams, S. Using isotopes to assess mineral absorption and utilization by children. *Am J Clin Nutr* 1999; 70: 955-64
71. Abrams SA. Using stable isotopes to assess mineral absorption and utilization by children. Am J Clin Nutr. 1999; 70 (6): 955-964
72. López de Romaña D, Lönnerdal Bo and Brwn KH. Absorption of zinc from wheat products fortified with iron and either zinc sulfate or zinc oxide. Am J Clin Nutr 2003; 78: 279-83
73. Herman S, Griffin I, Suwarti S, Ernawati F, Permaesih D, Pambudi D and Abrams S. Cofortification of iron-fortified flour with zinc sulfate, but not zinc oxide, decreases iron absorption in indonesian children. Am J Clin Nutr 2002; 76: 813-7
74. Hambidge MK, Krebs N and Millar L. Evaluation of zinc metabolism with use of stable-isotope techniques: implications for the assessment of zinc status. Am J Clin Nutr 1998; 68 (suppl): 410S-3S
75. Mazariegos M, Hambidge MK, Krebs N, Westcoott J, Lei S, Grunwald G, Campor R, Barahona B, Raboy V and Solomons N. Zinc absorption in Guatemalan schiilchildren fed normal or low phytate maize. Am J Clin Nutr 2006; 83: 59-64

76. King JC, Hambidge KM, Wescott JL, Kem DL, Marshall G. Daily variation in plasma zinc concentrations in women fed meals at six-hour intervals. *J Nutr* 1994; 124:508-16
77. King JC, Sharmes DM, Woodhouse LR. Zinc homeostasis in humans. *J Nutr*. 2000;130: 1360s-1366s
78. Hernández C, Izquierdo A. Función del zinc en la recuperación inmunonutricional de lactantes malnutridos. *Rev. Cubana Aliment Nutr* 2000: 14 (1):65-70
79. August D, Janghorbani M, Young V. Determination of zinc and copper absorption at three dietary Zn-Cu rations by using stable isotopes methods in young adult and elderly subjects. *Am J Clin Nutr* 1989;39:556-70
80. Institute of Medicine. National Academy of Sciences: Dietary referente intakes. National Academy Press. 2001,pp.442-89
81. Madrigal H, Chávez A, Moreno-Terrazas O, García T, Gutiérrez G. Consumo de alimentos y estado nutricional de la población del medio rural mexicano. *Rev. Invest Cli*. 1986; 38:9-19
82. Sian L, Hambidge M, Westcott J, Millar L, Fennessey P. Influence of meal and incremental doses of zinc on changes in zinc absorption. *Am J Clin Nutr* 1993; 58:533-536
83. Norma Oficial Mexicana NOM-120-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad para el proceso de alimentos, bebidas no alcohólicas y alcohólicas

ANEXO I

Tabla 1. Fórmula para fortificar harina de maíz (33)

Micronutriente	Nivel mínimo (mg/Kg)	Nivel recomendado (mg/Kg)	Nivel máximo (mg/Kg)	Compuesto recomendado
Tiamina	4.0	5.0	8.0	Mononitrato De tiamina
Riboflavina	2.4	3.0	5.0	Hidroclorhidrato De riboflavina
Niacina	28.0	35.0	45.0	Nicotinamida
Ácido fólico	0.4	0.5	0.8	Ácido fólico
Hierro	24.0	30.0	40.0	Hierro reducido extrafino
Zinc	16.0	20.0	26.0	Óxido de zinc

ANEXO II

Tabla 2. Ingestión de zinc y de inhibidores de su absorción en modelos de dietas rurales y urbanas mexicanas (52)

Componente	Dieta rural	Dieta urbana
Zinc (mg/d)	10.9 ± 1.0	10.0 ± 1.9
Acido fítico (mmol/d)	1.62 ± 0.14	0.09 ± 0.02
(g/d)	1.07 ± 0.09	0.07 ± 0.01
Fibra dietética (g/d)	40.2 ± 2.6	12.1 ± 0.9
Neutro detergente	28.7 ± 1.8	8.2 ± 0.5
Acido detergente	1.8	
Hemicelulosa	11.4 ± 1.6	3.7 ± 1.0
Celulosa	17.4 ± 1.4	5.5 ± 0.7
Lignina	11.3 ± 1.3	2.6 ± 0.2
Calcio (mg/d)	745 ± 70	410 ± 30

ANEXO III. Zinc excretado por sujeto en los 13 días de recolección**Sujeto 1**

Día	Peso del homogenado (g)	Zinc en homogenado (µg)
1	184.130	12821.867
2	522.220	20723.883
3	372.130	14730.867
4	221.750	8055.588
5	269.340	11177.514
6	610.850	19349.897
7	202.980	3782.940
8	165.200	13321.101
9	256.700	11264.411
10	280.090	7665.515
11	156.840	9530.426
12	412.270	17197.822
13	274.500	10164.026
Promedio	302.231	12291.220
DE	140.012	4817.276

Sujeto 2

Día	Peso del homogenado (g)	Zinc en homogenado (µg)
1	124.280	2715.171
2	158.280	8347.099
3	166.520	7321.464
4	360.090	19651.033
5	263.410	16239.527
6	115.670	7961.126
7	150.340	7077.963
8	109.800	5222.729
9	175.410	8089.409
10	125.930	5560.174
11	168.040	4893.680
12	207.400	3939.391
13	139.660	2854.136
Promedio	174.218	7682.531
DE	69.597	4983.136

Sujeto 3

Día	Peso del homogenado (g)	Zinc en homogenado (µg)
1	400.650	15952.051
2		
3	118.280	1494.914
4	141.670	9352.523
5	-	-
6	301.800	18106.731
7	117.720	5434.585
8	-	-
9	172.320	13953.720
10	165.550	7171.905
11	131.850	5627.093
12	-	-
13	304.400	15355.145
14	167.400	9244.375
Promedio	202.164	10169.304
DE	97.745	5441.190

Sujeto 4

Día	Peso del homogenado (g)	Zinc en homogenado (µg)
1	180.620	7893.236
2	180.760	9070.060
3	373.070	15350.493
4	314.820	19398.317
5	143.650	6018.305
6	241.680	10788.492
7	109.840	4892.084
8	184.670	6689.822
9	412.180	9810.571
10	293.920	9099.140
11	209.060	9566.419
12	362.320	10272.425
13	269.840	7787.933
Promedio	252.033	9741.331
DE	94.477	3882.827

Sujeto 5

Día	Peso del homogenado (g)	Zinc en homogenado (µg)
1	312.330	10724.667
2	375.650	16091.823
3	379.900	27682.107
4	508.200	12554.727
5	285.220	6674.520
6	207.780	3728.681
7	373.810	7067.412
8	266.880	6159.511
9	230.560	6427.537
10	247.710	4657.768
11	280.660	4062.037
12	467.270	4111.645
13	232.300	2311.309
Promedio	320.636	8634.903
DE	93.911	6932.300

Sujeto 6

Día	Peso del homogenado (g)	Zinc en homogenado (µg)
1	877.990	18999.218
2	143.260	3665.663
3	309.300	13700.506
4	675.130	29725.016
5	-	-
6	856.080	21083.717
7	214.750	5389.459
8	597.290	12946.558
9	834.680	15638.416
10	310.180	5325.424
11	607.100	10261.094
12	267.260	6919.599
13	292.350	7675.730
Promedio	498.781	12610.867
DE	271.625	7766.308

Sujeto 7

Día	Peso del homogenado (g)	Zinc en homogenado (µg)
1	386.960	12393.079
2	357.760	8541.563
3	578.040	21455.297
4	330.970	10352.198
5	619.130	17287.472
6	505.790	9647.702
7	306.140	5899.120
8	347.910	4747.189
9	424.740	7312.992
10	359.670	10303.846
11	401.240	13580.877
12	314.760	7254.170
13	404.550	7519.724
Promedio	410.589	10484.248
DE	98.835	4722.466

Sujeto 8

Día	Peso del homogenado (g)	Zinc en homogenado (µg)
1	238.020	5315.387
2	225.300	7011.674
3	331.930	18024.573
4	314.520	12516.536
5	506.630	13943.758
6	372.650	10606.359
7	264.840	6804.223
8	702.720	14787.879
9	447.980	7615.260
10	470.740	12162.759
11	322.150	6978.310
12	308.170	7729.870
13	353.860	8054.577
Promedio	373.808	10119.321
DE	130.937	3861.220

Sujeto 9

Día	Peso del homogenado (g)	Zinc en homogenado (µg)
1	181.430	7686.078
2	139.960	4930.571
3	271.000	10439.445
4	143.090	6451.617
5	212.420	7773.453
6	250.030	8308.207
7	179.320	7998.394
8	201.340	7158.972
9	190.570	7006.842
10	219.610	10578.559
11	160.530	5836.940
12	264.360	6801.556
13	442.210	12049.970
14	159.440	0.000
Promedio	219.682	7924.662
DE	79.120	2016.616

Sujeto 10

Día	Peso del homogenado (g)	Zinc en homogenado (µg)
1	549.820	51669.465
2	236.850	13891.634
3	353.040	28043.142
4	245.380	16971.993
5	527.630	50310.834
6	485.060	42326.023
7	217.730	8424.032
8	395.850	12560.086
9	199.930	5274.481
10	680.190	29968.860
11	326.200	17793.944
12	174.090	3417.931
13	567.850	16516.137
Promedio	381.509	22859.120
DE	166.003	16387.495

ANEXO IV. Isótopos de zinc excretados por sujeto

Sujeto 1

Día	% de enri Zinc 67*	Zinc 67 en heces (µg)	FE Zinc 67	Fracción acumulada Zinc 67	% de enri Zinc 68**	Zinc 68 en heces (µg)	FE Zinc 68	Fracción acumulada Zinc 68	% de enr Zinc 70***	Zinc 70 en heces (µg)	FE Zinc 70	Fracción acumulada Zinc 70
1	0.017	2.116	0.001	0.001	0.053	6.834	0.005	0.005	0.003	0.333	0.000	0.000
2	5.122	1061.560	0.672	0.674	0.269	55.809	0.039	0.044	0.000	0.000	0.000	0.000
3	1.242	182.957	0.116	0.790	6.595	971.560	0.687	0.731	0.049	7.277	0.011	0.011
4	0.055	4.398	0.003	0.792	1.584	127.601	0.090	0.821	2.912	234.579	0.344	0.355
5	0.023	2.616	0.002	0.794	0.197	22.053	0.016	0.837	2.357	263.409	0.387	0.742
6	0.032	6.134	0.004	0.798	0.172	33.262	0.024	0.860	0.013	2.496	0.004	0.746
7	0.022	0.813	0.001	0.798	0.083	3.128	0.002	0.862	0.020	0.760	0.001	0.747
8	0.029	3.903	0.002	0.801	0.128	17.024	0.012	0.874	0.013	1.745	0.003	0.749
9	0.033	3.751	0.002	0.803	0.173	19.465	0.014	0.888	0.014	1.611	0.002	0.752
10	0.039	2.982	0.002	0.805	0.202	15.477	0.011	0.899	0.019	1.426	0.002	0.754
11	0.051	4.868	0.003	0.808	0.272	25.956	0.018	0.917	0.020	1.949	0.003	0.757
12	0.036	6.274	0.004	0.812	0.206	35.393	0.025	0.942	0.017	2.900	0.004	0.761
13	0.038	3.884	0.002	0.815	0.234	23.738	0.017	0.959	0.025	2.554	0.004	0.765

Prom	98.943		0.730		104.40		0.742		40.080		0.549
DE	293.443		0.222		262.46		0.323		92.922		0.329

*Por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁷, ** por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁸, *** por ciento de enriquecimiento del Zn⁷⁰, FE = Fracción excretada

Sujeto 2

Día	% de enri Zinc 67*	Zinc 67 en heces (µg)	FE Zinc 67	Fracción acumulada Zinc 67	% de enri Zinc 68**	Zinc 68 en heces (µg)	FE Zinc 68	Fracción acumulada Zinc 68	% de enr Zinc 70***	Zinc 70 en heces (µg)	FE Zinc 70	Fracción acumulada Zinc 70
1	0.011	0.312	0.000	0.000	0.095	2.582	0.002	0.002	0.010	0.267	0.000	0.000
2	0.009	0.744	0.000	0.001	0.047	3.886	0.003	0.005	0.007	0.558	0.001	0.001
3	0.006	0.430	0.000	0.001	1.140	83.471	0.069	0.074	0.000	0.000	0.000	0.001
4	0.018	3.616	0.002	0.003	3.951	776.373	0.640	0.714	1.127	221.389	0.317	0.318
5	9.912	1609.629	1.079	1.083	0.869	141.186	0.116	0.831	1.431	232.388	0.333	0.651
6	4.057	322.967	0.217	1.300	0.109	8.678	0.007	0.838	0.298	23.748	0.034	0.685
7	0.970	68.621	0.046	1.346	0.007	0.503	0.000	0.838	0.055	3.872	0.006	0.690
8	0.334	17.439	0.012	1.357	0.000	0.000	0.000	0.838	0.025	1.311	0.002	0.692
9	0.070	5.695	0.004	1.361	0.000	0.000	0.000	0.838	0.009	0.720	0.001	0.693
10	0.019	1.068	0.001	1.362	0.000	0.000	0.000	0.838	0.005	0.272	0.000	0.694
11	0.014	0.666	0.000	1.362	0.000	0.000	0.000	0.838	0.005	0.254	0.000	0.694
12	0.004	0.150	0.000	1.362	0.000	0.000	0.000	0.838	0.001	0.020	0.000	0.694
13	0.000	0.000	0.000	1.362	0.000	0.000	0.000	0.838	0.002	0.049	0.000	0.694

Prom 156.257 0.915 78.206 0.641 37.296 0.501
DE 445.614 0.639 214.134 0.352 84.418 0.303

***Por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁷, ** por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁸, *** por ciento de enriquecimiento del Zn⁷⁰, FE = Fracción excretada**

Sujeto 3

Día	% de enri Zinc 67*	Zinc 67 (µg)	FE Zinc 67	Fracción acumulada Zinc 67	% de enri Zinc 68**	Zinc 68 (µg)	FE Zinc 68	Fracción acumulada Zinc 68	% de enr Zinc 70***	Zinc 70 (µg)	FE Zinc 70	Fracción acumulada Zinc 70
1	0.004	0.574	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.657	104.853	0.160	0.160
2												
3	0.989	14.779	0.010	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	2.981	44.559	0.068	0.228
4	3.442	321.905	0.213	0.223	0.269	25.196	0.016	0.016	1.993	186.396	0.285	0.513
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	2.598	470.431	0.311	0.534	3.491	632.142	0.411	0.428	0.423	76.664	0.117	0.630
7	0.200	10.875	0.007	0.541	1.483	80.595	0.052	0.480	0.015	0.810	0.001	0.631
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	0.077	10.730	0.007	0.548	0.495	69.057	0.045	0.525	0.010	1.437	0.002	0.633
10	0.020	1.434	0.001	0.549	0.065	4.640	0.003	0.528	0.007	0.495	0.001	0.634
11	0.025	1.429	0.001	0.550	0.052	2.915	0.002	0.530	0.006	0.332	0.001	0.635
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	0.021	3.209	0.002	0.552	0.038	5.866	0.004	0.534	0.004	0.645	0.001	0.636
14	0.005	0.416	0.000	0.552	0.000	0.000	0.000	0.534	0.003	0.305	0.000	0.636

Prom 83.578 0.406 82.041 0.358 41.650 0.534
DE 168.504 0.234 195.579 0.245 63.471 0.184

***Por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁷, ** por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁸, *** por ciento de enriquecimiento del Zn⁷⁰, FE = Fracción excretada**

Sujeto 4

Día	% de enri Zinc 67*	Zinc 67 (µg)	FE Zinc 67	Fracción acumulada Zinc 67	% de enri Zinc 68**	Zinc 68 (µg)	FE Zinc 68	Fracción acumulada Zinc 68	% de enr Zinc 70***	Zinc 70 (µg)	FE Zinc 70	Fracción acumulada Zinc 70
1	0.007	0.568	0.000	0.000	0.004	0.300	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	2.018	183.025	0.263	0.263
3	3.218	493.902	0.296	0.297	0.000	0.000	0.000	0.000	1.383	212.267	0.305	0.567
4	2.855	553.841	0.332	0.629	2.764	536.169	0.382	0.382	0.374	72.608	0.104	0.671
5	0.580	34.924	0.021	0.650	3.428	206.283	0.147	0.529	0.043	2.588	0.004	0.675
6	0.200	21.577	0.013	0.662	1.629	175.701	0.125	0.655	0.016	1.769	0.003	0.677
7	0.114	5.592	0.003	0.666	0.794	38.848	0.028	0.682	0.012	0.607	0.001	0.678
8	0.072	4.837	0.003	0.669	0.345	23.107	0.016	0.699	0.014	0.910	0.001	0.680
9	0.023	2.276	0.001	0.670	0.075	7.397	0.005	0.704	0.010	1.020	0.001	0.681
10	0.021	1.938	0.001	0.671	0.035	3.194	0.002	0.706	0.009	0.801	0.001	0.682
11	0.027	2.545	0.002	0.673	0.073	6.993	0.005	0.711	0.008	0.737	0.001	0.683
12	0.020	2.003	0.001	0.674	0.059	6.092	0.004	0.716	0.008	0.822	0.001	0.685
13	0.019	1.449	0.001	0.675	0.063	4.867	0.003	0.719	0.008	0.615	0.001	0.685

Prom 86.573 0.533 77.612 0.500 36.751 0.587
DE 194.724 0.258 154.060 0.301 74.321 0.211

***Por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁷, ** por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁸, *** por ciento de enriquecimiento del Zn⁷⁰, FE = Fracción excretada**

Sujeto 5

Día	% de enri Zinc 67*	Zinc 67 (µg)	FE Zinc 67	Fracción acumulada Zinc 67	% de enri Zinc 68**	Zinc 68 (µg)	FE Zinc 68	Fracción acumulada Zinc 68	% de enr Zinc 70***	Zinc 70 (µg)	FE Zinc 70	Fracción acumulada Zinc 70
1	0.013	1.373	0.001	0.001	0.029	3.132	0.002	0.002	0.004	0.386	0.001	0.001
2	5.006	805.557	0.566	0.567	0.175	28.129	0.022	0.025	0.005	0.805	0.001	0.002
3	1.603	443.633	0.312	0.879	3.353	928.043	0.728	0.752	0.014	3.903	0.006	0.008
4	0.098	12.341	0.009	0.888	1.546	194.134	0.152	0.905	2.380	298.777	0.453	0.460
5	0.041	2.710	0.002	0.890	0.201	13.442	0.011	0.915	1.219	81.362	0.123	0.584
6	0.016	0.604	0.000	0.890	0.000	0.000	0.000	0.915	0.400	14.930	0.023	0.606
7	0.023	1.640	0.001	0.892	0.000	0.000	0.000	0.915	0.030	2.113	0.003	0.609
8	0.024	1.503	0.001	0.893	0.039	2.390	0.002	0.917	0.007	0.425	0.001	0.610
9	0.014	0.887	0.001	0.893	0.000	0.000	0.000	0.917	0.004	0.238	0.000	0.610
10	0.019	0.894	0.001	0.894	0.006	0.293	0.000	0.917	0.005	0.247	0.000	0.611
11	0.010	0.390	0.000	0.894	0.000	0.000	0.000	0.917	0.003	0.110	0.000	0.611
12	0.008	0.345	0.000	0.894	0.010	0.407	0.000	0.918	0.005	0.189	0.000	0.611
13	0.014	0.326	0.000	0.895	0.006	0.141	0.000	0.918	0.005	0.116	0.000	0.611

Prom	97.862	0.798	90.008	0.764	31.046	0.456
DE	245.187	0.256	257.329	0.336	83.467	0.262

***Por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁷, ** por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁸, *** por ciento de enriquecimiento del Zn⁷⁰, FE = Fracción excretada**

Sujeto 6

Día	% de enri Zinc 67*	Zinc 67 (µg)	FE Zinc 67	Fracción acumulada Zinc 67	% de enri Zinc 68**	Zinc 68 (µg)	FE Zinc 68	Fracción acumulada Zinc 68	% de enr Zinc 70***	Zinc 70 (µg)	FE Zinc 70	Fracción acumulada Zinc 70
1	0.009	1.729	0.001	0.001	0.004	0.779	0.001	0.001	0.000	0.019	0.000	0.000
2	0.009	0.312	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.020	2.740	0.002	0.003	4.508	617.633	0.505	0.506	0.858	117.482	0.178	0.178
4	2.815	836.878	0.504	0.507	1.036	307.892	0.252	0.758	1.175	349.209	0.529	0.707
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	0.910	191.820	0.116	0.623	0.058	12.123	0.010	0.768	0.087	18.237	0.028	0.735
7	0.325	17.521	0.011	0.633	0.021	1.132	0.001	0.769	0.027	1.466	0.002	0.737
8	0.021	2.667	0.002	0.635	0.000	0.000	0.000	0.769	0.005	0.621	0.001	0.738
9	0.000	0.047	0.000	0.635	0.000	0.000	0.000	0.769	0.003	0.438	0.001	0.738
10	0.010	0.517	0.000	0.635	0.015	0.809	0.001	0.770	0.002	0.122	0.000	0.739
11	0.009	0.923	0.001	0.636	0.017	1.703	0.001	0.771	0.004	0.410	0.001	0.739
12	0.000	0.028	0.000	0.636	0.004	0.270	0.000	0.771	0.002	0.111	0.000	0.739
13	0.006	0.491	0.000	0.636	0.000	0.008	0.000	0.771	0.003	0.223	0.000	0.740

Prom 87.973 0.465 78.529 0.619 40.695 0.566

DE 242.077 0.282 191.268 0.298 102.785 0.309

***Por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁷, ** por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁸, *** por ciento de enriquecimiento del Zn⁷⁰, FE = Fracción excretada**

Sujeto 7

Día	% de enri Zinc 67*	Zinc 67 (µg)	FE Zinc 67	Fracción acumulada Zinc 67	% de enri Zinc 68**	Zinc 68 (µg)	FE Zinc 68	Fracción acumulada Zinc 68	% de enr Zinc 70***	Zinc 70 (µg)	FE Zinc 70	Fracción acumulada Zinc 70
1	0.001	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.307	38.034	0.055	0.055
2	0.002	0.179	0.000	0.000	0.026	2.204	0.002	0.002	3.609	308.248	0.448	0.504
3	4.729	1014.685	0.729	0.729	0.410	87.859	0.068	0.070	0.704	151.002	0.220	0.723
4	0.773	79.981	0.057	0.787	6.220	643.948	0.498	0.568	0.007	0.766	0.001	0.724
5	0.061	10.459	0.008	0.794	1.400	242.042	0.187	0.755	0.002	0.415	0.001	0.725
6	0.009	0.849	0.001	0.795	0.012	1.129	0.001	0.756	0.003	0.251	0.000	0.725
7	0.022	1.280	0.001	0.796	0.024	1.398	0.001	0.757	0.002	0.124	0.000	0.726
8	0.018	0.831	0.001	0.796	0.030	1.424	0.001	0.758	0.008	0.370	0.001	0.726
9	0.013	0.921	0.001	0.797	0.035	2.530	0.002	0.760	0.007	0.483	0.001	0.727
10	0.011	1.123	0.001	0.798	0.043	4.441	0.003	0.763	0.005	0.495	0.001	0.728
11	0.030	4.020	0.003	0.801	0.084	11.354	0.009	0.772	0.003	0.421	0.001	0.728
12	0.011	0.805	0.001	0.801	0.000	0.000	0.000	0.772	0.003	0.181	0.000	0.728
13	0.023	1.714	0.001	0.803	0.068	5.136	0.004	0.776	0.006	0.436	0.001	0.729

Prom	85.916	0.669	77.190	0.577	38.556	0.658
DE	279.904	0.297	183.418	0.321	91.260	0.191

***Por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁷, ** por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁸, *** por ciento de enriquecimiento del Zn⁷⁰, FE = Fracción excretada**

Sujeto 8

Día	% de enri Zinc 67*	Zinc 67 (µg)	FE Zinc 67	Fracción acumulada Zinc 67	% de enri Zinc 68**	Zinc 68 (µg)	FE Zinc 68	Fracción acumulada Zinc 68	% de enri Zinc 70***	Zinc 70 (µg)	FE Zinc 70	Fracción acumulada Zinc 70
1	2.168	115.238	0.088	0.088	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.101	0.000	0.000
2	4.773	334.660	0.256	0.345	0.012	0.848	0.001	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
3	2.671	481.382	0.369	0.714	3.047	549.137	0.377	0.378	0.268	48.378	0.072	0.072
4	0.363	45.448	0.035	0.748	2.511	314.303	0.216	0.593	1.887	236.212	0.352	0.424
5	0.109	15.254	0.012	0.760	0.776	108.148	0.074	0.668	1.199	167.116	0.249	0.673
6	0.021	2.206	0.002	0.762	0.069	7.297	0.005	0.673	0.302	31.999	0.048	0.720
7	0.009	0.626	0.000	0.762	0.000	0.000	0.000	0.673	0.025	1.681	0.003	0.723
8	0.015	2.174	0.002	0.764	0.010	1.508	0.001	0.674	0.002	0.251	0.000	0.723
9	0.009	0.655	0.001	0.764	0.000	0.000	0.000	0.674	0.000	0.000	0.000	0.723
10	0.007	0.803	0.001	0.765	0.000	0.000	0.000	0.674	0.001	0.073	0.000	0.723
11	0.008	0.586	0.000	0.766	0.000	0.000	0.000	0.674	0.000	0.000	0.000	0.723
12	0.009	0.696	0.001	0.766	0.020	1.523	0.001	0.675	0.003	0.216	0.000	0.724
13	0.025	2.006	0.002	0.768	0.163	13.113	0.009	0.684	0.008	0.660	0.001	0.725

Prom 77.056 0.675 76.606 0.541 37.438 0.535
DE 153.332 0.210 167.325 0.254 75.758 0.303

***Por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁷, ** por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁸, *** por ciento de enriquecimiento del Zn⁷⁰, FE = Fracción excretada**

Sujeto 9

Día	% de enri Zinc 67*	Zinc 67 (µg)	FE Zinc 67	Fracción acumulada Zinc 67	% de enri Zinc 68**	Zinc 68 (µg)	FE Zinc 68	Fracción acumulada Zinc 68	% de enr Zinc 70***	Zinc 70 (µg)	FE Zinc 70	Fracción acumulada Zinc 70
1	0.019	1.445	0.001	0.001	0.269	20.676	0.017	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.009	0.463	0.000	0.002	2.582	127.322	0.103	0.120	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.000	0.031	0.000	0.002	3.748	391.229	0.316	0.436	0.760	79.350	0.134	0.134
4	1.100	70.936	0.059	0.060	1.587	102.361	0.083	0.518	1.728	111.490	0.189	0.323
5	3.485	270.874	0.224	0.284	0.322	24.992	0.020	0.539	0.993	77.214	0.131	0.453
6	0.997	82.841	0.068	0.352	0.029	2.426	0.002	0.541	0.176	14.622	0.025	0.478
7	0.150	11.958	0.010	0.362	0.011	0.888	0.001	0.541	0.021	1.688	0.003	0.481
8	0.054	3.830	0.003	0.365	0.029	2.098	0.002	0.543	0.004	0.301	0.001	0.482
9	0.012	0.848	0.001	0.366	0.000	0.000	0.000	0.543	0.006	0.413	0.001	0.482
10	0.003	0.360	0.000	0.366	0.000	0.000	0.000	0.543	0.002	0.222	0.000	0.483
11	0.010	0.566	0.000	0.367	0.018	1.051	0.001	0.544	0.007	0.420	0.001	0.483
12	0.002	0.129	0.000	0.367	0.011	0.714	0.001	0.544	0.005	0.333	0.001	0.484
13	0.010	1.193	0.001	0.368	0.018	2.217	0.002	0.546	0.003	0.301	0.001	0.484
14	0.005	0.000	0.000	0.368	0.007	0.000	0.000	0.546	0.004	0.000	0.000	0.484

Prom	34.267	0.251	51.998	0.460	22.027	0.367
DE	76.466	0.165	110.178	0.177	39.368	0.191

***Por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁷, ** por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁸, *** por ciento de enriquecimiento del Zn⁷⁰, FE = Fracción excretada**

Sujeto 10

Día	% de enri Zinc 67*	Zinc 67 (µg)	FE Zinc 67	Fracción acumulada Zinc 67	% de enri Zinc 68**	Zinc 68 (µg)	FE Zinc 68	Fracción acumulada Zinc 68	% de enr Zinc 70***	Zinc 70 (µg)	FE Zinc 70	Fracción acumulada Zinc 70
1	0.004	2.222	0.002	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.325	168.029	0.257	0.257
2	2.997	416.332	0.320	0.322	2.621	364.128	0.261	0.261	0.396	55.025	0.084	0.342
3	0.953	267.167	0.206	0.528	0.036	10.208	0.007	0.268	0.942	264.138	0.405	0.746
4	0.991	168.159	0.129	0.657	2.466	418.495	0.300	0.568	0.089	15.020	0.023	0.769
5	0.084	42.462	0.033	0.690	0.216	108.873	0.078	0.646	0.001	0.604	0.001	0.770
6	0.010	4.360	0.003	0.693	0.000	0.000	0.000	0.646	0.000	0.000	0.000	0.770
7	0.007	0.556	0.000	0.694	0.000	0.000	0.000	0.646	0.000	0.000	0.000	0.770
8	0.027	3.379	0.003	0.696	0.061	7.624	0.005	0.652	0.007	0.854	0.001	0.771
9	0.017	0.918	0.001	0.697	0.025	1.308	0.001	0.653	0.009	0.448	0.001	0.772
10	0.006	1.738	0.001	0.698	0.017	5.185	0.004	0.656	0.005	1.349	0.002	0.774
11	0.011	1.886	0.001	0.700	0.026	4.626	0.003	0.660	0.007	1.228	0.002	0.776
12	0.027	0.909	0.001	0.701	0.107	3.650	0.003	0.662	0.295	10.069	0.015	0.791
13	0.022	3.667	0.003	0.703	0.151	24.890	0.018	0.680	0.007	1.123	0.002	0.793

Prom 70.289 0.599 72.999 0.538 39.837 0.700

DE 132.483 0.210 144.669 0.217 82.022 0.179

***Por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁷, ** por ciento de enriquecimiento del Zn⁶⁸, *** por ciento de enriquecimiento del Zn⁷⁰, FE = Fracción excretada**