



UNIVERSIDAD DE CHILE
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS



“EFECTO DE DOSIS CRECIENTES DE
ZINC SOBRE LA ABSORCIÓN DE
HIERRO EN LECHE FORTIFICADA CON
HIERRO EN HUMANOS”

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER
Mención Nutrición Humana

Alejandra Wiedeman Manríquez

TESISTA

Manuel Olivares Grohnert

DIRECTOR DE TESIS

Santiago de Chile

Enero, 2011

COORDINADORES

Magíster: Carola García Ghiringhelli

Mención Nutrición Humana: Daniel López de Romaña Forga

COMISIÓN DE TESIS

Dr. Miguel Arredondo Olguín

Dr. Manuel Ruz Ortiz

Dr. Gerardo Weisstaub Nuta

Fecha de Examen de Grado: Viernes 7 de enero de 2011

AGRADECIMIENTOS

Agradezco la paciencia, palabras de apoyo y guía de mi profesor, del laboratorio de micronutrientes, familia y cercanos.

Este es el fin de una etapa marcada de desafíos, felizmente alcanzados.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDOS	PÁGINA
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS	8
4.1. GENERAL	8
4.2. ESPECÍFICOS	8
4.3. HIPÓTESIS	8
5. MATERIALES Y MÉTODOS	9
5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	9
5.2. SUJETOS.....	9
5.3. TAMAÑO MUESTRAL.....	10
5.4. DEFINICIÓN DE VARIABLES	10
5.5. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS.....	11
5.5.1. Mediciones Antropométricas y Dietéticas.....	11
5.5.2. Alimento.....	13
5.5.3. Mediciones Bioquímicas	14
5.5.4. Estudios Isotópicos	15
5.5.5. Protocolo del estudio.....	17
5.6. PLAN DE ANÁLISIS	19
6. RESULTADOS	20
7. DISCUSIÓN	24
8. CONCLUSIÓN	28
9. FINANCIAMIENTO	29
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
11. ANEXOS	37
11.1. CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO “EFECTOS DE DIFERENTES NIVELES DE ZINC SOBRE LA ABSORCIÓN DE HIERRO EN ALIMENTOS ENRIQUECIDOS CON HIERRO Y ZINC”	37
11.1.1. Información sobre el estudio de investigación	37
11.1.2. Documentación del consentimiento.....	40
11.2. ENCUESTA DE TENDENCIA DE CONSUMO	41
11.3. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LAS LECHEs A ADMINISTRAR	42

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS	PÁGINA
Tabla 1: Descripción de las variables a medir en el estudio	10
Tabla 2: Puntos de corte para IMC del adulto.....	11
Tabla 3: AMDR y EAR para mujeres adultas.....	12
Tabla 4: Puntos de corte para los parámetros de nutrición de hierro	14
Tabla 5: Características generales de los sujetos.....	20
Tabla 6: Ingesta dietética de los sujetos.....	21
Tabla 7: Estado nutricional de hierro de los participantes.....	21
Tabla 8: Efecto de cantidades crecientes de zinc sobre la absorción de hierro	22

FIGURAS	PÁGINA
Figura 1: Protocolo del estudio.....	18
Figura 2: Razón de absorción de hierro	23

1. RESUMEN

Introducción: Existe evidencia de que la Leche Purita Fortificada no ha tenido un efecto similar sobre el estado de nutrición de zinc como la observada para hierro, lo cual sugeriría la posibilidad de aumentar la concentración de zinc en la leche fortificada; no obstante, primero es necesario asegurar que esta modificación no afecte la absorción de hierro.

Objetivo: Determinar el efecto de dosis crecientes de zinc adicionadas sobre la biodisponibilidad de hierro en leche entera en polvo fortificada con hierro en humanos.

Materiales y Métodos: Estudio experimental, participaron 15 mujeres adultas. Se midió la biodisponibilidad de hierro a través de la técnica doble radioisotópica, con la incorporación de ^{55}Fe y ^{59}Fe a los eritrocitos, luego de 14 días de la administración de 4 formulaciones diferentes de leche fortificada, en los días 1, 2, 14 y 15 del estudio, con 10 mg/L de hierro, como sulfato ferroso, con dosis crecientes de adición de zinc, como sulfato de zinc, logrando una proporción molar final (nativo más adicionado) de Zn:Fe de 0.3:1, 0.8 :1, 1.2:1 y 2.1:1.

Resultados: La fortificación con zinc en dosis crecientes no modificó significativamente la absorción de hierro (ANOVA para medidas repetidas, $F=1.31$, $p=0.28$).

Conclusión: En leche entera en polvo fortificada con 10 mg/L de hierro, la adición de 20 mg/L de zinc no inhibe la absorción de hierro, lo que equivale relaciones molares finales del producto de Zn:Fe menores o iguales a 2.1:1.

2. ABSTRACT

Introduction: There is evidence that Purita Fortified Milk has not had a similar effect on the nutritional status of zinc as observed for iron, suggesting the possibility of increasing the concentration of zinc in fortified milk, however, it is first necessary to ensure that this amendment does not affect iron absorption.

Objective: To determine the effect of increasing doses of zinc additions on the bioavailability of iron in full fat milk powder fortified with iron in humans.

Materials and Methods: Experimental study, involving 15 adult women. We measured the bioavailability of iron through the double-radioisotope technique with ^{55}Fe and ^{59}Fe incorporation into red blood cells after 14 days of the administration of 4 different formulations of cow's milk fortified on days 1, 2, 14 and 15 of the study, with 10 mg/L of iron, as ferrous sulfate, with increasing doses of zinc added, as zinc sulfate, achieving final molar ratios (native more added) of Zn:Fe of 0.3:1, 0.8:1, 1.2:1 and 2.1:1.

Results: Zinc fortification in increasing doses did not significantly modified the absorption of iron (repeated measures ANOVA, $F = 1.31$, $p = 0.28$).

Conclusion: In full fat milk powder fortified with 10 mg/L of iron, the addition of 20 mg/L of zinc does not inhibit iron absorption, which equals final product molar ratios of Zn:Fe less than or equal to 2.1:1.

3. INTRODUCCIÓN

Las deficiencias de micronutrientes constituyen un importante problema nutricional y de salud pública, los cuales afectan a los países en vías de desarrollo y a ciertos grupos en riesgo de países desarrollados (1-3).

Hierro y zinc son nutrientes esenciales para el ser humano, son críticos para el normal crecimiento, hematopoyesis y desarrollo neurológico durante la infancia (4). La deficiencia de hierro, además de causar anemia, aumenta la tasa de morbilidad en la infancia, bajo rendimiento en la escala de desarrollo y trastornos del aprendizaje con inadecuados logros educacionales (5). Por otro lado la deficiencia de zinc produce una disminución de la velocidad de crecimiento, alteraciones de la inmunidad, mayor incidencia y duración de diarrea y neumonía en la población infantil (6).

La causa primaria de deficiencia de micronutrientes en la mayoría de individuos es una ingesta inadecuada (7), sumado a depósitos reducidos al nacer, aportes dietarios inadecuados, aumento de los requerimientos y aumento de pérdidas gastrointestinales (8). Los productos animales son la mejor fuente de hierro y zinc dietario, por lo cual la deficiencia de ambos minerales puede coexistir en poblaciones que consumen dietas con cantidades insuficientes de fuentes de alimentos de origen animal.

La carencia de hierro es la deficiencia nutricional más común en el mundo y es la principal causa de anemia en los niños (9), en los países en vías de desarrollo esta carencia coexiste con otras deficiencias, entre ellas la de zinc (1). La anemia por deficiencia de hierro sigue siendo una preocupación en salud pública en niños, adolescentes y mujeres embarazadas (10), siendo los lactantes uno de los grupos más vulnerables a experimentar estas carencias (11, 12). Estudios de suplementación realizados en nuestro país han observado un efecto favorable del zinc en el crecimiento de lactantes, niños, preescolares y adolescentes (13-15).

La ingesta en conjunto de hierro con zinc y su interacción, merece particular atención para asegurar la biodisponibilidad de ambos micronutrientes debido a su interacción y al potencial efecto negativo con la absorción del otro (16). La palabra biodisponibilidad se refiere a la proporción del nutriente que proviene de la dieta que es absorbido y utilizado por el organismo. La mayoría de la información de la interacción entre hierro y zinc ha sido obtenida de estudios que han administrado estos dos minerales simultáneamente como suplemento (17, 18). Se ha demostrado que la administración combinada de hierro y zinc en una solución acuosa reduce la absorción de hierro en adultos (19, 20) y que la inhibición de absorción de hierro tiene efecto transitorio de corta duración (21).

Por otro lado, existen pocos estudios que han evaluado la biodisponibilidad de hierro a través de un alimento fortificado simultáneamente con hierro y zinc, los cuales han mostrado resultados contradictorios (22, 23). Además, la posible interacción entre hierro y zinc puede ser modificada por la cantidad de inhibidores y facilitadores de la absorción de estos minerales presentes en la dieta (24). Existen evidencias que el ácido ascórbico aumenta la absorción de hierro (25), sin modificar la absorción de zinc y que las proteínas de la leche de vaca, especialmente caseína, disminuye su absorción (26, 27).

Una de las estrategias utilizadas para controlar la deficiencia de hierro, aumentando su contenido en la dieta, es la fortificación de alimentos (28, 29); la cual es actualmente una práctica común tanto en países industrializados como en aquellos en vías de desarrollo. El término fortificación se refiere a la adición un nutriente a un alimento, logrando así una concentración mayor al nivel encontrado en el alimento originalmente. Por lo cual es considerado como una excelente estrategia para controlar la deficiencia de hierro (30-32), y también es una de las estrategias más promisorias para la prevención de la deficiencia de zinc (33). Siendo así la fortificación de alimentos, combinada de hierro y zinc, una de las estrategias que puede ser usada para mejorar el estado de ambos micronutrientes de la población.

El factor de mayor importancia a considerar para escoger la forma química del fortificador que va a ser añadido a un alimento es su biodisponibilidad, la cual se ve afectada por la solubilidad, densidad de carga, potencial de reducción y pH, formación de complejos y el efecto del procesamiento (34). Otros factores a considerar cuando un producto alimenticio es fortificado incluyen: seguridad para la mayoría de la población o para grupos específicos, efectos beneficiosos, cambios en las características organolépticas del alimento y costo de la fortificación.

Los minerales a utilizar son “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS, por sus siglas en inglés). Actualmente existen 5 sales de zinc que pueden ser utilizadas en la fortificación de alimentos: sulfato, clorhidrato, gluconato, óxido y estearato de zinc (35). En el caso de hierro existen 14 sales reconocidas como GRAS para el uso en fortificación de alimentos, dentro de ellas se encuentran: sulfato ferroso, gluconato ferroso, fumarato ferroso, fosfato férrico (28, 36). Las formas químicas que se utilizan frecuentemente son sulfato ferroso y sulfato de zinc, los cuales son compuestos solubles en agua y además poseen un bajo costo.

La fortificación requiere de un vehículo alimentario adecuado, elegido de acuerdo a la población o grupo vulnerable objetivo, existencia previa en el mercado, aceptabilidad y cantidad de consumo, siendo los alimentos comúnmente fortificados alrededor del mundo: harina, arroz, pastas, cereales de desayuno y fórmulas lácteas infantiles. Con respecto a la edad pediátrica los alimentos mayormente utilizados son los cereales (37, 38) y fórmulas lácteas (39-42). La leche es un alimento comúnmente utilizado para la fortificación pues posee varias ventajas, entre ellas que ya se encuentra disponible en el mercado, es ampliamente aceptada y frecuentemente es el alimento elegido para niños pequeños; por lo que la fortificación de lácteos ha sido la estrategia usualmente usada para prevenir la deficiencia de hierro en los niños.

La proporción de costo-beneficio está relacionada con productividad física, desarrollo cognitivo en el caso de hierro, y para zinc está relacionada con el retraso en el crecimiento. Asimismo los análisis económicos sugieren que la fortificación es en efecto una inversión de alta prioridad (43) y las estrategias para mejorar la biodisponibilidad de alimentos fortificados de bajo valor económico, juegan un importante papel en los cambios necesarios para mejorar el estado nutricional de la población. Es así que se considera de importancia apoyar y mejorar los programas de fortificación vigentes.

En nuestro país se han realizado diversos estudios de eficacia y efectividad con leches enriquecidas con hierro (40, 41, 44-46), los cuales han servido para mejorar los productos entregados por el Programa Nacional de Alimentación Complementaria (PNAC). Desde el año 1999 este programa entrega gratuitamente 2 kg mensuales de un producto destinado para niños menores de 18 meses llamado “Leche Purita Fortificada”, el cual está formulado a base de leche de vaca en polvo fortificada con 10 mg hierro, 5 mg zinc y 0.5 mg cobre por 100 g de producto.

La introducción de esta leche ha reducido la prevalencia de anemia ferropriva en los lactantes a menos de la mitad (47), otro estudio muestra la reducción de anemia de un 27.3% a un 8.8% (46), luego de la introducción de la entrega de Leche Purita Fortificada en nuestro país.

La prevalencia de deficiencia de micronutrientes no siempre se encuentra disponible a nivel mundial o nacional, debido a que no se encuentran estudios de muestras representativas sumado a que ciertos indicadores poseen algunas limitaciones (48). En el caso de zinc, una reunión de varios grupos internacionales de expertos, plantean dentro de sus metodologías utilizar el punto de corte del requerimiento promedio estimado (EAR, por sus siglas en inglés), para estimar la población deficiente en zinc; cuando en la población se alcanza un 25% de probabilidad de ingesta inadecuada el riesgo de deficiencia es considerado elevado (49).

En nuestro país existe evidencia de que la Leche Purita Fortificada no ha tenido un efecto similar sobre el estado de nutrición de zinc como la observada para hierro, pues un porcentaje importante de lactantes presenta aún valores subnormales de zinc plasmático 54.8% (47), lo cual plantearía la posibilidad de aumentar la concentración de zinc en la leche fortificada, asimilándola a la proporción en que el hierro y zinc se encuentran en la leche materna, la que es de aproximadamente 1:1 (50).

No obstante, primero es necesario asegurar que esta modificación no afecte la absorción de hierro, dado que el hierro y el zinc pueden presentar interacciones negativas mutuas en su absorción intestinal (36, 51); un aumento en la concentración de zinc en la Leche Purita Fortificada podría reducir la absorción de hierro, lo que reduciría la efectividad de esta leche fortificada en la prevención de la deficiencia de hierro.

Este estudio contribuye al conocimiento de las interacciones entre hierro y zinc en matriz alimentaria, además los resultados son útiles para los programas de fortificación de alimentos en que se utilizan ambos minerales, pues en el caso de la leche se desconoce cuál es la proporción óptima de hierro y zinc a utilizar para evitar el efecto negativo de su interacción.

4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4.1. GENERAL

- Determinar el efecto de dosis crecientes de zinc adicionadas sobre la biodisponibilidad de hierro en leche entera en polvo fortificada con hierro en humanos.

4.2. ESPECÍFICOS

- Estimar la prevalencia de ingesta inadecuada de hierro y zinc.
- Determinar los valores del estado nutricional de hierro de cada participante.
- Determinar la biodisponibilidad de hierro de una leche fortificada con hierro en condiciones basales.
- Determinar el efecto de dosis crecientes de zinc adicionadas a la leche sobre la biodisponibilidad de hierro.

4.3. HIPÓTESIS

- La absorción de hierro disminuye en sujetos que consumen leche fortificada con hierro y zinc en comparación cuando ellos consumen el producto fortificado sólo con hierro, y esta disminución depende de la relación entre las concentraciones de hierro y zinc agregada al producto.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

Experimental, con diseño en bloque aleatorizado completo, la absorción de hierro será comparada entre los mismos sujetos, el orden que serán administradas las diferentes formulaciones de leche fortificada será aleatorizado.

5.2. SUJETOS

Por razones éticas se estudiaron mujeres adultas como reemplazo de lactantes. Se estudiaron 15 mujeres adultas voluntarias, entre 33 a 45 años, aparentemente sanas. Las participantes fueron reclutadas en las juntas de vecinos y/o consultorios del sector Sur-Oriente de Santiago. A las voluntarias se les explicó la naturaleza del estudio y para su participación se les solicitó el consentimiento informado por escrito antes de su inicio (Anexo 1).

Dado que se utilizaron isótopos radioactivos para la medición de la absorción de hierro, las mujeres debían estar con un método anticonceptivo eficaz (dispositivo intrauterino, anticonceptivos orales o ligadura de trompas), con prueba de embarazo negativa (prueba de gonadotrofina coriónica humana en orina), no en período de lactancia y no haber recibido suplemento mineral en los últimos 6 meses.

El protocolo del estudio fue previamente aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos.

5.3. TAMAÑO MUESTRAL

Se estimó una muestra de 13 sujetos para determinar una diferencia intrasujetos de 1 desviación estándar, en logaritmo natural, de 0.795 en la absorción de hierro en el mismo sujeto; con una desviación estándar en logaritmo natural de 0.795, con un nivel de significación del 5% y poder del 90%. Se incluirán 15 sujetos para cubrir posibles pérdidas una vez iniciado el estudio.

5.4 DEFINICIÓN DE VARIABLES

Tabla 1: Descripción de las variables a medir en el estudio

	Variables	Niveles	Naturaleza	Escala de medición
Independiente	Ingesta de leche fortificada	Zn:Fe adicionado 0:1, 0.4:1, 0.9:1 y 1.8:1 Zn:Fe total 0.3:1, 0.8:1, 1.2:1 y 2.1:1	Cuantitativa	Intervalar
Dependiente	Biodisponibilidad de hierro		Cuantitativa	Intervalar
Descriptivas	Estado nutricional	Enflaquecido Normal Sobrepeso Obesidad	Cualitativa	Ordinal
	Ingesta dietética	Punto de corte EAR	Cuantitativa	Intervalar
Interviniente	Estado nutricional de hierro	Anemia Anemia ferropriva Deficiencia de hierro sin anemia Depleción de depósitos	Cualitativa	Ordinal

5.5. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

5.5.1. MEDICIONES ANTROPOMÉTRICAS Y DIETÉTICAS

La evaluación antropométrica se realizó en el día 1 considerando las variables edad en años, peso en kilos con una precisión de 100 g y estatura en metros con una precisión de 0.5 cm, la obtención de los datos se realizó de forma estandarizada (52). Con los datos obtenidos se construyó el índice de masa corporal (IMC) y los puntos de corte a utilizar fueron los establecidos por el Ministerio de Salud, que se detallan a continuación:

Tabla 2: Puntos de corte para IMC del adulto

Estado Nutricional	IMC (kg/m ²)
Enflaquecido	< 18.5
Normal	18.5 a 24.9
Sobrepeso	25 a 29.9
Obesidad	≥ 30

Se aplicó como método de estimación de la ingesta dietética la encuesta de tendencia de consumo cuantificada (Anexo 2) mediante la técnica de entrevista (53). La encuesta abarcó el período de tiempo del último mes y la estimación de porciones de alimentos consumidos fue realizada con estandarización en la equivalencia de medidas caseras a gramaje. Se utilizó la tabla de composición de alimentos del Laboratorio de Micronutrientes de INTA, Universidad de Chile.

Los valores de ingesta dietética se compararon con el rango de distribución de macronutrientes aceptable (AMDR, por sus siglas en inglés) para los

porcentajes de distribución de molécula calórica para macronutrientes (Tabla 3) (54) y con el requerimiento promedio estimado (EAR, por sus siglas en inglés) para hierro (55) corregido con una biodisponibilidad del 10% y zinc (33).

Es importante diferenciar algunos conceptos empleados en el contexto de requerimiento de nutrientes, como son: requerimiento fisiológico promedio, requerimiento promedio estimado e ingesta dietética recomendada. El requerimiento fisiológico promedio hace referencia a la cantidad de nutriente que debe ser absorbido para reponer las pérdidas. El requerimiento promedio estimado se refiere al nivel de ingesta mediante el cual el 50% de la población cubre sus requerimientos fisiológicos, el cual se calcula dividiendo el requerimiento fisiológico promedio por la absorción fraccional. La ingesta dietética recomendada (RDA, por sus siglas en inglés) corresponde al requerimiento promedio estimado + 2 desviaciones estándar, asegurando que entre el 97 al 98% de la población cubra sus requerimientos fisiológicos.

Para evaluar si la ingesta usual a nivel individual o grupal se debe ocupar el requerimiento promedio estimado, a través del método de punto de corte de EAR (Tabla 3), si la ingesta se encuentra sobre el valor de EAR probablemente la ingesta es adecuada, y por el contrario si la ingesta se encuentra bajo el valor de EAR probablemente la ingesta es inadecuada.

Tabla 3: AMDR y EAR para mujeres adultas

	IOM	FAO/OMS ¹	IZinCG ²
Proteínas (%)	10-35		
Lípidos (%)	20-35		
Hidratos de Carbono (%)	45-65		
Hierro (mg/día)		14.5	
Zinc (mg/día)			8

¹ Biodisponibilidad de hierro de la dieta del 10%

² En base a dieta no refinada

5.5.2. ALIMENTO

Se utilizó una leche en polvo entera comercializada en el país, la cual fue reconstituida con agua destilada en una concentración del 10% y se agregó 5% de sacarosa, con el propósito de que sea consumida como habitualmente se prepara la fórmula láctea infantil. A lo anterior se le agregó hierro, en forma de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt, Germany), y se prepararon partidas con dosis crecientes de agregado de zinc, en forma de sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt, Germany), antes de consumir (57).

La leche reconstituida se fortificó con 10 mg/L de hierro, o la misma cantidad de hierro más 0, 5, 10 o 20 mg/L de zinc; lo cual equivale a dosis molares adicionadas de Zn:Fe de 0:1, 0.4:1, 0.9:1 y 1.8:1. Al contabilizar la cantidad nativa presente en la leche más las cantidades adicionadas, equivale a dosis molares de Zn:Fe de 0.3:1, 0.8:1, 1.2:1 y 2.1:1 (Anexo 3), nombrándose fórmula 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Todos los ingredientes fueron mezclados por 30 minutos antes de su consumo.

Los 15 sujetos recibieron los 4 tipos de formulaciones de leche fortificada, el orden de la secuencia del tipo de leche administrada, fue seleccionada al azar, el cual correspondió a fórmula 1, 4, 2 y 3, los días de estudio 1, 2, 14 y 15, respectivamente.

5.5.3. MEDICIONES BIOQUÍMICAS

Se tomó una muestra de sangre venosa en ayunas el día 14 del estudio, 10 mL de la muestra fueron utilizados para evaluar el estado nutricional de hierro de los sujetos, mediante los siguientes parámetros de laboratorio: hemoglobina (Hb) y volumen corpuscular medio (VCM) utilizando un contador celular electrónico (CELL-DYN 1700, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA), saturación de transferrina (Sat) mediante la técnica de Fischer et al (58), zinc-protoporfirina eritrocitaria (ZPP) a través de un hematofluorímetro (ZP Hematofluorometer Model 206D, AVIV Biomedical Inc., Lakewood, NJ, USA) y ferritina sérica (FS) a través de la metodología recomendada por International Nutritional Anemia Consultative Group (59).

Se clasificaron con el diagnóstico de anemia a las mujeres que tenían una hemoglobina <12 g/dL, anemia ferropriva a quienes tenían anemia más 2 o más de los otros parámetros de nutrición de hierro alterados, deficiencia de hierro sin anemia a los sujetos con hemoglobina normal y 2 o más de los otros parámetros de nutrición de hierro alterados y depleción de los depósitos de hierro a las mujeres que tenían sólo una ferritina sérica <12 µg/L. Los puntos de corte que se utilizaron se detallan en la tabla a continuación:

Tabla 4: Puntos de corte para los parámetros de nutrición de hierro

Parámetro	Puntos de corte
Hemoglobina (Hb)	<12 g/dL
Volumen corpuscular medio (VCM)	<80 fL
Saturación de la transferrina (Sat)	<15%
Zinc-protoporfirina eritrocitaria (Zpp)	>70 µg/dL GR
Ferritina sérica (FS)	<12 µg/L

5.5.4. ESTUDIOS ISOTÓPICOS

Se utilizaron como marcadores 2 diferentes radioisótopos de hierro, ^{59}Fe y ^{55}Fe , de alta especificidad (Du Pont de Nemours, Wilmington, DE), los cuales fueron mezclados con las leches diluidas y fortificadas, inmediatamente antes de su administración. La ventaja de utilizar la técnica doble radioisotópica, es poder medir diferentes formulaciones de fortificación en el alimento en un corto período, al usar 2 marcadores extrínsecos para estimar la absorción de hierro.

Las dosis de radioisótopos administradas fueron previamente aprobadas por la Comisión Chilena de Energía Nuclear, su administración se realizó de la siguiente manera: los días 1 y 14 del estudio se utilizaron 111 kbq de ^{55}Fe y los días 14 y 15 del estudio se utilizaron 37 kbq ^{59}Fe .

De la muestra venosa obtenida el día 14, 20 mL se utilizaron para medir la radioactividad circulante por la leche consumida en los días 1 y 2. Una muestra final de sangre venosa de 20 mL se obtuvo el día 28 para determinar el aumento en la radioactividad circulante por la leche consumida en los días 14 y 15.

La cantidad de radioactividad ingerida se calculó a partir de alícuotas de las leches marcadas contadas en sextuplicado. La medición de la radioactividad circulante se determinó mediante la técnica de Eakins y Brown en duplicados de sangre venosa (60). Todas las muestras de leche y de sangre se analizaron en el Laboratorio de Micronutrientes del INTA utilizando un contador de centelleo líquido (Tri-Carb 1500TR, Packard Instruments Co., Downers Grove, IL, USA), realizando la medición en el tiempo suficiente para obtener un error de recuento <3%.

La radioactividad de las muestras de leche y sangre venosa se contaron simultáneamente al final del estudio, para evitar un error en el cálculo de absorción de hierro debido al decaimiento de los isótopos que pudo haber ocurrido entre la administración y la medición de estos 14 días después. Además, la absorción de

hierro administrado en los días 14 y 15 fue corregido por el isótopo que fue administrado los días 1 y 2, sustrayendo a la radiactividad del día 28 la del día 14.

Los porcentajes de absorción de hierro se calcularon a partir de la radioactividad circulante, calculada en base a la volemia estimada a partir de la altura y peso (61), menos la radioactividad ingerida y asumiendo un 80% de incorporación al eritrocito de la radioactividad ingerida (62). Este método es reproducible en el laboratorio con un coeficiente de variación inferior al 5%.

5.5.5. PROTOCOLO DEL ESTUDIO

En los días de estudio que correspondía la administración de las distintas formulaciones de leche, primero se reconstituyó la leche al 10% y se le adicionó 5% de sacarosa, luego se fortificó con las sales correspondientes y finalmente se agregó el isótopo de hierro respectivo al día del estudio.

El consumo de la leche diluida, fortificada y marcada se realizó en los días 1, 2, 14 y 15 del estudio al desayuno, en el horario entre las 7:00 y 9:00 de la mañana después de un ayuno nocturno, de al menos 8 horas. No se permitió el consumo de otros alimentos o bebidas en las siguientes 4 horas, a excepción de la ingesta de agua.

Los sujetos recibieron un vaso de 200 ml de leche, con las diferentes formulaciones en 4 días distintos. La cantidad exacta de leche ingerida por cada sujeto se calculó por diferencia de peso del vaso.

La toma de muestra de sangre venosa para evaluar el estado nutricional de hierro se realizó el día 14 del estudio, previo al consumo de la formulación de leche correspondiente. La muestra venosa para contabilizar la radioactividad circulante se realizó el día 14 del estudio y se realizó una toma de muestra venosa final el día 28 del estudio para evaluar el aumento de la radioactividad circulante.

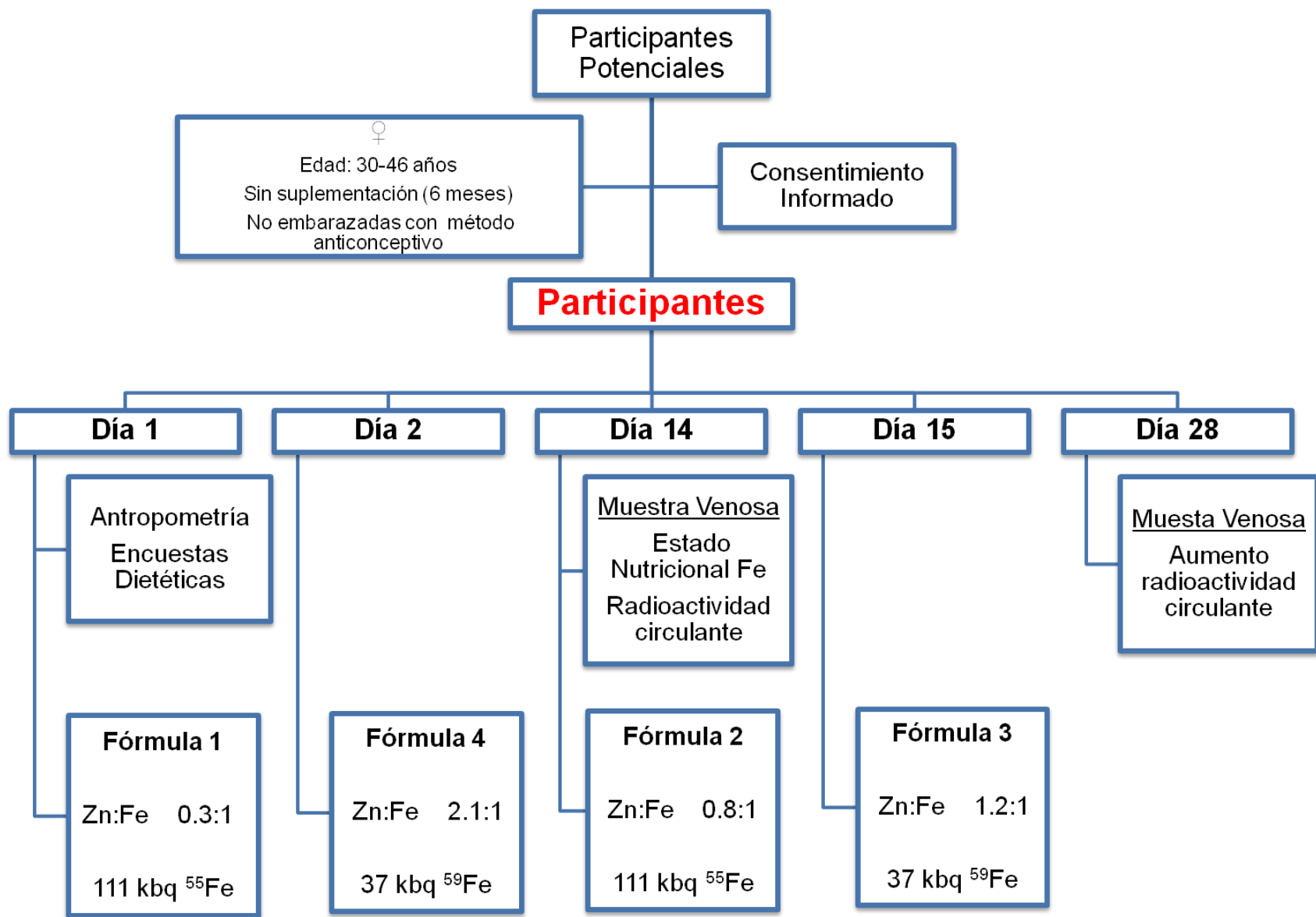


Figura 1: Protocolo del estudio

Se presentan las fórmulas en proporciones molares de hierro y zinc totales (adicionado más nativo).

5.6. PLAN DE ANÁLISIS

La recolección de datos se realizó a través de antropometría, encuesta dietética y muestras de sangre venosa. Se digitaron los datos por duplicado, con el fin de evitar errores en su traspaso y validar así la base de datos.

Para definir las variables se sometieron a la prueba de normalidad Shapiro-Wilk, las variables a analizar que se distribuían asimétricamente se transformaron a sus respectivos logaritmos naturales para la aplicación de estadística paramétrica (63).

Se sabe que los valores de ferritina y de biodisponibilidad de hierro presentan una distribución asimétrica (64-66), por lo que los valores fueron transformados a sus logaritmos naturales antes de calcular los promedios y desviaciones estándares, los análisis estadísticos se realizaron en los valores transformados a sus logaritmos. Luego los resultados fueron retransformados a sus antilogaritmos para recobrar las unidades originales.

Los resultados fueron expresados como promedios y desviación estándar, cuando la variable tuvo una distribución normal, y los datos con distribución asimétrica fueron expresados como promedios geométricos y rango de ± 1 desviación estándar.

Se utilizó análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas con el fin determinar diferencias significativas entre las absorciones de hierro para los datos de cada sujeto.

Se utilizó el programa estadístico Statistica (for Windows, release 4.5, StatSoft Inc., Tulsa, OK) y se consideró significativo un valor $p < 0.05$ en todos los casos.

6. RESULTADOS

El promedio (\pm desviación estándar) de edad de los sujetos fue de 38.1 ± 3.6 años, el peso 65.5 ± 11.0 kg y la talla 1.57 ± 0.06 m (Tabla 5). En cuanto al estado nutricional de las 15 mujeres, se encontraban 6 de ellas con peso normal (40%), 6 con sobrepeso (40%) y 3 en estado de obesidad (20%).

Tabla 5: Características generales de los sujetos

Variable	Promedio	DE ¹	Mínimo	Máximo
Edad (a)	38.1	3.6	33	45
Peso (kg)	65.5	11.0	56.0	89.5
Talla (m)	1.57	0.06	1.50	1.66
IMC ² (kg/m ²)	26.5	4.3	21.4	35.2

¹ DE, desviación estándar

² IMC, índice de masa corporal

Con respecto a la ingesta dietética de los sujetos, el promedio de energía consumida correspondió a 2127 kcal, 81.3 g de proteínas, 292.6 g de hidratos de carbono, 71.2 g de lípidos, 15.9 mg de hierro y 10.5 mg de zinc (Tabla 6). El promedio de la distribución de la molécula calórica se encontraba dentro de los rangos de distribución de macronutrientes aceptables (AMDRs, por sus siglas en inglés). En relación al requerimiento promedio estimado (EAR, por sus siglas en inglés) para hierro a nivel grupal el promedio de consumo dietario se encuentra sobre el punto de corte, por lo tanto probablemente la ingesta es adecuada, y lo mismo ocurre para el caso del zinc. A nivel individual en el caso de hierro 5 mujeres se encuentran bajo el punto de corte de EAR y 4 para zinc, correspondiendo a 33% y 27% de ingestas probablemente inadecuadas para hierro y zinc, respectivamente.

Tabla 6: Ingesta dietética de los sujetos

Variable	Promedio	DE ¹	Por 100 kcal	%DMC ²
Energía (kcal)	2127	771		
Proteínas (g)	81.3	60.1	3.8	15
Hidratos de carbono (g)	292.6	121.5	13.8	55
Lípidos (g)	71.2	17.2	3.3	30
Hierro (mg)	15.9	4.3	0.7	
Zinc (mg)	10.5	7.0	0.5	

¹ DE, desviación estándar

² %DMC, distribución de la molécula calórica en porcentaje

El promedio (\pm desviación estándar) de hemoglobina, volumen corpuscular medio, zinc-protoporfirina eritrocitaria y saturación de transferrina de los sujetos participantes fueron 13.9 ± 1.4 g/L, 88 ± 5 fL, y 69.7 ± 12.5 μ g/dL GR, 28.4 ± 7.5 respectivamente (Tabla 7). Además, el promedio geométrico (\pm rango de 1 desviación estándar) para ferritina sérica fue 14 (7-27). Una de las mujeres que participó en el estudio tuvo anemia por deficiencia de hierro, 2 deficiencia de hierro sin anemia y 3 depósitos de hierro depletados, lo que equivale a una prevalencia del 7%, 13% y 20%, respectivamente.

Tabla 7: Estado nutricional de hierro de los participantes

Parámetros	Promedio	DE ¹
Hemoglobina (g/dL)	13.9	1.4
Volumen corpuscular medio (fL)	88.4	5.3
Zinc-protoporfirina eritrocitaria (μ g/dL)	69.7	12.5
Saturación de transferrina (%)	28.4	7.5
Ferritina sérica (μ g/L) ²	13.8	7 - 27

¹ DE, desviación estándar

² FS, promedio geométrico \pm rango de 1 desviación estándar

La ingesta de la leche fortificada con hierro y dosis crecientes de zinc marcada con isótopos varió entre 199 a 201 g. El promedio geométrico (\pm rango de 1 desviación estándar) de la absorción de hierro de la leche fortificada solo con sulfato ferroso, sin adición de zinc fue de 6% (2.8-13.0%). La fortificación con zinc logrando una proporción final (nativo más adicionado) de Zn:Fe en la leche de 0.3:1, 0.8 :1, 1.2:1 y 2.1:1, no tuvo efecto significativo sobre la absorción de hierro (Tabla 8).

Tabla 8: Efecto de cantidades crecientes de zinc sobre la absorción de hierro

	Fórmula 1	Fórmula 2	Fórmula 3	Fórmula 4
Zinc adicionado (mg/L)	0	5	10	20
Hierro adicionado (mg/L)	10	10	10	10
Zn:Fe ¹ (proporción molar)	0:1	0.4:1	0.9:1	1.8:1
Zinc total (mg/L)	3.3	8.3	13.3	23.3
Hierro total (mg/L)	10.1	10.1	10.1	10.1
Zn:Fe ² (proporción molar)	0.3:1	0.8:1	1.2:1	2.1:1
Absorción de Hierro (%) ^{3,4}	6.0 (2.8-13.0)	6.7 (3.2-13.7)	5.4 (2.2-13.2)	5.3 (2.8-10.0)

¹ Proporción molar hierro y zinc adicionados a la leche

² Proporción molar hierro y zinc total (nativos más adicionados a la leche)

³ Promedio geométrico \pm rango de 1 desviación estándar

⁴ ANOVA para medidas repetidas, F=1.31, p=0.28.

Al comparar la absorción de hierro de leche cofortificada con hierro y zinc, en relación a la absorción de hierro de leche fortificada solo con hierro, según las diferentes dosis de zinc adicionadas (Figura 2), tampoco se encontró un efecto significativo.

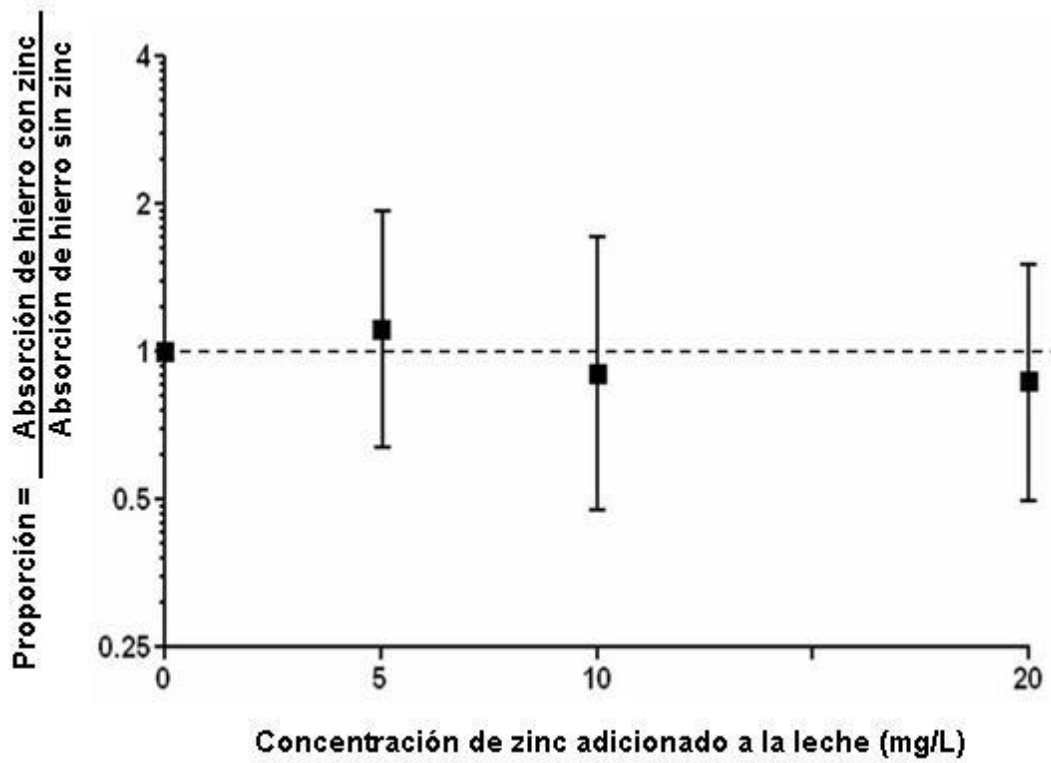


Figura 2: Razón de absorción de hierro

Se muestra promedio geométrico ± rango de 1 desviación estándar.

ANOVA para medidas repetidas: $F=2.29$, $p=0.12$.

7. DISCUSIÓN

La interacción negativa entre hierro y zinc se ha demostrado a través de estudios realizados en solución acuosa (19, 20), se ha encontrado que al administrar ambos minerales conjuntamente se observa una inhibición en la absorción de hierro a proporciones molares de Zn:Fe \geq 5:1 en concentraciones fisiológicas (67) y en una proporción equimolar de 1:1 a dosis farmacológicas (18). Por otro lado, también se ha medido el efecto del zinc sobre la absorción de hierro en matriz alimentaria no encontrándose en general un efecto negativo (20, 68). Existen pocos estudios en leche en los que se ha analizado esta interacción, un estudio en prematuros utilizó una proporción molar de Zn:Fe de 4:1, la cual no inhibió la absorción de hierro (68); en nuestro estudio encontramos que la adición de dosis crecientes de zinc a la leche, de hasta 20 mg/L no inhiben la absorción de hierro (proporción molar Zn:Fe de hasta 2.1:1).

Los mecanismos involucrados en la interacción entre hierro y zinc a nivel intestinal no están bien elucidados. Esta interacción negativa podría explicarse por una competencia por la unión al transportador de metales divalentes (DMT1) a nivel del enterocito, el cual participa en el transporte de metales divalentes, entre ellos hierro y zinc (69), aunque este transportador tiene mayor afinidad por hierro que por zinc (70). Sin embargo, algunos estudios realizados en cultivos de células de origen epitelial intestinal Caco-2, han cuestionado el papel del DMT-1 en la captación de zinc por el enterocito (71, 72). Más recientemente se ha postulado que existe otra vía común de captación del zinc y el hierro, diferente del DMT1, que está localizada en la membrana apical del enterocito (73). Por otra parte, como en la mayoría de los estudios realizados se ha medido la biodisponibilidad de hierro, otros mecanismos podrían estar involucrados, como es el caso de la transferrina y ferritina. La transferrina es la principal proteína transportadora de hierro, también puede unir zinc el que podría competir con el hierro (74-77) y además el zinc puede bloquear la capacidad de almacenaje de hierro de la ferritina (78-81). Recientemente se ha

demostrado en hepatocitos que el transportador Zip-14 además de transportar zinc al interior de las células capta hierro no unido a la transferrina (82).

La interacción negativa observada en los estudios en solución acuosa se podría explicar por la gran cantidad de cationes de ambos minerales disponibles para ser absorbidos en el lumen intestinal, lo cual se observa a dosis elevadas cuando los transportadores preferentes se encuentran saturados, por lo tanto se podría dar lugar a la competencia por la absorción entre hierro y zinc. En cambio en matriz alimentaria hay una menor cantidad de cationes libres, debido a la interacción con los otros componentes de la dieta. En solución acuosa DMT1 sería el punto de interacción más probable y los otros mecanismos no serían biológicamente relevantes.

Se ha demostrado que la baja biodisponibilidad de hierro en la dieta es la principal causa de la alta prevalencia de anemia en los países no desarrollados (83). La lactancia materna exclusiva durante los primeros 6 meses de vida es la principal estrategia para prevenir deficiencia de hierro en esta edad, sin embargo, sólo un 45,8% de los niños son alimentados exclusivamente con lactancia materna hasta los 6 meses, según datos de la última encuesta de lactancia materna nacional (84); para el gran número restante de lactantes el uso de fórmulas lácteas fortificadas con hierro es una de las alternativas para garantizar una nutrición adecuada.

Las fórmulas lácteas modificadas con hierro han sido utilizadas principalmente en la prevención de deficiencia de hierro en la infancia (85). Para países como el nuestro, la Organización Mundial de la Salud estima una biodisponibilidad intermedia de hierro de la dieta de un 10%, lo cual es ocupado en el cálculo de la ingesta dietética recomendada (RDA, por sus siglas en inglés). Sin embargo, es importante destacar que para evaluar la ingesta individual o poblacional no es correcto utilizar RDA (86), sino que se debe utilizar el requerimiento promedio estimado (EAR, por sus siglas en inglés). Por otro lado, la leche de vaca no modificada tiene un efecto inhibitorio en la absorción de hierro, debido principalmente a los inhibidores que ésta posee: caseínas (26), calcio (87, 88) y fosfatos (89). La absorción de hierro de leche fortificada con sulfato ferroso en nuestro estudio alcanzó un 6% de biodisponibilidad,

que es semejante a lo encontrado en otros estudios en que ésta ha variado entre un 4 a 5% (57, 90).

La deficiencia de hierro se encuentra en la mayoría de los países en vías de desarrollo y aún está presente en los países desarrollados (91, 92). Los estudios sobre la prevalencia de deficiencia de zinc en lactantes poseen grandes diferencias sobre los valores encontrados utilizando el indicador de zinc sérico, principalmente por los diferentes puntos de corte utilizados para diagnosticar déficit de zinc, en México se ha utilizado $< 65 \mu\text{d/dl}$ encontrándose una prevalencia del 28% en el área urbana (93) y en otro estudio $< 70 \mu\text{d/dl}$ encontrándose 34% (12), en California utilizando el punto de corte anterior se encontró un 42.8% (94) y en nuestro país con $< 80 \mu\text{d/dl}$ se encontró un 54.8% de prevalencia de déficit de zinc en lactantes de Santiago (47). Otro indicador de deficiencia de zinc es la ingesta dietética bajo EAR, en nuestro estudio encontramos una prevalencia de ingesta inadecuada del 27%, que supera al 25% planteado para un riesgo de deficiencia considerado elevado (49). El tercer indicador de deficiencia de zinc utilizado es la talla baja ($T/E < -2DE$), el cual es un indicador tardío pues es resultado de un déficit elevado crónico de zinc.

La leche de vaca entera tiene un contenido de zinc de 3.3 mg por 100 g de polvo, las especificaciones técnicas para la Leche Purita Fortificada (95), indican que el producto final debe tener un nivel de zinc de 5 mg por 100 g de polvo, por lo tanto la cantidad adicionada en forma extra a la leche es menor a la cantidad nativa que posee. En cambio para hierro se debe alcanzar un nivel de 10 mg por 100 g de polvo y la leche de vaca contiene solo 0.1 mg por 100 g de polvo, siendo su incremento mayor en comparación a la adición de zinc del producto final. Lo anterior expuesto podría explicar que la entrega por parte del PNAC de la Leche Purita Fortificada ha reducido significativamente la prevalencia de anemia en nuestros lactantes (46, 96, 97), lo que contrasta con el impacto sobre la nutrición de zinc (47).

Otro punto importante a considerar son los resultados de estudios de suplementación con zinc a nivel regional (98) y nacional (14, 99), en los cuales se ha encontrado un efecto favorable sobre el crecimiento en niños. Otros estudios han evaluado el impacto de la suplementación de zinc con indicadores de morbilidad,

encontrándose una reducción del 20% en los episodios de diarrea y 15% en las infecciones respiratorias agudas (100). En una reciente revisión de estudios de suplementación con hierro y zinc se encontró que cuando ésta se realiza en conjunto, generalmente no se afectan negativamente los indicadores bioquímicos (101), y propone los programas de suplementación en conjunto como una forma eficiente de entrega de ambos minerales, sin perder los beneficios de su entrega individual.

Cuando la fortificación es establecida sobre patrones de consumo de alimentos ya existentes, no son necesarios cambios en la dieta habitual de la población objetivo. Varios países desarrollados y en vías de desarrollo han implementado programas exitosos con el fin de eliminar la malnutrición y deficiencias de micronutrientes, se ha encontrado que la entrega de alimentos fortificados ha tenido un impacto positivo contribuyendo a mejorar la salud de la población (102).

Los resultados antes mencionados plantean la posibilidad de aumentar el contenido de zinc de la Leche Purita Fortificada desde 5 a 10 mg por 100 g de polvo, manteniendo la actual concentración de hierro (10 mg/100 g de polvo), lo que de acuerdo a nuestros resultados no impactaría negativamente la biodisponibilidad de hierro. Por otra parte, la absorción de zinc no se comprometería ya que en matrices alimentarias complejas se ha visto que el hierro inhibe la absorción de zinc en proporciones molares respecto al hierro de 25:1 (36, 103). Tampoco existiría un riesgo de inhibir la absorción de cobre ya que se requieren dosis farmacológicas de zinc para producir este efecto (104, 105).

8. CONCLUSIÓN

En conclusión, este estudio muestra que en leche entera en polvo fortificada con 10 mg/L de hierro, la adición de 20 mg/L de zinc no inhibe la absorción de hierro, lo que equivale a la adición de relaciones molares Zn:Fe menores o iguales a 1.8:1, y a relaciones molares finales del producto de Zn:Fe menores o iguales a 2.1:1. Por lo cual sería factible aumentar la concentración de zinc de la Leche Purita Fortificada hasta 23.3 mg por 100 g de polvo sin afectar la absorción de hierro.

9. FINANCIAMIENTO

Este trabajo forma parte del proyecto titulado “Efectos de diferentes niveles de fortificación con zinc sobre la absorción de hierro de productos alimentarios cofortificados con hierro y zinc”, el cual se encuentra financiado por FONDECYT # 1100094 y su investigador responsable es Manuel Olivares Grohnert.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Olivares M, Walter T, Hertrampf E, Pizarro F. Anaemia and iron deficiency disease in children. *Br Med Bull.* 1999;55(3):534-43.
2. Solomons NW, Schumann K. Lessons learned in iron intervention trials. *Am J Clin Nutr.* 2002 Sep;76(3):691-3.
3. Muller O, Krawinkel M. Malnutrition and health in developing countries. *CMAJ.* 2005;173(3):279-86.
4. Krebs NF. Dietary zinc and iron sources, physical growth and cognitive development of breastfed infants. *J Nutr.* 2000;130:358S-60S.
5. Olivares M, Walter T. Consecuencias de la deficiencia de hierro. *Rev Chil Nutr.* 2003;30:226-33.
6. Rubio C, González Weller D, Martín-Izquierdo RE, Revert C, Rodríguez I, Hardisson A. El zinc: oligoelemento esencial. *Nutr Hosp.* 2007;22(1):101-7.
7. Sandstead HH. Causes of iron and zinc deficiencies and their effects on brain. *J Nutr.* 2000;130(2S Suppl):347S-9S.
8. Gibson RS, McKenzie JE, Ferguson EL, Parnell WR, Wilson NC, Russell DG. The Risk of Inadequate Zinc Intake in United States and New Zealand Adults. *Nutr Today.* 2003;38(2):63-70.
9. McLean E, Egli I, Cogswell M, de Benoist B, Wojdyla D. Worldwide prevalence of anemia in preschool aged children, pregnant women and non-pregnant women of reproductive age. In: Kraemer K, Zimmermann MB, editors. *Nutritional Anemia.* Basel, Switzerland: Sight and Life Press; 2007. p. 1-12.
10. Yip R, Ramakrishnan U. Experiences and challenges in developing countries. *J Nutr.* 2002;132:827S-30S.
11. Lonnerdal B, Dewey KG. Epidemiology of iron deficiency in infants and children. *Ann Nestlé.* 1995;53:11-7.
12. Villalpando S, Garcia-Guerra A, Ramirez-Silva CI, Mejia-Rodriguez F, Matute G, Shamah-Levy T, et al. Iron, zinc and iodide status in Mexican children under 12 years and women 12-49 years of age. A probabilistic national survey. *Salud Publica Mex.* 2003;45 Suppl 4:S520-9.
13. Castillo-Duran C, Garcia H, Venegas P, Torrealba I, Panteon E, Concha N, et al. Zinc supplementation increases growth velocity of male children and adolescents with short stature. *Acta Paediatr.* 1994;83(8):833-7.
14. Ruz M, Castillo-Duran C, Lara X, Codoceo J, Rebolledo A, Atalah E. A 14-mo zinc-supplementation trial in apparently healthy Chilean preschool children. *Am J Clin Nutr.* 1997;66(6):1406-13.

15. Castillo-Duran C, Perales CG, Hertrampf ED, Marin VB, Rivera FA, Icaza G. Effect of zinc supplementation on development and growth of Chilean infants. *J Pediatr*. 2001;138(2):229-35.
16. Sandstrom B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. *Br J Nutr*. 2001;85 S181-5.
17. Olivares M, Pizarro F, Ruz M. Zinc inhibits nonheme iron bioavailability in humans. *Biol Trace Elem Res*. 2007;117:7-14.
18. Olivares M, Pizarro F, Ruz M. New insights about iron bioavailability inhibition by zinc. *Nutrition*. 2007;23(4):292-5.
19. Crofton RW, Gvozdanic D, Gvozdanic S, Khin CC, Brunt PW, Mowat NA, et al. Inorganic zinc and the intestinal absorption of ferrous iron. *Am J Clin Nutr*. 1989;50(1):141-4.
20. Rossander-Hulten L, Brune M, Sandstrom B, Lonnerdal B, Hallberg L. Competitive inhibition of iron absorption by manganese and zinc in humans. *Am J Clin Nutr*. 1991;54(1):152-6.
21. Olivares M, Pizarro F, Gaitán D, Ruz M. Acute inhibition of iron absorption by zinc. *Nutrition Research*. 2007;27:279-82.
22. Herman S, Griffin IJ, Suwanti S, Ernawati F, Permaesih D, Pambudi D, et al. Cofortification of iron-fortified flour with zinc sulfate, but not zinc oxide, decreases iron absorption in Indonesian children. *Am J Clin Nutr*. 2002;76(4):813-7.
23. Mendoza C, Peerson JM, Brown KH, Lonnerdal B. Effect of a micronutrient fortificant mixture and 2 amounts of calcium on iron and zinc absorption from a processed food supplement. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(2):244-50.
24. Gaitán D, Olivares M, Arredondo M, Pizarro F. Biodisponibilidad de hierro en humanos. *Rev Chil Nutr*. 2006;33(2):142-8.
25. Teucher B, Olivares M, Cori H. Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids. *Int J Vitam Nutr Res*. 2004;74(6):403-19.
26. Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad TP, Dassenko SA, Cook JD. Iron absorption in humans as influenced by bovine milk proteins. *Am J Clin Nutr*. 1989;49(3):546-52.
27. Lonnerdal B. Dietary factors influencing zinc absorption. *J Nutr*. 2000;130:1378S-83S.
28. Hertrampf E. Iron fortification in the Americas. *Nutr Rev*. 2002 Jul;60(7 Pt 2):S22-5.
29. Fairweather-Tait SJ. Iron in food and its availability. *Acta Paediatr Scand Suppl*. 1989;361:12-20.
30. Olivares M, Pizarro F, Hertrampf E, Walter T, Arredondo M, Letelier A. Fortificación de alimentos con hierro en Chile. *Rev Chil Nutr*. 2000;27:340-44.
31. Uauy R, Hertrampf E, Reddy M. Iron fortification of foods: overcoming technical and practical barriers. *J Nutr*. 2002;132(4 Suppl):849S-52S.

32. Adu-Afarwuah S, Lartey A, Brown KH, Zlotkin S, Briend A, Dewey KG. Home fortification of complementary foods with micronutrient supplements is well accepted and has positive effects on infant iron status in Ghana. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(4):929-38.
33. Brown KH, Rivera JA, Bhutta Z, Gibson RS, King JC, Lonnerdal B, et al. International Zinc Nutrition Consultative Group (IZiNCG) technical document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutr Bull.* 2004 Mar;25(1 Suppl 2):S99-203.
34. Lutter CK, Dewey KG. Proposed nutrient composition for fortified complementary foods. *J Nutr.* 2003;133(9):3011S-20S.
35. López de Romaña D, Castillo C, Diazgranados D. El zinc en la salud humana - II. *Rev Chil Nutr.* 2010;37:240-7.
36. Whittaker P. Iron and zinc interactions in humans. *Am J Clin Nutr.* 1998 Aug;68(2 Suppl):442S-6S.
37. Walter T, Dallman PR, Pizarro F, Velozo L, Pena G, Bartholmey SJ, et al. Effectiveness of iron-fortified infant cereal in prevention of iron deficiency anemia. *Pediatrics.* 1993;91(5):976-82.
38. Johnson MA, Smith MM, Edmonds JT. Copper, iron, zinc, and manganese in dietary supplements, infant formulas, and ready-to-eat breakfast cereals. *Am J Clin Nutr.* 1998;67:1035S-40S.
39. Hertrampf E, Cayazzo M, Pizarro F, Stekel A. Bioavailability of iron in soy-based formula and its effect on iron nutriture in infancy. *Pediatrics.* 1986;78(4):640-5.
40. Stekel A, Olivares M, Pizarro F, Chadud P, Cayazzo M, Lopez I, et al. Prevention of iron deficiency in infants by fortified milk. Field study of a low-fat milk. *Arch Latinoam Nutr.* 1986;36(4):654-61.
41. Hertrampf E, Olivares M, Pizarro F, Walter T. High absorption of fortification iron from current infant formulas. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998;27(4):425-30.
42. Sazawal S, Dhingra U, Dhingra P, Hiremath G, Kumar J, Sarkar A, et al. Effects of fortified milk on morbidity in young children in north India: community based, randomised, double masked placebo controlled trial. *BMJ.* 2007;334:140-4.
43. Horton S. The economics of food fortification. *J Nutr.* 2006;136(4):1068-71.
44. Olivares M, Walter T, Hertrampf E, Pizarro F, Stekel A. Prevention of iron deficiency by milk fortification. The Chilean experience. *Acta Paediatr* 1989;361:109-13.
45. Stekel A, Olivares M, Cayazzo M, Chadud P, Llaguno S, Pizarro F. Prevention of iron deficiency by milk fortification. II. A field trial with a full-fat acidified milk. *Am J Clin Nutr.* 1988 Feb;47(2):265-9.
46. Hertrampf E, Olivares M, Pizarro F, Walter T. Impact of iron fortified milk in infants: evaluation of effectiveness. *Ann Nutr Metab.* 2001;45(XVII International Congress of Nutrition. Viena):117S (Abstract).

47. Torrejon CS, Castillo-Duran C, Hertrampf ED, Ruz M. Zinc and iron nutrition in Chilean children fed fortified milk provided by the Complementary National Food Program. *Nutrition*. 2004;20(2):177-80.
48. Allen LH. Limitations of current indicators of micronutrient status. *Nutr Rev*. 2009 May;67 Suppl 1:S21-3.
49. de Benoist B, Darnton-Hill I, Davidsson L, Fontaine O, Hotz C. Conclusions of the Joint WHO/UNICEF/IAEA/IZINCG Interagency Meeting on Zinc Status Indicators. *Food Nutr Bull*. 2007 Sep;28(3 Suppl):S480-4.
50. Feeley RM, Eitenmiller RR, Jones JB, Jr., Barnhart H. Copper, iron, and zinc contents of human milk at early stages of lactation. *Am J Clin Nutr*. 1983 Mar;37(3):443-8.
51. Lynch SR. Interaction of iron with other nutrients. *Nutr Rev*. 1997 Apr;55(4):102-10.
52. Lohoman TG, Roche AF, Martorell R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign, IL: Human Kinetics, 1988.
53. Urteaga C, Pinheiro A. Investigación alimentaria: consideraciones prácticas para mejorar la confiabilidad de los datos. *Rev Chil Nutr*. 2003;30:235-42.
54. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Energy, Carbohydrate, Fiber, Fat, Fatty Acids, Cholesterol, Protein, and Amino Acids. Washington, DC: National Academy Press, 2005.
55. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium and Zinc. Washington, DC: National Academy Press, 2002.
56. International Zinc Nutrition Consultative Group I. Technical Document #1. Assessment of the risk of zinc deficiency in populations and options for its control. *Food Nutr Bull*. 2004;25 S94–204.
57. Stekel A, Olivares M, Pizarro F, Chadud P, Lopez I, Amar M. Absorption of fortification iron from milk formulas in infants. *Am J Clin Nutr*. 1986;43(6):917-22.
58. Fischer DS, Price DC. A Simple Serum Iron Method Using the New Sensitive Chromogen Tripyridyl-S-Triazine. *Clin Chem*. 1964;10:21-31.
59. International Nutritional Anaemia Consultative Group I. Measurements of iron status. Washington: Nutrition Foundation. 1985:35-54.
60. Eakins JD, Brown DA. An improved method for the simultaneous determination of iron-55 and iron-59 in blood by liquid scintillation counting. *Int J Appl Radiat Isot*. 1966;17(7):391-7.
61. Nadler SB, Hidalgo JU, Bloch T. The tulane table of blood volume in normal man. *Surgery*. 1962;51:224-32.
62. Bothwell TH, Finch CA. Iron metabolism. Boston: Little brown, 1962.

63. Cook JD, Layrisse M, Finch CA. The measurement of iron absorption. *Blood*. 1969 Mar;33(3):421-9.
64. Olivares M, Pizarro F, Hertrampf E, Fuenmayor G, Estevez E. Iron absorption from wheat flour: effects of lemonade and chamomile infusion. *Nutrition*. 2007 Apr;23(4):296-300.
65. Olivares M, Pizarro F, Pineda O, Name JJ, Hertrampf E, Walter T. Milk inhibits and ascorbic acid favors ferrous bis-glycine chelate bioavailability in humans. *J Nutr*. 1997 Jul;127(7):1407-11.
66. Pizarro F, Olivares M, Hertrampf E, Nunez S, Tapia M, Cori H, et al. Ascorbyl palmitate enhances iron bioavailability in iron-fortified bread. *Am J Clin Nutr*. 2006 Oct;84(4):830-4.
67. Olivares M, Pizarro F, Ruz M. Zinc inhibits nonheme iron bioavailability in humans. *Biol Trace Elem Res*. 2007 Summer;117(1-3):7-14.
68. Friel JK, Serfass RE, Fennessey PV, Miller LV, Andrews WL, Simmons BS, et al. Elevated intakes of zinc in infant formulas do not interfere with iron absorption in premature infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1998 Sep;27(3):312-6.
69. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. 1997 Jul 31;388(6641):482-8.
70. Garrick MD, Singleton ST, Vargas F, Kuo HC, Zhao L, Knopfel M, et al. DMT1: which metals does it transport? *Biol Res*. 2006;39(1):79-85.
71. Talkvist J, Bowlus CL, Lonnerdal B. Functional and molecular responses of human intestinal Caco-2 cells to iron treatment. *Am J Clin Nutr*. 2000 Sep;72(3):770-5.
72. Kordas K, Stoltzfus RJ. New evidence of iron and zinc interplay at the enterocyte and neural tissues. *J Nutr*. 2004 Jun;134(6):1295-8.
73. Tandy S, Williams M, Leggett A, Lopez-Jimenez M, Dedes M, Ramesh B, et al. Nramp2 expression is associated with pH-dependent iron uptake across the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *J Biol Chem*. 2000 Jan 14;275(2):1023-9.
74. Harris WR. Thermodynamic binding constants of the zinc-human serum transferrin complex. *Biochemistry*. 1983 Aug 2;22(16):3920-6.
75. Evans GW, Winter TW. Zinc transport by transferrin in rat portal blood plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 1975 Oct 27;66(4):1218-24.
76. Charlwood PA. The relative affinity of transferrin and albumin for zinc. *Biochim Biophys Acta*. 1979 Dec 14;581(2):260-5.
77. Harris WR, Stenback JZ. The bicarbonate-dependence of zinc(II)-transferrin binding. *J Inorg Biochem*. 1988 Jul;33(3):211-23.
78. Harrison PM, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Jul 31;1275(3):161-203.

79. Settlemire CT, Matrone G. In vivo interference of zinc with ferritin iron in the rat. *J Nutr.* 1967 Jun;92(2):153-8.
80. Price D, Joshi JG. Ferritin: a zinc detoxicant and a zinc ion donor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 May;79(10):3116-9.
81. Havukainen H, Haataja S, Kauko A, Pulliainen AT, Salminen A, Haikarainen T, et al. Structural basis of the zinc- and terbium-mediated inhibition of ferroxidase activity in Dps ferritin-like proteins. *Protein Sci.* 2008 Sep;17(9):1513-21.
82. Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep 12;103(37):13612-7.
83. MacPhail AP. Iron deficiency and the developing world. *Arch Latinoam Nutr.* 2001 Mar;51(1 Suppl 1):2-6.
84. Atalah E. Evolución de la lactancia materna exclusiva en Chile entre 1993 y 2005. *Situación Actual de la Lactancia en Chile.* Ministerio de Salud de Chile; 2006.
85. American Academy of Pediatrics. Iron-fortified infant formulas. *Pediatrics.* 1989 Dec;84(6):1114-5.
86. Kennedy E, Meyers L. Dietary Reference Intakes: development and uses for assessment of micronutrient status of women--a global perspective. *Am J Clin Nutr.* 2005 May;81(5):1194S-7S.
87. Hallberg L, Brune M, Erlandsson M, Sandberg AS, Rossander-Hulten L. Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. *Am J Clin Nutr.* 1991 Jan;53(1):112-9.
88. Fairweather-Tait SJ. Iron-zinc and calcium-Fe interactions in relation to Zn and Fe absorption. *Proc Nutr Soc.* 1995 Jul;54(2):465-73.
89. Peters T, Jr., Apt L, Ross JF. Effect of phosphates upon iron absorption studied in normal human subjects and in an experimental model using dialysis. *Gastroenterology.* 1971 Sep;61(3):315-22.
90. Heinrich HC, Gabbe EE, Whang DH, Bender-Gotze C, Schafer KH. Ferrous and hemoglobin-⁵⁹Fe absorption from supplemented cow milk in infants with normal and depleted iron stores. *Z Kinderheilkd.* 1975 Nov 13;120(4):251-8.
91. DeMaeyer E, Adiels-Tegman M. The prevalence of anaemia in the world. *World Health Stat Q.* 1985;38(3):302-16.
92. Innis SM, Nelson CM, Wadsworth LD, MacLaren IA, Lwanga D. Incidence of iron-deficiency anaemia and depleted iron stores among nine-month-old infants in Vancouver, Canada. *Can J Public Health.* 1997 Mar-Apr;88(2):80-4.
93. Duque X, Flores-Hernandez S, Flores-Huerta S, Mendez-Ramirez I, Munoz S, Turnbull B, et al. Prevalence of anemia and deficiency of iron, folic acid, and zinc in children younger than 2 years of age who use the health services provided by the Mexican Social Security Institute. *BMC Public Health.* 2007;7:345.

94. Schneider JM, Fujii ML, Lamp CL, Lonnerdal B, Zidenberg-Cherr S. The prevalence of low serum zinc and copper levels and dietary habits associated with serum zinc and copper in 12- to 36-month-old children from low-income families at risk for iron deficiency. *J Am Diet Assoc.* 2007 Nov;107(11):1924-9.
95. Gobierno de Chile, Ministerio de Salud. Bases Técnicas Leche Purita Fortificada. 2009.
96. Brito A, Olivares M, Hertrampf E. Evaluación de la prevalencia de anemia ferropriva en una muestra representativa de beneficiarios del programa nacional de alimentación complementaria de la región metropolitana y quinta región. 50º Congreso de Pediatría, Pucón, 28 al 31 de octubre de 2010 (trabajo N°123).
97. Palomo I, Gutierrez B, Guerra M, de la Fuente M, Pino M. [Iron deficiency and hypochromic anemia in normal infants and preschool children]. *Rev Chil Pediatr.* 1984 Jul-Aug;55(4):248-53.
98. Rivera JA, Ruel MT, Santizo MC, Lonnerdal B, Brown KH. Zinc supplementation improves the growth of stunted rural Guatemalan infants. *J Nutr.* 1998 Mar;128(3):556-62.
99. Castillo-Duran C, Weisstaub G. Zinc supplementation and growth of the fetus and low birth weight infant. *J Nutr.* 2003 May;133(5 Suppl 1):1494S-7S.
100. Brown KH, Peerson JM, Baker SK, Hess SY. Preventive zinc supplementation among infants, preschoolers, and older prepubertal children. *Food Nutr Bull.* 2009 Mar;30(1 Suppl):S12-40.
101. Fischer Walker C, Kordas K, Stoltzfus RJ, Black RE. Interactive effects of iron and zinc on biochemical and functional outcomes in supplementation trials. *Am J Clin Nutr.* 2005 Jul;82(1):5-12.
102. Mannar MG. Successful food-based programmes, supplementation and fortification. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006 Dec;43 Suppl 3:S47-53.
103. Sandstrom B, Davidsson L, Cederblad A, Lonnerdal B. Oral iron, dietary ligands and zinc absorption. *J Nutr.* 1985 Mar;115(3):411-4.
104. Walravens PA, Hambidge KM. Growth of infants fed a zinc supplemented formula. *Am J Clin Nutr.* 1976 Oct;29(10):1114-21.
105. Yadrick MK, Kenney MA, Winterfeldt EA. Iron, copper, and zinc status: response to supplementation with zinc or zinc and iron in adult females. *Am J Clin Nutr.* 1989 Jan;49(1):145-50.

11. ANEXOS

11.1. CONSENTIMIENTO DE PARTICIPACIÓN EN EL PROYECTO “EFECTOS DE DIFERENTES NIVELES DE ZINC SOBRE LA ABSORCIÓN DE HIERRO EN ALIMENTOS ENRIQUECIDOS CON HIERRO Y ZINC”.

11.1.1. Información sobre el estudio de investigación

1. ¿Cuál es el propósito del estudio?

Los alimentos fortificados y los suplementos con minerales se utilizan para prevenir deficiencias de minerales. Habitualmente estos preparados llevan varios minerales y algunas vitaminas, los que pueden competir entre ellos haciendo que su absorción se pueda ver afectada. En este estudio veremos como el agregado de zinc puede disminuir la absorción de hierro.

2. ¿Por qué debiera yo considerar mi participación como sujeto de investigación en este estudio? ¿En qué podría este estudio beneficiar a otros?

Este estudio permitirá mejorar la composición de los alimentos fortificados con hierro y zinc, lo que contribuirá a una mejor prevención de las deficiencias de estos minerales en nuestra población.

3. ¿Tengo necesariamente que participar en este estudio? ¿Si acepto participar, puedo cambiar de opinión o retirarme? ¿Si decido no participar en este estudio, que me puede suceder, o que otras opciones tengo si necesito tratamiento?

Usted no tiene ninguna obligación de participar en el estudio. Si acepta participar puede retirarse en cualquier momento del estudio sin ningún perjuicio para usted. No participar en el estudio no tiene consecuencias para usted.

4. ¿Si decido participar en el estudio, en qué consisten precisamente las evaluaciones, y que tipo de tratamientos o procedimientos me van a practicar?

Los posibles participantes de este estudio serán contactados por líderes comunitarios de las poblaciones cercanas al INTA, quienes les informarán sobre el propósito del estudio y los invitarán a una reunión en el INTA donde el investigador responsable del estudio les explicará detalladamente los propósitos del estudio y los procedimientos a los que serán sometido.

Una vez que acepte participar en el estudio, usted concurrirá en ayunas al INTA durante 5 mañanas de días hábiles (días 1, 2, 14, 15 y 28 del estudio) por aproximadamente 1 hora. En 4 de esos días a usted le puede tocar consumir ese día alguno de los siguientes alimentos: una taza de leche (con y sin vitamina C), o un pan (con o sin una sustancia similar a la vitamina C), o un pan con un vaso de leche o un pan con una taza de té. La leche y el pan contienen hierro con un marcador radioactivo o también zinc en distintas cantidades. El agregado de estos minerales y de la marca radioactiva no cambiará las características de estos alimentos. Después de haber bebido el contenido de la taza de leche o el pan, usted deberá permanecer 3 horas sin consumir ningún alimento. Después de ese período puede consumir cualquier tipo de alimento. En el día 14 del estudio se le extraerá 30 ml (6 cucharaditas de té) de sangre de una vena del brazo para medir la absorción de hierro de los alimentos consumidos los días 1 y 2 y para saber su nutrición de hierro. En el día 28 se le extraerá 20 ml (4 cucharaditas de té) de sangre para medir la absorción de hierro de los alimentos consumidos los días 14 y 15. Con la sangre que a usted le sacamos no se realizará ningún estudio genético y una vez terminado el estudio esta será destruida.

5. ¿Qué peligros podría experimentar en este estudio, y que harán los investigadores para reducir el riesgo de que éstos se presenten? ¿Qué harán los investigadores si sufro algún daño durante el estudio?

Usted no corre ningún peligro. Las dosis de radioactividad que recibirá es menor a tomarse una radiografía de tórax. Por razones de seguridad, en el caso de las mujeres sólo serán seleccionadas si están utilizando algún método anticonceptivo y se les realizará un test de embarazo, el día 1 y 14 del estudio, a fin de no incluir personas embarazadas. En el sitio de punción de la vena pudiera aparecer en algún caso un moretón.

6. ¿Qué harán los investigadores para asegurar que la información que recolectarán sobre mí, no caerá en manos equivocadas?

Usted será identificado con un código, siendo su identidad sólo conocida por el investigador responsable del proyecto. En la publicación de los resultados no figurará su identidad.

7. ¿Qué beneficios personales puedo yo esperar al participar en este estudio?

Usted sabrá si tiene anemia u otra forma más leve de carencia de hierro En el caso de presentar anemia o carencia de hierro se le derivará a su centro de salud o médico personal para su tratamiento.

8. ¿Recibiré algún pago por participar en este estudio?

Usted recibirá una compensación de \$70.000 por los gastos que pudiera incurrir por participar en el estudio y por el dinero que deje de percibir durante los 5 días en la mañana en que debe concurrir al estudio.

9. ¿Se cobrará a mí, a mi Isapre o compañía de seguros de salud el costo de algunos de estos estudios?

Este estudio no tiene ningún costo para usted o su sistema de salud.

10. ¿Una vez que yo haya ingresado como sujeto de estudio, a quien tendría que dirigirme para averiguar más acerca del estudio o para hacer llegar algún reclamo respecto al trato que hubiese recibido?

Usted se podrá dirigir al Dr. Manuel Olivares, INTA, Macul 5540, Fono 9781482 (celular 90986234).

Cualquier información sobre sus derechos como participante en esta investigación científica o reclamo sobre el trato recibido lo puede hacer a la Presidenta del Comité de Ética del INTA, Profesora Ana María Pino, fono 9781418.

11.1.2. Documentación del consentimiento

1. ¿Después que firme el documento, quien lo guardará?

El investigador responsable del proyecto.

Declaro haber leído la información descrita y mis preguntas acerca del estudio han sido respondidas satisfactoriamente. Al firmar esta copia, indico que tengo un entendimiento claro del proyecto y deseo participar en él.

Nombre del sujeto: _____

Firma: _____

Fecha: _____

2. Consentimiento del investigador

Al sujeto de investigación he entregado información sobre el estudio, y en mi opinión esta información es precisa y suficiente para que el sujeto entienda completamente la naturaleza, los riesgos y beneficios del estudio, y los derechos que tiene en tanto sujeto de investigación. No ha existido coerción ni ha actuado bajo influencia alguna. He sido testigo que el sujeto firmó el documento.

Nombre del Investigador: Manuel Olivares Grohnert

Firma del Investigador: _____ Fecha: _____

11.2. ENCUESTA DE TENDENCIA DE CONSUMO

ENCUESTA DE TENDENCIA DE CONSUMO				
Alimentos	Frecuencia	Cantidad por vez medida g/cc	Cantidad T/M día	Observaciones
Lácteos				
Carne de vacuno				
Cerdo y fiambres				
Pollo				
Cordero y otros				
Vísceras				
Pescado				
Mariscos				
Huevos				
Leguminosas				
Papas				
Verduras				
Frutas				
Arroz				
Avena				
Pastas				
Pan				
Aceite				
Mantequilla				
Mayonesa				
Crema				
Azúcar				
Bebidas alcohólicas				
Bebidas gaseosas				
Jugos en polvo				
Golosinas				
Otros				

11.3. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LAS LECHES A ADMINISTRAR

Ingredientes	COMPOSICIÓN NUTRICIONAL PORCIÓN DE 200 ML						
	Cantidad g	Energía kcal	Proteínas g	Lípidos g	H de C g	Hierro mg	Zinc mg
Fórmula 1							
Leche en polvo	20	98	5.2	5.2	7.6	0.0	0.7
Sacarosa	10	40	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0
Sulfato de hierro	0.010	0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0
Sulfato de zinc	0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
TOTAL		138	5.2	5.2	17.6	2.0	0.7
Fórmula 2							
Leche en polvo	20	98	5.2	5.2	7.6	0.0	0.7
Sacarosa	10	40	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0
Sulfato de hierro	0.01	0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0
Sulfato de zinc	0.004	0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
TOTAL		138	5.2	5.2	17.6	2.0	1.7
Fórmula 3							
Leche en polvo	20	98	5.2	5.2	7.6	0.0	0.7
Sacarosa	10	40	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0
Sulfato de hierro	0.01	0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0
Sulfato de zinc	0.009	0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0
TOTAL		138	5.2	5.2	17.6	2.0	2.7
Fórmula 4							
Leche en polvo	20	98	5.2	5.2	7.6	0.0	0.7
Sacarosa	10	40	0.0	0.0	10.0	0.0	0.0
Sulfato de hierro	0.01	0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.0
Sulfato de zinc	0.018	0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.0
TOTAL		138	5.2	5.2	17.6	2.0	4.7

Nutrientes	COMPOSICIÓN NUTRICIONAL 1000 ML			
	Fórmula 1	Fórmula 2	Fórmula 3	Fórmula 4
Hierro (mg)	10.1	10.1	10.1	10.1
Zinc (mg)	3.3	8.3	13.3	23.3