



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTO DE DOSIS CRECIENTES DE ZINC EN PAN
FORTIFICADO CON HIERRO CONSUMIDO CON TÉ SOBRE
LA BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO**

Carla Andrea Castro Tabilo

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Fomento de
la Producción Animal

PROFESOR GUÍA: Manuel Olivares Grohnert
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos

SANTIAGO, CHILE
2013

FONDECYT 1100094



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTO DE DOSIS CRECIENTES DE ZINC EN PAN
FORTIFICADO CON HIERRO CONSUMIDO CON TÉ SOBRE
LA BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO**

Carla Andrea Castro Tabilo

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario
Departamento de Fomento de
la Producción Animal

	NOTA	FIRMA
Manuel Olivares Grohnert	_____	_____
María Sol Morales Silva	_____	_____
Carolina Valenzuela Venegas	_____	_____

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos

SANTIAGO, CHILE
2013

FONDECYT 1100094

**EFFECTO DE DOSIS CRECIENTES DE ZINC EN PAN
FORTIFICADO CON HIERRO CONSUMIDO CON TÉ SOBRE
LA BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO**

**EFFECT OF INCREASING DOSE OF ZINC ON IRON
BIOAVAILABILITY FROM IRON FORTIFIED BREAD WHEN IS
CONSUMED WITH TEA**

Carla Castro T.¹, Manuel Olivares G.²

¹Departamento de Fomento de la Producción Animal, Facultad de Ciencias
Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

²Laboratorio de Micronutrientes, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos
(INTA), Universidad de Chile.

Laboratorio de Micronutrientes INTA, Universidad de Chile. El Líbano 5524, Macul.
Casilla 138-11, Santiago. Email: molivare@inta.cl

ABSTRACT

The co-fortification of wheat flour with iron (Fe) and zinc (Zn) is a strategy used to prevent these deficiencies in the population. Given that Zn could interact negatively with Fe, the objective was to assess the effect of Zn on Fe absorption from bread prepared with wheat flour fortified with Fe and graded levels of Zn fortificant. Twelve women aged 30-46 years, with contraception and a negative pregnancy test, participated in the study. They received on 4 different days, after an overnight fast, 100 g of bread made with wheat flour (70% extraction) fortified with 30 mg Fe/kg as ferrous sulfate (A) or prepared with the same Fe-fortified flour but with graded levels of Zn, as zinc sulfate: 30 mg/kg (B), 60 mg/kg (C) or 90 mg/kg (D). The bread was consumed with 200 mL of tea. Fe radioisotopes (^{59}Fe and ^{55}Fe) of high specific activity were used as tracers and Fe absorption which was measured by the incorporation of radioactive Fe into erythrocytes. Results: The geometric mean and range of ± 1 SD of Fe absorption were: A=6.5% (2.2-19.3), B=4.6% (1.0-21.0), C=2.1% (0.9-4.9) and D=2.2% (0.7-6.6), respectively; ANOVA for repeated measures $F=10.9$, $p<0.0001$ (Scheffè post hoc test: A vs D and B vs D $p<0.05$). It can be concluded that the absorption of iron from bread made with low extraction wheat flour fortified with 30 mg Fe/kg, as ferrous sulfate, consumed with tea, is comparable to that obtained when flour is fortified up to 30 mg Zn/kg, as zinc sulfate. A statistically significant reduction of Fe absorption was observed at a Zn fortification level of 60 and 90 mg Zn/kg.

Key words: Iron, zinc, food fortification, iron absorption, humans.

INTRODUCCIÓN

La deficiencia de hierro (Fe) es considerada la carencia nutricional más prevalente a nivel mundial y la principal causa de anemia. Se presenta mayormente en países en vías de desarrollo y en grupos de alta vulnerabilidad como niños menores de 2 años, mujeres en edad fértil y embarazadas (Biolley *et al.*, 2012). Según datos de la Organización Mundial de la Salud se ha estimado que mil millones de individuos en el mundo presentan deficiencias de hierro (Olivares *et al.*, 2010a).

Es conocido que la deficiencia de hierro y zinc (Zn) suelen coexistir; pero a diferencia del hierro, el zinc aún carece de marcadores sensibles y específicos para determinar su estatus y la magnitud de la prevalencia de su deficiencia, pero se estima que sería similar a la del hierro (Olivares *et al.*, 2010b).

Debido a la alta prevalencia de anemia provocada por el déficit de Fe, se han implementado estrategias como la fortificación de alimentos, en nuestro país un ejemplo de esto ha sido la fortificación de la harina de trigo, utilizada entre otras cosas para la elaboración del pan. Lo anterior ha permitido disminuir notablemente la anemia por deficiencia de hierro en la población del país, siendo la prevalencia de esta en mujeres al año 2003 de 5,1% (MINSAL, 2003). Considerando que en Chile el consumo de pan es entre los 86 y 90 kg por habitante al año (CONADECUS, 2012), la fortificación de la harina de trigo con Zn sería una estrategia eficaz para resolver su deficiencia. Ante lo cual se debieran considerar las interacciones entre ambos micronutrientes al ser empleados en una matriz alimentaria.

Hay evidencia en estudios en los que se ha evaluado el efecto del Zn sobre la absorción de Fe en alimentos fortificados con Fe, como la harina de trigo utilizada para la fabricación del pan (Olivares *et al.*, 2012; Herman *et al.*, 2002). Pero no existen estudios en los cuales además se evalúe el efecto inhibitor del té sobre la absorción de Fe, considerando que este es el acompañante más habitual del pan en la dieta de la población chilena.

Teniendo en cuenta los antecedentes, el objetivo de este estudio fue determinar como el Zn en diferentes proporciones modifica la absorción de Fe de un pan fortificado con Fe, cuando es consumido con té.

MATERIALES Y MÉTODOS

Criterios de inclusión

En el estudio participaron 13 mujeres entre 30 y 46 años de edad aparentemente sanas, las que estaban utilizando un método anticonceptivo (dispositivo intrauterino, anticonceptivo oral o ligadura de tubos). Previo al comienzo de estudio se les realizó un test de embarazo (determinación de hormona gonadotrofina coriónica en orina), el que fue negativo. Por medio de una exposición oral fueron informadas sobre la naturaleza del estudio, además debieron firmar un consentimiento informado.

El protocolo utilizado en el estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto de Nutrición y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Chile.

Preparación de las comidas de prueba

La infusión de té fue preparada con 15 bolsas de té en 3 litros de agua hirviendo, más 150 g de sacarosa. Mientras que para la preparación del pan se utilizó harina de trigo (70% extracción) enriquecida con 30 mg/kg de Fe, como sulfato ferroso, solo o más 30, 60 o 90 mg de zinc/kg como sulfato de Zn. Además al momento de la preparación fueron incorporados los isótopos de hierro ^{55}Fe y ^{59}Fe . El producto final ofrecido a los sujetos fueron bollos de pan tipo marraqueta de 100 g cada uno, los que tenían aproximadamente 70 g de harina de trigo.

El total de Fe y Zn de los productos finales fueron medidos por espectrometría de absorción atómica (Perkin Elmer Modelo 2280, Perkin-Elmer Corporation, Norwalk, CT).

Protocolo del estudio

El día 1 las voluntarias consumieron 100 g de pan preparado con harina de trigo fortificada con 30 mg de Fe/kg, como sulfato ferroso, sin agregado de zinc y marcado con 111 kBq ^{55}Fe . El día 2 consumieron 100 g de pan preparado con harina de trigo fortificada con 30 mg de Fe/kg, como sulfato ferroso, más 30 mg/kg de agregado de zinc, como sulfato de zinc, marcado con 37 kBq ^{59}Fe . El día 14 las participantes del estudio consumieron 100 g de pan preparado con harina de trigo fortificada con 30 mg de Fe/kg, como sulfato ferroso, más 60 mg/kg de agregado de zinc, como sulfato de zinc, marcado con 111 kBq ^{55}Fe , además se obtuvo una muestra de 30 mL de

sangre venosa de cada participante con el objetivo de evaluar el estado nutricional de Fe y la radioactividad circulante. El día 15 las voluntarias consumieron 100 g de pan preparado con harina de trigo fortificada con 30 mg de Fe/kg, como sulfato ferroso, más 90 mg/kg de agregado de Zn, como sulfato de Zn, marcado con 37 kBq ^{59}Fe . Los cuatro días el pan fue consumido junto a una infusión de 200 mL de té. El día 28 se obtuvieron 20 mL de sangre venosa de cada voluntaria con el propósito de determinar la radioactividad circulante.

Estudio isotópico

Los isótopos radiactivos ^{55}Fe y ^{59}Fe actúan como trazadores de la absorción de Fe y fueron utilizados en dosis de 111 kBq el ^{55}Fe y 37 kBq el ^{59}Fe en 100 g de pan. El pan marcado con isótopos radiactivos y la infusión de té fueron consumidos luego de una noche de ayuno, y posterior a su ingesta los sujetos no debían comer ningún alimento ni bebida diferente al agua hasta transcurridas 4 horas. La cantidad de pan ingerido fue calculada por el peso diferencial, es decir, cantidad de pan ofrecido menos cantidad de pan sobrante. Para el cálculo de la radioactividad total ingerida, la radioactividad de las alícuotas de pan marcado con isótopos fue calculada en sextuplicado. La medición de la radioactividad circulante se realizó en duplicados de sangre venosa según el método de Eakins y Brown (1966), el mismo utilizado para obtener la radioactividad total ingerida. Las muestras fueron analizadas utilizando el contador de centelleo líquido (Tri-Carb 1500TR; Packard Instruments Co, Downers Grove, IL), realizando la medición en el tiempo suficiente para obtener un error de conteo < 3%. Los porcentajes de Fe absorbido fueron calculados sobre la base de la volemia estimada por altura y peso de los sujetos y asumiendo una incorporación del radioisótopo en el eritrocito del 80% (Nadler *et al.*, 1962).

La radioactividad de los panes marcados y muestras de sangre fueron contados simultáneamente al final del estudio, para evitar un error en el cálculo de la absorción de Fe debido al decaimiento de los isótopos que ocurre entre la administración de estos y la medición 14 días después. Además, la absorción de Fe administrada los días 14 y 15 ha sido corregida por el isótopo que ha sido administrado en los días 1 y 2, restando la radioactividad de la muestra de sangre del día 14 a partir de la radioactividad de los glóbulos rojos del día 28.

Evaluación del estado nutricional de hierro

El día 14 se obtuvo una muestra de sangre para evaluar el estado de nutrición de Fe: hemoglobina, hematocrito y volumen corpuscular medio (VCM) (CELL-DYN 1700, Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, EE.UU.), saturación de transferrina, Zn-protoporfirina (ZP Hematofluorometer modelo 206D, AVIV Biomedical Inc., Lakewood, NJ, EE.UU.) y ferritina sérica (mediante una prueba ELISA en sándwich, utilizando como anticuerpo primario anti-Fn y como secundario anti-Fn conjugado con peroxidasa, ambos de marca Dako Corporation).

El estado nutricional de Fe fue considerado normal cuando los índices determinados por el laboratorio se encontraron dentro del rango de referencia. La anemia fue definida como $Hb < 12$ g/dL, anemia ferropriva como $Hb < 12$ g/dL más dos o más biomarcadores alterados (VCM < 80 fL, saturación transferrina $< 15\%$, Zpp > 70 μ g/dL de GR y ferritina sérica < 12 μ /L), la deficiencia de Fe sin anemia como $Hb \geq 12$ g/dL más dos o más biomarcadores alterados y los depósitos de Fe repletados cuando se encontró una ferritina sérica < 12 μ /L y todos los otros parámetros eran normales.

Análisis estadístico

Para definir las variables se las sometió a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Las variables distribuidas de forma normal se expresaron en promedio \pm desviación estándar. Las variables que no presentaron una distribución normal fueron transformadas a su logaritmo natural para el análisis estadístico, aplicando estadística paramétrica. Luego los datos fueron reconvertidos a sus antilogaritmos para recuperar las unidades originales. Los resultados fueron expresados en promedio geométrico ± 1 desviación estándar. Para establecer la diferencia en el porcentaje de absorción del Fe entre las diferentes formulaciones de pan se utilizó el Test de Análisis de Varianza (ANOVA) a una vía para medidas repetidas y test Post hoc de Scheffè. Todas las comparaciones se realizaron a un nivel del 5% de significancia.

RESULTADOS

En el estudio participaron 13 mujeres, una de las cuales fue sacada del estudio por presentar valores de biodisponibilidad erráticos. En la Tabla 1 se resumen las características generales de los sujetos del estudio. Respecto al estado nutricional de las 12 voluntarias 4 presentaron obesidad, 4 sobrepeso y 4 eran normales.

En lo que se refiere al estado nutricional de Fe de las voluntarias (Tabla 2) ninguna presentó anemia ferropriva ni depósitos de Fe depletados, mientras que dos de ellas presentaron deficiencia de Fe sin anemia.

El promedio geométrico (\pm rango de 1 DE) de la absorción de Fe proveniente del pan fortificado con Fe y consumido con té fue de 6,5% (rango \pm 1 DE =2,2-19,3%) (Tabla 3). El agregado de Zn a la harina de trigo fortificada con Fe en proporción Zn:Fe de 1:1 no modificó la absorción de Fe. Mientras que a proporciones 2:1 y 3:1 se apreció una disminución significativa de la absorción de Fe (ANOVA para medidas repetidas, $F=10,9$, $p < 0,0001$) (Tabla 3).

En la Figura 1 se observa que a proporciones Zn:Fe 1:1 hay una disminución en la absorción de Fe, no siendo significativa ($p > 0,05$). Mientras que a proporciones Zn:Fe 2:1 y 3:1 se observa una disminución en la absorción de Fe, la que es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Escasos son los estudios en los cuales se ha evaluado el efecto de la fortificación con Zn en la harina de trigo fortificada con Fe, mientras que en ninguno de estos se ha evaluado el efecto que tiene el té en la absorción de Fe de la harina de trigo co-fortificada con Fe y Zn., siendo de interés estudiarlo debido a la presencia de inhibidores de la absorción de hierro en su composición, tales como flavonoides (monómeros (catequiza); dímeros (teoflavina) y polímeros (tearubigina)) (Zijp *et al.*, 2000).

Los resultados del presente estudio evidencian que la absorción de Fe de pan preparado con harina de trigo fortificada con 30 mg/kg de Fe, como sulfato de hierro, solo o con dosis crecientes de Zn de 30, 60 y 90 mg Zn/kg, como sulfato de zinc, y consumido con 200 mL de té, se vio afectada negativamente a dosis de Zn de 60 y 90 mg/kg, siendo tal disminución en la absorción de Fe estadísticamente significativa. En un estudio similar se evaluó el efecto del zinc sobre la absorción de Fe en harina co-fortificada con Fe y Zn, en mujeres que consumieron pan preparado con harina de trigo fortificada con 30 mg de Fe/Kg, como sulfato ferroso, solo o con diferentes niveles de Zn 30, 60 y 90 mg/Kg, como sulfato de zinc, observándose una inhibición estadísticamente significativa de la absorción del Fe al adicionar 90 mg de zinc/Kg (Olivares *et al.*, 2012). La diferencia en los resultados de ambos estudios sobre la absorción de Fe, se debe al efecto negativo del té sobre la absorción de Fe y Zn, junto al incremento que provoca el efecto inhibitor de Zn sobre la absorción de Fe a una determinada proporción Zn:Fe. Lo que explicaría porque que en este estudio la inhibición de la absorción de Fe ocurre a proporción Zn:Fe más baja que en lo observado por Olivares *et al.* (2012).

En un estudio realizado por Herman *et al.* (2002), en 86 niños de Indonesia, quienes asignados al azar debían consumir albóndigas de harina de trigo preparadas con 25 g de harina fortificada con 60 mg Fe/kg solo o con la misma cantidad de Fe y 60 mg Zn/kg, como óxido de zinc o como sulfato de zinc, la absorción de Fe fue significativamente menor desde la harina co fortificada con ZnSO₄, pero este efecto inhibitor no fue observado cuando la harina fue co-fortificada con óxido de zinc, el cual es menos soluble en agua que el sulfato de zinc. Por el contrario López de Romaña *et al.* (2005) evaluaron si la adición de Zn a alimentos fortificados con Fe

afectó la absorción de Fe de los mismos. Los alimentos a base de trigo fueron fortificados con 3 mg de Fe como FeSO₄ solo o con 3 y 9 mg de Zn como ZnSO₄ por cada 100 g de harina. Concluyendo que la absorción de Fe no se vio afectada significativamente por los diferentes niveles de Zn.

Los resultados de absorción de Fe del pan fortificado con Fe sin agregado de Zn y consumido con té obtenidos en este estudio es comparable a lo observados por Peña *et al.* (1991).

Si bien no es conocido con certeza el mecanismo por el cual Zn y Fe tienen una interacción competitiva negativa a nivel del enterocito, se ha propuesto que podría deberse a la competencia de ambos micronutrientes por la unión al transportador de metales divalentes (DMT1), el que tiene afinidad por el hierro no hem pero que también transporta Zn (Garrick *et al.*, 2006). Sin embargo, algunos estudios han cuestionado el rol del DMT1 en la captación del Zn (Kordas y Stoltzfus, 2004), mientras que otros autores han demostrado que el DMT1 no podría transportar Fe y Zn al mismo tiempo, proponiendo una interacción de tipo no competitiva (Iyengar *et al.*, 2009). La proporción de Zn:Fe que inhibe la absorción de Fe dependería de la concentración de ambos cationes y sus interacciones con ligandos dietéticos que pueden favorecer la disminución o incremento en la cantidad de cationes de Zn y Fe interactuando en la captación a nivel del enterocito. Cuando el Fe y el Zn están presentes en una matriz alimentaria hay menos cationes disponibles ya que están unidos a ligandos dietarios, es lo que se conoce como el “efecto matriz”. En el caso del pan, el Fe y el Zn se encuentran unidos a los fitatos presentes en harina de trigo disminuyendo el contenido total de cationes disponibles para su absorción (Brune *et al.*, 1992; Iyengar *et al.*, 2010). Además en nuestro estudio se suma el efecto de los polifenoles presentes en el té, los que actúan como poderosos quelantes de Fe inhibiendo su absorción principalmente cuando se consumen en forma simultánea (Disler *et al.*, 1975).

La principal causa de anemia en los países subdesarrollados es la baja biodisponibilidad del Fe en la dieta, siendo los programas de fortificación masiva una de las estrategias para aumentar la ingesta de micronutrientes como el Fe y el Zn. Considerando los resultados del presente estudio en que al adicionar 60 y 90 mg de Zn/Kg se afecta negativamente la absorción de Fe de la harina de trigo fortificada con

30 mg de Fe/kg, la co-fortificación con Zn en tales cantidades no sería una intervención viable para la disminución de la anemia por deficiencia de Fe y la deficiencia de Zn prevalente en la población.

CONCLUSIÓN

La absorción de hierro del pan preparado con harina de trigo, de baja extracción, fortificada con 30 mg/kg de hierro, como sulfato ferroso y consumido con té, es comparable a la obtenida cuando se fortifica la harina con 30 mg/kg de zinc, como sulfato de zinc. A niveles de enriquecimiento de 60 y 90 mg de Zn/kg de harina hay una reducción estadísticamente significativa de la absorción de Fe.

RESUMEN

La co-fortificación de la harina de trigo con hierro (Fe) y zinc (Zn) es una estrategia utilizada para prevenir estas deficiencias en la población. Debido a que el zinc puede interactuar negativamente con el hierro, el objetivo fue evaluar el efecto del Zn sobre la absorción de Fe de pan preparado con harina de trigo fortificada con Fe y niveles crecientes de Zn. Participaron en el estudio trece mujeres entre 30-46 años de edad, utilizando método anticonceptivo y con prueba de embarazo negativa. Ellas recibieron en 4 días diferentes, luego de una noche de ayuno, 100 g de pan preparado con harina de trigo (70% extracción) fortificado con 30 mg Fe/kg como sulfato ferroso (A) o preparado con harina fortificada con Fe pero con niveles crecientes de Zn, como sulfato de zinc: 30 mg/kg (B), 60 mg/kg (C) o 90 mg/kg (D). Los panes fueron consumidos junto a una infusión de 200 mL de té. Fueron utilizados isótopos radioactivos de Fe (^{59}Fe and ^{55}Fe) de alta actividad específica como trazadores de la absorción de Fe, la que se midió por la incorporación de Fe radiactivo en los eritrocitos. El promedio geométrico y rango ± 1 DE de la absorción de Fe fue: A=6,5% (2,2-19,3), B=4,6% (1,0-21,0), C=2,1% (0,9-4,9) y D=2,2% (0,7-6,6), respectivamente, ANOVA para medidas repetidas $F=10.9$, $p<0.0001$ (Test post hoc de Scheffè A vs D y B vs D $p<0.05$). Se puede concluir que la absorción de Fe del pan hecho con harina de trigo, de baja extracción, fortificada con 30 mg/kg de hierro, como sulfato ferroso y consumido con té, es comparable a la obtenida cuando se fortifica la harina con 30 mg/kg de zinc, como sulfato de zinc. A niveles de enriquecimiento de 60 y 90 mg de Zn/kg hay una reducción estadísticamente significativa de la absorción de Fe.

Palabras claves: Hierro, zinc, fortificación de alimentos, absorción de hierro, humanos.

BIBLIOGRAFÍA

- Biolley, E.; Busto, E.; Daroch, C.; Guerrero, M.; Morales, D.; Ramos, N. 2012. Intervención educativa para modificar el aporte de hierro absorbible en mujeres no embarazadas. *Rev. Chil. Nutr.* 39:39-44.
- Brune, M.; Rossander –Hultén, L.; Hallberg, L.; Gleerup, A.; Sandberg, A. 1992. Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. *J. Nutr.* 122:442-449.
- CONADECUS. 2012. Chile segundo consumidor de pan, tras Alemania. [en línea]. < <http://www.conadecus.cl/conadecus/?p=4354> > [consulta:27-01- 2013]
- Disler, P.; Lynch, S.; Charlton, R.; Torrance, J.; Bothwell, T.; Walker, R.; Mayet, F. 1975. The effect of tea on iron absorption. *Gut.* 16:193–200.
- Eakins, J.; Brown, D. 1966. An improved method for the simultaneous determination of iron-55 and iron-59 in blood by liquid scintillation counting. *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 17:391-397.
- Garrick, M.; Singleton, S.; Vargas, F.; Kuo, H.; Zhao, L.; Knöpfel, M.; Davidson, T.; Costa, M.; Paradkar, P.; Roth, J.; Garrick, L. 2006. DMT1: Which metals does it transport?. *Biol. Res.* 39:79-85.
- Herman, V.; Griffin, I.; Suwarti, F.; Ernawati, F.; Permaesih, D.; Pambudi, D.; Abrams, S. 2002. Cofortification of iron-fortified flour with zinc sulfate, but not zinc oxide, decreases iron absorption in Indonesian children. *Am. J. Clin. Nutr.* 76:813–817.
- Iyengar, V.; Pullakhandam, R.; Nair, K. 2009. Iron-zinc interaction during uptake in human intestinal Caco-2 cell line: kinetic analyses and possible mechanism. *Indian J. Biochem. Biophys.* 46:299-306.
- Iyengar, V.; Pullakhandam, R.; Nair, K. 2010. Dietary ligands as determinants of iron-zinc interactions at the absorptive enterocyte. *J. Food Sci.* 75:H260-4.
- Kordas, K.; Stoltzfus, R. 2004. New evidence of iron and zinc interplay at the enterocyte and neural tissues. *J. Nutr.* 134:1295-8.
- López de Romana, D.; Salazar, M.; Hambidge, M.; Penny, M.; Peerson, J.; Sian, L.; Krebs, N.; Brown, K. 2005. Iron absorption by Peruvian children consuming wheat products fortified with iron only or iron and one of two levels of zinc. *Proceedings of FASEB Experimental Biology, San Diego.* Abstract 274.23.
- MINSAL. 2003. Resumen Ejecutivo Encuesta Nacional de Salud, 2003. [en línea]. < <http://epi.minsal.cl/epi/html/elvigia/VIGIA20.pdf> > [consulta: 13-12- 2012]
- Nadler, S.; Hidalgo, J.; Bloch, T. 1962. The Tulane table of blood volume in normal man. *Surgery.* 51:224-232.
- Olivares, M.; Arredondo, M.; Pizarro, F. 2010a. Hierro. **In:** Gil, Á. *Tratado de Nutrición Tomo 1. Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición.* 2ª ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 18 p.

- Olivares, M.; Castillo, C.; Uauy, R. 2010b. Cobre y cinc. **In:** Gil, Á. Tratado de Nutrición Tomo 1. Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición. 2ª ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. 18 p.
- Olivares, M.; Pizarro, F.; López de Romaña, D. 2012. Effect of zinc sulfate fortificant on iron absorption from low extraction wheat flour co-fortified with ferrous sulfate. *Biol. Trace Elem. Res.* 151:471–475.
- Peña, G.; Pizarro, F.; Hertrampf, E. 1991. Aporte del hierro del pan a la dieta chilena. *Rev. Med. Chil.* 119:753-757.
- Zijp, I.; Korver, O.; Tijburg. 2000. Effect of tea and other dietary factors on iron absorption. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 40:371–398.