

Evaluación "in vivo" de la biodisponibilidad del hierro en alimentos infantiles fortificados con hierro

Evaluation of the bioavailability of iron from fortified with iron baby food products

Haydée CÁRDENAS-QUINTANA¹, Juan Pablo APARCO^{2,3}, Carlos A. GÓMEZ¹

1 Departamento de Nutrición, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.

2 Programa Doctoral en Nutrición, Escuela de Posgrado, Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.

3 Centro Nacional de Alimentación y Nutrición, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

Recibido: 20/marzo/2021. Aceptado: 9/mayo/2021.

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la biodisponibilidad del hierro en alimentos infantiles fortificados con hierro (papillas), usando el método "in vivo" en ratas Holtzman sin anemia.

Métodos: Diseño experimental controlado y aleatorizado. Se emplearon 48 ratas de la cepa Holtzman sin anemia que se asignaron durante 10 días a 4 tipos de dieta: Grupo 1 (Papilla A), Grupo 2 (Papilla B), Grupo 3 (Caseína con hierro) y grupo 4 (Caseína sin hierro). Los animales se colocaron en jaulas metabólicas individuales para determinar el consumo de la dieta y las excretas de manera diaria. La biodisponibilidad de hierro se determinó a través del balance metabólico, coeficiente de digestibilidad aparente y porcentaje de retención del hierro.

Resultados: El consumo de alimentos, la ganancia de peso, la ingesta de hierro y excreción fecal de hierro fue significativamente mayor en los grupos con dieta a base de papillas ($p < 0,05$) comparados con los grupos de caseína, el balance metabólico de hierro, coeficiente de digestibilidad y porcentaje de retención de hierro fueron negativos en los grupos de papillas y caseína sin hierro, mientras que el grupo caseína con hierro mostró un balance positivo de hierro en los 3 indicadores, estas diferencias fueron significativas ($p < 0,05$).

Conclusiones: Las dietas en base a papillas mostraron menor biodisponibilidad de hierro comparadas con la dieta caseína con hierro, lo cual indicaría que los insumos utilizados en la formulación de las papillas podrían estar afectando la absorción del hierro.

PALABRAS CLAVE

Biodisponibilidad, hierro, balance de hierro, papillas, ratas.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the bioavailability of iron in fortified baby food (porridge), using the "in vivo" method in Holtzman rats without anemia.

Methods: Randomized and controlled experimental design. 48 rats of the Holtzman strain without anemia were used, which were assigned for 10 days to 4 types of diet: Group 1 (Porridge A), Group 2 (Porridge B), Group 3 (Casein with iron) and Group 4 (Casein without iron). The animals were placed in individual metabolic cages to determine the consumption of diet and excreta on a daily basis. Iron bioavailability was determined through metabolic balance, apparent digestibility coefficient, and iron retention percentage.

Results: Food consumption, weight gain, iron intake and fecal iron excretion were significantly higher in the groups with a porridge-based diet ($p < 0.05$) compared to the casein groups, the metabolic balance of iron, digestibility coefficient and iron retention percentage were negative in the porridge and casein groups without iron, while the casein group with

Correspondencia:

Haydée Cárdenas-Quintana
hcardenasq@lamolina.edu.pe

iron showed a positive balance of iron in the 3 indicators, these differences were significant ($p < 0, 05$).

Conclusions: The porridge-based diets showed lower bioavailability of iron compared to the casein diet with iron, which would indicate that the inputs used in the formulation of the porridges could be affecting the absorption of iron.

KEYWORDS

Bioavailability, iron, iron balance, porridge, rats.

INTRODUCCIÓN

La anemia en el Perú continúa siendo un problema severo de salud pública. A pesar del esfuerzo multisectorial del gobierno por abordar esta enfermedad, desde el 2015 hasta el 2019 solo se han reducido 3,4 puntos porcentuales¹. Los grupos etarios más afectados por la anemia son los niños de 6 a 11 meses de edad que muestran prevalencias de hasta 59%, con las consecuentes pérdidas físicas, cognitivas, económicas y laborales en la vida futura².

Por otra parte, existe la preocupación de que el impacto negativo de la pandemia por COVID-19 en el empleo, los ingresos y la economía incrementa la inseguridad alimentaria a nivel mundial, especialmente en hogares con niños pequeños^{3,4}, el Perú no es ajeno a estos efectos y la actual política de suplementación con hierro será insuficiente para enfrentar los problemas de anemia y desnutrición infantil, por ello las intervenciones para mitigar esta crisis, deben incluir papillas que provean energía y proteínas además de micronutrientes⁵.

El principal desafío de las intervenciones con alimentos infantiles tipo papilla es proveer suficiente hierro para cubrir los requerimientos nutricionales de los niños; sin embargo, las papillas se elaboran en base a gramíneas, quenopodiáceas y leguminosas⁶ que contienen fitatos, taninos, polifenoles, pectinas y oxalatos. Estos compuestos tienen efecto inhibitor en la absorción del hierro ya que forman complejos insolubles⁷ y afectan la biodisponibilidad de hierro^{8,9}.

Desde esa perspectiva, el actual contexto de COVID-19, muestra la necesidad de proveer alimentos infantiles en las zonas de mayor inseguridad alimentaria del Perú⁵ para prevenir la anemia y desnutrición infantil. Sin embargo, antes de iniciar estas intervenciones se debe determinar la biodisponibilidad del hierro en las papillas. A pesar de la importancia de esta información, a la fecha, en el Perú no se han publicado estudios al respecto. Por ello el objetivo del presente artículo fue determinar la biodisponibilidad del hierro contenido en papillas, a través del método "in vivo" en ratas Holtzman recién destetadas, aplicando el principio de balance metabólico del hierro¹⁰.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de investigación y animales de experimentación: Se desarrolló un estudio experimental controlado y con asignación aleatoria a diferentes dietas. Se seleccionaron 48 ratas de la cepa Holtzman, recién destetadas y de 21 días de nacidas, procedentes del bioterio de la Facultad de Zootecnia, Universidad Nacional Agraria La Molina. Para obtener animales con pesos homogéneos se realizaron apareamientos de animales de la línea Holtzman. Las ratas se distribuyeron en jaulas metabólicas individuales que permitían recoger el total de heces y orina de cada animal, divididas en cuatro grupos y que recibieron, durante 10 días, cuatro tipos de dieta.

Dietas experimentales: El estudio incluyó 4 tipos de dietas experimentales elaboradas con el criterio de dietas isocalóricas e isoproteicas. Las dietas en cada grupo fueron: Grupo 1 papilla A (Se trabajó con muestra A de alimento infantil fortificado), grupo 2: papilla B (Se trabajó con muestra B de alimento infantil fortificado), grupo 3: (Dieta en base a caseína con aporte de hierro similar al promedio de hierro de las papillas A y B: control positivo) y grupo 4: (Dieta en base a caseína sin hierro: control negativo). Las papillas A y B se obtuvieron directamente de los lotes de entrega de las dos empresas proveedoras de este alimento para programas sociales. Las dietas y el agua desionizada fueron administradas de forma "ad libitum" por 10 días. El análisis químico proximal de los cuatro tipos de dieta, se realizó siguiendo el método análisis inmediato de los alimentos¹¹, para el cálculo de energía disponible se aplicaron los factores de Atwater¹², los resultados se presentan en la tabla 1.

Procedimientos: Los animales experimentales fueron seleccionados por pesos homogéneos y asignados de manera aleatoria a los distintos grupos experimentales. Luego se colocaron en jaulas metabólicas individuales donde fueron alimentados con las dietas correspondiente por un espacio de 10 días. Además, el consumo de alimento y los controles de excretas (orina y heces) se realizaron diariamente. Las ratas fueron pesadas al inicio, durante y al final de la prueba experimental para determinar la ganancia de peso en los diferentes momentos. Se determinó el contenido de hierro de las muestras de papilla, dietas experimentales y excreciones metabólicas como heces y orina; siguiendo el método de la AOAC¹³.

También se midieron los niveles de hemoglobina en todos los grupos al final de la prueba experimental, para ello se colectaron 10 microlitros de sangre haciendo un pequeño corte al nivel de la punta de la cola de los animales. La determinación del contenido de hemoglobina se realizó siguiendo el método colorimétrico para la determinación de Hemoglobina como cianuro de Hemoglobina en sangre (Método colorimétrico HemogloWiener, de WIENER Laboratorios SAIC, Argentina).

Tabla 1. Análisis químico-proximal de las dietas experimentales (g/100g) *.

Nutrientes	Dieta experimental			
	Grupo 1: Papilla A	Grupo 2: Papilla B	Grupo 3: Caseína con hierro	Grupo 4: Caseína sin hierro
Energía (Kcal)	431,9	419,8	408,3	408,7
Proteína total (g)	14,5	15,1	14,3	14,2
Grasa total (g)	14,1	10,6	7,9	8,0
Fibra cruda (g) **	0,5	0,5	—	—
Minerales (mg)	4,2	3,9	1,9	2,0
ELN*** (g)	61,7	65,8	69,7	69,9
Hierro (mg/100g)	8,66	10,08	6,52	0,77

*En base fresca. ** En el grupo 3 y 4 las cantidades fueron imperceptibles. *** ELN: Extracto Libre de Nitrógeno.

La evaluación de la biodisponibilidad del hierro se hizo a través del balance metabólico de hierro (BM), el coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) y el porcentaje de retención de hierro (RI) que se calcularon a partir de la ingestión del hierro y de su excreción por heces y orina^{10,14}, según las siguientes fórmulas:

$$BM = \text{Fe ingerido} - (\text{Fe fecal} + \text{Fe urinario})$$

$$CDA = (\text{Fe ingerido} - \text{Fe fecal}) \times 100 / \text{Fe ingerido}$$

$$RI = [\text{Fe ingerido} - (\text{Fe fecal} + \text{Fe urinario})] \times 100 / \text{Fe ingerido}$$

Donde:

Fe ingerido: Cantidad de hierro (g) proveído por la dieta

Fe fecal: Cantidad de hierro (g) perdido por las heces

Fe urinario: Cantidad de hierro (g) perdido por la orina

Análisis estadístico

Los datos se procesaron en Microsoft Excel 2007 y se analizaron en STATA 15. Para los datos descriptivos se estimaron los promedios y desviación estándar del consumo de alimentos y excreción urinaria y fecal, así como de los indicadores de peso y hemoglobina, luego se procedió a verificar la distribución normal de los datos a través de la prueba Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas con el test de Levene. Finalmente se aplicó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) para el consumo de alimentos, incremento de peso, hierro ingerido y excretado vía fecal y urinario de las 4 dietas experimentales, así como en el balance metabólico del hierro, coeficiente de digestibilidad y porcentaje de retención de hierro. En los casos que se encontró diferencia significativa se aplicó la prueba de post-hoc Bonferroni. En todas las pruebas

se consideró significativo un valor de probabilidad (p-value) menor de 0,05.

Aspectos éticos

Todos los procedimientos para el manejo de los animales se realizaron respetando los lineamientos de la Guía de uso y cuidado de animales de laboratorio del Consejo Nacional de Investigación de Estados Unidos¹⁵.

RESULTADOS

El consumo total de alimentos fue casi el doble en los grupos de las papillas A y B en relación a los dos grupos de caseína, de la misma forma el total de heces excretadas fue mayor en los grupos A y B; sin embargo, el total de orina excretada fue similar entre todos los grupos a excepción del grupo papilla A que fue menor a 20 ml. El promedio del peso inicial de las ratas varió de 64,2 a 72,1 gramos y se encontró un aumento significativo ($p < 0,05$) en la ganancia de peso en los grupos papilla A y B, comparados con los dos grupos de caseína (Tabla 2).

La Tabla 3 muestra que el grupo papilla B tuvo la ingesta más alta de hierro (5,50 mg) y que no se encontró diferencia en ingesta de hierro entre los grupos de papilla A y B, en tanto que el grupo caseína con hierro (1,83 mg) y caseína sin hierro (0,24 mg) tenían los menores valores y fueron diferentes con todos los demás grupos ($p < 0,05$); la excreción de hierro urinario mostró el mismo comportamiento. Respecto a la excreción fecal la pérdida de hierro por heces fue mayor a la ingesta en todos los grupos, excepto en el de caseína con hierro, además los valores de todos los grupos fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$).

En cuanto al balance metabólico se encontró balance positivo de hierro solo en el grupo caseína con hierro (0,39 mg), mien-

Tabla 2. Características de consumo de alimentos, excretas, peso inicial, peso final y ganancia de peso en animales según dieta experimental por 10 días ($X \pm DE$).

Características	Dieta experimental			
	Papilla A (n=8)	Papilla B (n=8)	Caseína con hierro (n=16)	Caseína sin hierro (n=16)
Total de alimento consumido (g)	52,7 \pm 2,79	52,4 \pm 4,46	26,4 \pm 2,07	28,1 \pm 3,54
Total de heces excretadas (g)	6,86 \pm 0,75	6,13 \pm 1,03	1,47 \pm 0,26	1,66 \pm 0,37
Total de orina excretada (ml)	19,6 \pm 10,49	25,5 \pm 8,65	25,8 \pm 14,76	24,3 \pm 14,27
Peso inicial (g)	70,9 \pm 4,32	72,1 \pm 7,04	64,2 \pm 2,86	63,3 \pm 3,95
Peso final (g)	98,5 \pm 3,01	98,5 \pm 6,44	71,2 \pm 3,73	74,5 \pm 6,02
Ganancia de peso (g)	27,5 \pm 4,04 ^a	26,4 \pm 3,25 ^a	7,0 \pm 1,37 ^b	11,2 \pm 2,17 ^b

ANOVA, prueba de post-hoc Bonferroni. Los valores con letras diferentes representan diferencias significativas entre los grupos de comparación, $p < 0.05$.

Tabla 3. Ingesta, excreción urinaria y fecal de hierro, balance de hierro, coeficiente de digestibilidad y retención de hierro según dietas experimentales por 10 días ($X \pm DE$).

Características	Dieta experimental			
	Papilla A	Papilla B	Caseína con hierro	Caseína sin hierro
Ingesta de hierro (mg)	4,81 \pm 0,24 ^a	5,50 \pm 0,45 ^a	1,83 \pm 0,12 ^b	0,24 \pm 0,02 ^c
Excreción de hierro urinario (mg)	0,02 \pm 0,01 ^a	0,03 \pm 0,01 ^a	0,01 \pm 0,00 ^b	0,13 \pm 0,00 ^c
Excreción de hierro fecal (mg)	6,60 \pm 0,62 ^a	6,02 \pm 1,83 ^b	1,42 \pm 0,21 ^c	0,35 \pm 0,07 ^d
Balance metabólico de hierro (mg)	-1,81 \pm 0,39 ^a	-0,55 \pm 0,34 ^b	0,39 \pm 0,28 ^c	-0,25 \pm 0,08 ^b
Coeficiente de digestibilidad (%)	-37,5 \pm 10,02 ^a	-9,8 \pm 6,75 ^{a,b}	22,0 \pm 15,12 ^c	-49,4 \pm 38,13 ^{a,d}
Retención de hierro (%)	-38,5 \pm 10,01 ^a	-15,4 \pm 11,76 ^a	21,0 \pm 15,17 ^b	-107,0 \pm 45,55 ^c

ANOVA, prueba de post-hoc Bonferroni. Los valores con letras diferentes representan diferencias significativas entre los grupos de comparación, $p < 0.05$.

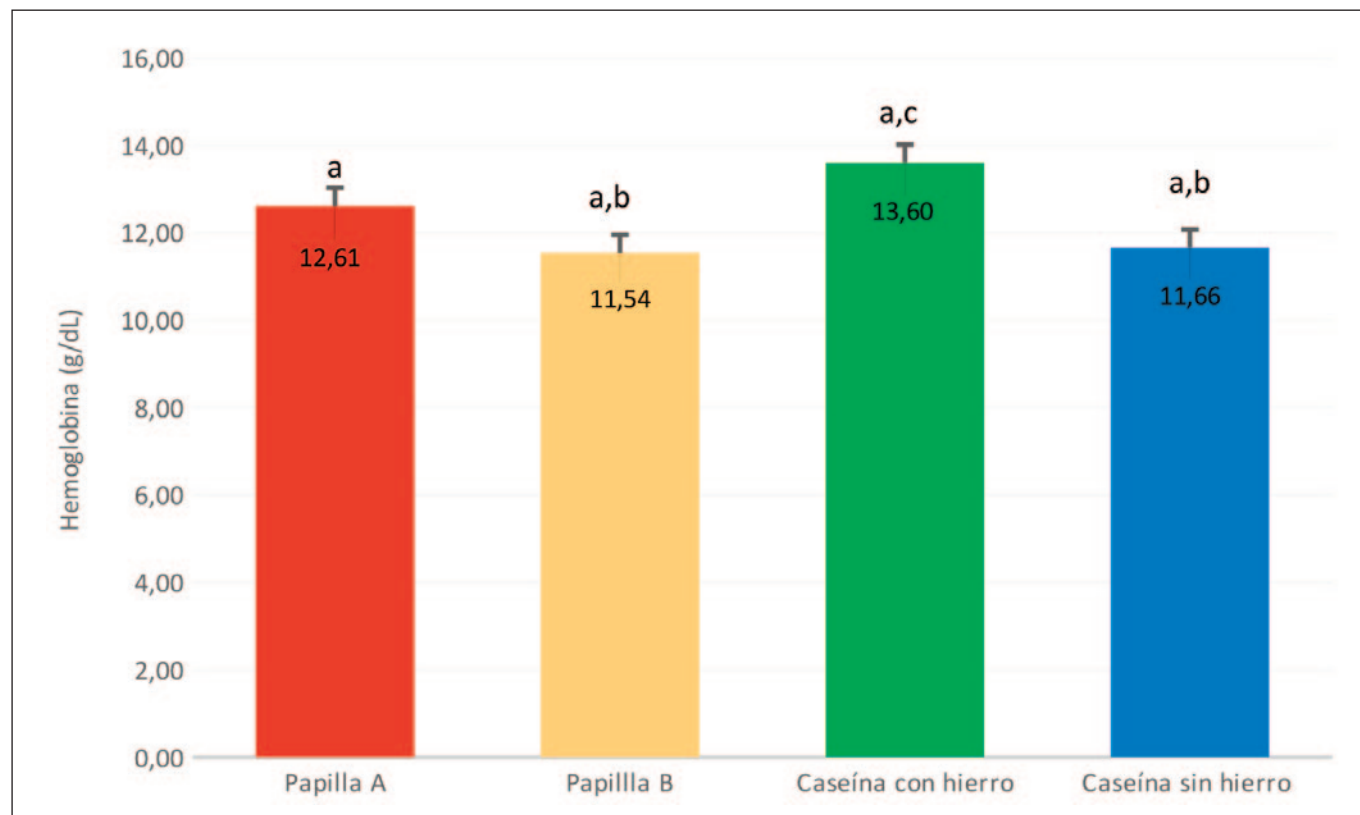
tras que los demás grupos tuvieron balances negativos; además el grupo caseína con hierro y el grupo papilla A mostraron diferencias significativas con todos los grupos. El coeficiente de digestibilidad también reveló un valor positivo solo para el grupo de caseína con hierro (22%) y diferencias significativas con los demás grupos. Por su parte el indicador de retención de hierro confirmó que el grupo de caseína con hierro mostró una retención de 21%, la cual fue significativamente diferente a los demás grupos que evidenciaban pérdidas, destacando el grupo de caseína sin hierro con una retención de -107 %. (Tabla 3).

También se evaluaron los niveles de hemoglobina de cada grupo al finalizar el período de estudio y al comparar el promedio de hemoglobina en los 4 grupos experimentales, se encontró que el grupo de caseína con hierro mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) con los grupos papilla B y caseína sin hierro (Gráfico 1).

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio muestran balance positivo en el grupo de dieta caseína con hierro, evidenciando una mayor biodisponibilidad de hierro en este grupo, mientras que las otras dietas no evidenciaron absorción de hierro. Estos resultados también se corroboran en los mayores niveles de hemoglobina al finalizar el estudio, del grupo de dieta caseína con hierro, frente a los grupos papilla B y caseína sin hierro.

Otros estudios también han reportado resultados similares, Padrón et al., comparando dietas en base a pan, blanco, integral y dieta de caseína en animales experimentales de laboratorio, encontraron balance positivo solo en la dieta a base de caseína con hierro¹⁵, por su parte Chaud et al., encontraron similar eficacia para la repleción de hemoglobina en ratas al comparar sulfatos ferrosos con un complejo peptídico de

Gráfico 1. Hemoglobina final en animales según dietas experimentales por 10 días.

ANOVA, prueba de post-hoc Bonferroni. Los valores con letras diferentes representan diferencias significativas entre los grupos de comparación, $p < 0.05$.

Fe^{3+} en base a un hidrolizado enzimático de caseína¹⁶. Un estudio reciente en mujeres jóvenes no anémicas, ha confirmado la eficacia equivalente entre los complejos ferro-proteicos de caseína y el sulfato ferroso¹⁷.

Además se encontró que los grupos papilla A y B consumieron casi el doble de la cantidad de alimentos que los dos grupos de caseína, por tanto tuvieron una mayor ingesta de energía y de hierro (más del doble); sin embargo solo el aumento de peso en los grupos papilla A y B fue consistente con la mayor ingesta de alimentos, mientras que en el caso del hierro no aumentó significativamente la hemoglobina y no presentaron balance positivo, este comportamiento diferenciado del hierro, estaría explicado por que los grupos de papilla presentaron mayor cantidad de hierro perdido en heces y orina, que los grupos de caseína. Las razones del mayor consumo de alimentos de las dietas en base a papillas podrían deberse más que a la calidad nutricional a aspectos organolépticos como el olor o sabor de las dietas en base a caseína tal como lo reporta el Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos de Cuba¹⁸.

Dentro de los factores que influyen en la absorción del hierro, se reconocen tres importantes: el estado de hierro de los animales, la forma en la que está presente el hierro

en la dieta y por último la presencia en la dieta de promotores e inhibidores de la absorción del hierro¹⁹. Respecto al estado de hierro de los animales, se debe mencionar que al inicio del estudio todos los animales tenían niveles similares de hemoglobina; por lo que este factor de influencia podría estar de algún modo controlado. En cuanto a la forma de hierro presente en las dietas experimentales tanto para las dietas a base de caseína como para las papillas elaboradas, se utilizó el mismo tipo de hierro en forma de sulfato ferroso que posee una solubilidad alta, reactividad alta y biodisponibilidad media⁶.

Por lo tanto, las razones de porque solo el grupo de caseína con hierro tuvo balance positivo comparado con los otros podría deberse a la presencia en las dietas de promotores e inhibidores de la absorción del hierro. Respecto a los inhibidores, se debe mencionar que las papillas se elaboran en base a mezclas de harinas de vegetales como cereales y leguminosas que contienen naturalmente inhibidores de la absorción de hierro como ácido fítico, polifenoles, entre otros, los cuales reducen marcadamente la absorción de hierro no hemo^{19,20}. Además, otros factores dietarios presentes en vegetales, como los fitatos, las pectinas, los oxalatos y los fosfatos de la dieta, pueden influir en la absorción intestinal ya

que tienden a insolubilizar el hierro, reduciendo de ese modo su biodisponibilidad^{21,22}.

En cuanto a los promotores de la absorción de hierro, se ha propuesto que los péptidos derivados de caseína tienen capacidad de conformar complejos con hierro^{9,23} y que estos péptidos quelantes pueden mejorar la solubilidad del hierro, primero porque los caseinofosfopéptidos (CPP) se enlazan con el hierro en sitios de unión específicos facilitando su absorción a través del epitelio intestinal^{24,25}; además al estar formando un complejo se protege al hierro de los efectos de la celulosa, fosfato y oxalato²⁶; en consecuencia la biodisponibilidad del hierro estaba estrechamente relacionada con la fuerza de quelación²⁷. Una revisión sistemática actualizada a 2018 reporta la eficacia similar entre el sulfato ferroso y los péptidos de hierro derivados de caseína²⁸, la cual estaría explicada en parte por la formación de péptidos quelantes con la caseína, aunque se ha observado este fenómeno también con otras fuentes de proteína animal.

El estudio presenta algunas limitaciones entre ellas se debe mencionar que el modelo empleado determina el balance metabólico a través de la absorción aparente de hierro, sin embargo, existen otros modelos como radioisótopos de hierro marcados que permiten determinar con mayor precisión la absorción metabólica del hierro²⁹. Además, otros estudios determinan los resultados de la provisión de hierro en dietas experimentales a través de la reconversión y ganancia de hemoglobina en diseños con animales anémicos, sin embargo, en nuestro estudio empleamos animales en condiciones normales, sin anemia. El presente es un estudio en animales que comprueba la baja biodisponibilidad del hierro que fortifica los alimentos infantiles o papillas, sin embargo, es necesario que este tipo de estudios se realicen en seres humanos para comprobar los hallazgos.

CONCLUSIONES

Los resultados del estudio muestran que la dieta experimental a base de caseína con hierro tenía mayor biodisponibilidad del hierro comparada con las dietas en base a papillas de leguminosas y cereales, en un modelo "in vivo". Además, en el porcentaje de retención de hierro la dieta a base de caseína con hierro mostró valores positivos, evidenciando la absorción de hierro, mientras que en las otras dietas fue negativo. Es necesario evaluar la biodisponibilidad del hierro en los alimentos que se elaboran para los niños menores de 3 años antes de su distribución, para asegurar una fuente de hierro adecuada y proveer una intervención con plausibilidad biológica para incrementar los niveles de hemoglobina y garantizar el éxito de las intervenciones contra la anemia infantil. Asimismo, recomendamos evaluar el contenido de inhibidores de hierro en los alimentos, sobre todo las leguminosas, que se incluyen en la elaboración de alimentos infantiles contra la anemia para reemplazar su uso o aplicar técnicas que permitan reducir su efecto sobre la biodisponibilidad del hierro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Encuesta Nacional de Demografía y Salud (ENDES) 2019, Informe Principal. Lima: INEI; 2020 [citado el 12 noviembre de 2020]. Disponible en: <http://proyectos.inei.gob.pe/web/biblioineipub/bancopub/Est/Lib1075/index.html>.
2. Alcázar L. Impacto económico de la anemia en el Perú [Internet]. Lima: GRADE; Acción contra el Hambre; 2012 [citado el 4 de noviembre de 2018]. Disponible en: http://www.grade.org.pe/upload/publicaciones/archivo/download/pubs/LIBROGRADE_ANE MIA.pdf.
3. Pereira M, Oliveira AM. Poverty and food insecurity may increase as the threat of COVID-19 spreads. *Public Health Nutrition*. Cambridge University Press; 2020;23(17):3236–40.
4. Fore HH, Dongyu Q, Beasley DM, Ghebreyesus TA. Child malnutrition and COVID-19: the time to act is now. *Lancet*. 2020 Aug 22;396(10250):517-518. doi: 10.1016/S0140-6736(20)31648-2.
5. Rivera JA, Martorell R, Gonzalez W, Lutter C, Cossio TG, Flores-Ayala R, et al. Prevención de la desnutrición de la madre y el niño: el componente de nutrición de la Iniciativa Salud Mesoamérica 2015. *Salud Publica Mex*. 2011;53 Suppl 3:S303–11
6. Perú, Ministerio de Salud. Norma Sanitaria para la fabricación de los alimentos a base de granos y otros, destinados a Programas Sociales de Alimentación. Resolución Ministerial N° 451-2006. Lima: MINSa; 2006.
7. Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R. Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci*. 2014 Feb;19(2):164-74. PMID: 24778671; PMCID: PMC3999603.
8. Afify Ael-M, El-Beltagi HS, El-Salam SM, Omran AA. Bioavailability of iron, zinc, phytate and phytase activity during soaking and germination of white sorghum varieties. *PLoS One*. 2011;6(10):e25512. doi: 10.1371/journal.pone.0025512.
9. Urdampilleta Otegui A, Martínez Sanz J, et al. Intervención dietético-nutricional en la prevención de la deficiencia de hierro. *Nutr clín diet hosp* 2010;30(3):27-41
10. Alegria-Toran, A., Barbera-Saez, R., Cilla-Tatay, A. Bioavailability of minerals in foods. In M. G. de la & S. Guardia (Eds.), *Handbook of mineral elements in food* (pp. 41–63). Hoboken: Wiley Blackwell, 2015.
11. McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD. *Nutrición animal*. Ed Acribia SA. España, 1986.
12. Atwater WO. Principles of nutrition and nutritive values of food. *United States Farmers' Bulletin* 1910; 142.
13. AOAC. *Official methods of analysis*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 2000.
14. Alferez, M.J.M., Lopez-Aliaga, I., Nestares, T., Diaz-Castro, J., Barrionuevo, M., Ros, P.B., Campos, M.S., 2006. Dietary goat milk improves iron bioavailability in rats with induced ferropenic anaemia in comparison with cow milk. *International Dairy Journal* 16, 813–821.
15. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the*

- Care and Use of Laboratory Animals. 8th edition. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/> doi: 10.17226/12910.
16. Padron M., Abreu M., Hernandez M., Symington R. y J. Rebozo. Efecto del pan integral sobre el balance mineral en ratas. *Rev. Cubana Aliment Nutr* 2 (1): 120-135. ene.-jun. 1988.
 17. Chaud MV, Izumi C, Nahaal Z, Shuhama T, Bianchi Mde L, de Freitas O. Iron derivatives from casein hydrolysates as a potential source in the treatment of iron deficiency. *J Agric Food Chem*. 2002 Feb 13;50(4):871-7. doi: 10.1021/jf0111312. PMID: 11829660.
 18. Sharon J Henare, Nadia Nur Singh, Ashling M Ellis, Paul J Moughan, Abby K Thompson, Thomas Walczyk, Iron bioavailability of a casein-based iron fortificant compared with that of ferrous sulfate in whole milk: a randomized trial with a crossover design in adult women, *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volume 110, Issue 6, December 2019, Pages 1362–1369, <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqz237>.
 19. Instituto de Nutrición e Higiene de los alimentos (INHA). Consideraciones practicas del balance nitrogenado. INHA, Universidad de La Habana. Cuba, 1997.
 20. World Health Organization. Nutritional anaemias: tools for effective prevention and control. Geneva: World Health Organization, 2017.
 21. Hunt JR. Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets. *Am J Clin Nutr* 2003; 78 (3 Suppl): 633S-639S.
 22. Andrews M, Briones L, Jaramillo A, Pizarro F, Arredondo M. Effect of calcium, tannic acid, phytic acid and pectin over iron uptake in an in vitro Caco-2 cell model. *Biol Trace Elem Res*. 2014 Apr;158(1):122-7. doi: 10.1007/s12011-014-9911-0. Epub 2014 Feb 16. PMID: 24531910.
 23. Ramírez-Ojeda, A.M., Moreno-Rojas, R., Sevillano-Morales, J. et al. Influence of dietary components on minerals and trace elements bioaccessible fraction in organic weaning food: a probabilistic assessment. *Eur Food Res Technol* 243, 639–650 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2777-y>
 24. Caetano-Silva, M. E., Bertoldo-Pacheco, M. T., Paes-Leme, A. F., & Netto, F. M. Iron-binding peptides from whey protein hydrolysates: Evaluation, isolation and sequencing by LC–MS/MS. *Food Research International*, 2015, 71, 132–139.
 25. Kibangou, I., Bouhallab, S., Bureau, F., Allouche, S., Thouvenin, G., & Bougle, D. Caseinophosphopeptide-bound iron: Protective effect against gut peroxidation. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 2008. 52(3), 177–180.
 26. Wu W, Yang Y, Sun N, Bao Z, Lin S. Food protein-derived iron-chelating peptides: The binding mode and promotive effects of iron bioavailability. *Food Res Int*. 2020 May;131:108976. doi: 10.1016/j.foodres.2020.108976.
 27. O'Loughlin IB, Kelly PM, Murray BA, FitzGerald RJ, Brodkorb A. Molecular characterization of whey protein hydrolysate fractions with ferrous chelating and enhanced iron solubility capabilities. *J Agric Food Chem*. 2015 Mar 18;63(10):2708-14. doi: 10.1021/jf505817a. Epub 2015 Mar 4. PMID: 25716093.
 28. Sun X, Sarteshnizi RA, Boachie RT, Okagu OD, Abioye RO, Pfeilsticker Neves R, Ohanenye IC, Udenigwe CC. Peptide-Mineral Complexes: Understanding Their Chemical Interactions, Bioavailability, and Potential Application in Mitigating Micronutrient Deficiency. *Foods*. 2020 Oct 2;9(10):1402. doi: 10.3390/foods9101402. PMID: 33023157; PMCID: PMC7601898.
 29. Martínez Francés A, Leal Martínez-Bujanda J. Efficacy and tolerability of oral iron protein succinylate: a systematic review of three decades of research. *Curr Med Res Opin*. 2020 Apr;36(4):613-623. doi: 10.1080/03007995.2020.1716702. Epub 2020 Jan 24. PMID: 31944128.
 30. Lynch S, Pfeiffer CM, Georgieff MK, Brittenham G, Fairweather-Tait S, Hurrell RF, McArdle HJ, Raiten DJ. Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)-Iron Review. *J Nutr*. 2018 Jun 1;148(suppl_1):1001S-1067S. doi: 10.1093/jn/nxx036. PMID: 29878148; PMCID: PMC6297556.