

Biodisponibilidad de lactato ferroso adicionado a caramelos de goma

Adrián Guillermo Quintero¹

Guillermina González Rosendo
Javier Polo Pozo²
José J. Rodríguez Jerez³

¹Centro de Desarrollo de Productos Bióticos -IPN

²Centro de I+D de American Protein Corporation-Europe

³Facultad de Veterinaria Universidad Autónoma de Barcelona

Resumen

Fundamentos: El enriquecimiento de alimentos con sulfato ferroso es la alternativa más usada para combatir la deficiencia de hierro, pero tecnológicamente es difícil de manejar, por lo que se propone en su lugar el lactato ferroso que imprime menos modificaciones.

Objetivo: Evaluar la biodisponibilidad del lactato ferroso adicionado a caramelos de goma, en cerdos en crecimiento.

Métodos: La biodisponibilidad del hierro se evaluó en lechonas. Aleatoriamente se formaron 2 grupos que recibieron: alimento bajo en hierro, mas los caramelos adicionados con lactato ferroso y alimento normal. Quincenalmente se midieron peso y parámetros hematológicos. Se realizó análisis pareado y comparación de medias.

Resultados: El producto tuvo características organolépticas aceptables, contenido de hierro de 2,4 mg por gramo. Las lechonas suplementadas con lactato ferroso presentaron mayor ganancia de peso (15,7% más). La mortalidad en el grupo de lactato fue del 20% y de 50% en el grupo control. El hierro detectado, fue mayor en el grupo de lactato (2.987 mg) que en el control (2.792 mg); en cambio, la cantidad de hierro consumido fue mayor en este último.

Conclusiones: La suplementación con lactato ferroso demostró ser mejor en el incremento de peso y en la menor mortalidad de lechonas. La biodisponibilidad del lactato ferroso fue superior en un 30% a la del sulfato ferroso.

Palabras clave: Hierro. Biodisponibilidad. Cerdos. Deficiencia de hierro.

Summary

Background: The enrichment of food with ferrous sulfate is the most frequently use alternative to combat iron deficiency, but it is technologically difficult to manage which is why we propose ferrous lactate which provides the benefit of fewer modifications.

Objective: To evaluate the bioavailability of ferrous lactate added to gum caramels to female growing pigs.

Methods: The bioavailability of the iron was evaluated in piglets. At random 2 groups were formed which received: Feed low in iron, plus caramels added with ferrous lactate and normal feed. Every 15 days were weight and

hematological parameters were measured. Paired analysis were made and comparison of measurements.

Results: The product had acceptable characters, quantity of iron of 2,4 mg per gram. The female pigs supplemented with ferrous lactate showed more aid on weight (15,7% more). The mortality in the group of lactate was 20% and 50% in the control group. The iron detected, was higher in the group of lactate (2 987 mg) than in the control group (2 792 mg); whereas, the quantity of iron consumed was higher in the last group.

Conclusions: The supplement with ferrous lactate proved to be the best in increasing weight and reduced the mortality of female pigs. The bioavailability of ferrous lactate was superior by 30% compared with ferrous sulfate.

Key words: Iron. Bioavailability. Pigs. Iron deficiency.

Introducción

A pesar de su amplia difusión en el planeta, el hierro es el nutrimento cuya carencia es la más manifiesta en los grupos humanos¹.

Se han emprendido múltiples acciones para su control; sin embargo, el problema persiste por varios motivos; entre otros, el poco apego a la suplementación, la combinación inadecuada de alimentos en la dieta y la baja biodisponibilidad de hierro de los productos consumidos^{2,3}.

El hierro de la dieta se presenta en dos formas:

- Hierro no hemo, derivado de productos vegetales principalmente, aunque también se incluye hasta el 60% del contenido del metal en los productos de origen animal; el total de las sales ferrosas usadas para enriquecimiento de alimentos o como medicamentos son también de este tipo⁴.
- Hierro hemo, que se encuentra sólo en productos animales, es más fácilmente absorbido, pero por su origen resulta más caro y de difícil acceso para quienes más lo necesitan⁵.

En la actualidad, las medidas empleadas para contrarrestar el problema de la deficiencia son múlti-

Correspondencia:

Adrián Guillermo Quintero
Apdo. Postal, 24
62731 Yauatepec,
Morelos, México
E-mail: gquinter@ipn.mx

ples: mejora de prácticas dietéticas, cuidados prenatales y perinatales, control de infecciones y parasitosis, educación en nutrición y salud, suplementación con hierro y fortificación de alimentos con el metal⁶. En esta última estrategia existen evaluaciones del impacto obtenido tanto en países industrializados⁷ como en vías de desarrollo⁸; en los primeros los resultados son muy satisfactorios, no sucede así en los segundos; por lo que, la investigación continua en la búsqueda de mejores alternativas, una de ellas es encontrar compuestos que sean adecuadamente absorbidos y que además no provoquen modificaciones importantes en las propiedades sensoriales de los alimentos y que a la vez su absorción se vea poco afectada por compuestos existentes en la dieta como el ácido fítico, compuestos fenólicos y calcio⁹.

El lactato ferroso es una sal cuya absorción es del 106% en relación al sulfato ferroso y no provoca modificaciones importantes al vehículo que se adiciona, es de bajo costo, por lo que se considera una alternativa atractiva para el enriquecimiento de alimentos con hierro⁹.

Hay una gran variedad de alimentos enriquecidos con hierro, los más usados son los cereales y sus derivados y las salsas y condimentos, quizá por su amplio consumo y factibilidad tecnológica para hacer la adición del metal¹⁰; los caramelos son también un vehículo extraordinario para este fin; por su amplio consumo (sobre todo en los niños) y por la facilidad para adicionarle la sal ferrosa disfrazando con facilidad cualquier modificación en sus propiedades sensoriales¹¹; sin embargo, en acuerdo con Hurrell, cualquier nueva propuesta de alimento enriquecido con hierro debe evaluarse en términos de su capacidad real para mejorar el estado nutricional del metal en los individuos; es decir, de su biodisponibilidad⁹.

Existen múltiples técnicas para el estudio de la biodisponibilidad del hierro, que dependiendo del modelo utilizado se pueden clasificar en: estudios in vitro e in vivo (estos últimos en animales o en humanos)¹².

Los estudios in vitro, son rápidos, con menor costo y permiten mayor control sobre las variables experimentales. La limitación más importante de estos métodos es que no pueden simular estados fisiológicos o algunas propiedades físico-químicas y respuestas adaptativas que influyen en la biodisponibilidad del hierro¹³; aunque cabe mencionar que últimamente se han desarrollado métodos que tratan de corregir estas limitaciones y se acercan en medida de lo posible, a las condiciones de absorción del intestino delgado¹⁴.

Los estudios de absorción en humanos continúan siendo el estándar de oro para estimar la biodisponibilidad del hierro; sin embargo, los ensayos con animales son, en muchas ocasiones, más prácticos para predecir la biodisponibilidad de nutrimentos^{12,15}.

Se considera al cerdo como un modelo que comparte más similitudes con la estructura y función humana que otros animales y es posible controlar más variables; como las relacionadas con la dieta o con el ritmo de crecimiento, motivo por el cual se escogió como modelo en este estudio¹⁶.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la biodisponibilidad del lactato ferroso, contenido en caramelos de goma ("gomitas" o "gominolas").

Materiales y métodos

Desarrollo de los caramelos de goma

Por diseño de factor a factor¹⁷, se evaluaron varios ingredientes y fórmulas (hidrocoloides, entre ellos); de las que se seleccionó una como definitiva que constó de 9 ingredientes (Tabla 1). Mediante observación directa y con una escala arbitraria (de 0 a 5), se midieron las características de elasticidad, color, olor, sabor, gomosidad, firmeza y esfuerzo de corte.

El lactato ferroso usado en el enriquecimiento es la sal de hierro (II) del L-ácido láctico natural, producido por fermentación del azúcar. Polvo color amarillo verdoso con 20-21% de hierro elemental (PURAMEX® FE, producido por PURAC, Bioquímica).

Se realizó análisis de contenido de: proteína, grasa, humedad y cenizas, siguiendo la metodología propuesta por la AOAC¹⁸; el hierro se determinó mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica de Llama en un espectrofotómetro marca PERKIN-ELMER, modelo 2100¹⁹.

Ingredientes	Porcentaje
Gelatina	9,5
Azúcar	31,7
Glucosa	30,2
Ácido cítrico	1,6
Lactato ferroso	0,6
Agua	26,0
Colorantes	0,2
Aromas	0,2

Tabla 1.
Fórmula de caramelos de goma enriquecidos con hierro

Se aplicó control microbiológico durante el proceso y al producto final realizando determinaciones de mesófilos, enterobacterias, mohos y levaduras, *Salmonella* y *E coli*.

Evaluación de la biodisponibilidad

El estudio se realizó en 20 cerdos comunes hembras (*Sus scrofa domesticus*), Pietrain Belga; de 4 semanas de edad, con un peso promedio de 7 kg, a las que se les administraron al nacimiento sólo 100 mg de hierro dextrano con el objeto de producir una ligera deficiencia de hierro.

Mediante selección aleatoria se formaron dos grupos de suplementación con 10 lechones cada uno:

- Grupo de estudio. Recibió dieta con alimento bajo en hierro, además caramelos de goma enriquecidos con lactato ferroso.
- Grupo Control. Recibió alimento normal que de fábrica viene adicionado con sulfato ferroso.

Se realizó supervisión diaria, se tomó el peso y muestras de sangre cada quince días, se realizaron oportunamente los tratamientos antiparasitarios y se realizó mensualmente una revisión veterinaria.

Las muestras de sangre se extrajeron de la vena cava superior, para lo cual previamente se tranquilizaba al cerdo con la aplicación de Azaperona (Stresnil®). Se captaron 7 ml de sangre de los cuales 3 ml se depositaron en un tubo con EDTA, del que posteriormente se realizaron las determinaciones de la serie roja y el resto de sangre (4 ml) se vació en un tubo con gel separador de sueros para hacer las determinaciones bioquímicas. Las muestras se transportaron en refrigeración de la granja al laboratorio, donde se procesaron de inmediato. Las determinaciones hematológicas se realizaron en un equipo Advia 120 de Bayer²⁰, y las bioquímicas en un Sistema Analizador Químico COBAS MIRA 89, utilizando el kit co-

mercial de ABX: Ferrozine iron A11A00091. La determinación de hierro en hígado se realizó por espectrofotometría de absorción atómica.

Esta investigación fue aprobada por la Comisión de Ética de la Universidad Autónoma de Barcelona. El criterio de punto final de los sistemas experimentales lo constituyó por un lado, la existencia de enfermedad incapacitante o incurable y por otro, la terminación del estudio; en ambos casos, la eutanasia se realizó administrando pentobarbital sódico en la misma granja porcina^{21,22}.

Para el análisis estadístico se usó el programa SPSS® versión 10; se realizó análisis descriptivo de los datos y posteriormente inferencial, mediante análisis pareado de los valores iniciales contra finales y comparación de medias independientes entre los resultados de los dos grupos.

Resultados

La Tabla 2 muestra la composición nutricional de los caramelos de goma formulados. Es posible observar que aportan 2,4 mg de hierro elemental por cada gramo de caramelo. La observación directa mostró que el producto tuvo una apariencia aceptable, olor, color y sabor de acuerdo a la figura formada y apropiada gomosidad y dureza.

En la columna de valores normales de la Tabla 3, se presentan algunas características del grupo total estudiado; se observa que la variabilidad del peso, es alta; algo similar ocurre con las otras características, lo que indica que el grupo es bastante heterogéneo. Sin embargo, la mayoría de los valores están dentro de la normalidad²³.

Del total de cerdas con que se inició el estudio, 7 murieron durante el seguimiento, 5 del grupo control (50%) y 2 del grupo de lactato (20%). En la Tabla 4 se observa que hay diferencias en los valores de los grupos de las que sobrevivieron y de las que murieron, las diferencias son mínimas, excepto para hierro sérico y plaquetas; aunque para todos los casos, las diferencias no son estadísticamente significativas.

En la Figura 1 se observa el comportamiento del peso en los dos grupos de estudio; a partir de la semana 9 y hasta la semana 12, el peso de las cerdas del grupo de lactato fue ligeramente inferior al del grupo control; a partir de la semana 12 se inicia un despegue del grupo suplementado con lactato ferroso, que se incrementa a medida que pasa el

Tabla 2. Composición nutricional de los caramelos de goma* enriquecidos con lactato ferroso

Nutrientos	Cantidad
Energía, kcal	312,7
Proteínas, g	8,6
Grasas, g	-
Hidratos de carbono, g	69,6
Hierro, mg	240,4
Cenizas %	0,3
Humedad %	14,1

*100 g de caramelo

Característica	Grupos de estudio**		Valores normales
	Lactato	Control	
Peso, kg	7,1 (1,7)	6,9±1,7	-
R. Eritrocitos, 10 ⁶ /μl	6,1 (1,0)	6,00 (0,5)	5-7
Hemoglobina, g/dl	11,4 (1,2)	11,7 (1,2)	9-13
Hematocrito, %	31,6 (5,7)	32,5 (3,6)	36-43
VCM, fl	52,8 (4,9)	54,3 (1,4)	52-62
CMH, pgl	18,9 (3,0)	19,5 (1,9)	17-24
CCMH, g/dl	36,6 (4,9)	36,0 (2,1)	29-34
Fe Sérico, μ/dl	257,0 (58,6)	238,3 (84,4)	172±60
R. Leucocitos, 10 ³ /μl	19,9 (7,4)	21,5 (3,1)	11-22
R. Plaquetas, 10 ³ /μl	570,3 (106,3)	408,1 (11,1)	200-500
Linfocitos, %	50,0 (12,1)	60,2 (6,0)	35-75
Monocitos, %	2,5 (19)	2,7 (1,3)	0-10
Neutrófilos, %	50,3 (15,5)	35,4 (7,2)	20-70
Eosinófilos, %	1,5 (0,5)	3,1 (0,5)	0-10

*Expresados como promedio y desviación

**Las diferencias no fueron estadísticamente significativas en ningún caso. $p>0,05$. No aplica

Tabla 3.
Peso y características
hematológicas
de las lechonas*
según grupo de estudio
y normalidad

tiempo hasta la semana 20, en la que finaliza el estudio, con un peso promedio de 49,9 kg a diferencia del grupo control que alcanzó un peso de 43,9 kg.

En la Tabla 5 se presenta el hierro medido en sangre e hígado y luego calculado para cada uno de los compartimentos del organismo porcino: hierro funcionante, reservas y circulante, la suma de ellos que constituye el hierro aprovechado (total) y su proporción en relación con el hierro ingerido, es lo que informa del porcentaje de aprovechamiento promedio y con ello de la biodisponibilidad de las dos sustancias utilizadas.

Es factible observar que las diferencias fueron significativas entre los dos grupos en lo referente a hierro circulante y hierro total, no así en los compartimentos de hierro funcionante y de reservas; sin embargo, la diferencia encontrada en la biodisponibilidad (1.2%), sí fue estadísticamente significativa.

Discusión

En la Tabla 2 se observa que cada gramo de caramelo contiene 2,4 mg de hierro, por lo que un caramelo de 5 gramos, tendrá aproximadamente 12 mg

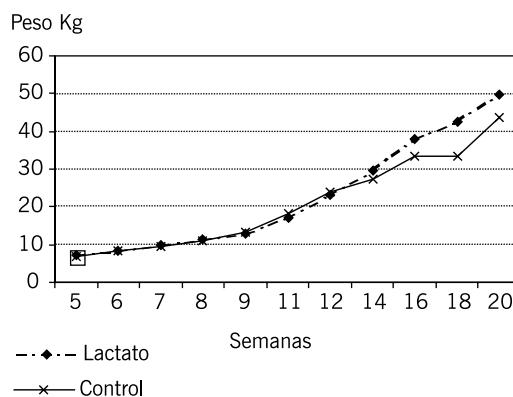


Figura 1.
Ganancia de peso de las
cerdas durante
el seguimiento,
según grupo

de hierro, cantidad que puede cubrir hasta el 100% de las recomendaciones para el consumo del metal en los niños²⁴. Pudiera pensarse que dado este alto contenido de hierro en el producto, existe el riesgo de sobredosis por consumo excesivo; sin embargo, para que ocurra intoxicación aguda por el metal se requieren más de 200 piezas de caramelo, lo que en la práctica resulta difícil de consumir.

La evaluación de biodisponibilidad se realizó en las 20 lechonas, que se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos, por los datos presentados en la Tabla 3,

es posible observar que hubo una gran variabilidad dentro del grupo estudiado; por ejemplo, en el peso hay un coeficiente de variación de 0,24; hematocrito de 0,22; leucocitos de 0,37. Dada la heterogeneidad del grupo, se tuvo cuidado en que la distribución a los grupos fuera aleatoria. En la citada tabla se presentan las características de cada uno de los grupos. Puede notarse que hubo algunas diferencias; sin embargo, éstas no fueron estadísticamente significativas en ningún caso, por lo que puede asumirse que los grupos no eran diferentes al inicio del estudio y que la distribución fue satisfactoria.

Podría existir el riesgo de que las cerdas que murieron tuvieran una característica en común diferente a las que sobrevivieron y que eso pudiera influir sobre los resultados; sin embargo, al comparar los valores promedio de las variables de uno y otro grupo, se observó que hubo ligeras diferencias en algunas variables (Tabla 4); pero, éstas no fueron estadísticamente significativas, esto hace pensar en la ausencia de alguna influencia diferencial de la mortalidad sobre los grupos de estudio.

Al inicio del estudio las lechonas de ambos grupos presentaron promedios de peso muy similares de 7,1

(1,7) para lactato ferroso y 6,9 (1,7) kg para el control (diferencias no significativas estadísticamente $p > 0.05$); pero, el incremento fue superior en el grupo suplementado con lactato (Figura 1), su peso final fue de 49,9 kg, lo que da un incremento de 42,8 kg; a diferencia del grupo control cuyo peso promedio alcanzó los 43,9 kg, por tanto el incremento fue de 37 kg, lo que hace una diferencia entre los grupos de 5,8 kg, que fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$) y concuerda con los resultados obtenidos por Perestrelo y Perestrelo²⁵.

En promedio, las lechonas del grupo de lactato consumieron 4,4 kg de caramelos cada uno, lo que significan 13 778 kilocalorías, las cuales convertidas a peso de los animales, a razón de 9200 kcal por kg²⁶, da un total de 1,5 kg de peso explicado por el consumo de caramelos, con lo que la diferencia real del peso promedio de los cerdos, podría ser de 4,3 kg (11,2%) a favor del grupo suplementado con lactato ferroso.

En la Tabla 5 se observa que las diferencias entre la biodisponibilidad del hierro del grupo suplementado con lactato ferroso y del suplementado con sulfato ferroso, fueron estadísticamente significativas, la biodisponibilidad del lactato ferroso mostró ser superior en un 30% a la observada con el sulfato ferroso, cabe mencionar que se estaría subestimando la biodisponibilidad para los dos grupos, puesto que sólo se midió el aprovechamiento en dos tejidos del animal; sin embargo estos datos informan de una biodisponibilidad relativa comparable entre los dos grupos estudiados²⁷.

En conclusión, se puede afirmar que es factible fabricar un caramelo de goma aceptable y con alto contenido de hierro. La mortalidad fue menor en el grupo de cerdos que se suplementó con lactato ferroso; el peso fue mayor en este grupo y hubo una clara diferencia a favor del lactato ferroso en los promedios de la cantidad total de hierro detectada; además de que los cerdos del grupo de lactato con-

Tabla 4.
Características
hematológicas de las
cerdas que permanecieron
en el estudio en relación a
las que murieron

Característica	Grupos de lechonas*	
	Sobrevivieron	Murieron
R. Eritrocitos, $10^6/\mu\text{l}$	8,0 (0,6)	8,0 (0,1)
Hemoglobina, g/dl	12,8 (0,8)	13,1 (0,1)
Hematocrito, %	43,5 (2,9)	43,2 (1,1)
VCM, fl	55,9 (6,2)	53,8 (1,8)
CMH, pgl	16,1 (0,9)	16,3 (0,3)
CCMH, g/dl	29,5 (0,8)	30,3 (0,5)
Fe Sérico, $\mu\text{g/dl}$	131,8 (59,7)	122,9 (72)
R. Leucocitos, $10^3/\mu\text{l}$	17,2 (3,9)	15,4 (9,5)
R. Plaquetas, $10^3/\mu\text{l}$	366,7 (116,2)	274,7 (80,8)

*Las diferencias no fueron estadísticamente significativas. $p > 0,05$.

Tabla 5.
Cantidad de hierro de los
compartimentos
y porcentaje de absorción
de hierro en relación
al consumido

Grupos	Cantidad de hierro. Mg				Biodisponibilidad*	
	Hemoglobina** Funcionante	Hígado** Reservas	Sangre* Circulante	Total*	Ingerido	
Lactato Ferroso	2732 (494)	245 (69)	9,6 (3,6)	2987 (530)	68033	5,2 (1,0)
Control	2498 (723)	287 (45)	6,7 (1,7)	2792 (754)	69810	4,0 (1,0)

* Diferencias estadísticamente significativas. $p < 0,05$.

** Diferencias estadísticamente no significativas. $p > 0,05$.

sumieron una menor cantidad de hierro; por lo que se puede afirmar que la biodisponibilidad del lactato ferroso fue superior a la observada con el sulfato ferroso.

Agradecimientos

Se agradece el apoyo recibido para la realización del presente. A la Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas (Instituto Politécnico Nacional-México); a la Universidad Autónoma de Barcelona y a la empresa A P C - Europe. Y a la subvención por la ayuda PROFIT FIT-060000-2000-74 del Ministerio Español de Ciencia y Tecnología.

Bibliografía

- OPS/OMS. Estrategias de la OPS/OMS para el control de la deficiencia de hierro en la región. Washington DC: Oficina Sanitaria Panamericana; 1996.
- Loocher AC, Dallman PR, Carroll MD, Gunter EW, Jonson CL. Prevalence of iron deficiency in the United States. *JAMA* 2002;(12):973-6.
- Schultink W, Van DR, Matulessi P, Gross R. Low compliance with an iron-supplementation program: a study among pregnant women in Jakarta. *Am J Clin Nutr* 1993;(57):135-9.
- ILSI. Iron compounds for food fortification: Guidelines for Latin America and the Caribbean 2002. *Nutr Rev* 2003;60(7):50-61
- Uzel C, Conrad M. Absorption of heme iron. *Seminars in haematology* 1998;(1):27-34.
- Martorell R. Forging effective strategies to combat iron deficiency. Panel discussion: regional actions priorities. *J Nutr* 2002;(132):871S-4S.
- Ramakrishnan U, Yip R. Forging effective strategies to combat iron deficiency. Experiences and challenges in industrialized countries: control of iron deficiency in industrialized countries. *J Nutr* 2002;(132):820S-4S.
- Hertrampf E. Fortification of foods with iron in Latin America. *Nutr Rev* 2002;60(7)Supl:22-5.
- Hurrell RF. Fortification: overcoming Technical and practical barriers. *J Nutr* 2002;(132):806S-12S.
- Uauy R, Hertrampf E, Reddy, M. Forging effective strategies to combat iron deficiency. Iron fortification of foods: overcoming technical iron deficiency. *J Nutr* 2002;(132):849S-52S.
- Sari M, Bloem MW, De Pee S, Schultink WJ, Sastroamidjojo S. Effect of iron-fortified candies on the iron status of children aged 4-6 in East Jakarta, Indonesia. *Am J Clin Nutr* 2001;73:1034-9.
- Fairweather-Tait SJ. Bioavailability of nutrients and other bioactive components from dietary supplements: iron. *J Nutr* 2001;(131 Suppl):1383S-6S.
- Cook JD. Adaptation in iron metabolism. *Am J Clin Nutr* 1990;(51):301-8.
- Glahn P. A gut issue. Measuring iron bioavailability. [en línea] August 1999. Disponible en: <http://www.nps.ars.usda.gov/programs/appvs.htm>.
- Wood JR. Methodological issues in assessing bioavailability of nutrients and other bioactive substances in dietary supplements: summary of workshop discussion. *J Nutr* 2001;131 Supl:1396S-8S.
- Swindle M, Smith AC, Laberlaid K, Duncan ML. Farm animals in biomedical research part one swine in biomedical research: management and models. *ILAR, news* 1994;(1):1-8.
- Toledo O, Jiménez G, Garrido F. Desarrollo y formulación de alimentos: VI taller de herramientas de cálculo en ingeniería de alimentos. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 1995.
- Association of Official and Analytical Chemist. Official Methods of Analysis of AOAC. 16th ed. Maryland (US): The AOAC 1997.
- Adrian J, Potus J, Poiffait A. Elementos minerales. En análisis nutricional de los alimentos. Zaragoza (ES): Acribia; 2000;93-111.
- Knoll JS. Clinical automated hematology systems. En: Schalm's editor. *Veterinary Hematology*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins 2000:3-11.
- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Baunvan J, et al. Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación: parte 1. *Laboratory animals* 1996;(4):293-316.
- Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Baunvan J, et al. Recomendaciones para la eutanasia de animales de experimentación: parte 2. *Laboratory animals* 1997;(1):1-32.
- Aiello SE, Mays A. *Guía de referencias en el manual Merk de veterinaria*. 5ª ed. Barcelona: Doyma 2000: 2452-6.
- Institute of medicine (US). Dietary reference intakes. Vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Washington, DC.: *National Academy Press* 2001.
- Perestrelo VR, Perestrelo VH. La administración de diaminoácidoquelato de hierro en cerdas gestantes mejora el peso de los lechones y la homogeneidad de las camadas al nacimiento. *ANAPORC* 1998; (183):85-8.
- Goodwing DH. Raciones equilibradas. En: *Producción y manejo del cerdo*. Zaragoza: Acribia; 1975: 67-76.
- Quintero GA, Sánchez MJ, Mariaca GG, González RG. Biodisponibilidad de nutrimentos y sustancias bioactivas. *Industria Alimentaria* 2003;6:14-20.