

## **II. Objetivos**

## **2.1 Objetivo general**

Desarrollar un alimento funcional a partir de hierro hémico (relleno para galletas) y evaluar su biodisponibilidad en cerdos en etapa de crecimiento, a fin de que sea usado en humanos para el control y prevención de la deficiencia de hierro, con más ventajas que los productos actuales.

## **2.2 Objetivos específicos**

### **2.2.1 Desarrollo del relleno para galletas**

2.2.1.1 Seleccionar los ingredientes y establecer la fórmula del relleno para galletas enriquecido con hierro hémico.

2.2.1.2. Desarrollar el proceso -a escala de laboratorio-, para la elaboración óptima del relleno para galletas sabor chocolate, enriquecido con hierro hémico.

2.2.1.3. Realizar la evaluación química, microbiológica, y de vida útil del producto desarrollado.

2.2.1.4. Elaborar la documentación del desarrollo del proceso.

## **2.2.2 Evaluación de la biodisponibilidad del hierro**

2.2.2.1. Formar aleatoriamente los grupos experimentales de las lechonas.

2.2.2.2. Administrar la suplementación con hierro a cada uno de los grupos de estudio.

2.2.2.3. Evaluar periódicamente y al final, el comportamiento del peso y del perfil férrico hematológico de las cerdas.

2.2.2.4. Evaluar los efectos de la suplementación con hierro, mediante la comparación de los resultados obtenidos en cada grupo experimental.

### **III. Material y Métodos**

### **3.1. Desarrollo del relleno para galletas.**

#### **3.1.1. Concepto**

Se planteó obtener un producto que aporte al menos 2 mg de hierro altamente biodisponible por gramo; además de un porcentaje elevado de proteínas de buena calidad biológica, con alta viscosidad y baja actividad de agua, untable; color, sabor y olor de chocolate; que colocado entre dos galletas y envasado en bolsas de polipropileno, tenga una vida útil de al menos 1 mes, almacenado en condiciones ambientales (temperaturas de 15-40° C). El producto está dirigido para su consumo por los grupos más vulnerables a la deficiencia de hierro (mujeres adolescentes, embarazadas y en periodo de lactancia y niños); aunque, inicialmente, está elaborado para consumo por cerdas en crecimiento en su evaluación preclínica (**Castañedo**, 1998, **Fors**, 1999).

De acuerdo a las características del producto y a que está especialmente preparado para suplementación con hierro, se le considera un producto para regímenes especiales, por lo que deberá atenerse a lo establecido en el **Real Decreto** 2685/1976. Reglamentación técnico sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de preparados alimenticios para regímenes dietéticos y/o especiales y al **Real Decreto** 1124/1982, relativo a la Reglamentación Técnico Sanitaria para la Elaboración, Fabricación, Circulación y Comercio de Galletas.

En el **Real Decreto** 1124, en su inciso 2.2.5 define las galletas tipo “Sándwich” como “el conjunto de dos galletas tradicionales, a las que se adiciona entre ambas

un relleno consistente en una mezcla de azúcar, grasa y otros componentes alimenticios y alimentarios debidamente autorizados”. En este caso, se usa un sustituto de grasa, almidón y jarabe de glucosa para dar una consistencia similar.

### **3.1.2. Formulación e ingredientes del relleno para galletas**

Por diseño de factor a factor (Toledo, 1995), inicialmente se evaluaron varios ingredientes y formulaciones (hidrocoloides, entre ellos); de las que se seleccionó una como básica, que consta de 7 ingredientes: glucosa, azúcar, polvo hémico, Simplese<sup>®</sup>, cacao, almidón y agua (anexos 2 a 8. p. 222-236); a partir de los cuales se realizó el desarrollo de la formulación definitiva.

Se ajustaron las cantidades de los ingredientes básicos, a la vez que se evaluaron algunos aditivos colorantes, hasta conseguir características óptimas del producto. Se buscaron las propiedades de untabilidad y fluencia para que fuera fácil su distribución en toda la superficie de la galleta, pero que no fluyera fuera de la misma y además tuviera alta solubilidad en agua.

Mediante observación directa se controlaron varias características del relleno, para lo cual se estableció una escala arbitraria de 0 a 5. Se midieron las siguientes propiedades:

#### **Olor:**

Se procuró disfrazar el característico olor a sangre, e imprimir el de chocolate.

**Color:**

Se tomó como referencia un producto comercial y se procuró que el color negro que inicialmente aparece por efecto del polvo hémico, se transformara en el marrón oscuro, característico del producto comercial.

**Adherencia:**

Se buscó disminuir la adherencia del producto a superficies de contacto, a fin de mejorar la fluencia y untabilidad.

**Gomosidad:**

Se disminuyó a fin de facilitar el corte. Se observó a través de la introducción de la espátula en un recipiente estándar con el producto.

**Firmeza:**

La meta fue elaborar un producto lo suficientemente firme para soportar la presión ejercida por las dos tapas de galleta en las que se colocaría; pero también que fuera fluyente para su distribución en la superficie de éstas. Se valoró directamente en la galleta.

**Esfuerzo de corte:**

Se procuró que el esfuerzo para cortar el relleno adicionado o no a la galleta, fuera el mínimo. Se observó al aplicar el corte con la espátula.

**Brillantez:**

Principalmente la propicia la glucosa, por lo que ajustándola al mínimo se logró una tonalidad mate del relleno.

**Deshidratación:**

Es el principal problema que limita la vida útil del producto, por lo que la adición de cacao, permitió llegar a un producto que conserva su textura hasta un mes. Se observó directamente.

Se ensayaba la formulación al menos 4 veces y se obtenían los puntajes parciales (por característica), en seguida se promediaban y se daba la calificación a la formulación, la meta consistió en llegar a un valor lo más cercano a 5, que fue el valor máximo posible para una formulación.

### **3.1.3. Factores intrínsecos del producto**

#### ***3.1.3.1. Análisis de composición***

Se realizó análisis químico general, determinación de hierro y análisis químico elemental del producto. Según las técnicas y equipos que a continuación se describen:

#### **Toma de muestras:**

Se tomaron las muestras de galletas, relleno y galletas sándwich según lo indicado en la tabla 11.

#### **Determinación de proteína total**

El contenido proteico de las muestras, se determinó estimando el nitrógeno total por el método de Kjeldahl.

#### **Fundamento:**

La muestra se somete a un tratamiento oxidativo con ácido sulfúrico concentrado en presencia de una mezcla catalizadora. Se forma sulfato amónico del que se libera amoniaco por tratamiento alcalino, que es transportado por la destilación en corriente de vapor a un recipiente con ácido bórico, para en seguida realizar su titulación con una disolución valorada de ácido clorhídrico. El contenido en

proteína de las muestras de relleno y de galletas, se calculó multiplicando la cantidad de nitrógeno obtenida por el factor 6,38 (**Matissek**, 1998).

Producto y cantidad	No. de muestras
<b>Química</b>	
<b>Relleno (45 g)</b>	3
<b>Galleta (45 g)</b>	3
<b>Sándwich (45 g)</b>	3
<b>Absorción atómica</b>	
<b>Relleno (20 g)</b>	5
<b>Galleta (20 g)</b>	5
<b>Sándwich (20 g)</b>	5

**Tabla 11.** Cantidad de muestra de los productos

### **Equipo:**

Se usó la batería de digestión y destilación Kjeldahl marca TECATOR modelo No. 1015. DIGESTOR SYSTEM 20 y KJELTEC SYSTEM 1026 DISTILLING UNIT, respectivamente.

### **Referencia:**

Con base en la técnica 920.105 de la AOAC (**AOAC** 1990).

### **Determinación de grasas**

Se determinaron grasas libres gravimétricamente tras la extracción de la misma por el método Soxhlet.

#### **Fundamento:**

La materia grasa se extrae de la muestra seca (anhidra) con éter dietílico y con éter de petróleo y después se determina gravimétricamente el extracto seco, del que se habrán eliminado los disolventes (**Hart**, 1991).

#### **Equipo:**

Equipo de extracción Soxhlet marca Selecta Precis-Bar.

#### **Referencia:**

Se realiza en base en la técnica 920. 39C de la AOAC (**AOAC** 1990) .

### **Determinación de hidratos de carbono**

El contenido de éstos se obtuvo por diferencia: se suman los otros componentes y el restante hasta llegar a 100, es el valor de hidratos de carbono.

### **Determinación de extracto seco**

Se usó el método de secado en estufa.

#### **Fundamento:**

La muestra se seca directamente en la estufa desecadora a 103° C, hasta obtener pesada constante; se calcula el residuo por diferencia de peso.

#### **Equipo:**

Estufa desecadora Joan PTA 0062.

**Referencia:**

Se realizó con base a la técnica 44-01 de AACC (Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists 2000).

**Determinación de cenizas**

Se realizó por el método de la calcinación en mufla.

**Fundamento:**

La muestra se calcinó totalmente a 650° C en una mufla, hasta obtener peso constante. Los residuos remanentes representan las cenizas.

**Equipo:**

Mufla marca Selecta-Horn.

**Referencia:**

Se realizó de acuerdo con la técnica 08-01 de la AACC (**AACC** 2000)

**Determinación de metales:**

La determinación de Fe, Cu y Zn, se hizo por espectroscopía de absorción atómica (EAA) de llama:

La determinación de Pb se realizó por espectroscopia de absorción atómica en horno de grafito.

**Fundamento:**

Transformar los elementos metálicos presentes en la muestra, a átomos en fase gas y en estado fundamental, de manera que sean capaces de absorber la radiación emitida por una lámpara de cátodo hueco, que emite radiación a la misma longitud de onda a la que absorbe el metal en cuestión.

Las muestras fueron mineralizadas de la siguiente manera:

- a. Caramelos de goma: Digestión con 10 ml de  $\text{HNO}_3$  a vaso abierto.
- b. Galletas: Digestión con 5 ml de  $\text{HNO}_3$  en horno de microondas a una presión de 160 psi.
- c. Relleno: Digestión con 5 ml de  $\text{HNO}_3$  en horno de microondas a una presión de 140 psi.

En la determinación de Fe, la llama utilizada fue de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) – acetileno ( $\text{C}_2\text{H}_2$ )

En la determinación de Cu y Zn la llama utilizada fue de aire – acetileno

**Equipo:**

EAA de llama:

Marca: PERKIN-ELMER

Modelo: 2100

EAA de horno de grafito:

Marca: PERKIN-ELMER

Modelo: 4100ZL

**Análisis químico elemental:**

Microanálisis elemental orgánico.

**Fundamento:**

La determinación del porcentaje de C, N, S e H, es una determinación cromatográfica cuantitativa ordinaria, en la que la detección se hace con un

detector TCD (Thermal Conductivity Detector) que mide la diferencia de conductividad térmica entre los gases de combustión de la muestra en atmósfera de O<sub>2</sub> a 1200°C y un gas de referencia (He).

**Equipo:**

Analizador elemental Marca CARLO ERBA, Modelo EA1108.

**3.1.3.2. Presencia de microorganismos**

Se aplicó un control microbiológico durante el proceso de elaboración y a los productos finales, procurando que cumpliera con lo establecido en las normas microbiológicas aplicables al producto (RD-2685,1976). Los recuentos microbiológicos mínimos establecidos para el producto final, están indicados en la tabla 12.

<b>Microorganismos</b>	<b>RD-2685/1976 Regímenes</b>
<b>Aerobios mesófilos</b>	Máximo 10000 col/g
<b>Mohos y levaduras</b>	Máximo 300 col/g
<b>Enterobacterias totales</b>	Ausencia en 1 g
<b><i>Escherichia coli</i></b>	Ausencia en 1 g
<b><i>Salmonella</i></b>	Ausencia en 30 g
<b>Estafilococos DNAasa positivo</b>	Ausencia en 0,1 g

Tabla 12. Recuentos microbiológicos máximos permitidos.

**Toma de Muestras:**

Las muestras se tomaron asépticamente (ICMSF 1999) de tres productos: galletas, relleno y galletas sándwich, en las cantidades que se indican en la tabla 13.

Muestra	Número de muestras				
	Días				
	Inicial	15	30	45	60
<b>Al ambiente</b>	3	3	3	3	3
Relleno (25 g)	3	3	3	3	3
Galleta (25 g)	3	3	3	3	3
Sándwich(25 g)					
<b>Al vacío</b>					
Relleno (25 g)	3	3	3	3	3
Galleta (25 g).	3	3	3	3	3
Sándwich (25 g)	3	3	3	3	3

**Tabla 13.** Muestras de galletas, relleno y galletas sándwich.

Se almacenaron por los periodos de tiempo que se mencionan y previo a los análisis se pesaron 25 g de cada producto, que se depositaron en bolsas del

homogeneizador (Stomacher. Lab-Blender 400), con 225 ml de agua peptonada y fueron trituradas para su homogeneización durante un minuto aproximadamente.

**Investigación de Mesófilos totales.** (ICMSF, 1998)

En este recuento se estima la flora total sin especificar el tipo de bacterias. Estos microorganismos se catalogan como indicadores de la calidad de los alimentos en general, y nos pueden dar idea del estado de la materia prima utilizada, como han sido manipulados durante su preparación y su vida comercial.

Se utilizó el método de recuento en placa por dilución en masa. El medio de cultivo fue agar nutritivo de recuento en placa (PCA), incubación de las placas durante 48 horas a 30° C.

**Investigación de enterobacterias.** (ICMSF, 1998)

Se consideran microorganismos indicadores y se utilizan como tales para señalar la calidad sanitaria de alimentos procesados. Se suelen usar como índice de contaminación fecal por su frecuencia en heces. Niveles altos indican, elaboración poco higiénica o contaminación posterior a su elaboración, o ambas cosas. Para su investigación se usó agar biliado, cristal violeta y glucosa (VRBG), incubación de las placas durante 24 horas a 37° C.

**Investigación de mohos y levaduras.** (ICMSF, 1998)

La contaminación fúngica en los alimentos no sólo provoca su deterioro, sino que también producen micotoxinas en productos vegetales, que frecuentemente producen intoxicaciones o alergias en la población. Las levaduras, en cambio, sólo tienen significado desde el punto de vista de la alteración. Para la

investigación de mohos y levaduras se usó el medio de cultivo Rosa de Bengala las placas se incubaron durante 5 días a 21° C.

#### **Investigación de *Staphylococcus aureus*. (ICMSF, 1998)**

Su presencia o la de sus toxinas es signo evidente de falta de higiene por deficiente manipulación, al ser muy sensible a la acción de calor y de los desinfectantes. Una característica de esta bacteria es que produce una toxina que permanece en el alimento, siendo más resistente que la misma bacteria y que puede ser causa de intoxicación cuando se ingiere. En su investigación se usó el medio de cultivo Agar Baird Parker RPF (*bioMérieux*), que es un medio para el recuento con confirmación directa de estafilococos coagulasa positivos. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37° C.

#### **Detección de *Salmonella*. (ICMSF, 1998)**

*Salmonella* spp es un género bacteriano, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, integrado por gérmenes de forma bacilar, no esporulados, habitualmente móviles, gram negativos, aerobios-anaerobios facultativos, fermentan la glucosa con producción de gas, no fermentan la lactosa, reducen nitratos a nitritos y son citocromo-oxidasa negativos. Se usó el test Vidas *Salmonella* (SLM) de *bioMérieux*; que es un análisis inmunoenzimático, que permite la detección de antígenos de *Salmonella* por el método ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), mediante el sistema automatizado VIDAS (MiniVidas modelo Vidas 12. *bioMérieux*). Se realizó pre-enriquecimiento en agua peptonada durante 24 horas a 37° C, en seguida enriquecimiento selectivo en medio selenito-cistina y medio Rappaport-Vassiliadis (RV) durante 5 horas a 42° C.

**Recuento de *Escherichia coli*. (ICMSF, 1998)**

Por su especificidad, es considerado como un buen índice de contaminación fecal. Su resistencia fuera del ambiente entérico es poca, por lo que su presencia en los alimentos indica contaminación reciente. Para su detección se usó un medio cromogénico selectivo: Coli ID (*bioMérieux*), que contiene dos sustratos cromogénicos: uno que tiñe las colonias de *E coli* de color rosa y el otro que tiñe de azul las colonias de otros coliformes. Las placas se incubaron 24 horas a 37°C.

En la tabla 14 es posible ver las características más importantes de las técnicas empleadas en la detección y recuentos microbiológicos en las muestras de galletas, relleno y galletas sándwich (**Pascual, 2000; CRTA-Ude LI; 1998**).

Microorganismo	Medio de Cultivo	Muestra g	Esterilización	Sembrado	Incubación	Máximos RD. 2685/1976	Referencia
<b>Mesófilos</b>	PCA.	10-25, en agua peptonada	120°/15"	1 ml. En masa	48 Hrs. 30°	Max.10000 col/g	AF V 08-051
<b>Enterobacterias</b>	VRBG	10-25, en agua peptonada	Doble hervido	1 ml En masa	24 Hrs. 37°	Ausencia en 0,1 g	NF V 08-054
<b>Mohos y Levaduras</b>	Rosa de Bengala	10-25, en agua peptonada	120°/15"	0,1 ml. Superficie	3-5 días 21°	Max. 300 col/g	NF V 08 –059
<b>Estafilococos</b>	Baird Parker	10-25, en agua peptonada	Fundirlo	1 ml en masa	48 Hrs 37°	Ausencia en 0,1 g	ISO/CD 6888-2(1999)
<b>Salmonella</b>	Kit- Vidas	25, en agua peptonada, 24 hrs. 37°	Instructivo	Tubos	Instructivo	Ausencia en 30 g	ISO-6579:1993
<b>E. coli</b>	Coli ID-Medio	10-25	Instructivo	1 ml en masa y a doble capa	24 Hrs. 37°	Ausencia en 1 g	AFNOR. BIO 12/5-01/99

**Tabla 14.** Características de las técnicas microbiológicas.

### **3.1.3.3. Determinación de pH**

Se realizó con el pH-metro 507 (Crison). Previo a las mediciones, se introducían manualmente las lecturas de temperatura a la que se encontraba el relleno en el momento de la medición. Se realizaron tres determinaciones en cada lote de producto.

### **3.1.3.4. Evaluación de consistencia.**

Se realizó con el Texturómetro Universal TA.XT2 (Stable Micro Systems), con la sonda cilíndrica de ebonita de 10 mm de diámetro (P1), a la velocidad de 2 mm por segundo. Se midieron tres lotes del relleno que tenían distintos tiempos de fabricación. Los resultados se reportan de la siguiente manera: fuerza en gramos; tiempo en segundos y distancia en milímetros. Se realizaron ensayos de penetración, con parámetros de fuerza, distancia y tiempo y se observó el esfuerzo de rompimiento de la capa superficial, el esfuerzo de penetración y la adhesividad del producto al extraer la sonda ( **Lewis**, 1993; **Steffe**, 1996; **Costell**, 1997; **Rosenthal**, 2001).

### **3.1.3.5. Estudio del color**

Se midieron tres lotes de relleno de 2, 20 y 45 días; se observó la modificación del color a lo largo del tiempo, se usó el espectrocolorímetro MiniScan XE, marca Hunter Lab; la escala CIELab con luz D65/10°. Las muestras estaban a 21° C (**Calvo**, 1997).

### **3.1.3.6. Medición de la viscosidad**

Se midió en el relleno a través del viscosímetro rotacional Brookfield, de cilindros concéntricos a 60 revoluciones por minuto con *spindle* "F", a la temperatura de 60°C y los resultados se informan en centipoices (cgs). (Lewis 1993a).

### **3.1.3.7. Determinación de actividad del agua**

Se miden los cambios en la conductividad eléctrica de las sales contenidas en el relleno, a través del lector de actividad de agua marca Nova Sina AG, modelo RS 2302, a 21° C. De acuerdo con el método 978.18 de la AOAC (AOAC, 2000; Welti 1997).

## **3.1.4. Factores extrínsecos del producto**

### **3.1.4.1. Temperatura**

La mezcla de ingredientes del relleno se realizó a temperatura ambiente (15-30°C), la conservación posterior del producto, cuando no se utilizó de inmediato, se hizo en refrigeración a 4ª C y después de su adición a galletas y de su envasado en bolsas de polietileno, se realizó a temperatura ambiente.

### **3.1.4.2. Envasado**

Se procuró un envase impermeable al agua (Bureau, 1995), por lo cual se usaron bolsas de polietileno de baja densidad y de calidad alimentaria.

### **3.1.5. Expectativas de vida útil**

En virtud de que se considera que el producto se consumirá muy poco tiempo después de su producción (dos semanas), se estableció un mes como tiempo de vida útil del producto. Se realizaron ensayos de laboratorio para observar si había modificación de algunas características del relleno (consistencia y color). El estudio incluyó la evaluación microbiológica, periódica más arriba enunciada.

### **3.1.6. Expectativas de consumo**

Inicialmente y para efectos del estudio de biodisponibilidad del hierro adicionado al relleno para galletas, se realizó una producción a escala piloto para suplementar con hierro a un grupo de cerdos.

La intención es que este producto sea consumido por los grupos vulnerables más susceptibles de sufrir deficiencia de hierro: mujeres adolescentes, embarazadas, y en periodo de lactancia y niños de 1 a 6 años de edad; en las cantidades que se proponen en la tabla 15, para cubrir aproximadamente la recomendación (Russell, 2002).

<b>Grupo de riesgo</b>	<b>Consumo de galletas. Piezas</b>	<b>Contenido de hierro. mg</b>	<b>Recomendación de consumo diario de hierro. mg/día<sup>1</sup></b>
<b>1-3 años</b>	½	5	7
<b>4-8 años</b>	1	10	10
<b>9-13 años, niñas</b>	½	5	8
<b>14-18 años, mujeres adolescentes</b>	1	10	15
<b>19-50 años, mujeres adultas</b>	1½	15	18
<b>Embarazadas</b>	2 ½	25	27
<b>Lactancia</b>	1	10	9

**Tabla 15.** Recomendación de consumo diario de galletas, por grupos de población.

Cada galleta contiene 10 mg de hierro hémico.<sup>1</sup>(Russell. 2002).

En cuanto a la posibilidad de consumo excesivo del producto, se ha observado toxicidad por sobrecarga en consumos de hierro que van de los 3 a los 10 g, que sería el equivalente a 300 galletas aproximadamente, por lo que es muy difícil que alguien consuma hierro en exceso por este medio.

### **3.1.7. Marco legal**

El desarrollo de productos se realizará tomando en consideración la legislación vigente:

- a) Reglamentación técnico sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de preparados alimenticios para regímenes dietéticos y/o especiales. R. D. 2685/1976.
  
- b) Modificación del R.D. 2685/1976. Reglamentación técnico sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de preparados alimenticios para regímenes dietéticos y/o especiales. R.D. 1809/1991.
  
- c) Reglamentación técnico-sanitaria específica de los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. R:D. 490/1998.
  
- d) Modificación del R.D. 2685/1976. Reglamentación técnico sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de preparados alimenticios para regímenes dietéticos y/o especiales. R. D. 431/1999.
  
- e) Reglamentación técnico sanitaria específica de los alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales. R. D. 1091/2000.
  
- f) Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, fabricación circulación y comercio de galletas. R. D. 1124/1982.
  
- g) Lista positiva de aditivos distintos de los colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. R. D. 142/2002.

- h) Lista positiva de aditivos colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. R. D. 2001/1995.
  
- i) Reglamentación técnico-sanitaria de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción. R.D. 1477/1990.
  
- j) Modificación del R.D. 1477/1990. Reglamentación técnico-sanitaria de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción. R.D. 1320/1992.
  
- k) Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de enero de 1997 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. (CE) nº 258/97.
  
- l) Real Decreto por el que se establece y regula el programa integral coordinado de vigilancia y control de las encefalopatías espongiformes transmisibles de los animales. R.D. 3454/2000.

**3.1.8. Diseño de proceso**

Se establecen las etapas operacionales por las que transcurre la elaboración del relleno (flujograma de proceso), especificando materias primas, equipos y materiales necesarios para su desarrollo, así como los puntos donde hay riesgos de contaminación, de merma o de transformación indeseable del producto (anexos 9 a 12, pp. 241-249). Para este caso se plantearon las siguientes: recepción y almacenamiento de materias primas; peso de ingredientes; mezclado en seco; mezclado en húmedo; dosificación del relleno y formación del sándwich; envasado y documentación del proceso.

### **3.2. Evaluación de la biodisponibilidad del hierro**

Se realizó un ensayo experimental con tres grupos de suplementación cada uno con diferente fuente de hierro (figura 8). Los grupos tuvieron 10 lechonas cada uno:

- a) Hierro hémico. Este grupo recibió galletas sándwich con el relleno sabor chocolate adicionado con hierro hémico.
- b) Lactato ferroso. Se administró en forma de tabletas de caramelo de goma.
- c) Control. Recibió pienso normal adicionado con sulfato ferroso.

Se estableció un sistema de supervisión diaria; quincenalmente se tomó el peso y muestras de sangre venosa para realizar las determinaciones de laboratorio que más abajo se detallan.

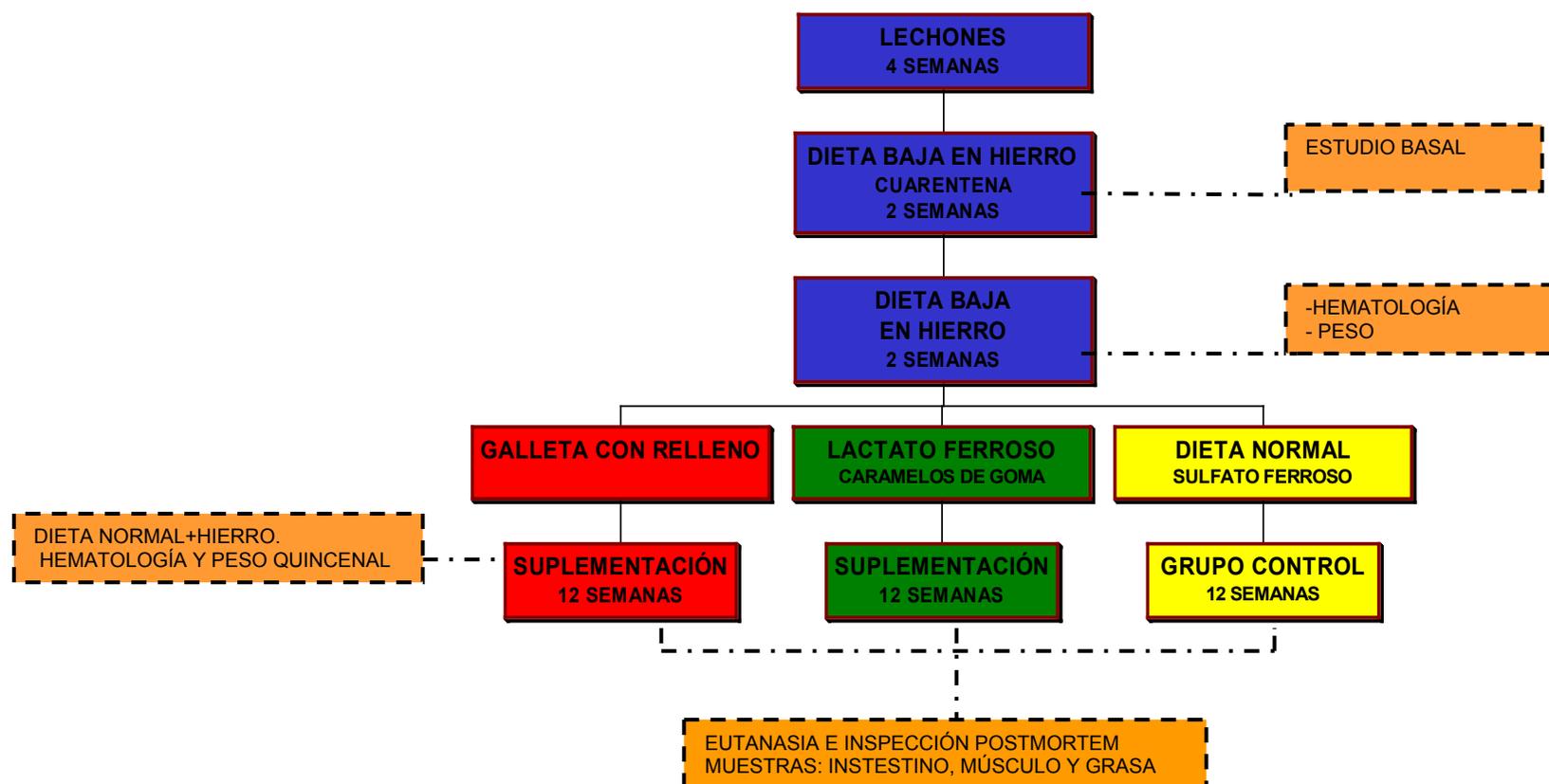


Figura 8. Evaluación de biodisponibilidad de hierro hémico

### **3.2.1. Sustancia evaluada y de referencia**

#### **3.2.1.1. Hierro hémico**

Es un concentrado de hierro hémico natural (1,3% de hierro), obtenido a través de la digestión y separación de la fracción rica en hierro de hemoglobina bovina (anexo1, p. 221). Se describe en el punto 3.1.2.3. de ingredientes, su contenido fue descrito en la tabla 9 (p. 81) y sus características generales se mencionan en el anexo 4 (p. 226).

Este producto se empleó adicionado al relleno de galletas sándwich que se administró a los cerdos. En la tabla 23 (p. 146) del capítulo de resultados se describe ampliamente la composición del relleno; se destaca que tiene 2,6 mg de hierro por gramo, que cuenta con 14,1 g de proteína por cada 100 g de relleno. Se describen además en el mismo capítulo, otras características del relleno: su inocuidad microbiológica y su bajo contenido de metales pesados contaminantes, entre otras.

#### **3.2.1.2. Lactato ferroso**

Es una de las sustancias de referencia; es la sal ferrosa ( $\text{Fe}^{++}$ ) del ácido láctico natural, que es producida por fermentación de azúcar; su nombre comercial es PURAMEX<sup>®</sup> FE, producido por PURAC Biochem, tiene un 20-21% de hierro en forma ferrosa y no más de 0,2% de hierro en forma férrica, su descripción completa se encuentra en el anexo 13 (p. 250).

Se escogió este compuesto, porque según puede verse en la tabla 7 (p. 75), tiene buena biodisponibilidad (106%, tomando como patrón el sulfato ferroso), no

imprime grandes modificaciones organolépticas al vehículo, en cuanto a color, olor o sabor y tiene buena solubilidad, lo que le imprime condiciones tecnológicas adecuadas para su adición a alimentos, por lo que se considera un buen parámetro de comparación para el hierro hémico.

Este producto se administró a los cerdos en forma de tabletas de caramelo de goma, cuya composición química se detalla en la tabla 16.

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

**Tabla 16.** Composición de los caramelos de goma enriquecidos con lactato ferroso (100 g de caramelo).

Como puede observarse, cada gramo de caramelo tiene 2,4 mg de hierro elemental.

### 3.2.1.3. Sulfato ferroso

Es la otra sustancia de referencia; es una sal ferrosa cuyo contenido de hierro elemental es del 20%. Es el estándar de referencia porque de las sales ferrosas, es la más estudiada: Su biodisponibilidad, aunque baja, es aceptable y normalmente se adiciona a los correctores para pienso de cerdos, en este caso la pre-mezcla con que se fabricó el pienso contenía 80 g de sulfato ferroso por tonelada (16 mg de Fe por kg de pienso).

El sulfato ferroso se adicionó directamente al pienso en el lugar de fabricación a razón de 250 g por tonelada, lo que nos da un total de 50 mg de hierro elemental por kilogramo de pienso extra adicionado. En la tabla 17 es posible observar la composición del pienso.

Nutrientes	Cantidad
Energía, kcal	300,0
Proteínas, g	16,5
Grasas, g	5,3
Hidratos de carbono, g	46,8
Hierro, mg	53,7

**Tabla 17.** Composición del pienso normal para cerdos. (100 g de pienso)

#### **3.2.1.4. Dosis y ruta de administración**

La vía de administración para las sustancias a evaluar y la de referencia, fue oral. Los procedimientos seguidos para su control se pueden resumir en los siguientes lineamientos:

- a) Galletas de relleno enriquecido con hierro hémico. Se fracturaban en pequeños trozos y se administraban después de dos horas de suspensión del consumo de pienso, se proporcionaban diariamente por las mañanas.
- b) Tabletas de caramelo enriquecido con lactato ferroso. Después de dos horas de suspensión de la administración del pienso, se suministraron diariamente por las mañanas.
- c) Pienso normal. Se administró según las cantidades estipuladas en la tabla 19. Se les suspendía la administración por dos horas, al igual que a los otros grupos.

En el anexo 14 (p. 111) se detallan los procedimientos seguidos para el control, medición y distribución de piensos a las cerdas de cada grupo de estudio.

La dosis de hierro aportada fue calculada según consumo de pienso, de acuerdo a la edad y peso del animal que se muestra en la tabla 18 (**NRC**, 1998).

Suplementación	Peso en Kg	
	10-20	20-50
Consumo diario de pienso, g	1000	1500
Requerimiento diario de hierro <sup>1</sup> , mg	80	111,3
Hierro en el pienso bajo en hierro, consumo promedio diario, mg	453	679,5
Hierro en el pienso normal, consumo promedio diario, mg	537	805,5
Caramelos, consumo diario (g) / mg de Fe (lactato)	23/55,2	46/110,9
Galletas, consumo diario (piezas) / mg de Fe (hémico)	3/46,8	6/93,6

**Tabla 18.** Suplementación con hierro a cerdos según peso, tipo de pienso y vehículo de administración del hierro. <sup>1</sup> NRC 1998.

### **3.2.2. Sistema experimental**

#### ***3.2.2.1. Justificación de la especie***

Se seleccionó al cerdo como modelo para este estudio, porque es de los animales cuya fisiología en general y a excepción de los primates no humanos, la que más se parece a la del hombre, especialmente la digestiva. Su patrón de crecimiento y maduración es similar al de los niños y los procesos bioquímicos del hierro, son similares a los del humano (NRC, 1998; Pérez, 1999; Swindle, 1994; Calabrese, 1991; Gad, 1992; Pond, 1981).

Por el momento, el uso de animales para predecir biodisponibilidad es el que presenta menos inconvenientes técnicos y reporta mejores resultados. El marcaje con isótopos estables en humanos, se presenta como una alternativa para la medición de la dinámica del mineral en el organismo; sin embargo, presenta numerosos inconvenientes de variabilidad interindividual e interespecie. Otra posibilidad la constituyen los métodos de digestión simulada *in vitro*, que son muy rápidos y de menor coste y permiten el mayor control de algunas variables. Sin embargo, no puedan simular factores fisiológicos como el estado nutricional, secreción gastrointestinal, interacciones con la mucosa, flora intestinal, transporte activo y tránsitos intestinales, entre otros (**Wood**, 2001; **Ibáñez**, 2000; **Fairweather-Tait**, 2001; **Jackson**, 1997).

Con el objeto de encontrar algún procedimiento alternativo validado, que permitiera sustituir la utilización de animales en este estudio, se consultaron varias bases de datos y el resultado fue negativo: no existe método alternativo alguno que tome en consideración los factores dietéticos y fisiológicos que condicionan la biodisponibilidad.

### **3.2.2.2. Número de animales y caracterización del sistema.**

El cálculo de tamaño de muestra para el ensayo se realizó mediante el *software* PC-SIZE CONSULTANT, versiones 1.01 y 2.13 (**Dallal** 1990), a partir de los siguientes datos:

$$\alpha = 0.05$$

Referido a la probabilidad de cometer error tipo I, es decir cuando la hipótesis nula es verdadera y se rechaza (**Doménech**, 2001).

$\beta = 0.20$ . Potencia de la prueba = 80%

Referido a la probabilidad de cometer error tipo II, cuando la hipótesis alternativa es verdadera y se acepta la hipótesis nula. La potencia de la prueba es la probabilidad complementaria  $1-\beta$ , que expresa la probabilidad de aceptar la hipótesis alternativa cuando ésta es verdadera (**Doménech**, 2001).

Desviación típica = 0,65

Se tomaron en consideración las desviaciones típicas de la concentración de hemoglobina (g/dl) informadas por varios autores, para distintas razas de cerdos y para estudios en humanos (**Walter**, 1993; **Monge**, 1996; **Maugenet**, 1997; **Thorn**, 2000; **Underwood**, 1999).

Diferencia = 1,0 g/dl

Se refiere a la cuantía del efecto mínimo que se quiere detectar. Se plantea según criterios conceptuales del investigador (**Doménech**, 2001).

Razón de grupos 1 : 1

Se refiere a que al momento de realizar las comparaciones, cada grupo de estudio tendrá sólo un grupo control y en cada grupo habrá igual número de observaciones para cada variable.

Se realizó el cálculo para comparación de dos medias independientes y se obtuvo el resultado de  $n = 8$  cerdos para cada grupo (figura 8), a los cuales se les sumó el 20%, por las probables pérdidas que pudieran ocurrir, lo que hizo un total de 10 por cada grupo.

Se emplearon cerdos comunes (*Sus scrofa domesticus*), abuela: Landrace, abuelo: Large White y padre: Pietrain Belga; de 4 semanas de edad y un peso promedio de 7 kg., todas hembras, a las que sólo se les administraron al nacimiento 100 mg (en lugar de los 200mg, que es la norma) de hierro dextrano con el objeto de producir una ligera deficiencia de hierro.

### **3.2.2.3. Condiciones de mantenimiento y alimentación**

Las lechonas se alojaron en jaulas individuales a fin de controlar el consumo de pienso. Las jaulas cuentan con espacio suficiente para la movilidad de los animales; condiciones adecuadas para la limpieza regular y eficaz, que propició un nivel higiénico satisfactorio y además se contó con un área específica para almacenamiento de pienso y materiales clínicos. Se siguió un control preciso de ventilación, temperatura, humedad, iluminación y ruidos (Ley 5/1995).

Cada jaula contó con un comedero individual, donde el cerdo dispuso de pienso a voluntad, hasta consumir la cantidad asignada, según se establece en la tabla 18. La jaula contó con sistema automático móvil de bebida de agua (ICLAS, 1996).

#### **3.2.2.4. Procedimientos a realizar con los animales**

##### **Identificación**

Se realizó mediante inyección intraperitoneal de un marcador electrónico.

##### **Aleatorización**

Mediante asignación aleatoria se formaron tres grupos de cerdos que recibieron distintas dietas (figura 8. p. 120).

Grupo No. 1: Dieta con pienso bajo en hierro mas galletas sándwich  
adicionadas con hierro hémico.

Grupo No. 2: Dieta con pienso bajo en hierro mas caramelos adicionados  
con lactato ferroso.

Grupo No. 3: Dieta normal con sulfato ferroso, sin suplementación especial.

##### **Dietas especiales**

Se prepararon 2 distintos tipos de pienso: uno con bajo contenido de hierro y el otro con hierro normal; su aporte de nutrientes puede verse en la tabla 19 y la descripción aportada por el fabricante en el anexo 15 (p. 253).

Aporte	Pienso normal	Pienso bajo en Fe
Energía, kcal	3000	3000
Hidratos de carbono, g	470	470
Proteína, g	160	160
Grasa, g	50	50
Hierro, mg	537	453

Tabla 19. Aporte de nutrientes del pienso para cerdos en crecimiento. (por kg)

### Controles periódicos

Se realizó observación diaria según formatos de supervisión (anexo 16, p.255), se tomó el peso cada quince días, se realizaron oportunamente los tratamientos antiparasitarios y se realizó mensualmente una revisión veterinaria.

### Toma de muestras en vivo

Cada quince días se tomaron muestras de sangre de la vena cava superior (**Morton**, 1993), según la técnica descrita en el anexo 17 (p. 259). Para lo cual previamente se tranquilizó el cerdo con la aplicación de Azaperona (Stresnil®) en las dosis recomendadas por el fabricante (**Esteve Veterinaria**, 1997). Se capturaron 7 ml de sangre de los cuales 3 se vaciaron en un tubo que contenía EDTA, como anticoagulante, para posteriormente realizar las determinaciones de la serie roja y el resto de sangre (4 ml) se vaciaron en un tubo con gel separador de sueros. Las muestras se transportaron en refrigeración de la granja al laboratorio, donde se procesaron de inmediato.

La sangre se dejó coagular, después de reposar 40 minutos a temperatura ambiente y 5 minutos en refrigeración, se centrifugó a 4000 RPM durante 6 minutos, en el suero así obtenido se hicieron las determinaciones de sideremia.

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 usando pentobarbital sódico (**Booth**, 1988; **Close**, 1996; 1997) en la misma granja porcina. Posteriormente se tomaron muestras de hígado (anexo 18, p. 262).

### **3.2.3. Determinaciones de laboratorio**

#### ***3.2.3.1. Concentración de hemoglobina***

Se empleó una modificación del método manual de cianometahemoglobina. La lisis celular es acelerada por un surfactante, seguido de la conversión de hemoglobina en cianometahemoglobina, cuya absorbancia es medida a 546 nm.

Se realizó con el equipo Advia 120 de Bayer (**Bain**, 1995).

#### ***3.2.3.2. Recuento de glóbulo rojos, hematocrito e índices eritrocitarios***

Se realizó también por un método automatizado (Advia 120 de Bayer). En primer lugar, todas las células se hacen esféricas sin modificar su volumen; luego se hacen pasar por dos haces de luz láser que miden dos ángulos: la luz con el ángulo bajo indica el volumen de las células y la luz de ángulo alto señala el índice refractivo; que en el caso de las células rojas, es determinado por la

concentración de hemoglobina. Por lo que se generan mediciones tanto del volumen de las células, como de la concentración de hemoglobina celular. Son derivados entre otros, el Volumen Corpuscular Medio (VCM); a partir de éste y el recuento de eritrocitos se calcula el hematocrito; con el hematocrito calculado y la concentración de hemoglobina, se obtiene la concentración corpuscular media de hemoglobina (CCMH) y también hace el cálculo de la concentración media de hemoglobina (CMH), mediante el recuento eritrocitario y la concentración de Hb (Knoll, 2000).

#### **3.2.3.3. Sideremia**

Estos estudios se realizaron con el Sistema Analizador Químico COBAS MIRA 89, utilizando el kit comercial de ABX: Ferrozine iron A11A00091.

La determinación de hierro sérico se realizó por el método colorimétrico. En un medio ácido y en presencia de guanidina, los iones férricos se liberan de sus uniones proteicas, principalmente del complejo hierro transferrina. Mediante la hidroxilamina, el hierro se reduce a su estado ferroso, para formar un complejo coloreado con la Ferrozine<sup>®</sup> (ABX diagnostics 2000).

#### **3.2.3.4. Determinaciones en hígado**

Se realizó determinación de hierro por espectrofotometría de absorción atómica, según la técnica detallada en el punto 3.1.3.1 (p.101), en el apartado relativo a determinación de metales (hierro). Se usó el mismo fundamento y equipo.

### **3.2.4. Almacén de datos y muestras**

#### ***3.2.4.1. Registro y almacén de datos***

Se realizó un registro de datos del seguimiento de los sistemas de experimentación que incluyó: características en la recepción de animales y materiales de consumo, control de peso, consumo de pienso, aplicación de medicamentos (incluidos los tranquilizantes), observaciones del estado de salud de los animales (Anexo 16, p. 255).

Se registraron valores basales y posteriormente cada 15 días de las determinaciones hematológicas y bioquímicas en los cerdos durante un período de 6 semanas.

Con la información anterior, se construyó una base de datos informatizada en el software Excell.

#### ***3.2.4.2. Almacén de muestras***

Las muestras de sangre y tejidos se almacenaron en congelación a  $-20^{\circ}$  C, y estarán así por un año después de la conclusión del estudio, de acuerdo con la legislación vigente (**Ley 5/1995**).

### **3.2.5. Análisis estadístico**

Se realizó análisis descriptivo y posteriormente inferencial, mediante análisis pareado en los valores iniciales contra finales y análisis de variancia entre los resultados de los tres grupos. Los cálculos se hicieron con el programa estadístico SPSS® versión 10.

### **3.2.6. Control de calidad**

La realización del estudio, se apegó a la buenas practicas de laboratorio, según el Real Decreto 822/1993, relativo a los principios de buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos y normativas derivadas del mismo. (**Ley** 5/1995; **RD** 214/1997).

### **3.2.7. Informes**

Se realizaron informes periódicos semanales y cuando hubo algún hecho extraordinario se informó de inmediato.

Se realizaron informes trimestrales de avances de resultados y un informe final al término del estudio.

## **IV.- Resultados**

## 4.1. Desarrollo del relleno enriquecido con hierro hémico.

### 4.1.1. Formulación

Inicialmente se ensayaron formulaciones que tenían como base hidrocoloides; sin embargo, dado que el relleno debe conservar su cremosidad y textura a condiciones del medio ambiente, el uso de espesante y/o gelificantes en combinación con el polvo hémico, no lo propiciaron; por lo que resultó más conveniente usar algún sustituto de grasa, escogiéndose el Simplese-100, por ser importante fuente de proteínas y por la cremosidad que aporta a los productos que lo contienen en su fórmula. Se partió del listado de ingredientes que se describe en la tabla 20.

<b>Ingredientes</b>
Glucosa
Azúcar
H. hémico
Simplese-100
Cacao desgrasado
Almidón de maíz
Agua

**Tabla 20.** Ingredientes  
del relleno

En la tabla 21 se describen los resultados de las experiencias de laboratorio para 15 formulaciones que se ensayaron. Cada una fue el punto de partida para hacer al menos 4 repeticiones, con la modificación fina de algunos de los ingredientes.

Puede observarse que se inicia la modificación de cantidades de los ingredientes, con la intención de disminuir la pérdida de agua del relleno: se incrementa la cantidad de glucosa; sin embargo, al evaluar la formulación no hubo mejoría (2), por lo que se probó incrementar la cantidad de almidón, lo que provocó una ligera disminución en la calificación final (3); de nuevo se reduce la cantidad de almidón y se aumenta la cantidad de agua, obteniéndose una ligera mejoría en la calificación final de la formulación (4). En seguida se decidió revalorar la importancia de algunos de los ingredientes en el proceso de pérdida de agua a lo largo del tiempo, pero mantenimiento de la textura cremosa: la calificación total, fue similar al quitar Simplese, cacao o almidón; algunas características se potenciaron y otras disminuyeron, lo que hizo que se mantuviera una calificación un poco más alta que la anterior, pero igual entre las tres formulaciones (5, 6 y 7), con la consecuente disparidad en el valor de las características observadas (unas muy bajas y otras bastante altas).

En la formulación 8 se disminuye la cantidad de glucosa, observándose una ligera mejoría en la calificación final. Luego, se incrementa la cantidad de agua y se disminuye ligeramente el Simplese®, aumenta la calificación final, pero la firmeza es muy baja (formulación 9), por lo que en la formulación 10 se incrementa la cantidad de almidón, mejorando la firmeza y la calificación final, pero la brillantez persiste, por lo que se disminuye la cantidad de glucosa y se

incrementa la de azúcar (formulación 11), lo que provoca un ligero aumento de la calificación final, pero la migración del agua a la galleta persiste, provocando la deshidratación del relleno y con ello el pronto endurecimiento.

Se retoma la formulación 10, aumentando la cantidad de hierro hémico y disminuyendo las cantidades de Simplese, cacao y almidón, con lo que se observa una mejoría notable en la calificación final (formulación 12), hay disminución de la migración del agua a la galleta y sobre todo uniformidad en las calificaciones individuales de cada característica del relleno, excepto en olor. Persiste el olor a sangre y el color es demasiado oscuro; por lo que en la formulación 13 se incrementa la cantidad de dióxido de titanio, observándose ligera mejoría en el color, sigue existiendo migración de agua a la galleta y la calificación final no cambia.

<b>N</b>	<b>Glucosa</b>	<b>Azúcar</b>	<b>Hémico</b>	<b>Simplesse</b>	<b>Cacao</b>	<b>Almidón</b>	<b>Aroma</b>	<b>Titanio</b>	<b>Anaranjado</b>	<b>Agua</b>	<b>Calificación</b>
1	15,8	36,5	9,9	5,8	8,8	7,5	2,0	1	0,5	12,2	<b>3,29</b>
2	19,0	33,7	9,1	5,4	8,9	7,8	3,4	1	0,5	11,2	<b>3,25</b>
3	19,0	33,5	9,0	5,4	8,0	10,0	2,2	1,1	0,6	11,1	<b>3,25</b>
4	19,2	36,7	8,8	4,0	6,0	5,8	4,2	0,8	0,5	14,0	<b>3,30</b>
5	18,2	38,7	9,8	0	8,7	8,5	3,6	1,0	0,6	10,9	<b>3,55</b>
6	18,7	39,9	10,1	5,6	0	8,7	3,7	1,0	0,6	11,2	<b>3,55</b>
7	18,7	39,8	10,1	6,0	9,0	0	3,7	1,0	0,6	11,2	<b>3,55</b>
8	17,0	36,2	9,2	5,4	8,1	7,9	3,4	0,9	0,6	11,3	<b>3,75</b>
9	17,4	36,4	8,7	3,4	6,0	5,8	3,7	0,7	0,4	16,6	<b>3,90</b>
10	19,5	34,3	9,3	5,6	8,2	8,0	3,4	0,9	0,6	10,3	<b>4,00</b>
11	14,7	38,5	9,2	5,4	8,1	8,0	3,4	0,9	0,6	11,3	<b>4,13</b>
12	18,0	34,4	16,3	3,8	5,6	5,5	3,9	0,8	0,4	11,4	<b>4,56</b>
13	17,9	34,2	16,2	3,7	5,6	5,5	3,9	1,2	0,4	11,4	<b>4,56</b>
14	16,0	38,0	18,0	5,0	5,0	0	4,5	1,5	0,5	11,5	<b>4,56</b>
15	15,9	39,7	17,9	5,0	5,0	0	4,5	1,5	0,5	10,0	<b>4,78</b>

Tabla 21. Porcentaje de ingredientes en formulaciones del relleno enriquecido con hierro hémico.

En la formulación 14, se incrementa el contenido de azúcar, Simplese<sup>®</sup>, dióxido de titanio, aroma y se retira el almidón, con lo cual la calificación se incrementa, las características son uniformes y se elimina la migración de agua a la galleta; aunque el relleno tiene una ligera falta de firmeza, por lo que se reduce el contenido de agua y se incrementa ligeramente el contenido de azúcar, logrando con ello una mejoría en la calificación final y un producto aceptable que conserva sus características sin modificar sustancialmente las características de las galletas en las que está contenido, durante más de un mes; además, tiene un alto contenido de hierro hémico.

Estas experiencias de laboratorio permiten concretar que la mejor formulación encontrada para el relleno enriquecido con hierro hémico (figura 9), es la mostrada en la tabla 22.

<b>Ingrediente</b>	<b>% de ingrediente</b>
<b>Glucosa</b>	15,9
<b>Azúcar</b>	39,7
<b>Hierro hémico</b>	17,9
<b>Simplese-100</b>	5,0
<b>Cacao desgrasado</b>	5,0
<b>Aroma de chocolate</b>	4,5
<b>Dióxido de titanio</b>	1,5
<b>Anaranjado E-110<sup>1</sup></b>	0,5
<b>Agua</b>	10,0
<b>Total</b>	100

**Tabla 22.** Fórmula del relleno enriquecido con hierro hémico.

<sup>1</sup> Colorante al 20%

#### **4.1.2. Proceso de elaboración**

Como puede observarse en el flujograma de la figura 10, que describe el proceso seguido para la elaboración de este producto, no se necesita la aplicación de calor, e incluso la mezcla de los ingredientes puede hacerse previamente en seco y así mantenerse en almacenamiento, para que cuando se requiera, se mezcle con el agua y el colorante en las proporciones estipuladas en la formulación.



**Figura 9.** Relleno enriquecido con hierro hémico

A continuación se hace una descripción de cada una de las fases del proceso.



Figura 10. Proceso de elaboración del relleno enriquecido

#### **4.1.2.1. Recepción y almacenamiento de materias primas**

A la recepción, las características de las materias primas se cotejaron con las especificaciones establecidas en los anexos 2 al 8 (p. 222-236). Luego fueron almacenadas en un lugar seco y protegido de fauna nociva. El polvo hémico además, fue protegido de la luz.

**4.1.2.2. Peso de ingredientes**

Se realizó con la balanza de precisión marca AND® (modelo GF-300) que tiene una precisión de 0,001g. Los ingredientes se pesaron y se depositaron en recipientes individuales para después hacer la mezcla en la cubeta de la mezcladora (Stephan Máquina Universal. UM 5).

**4.1.2.3. Mezclado en seco**

Después de pesados los ingredientes, fueron vaciados en la cubeta de la Máquina Universal, se mezclaron a 600 revoluciones por minuto durante un minuto, a temperatura ambiente. A esta mezcla se le añadió el agua desionizada, donde previamente se había disuelto el colorante anaranjado, para en seguida proceder al mezclado en húmedo.

**4.1.2.4. Mezclado en húmedo**

Se realizó a 600 revoluciones por minuto durante 3 minutos, a temperatura ambiente, procurando que la paleta de transporte girara uniformemente.

**4.1.2.5. Dosificación del relleno y formación del sándwich**

Se realizó mediante una jeringa de plástico de 100 cc. Previamente se ajustó el volumen del relleno para que la dosis fuera de 6 g. Esta cantidad se administró manualmente a cada galleta, a la que después se le colocó la tapa correspondiente para formar la galleta rellena (sándwich).

**4.1.2.6. Envasado y almacenamiento**

En virtud de que la producción piloto fue un fin muy específico: consumo de cerdos; se envasaron en bolsas de polietileno, procurando adecuar la cantidad de galletas por envase a las dosis estipuladas de 3, 6 y 8 galletas; a su vez estos paquetes fueron envasados en bolsas de polietileno, 10 por bolsa, cantidad suficiente para cubrir las necesidades de un día del grupo de cerdos suplementados con hierro hémico.

Se almacenaron a temperatura ambiente, procurando que no se expusieran a temperaturas superiores a 40° C.

**4.1.2.7. Documentación del proceso**

Para la reproducción del proceso realizado se cuenta con los documentos que a continuación se enlistan:

- a). Especificaciones (anexos 2-8, p. 222- 236).
- b). Establecimiento del proceso (anexo 9, p. 241).
- c). Análisis de peligros y puntos de control críticos (anexo10, p. 245).
- d). Formatos de control del proceso (anexo 11, p. 246).
- e). Costes del producto (anexo 12, p. 249).
- f). Caracterización del producto (tabla 23, p. 146).

### **4.1.3. Caracterización del relleno enriquecido con hierro hémico**

#### ***4.1.3.1. Composición química***

En la tabla 23 se observa la composición química del relleno, galletas sándwich y galletas. Es notorio que el producto, además de un alto contenido de hierro hémico (260 mg en 100 g), tiene también una importante cantidad de proteína (14,1%).

Es factible observar que la totalidad del hierro, es el aportado por el relleno, ya que la galleta no lo contiene. La presencia de cobre no se detectó y el contenido del zinc, es insignificante desde el punto de vista nutricional. El contenido de plomo también es bajo.

Al correlacionar el contenido de proteínas con el contenido de nitrógeno, se observa gran correspondencia.

Composición	Cantidad		
	Relleno	Sándwich	Galletas solas
Energía, kcal	415,3	446,9	480,2
Proteínas, g	14,1	5,8	5,8
Grasas, g	10,9	14,2	19,2
Hidratos de carbono, g	65,2	74,0	71,0
Cenizas, g	5,3	1,5	1,0
Humedad, %	4,6	4,6	3,1
Hierro, mg	260,0	70	0,0
Cobre, mg	0,0	0,0	0,0
Zinc, mg	0,8	0,7	0,5
Plomo, µg	73	35	20
Nitrógeno, %	3,77	1,68	1,74
Carbono, %	40,81	45,24	48,13
Hidrógeno, %	6,40	6,75	7,31
Azufre, %	0,00	0,00	0,00

**Tabla 23.** Composición química del relleno enriquecido con hierro

hémico, de las galletas sándwich y de galletas solas. (100 g de producto).

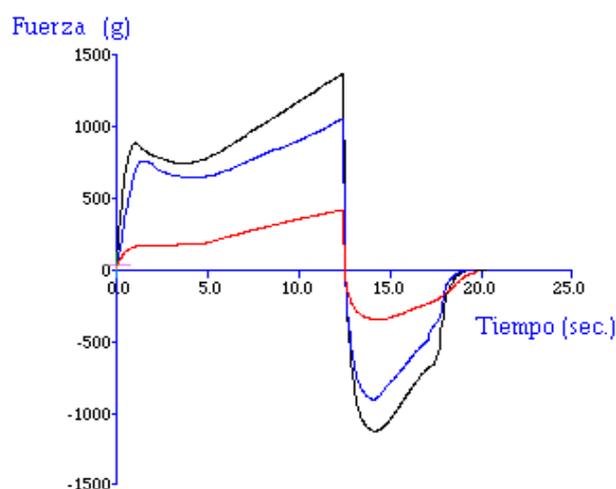
#### 4.1.3.2. Consistencia

Del estudio de textura se obtuvo el gráfico que se presenta en la figura 11, la línea de color rojo corresponde al relleno cuyo tiempo de elaboración era de 48 horas; es factible observar que a partir de que el producto envejece, hay diferencias notables en la fuerza necesaria para romper la capa superficial; para penetrar y para extraer la sonda.

<b>Acción de la sonda</b>	<b>Rompimiento</b>			<b>Penetración</b>			<b>Retorno</b>		
	Fuerza (g)	Tiempo (segundos)	Distancia (mm)	Fuerza (g)	Tiempo (segundos)	Distancia (mm)	Fuerza (g)	Tiempo (segundos)	Distancia (mm)
<b>45 días</b>	894,6 (93,1)	1,1 (0,1)	2,1 (0,1)	1377,4 (67,4)	12,4 (0,1)	24,8 (0,1)	-1125,7 (16,0)	14,1 (0,1)	17,1 (0,6)
<b>20 días</b>	785,6 (84,6)	1,5 (0,3)	2,9 (0,5)	1062,6 (53,5)	12,4 (0,1)	24,8 (0,1)	-907,7 (57,3)	14,1 (0,1)	17,1 (0,8)
<b>2 días</b>	169,9 (7,7)	1,1 (0,1)	2,1 (0,3)	425,5 (10,2)	12,4 (0,1)	24,8 (0,1)	-351,3 (8,7)	14,3 (0,3)	16,1 (1,3)

**Tabla 24.** Medición de consistencia del relleno enriquecido, a través de fuerzas de penetración; en distintos tiempos de almacenamiento.

En la tabla 24 se presentan los datos correspondientes a las fuerzas máximas (picos) aplicados en cada uno de los procesos que realizó la sonda: la fuerza máxima de penetración al rompimiento de la capa superficial del relleno (169,9 g. DT 7,7 g); la fuerza necesaria para la penetración de la sonda (425,5 g. DT 10,2 g); y la fuerza necesaria para romper la adhesividad del producto al retirar la sonda (351,3 g. DT 8,7 g).



**Figura 11.** Medición de textura por penetración del relleno para galleta enriquecido con hierro hémico.

Rojo = 2 días, Azul = 20 días, Negro = 45 días

#### 4.1.3.3. Estudio del color

Se midieron los cambios de color a lo largo del tiempo y se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 25.

Tiempo de almacenamiento	L*	a*	b*
2 días	30,3 (1,7)	5,3 (0,4)	4,2 (0,4)
20 días	28,5 (0,6)	4,3 (0,1)	3,4 (0,1)
45 días	28,2 (0,6)	3,7 (0,1)	2,6 (0,2)

**Tabla 25.** Comportamiento del color del relleno a lo largo del tiempo

de almacenamiento.

L = Brillantez de la muestra. a = tendencia al rojo (+) o al verde (-)

B = Indica la tendencia al amarillo (+) o al azul (-)

Es notorio que a medida que pasa el tiempo, la muestra se oscurece, pasa de 30,3 a 28,2, también es posible notar que al envejecer las muestras pasan del color rojo al verde, pues van de 5,3 a 3,7 y del componente amarillo al azul; ya que su valor, tiene una tendencia de mayor (4,2 hacia 2,6) a menor.

#### 4.1.3.4. p H y actividad del agua

El producto tiene un pH casi neutro (6,8), debido a que los ingredientes usados se acercan a ese valor.

La actividad de agua del relleno fue de 0,4, y de las galletas para hacer el sándwich de 0,7.

#### **4.1.3.5. Estudios microbiológicos**

En la tabla 26 se muestran los promedios de los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos realizados al relleno enriquecido, a las galletas sándwich y a las galletas, envasadas al medio ambiente y al vacío. No se observó ninguna tendencia a lo largo del tiempo de almacenamiento, motivo por el cual los datos se resumieron de esta manera. Es posible observar que la presencia de microorganismos en los productos está muy por debajo de la norma (Real Decreto 2685/1976).

Hubo crecimiento de mesófilos en todas las muestras; aunque, con recuentos bajos; los mohos y levaduras crecieron en las dos muestras de galletas sándwich (las envasadas al vacío y al medio ambiente), también con recuentos bajos; y los estafilococos se observaron en los tres productos, aunque con recuentos relativamente bajos.

<b>Muestras</b>	<b>Mesófilos ufc/g</b>	<b><i>Entero- Bacterias</i> ufc/g</b>	<b>Mohos y levaduras ufc/g</b>	<b>Estafilococos ufc/g</b>	<b>Salmonella ufc/g</b>	<b>E.coli ufc/g</b>
<b>Galletas al medio ambiente</b>	46	<10	<10	-	-	-
<b>Galletas al vacío</b>	35	<10	<10	10	-	-
<b>Sándwich al medio ambiente</b>	10	<10	94	10	-	-
<b>Sándwich al vacío</b>	20	<0	10	10	-	-
<b>Relleno al medio ambiente</b>	13	<10	-	10	-	-
<b>Relleno al vacío</b>	10	<10	-	-	-	-

**Tabla 26.** Promedios de las cuentas de unidades formadoras de colonias de microorganismos del relleno enriquecido, galletas sándwich y galletas.

## 4.2. Evaluación de la biodisponibilidad de hierro hémico

El estudio se inició con 30 lechonas, que se distribuyeron en forma aleatoria en tres grupos; dos de ellos fueron suplementados: uno con hierro hémico y el otro con lactato ferroso; el tercero no recibió suplemento especial; sólo el contenido en el pienso y se utilizó como control.

Característica	Valor	Normal <sup>1</sup>
Edad, semanas	5	-
Peso, kg	7,0 (1,6)	
R. Eritrocitos, 10 <sup>6</sup> /μl	6,2 (0,9)	5-7
Hemoglobina, g/dl	11,5 (1,2)	9-13
Hematocrito, %	32,8 (5,7)	36-43
VCM, fl	53,2 (5,3)	52-62
CMH, pgl	18,8 (2,8)	17-24
CCMH, g/dl	35,6 (4,1)	29-34
Fe Sérico, μ/dl	225,4(95,2)	172±60
R. Leucocitos, 10 <sup>3</sup> /μl	21,0 (5,9)	11-22
R. Plaquetas, 10 <sup>3</sup> /μl	474,6 (173)	200-500
Linfocitos %	52,5 (11,5)	35-75
Monocitos %	3,1 (1,9)	0-10
Neutrófilos %	42,7 (15,5)	20-70
Eosinófilos %	2,1 (1,1)	0-10

Tabla 27. Características hematológicas y generales de las lechonas (promedio y desviación típica, D T).

<sup>1</sup> Aiello, 2000.

En la tabla 27 se presentan algunas características del grupo total estudiado; es posible observar que la variabilidad del peso (desviación típica DT), es importante (23%), 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 normalidad.

Dada la heterogeneidad del grupo, se tuvo mucho cuidado en que la distribución a los grupos fuera aleatoria. En la tabla 28 es posible observar las características de cada uno de los grupos.

Puede notarse que hubo diferencias; sin embargo, éstas no fueron estadísticamente significativas en ningún caso.

Característica	Grupos de estudio <sup>1</sup>		
	Hémico	Lactato	Control
<b>Peso, kg</b>	6,9 (1,7)	7,1 (1,7)	6,9 (1,7)
<b>R. Eritrocitos, 10<sup>6</sup>/μl</b>	6,5 (1,0)	6,1 (1,0)	6,00 (0,5)
<b>Hemoglobina, g/dl</b>	11,5 (1,5)	11,4 (1,2)	11,7 (1,2)
<b>Hematocrito, %</b>	34,1 (7,4)	31,6 (5,7)	32,5 (3,6)
<b>VCM, fl</b>	52,6 (6,7)	52,8 (4,9)	54,3 (1,4)
<b>CMH, pgl</b>	18,0 (3,2)	18,9 (3,0)	19,5 (1,9)
<b>CCMH, g/dl</b>	34,3 (4,9)	36,6 (4,9)	36,0 (2,1)
<b>Fe Sérico, μ/dl</b>	212,7 (110,7)	257,0 (58,6)	238,3 (84,4)
<b>R. Leucocitos, 10<sup>3</sup>/μl</b>	21,5 (6,8)	19,9 (7,4)	21,5 (3,1)
<b>R. Plaquetas, 10<sup>3</sup>/μl</b>	448,2 (230,2)	570,3 (106,3)	408,1 (118,1)
<b>Linfocitos, %</b>	47,7 (12,0)	50,0 (12,1)	60,2 (6,0)
<b>Monocitos, %</b>	3,9 (2,3)	2,5 (1,9)	2,7 (1,3)
<b>Neutrófilos, %</b>	42,1 (18,6)	50,3 (15,5)	35,4 (7,2)
<b>Eosinófilos, %</b>	1,9 (0,8)	1,5 (0,5)	3,1 (0,5)

**Tabla 28.** Peso y características hematológicas de las lechonas, según grupo de estudio (promedio y DT).

<sup>1</sup> Las diferencias no fueron estadísticamente significativas en ningún caso.  $p > 0,05$ .

Del total de cerdas que había al inicio del estudio, 8 fallecieron durante el seguimiento, por lo que el grupo final tuvo 22. En la tabla 29 se observa la distribución de mortalidad por grupo de suplementación, es claro que el grupo con

menor mortalidad, fue el que recibió hierro hémico (10%); en cambio, el grupo control tuvo una mortalidad del 50%.

Grupo de estudio	Sobrevivieron		Murieron	
	No.	%	No.	%
<b>Hémico</b>	9	90	1	10
<b>Lactato ferroso</b>	8	80	2	20
<b>Control</b>	5	50	5	50
<b>Total</b>	22	73	8	27

**Tabla 29.** Porcentaje de mortalidad por grupo de estudio. (para un informe más detallado ver anexo 19. p. 263).

En la tabla 30, es posible observar las características de las cerdas que murieron y las que sobrevivieron a la experiencia.

En la mayoría de las características, las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas, excepto en el porcentaje de neutrófilos y linfocitos; los primeros fueron más bajos en las que murieron y los segundos más altos; sin embargo, el recuento de leucocitos fue similar en los dos grupos.

Característica	Cerdas	
	Sobrevivieron	Murieron
<b>R. Eritrocitos, 10<sup>6</sup>/μl</b>	8,0 (0,6)	8,0 (0,1) <sup>2</sup>
<b>Hemoglobina, g/dl</b>	12,8 (0,8)	13,1 (0,1) <sup>2</sup>
<b>Hematocrito, %</b>	43,5 (2,99)	43,2 (1,1) <sup>2</sup>
<b>VCM, fl</b>	55,9 (6,2)	53,8 (1,8) <sup>2</sup>
<b>CMH, pgl</b>	16,1 (0,9)	16,3 (0,3) <sup>2</sup>
<b>CCMH, g/dl</b>	29,5 (0,8)	30,3 (0,5) <sup>2</sup>
<b>Fe Sérico, μ/dl</b>	131,8 (59,7)	122,9 (7,2) <sup>2</sup>
<b>R. Leucocitos, 10<sup>3</sup>/μl</b>	17,2 (3,9)	15,4 (9,5) <sup>2</sup>
<b>R. Plaquetas, 10<sup>3</sup>/μl</b>	366,7 (116,2)	274,7 (80,8) <sup>2</sup>
<b>Linfocitos, %</b>	56,1 (11,3)	67,0 (4,6) <sup>1</sup>
<b>Monocitos, %</b>	3,5 (1,3)	4,3 (1,5) <sup>2</sup>
<b>Neutrófilos, %</b>	39,4 (11,8)	20,3 (11,5) <sup>1</sup>
<b>Eosinófilos, %</b>	1,3 (0,5)	1,7 (0,6) <sup>2</sup>

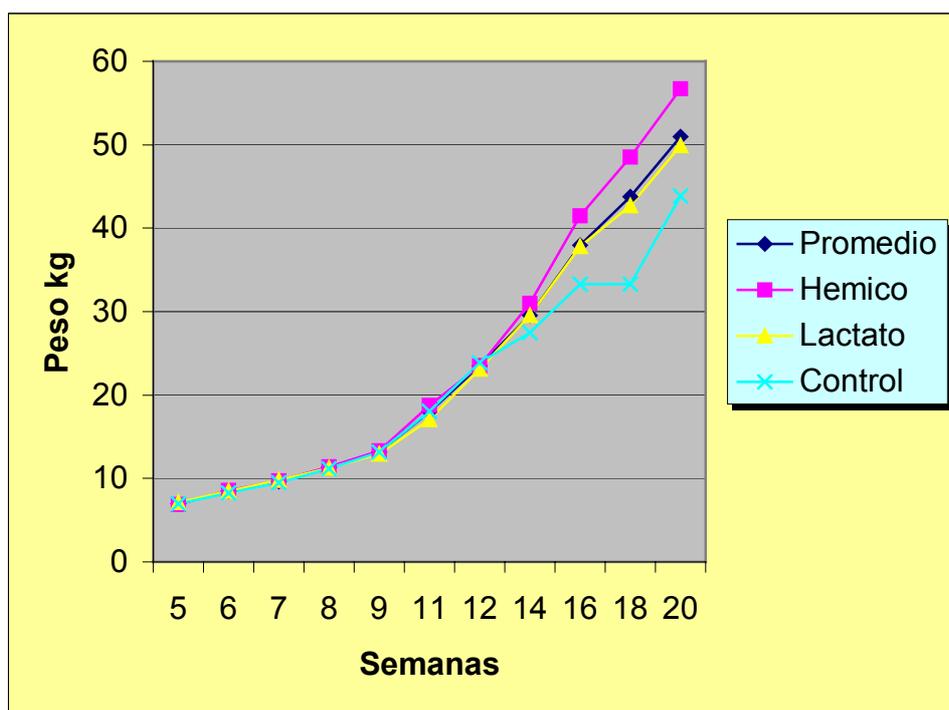
**Tabla 30.** Características hematológicas de las cerdas que permanecieron en el estudio en relación a las que se murieron (promedio y DT).

<sup>1</sup> Las diferencias fueron estadísticamente significativas.  $p < 0,05$ .

<sup>2</sup> Las diferencias no fueron estadísticamente significativas.  $p > 0,05$ .

En la figura 12 se observa el comportamiento del peso promedio para cada uno de los grupos de estudio. Es notoria la diferencia mostrada por el grupo que se

suplementó con hierro hémico; a partir de la semana 8, hay una ligera diferencia con los otros grupos, que se mantiene hasta la semana 13; a partir de la cual se inicia un despegue mayor que se incrementa a medida que pasa el tiempo hasta la semana 20, en la que finaliza el estudio. El grupo que recibió lactato, también presenta un incremento superior en relación al control, pero éste a partir de la semana 13, se hace más notorio a medida que avanza el tiempo, pero se conserva muy cercano a la media, e inferior al observado en el grupo de hémico.



**Figura 12.** Ganancia de peso de las cerdas durante el seguimiento, según grupo de estudio.

Las diferencias absolutas entre los promedios de peso para cada uno de los grupos de estudio, pueden observarse en la tabla 31. Entre el grupo suplementado con hierro hémico y el control, la diferencia al final del estudio fue de 12,8 kg y con el grupo que recibió lactato ferroso fue de 7,0 kg, estas diferencias fueron estadísticamente significativas al igual que las diferencias observadas entre los incrementos de los tres grupos estudiados.

Grupo de estudio <sup>1</sup>	Peso kg		Incremento <sup>2</sup>
	Inicial	Final	
<b>Hémico</b>	6,9 (1,7)	56,7 <sup>1</sup>	49,8
<b>Lactato</b>	7,1 (1,7)	49,9 <sup>1</sup>	42,8
<b>Control</b>	6,9 (1,6)	43,9 <sup>1</sup>	37,0

**Tabla 31.** Incremento de pesos de las cerdas, según grupo de estudio (promedio y DT).

<sup>1</sup> Diferencias estadísticamente significativas.  $p < 0,05$ .

<sup>2</sup> Diferencia estadísticamente significativas del hémico con el control.  $p < 0,05$ .

Con la intención de evaluar la influencia que pudo haber tenido el consumo extra de energía (kilocalorías), aportado por los vehículos de suplementación (galletas y caramelos de goma), se presenta la tabla 32, en donde es factible observar que en promedio, cada cerda del grupo suplementado con hierro hémico, recibió 46.736,8 kilocalorías (a partir de galletas), que si lo convertimos a peso del animal (a razón de 9200 kcal por kg (**Goodwing**, 1975), tendríamos que este consumo

calórico, podría explicar sólo 5,1 kgs del incremento de su peso. Algo similar ocurre con la energía aportada por el caramelo de goma; en promedio cada cerda consumió 13.777,9 kilocalorías que convertidas a peso de la cerda nos dan 1,5kg, valor muy abajo del incremento observado.

<b>Consumo y peso</b>	<b>Hémico (galletas sándwich)</b>	<b>Lactato (caramelos de goma)</b>	<b>Control</b>
<b>Cantidad promedio consumida</b>	10.458,0 g (498 pzas)	4.416 g	0
<b>Energía aportada, kcal</b>	46.736,8 g	13.777,9	0
<b>Conversión a peso de la cerda</b>	5,1 k g	1,5 kg	0
<b>Incremento de peso</b>	49,8 kg	42,8 kg	37,0 kg
<b>Diferencia con el grupo control</b>	12,8 kg	7,0 kg	-

**Tabla 32.** Consumo calórico extra, aportado por el vehículo de la suplementación y su expresión en el peso final de las cerdas.

Con relación al cambio ocurrido durante todo el estudio, en algunas características del grupo total, la tabla 33 muestra que hubo diferencias importantes en algunos de los parámetros hematológicos y el peso.

El recuento de eritrocitos se elevó en un millón y la diferencia fue estadísticamente significativa. La hemoglobina se incrementó en 1,4 g/dl y el hematocrito aumentó 6%, también con diferencias estadísticamente significativas. Hubo reducción en la CMH, CCMH y el hierro sérico (estadísticamente significativa), en este último la diferencia absoluta fue muy alta de 101  $\mu$ g/dl.

Característica	Promedios	
	Inicial	Final
<b>Edad, semanas</b>	6	20
<b>Peso, kg</b>	7,0 (1,5)	51,0 (10,9) <sup>1</sup>
<b>R. Eritrocitos, 10<sup>6</sup>/<math>\mu</math>l</b>	6,3 (1,0)	7,3 (0,7) <sup>1</sup>
<b>Hemoglobina, g/dl</b>	11,6 (1,2)	13 (0,9) <sup>1</sup>
<b>Hematocrito, %</b>	33,4 (5,9)	39,4 (3,3) <sup>1</sup>
<b>VCM, fl</b>	53,5 (5,5)	54,0 (2,7) <sup>2</sup>
<b>CMH, pgl</b>	18,8 (3,0)	17,8 (0,8) <sup>2</sup>
<b>CCMH, g/dl</b>	35,4 (1,4)	33,1 (1,4) <sup>1</sup>
<b>Fe Sérico, <math>\mu</math>/dl</b>	206,6 (96,5)	105,37(29,0) <sup>1</sup>

**Tabla 33.** Características de las cerdas al inicio y al final del estudio (promedio y DT).

<sup>1</sup> Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$ .

<sup>2</sup> Diferencia estadísticamente no significativa  $p > 0,05$ .

Al evaluar el comportamiento de esos indicadores por cada uno de los grupos de estudio, es factible notar que en el grupo suplementado con hierro hémico (tabla 34), fueron estadísticamente significativos los incrementos de peso, el recuento

de eritrocitos, la concentración de Hb y el hematocrito, pero también lo fue el decremento en el hierro sérico. Las diferencias en el resto de los parámetros no fueron estadísticamente significativas.

Característica	Promedios	
	Inicial	Final
<b>Peso, kg</b>	7,1 (1,6)	56,7 (10,8) <sup>1</sup>
<b>R. Eritrocitos, 10<sup>6</sup>/μl</b>	6,5 (1,1)	7,4 (0,6) <sup>1</sup>
<b>Hemoglobina, g/dl</b>	11,5 (1,6)	13,0 (0,8) <sup>1</sup>
<b>Hematocrito, %</b>	34,7 (7,6)	40,7 (3,1) <sup>1</sup>
<b>VCM, fl</b>	53,2 (6,8)	55,2 (2,3) <sup>2</sup>
<b>CMH, pgl</b>	18,1 (3,4)	17,6 (0,9) <sup>2</sup>
<b>CCMH, g/dl</b>	34,0 (5,0)	31,9 (1,1) <sup>2</sup>
<b>Fe Sérico, μ/dl</b>	196,4(106,2)	87,8 (13,7) <sup>1</sup>

**Tabla 34.** Características del grupo suplementado con hierro

hémico, al inicio y al final del estudio (promedio y DT).

<sup>1</sup> Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$ .

<sup>2</sup> Diferencia estadísticamente no significativa  $p > 0,05$ .

En el grupo que recibió lactato ferroso (tabla 35), se observaron diferencias estadísticamente significativas en el incremento de peso (de 7,01 a 49,9 kg) y en la concentración de Hb, en los otros parámetros las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Característica	Promedios	
	Inicial	Final
<b>Peso, kg</b>	7,0 (1,8)	49,9 (6,6) <sup>1</sup>
<b>R. Eritrocitos, 10<sup>6</sup>/μl</b>	6,3 (1,0)	7,2 (0,9) <sup>2</sup>
<b>Hemoglobina, g/dl</b>	11,6 (1,0)	13,1 (1,2) <sup>1</sup>
<b>Hematocrito, %</b>	32,5 (5,4)	38,3 (3,7) <sup>2</sup>
<b>VCM, fl</b>	53,3 (5,1)	53,0 (2,5) <sup>2</sup>
<b>CMH, pgl</b>	18,8 (3,2)	18,1 (0,8) <sup>2</sup>
<b>CCMH, g/dl</b>	36,2 (0,8)	34,2 (0,6) <sup>2</sup>
<b>Fe Sérico, μ/dl</b>	215,5 (63,8)	137,8 (67,4) <sup>2</sup>

**Tabla 35.** Características del grupo suplementado con lactato

ferroso al inicio y al final del estudio (promedio y DT).

<sup>1</sup> Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$ .

<sup>2</sup> Diferencia estadísticamente no significativa  $p > 0,05$ .

En el grupo control (tabla 36), los incrementos de peso, recuento eritrocitario, concentración de Hb y hematocrito, fueron significativos, pero lo fue también el decremento de la concentración corpuscular media de Hb. Las diferencias en los otros parámetros no fueron estadísticamente significativas.

Característica	Promedios	
	Inicial	Final
<b>Peso kg</b>	7,13 (1,2)	43,9 (12,7) <sup>1</sup>
<b>R. Eritrocitos, 10<sup>6</sup>/μl</b>	5,9 (0,5)	7,3 (0,5) <sup>1</sup>
<b>Hemoglobina, g/dl</b>	11,9 (0,8)	13,0 (0,7) <sup>1</sup>
<b>Hematocrito, %</b>	32,4 (1,0)	38,5 (2,7) <sup>1</sup>
<b>VCM, fl</b>	54,8 (3,3)	52,9 (3,4) <sup>2</sup>
<b>CMH, pgl</b>	20,0 (1,7)	17,9 (0,9) <sup>2</sup>
<b>CCMH, g/dl</b>	36,8 (2,0)	33,8 (0,8) <sup>1</sup>
<b>Fe Sérico, μ/dl</b>	230,8(101,7)	141,4 (16,2) <sup>2</sup>

**Tabla 36.** Características del grupo control, al inicio y al final del estudio (promedio y DT).

<sup>1</sup> Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$ .

<sup>2</sup> Diferencia estadísticamente no significativa  $p > 0,05$ .

Para obtener una visión más completa del comportamiento de los parámetros hematológicos por grupo de suplementación, se hace una descripción de cada uno de ellos.

En la tabla 37, es factible observar que el grupo suplementado con hierro hémico tuvo un incremento de 0,9 millones de eritrocitos (diferencia estadísticamente significativa). Incremento similar se observó en el grupo que recibió lactato

ferroso, pero en éste la diferencia no fue estadísticamente significativa. En el grupo control, el incremento observado fue de 1,4 millones de eritrocitos y fue estadísticamente significativo.

Grupo de estudio	Inicial	Final	Diferencia <sup>3</sup>
<b>Hémico</b>	6,5 (1,1)	7,4 (0,6) <sup>1</sup>	0,9
<b>Lactato</b>	6,3 (1,0)	7,2 (0,9) <sup>2</sup>	0,9
<b>Control</b>	5,9 (0,5)	7,3 (0,5) <sup>1</sup>	1,4

**Tabla 37.** Recuento de eritrocitos ( $10^6/\mu\text{l}$ ) inicial y final, por grupo de suplementación (promedio y DT).

<sup>1</sup> Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$ .

<sup>2</sup> Diferencia estadísticamente no significativa  $p > 0,05$ .

<sup>3</sup> Diferencia estadísticamente no significativas del grupo hémico con lactato.  $p > 0,05$ .

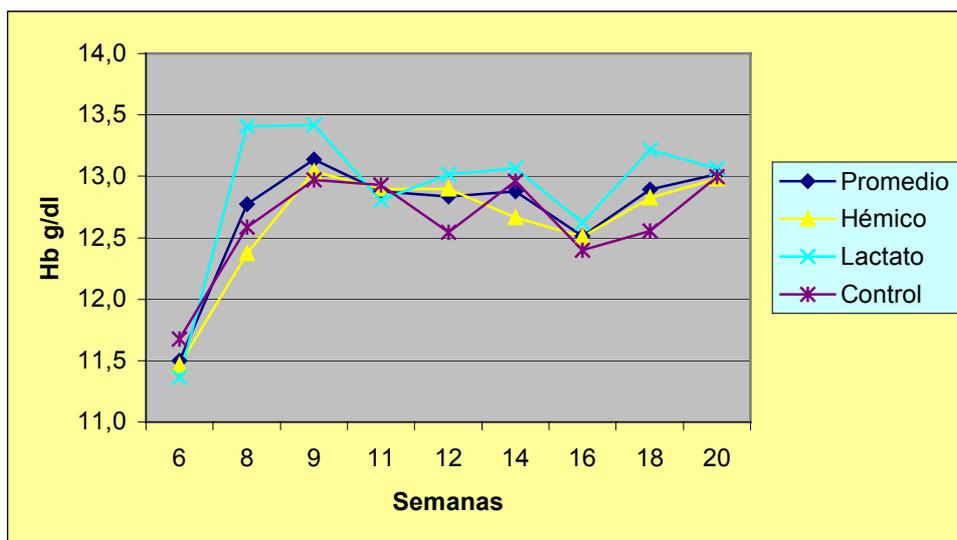
En cambio, en la concentración de hemoglobina (tabla 38), los incrementos presentados en los tres grupos fueron estadísticamente significativos, no así la diferencia entre ellos.

Grupo de estudio	Inicial	Final	Diferencia <sup>2</sup>
<b>Hémico</b>	11,5 (1,6)	13,0 (0,8) <sup>1</sup>	1,5
<b>Lactato</b>	11,6 (1,0)	13,1 (1,2) <sup>1</sup>	1,5
<b>Control</b>	11,9 (0,8)	13,0 (0,7) <sup>1</sup>	1,1

**Tabla 38.** Concentración de hemoglobina (g/dl) inicial y final, según grupo de suplementación (promedio y DT).

<sup>1</sup> Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$ .

<sup>2</sup> Diferencia estadísticamente no significativas.  $p > 0,05$ .



**Figura 13.** Concentración de hemoglobina a lo largo del estudio, según grupo de suplementación.

En la figura 13 es factible observar que la Hb de los tres grupos de estudio, sufre un importante incremento durante las semanas 6 a 9, para luego mantenerse entre los 12,5 y 13,0 g/dl, durante todo el estudio. Es notorio que la concentración de Hb del grupo de lactato presentó una elevación mayor (pico) en la semana 8.

En la tabla 39 es factible observar que el hematocrito de la muestra inicial del grupo suplementado con lactato ferroso mostró un incremento pero no fue estadísticamente significativo. Los incrementos observados en los grupos de hémico y control fueron estadísticamente significativos. Las diferencias entre los incrementos de los tres grupos no fueron estadísticamente significativas.

Grupo de estudio	Inicial	Final	Diferencia <sup>3</sup>
Hémico	34,7 (7,6)	40,7 (3,1) <sup>1</sup>	6,0
Lactato	32,5 (5,4)	38,3 (3,7) <sup>2</sup>	5,8
Control	32,4 (1,03)	38,5 (2,7) <sup>1</sup>	6,1

**Tabla 39.** Hematocrito (%) inicial y final, según grupo de suplementación (promedio y DT).

<sup>1</sup> Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$ .

<sup>2</sup> Diferencia estadísticamente no significativa  $p > 0,05$ .

<sup>3</sup> Diferencia estadísticamente no significativas.  $p > 0,05$ .

El promedio del volumen corpuscular medio de los tres grupos de estudio, mostró algunos cambios de la muestra inicial a la final (tabla 40); pero no fueron estadísticamente significativos; tampoco lo fueron las diferencias entre los tres grupos.

Grupo de estudio	Inicial	Final	Diferencia <sup>2</sup>
Hémico	53,2 (6,8)	55,2 (2,3) <sup>1</sup>	2,0
Lactato	53,3 (5,1)	53,0 (2,5) <sup>1</sup>	-0,3
Control	54,8 (3,3)	52,9 (3,4) <sup>1</sup>	-1,9

**Tabla 40.** Volumen corpuscular medio (fl) inicial y final, según grupo de suplementación (promedio y DT).

<sup>1</sup> Diferencia estadísticamente no significativa  $p > 0,05$ .

<sup>2</sup> Diferencias estadísticamente no significativas.  $p > 0,05$ .

Las diferencias en la concentración media de hemoglobina del inicio al final del estudio (tabla 41), no fueron estadísticamente significativas y las diferencias entre los tres grupos tampoco lo fueron.

Grupo de estudio	Inicial	Final	Diferencia <sup>2</sup>
Hémico	18,1 (3,4)	17,6 (0,9) <sup>1</sup>	-0,5
Lactato	18,8 (3,2)	18,1 (0,8) <sup>1</sup>	-0,6
Control	20,0 (1,7)	17,9 (0,9) <sup>1</sup>	-2,1

**Tabla 41.** Concentración media de hemoglobina (pg/l) inicial y final, según grupo de suplementación (promedio y DT).

<sup>1</sup> Diferencia estadísticamente no significativa  $p > 0,05$ .

<sup>2</sup> Diferencias estadísticamente significativas del grupo hémico con lactato.  $p < 0,05$ .

La concentración corpuscular media de hemoglobina mostró decremento en los tres grupos, pero sólo fue estadísticamente significativa en el grupo control (tabla

42). Las diferencias entre los decrementos de los tres grupos, no fueron estadísticamente significativos.

Grupo de estudio	Inicial	Final	Diferencia <sup>3</sup>
Hémico	34,0 (5,0)	31,9 (1,1) <sup>2</sup>	-2,1
Lactato	36,2 (0,8)	34,2 (0,6) <sup>2</sup>	-2,0
Control	36,8 (2,0)	33,8 (0,8) <sup>1</sup>	-3,0

**Tabla 42.** Concentración corpuscular media de hemoglobina (g/dl)

inicial y final, según grupo de suplementación (promedio y DT).

<sup>1</sup> Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$ .

<sup>2</sup> Diferencia estadísticamente no significativa  $p > 0,05$ .

<sup>3</sup> Diferencias estadísticamente no significativas.  $p > 0,05$ .

En cuanto a la concentración de hierro sérico (tabla 43), hubo un importante decremento de la muestra inicial a la final en el grupo hémico (estadísticamente significativo). En cambio, en el grupo de lactato y control, se observaron decrementos, pero éstos no fueron estadísticamente significativo. Las diferencias entre los decrementos de los tres grupos no fueron estadísticamente significativas.

Grupo de estudio	Inicial	Final	Diferencia <sup>3</sup>
Hémico	196,4 (106,2)	87,8 (13,7) <sup>1</sup>	-108,6
Lactato	215,5 (63,8)	137,8 (67,4) <sup>2</sup>	-77,7
Control	230,8 (101,7)	141,4 (16,2) <sup>2</sup>	-89,4

**Tabla 43.** Concentración de hierro sérico ( $\mu$ /dl) inicial y final, según grupo de suplementación (promedio y DT).

<sup>1</sup> Diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$ .

<sup>2</sup> Diferencia estadísticamente no significativa  $p > 0,05$ .

<sup>3</sup> Diferencia estadísticamente no significativas.  $p > 0,05$ .

En la tabla 44 se presenta el hierro medido en los tejidos y luego calculado para cada uno de los compartimentos del organismo porcino, la suma de ellos y el porcentaje en relación con el total de hierro consumido por cada una de las cerdas durante todo el estudio, de acuerdo al grupo de suplementación al que pertenecen.

Es factible observar que las diferencias fueron significativas entre los tres grupos en lo referente a hierro en sangre, no así en los otros compartimentos. Las diferencias en el porcentaje de absorción fueron significativas entre el grupo de hémico y el control, no así del hémico con el de lactato.

Grupo de estudio	Cantidad de hierro. mg					Porcentaje de Absorción
	Hemoglobina	Hígado	Sangre	Total	Consumido	
	Funcionante	Reservas	Circulante			
Hierro hémico	3.032 (636) <sup>2</sup>	277 (131) <sup>2</sup>	6,2 (1,6) <sup>1</sup>	3.315 (689) <sup>2</sup>	63.980	5,2 (1,0) <sup>3</sup>
Lactato ferroso	2.732 (494) <sup>2</sup>	245 (69) <sup>2</sup>	9,6 (3,6) <sup>1</sup>	2.987 (530) <sup>2</sup>	68.033	4,5 (0,8)
Control	2.498 (723) <sup>2</sup>	287 (45) <sup>2</sup>	6,7 (1,7) <sup>1</sup>	2.792 (754) <sup>2</sup>	69.810	4,0 (1,0)

**Tabla 44.** Cantidad de hierro de los compartimentos y porcentaje de absorción de hierro en relación al consumido.

<sup>1</sup> Diferencias estadísticamente significativas.  $p < 0,05$ .

<sup>2</sup> Diferencias estadísticamente no significativas.  $p > 0,05$ .

<sup>3</sup> Diferencias estadísticamente significativas de el hémico con el control.  $p < 0,05$ .

## **V. Discusión de Resultados**

### **5.1. Desarrollo del relleno enriquecido con hierro hémico.**

Dada la importancia de la carencia de hierro en los humanos, se han implementado múltiples alternativas para remediarla; una de ellas ha sido el enriquecimiento de distintos productos alimenticios (**Uauy**, 2002; **Block** ,1985; **Yip**, 2002b); los resultados han mostrado ser satisfactorios sobre todo en países industrializados, donde se han conjuntado varios factores: **Ramakrishnan y Yip** (2002), mencionan algunos:

- La importancia que han tenido las precisiones legislativas en cuanto al enriquecimiento de harina de trigo y otros productos específicos (pastas para sopa, productos de arroz o maíz).
- La participación de las agencias gubernamentales de salud, educativas o de investigación, en la vigilancia de los avances; el sector industrial y comercial que han propiciado la rápida expansión de la comercialización y el procesamiento de esos alimentos.
- Todo lo anterior combinado con los avances en la tecnología de los alimentos y las ciencias de la nutrición.

**Hurrel** (2002), opina que la principal vía para prevenir la deficiencia de hierro es la fortificación de alimentos con hierro; sin embargo, también menciona que ha habido dos problemas fundamentales para el éxito de la fortificación:

- Encontrar un compuesto ferroso con alta biodisponibilidad y que no imprima cambios en las propiedades sensoriales del vehículo.
- Los factores de la dieta que interfieren con la absorción del hierro de enriquecimiento.

En la tabla 7 (p. 75) se presenta un listado de los productos comúnmente usados para enriquecer, donde es factible observar que los productos que podrían tener mayor biodisponibilidad (tomando como referencia el sulfato ferroso), son: el lactato ferroso (106%); el hierro elemental (reducido) en polvo (13-148%); el NaFe EDTA (28-416%) y el hierro hémico (100-700%).

En este estudio se propuso al hierro hémico como una alternativa viable para enriquecer, porque es el compuesto que puede tener una mayor biodisponibilidad y aunque es complicado disfrazar su color oscuro y su sabor (parecido al de la carne), es factible si se escoge un vehículo que pueda asumir esas características, éste es el caso del relleno para galletas sabor chocolate: es de color marrón oscuro, altamente viscoso (impide la precipitación del hierro) y el sabor y olor fuerte del chocolate disfraza el olor extraño que pudiera conferir el hierro hémico; aunque la complicación tecnológica consiste en sustituir la gran cantidad de grasa que normalmente llevan en su formulación este tipo de productos (**Smith**, 1968; **Yost**, 1995).

Como parte del proceso de desarrollo del relleno para galletas, sabor chocolate y enriquecido con hierro hémico; inicialmente se evaluaron varios hidrocoloides

(agar, almidón, alginatos y gomas guar, garrofín, xantana y gelán), con los que se lograba obtener una viscosidad cercana a la del relleno comercial, pero no fue posible obtener la “cremosidad”, “untabilidad” y “grumosidad”, propias del relleno para galletas. Así que se optó por emplear un sustituto de grasa (Simplese®) y se partió de la fórmula base descrita en la tabla 20 (p. 136), que previamente se había obtenido tras las experiencias con hidrocoloides.

Los resultados mostrados en la tabla 21 (p. 139), dan idea del proceso seguido en la definición de la fórmula final del relleno. Como puede observarse, la metodología seguida fue ensayo-error a partir de 7 ingredientes básicos. Los dos principales problemas encontrados en este desarrollo fueron: otorgar la textura típica al producto, sin usar gran cantidad de grasa y evitar la migración de agua hacia la galleta. El primero se solucionó al usar Simplese® y el segundo al incrementar la cantidad de polvo hémico, lo que permitió disminuir la actividad de agua del relleno y con ello evitar la migración a la galleta, cuya actividad de agua es mayor; con la ventaja de que se incrementó el contenido de hierro hémico y el de proteína. La actividad de agua del relleno se bajó hasta 0,4 para evitar que el agua migrara hacia la galleta (con 0,7 de actividad de agua), esta diferencia propicia una vida útil más larga, ya que se evita la deshidratación precoz del relleno, logrando un producto estable en periodos de tiempo suficientes para el uso que se pretende darle.

En virtud de que se trató de evitar la exposición del hierro hémico al calor; se diseñó un proceso que no lo requiriera (figura 10, p. 142); su elaboración incluye dos fases principales: mezclado en seco y mezclado en húmedo; pudiéndose

realizar la primera y almacenar en seco el producto hasta su posterior uso agregándole agua y colorante, para en seguida continuar con la segunda fase.

El proceso se planteó y probó a escala laboratorio y con métodos manuales, produciendo lotes de 0,5, 2 y 4 kg, con buenos resultados, por lo que valdría la pena realizarlo a escala de planta piloto e industrial.

Un gramo de relleno aporta 2,6 mg de hierro hémico por cada gramo de relleno, por lo que una galleta que contenga 5 gramos del producto, aportará hasta 13 mg de hierro hémico, lo que puede cubrir hasta el 100% de las recomendaciones (**NRC**,2002). El relleno contiene 14,1% de proteína, que al ser de suero de leche y de sangre, seguramente serán de alta calidad biológica (**Erdman** 1990). Contiene además, otros nutrientes en cantidades pequeñas, que podrían tener un interés nutricional.

El estudio de textura mostró que hay modificaciones en la consistencia del relleno, a medida que transcurre el tiempo: tiende a hacerse más viscoso; sin embargo, a los 45 días (que fue el tiempo máximo de almacenamiento estudiado), dentro de la galleta, se conserva en condiciones aceptables para su consumo, lo que indica que soportaría en buenas condiciones el mes de vida útil que se ha pensado para él.

Aunque el estudio de color indicó también un cambio del mismo, a lo largo del tiempo de almacenamiento; éste es mínimo: la pérdida de la tonalidad roja y

amarilla y el oscurecimiento ocurrido a los 45 días de almacenamiento, no lo hacen inaceptable.

La flora microbiana detectada en distintas condiciones de almacenamiento (vacío y medio ambiente) fue mínima y se encuentra muy por abajo de la norma establecida al efecto (**R. D. 2685/1976**), no detectándose la presencia de patógenos como *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli*.

## 5.2. Evaluación de la biodisponibilidad de hierro hémico

Una de las preocupaciones iniciales en un estudio aleatorio, es la distribución de los sujetos de estudio a los grupos experimentales; en este caso lo fue aun más, porque observamos heterogeneidad en el grupo de las lechonas (tabla 27, p. 152). Hubo coeficientes de variación (cv) de 0,61 en monocitos, 0,42 en hierro sérico, 0,36 en plaquetas y neutrófilos. Sin embargo, aún con estas diferencias, los valores se encontraban dentro de los rangos de normalidad (**Aiello**, 2000).

En la distribución aleatoria de las lechonas a los grupos de estudio, se tomaron en cuenta estas diferencias, se usó al peso (cv = 0,23) como la variable referente. El total de cerdas se dividió en dos grupos: grandes y pequeñas (según peso); luego, aleatoriamente se distribuyeron asignando una del grupo de grandes y otra del de pequeñas a cada grupo de estudio, lo que aseguró una distribución uniforme entre los tres grupos (**Silva**, 1993) .

En general, los valores absolutos observados en las características de los tres grupos fueron muy similares y aunque hubo diferencias, éstas no fueron estadísticamente significativas (tabla 28, p. 154). Por lo anterior, es posible asumir que los tres grupos eran similares al inicio del estudio.

La mortalidad fue mayor en el grupo control (50%), a diferencia del grupo que recibió hierro hémico, donde sólo murió una cerda (tabla 29, p. 155) y casi en todos los casos la muerte fue provocada por las secuelas ocasionadas por el Síndrome de Estrés Porcino (**Muirhead**, 2001), lo cual hace pensar en la

existencia de algún factor de protección para este problema en el complejo de hierro hémico, derivado quizá de su potencial para fomentar un mayor crecimiento y desarrollo y una mejor nutrición en general en el ganado porcino (**Perestrelo**, 1998).

Podría existir el riesgo de que las cerdas que murieron tuvieran una característica en común diferente a las que sobrevivieron y que eso pudiera sesgar los resultados; sin embargo, al comparar los valores de las variables de uno y otro grupo (tabla 30, p. 1567), se nota que hay diferencias, pero éstas no son estadísticamente significativas, excepto en las diferencias encontradas en el porcentaje de neutrófilos, que fue más bajo en las que murieron y el porcentaje de linfocitos que fue más alto; situación que es una relación inversa a lo que sucede normalmente en una infección bacteriana (aumento de neutrófilos y disminución de linfocitos), por lo que la mortalidad no se puede asociar a una posible infección (**Calhoun**, 1982), además de que ambos valores están en la normalidad, al igual que el recuento de leucocitos totales, que en caso de una infección pudiera estar elevado. Sin embargo, vale la pena ahondar en el estudio de este comportamiento de los neutrófilos y linfocitos, como respuesta a la situación de estrés provocado probablemente por problemas de manejo.

El grupo suplementado con hierro hémico tuvo importantes diferencias en el peso en relación con los otros dos grupos (12,8 kg para el control y 7,0 kg para el de lactato), con una marcada tendencia a incrementarse a medida que el tiempo transcurrió (figura 12, p. 157). Pudiera pensarse que las calorías extras consumidas con los vehículos de suplementación explican esas diferencias; sin

embargo, al cuantificarlas (tabla 32, p. 159), es claro que para el primer caso sólo explica 5,08 kg de la diferencia de 12,8 kg encontrada. En el caso del grupo de lactato, explica sólo 1,5 de los 6,8 kg; lo que indica que esas diferencias tan notorias no se debieron al vehículo de suplementación, sino que muy posiblemente se deban a la influencia de la suplementación coincidiendo con lo obtenido por otros autores (**Maugenet**, 1997; **Brian**, 1997 y **Underwood**, 2000).

Al observar la evolución de las características de las cerdas a lo largo del estudio (tabla 33, p. 160), es factible ver que entre los resultados iniciales y finales, hubo importantes incrementos en el recuento de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito (estadísticamente significativos), seguramente como efecto de la suplementación recibida. Aunque la CCMH mostró un descenso del 6,4% y es estadísticamente significativo, éste se encuentra dentro de la variabilidad normal del parámetro (**Aiello**, 2000). En el hierro sérico se observó un gran decremento, estadísticamente significativo, motivado quizá, por la edad de las cerdas, ya que el valor es más alto durante las primeras semanas de vida (**Mc Kenzie**, 1991; **Thorn**, 2000). En el caso del peso, las diferencias absolutas son altas y estadísticamente significativas; aunque, en cerdos en condiciones normales (alimentación *ad libitum*), el crecimiento es mayor a las 20 semanas de vida, en unos 10 kg aproximadamente (**Goodwing**, 1975).

Cuando se analiza la evolución de las características hematológicas por grupo de estudio, se observa que en el caso del grupo suplementado con hierro hémico (tabla 34, p. 161) hubo incrementos (estadísticamente significativos) en 3 de los indicadores hematológicos: recuento de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito y

un decremento importante y estadísticamente significativo en hierro sérico. En los tres restantes, las diferencias no fueron estadísticamente significativas; por lo que estos datos, indican que durante el tiempo de suplementación ocurrieron modificaciones considerables en el perfil férrico del hierro: el hierro funcionante a la alza y el circulante a la baja (**Castro**, 1999). El peso mostró un incremento de 49,6 kg (estadísticamente significativo), superior al observado en los otros grupos, y como se mencionaba antes, como efecto de la suplementación con hierro hémico.

En el grupo que recibió lactato ferroso (tabla 35, p. 162), el incremento se observó en la concentración de Hb del 11,4%, en los otros indicadores hematológicos el incremento no fue estadísticamente significativo, lo que nos indica que la modificación del perfil férrico hematológico, se produjo sólo en el hierro funcionante y; aunque las diferencias absolutas en el hierro sérico, con tendencia a la baja, continúan siendo altas, estas no son estadísticamente significativas. El peso también mostró incremento (42,9 kg); aunque no tanto como el del grupo suplementado con hierro hémico.

De las variables hematológicas del grupo control (tabla 36, p. 163), hubo incrementos estadísticamente significativos en el recuento de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito, lo cual de nuevo habla de mejoría en el hierro funcionante; sin embargo, la CCMH, bajó un 8%, explicado, porque el incremento del número de eritrocitos fue mayor (del 20%), que el ocurrido en la concentración de Hb (del 9%); relación que expresa el porcentaje de incremento en el

hematocrito del 16%, lo que habla de un desequilibrio en el perfil férrico hematológico, lo cual no es deseable (**Mc Kenzie**, 1991; **Gimferrer**, 1998).

En el peso, el incremento fue estadísticamente significativo, pero muy inferior al observado en los otros dos grupos, lo que permite suponer que la suplementación con lactato ferroso, pero sobre todo con hierro hémico, tuvo una influencia positiva en el crecimiento de los cerdos con el consecuente resultado en productividad (**Polo**, 1997; **Perestrelo**, 1998).

La tendencia a la baja en el hierro sérico continúa; y aunque, no es estadísticamente significativa, es muy marcada, en este grupo de estudio fue del 38% contra el 36% en el grupo de lactato ferroso y 55% en el grupo de hémico, la baja, se explicaría, como ya se dijo anteriormente, porque en el lechón las concentraciones de hierro sérico son más altas que en el cerdo adulto (**Thorn**, 2000). Las diferencias entre los grupos de estudio que consumieron sales y el que consumió hierro hémico, posiblemente se deban a la diferente velocidad con que cada tipo de hierro es incorporado a la eritropoyesis y a las células (**Castro**, 1999; **Harvey**, 2000; **Kaneko**, 2000).

Al analizar cada uno de los indicadores hematológicos, comparando los tres grupos de suplementación, se detectan algunos datos interesantes: en la tabla 37 (p. 164), es posible observar que en recuento de eritrocitos en el grupo de hémico y lactato se incrementó en 0,9 millones de eritrocitos; mientras que el grupo control lo hizo en 1,4 millones, por tanto la diferencia es sustancial (36%), pero como se anotaba antes, con un incremento de hemoglobina inferior en 26% al

incremento ocurrido en los grupos de lactato y hierro hémico, lo que trae como consecuencia una CCMH baja (**Mc Kenzie**, 1991).

El comportamiento del incremento de Hb fue el característico de la respuesta a la suplementación con hierro en individuos deficientes en hierro (figura 13, p. 166): un fuerte incremento durante las primeras semanas de consumo de hierro (semanas 1 a 3 de suplementación) y después de llegar a concentraciones normales, mantenerse en esos valores (**Gimferrer**, 1998).

Los grupos de hémico y control mostraron incremento similar (de inicio al final) en el hematocrito (tabla 39, p. 167), seguramente como efecto del hierro suplementado, pero las diferencias entre los incrementos ocurridos en cada grupo no fueron estadísticamente significativas, lo que nos habla de un comportamiento similar de los tres grupos, en este parámetro. El volumen corpuscular medio del grupo control, mostró una ligera reducción, que al compararla con lo ocurrido en los otros dos grupos de estudio, no se observan diferencias estadísticamente significativas.

El hierro sérico bajó en los tres grupos, pero este decremento fue superior (y estadísticamente significativo) en el grupo de hierro hémico (tabla 43, p. 170), quizá porque dada su estructura orgánica, la velocidad de incorporación a la eritropoyesis y a las células en general, sea mayor que la de las sales (**Castro**, 1999).

Al estudiar las cantidades de hierro encontrado en los compartimentos (tabla 44, p. 171), se observa que, aunque la cantidad de hierro del compartimento funcionante es mayor en los animales del grupo hémico, la diferencia no fue significativa. La menor cantidad de hierro circulante se encontró en este grupo y si fue significativa, pero al evaluar la cantidad total promedio de hierro encontrada en las cerdas, se observa que es mayor (10% más) en el grupo hémico, aun cuando los consumos de hierro fueron sustancialmente más bajos en este grupo; pero esta diferencia no es estadísticamente significativa; en cambio, las diferencias en el porcentaje de absorción si lo fueron y el hierro hémico mostró ser superior en 23% al grupo control y en un 13% al grupo de lactato. Lo que en resumen podría estar indicando que el hierro hémico se absorbe mejor y se distribuye a los tejidos a una mayor velocidad a diferencia de lo ocurrido con el sulfato ferroso en el grupo control, cuyo porcentaje de absorción es menor y la velocidad de distribución es también aparentemente menor. El lactato ferroso muestra un porcentaje de absorción intermedio, pero la velocidad de distribución a los tejidos es la más baja (**Harvey, 2000; Kaneko, 2000**).

## **VI. Conclusiones**

- 1.- Existe una amplia y clara justificación en la elección del vehículo que se seleccionó para el enriquecimiento con hierro hémico.
- 2.- Es factible transformar y aprovechar las características adversas del hierro hémico (color oscuro y olor a sangre) incorporándolo en una matriz adecuada, como lo es el relleno para galletas.
- 3.- Se desarrolló un proceso sencillo y de bajo costo, para elaboración a escala de laboratorio del relleno para galletas, sabor chocolate, enriquecido con hierro hémico.
- 4.- Se obtuvo un alimento funcional inocuo, de sabor, color y olor aceptables; con alto contenido de hierro (2,6 mg/g) y proteína de alta calidad biológica; cuya vida útil en la galleta sándwich, es de al menos un mes.
- 5.- La mortalidad fue menor en el grupo que se suplementó con hierro hémico comparado con el grupo suplementado con lactato ferroso y con el grupo control.
- 6.- El incremento de peso fue mayor en el grupo suplementado con hierro hémico que en los otros dos grupos y la influencia de las calorías ingeridas en el vehículo de suplementación, explican sólo una mínima parte de las diferencias, por lo que las diferencias en el incremento de peso se pueden atribuir al efecto de la suplementación con hierro.

7.- En los tres grupos de estudio, fue notorio un incremento de los parámetros sanguíneos que informan del hierro funcionante y un decremento en el hierro circulante, este último, más manifiesto en el grupo de hémico.

8.- Hubo una tendencia en los promedios de la cantidad total de hierro detectada en los grupos de estudio; de mayor a menor fue en el siguiente orden: Grupo de hémico, lactato y control, inversa a los promedios de la cantidad total de hierro consumida, que de menor a mayor fue: hémico, lactato y control.

9.- La suplementación con hierro hémico demostró ser mejor en el incremento de peso y en la disminución de la mortalidad.

10.- La biodisponibilidad del hierro hémico fue superior en un 23% a la observada con el sulfato ferroso y mayor a la del lactato ferroso en un 13%.

## **VII. Referencias Bibliográficas**

1. **ABX Diagnostics.** TIBC Ferrozine Iron<sup>®</sup>, Instrucciones del test para los instrumentos MIRA. A11A00095. ABX Diagnostics 2000.
2. **ABX Diagnostics.** Ferrozine Iron<sup>®</sup>. Instrucciones del test para los Instrumentos MIRA. A11A00091. ABX Diagnostic 2000.
3. **Adams PC.** Solid phase inmunoradiometric assay for porcine serum ferritine. Comp Biochem Physiol 1988;(89):355-8.
4. **Aiello SE, Mays A.** Guía de referencias en el manual Merk de veterinaria. 5<sup>a</sup> ed. Barcelona: Doyma; 2000: 2452-6.
5. **Aird B.** Clinical and hematologic manifestations of anemia. In Schalm's Veterinary Hematology. Baltimore: Lippincott, Williams & Wilkins 2000:140-150.
6. **Angulo E, Villuendas J.** Efecto de la sustitución parcial y/o total de la harina de pescado por glóbulos rojos en piensos prestarter a partir de 14 días postdestete y en dietas starter. Departamento de Producción Animal Universidad de Lleida. 1997:1-9.
7. **Anónimo.** Reglamentación técnico sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de preparados alimenticios para regímenes dietéticos y/o especiales. BOE-España. 284, 26-11 1976; R. D. 2685/1976.

8. **Anónimo.** Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, fabricación circulación y comercio de galletas. BOE- España. 133, 4-06 1982; R. D. 1124/1982.
9. **Anónimo.** Reglamentación técnico-sanitaria de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción. BOE- España. 280, 22-11 1990; R.D. 1477/1990:34604.
10. **Anónimo.** Modificación del R.D. 2685/1976. Reglamentación técnico sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de preparados alimenticios para regímenes dietéticos y/o especiales. BOE- España. 308, 13-12 1991; R.D. 1809/1991:41511.
11. **Anónimo.** Modificación del R.D. 1477/1990. Reglamentación técnico-sanitaria de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales de base para su producción. BOE- España. 279, 20-11 1992; R.D. 1320/1992:39385.
12. **Anónimo.** Principios de buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos. BOE- España. 28-20-05 1993; R.D. 822/1993.
13. **Anónimo.** Lista positiva de aditivos colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. BOE- España. 19, 22-01 1995; R. D. 2001/1995:1884.

14. **Anónimo.** Llei de protecció dels animals utilitzats per a experimentació i per altres finalitats científiques. DOGC. 2073, 10-07 1995; Llei 5/ 1995.
15. **Anónimo.** Estrategias de la OPS/OMS para el control de la deficiencia de hierro en la región. OPS/OMS. Washington DC: Oficina Sanitaria Panamericana; 1996.
16. **Anónimo.** Micronutrient interactions: Impact on child health and nutrition. ILSI-OMNI-USAID. Washington DC: ILSI press; 1996. 68p.
17. **Anónimo.** Enriquecimiento de alimentos con nutrientes. Fundamentos de la garantía de calidad. OPS. NutrInfo 1997;(10):1-9.
18. **Anónimo.** Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de enero de 1997 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. Diario Oficial de la Comunidad Europea. nº L 043, 14/02 1997; (CE) nº 258/97:01-07.
19. **Anónimo.** Decret pel qual es regula la utilització d'animals per a experimentació i per a altres finalitats científiques. DOGC. 2450-7-08 1997; D. 214/1997.
20. **Anónimo.** Stresnil. Uso veterinario. Azaperona 40 mg. Prospecto. Barcelona: Laboratorio Dr. Esteve S.A. 1997.
21. **Anónimo.** Métodos normalizados y validados en microbiología de alimentos. Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Lleida, Centro de

referencia en tecnología de alimentos - Biomerieux. Lleida: Biomerieux, S.A.; 1998. 200p.

22. **Anónimo.** Reglamentación técnico-sanitaria específica de los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. BOE- España. 83, 7-4 1998; R.D. 490/1998:11638
23. **Anónimo.** Microbiología de los alimentos. Características de los patógenos microbianos. Zaragoza editorial Acribia, 1998. 606 p.
24. **Anónimo.** Recogida y manipulación de muestras y unidades analíticas en Microorganismos de los alimentos 2. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: principios y aplicaciones específicas. ICMSF. 2ª ed. Zaragoza: Acribia; 1999: 103-10.
25. **Anónimo.** Reglamentación técnico sanitaria específica de los alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales. BOE- España. 139, 9-06 2000; R. D. 1091/2000:20732
26. **Anónimo.** Real Decreto por el que se establece y regula el programa integral coordinado de vigilancia y control de las encefalopatías espongiformes transmisibles de los animales. BOE- España. 307, 23-12 2000; R.D. 3454/2000:45550.

27. **Anónimo**. Modificación del R.D. 2685/1976. Reglamentación técnico sanitaria para la elaboración, circulación y comercio de preparados alimenticios para regímenes dietéticos y/o especiales. BOE- España. 62, 13-03 2002; R. D. 431/1999:10250.
28. **Anónimo**. Lista positiva de aditivos distintos de los colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. BOE- España. 44, 20-02 2002; R. D. 142/2002:6756.
29. **Aranda RP, Llopis GJ**. Minerales en Nutrición y Dietética. Aspectos Sanitarios. La Bisbal, Gerona: Consejo General de Colegios Oficiales de Farmaceúticos, 1993; 1: 204-9.
30. **Aznar GE, González HR, Aching A**. Deficiencia de hierro, su control con la aplicación de un biopreparado hierro-proteína (Trofin). Las Palmas: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria; 1998. 242p.
31. **Bach KK, Jorgensen H**. Use of synthetic amino acids in pig and poultry diets in Recent development in pig nutrition 2. Nottingham: Nottingham University Press; 1993; 9: 106-17.
32. **Bacon BR, Briton RS**. The pathology of hepatic iron overload: a free radical-mediated process? Hepatology 2002;(11):127-31.

33. **Baker R.** Fundamentals of new Food Product Development. Elsevier Science Publishers; 1988.
34. **Barnard ND.** Use of animal studies in predicting human bioavailability. *Am J Clin Nutr* 1989;(3):557-9.
35. **Barret KM, Cullen NA, Kvistad J.** The mechanism of iron absorption. *FSCN* 1999;(5623):1-3.
36. **Barton GP.** Medidas de la calidad de la carne de porcino. Jornadas Científicas SEPORT'91. Consejería de Agricultura. Lorca: Muñoz Luna; 1991:23-33.
37. **Bauman D; et al.** Nutrient Requirements of Swine Subcommittee on Swine Nutrition. National Research Council (EE UU). 10 ed. Washington DC: National Academy Press; 2002.
38. **Beard JL.** Weekly iron intervention: the case for intermittent iron supplementation. *Am J Clin Nutr* 1998;(68):209-12.
39. **Berger J, Aguayo VM, San Miguel JL, Lujan C, Tellez W, Traissac P.** Definition and prevalence of anemia in Bolivian Women of childbearing age living at high altitudes: the effect of iron-folate supplementation. *Nutr Reviews* 1997;(6):247-56.
40. **Beutler E.** How little we know about the absorption of iron. *Am J Clin Nutr* 1997;(66):419-20.

41. **Birgegard G.** Serum Ferritin: physiological and methodological studies. Clin Chim Acta 1980;(103):277-85.
42. **Booth NH, Mc Donald LE.** Anestésicos intravenosos y otros anestésicos parenterales. Farmacología y terapéutica veterinaria. Zaragoza: Editorial Acribia; 1988: 245-50.
43. **Brady PS, Ku PK, Ullrey DE, Miller ER.** Evaluation of an amino acid-iron chelate hematinic for the baby pig. J Anim Sci 1978;(5):1135-40.
44. **Brian K, Anderson MS, Easter RA.** A review of iron nutrition in pigs. Pork on the information superhighway. Porknet. 1997;1-7.
45. **Brune M, Rosander L, Glerup A, Sandberg AS.** Iron absorption from bread in humans: inhibiting effects of cereal fiber, phytate and inositol phosphates with different numbers of phosphate groups. J Nutr 1992;122-42.
46. **Bureau G; Multon JL.** Embalaje de los alimentos de gran consumo. Zaragoza: Acribia; 2002. 198p.
47. **Buron I.García R.** Nuevos productos alimentarios. Madrid: AMV Ediciones; 1990. 13p.

48. **Calabrese JE.** Principles of animal extrapolation. Michigan: Lewis Publishers; 1991. 341p.
49. **Calhhoun ML, Brown EM.** Hematología en enfermedades del cerdo. En Dunne HW, Leman AD. Enfermedades del cerdo. Buenos Aires: Hemisferio Sur; 1982: 37-60.
50. **Calvo JJ, Allue JR, Escudero A, García LJ.** Plasma ferritin of sows during pregnancy and lactation. Cornell Vet 1989;(79):273-82.
51. **Calvo C; Durán L;** Propiedades físicas II. Ópticas y color en Aguilera JM. Temas en tecnología de alimentos. México D.F. IPN 1997:261-288.
52. **Capdevilla J.** Programas de alimentación en lechones. ANAPORC 1995;(145):55-76.
53. **Carruyo VC, Vizcaíno G, Diez EM, Arteaga VM.** Hemoglobin and nutrient concentration in middle-class adolescent. Relationship with school performance. Investigación clínica 1995;(3):117-30.
54. **Castañedo VR.** Algunas notas sobre la evaluación clínica de alimentos para regímenes especiales. Rev Cub Aliment Nutr 1998;(2):120-4.
55. **Castro D.** Preparados antianémicos obtenidos por la tecnología de métodos combinados. Alimentaria 1995;(268):107-10.

56. **Castro del Pozo**. Metabolismo del hierro normal y patológico. 2ª ed. Barcelona: Masson 1999. 139p.
57. **Cámara HM**. Sistemas de futuro en la obtención de alimentos de origen vegetal. Symposium Europeo de Alimentación en el Siglo XXI. Badajoz: Colegio Oficial de Veterinarios de Badajoz; 1999: 25-8.
58. **Claydesdale FM**. Physicochemical determinants of iron bioavailability. Food Technology 1983;(Oct):133-4.
59. **Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Baunvan J, and Coll**. Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación: parte 1. Laboratory animals 1996;(4):293-316.
60. **Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Baunvan J, and Coll J**. Recomendaciones para la eutanasia de animales de experimentación: parte 2. Laboratory animals 1997;(1):1-32.
61. **Conrad ME, Weitraub LR, Sears DA, Crosby WH**. Absorption of haemoglobin iron. Am J Physiol 1966;(211):1123-30.
62. **Conrad ME, Burton IB, Harold LW, Foy AI**. Human absorption of hemoglobin-iron. Gastroenterology 1967;(53):5-10.

63. **Conrad ME, Umbreit JN.** A concise review: Iron absorption- The mucin-mobilferrin-integrin pathway. A competitive pathway for metal absorption. *Am J Hematology* 1993;(42):67-73.
64. **Cook JD.** Adaptation in iron metabolism. *Am J Clin Nutr* 1990;(51):301-8.
65. **Cook JD, Reddy MB.** Efficacy of weekly compared with daily iron supplementation. *Am J Clin Nutr* 1995;(62):117-20.
66. **Cook JD, Reddy MB, Burri J, Juillerat MA, Hurrell RF.** The influence of different cereal grains on iron absorption from infant cereal foods. *Am J Clin Nutr* 1997;(65):964-9.
67. **Costell E, Fiszman SM, Durán L.** Propiedades físicas I. Reología de sólidos y textura. En José Miguel Aguilera, *Temas en Tecnología de Alimentos*. México DF: Instituto Politécnico Nacional; 1997: 215-60.
68. **Craig WJ.** Iron status of vegetarians. *Am J Clin Nutr* 1994;(59 Suppl):1233S-7S.
69. **Cuéllar P.** alimentación no convencional de cerdos, mediante la utilización de recursos disponibles. Cali, Colombia: CIPAV; 2000.
70. **Czanja-Naris DM.** Minerales. En *Nutrición y Dietoterapia de Krause*. 9 ed. México DF: Interamericana; 1998:109-41.

71. **Dallal GE.** PC-SIZE Consultant. A program for sample size determinations. Andover MA: 1990.
72. **Daumas G.** Clasificación de las canales porcinas en la CEE. Consejería de Agricultura Ganadería y Pesca, Región Murcia. Jornadas Científicas SEPORT'91. Lorca: Muñoz Luna; 1991; p. 7-12.
73. **Dávalo A.** Body iron stores and early neurologic deterioraton in acute cerebral infarction. *Neurology* 2000;(54):1568-74.
74. **De Maeyer E.** The Prevalence of Anemia in the World. *World Health Statistics*. OMS; 1988:38-302.
75. **Diasio Rb, LoBuglio AF.** Drugs effective in iron deficiency and other hypochromic anemias. Iron and iron salts . In Alfred Goodman Gilman, *The farmacological basis of the therapeutics*. 9 ed. New York: Mc Graw -Hill Companies; 1996:1321-5.
76. **Diestre A.** Principales problemas de la calidad de la carne en el porcino. Jornadas Científicas SEPORT'91. Consejería de Agricultura Ganadería y Pesca. Región Murcia, Lorca: Muñoz Luna; 1991:13-21.
77. **Doménech MJ.** Fundamentos de diseño y estadística. Comprobación de hipótesis: Pruebas de significación y pruebas de hipótesis. Barcelona Editorial Signo 2001:39.

78. **Duquesne F, Carrillo E, Nuñez VM, Hombre R.** Formulación y caracterización de una crema sucedáneo de queso. *Alimentaria* 2000;(312):61-3.
79. **Elízaga V, Blasco N, Pérez M. Hernández RM. SG.** Elementos traza. En *Tratado de nutrición*. Madrid: Diaz de Santos; 1999: 229-48.
80. **Erdman JW.** The quality of microparticulated protein. *J Am Coll Nutr* 1990;(4):398-409.
81. **Erickson, C.** Heme iron enriched aminoacid and process for the preparation of heme iron enriched aminoacid. Patent USA. 4411915. 1983; p.12
82. **Fairbanks VF, Klee GG. Norbert W Tietz,** Iron metabolism and iron compartments. In *Fundamentals of clinical chemistry*. 3ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1987: 818-24.
83. **Fairweather-Tait SJ.** The concept of bioavailability as it related to iron nutrition. *Nutr Res* 1987;(7):319-25.
84. **Fairweather-Tait SJ.** Bioavailability of trace elements. *Food Chem* 1992;(43):213-7.
85. **Fairweather-Tait SJ.** Bioavailability of nutrients and other bioactive components from dietary supplements: iron. *J Nutr* 2001;(131 Suppl):1383S-6S.

86. **Ferreira R.** ¿El exceso de hierro es un factor de riesgo en el cáncer y en la enfermedad coronaria? Evidencias de los estudios epidemiológicos. Antioxidantes y calidad de vida 2000; (Febrero):1-5.
87. **Figuroa V, Sánchez M.** Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal. Taller Regional Instituto de Investigaciones Porcinas y FAO. Habana Cuba septiembre de 1994. Roma: FAO; 1997: 248-52.
88. **Flores MJA.** Bromatología animal. 3 ed. México DF: LIMUSA; 1975. 895p.
89. **Fors LMM, Peña AD.** Algunas consideraciones generales sobre el desarrollo de la evaluación de productos farmacéuticos y biotecnológicos y equipos médicos en Cuba y el mundo. Revista Cubana Invest Biomed 1999;(2):117-20.
90. **Fox TE, Eagles J, Faiweather-Tait SJ.** Bioavailability of iron glycine as a fortificant in infant foods. Am J Clin Nutr 1998;(67):664-8.
91. **Freire BW.** Strategies of the Pan American Health Organization/World Health Organization for the control of iron deficiency in Latin America. Nutr Reviews 1997;(6):183-8.
92. **FUFOSE.** Scientific concepts of functional foods in Europe. Consensus document. Br J Nutr 1999;(81):1S-27S.

93. **Gad CS; Chengelis CP.** Animals models in toxicology. New York: Marcel Decker Inc; 1992. 764p.
94. **Ganong WF.** Digestión y Absorción en Fisiología Médica. 16 ed. México, D F: El Manual Moderno 1998:533-5.
95. **García MB.** Concepto e importancia de la inspección *post mortem* en Higiene e inspección de carnes. León: Universidad de León; 1991:158-71.
96. **Gimferrer EF. Rodes TJ, Guardia MJ, Trilla GA.** Alteraciones del metabolismo del hierro en Medicina Interna. Barcelona: Masson; 1997: 2898-905.
97. **González G; Fernández J; Rodríguez J.** Comparación de la dosis única semanal de hierro con la dosis diaria, en el tratamiento y prevención de la anemia ferropénica en mujeres adolescentes mexicanas. Tesis doctoral. Barcelona, Universidad Autónoma de Barcelona, 2002.
98. **Gleerup A, Rossander-Hulthen, Elisabeth G, Hallberg L.** Iron absorption from the whole diet: comparison of the effect of two different distributions of daily calcium intake. Am J Clin Nutr 1995;(61):97-104.
99. **Gómez CA, Guerrero GJ, Garrido VA.** Nuevas fuentes de alimentos para la producción animal. II Reunión Científica. Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos. Córdoba: Universidad de Córdoba; 1984:255-63.

100. **González R, Aznar E, Moreira V.** Formulación de un suplemento proteico-mineral (Trofin). Composición y estrategia para su uso. I Congreso Iberoamericano de Nutrición y Salud Pública. Las Palmas: Sociedad Española de Nutrición Comunitaria; 1988:245-7.
101. **Goodwing DH.** Raciones equilibradas en Producción y manejo del cerdo. Zaragoza: Acribia; 1975: 67-76.
102. **Guerra CC.** treatment of hypochromic anemia in the adult with polymaltosed iron hidroyde +++. Gynecology 1984;(8):349-52.
103. **Hallberg L, Hulthen L, Gramatkovsky E.** Iron absorption from the whole diet in men: How effective is the regulation of iron absorption? Am J Clin Nutr 1997;(66):347-56.
104. **Hallberg L, Hulthen L.** Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculating absorption and bioavailability of dietary iron. Am J Clin Nutr 2000;(71):1147-60.
105. **Hallberg L.** Results of survey to assess iron status in Europe. Nutr Reviews 1997;(11):314-22.
106. **Hart FL; Fisher HJ.** Análisis moderno de los alimentos. 2ª reimpresión ed. Zaragoza: Editorial Acribia; 1991.

107. **Harvey JW.** Erythrocyte metabolism. In Schalm's Veterinary Hematology. Baltimore, Lippincott, Williams & Wilkins 2000:125-134.
108. **Hasler CM, Kundrat S, Wool D.** Functional foods and cardiovascular disease. Curr Atheroscler Rep 2000;(6):467-75.
109. **Hasler CM.** The changing face of functional foods. J Am Coll Nutr 2000;(5 Suppl):499S-506S.
110. **Hasler CM.** Functional foods: the western perspectives. Nutr Rev 1996;(11 suppl):32S-7S.
111. **Hercber S, Galan P.** Epidemiología de las anemias nutricionales y políticas de prevención en Nutrición y Salud Pública. Madrid: CEA; 1988: 149-68.
112. **Holland K, Spivak JL.** Hemochromatosis. Hepat Dis 1989;(3):831-7.
113. **Holtz W. Trevor Poole.** Ungulates: Pig and minipigs editors in The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals. 6ª ed. Great Britain: Logman Scientific Technical; 1989: 496-516.
114. **Hunt JR.** Ascorbic Acid: effect on ongoing-iron absorption and status in iron depleted young women. Am J Clin Nutr 1990;(4):649-55.

115. **Hurrell RF.** Prevention iron deficiency through food fortification. *Nutr Reviews* 1997;(6):210-22.
116. **Hurrell RF.** Fortification: overcoming Technical and practical barriers. *J Nutr* 2002;(132):806S-12S.
117. **Ibáñez MV, Rincón F, Martínez B, Acosta A.** Biodisponibilidad mineral. Concepto y factores que influyen. *Alimentaria* 2000;(Mayo):33-7.
118. **Ibáñez MV, Rincón F, Martínez B.** Biodisponibilidad mineral. II métodos propuestos para estimar la biodisponibilidad de un elemento traza en un alimento. *Alimentaria* 2000;(Mayo):39-43.
119. **ICLAS.** Directrices del ICLAS sobre alimentación y formulación de dietas para los animales utilizados en la investigación biomédica. ICLS/CSIC; 1996. 37p.
120. **Intoccia AP, Walkenstein SS, Wittendorf RW, Hoppe RC, Free SM.** Use of anemic piglet to assess bioavailability of iron from oral iron preparations. *J Pharm Sci* 1977;(1):85-8.
121. **Jackson EW.** Guía Profesional de Medicamentos. 2 ed. México DF: El Manual Moderno; 1987. 579p.
122. **Johnson PE.** What can *in vitro* methods tell us about mineral availability? *Biol Trace Element Res* 2000;(19):3-10.

123. **Kaneko JJ.** Hemoglobin synthesis and destruction. In Schalm's Veterinary Hematology. Baltimore, Lippincott, Williams & Wilkins 2000:135-139.
124. **Kats LJ, Nelssen MD, Tokach RD, Goodband RD, Weeden TL, Dritz SS, Hansen JA, Friesen KG.** The effects of spray-dried blood meal on growth performance of the early-weaned pig. *J Anim Sci* 1994;(72):2860-9.
125. **Klipstein GK, Koster JF, Grobbee DE, Lindemas J, Boeing H, Hofman A.** Serum ferritin and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam study. *Am J Clin Nutr* 1999;(69):1231-6.
126. **Knoll JS.** Clinical automated hematology systems. In Schalm's Veterinary Hematology. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins 2000:3-11
127. **Knutson MD, Walter PB, Ames BN, Viteri FE.** Both iron deficiency and daily iron supplements increase lipid peroxidation in rats. *J Nutr* 2000;(130):621-8.
128. **Kuennen M.** Tentative. Product information. Heme iron concentrate. Ames Iowa. Proliant Incorporation. 2000:1-5
129. **Latunde-Dada GO, Pires-Bianchi ML, Dutra-Oliveira JE.** On the methods for studying the mechanisms and bioavailability of iron. *Nutr Reviews* 1998;(3):76-80.

130. **Layrisse M, Chávez JF Méndez CH, Bosh B, Tropper E, Bastardo B, González E.** Early response to the effect of iron fortification in the Venezuelan population. *Am J Clin Nutr* 1996;(64):903-7.
131. **Layrisse M, García CMN.** Strategies for the prevention of iron deficiency through foods in the household. *Nutr Reviews* 1997;(6):233-9.
132. **Layrisse M, García CMN, Solano L, Barón MA, Arguello F, Llovera D.** Iron Bioavailability in humans from breakfasts enriched with iron bis-glycine, phytates and polyphenols. *J ind* 2000;
133. **Lewis MJ.** Reología y textura de los sólidos en propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado. Zaragoza: Editorial Acribia; 1993: 135-67.
134. **Lewis MJ.** Viscosidad en Propiedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado. Zaragoza: Editorial Acribia; 1993: 101-33.
135. **Lindroos P.G.** Heme concentrate and method for the preparation thereof. Patent USA. 4,431,581. 1984:1-9
136. **Linkek C.A.** Diagnóstico Clínico y Tratamiento. México DF: El Manual Moderno; 1992;Anemias. p. 334-5.

137. **Locker AC, Dallman PR, Carroll MD, Gunter EW, Jonson CL.** Prevalence of iron deficiency in the United States. *JAMA* 2002;(12):973-6.
138. **Madrid A.** Aprovechamiento de la sangre de origen animal en Aprovechamiento de los subproductos cárnicos. Madrid: Editorial Mundiprensa; 1999: 46-70.
139. **Maox C.** Effect of Vitamin C supplementations in iron deficiency anemia in chinese children. *Biom Environ Scei* 1992;(2):125-9.
140. **Marranzini M Paesetto AG.** Anorexic and pseudoanorexic child. *Pediatr Med Chir* 1995;6:545-58.
141. **Martorell R.** Forging effective strategies to combat iron deficiency. Panel discussion: regional actions priorities. *J Nutr* 2002;(132):871S-4S.
142. **Matissek R, Schnepel FM, Steiner G.** Proteínas péptidos y aminoácidos en Análisis de los alimentos. Fundamentos métodos y aplicaciones. Zaragoza: Editorial Acribia.; 1998: 89-112.
143. **Maugenet L.** El hierro en el lechón. *ANAPORC* 2002;(169):74-80.
144. **Mártin M, Valladares C, Guerra MA, Castro D, Chang L, Casals C.** Suplemento antianémico líquido a partir de sangre entera. *Alimentaria* 1997;(288):99-101.

145. **Mc Kenzie SB.** Anemia por defectos en la síntesis del hem y las porfirinas en Hematología Clínica. México DF: El Manual Moderno; 1991:114-36.
146. **Miller DD.** An *in vitro* methods for estimation of bioavailability from meals. Am J Clin Nutr 1981;(34):2248-56.
147. **Monge R, Quintana E, Faiges F, Rivero A, Alvarado J, Muñoz L.** Perfil férrico de adolescentes urbanos costarricenses. Rev Cost de Ciencias Médicas 1996;(2):27-33.
148. **Monsen ER.** Iron and absorption: dietary factors which impact iron bioavailability. J Am Diet Ass 1988;(88):786-90.
149. **Moreiras O; Carvajal A; Cabrera L.** Tablas de composición de los alimentos. Madrid: Ediciones Pirámide; 1996.
150. **Morton DB.** Extracción de sangre en los mamíferos y aves de laboratorio. Primer informe del grupo conjunto de trabajo BVA/FRAME/RSPCA/UFAW sobre refinamiento. Laboratory animals 1993;(27):1-22.
151. **Muirhead MR, Alexander TL.** Manejo y tratamiento de enfermedades durante el periodo de gestación. En: Manejo sanitario y tratamiento de las enfermedades del cerdo. Referencias para la granja. Buenos Aires: Intermédica; 2001: 252-3.

152. **Mulvaney TR.** Vegetable products, processed in Helrich K. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 15 ed. Arlington V: AOAC; 1990: 42.
153. **National Research Council (EE UU).** Designing Foods. Animal product options in the marketplace. Washington DC: National Academy Press; 1988.
154. **O'Donnell AM, Carmuega ES, Durán P.** Preventing iron deficiency in infants and preschool children in Argentina. *Nutr Reviews* 1997;(6):189-94.
155. **O'Neil MA, Crosby WH.** Bloking of iron absorption by a preliminary oral dose of iron. *Arch Intern Med* 1987;(147):489-91.
156. **Osahug A BKBB-IaNI, Bugge KH, Bjornes, Borch L, Neslein IL.** Associations between serum ferritin and cardiovascular risk factors in healthy men. A cross sectional study. *European Journal of Clinical Nutrition* 1995;(49):430-8.
157. **Pallares I.** Supplementation of a cereal-milk formula with haem iron palliates the adverse effects of iron deficiency on calcium and magnesium metabolism in rats. *Analss Nutr Metab* 1996;(2):81-90.
158. **Parés D, Carretero C.** La sangre de matadero: subproducto de la industria cárnica. *Cárnica 2000* 1997;(agosto):49-54.

159. **Park J B.** Iron content, sensory evaluation, and consumer acceptance of food cooked in iron utensils. *Journal of Food Quality* 2000;(2):205-15.
160. **Pascal G, Collet RC.** European perspectives on functional foods. *The IPTS Report* 1998;(24):1-8.
161. **Pascual AR, Calderón PV.** Muestreo en Microbiología Alimentaria. 2ª ed. Diaz de Santos; 2000: 1-8.
162. **Perestrelo VR, Perestrelo VH.** La administración de diaminoacidoquelato de hierro en cerdas gestantes mejora el peso de los lechones y la homogeneidad de las camadas al nacimiento. *ANAPORC* 1998;(183):85-8.
163. **Pérez GC; Diez PM; García PP.** Introducción a la experimentación y protección animal. Ponferrada, León: Universidad de León; 1998. 47p.
164. **Polo J, Rodríguez C, Villar JS, Machín P, Pujols J, Esteve E, Torrallardona, D.** Aplicación de hidrolizados enzimáticos de glóbulos rojos en alimentación de lechones durante la transición (24 a 47 días). *ANAPORC* 1997;(167):98-111.
165. **Polo J.** Caracterización del grupo hemo procedente del proceso de fabricación (*Heme-iron Concentrate*). Documento interno. APC-Europe-Proliant 2000; p.1
166. **Pond WG.** Biología del cerdo. Zaragoza: Acribia; 1981. 327p.

167. **Pond WG; Lowrey RS; Maner JH.** Parenteral iron administration to sows during gestation or lactation. New York: Cornell University; 1991.
168. **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.
169. **Revuelta L, Illera JC, Silván G, Illera M.** Parámetros hematológicos de la serie roja durante los periodos prepuberal y puberal en cerdos de la raza Jianxing. *Rev Exp Anim* 1996;(7):1-2.
170. **Rhoades RA, Tanner GA.** Digestión y absorción en *Fisiología Médica*. Barcelona: Masson-Little,Brown; 1997: 655-6.
171. **Robertfroid MB.** Functional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides. *Nutr Rev* 1996;(11):38S-42S.
172. **Robertfroid MB.** Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am J Clin Nutr* 2000;(71 suppl):1660S-4S.
173. **Robinson S, Godfrey KD.** The determinants of iron status in early pregnancy. *Br J Nutr* 1998;(79):249-55.
174. **Russell R.** Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon,

Vanadium, and Zinc. Food and Nutrition Board (FNB); Institute of Medicine (IOM). Panel on micronutrients. Washington DC: National Academy Press; 2002. 393p.

175. **Saguy IS**. Food Product Development, From concept to the Marketplace. New York: Van Nostarnd Reinhold; 1991.
176. **Salve ML, Amich S, Prieto S**. Hierro en Laboratorio clínico. Bioquímica. Madrid: Interamericana-Mc Graw Hill; 1994; 7,. p. 177-92.
177. **Sari M, Bloen MW, Pee S, Schultink WJ, Sastroamidjojo S**. Effect of iron-fortified candies on the iron status of children aged 4-6 y in East Jakarta, Indonesia. Am J Clin Nutr 2001;(6):1034-9.
178. **Schneider BD**. Regulation of mammalian iron homeostasis. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care 2000;(3):267-73.
179. **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.
180. **Sempos CT, Loocher AC, Gullum RF**. Iron and heart disease: the epidemiologic data. Nutr Reviews 1996;(3):73-84.
181. **Sepúlveda AJ; Rivera DJ**. Encuesta Nacional de Nutrición. México DF: Instituto Nacional de Salud Pública; 2000.

182. **Silva AL.** Muestreo simple aleatorio en Muestreo para la investigación en ciencias de la salud. Madrid: Diaz de Santos; 1993: 21-9.
183. **Smith JE, More K, Boyington D, Pollman, DS, Schoneweis D.** Serum ferritin and total iron-binding capacity to estimate iron storage in pigs. *Vet Pathol* 1984;(21):297-300.
184. **Smith WH.** Cream sandwiches by the millions. Cream makeup. *Snack-food* 1968;(10):47-9.
185. **Steffe JF.** Introduction to rheology in *Rheological methods in food process engineering*. 2ª ed. Lansing MI: Freeman Press; 1996: 1-93.
186. **Stoltzfus JR; Dreyfuss ML.** Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anemia. Washington DC: ILCI press; 1998.
187. **Sullivan JL.** Iron and the sex difference in heart disease risk. *Lancet* 1981;(8233):1293-4.
188. **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.

189. **Thomas PR, Earl R.** Enhancing the food supply in Committee Opportunities in the Nutrition and Food Sciences: Research Challenges and the Next Generation of Investigators. Washington DC: National Academy Press; 1994: 108-10.
190. **Thorn CE.** Normal haematology of the pig. In Schalm's Veterinary Hematology. Baltimore, Lippincott, Williams & Wilkins 2000:1089-1095.
191. **Thu BD, Schultink W, Dillon D, Gross R, Leswara DN, Khoi HH.** Effect of daily and weekly micronutrient deficiencies and growth in young Vietnamese children. *Am J Clin Nutr* 1999;(69):80-6.
192. **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.
193. **Topel DG, Christian LI, Ball RA. Dunne Hw, Leman AD.** Síndrome de estrés porcino en Enfermedades del Cerdo. Buenos Aires: Hemisferio Sur; 1982:1-36.
194. **Trowbrige F, Martorell R.** Forging effective strategies to combat iron deficiency. Summary and recommendations. *J Nutr* 2002;(132):875S-9S.
195. **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.

196. **Underwood EJ.** The mineral nutrition of livestock. 3 ed. Oxon UK: CAB International; 1999; 13, Iron. p. 389-90.
197. **Uzel C, Conrad M.** Absorption of heme iron. *Seminars in haematology* 1998;(1):27-34.
198. **Viteri FE, Lindsay A.** The consequences of iron deficiency and anemia in pregnancy in *Nutrient Regulation During Pregnancy, Lactation, and Infant Growth.* New York: Plenum Press; 1994: 127-39.
199. **Viteri FE.** Iron Deficiency, ending Hidden Hunger, Proceeding a Policy Conference of micronutrient malnutrition. WHO, UNICEF, WORLD BANK; 1991.
200. **Viteri FE.** Nutrición materno infantil en países en desarrollo. *Bol Of Sanit Panam* 1985;(6):565-6.
201. **Viteri FE, Liu X, Tolomei K, Martin A.** True absorption and retention of supplemental iron is more efficient when iron is administered every three days rather than daily to iron-normal and iron-deficient rats. *J Nutr* 1995;(1):82-91.
202. **Viteri FE.** Iron deficiency in children: new possibilities for its control. *International Child Health* 1995;(1):49-61.

203. **Viteri FE, Álvarez E, Batres R, Torún B, Pineda O, Mejía.** Fortification of sugar with iron sodium ethylenediaminetetraacetate (FeNaEDTA) improves iron status in semirural Guatemalan populations. *Am J Clin Nutr* 1995;(61):1153-63.
204. **Viteri FE.** Iron supplementation for the control of iron deficiency in populations at risk. *Nutr Reviews* 1997;(6):195-209.
205. **Viteri FE, Mendoza C.** Nuevos enfoques para la prevención y control de la deficiencia de hierro. Suplementación con hierro en los países en desarrollo. *Rev Esp Nutr Com* 1999;(1):7-17.
206. **Vives JL, Aguilar JL.** Métodos diagnósticos de la anemia ferropénica en *Manual de Técnicas de Laboratorio en Hematología*. Barcelona: Masson; 1997:237-48.
207. **Vliet TV.** Clasificación reológica de los alimentos y técnicas instrumentales para su estudio en *Textura de los Alimentos. Medida y Percepción de Rosental*. Zaragoza: Acribia; 2001: 65-98.
208. **Wahlstrom RC, Juhl EW.** A comparison of different methods of iron administration on rate of gain and hemoglobin level of the baby pig. *J Anim Sci* 1960;(19):183-4.
209. **Walter T, Andraca I.** Iron deficiency anaemia: adverse effects on infant psychomotor development. *Pediatrics* 1989;(84):7-17.

210. **Walter T, Dalman PR, Pizarro F, Velozo L, Peña G, Bartholmey SJ, et al.** Effectiveness of iron-fortified infant cereal in prevention of iron deficiency anemia. *Pediatrics* 1993;(5):976-82.
211. **Walter T.** Effect of Bovine-Hemoglobine-Fortified cookies on iron status of schoolchildren: a nationwide program in Chile. *Am J Clin Nutr* 1993;57(190):194
212. **Webster WR, Dimmock CK, O'Rourke PK, Lynch PJ.** Evaluation of oral iron galactan as a method of iron supplementation for intensively housed sucking piglets. *Aust Vet J* 1978;(7):345-8.
213. **Welti ChJ, Vergara BF.** Actividad del agua. Concepto y aplicación en alimentos con alto contenido de humedad en José Miguel Aguilera. *Temas en Tecnología de Alimentos*. México DF: Instituto Politécnico Nacional; 1997: 11-44.
214. **Wheby MS, Suttle GE, Ford KT.** Intestinal absorption of hemoglobin iron. *Gastroenterology* 1970;(58):647-56.
215. **Widhalm K, Stargel WW, Burns TS, Tschanz C.** Evaluation of clinical and biochemical parameters in children after consumption of microparticulated protein fat substitute (Simplese). *J Am Coll Nutr* 1994;(4):392-6.
216. **Wismer-Pederson J.** Utilization of animal blood in meat products. *Food Technol* 1970;(33):76-80.

217. **Wismer-Pederson J.** Use of Hemoglobin in Foods. *Meat science* 1988;(24):35-6.
218. **Wood JR.** Methodological issues in assessing bioavailability of nutrients and other bioactive substances in dietary supplements: summary of workshop discussion. *J Nutr* 2001;(131):1396S-8S.
219. **Wolf N.** Pathology. Basic and Systemic. London: Saunders Company; 1998.
220. **Yip R.** Forging effective strategies to combat iron deficiency. Prevention and control of iron deficiency: policy and strategy issues. *J Nutr* 2002;(132):802S-5S.
221. **Yip R, Ramakrishnan U.** Forging effective strategies to combat iron deficiency. Experiences and Challenges in developing countries. *J Nutr* 2002;(132):827S-30S.
222. **Yost RA.** Quick-setting sandwich bisquit cream fillings. United-States-Patent. US 964314. 1995.