



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**PROGRAMA DE POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y
PRODUCTIVIDAD**

GANADERÍA

DISEÑO DE BOLOS DE LENTA LIBERACIÓN CON MINERALES TRAZA PARA RUMIANTES

MISAELEÓN CRUZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019


CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Misael León Cruz, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Diseño de bolos de lenta liberación con minerales traza para rumiantes

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 26 de abril de 2019


Firma del
Alumno (a)

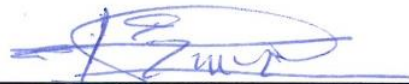

Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: "**Diseño de bolos de lenta liberación con minerales traza para rumiantes**" realizada por el alumno: **Misael León Cruz** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca

ASESOR (A)



Dra. Leonor Miranda Jiménez

ASESOR (A)



Dra. Raquel López Arellano

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Abril del 2019

DISEÑO DE BOLOS DE LENTA LIBERACIÓN CON MINERALES TRAZA PARA RUMIANTES

Misael León Cruz, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2019

RESUMEN

El objetivo del estudio fue formular y diseñar bolos intrarruminales de lenta liberación con cobre, zinc, cobalto y selenio para cubrir sus deficiencias en rumiantes. El estudio se planteó en dos etapas, en la primera se diseñaron 3 tipos de bolos por el método de granulación por fusión los cuales consistieron en: T1: 20% cutina + 10% fosfato de calcio + 0% Fe; T2: 30% cutina + 0% fosfato de calcio + 0% Fe y T3: 20% cutina + 5% fosfato de calcio + 5% Fe. El contenido de cobre, zinc, cobalto y selenio fue el mismo para todos los bolos. Posteriormente los bolos se evaluaron con el procedimiento de fermentación *in vitro* en condiciones de pH a 6.5, temperatura de 39.5 °C y movimiento constante en el digestor Daisy Ankom. Se utilizaron 3 bolos por tratamiento con media de peso inicial de 32.174 g, cada bolo se sumergió aleatoriamente en 100 mL de solución amortiguadora por 7 días. Las variables evaluadas fueron erosión diaria y final de los bolos, liberación teórica del cobre, zinc, cobalto y selenio y la tasa de liberación. En la segunda etapa se elaboraron 36 bolos a base de pentóxido de fósforo por el método de fusión. De acuerdo a la masa de los bolos se formaron 4 grupos, con media de masa inicial de 2.187, 4.473, 6.86 y 14.721 g. Posteriormente los bolos fueron distribuidos aleatoriamente en 2 frascos con 1250 mL de solución amortiguadora para su evaluación en fermentación *in vitro* por 56 días. Los resultados mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$) entre la erosión diaria y final de los tratamientos, el T3 tuvo mayor erosión ($0.129 \text{ g bolo}^{-1} \text{ día}^{-1}$ y $0.902 \text{ g bolo}^{-1}$). La liberación teórica de cobre, zinc, cobalto y selenio también fue mayor ($P < 0.05$) para

T3 vs. T1, obteniendo liberaciones de 13.931 mg de Cu, 41.793 mg de Zn, 0.141 mg de Co y 0.773 mg Se día⁻¹ bolo⁻¹. De manera similar, los bolos de T3 presentaron la mejor tasa de liberación (3.678 mg cm² día⁻¹). En la segunda etapa los modelos para la disolución de los bolos en efecto tiempo dentro de la solución amortiguadora fueron: G1: Peso (g) = 1/(0.45679 + 0.11631 (x) 0.22501) (R² = 0.97); G2: Peso (g) = 1/(0.22285 + 0.04252 (x) 0.28596) (R² = 0.95); G3: Peso (g) = 1/(0.14497+ 0.02147 (x) 0.34713) (R² = 0.95); G4: Peso (g) = 1/(0.06791+ 0.01689 (x) 0.12493) (R² = 0.98). Nosotros concluimos que las formulaciones elaboradas en la primera etapa resultaron adecuadas para la fabricación de bolos de lenta liberación con los minerales traza. Sin embargo, en la segunda etapa se recomienda modificar la matriz de liberación, para mantener erosión controlada y constante en los bolos.

Palabras clave: Suplemento con bolos, deficiencia de minerales, cinética de liberación.

DESIGN OF SLOW RELEASE BOLUSES WITH TRACE MINERALS FOR RUMINANTS

Misael León Cruz, M. en C.
Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

The objective of the study was to formulate and design slow release intraruminal boluses with copper, zinc, cobalt and selenium to cover their deficiencies in ruminants. The study was proposed in two stages, in the first three types of boluses were designed by the method of fusion granulation which consisted of: T1: 20% cutin + 10% calcium phosphate + 0% Fe; T2: 30% cutin + 0% calcium phosphate + 0% Fe and T3: 20% cutin + 5% calcium phosphate + 5% Fe. The content of copper, zinc, cobalt and selenium was the same for all boluses. The boluses were evaluated with the *in vitro* fermentation procedure under conditions of pH 6.5, temperature of 39.5 ° C and constant movement in the Daisy Ankom digester. 3 boluses were used per treatment with mean of the initial weight of 32,174 g, each bolus was randomly immersed in 100 mL of buffer for 7 days. The evaluated variables were daily and final erosion of the boluses, theoretical release of copper, zinc, cobalt and selenium and the release rate. In the second stage, 36 boluses based on phosphorus pentoxide were prepared by the fusion method. According to the mass of the boluses, 4 groups were formed, with an mean initial mass of 2,187, 4,473, 6,86 and 14,721 g. Subsequently, boluses were randomly distributed in 2 bottles with 1250 mL of buffer for evaluation *in vitro* fermentation for 56 days. The results showed significant difference ($P < 0.05$) between the daily erosion and final treatment, the T3 had greater erosion ($0.129 \text{ g bolus}^{-1} \text{ day}^{-1}$ and $0.902 \text{ g bolus}^{-1}$). The theoretical release of copper, zinc, cobalt and selenium was also higher ($P < 0.05$) for T3 vs. T1, obtaining releases of

13,931 mg of Cu, 41,793 mg of Zn, 0.141 mg of Co and 0.773 mg Se day⁻¹ bolus⁻¹. Similarly, the T3 boluses had the best release rate (3,678 mg cm² day⁻¹). In the second stage the models for the dissolution of the boluses by effect time (inside the buffer) were: G1: Weight (g) = 1 / (0.45679 + 0.11631 (x) 0.22501) (R² = 0.97); G2: Weight (g) = 1 / (0.22285 + 0.04252 (x) 0.28596) (R² = 0.95); G3: Weight (g) = 1 / (0.14497 + 0.02147 (x) 0.34713) (R² = 0.95); G4: Weight (g) = 1 / (0.06791 + 0.01689 (x) 0.12493) (R² = 0.98). We conclude that the formulations elaborated in the first stage were suitable for the manufacture of slow release boluses with trace minerals. However, in the second stage it is recommended to modify the release matrix, to maintain controlled and constant erosion in the boluses.

Key words: Supplement with boluses, mineral deficiency, release kinetics.

AGRADECIMIENTOS

Al **Colegio de Postgraduados Campus Montecillo** por aceptarme como un estudiante más en el programa de Maestría en Ciencias en el postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por su valioso apoyo económico para realizar mis estudios de maestría.

Al **Dr. Efrén Ramírez Bribiesca** por la confianza y sus consejos profesionales, así también su apoyo y disponibilidad para dirigir esta investigación.

A la **Dra. Leonor Miranda Jiménez** por su valiosa colaboración en la realización de esta investigación.

A la **Dra. Raquel López Arellano** y a la **Dra. Gabriela Rodríguez Patiño** por sus asesorías y atinadas observaciones para mejorar el diseño y desarrollo de los bolos intrarruminales.

Al **Dr. Javier Suarez Solís** por su asesoría en el diseño del trabajo en laboratorio y análisis estadísticos.

A la **Dra. María Magdalena Crosby Galván** y a la **Ing. Margarita Crosby Galván** por su confianza, asesorías y conocimientos compartidos durante las pruebas en el Laboratorio de Nutrición Animal.

Al **Dr. Pedro Cisneros Saguilan** por sus consejos y motivación constante para realizar mis estudios de maestría.

Al **Dr. Ricardo Bárcena Gama** y al **MC. Omar Cabañas Reynoso** por su apoyo en la realización de trámites administrativos y sugerencias para mejorar la investigación, muchas gracias.

A todos mis **maestros, amigos** y **compañeros** del postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería por los conocimientos compartidos en las clases y pláticas personales respecto a la investigación.

DEDICATORIA

A **Dios**, por prestarme vida y salud para poder concretar un logro más.

A mis padres, **Hipólito León Garzón (†)** por su presencia en espíritu y guiarme por el camino del bien. A mi madre **Herminia Cruz** por su fe, confianza y amor, por brindarme siempre su apoyo incondicional.

A mis hermanos (as), **Teresa, Demetria, Raúl, Angélica, Magdaleno (†), Hipólito y Omar** por su amor, amistad y apoyos brindados por siempre.

A mis sobrinos, hermanos **Mora León, López León, León Hernández, León Cruz, León Alamos y Estrada León**, con todo mi cariño y aprecio.

A mi gran amigo, **Federico Cisneros Herrera** por su amistad, consejos y motivación para seguir adelante.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
AGRADECIMIENTOS	viii
DEDICATORIA.....	ix
LISTA DE CUADROS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1. Definición de bolos intrarruminales	2
2.1.1. Características de bolos intrarruminales	2
2.2. Sistemas de liberación controlada.....	3
2. 2. 1. Sistemas controlados por difusión.....	4
2. 2. 2. Sistemas controlados por erosión	5
2. 2. 3. Sistemas controlados por hinchazón.....	8
2. 2. 4. Sistemas controlados por bombeo osmótico.....	8
2. 2. 5. Sistemas de disolución controlada	10
2. 3. Métodos de fabricación de bolos intrarruminales	11
2. 3. 1. Extrusión en caliente	11
2. 3. 2. Granulación por fusión	12
2. 3. 3. Fusión directa.....	14
2. 4. Fisiología y metabolismo de los minerales traza en los rumiantes.....	14
2. 4. 1. Cobre	15
2. 4. 1. 1. Absorción, transporte y excreción.....	16
2. 4. 2. Zinc	17
2. 4. 2. 1. Absorción, transporte y excreción.....	19
2. 4. 3. Cobalto.....	20
2. 4. 3. 1. Absorción, transporte y excreción.....	21
2. 4. 4. Selenio	22
2. 4. 4. 1. Absorción, transporte y excreción.....	23

3. HIPÓTESIS	25
4. OBJETIVOS	25
4.1. Objetivo general	25
4.2. Objetivos particulares	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1. Etapa I. Evaluación <i>in vitro</i> de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza elaborados por el método de granulación por fusión	26
5.1.1. Formulación de bolos intrarruminales de lenta liberación	26
5.1.2. Elaboración de bolos intrarruminales de lenta liberación	27
5.1.3. Cinética de disolución de los bolos intrarruminales de lenta liberación con la técnica de fermentación <i>in vitro</i>	29
5.1.3.1 Preparación de la solución amortiguadora	29
5.1.4. Determinación de la erosión diaria y total de bolos intrarruminales de lenta liberación	30
5.1.5. Estimación de la liberación teórica del Cu, Zn, Co y Se	30
5.1.6. Tasa de liberación	31
5.1.7. Diseño experimental y Análisis estadístico	31
5.2. Etapa II. Evaluación <i>in vitro</i> de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza elaborados por el método de fusión	31
5.2.1. Formulación de bolos intrarruminales de lenta liberación	31
5.2.2. Elaboración de bolos intrarruminales de lenta liberación	32
5.2.3. Cinética de disolución de los bolos de lenta liberación con la técnica de fermentación <i>in vitro</i>	34
5.2.3.1. Incubación de los bolos en el Daisy Ankom	34
5.2.4. Análisis estadístico	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
6.1. Etapa I	37
6.1.1. Características físicas de los bolos de lenta liberación	37
6.1.2. Erosión diaria y total de bolos intrarruminales de lenta liberación	38
6.1.3. Liberación teórica del Cu, Zn, Co y Se	39
6.1.4. Tasa de liberación	44

6.2. Etapa II.....	46
6.2.1. Características físicas de los bolos de lenta liberación	46
6.2.2. Cinética de disolución <i>in vitro</i> de bolos intrarruminales de lenta liberación .	47
7. CONCLUSIONES.....	51
8. LITERATURA CITADA.....	52

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Formulación de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza.	27
Cuadro 2. Formulación de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza a base de pentóxido de fosforo.	32
Cuadro 3. Características físicas de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza.....	37
Cuadro 4. Erosión de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza por fermentación <i>in vitro</i>	38
Cuadro 5. Liberación teórica de minerales traza obtenidas por fermentación <i>in vitro</i>	40
Cuadro 6. Tasa de liberación de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza obtenida por fermentación <i>in vitro</i>	45
Cuadro 7. Medias de masas de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza elaborados a base de pentóxido de fosforo.	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diseño del bolo Paratect® con sistema de liberación por difusión (tomado de Cardinal, 1997).....	5
Figura 2. Esquema de la erosión en bolos de liberación controlada (adaptado de Fan y Singh, 1989).	6
Figura 3. Diagrama de los componentes principales del dispositivo de Laby (tomado de Cardinal, 1997).....	7
Figura 4. Esquema de una bomba osmótica simple (adaptado de Fan y Singh, 1989).	9
Figura 5. Bolo IVOMEK SR Bolus® diseñado con el sistema de liberación osmótico (tomado de Cardinal, 1997).....	10
Figura 6. Esquema de los componentes de una extrusora simple.....	12
Figura 7. Prensa hidráulica de laboratorio “Carver Press” (izquierda) y bolos intrarruminales de lenta liberación (derecha).	28
Figura 8. Bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza en la solución amortiguadora.	30
Figura 9. Diagrama general del proceso de elaboración de los bolos por el método de fusión.....	33
Figura 10. Fases del proceso de fermentación in vitro de los bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza a) Bolos intrarruminales de lenta liberación; b) Bolos cubiertos por una tela para su digestión; c) Bolos intrarruminales de lenta liberación en la solución amortiguadora; d) Digestión de los bolos en el Daisy Ankom.	35
Figura 11. Bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza elaborados a base de pentóxido de fosforo.	47
Figura 12. Cinética y curva de ajuste en la disolución de los bolos de lenta liberación con minerales traza en fermentación in vitro. *a): bolos grupo 1; b): bolos grupo 2; c): bolos grupo 3; d): bolos grupo 4.....	50

1. INTRODUCCIÓN

Los minerales traza en la producción animal se han reconocido como esenciales para múltiples funciones metabólicas, incluida la respuesta inmune, la reproducción y el crecimiento. La deficiencia de minerales traza en los forrajes es común en las regiones tropicales, como consecuencia de la baja concentración mineral en los suelos. Esto es una causa de la baja producción y de los problemas reproductivos en rumiantes (McDowell y Arthington, 2005).

En el trópico mexicano los perfiles minerales han revelado deficiencias severas de cobre (Cu), zinc (Zn) y selenio (Se) en suelos, forrajes y suero sanguíneo de bovinos (Alvear, 2003; Ramírez-Orduña *et al.*, 2005; Martínez, 2006; Gámez, 2009; Arteaga, 2014), y bajas concentraciones de Se en pequeños rumiantes (Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2001; Torres, 2013). Por esto es necesario proveer estos elementos como suplementos dietéticos. Existen diversas estrategias de suplementación mineral como son las premezclas minerales, bloques y soluciones inyectables. Sin embargo, el uso de estos métodos resultan ser pocos prácticos para el ganado en pastoreo, debido a que se requieren de dosificaciones frecuentes y el consumo es variable en el caso de libre acceso (Kendall *et al.*, 2001). Por otro lado, los bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza, se consideran como la estrategia más indicada para tratar deficiencias en rumiantes (Blanco *et al.*, 2000; Kendall *et al.*, 2001; Kendall *et al.*, 2012). Estos proporcionan al animal dosis constante del mineral durante largo periodo de tiempo, de modo que una sola aplicación asegure la cobertura adecuada del elemento mineral durante varios meses. El objetivo de esta investigación fue formular y diseñar bolos intrarruminales de lenta liberación para suplementar cobre, zinc, cobalto y selenio a rumiantes.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Definición de bolos intrarruminales

Los bolos intrarruminales son dispositivos sólidos para la administración de fármacos, minerales traza, promotores de crecimiento, nutrientes y agentes antiparasitarios (Cardinal, 1997; Rathbone *et al.*, 2000). Se caracterizan por el suministro del principio activo en los compartimentos del retículo-rumen de los rumiantes. Estos pueden ser de liberación controlada o modificada que incluyen a los sistemas de liberación prolongada y a los sistemas de liberación retardada. Los sistemas de liberación prolongada son aquellos en los que el principio activo se libera inicialmente en proporción suficiente para producir efecto terapéutico y posteriormente reduce la frecuencia de dosificación, mientras que los sistemas de liberación retardada liberan el fármaco después de un periodo de latencia posterior a su administración (Jaimes, 2009). En el caso de los sistemas de lenta liberación, los bolos intrarruminales liberan al principio activo gradualmente, cuya velocidad de liberación permite la frecuencia constante de dosificación (Rodríguez, 2006).

2.1.1. Características de bolos intrarruminales

Los bolos intrarruminales son diseñados para proporcionar fármacos o minerales traza por largos periodos de tiempo dentro del retículo-rumen de los rumiantes. Entre las características que se deben considerar en el diseño de los bolos intrarruminales se listan las siguientes (Jaimes, 2009):

- El sistema de liberación debe controlar la cinética de liberación para adaptarse a la farmacocinética de diversos fármacos.
- Deben ser aplicables a gran variedad de ingredientes activos, independientemente de sus propiedades fisicoquímicas.
- No deben ser muy sensibles a variables fisiológicas como motilidad, vaciado gástrico, pH, volumen de fluido, contenido intestinal, concentración y presencia de enzimas, estado de ayuno, tipo de alimentación, posición física, nivel de actividad del animal, entre otros.
- Mantener la estabilidad del fármaco.
- El excipiente que controla la liberación no debe aumentar el volumen del producto.

El diseño debe cumplir con tres criterios básicos (Fan y Singh, 1989; Cardinal, 2000):

1. Dimensiones. Las dimensiones del bolo deben ser de alrededor de 2.5 cm de diámetro con longitud variable de 6 a 10 cm. Comúnmente la forma es cilíndrica o con forma de cápsula, de manera que se pueda administrar por vía oral.
2. Densidad. El bolo debe contar con un agente densificador para asegurar la densidad superior a 2.0 g/cm³ y garantizar la permanencia en el retículo-rumen.
3. Sistema de liberación. Se clasifican de acuerdo a su principal mecanismo de control de velocidad como difusión, erosión, hinchazón y ósmosis.

2.2. Sistemas de liberación controlada

En un sistema de liberación controlada, la sustancia activa es incorporada a un soporte que generalmente es un material polimérico o una combinación de varios. La velocidad

de liberación de la sustancia activa desde dicho sistema al medio que la rodea, viene determinada por las propiedades del propio polímero y, en menor medida, depende de los factores ambientales, como pueden ser el pH, la temperatura y los fluidos del organismo. Por ello, los sistemas de liberación controlada deben ser capaces de permitir la administración de sustancias activas de una forma lenta y continua durante períodos dilatados de tiempo (Rathbone *et al.*, 2000; Sáez *et al* 2002). A continuación se describen los sistemas de liberación.

2. 2. 1. Sistemas controlados por difusión

Estos sistemas son diseñados para controlar la velocidad de liberación mediante la difusión del agente activo a través de cualquier parte del dispositivo. Existen dos tipos de dispositivos controlados por difusión; los dispositivos reservorios que contienen un núcleo del agente activo rodeado por una membrana polimérica densa o porosa (Rathbone *et al.*, 2000) y los dispositivos monolíticos o de matriz que consisten en la distribución del agente activo en una matriz de polímero no biodegradable, que puede dispersarse como una fase separada o disolverse en el polímero. Los polímeros que generalmente se utilizan como base para estos dispositivos son el polidimetilsiloxano, la etilcelulosa y la hidroxipropilcelulosa (Fan y Singh, 1989; Cardinal, 1997).

Dresback y Pfizer (citado por Cardinal, 1997) desarrollaron un dispositivo reservorio (Paratect®) que en su interior contiene una mezcla de morantel y polietilenglicol para el tratamiento de infecciones parasitarias. Este bolo consiste en un cilindro de acero inoxidable de 4 pulgadas de largo y 1 pulgada de diámetro. Los extremos están tapados

con discos porosos de polietileno impregnados con triacetato de celulosa (Figura 1). La liberación del fármaco se realiza a través de los discos por difusión simple hasta por 90 días.

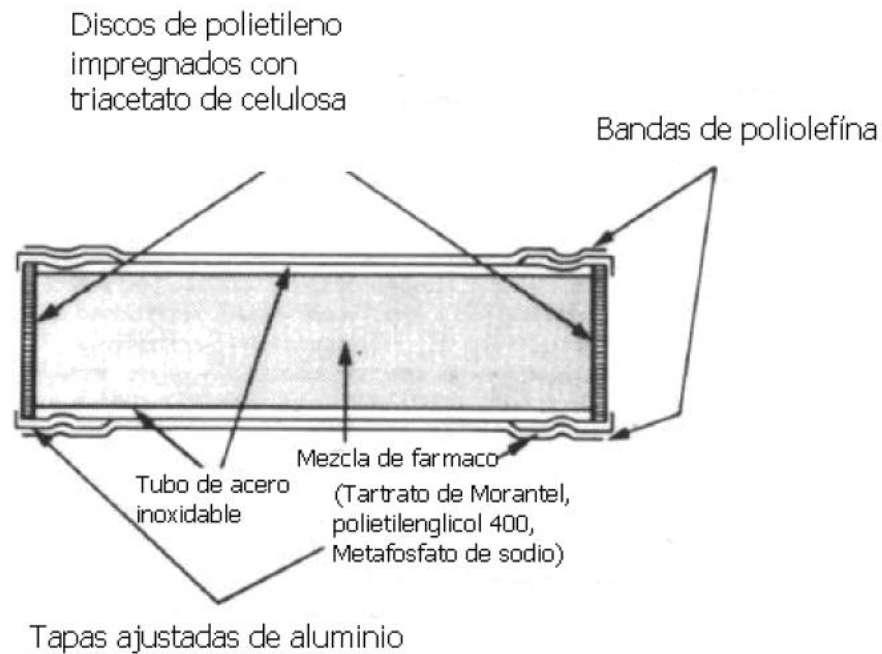


Figura 1. Diseño del bolo Paratect® con sistema de liberación por difusión (tomado de Cardinal, 1997).

2. 2. 2. Sistemas controlados por erosión

En los sistemas de liberación controlados por erosión los polímeros no son portadores pasivos, sino participantes activos en el proceso de liberación (Fan y Singh, 1989). Estos sistemas están diseñados para disolverse o desgastarse por el fluido ruminal o acción mecánica del rumen, como se muestra en la Figura 2. Este enfoque permitió el desarrollo de bolos con matriz erosionables para conocer el efecto en los cambios de composición en las características de liberación. Se determinó que densidades superiores a 2.0 g/cm^3

eran suficientes para prevenir la regurgitación y asegurar la permanencia del bolo en el retículo-rumen. Sin embargo, se observó que la tasa de liberación fue mayor cuando el bolo se alojaba en el retículo respecto al rumen, debido a las diferencias en el ambiente ruminal, contracciones musculares y a los efectos de abrasión de otros materiales (Cardinal, 1997). Otro tipo de bolo implica un medicamento encapsulado dentro de una membrana erosionable que controla la velocidad de liberación. Este sistema involucra el proceso de difusión a través de la membrana que es de espesor y permeabilidad definidos (Rathbone *et al.*, 2000).

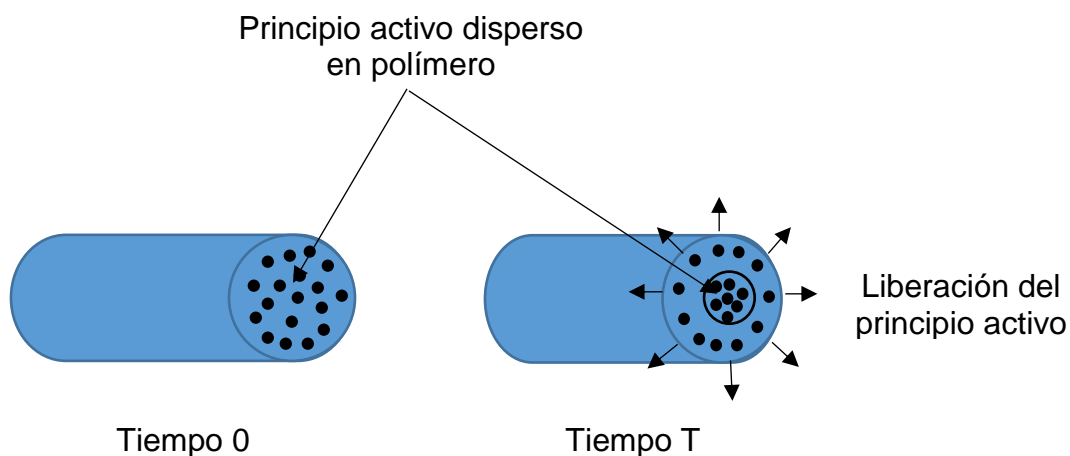


Figura 2. Esquema de la erosión en bolos de liberación controlada (adaptado de Fan y Singh, 1989).

Existe gran variedad de diseños y tipos de bolos para liberar diversos fármacos, minerales traza o nutrientes para rumiantes en pastoreo. Por ejemplo la Figura 3 muestra un bolo que consiste en un cilindro hueco tapado en ambos extremos. Por un extremo contiene un resorte que actúa sobre un pistón que a su vez ejerce presión sobre una

composición erosionable. El cilindro posee alas poliméricas que se expanden al entrar en contacto con el líquido ruminal, para evitar ser regurgitado.

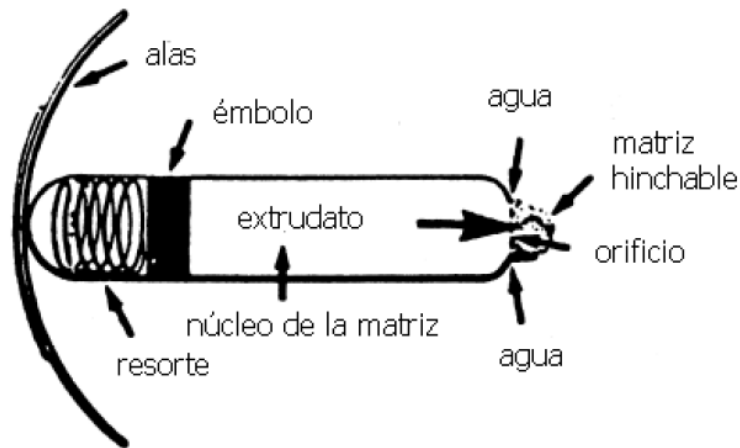


Figura 3. Diagrama de los componentes principales del dispositivo de Laby (tomado de Cardinal, 1997).

Otros diseños de bolos constan de una matriz comprimida que contiene al principio activo. Esta matriz está revestida por un polímero insoluble en líquido ruminal, pero es quebradiza, lo que permite la erosión del bolo y consecuentemente la liberación del principio activo. Además se han desarrollado dispositivos formulados con mezcla de ceras, agentes tensoactivos y material denso para retenerlos en el rumen (Rothbone *et al.*, 2000). En este caso los sistemas controlados por reacción química incluyen formulaciones poliméricas y en consecuencia la liberación se controla mediante reacción química como la escisión del fármaco a partir de un esqueleto de polímero (Fan y Singh, 1989; Rothbone *et al.*, 2000)

2. 2. 3. Sistemas controlados por hinchazón

Los bolos intrarruminales con sistema de liberación por hinchazón están formados por matriz polimérica hidrofílica que es incapaz de degradarse por completo al entrar en contacto con el fluido ruminal. La liberación del principio activo se da por difusión cuando el polímero absorbe líquido ruminal, lo que hace que se hinche. Algunos polímeros vítreos cuya temperatura disminuye por el fluido, sufrirán una transición de vidrio a gel, estos pueden emplearse para tales sistemas (Fan y Singh, 1989).

2. 2. 4. Sistemas controlados por bombeo osmótico

Los bolos intrarruminales con sistemas osmóticos se desarrollaron bajo el principio de la bomba osmótica. Consiste en un núcleo sólido y compacto con el agente activo soluble o insoluble en agua. El núcleo está cubierto por una membrana de polímero permeable al agua, pero impermeable al agente activo. Cuando el bolo está en un ambiente acuoso, el fluido penetra la membrana y genera presión hidrostática suficiente para regular el rango de liberación del agente activo a través del orificio del bolo (Figura 4).

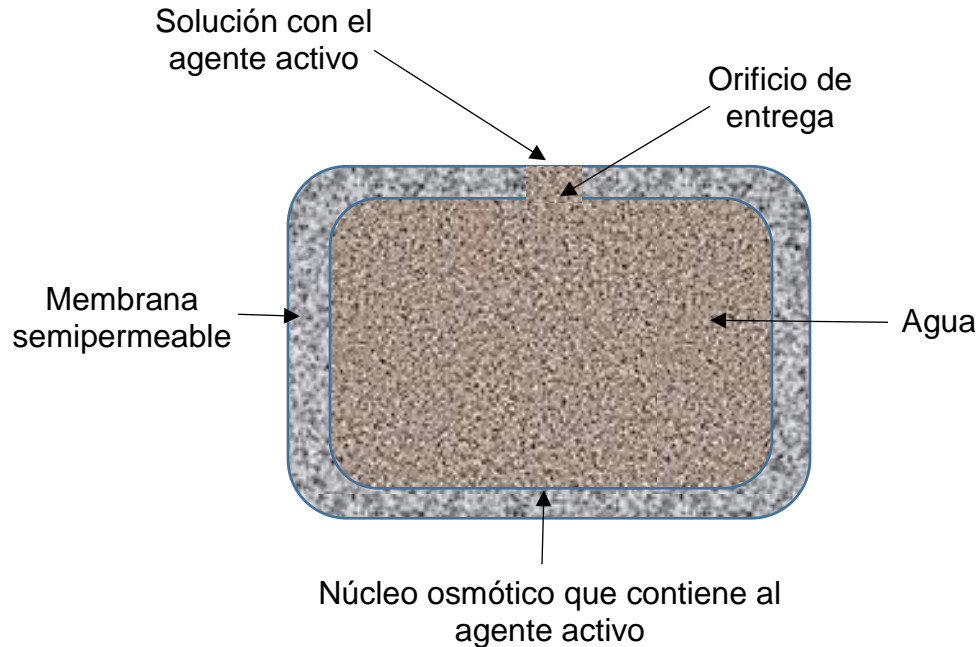


Figura 4. Esquema de una bomba osmótica simple (adaptado de Fan y Singh, 1989).

Esta tecnología permitió que científicos de Merck & Co. y ALZA desarrollaran un producto con ivermectina llamado IVOMEK SR Bolus®, comercializado en Europa y Estados Unidos para el tratamiento de ecto y endoparásitos. Se estableció que la dosis diaria de ivermectina en rangos de 12 mg día^{-1} fuera suficiente para proteger al ganado contra una variedad de parásitos internos y externos hasta por un periodo de 135 días. El bolo está cubierto por una membrana extruída de acetato de celulosa y varios plastificantes. Su interior se llena con una tableta osmótica que se hincha con el agua que penetra la membrana. Sobre la tableta se coloca un placebo que funge como separador y pistón para dirigir el flujo del fármaco hacia el canal de salida ubicado en el centro del agente densificador (Figura 5).

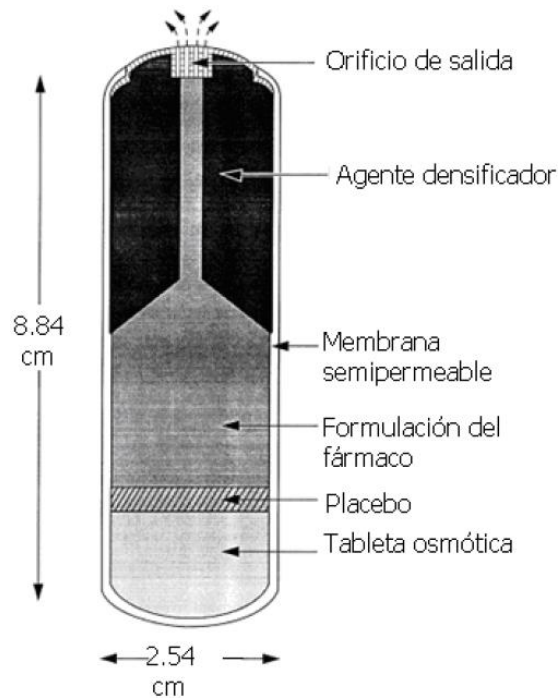


Figura 5. Bolo IVOMEC SR Bolus® diseñado con el sistema de liberación osmótico (tomado de Cardinal, 1997).

2. 2. 5. Sistemas de disolución controlada

El sistema de disolución controlada permite la administración de medicamentos que liberan al principio activo mediante el proceso de disolución. Por ejemplo, el vidrio exhibe una solubilidad relativamente alta en soluciones tamponadas, por lo tanto se ha utilizado en el diseño de dispositivos intrarruminales. El principio activo también puede liberarse por difusión o erosión (Rathbone *et al.*, 2000). Varios autores señalan que los bolos de vidrio son eficaces para suministrar minerales traza a rumiantes en pastoreo por periodos de hasta un año (Kendall *et al.*, 2012).

2. 3. Métodos de fabricación de bolos intrarruminales

2. 3. 1. Extrusión en caliente

La técnica de extrusión en caliente inició en la década de 1930, utilizada ampliamente por las industrias de plásticos, cauchos y alimentos (Patil *et al.*, 2016), su aplicación en la industria farmacéutica fue hasta la década de 1970 para la formación de productos multiparticulados (Repka *et al.*, 2018). La extrusión en caliente es un proceso que consiste en el bombeo de materias primas con un tornillo que gira a temperaturas elevadas dentro de un troquel para conseguir una mezcla homogénea de los compuestos activos y aglutinantes (termoplásticos y polímeros) (Crowley *et al.*, 2007; Patil *et al.*, 2016). Esta tecnología se convirtió en una alternativa para la fabricación de productos farmacéuticos como tabletas, cápsulas, películas e implantes para la administración de medicamentos a través de vía oral, transdérmica y transmucosa (Patil *et al.*, 2016; Repka *et al.*, 2018).

La Figura 6 muestra los componentes de una extrusora simple que se utiliza en el proceso de extrusión. El equipo consta de un barril que contiene bandas de calor para calentar y reblandecer el material alimentado por la tolva, que es transportado hacia adelante con ayuda de un tornillo, que a la vez calienta, mezcla y comprime. La presión, temperatura y la velocidad son factores claves para alcanzar la consistencia de la mezcla y la extrusión correcta del material (Navas y Navas, 2017). Posteriormente el extruido es conducido hacia el dado, pieza que recibe el producto y le brinda el perfil o la forma deseada. Las presiones comunes en el proceso son de alrededor de 35 a 70 mPa (Ruíz, 2009).

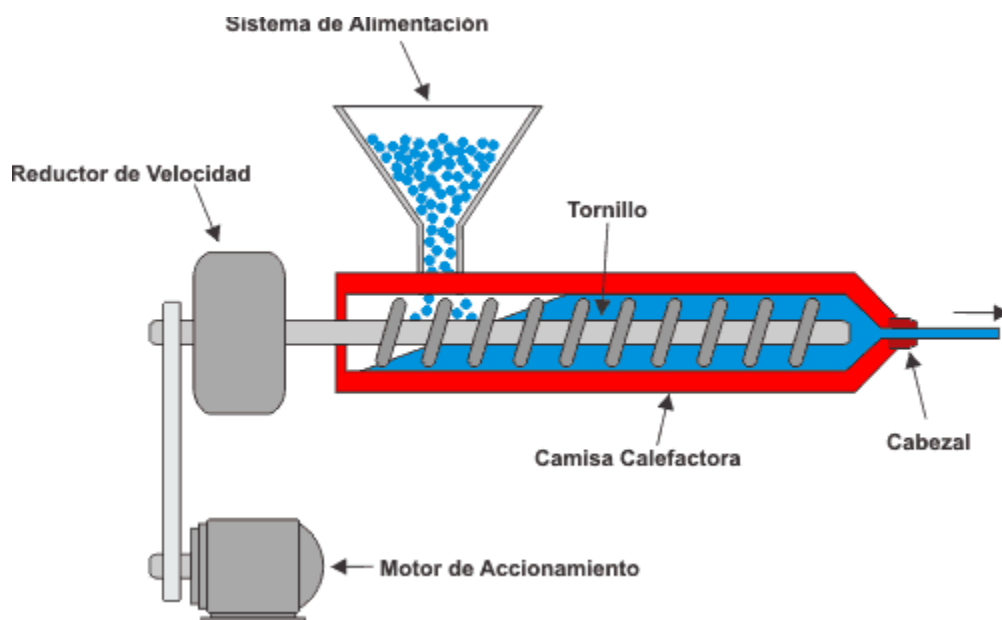


Figura 6. Esquema de los componentes de una extrusora simple.

2. 3. 2. Granulación por fusión

La granulación por fusión es una técnica basada en la utilización de un agente aglutinante sólido que se funde a temperaturas entre 50 a 80 °C. Este proceso es aplicable a fármacos sensibles a la humedad, evitando el uso de solventes acuosos u orgánicos (Ochoa *et al.*, 2006). El proceso consiste en lo siguiente, según lo descrito por Rodríguez (2006):

- 1) Mezclado. Es el proceso con el cual se obtiene una mezcla homogénea de los ingredientes y el principio activo se encuentre uniformemente distribuido, para asegurar su correcta dosificación en el bolo que se elaborará posteriormente. Para conseguir un mezclado correcto, en la industria farmacéutica se utilizan mezcladores granuladores de alta velocidad, que permite realizar además del

mezclado, la granulación y secado del granulado en un solo paso, y cuando se realiza en pequeña escala se emplea un mortero o un mezclador a escala piloto.

2) Fusión. En esta etapa el excipiente se coloca en un recipiente de acero inoxidable sobre una parrilla eléctrica para generar su fusión de 50 a 80 °C.

3) Granulación. La mezcla de los ingredientes (principio activo y densificador) se adiciona al excipiente fundido y se mezclan homogéneamente. Se deja enfriar la mezcla aproximadamente por 15 minutos y en seguida se pasa al granulador. Para obtener el tamaño de partícula deseado el producto es tamizado en mallas. Finalmente, el granulado es mezclado con el lubricante para su compresión.

4) Compresión. Esta etapa consiste en la producción de los bolos por compresión mediante una tableteadora. Las tableteadoras monopunzónicas tienen básicamente dos punzones (superior e inferior) y un cilindro dosificador donde se va introduciendo el granulado a comprimir, desde una tolva. El punzón superior realiza la compresión y controla la dureza, mientras que el punzón inferior expulsa el comprimido y controla el peso.

Esta técnica permite la obtención de bolos intrarruminales de lenta liberación, mediante la selección adecuada de los excipientes que formarán la matriz de liberación.

2. 3. 3. Fusión directa

Los métodos citados anteriormente, utilizan como materia prima a diversos polímeros solubles e insolubles. A pesar de los resultados exitosos que se han logrado en la fabricación de bolos intrarruminales, constantemente se buscan nuevos materiales para mejorar el diseño y la liberación del principio activo. Por ejemplo, materiales de vidrio soluble en agua se ha utilizado en la fabricación de bolos para tratar deficiencias de minerales traza en los rumiantes. Por lo tanto, las materias primas que se utilizan para formar el vidrio necesitan fundirse a intervalo de temperaturas de 500 a 1100 °C. Esta técnica inició a principios de la década de 1980, Pilkington PLC fabricó un bolo de vidrio que contenía Cu, Co y Se, diseñado para disolverse durante un periodo de 18 meses (Kendall *et al.*, 2001).

En la fabricación de bolos intraruminales de vidrio se utilizan diferentes óxidos formadores de vidrio (vitrificantes) y óxidos modificadores (fundentes y estabilizantes) que permitan la formación correcta de la red del vidrio. La mezcla de los materiales se funde en un horno a alta temperatura y luego es vertido en moldes para formar un producto final, por ejemplo, varillas, tubos, discos, granulados y bolos monolíticos (Cardinal, 2000; Kendall *et al.*, 2001).

2. 4. Fisiología y metabolismo de los minerales traza en los rumiantes

Los minerales traza en la producción animal se han reconocido como componentes funcionales de múltiples eventos metabólicos. Las funciones que desarrollan se pueden clasificar en cuatro categorías: estructurales, fisiológicas, catalíticas y reguladoras. Los

minerales traza son componentes estructurales de los órganos y tejidos corporales. Participan en la regulación de la presión osmótica, en el equilibrio ácido-base y en la permeabilidad de la membrana. Además, forman parte de la estructura de numerosas metaloenzimas que participan en diversas funciones metabólicas como en la producción de energía, digestión de proteínas, replicación celular, actividad antioxidante, entre otras (Suttle, 2010).

2. 4. 1. Cobre

El Cu es un mineral traza que actúa como cofactor esencial de varias enzimas específicas y proteínas de transporte involucradas en diferentes procesos fisiológicos del organismo (Linder, 2002; McDowell, 2003; Cano *et al.*, 2014; Goff, 2018), como respiración celular, formación de la hemoglobina, función cardíaca, metabolismo de lípidos, desarrollo del tejido conectivo, mielinización de la medula espinal, queratinización y pigmentación del tejido, formación e inactivación de hormonas y respuesta del sistema inmune (Corah, 1996; Underwood y Suttle, 1999; McDowell, 2003; NRC, 2005; Goff, 2018).

La deficiencia de Cu está relacionada con anemia, alteraciones óseas, ataxia en recién nacidos, trastornos cardiovasculares (insuficiencia cardíaca o ruptura de la aorta), despigmentación y alteración de la queratinización del pelo y lana, diarreas, infertilidad, reducción del crecimiento y alteraciones en el sistema inmunológico (Underwood, 1981; NRC, 2005; McDowell y Arthington, 2005; Suttle, 2010).

2. 4. 1. 1. Absorción, transporte y excreción

En los no rumiantes el Cu se absorbe principalmente en el estómago y en el intestino delgado (Van den Berghe y Klomp, 2009; Goff, 2018). El duodeno y el yeyuno son los principales sitios de absorción de Cu en los rumiantes, y en menor proporción en íleon (García *et al.*, 2015). Sin embargo, en el ovino hay una absorción importante en el intestino grueso (Quiroz y Bouda, 2001). La absorción del Cu se da mediante dos mecanismo: transporte activo y difusión simple (Quiroz y Bouda, 2001; McDowell, 2003).

A nivel de la membrana apical gástrica y duodenal, el Cu es reducido y transportado por difusión por la Proteína Transportadora de Cobre 1 (CTR1) a través de la membrana apical (Lutsenko, 2010; Hashimoto y Kambe, 2015; Mesa *et al.*, 2016). El transportador de metal divalente (DMT1) absorbe al Cu en menor proporción (Lutsenko *et al.*, 2007). Las proteínas chaperonas de Cu (Atox1) y las metalotioneinas (MT) se encargan de transportar al Cu en el enterocito (Rosa y Mattioli, 2002; Cousins y Liuzzi, 2018). Finalmente, el Cu es liberado a los fluidos extracelulares en forma cúprica (Cu^{+2}) y se une principalmente a la transcupreína (McDowell, 2003), a la α -2-macroglobulina y en menor proporción a las albúminas y al aminoácido histidina para ser transportado hasta el hígado (Van den Berghe y Klomp, 2009; Mesa *et al.*, 2016; Cousins y Liuzzi, 2018).

En el hígado se sintetiza la ceruloplasmina (Cp), proteína relacionada con el transporte y distribución del Cu en el organismo, como en la movilización del Fe almacenado en el hígado y la eliminación de radicales libres (McDowell, 2003). Las concentraciones normales de Cu hepático en los rumiantes son del orden de 100 a 400 mg de Cu kg^{-1} de

materia seca (NRC, 2005). Cuando las reservas de Cu hepático exceden las concentraciones normales, cualquier Cu adicional que entre al hepatocito se traslada a los canalículos por la ATP7B y se excreta en la bilis vía exocitosis (Mesa *et al.*, 2016). Este mecanismo es uno de los más activos, pero también se excretan cantidades intermedias de Cu a través de la orina, la leche y el intestino, y pequeñas cantidades se excretan en la transpiración (McDowell, 2003; Suttle, 2010).

2. 4. 2. Zinc

El Zn es un componente integral de más de 300 enzimas (Wright, 2012), que incluyen la anhidrasa carbónica, alcohol deshidrogenasa, fosfatasa alcalina, aldolasa, lactato deshidrogenasa, ARN y ADN polimerasas, transcriptasa inversa, carboxipeptidasa A, B, G y superóxido dismutasa (Kohlmeier, 2015; Swain *et al.*, 2016), involucradas en diversas funciones biológicas del organismo como en el metabolismo de proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos (Salgueiro *et al.*, 2000; NRC, 2005). Desempeña un papel fundamental en la síntesis del ADN (Underwood, 1981), se requiere para la integridad estructural y funcional de más de 2000 factores de transcripción y casi todas las vías metabólicas y de señalización dependen de una o más proteínas dependientes de Zn (Suttle, 2010; Cano *et al.*, 2014).

En la reproducción animal el Zn es esencial para la madurez sexual y para los eventos reproductivos en la hembra (Yasothai, 2014). Es importante para el mantenimiento y la reparación del revestimiento uterino después del parto (Kumar y Parmar, 2017). La deficiencia de Zn se asocia con disminución en la tasa de concepción, estro anormal,

aborto, reducción del tamaño testicular y alteración en la formación de los espermatozoides (Wright, 2012; Swain *et al.*, 2016). Roy *et al.* (2013) señalaron que el Zn interviene en la motilidad de los espermatozoides, debido a que actúa en la pieza intermedia del esperma. El Zn está involucrado en el catabolismo de lípidos, y por lo tanto es la fuente de energía para la movilidad de los espermatozoides.

Otra de las funciones del Zn corresponde al sistema inmune, forma parte de la timosina, hormona producida por las células del timo para regular la maduración de los linfocitos, vital para la inmunidad mediada por células competentes (Goff, 2018). Además, puede actuar directamente al promover la proliferación de los linfocitos y disminuir la susceptibilidad a la muerte celular programada (apoptosis) (Kohlmeier, 2015). La deficiencia de Zn afecta significativamente la función inmune, manifestándose atrofia tímica, función alterada de los linfocitos y en consecuencia mayor incidencia de infecciones bacterianas, virales y micóticas (Haase, 2017).

A nivel celular el Zn desempeña un papel antioxidante a través de la superóxido dismutasa (CuZnSOD) que protege a las células de los radical libres que se producen en los diferentes procesos fisiológicos (Zhao *et al.*, 2014), también puede proteger la peroxidación lipídica inducida por el Fe bloqueando los sitios de fijación del Fe en las superficies celulares, actuando de forma sinérgica con la vitamina E (Suttle, 2010).

2. 4. 2. 1. Absorción, transporte y excreción

La absorción del Zn ocurre a lo largo del tracto intestinal, pero las tasas más altas se producen en el duodeno y yeyuno en humanos y animales no rumiantes (Cousins y Liuzzi, 2018). En los rumiantes también se absorbe en el rumen (NRC, 2005) y en el abomaso (Miller y Cragle, 1965). La eficiencia máxima de absorción del Zn por los rumiantes es de 0.75 (Suttle, 2010) y se da principalmente por difusión y transporte activo (Das *et al.*, 2018). Sin embargo, la eficiencia de absorción del Zn en los animales puede variar desde 15 a 60 % (McDowell, 2003).

El Zn ingresa a las células epiteliales del intestino a través del borde de cepillo mediante la ayuda de las proteínas ZIP/SLC29A presentes en las membranas celulares (Jeong y Eide, 2013). La ZIP4 es la proteína principal en la absorción del Zn (Wang y Zhou, 2010; Takagishi *et al.*, 2017; Cousins y Liuzzi, 2018), mientras que la ZIP11 y ZIP14 absorben en menor proporción (Cousins, 2010). En el enterocito la movilidad del Zn está a cargo de los transportadores ZnT2 a ZnT7 (Cousins, 2010). La MT contribuye al tráfico intracelular del Zn y cumple una doble función como desintoxicación y reserva de Zn (Wang y Zhou, 2010; Cousins y Liuzzi, 2018). Sin embargo, la proteína ZnT1 es el transportador principal que controla el flujo de salida del enterocito hacia el torrente sanguíneo (Cousins *et al.*, 2003; Wang y Zhou, 2010; Cousins, 2010). En la circulación el Zn se une a la albumina en 70 % y a la α -2-macroglobulina 20 a 30 % para su transporte al hígado y al resto del cuerpo (NRC, 2005; Kohlmeier, 2015; Garlhan, 2018).

El Zn se encuentra principalmente en el tejido muscular y óseo (85 %), en la piel y el hígado (11 %) y en el plasma (0.1 %) (Das *et al.*, 2018). La excreción del Zn se da en las heces y representa al Zn no absorbido y al secretado en el intestino delgado principalmente por las secreciones pancreáticas, biliares y la digestión intraluminal por proteasas (McDowell, 2003).

2. 4. 3. Cobalto

El Co es el átomo central de la cobalamina (vitamina B₁₂) sintetizada por los microorganismos del rumen y en el tracto digestivo del caballo (Cano *et al.*, 2014). La vitamina B₁₂ es esencial para los rumiantes para el metabolismo del ácido graso y el folato, además es cofactor de la enzima metilmalonil-CoA mutasa implicada en la conversión del propionato a glucosa (Kumar y Parmar, 2017), y de la metionina sintetasa que regenera la metionina de la homocisteína (Goff, 2018). Además, el Co puede favorecer la fermentación ruminal al aumentar la digestión de la fibra de los forrajes de baja calidad (McDowell, 2003).

Las dietas deficientes en Co reducen significativamente la síntesis de vitamina B₁₂. Esto provoca aumento en las concentraciones de ácido metilmalónico en el líquido ruminal, la sangre y la orina, como resultado de la incapacidad de los microorganismos para convertir la metilmalonil-CoA a succinato, que luego deberá convertirse a propionato (Goff, 2018). En este contexto, la deficiencia de Co y vitamina B₁₂ en rumiantes puede provocar anorexia, pérdida del apetito, reducción del crecimiento, anemias, enfermedades del hígado graso y reducción de la resistencia a parásitos e infecciones

microbianas (NRC, 2005; Suttle, 2010; Yasothai, 2014). Entre otras anomalías como infertilidad, mal acondicionamiento del feto en desarrollo, retraso de la involución uterina, ciclo estral irregular, bajas tasas de concepción y mortalidad temprana del ternero (Kumar y Parmar, 2017).

2. 4. 3. 1. Absorción, transporte y excreción

En la mayoría de las especies la absorción del Co se realiza en duodeno, y los sitios de absorción para la vitamina B₁₂ se localizan en la porción del íleon. Aproximadamente el 3 % de Co se convierte en vitamina B₁₂, del total de vitamina sintetizada, solo del 1 al 3 % se absorbe (McDowell, 2003). El Co se absorbe con la ayuda de la proteína DMT1 (Kohlmeier, 2015). Sin embargo, la absorción de Co elemental por los rumiantes es del orden de 1 a 2 % (NRC, 2005).

Durante la digestión de los microorganismos muertos y de la haptocorrina salival se libera la vitamina B₁₂ y se une al factor intrínseco (IF) (Suttle, 2010). La secreción de sales biliares facilita la unión del complejo vitamina B₁₂-IF a los receptores de la mucosa íleal para su absorción (Seetheram *et al.*, 1999). Este complejo se degrada en los lisosomas y la vitamina liberada se une a la transcobalamina (TC) (McDowell, 2003; Combs y McClung, 2017). En el plasma sanguíneo la vitamina B₁₂ circula como adenosilcobalamina (AdoCbl) unida a la TC y la metilcobalamina (MeCbl) se une a la haptocorrina plasmática en 70 a 80 % (Combs y McClung, 2017).

La concentración de Co en los tejidos es menor a 0.2 mg kg^{-1} . El hígado, riñón, páncreas, bazo y corazón contienen en promedio 0.15, 0.25, 0.11, 0.09 y 0.06 ppm, respectivamente (McDowell, 2003). El hígado de ovejas y vacas sanas, pueden contener de 0.2 a 0.3 ppm de Co en base seca (Underwood, 1981). En el suero sanguíneo de ovinos la vitamina B₁₂ se encuentra en valor cercano a 400 ng L^{-1} , mientras que en bovinos puede llegar a 1000 ng L^{-1} (Viglierchio, 2000). La ruta principal de excreción del Co y de la vitamina B₁₂ es mediante las heces, aunque en la orina también se secretan cantidades variables (Suttle, 2010). Las vacas en lactancia excretan en las heces alrededor de 86 a 87.5 % del Co total absorbido, de 0.9 a 1.0 % en la orina y de 11.5 a 12.5 % en la leche (McDowell, 2003).

2. 4. 4. Selenio

El selenio es el componente estructural de más de 30 selenoproteínas involucradas en la actividad enzimática y la regulación metabólica de los procesos oxidativos (Hefnawy y Tórtora, 2010; Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2017; Friedmann y Conrad, 2018). Su importancia biológica se reconoció con el descubrimiento del glutatión peroxidasa (GSH-Px), cuya función es proteger a las membranas celulares contra el daño de los radicales libres (Brown y Arthur, 2001; Cano *et al.*, 2014). Entre las funciones fisiológicas se incluye la espermatogénesis, la función inmune, las reacciones de biotransformación hepática, el recambio de neurotransmisores, la estabilidad de las membranas celulares, el desarrollo y función muscular y la regulación de las hormonas tiroideas (Kendall *et al.*, 2000; Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2005; Hefnawy y Tórtora, 2010; Ahsan *et al.*, 2014; Davis y Hall, 2017; Hall, 2018).

La incorporación del Se en los rumiantes en pastoreo proviene de los forrajes, asociado paralelamente con su concentración de Se en el suelo. Existen regiones cuyo contenido de Se es bajo, y la deficiencia en los animales es notable (McDowell, 2003). La deficiencia de Se en los rumiantes pueden originar enfermedades como la enfermedad del musculo blanco (Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2001) y problemas como fertilidad alterada, abortos espontáneos, retención placentaria, debilidad neonatal, incidencia de endometritis, ovarios quísticos, hepatitis dietética en cerdos, diátesis exudativa y degeneración pancreática en aves de corral (McDowell, 2003; NRC, 2005; Wright, 2012; Davis y Hall, 2017).

2. 4. 4. 1. Absorción, transporte y excreción

La absorción del Se en rumiantes es menor (alrededor de 29 a 35 %) que en los no rumiantes (hasta 85 %) (Spears, 2003). Los microorganismos del rumen metabolizan al selenato (SeO_4) y selenito (SeO_3) a Se elemental, el cual es incorporado parcialmente por la proteína microbiana, otra parte es metabolizada a selénido insoluble (Galbraith *et al.*, 2016; Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2017). La absorción del Se ocurre principalmente en el yeyuno, en donde el mecanismo de absorción es similar al observado en los no rumiantes (McDowell, 2003; Suttle, 2010). La proteína microbiana es hidrolizada en el intestino delgado por acción enzimática y libera a la selenometionina para absorberse por transporte activo en el duodeno, con menores cantidades en el yeyuno e íleon (Davis y Hall, 2017).

En la célula el Se se reduce a selenido y es incorporado a la Se-cisteína que es la forma activa presente en la estructura de la enzima antioxidante GSH-Px (Ceballos y Wittwer, 1996). La selenometionina se metaboliza fácilmente en Se-adenosilmetionina y posteriormente en Se-cisteína que puede ser catalizada por una liasa específica para liberar el Se elemental e incorporarse entonces a las selenoproteínas (NRC, 2005; Suttle, 2010).

Cuando el Se es inyectado en forma de selenito, este es captado por los eritrocitos y reducido a selenuro y transferido al plasma para ser transportado por albumina al hígado, donde se incorpora a las selenoproteínas como selenoproteína P o glutatión peroxidasa extracelular, que posteriormente son excretadas al plasma. En el caso del selenato es tomado directamente por el hígado sin haber sido procesado en sangre (Amador, 2005). La selenoproteína P es la encargada del transporte del Se hacia los tejidos, esta proteína representa más del 60 % del Se en plasma (NRC, 2005).

La eliminación del Se se presenta a través de la orina, heces y exhalación, la cantidad depende del consumo, la forma de administración, la composición de la dieta, los antagonistas presentes y la especie animal (McDowell, 2003; Alexander, 2015). Sin embargo, en los no rumiantes predomina la excreción urinaria en forma de trimetilselenuro y monometilselenuro, independientemente de la vía de administración (Davis y Hall, 2017). Mientras que en los rumiantes la ruta principal es fecal cuando se ingiere vía oral, pero cuando se suministra vía parenteral es a través de la orina (Hall, 2018).

3. HIPÓTESIS

Los bolos intrarruminales elaborados a base de pentóxido de fosforo garantizan una formulación idónea para liberar por más de seis meses los minerales traza.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Formular y diseñar bolos intrarruminales de lenta liberación con cobre, zinc, cobalto y selenio para cubrir sus deficiencias en rumiantes.

4.2. Objetivos particulares

- 1) Desarrollar dos prototipos de bolos de lenta liberación con diferentes matrices y contenido de fuentes de cobre, zinc, cobalto y selenio para evaluar su comportamiento con la técnica de fermentación *in vitro*.
- 2) Determinar la liberación teórica del cobre, zinc, cobalto y selenio de los bolos con la técnica de fermentación *in vitro* para cubrir sus deficiencias en rumiantes.
- 3) Determinar la cinética de disolución de los bolos de lenta liberación con los minerales traza con la técnica de fermentación *in vitro*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en dos etapas y cada una incluyó las siguientes fases:

- I. Formulación de bolos intrarruminales de lenta liberación
- II. Elaboración de bolos intrarruminales de lenta liberación
- III. Cinética de disolución de bolos intrarruminales de lenta liberación con la técnica de fermentación *in vitro*

5.1. Etapa I. Evaluación *in vitro* de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza elaborados por el método de granulación por fusión

5.1.1. Formulación de bolos intrarruminales de lenta liberación

La formulación y elaboración de los bolos se realizó en el área de Farmacia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). La fórmula de los bolos (Cuadro 1) incluyó sulfato de cobre (CuSO_4), óxido de zinc (ZnO), óxido de cobalto (Co_3O_4) y selenito de sodio (Na_2SeO_3) como fuentes de Cu, Zn, Co y Se, respectivamente. Para estructurar la matriz de liberación se utilizó Cutina HR polvo (aceite vegetal hidrogenado) y fosfato de calcio (DI-TAB, Helm de México). En T3 se utilizó hierro (Fe) como agente densificador para asegurar la densidad superior a 2.0 g/cm^3 . Además se añadió Estearato de magnesio (Helm de México) como lubricante para reducir la fricción entre las piezas metálicas durante la compresión.

Cuadro 1. Formulación de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza.

Componente	T1	T2	T3
	%		
Cutina	20	30	20
Fosfato de calcio	10	0	5
Hierro	0	0	5
Estearato de magnesio	1.092	1.092	1.092
Sulfato de cobre	27.13	27.13	27.13
Óxido de zinc	40.33	40.33	40.33
Óxido de cobalto	0.148	0.148	0.148
Selenito de sodio	1.3	1.3	1.3
Total	100	100	100
Análisis calculado			
Cobre	10.8	10.8	10.8
Zinc	32.4	32.4	32.4
Cobalto	0.11	0.11	0.11
Selenio	0.6	0.6	0.6

*Tratamientos uno (T1), dos (T2) y tres (T3).

5.1.2. Elaboración de bolos intrarruminales de lenta liberación

Se elaboraron 9 bolos, 3 por cada tratamiento de acuerdo a las formulaciones del Cuadro

1. Para la elaboración de los bolos se utilizó el método de granulación por fusión, el cual consistió en lo siguiente:

- a) Se pesaron los ingredientes activos y los excipientes de la formulación en una balanza analítica Mettler Toledo modelo AB-204-S.
- b) Se mezclaron las fuentes de Cu, Zn, Co y Se, el Fe y el fosfato de calcio por tres minutos.
- c) Se vertió la Cutina en un vaso metálico y se colocó en una plancha para su fusión a temperatura aproximada de 80 a 90 °C.

- d) Se adicionó la mezcla del inciso b a la Cutina fundida y se agitó constantemente hasta lograr una mezcla homogénea.
- e) Se disminuyó la temperatura entre 40-50 °C.
- f) La masa se vertió en una malla del número 12 para hacer la granulación.
- g) Se dejó enfriar el granulado hasta alcanzar la temperatura ambiente.
- h) Se agregó el Estearato de magnesio al granulado y se mezcló por tres minutos.
- i) Finalmente los bolos se elaboraron por la compresión de 32.208 gramos (T1), 31.910 gramos (T2) y 32.403 gramos (T3) en una prensa hidráulica de laboratorio “Carver Press” (Figura 7) empleando 3 toneladas en la fuerza de compresión por 30 segundos.



Figura 7. Prensa hidráulica de laboratorio “Carver Press” (izquierda) y bolos intrarruminales de lenta liberación (derecha).

5.1.3. Cinética de disolución de los bolos intrarruminales de lenta liberación con la técnica de fermentación *in vitro*

5.1.3.1 Preparación de la solución amortiguadora

Se preparó una solución amortiguadora a base de saliva de McDougall y líquido ruminal, con relación 4:1. Se ajustó a pH de 6.5 con ácido clorhídrico (HCl) al 2N con un potenciómetro y agitación constante en una parrilla.

Previamente se preparó la saliva de McDougall, con los siguientes reactivos disueltos en agua desionizada para aforar a un litro de solución:

- a) 9.80 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
- b) 7.00 g de fosfato de sodio heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HP}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- c) 0.57 g de cloruro de potasio (KCl)
- d) 0.47 g de cloruro de sodio (NaCl)
- e) 0.12 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Los bolos se pesaron y midieron, y se introdujeron en frascos de vidrio con 100 mL con solución amortiguadora. Posteriormente se incubaron en el Daisy Ankom a 39.5 °C por 7 días (Figura 8). A las 72 horas los bolos se sacaron y fueron secados con toallas de papel para monitorear su masa. Así mismo se realizó el cambio de la solución amortiguadora.



Figura 8. Bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza en la solución amortiguadora.

5.1.4. Determinación de la erosión diaria y total de bolos intrarruminales de lenta liberación

La erosión diaria de los bolos (EDB) se calculó restándole a la masa inicial la masa final de los bolos divididos entre los días de duración del experimento, expresándose en g día^{-1} . Para determinar la erosión total del bolo (ETB) se le restó a la masa inicial la masa final del bolo por tratamiento y su repetición. Los valores de las variables se ajustaron a base seca.

5.1.5. Estimación de la liberación teórica del Cu, Zn, Co y Se

La estimación de la liberación de los minerales traza se realizó de forma teórica, considerando los valores de las erosiones diarias y totales de los bolos, de acuerdo a los porcentajes de inclusión de las fuentes minerales. Los resultados se agruparon por cada tratamiento.

5.1.6. Tasa de liberación

Se dividió el promedio de la EDB y el área superficial de los bolos por tratamiento y se expresó en $\text{mg cm}^2 \text{ día}^{-1}$.

5.1.7. Diseño experimental y Análisis estadístico

Los tratamientos fueron asignados a las unidades experimentales mediante un diseño experimental completamente al azar. Los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza con el procedimiento GLM del programa SAS versión 9.4. Las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

5.2. Etapa II. Evaluación *in vitro* de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza elaborados por el método de fusión

5.2.1. Formulación de bolos intrarruminales de lenta liberación

La formulación y elaboración de los bolos para esta etapa se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. La fórmula de los bolos incluyó óxido de cobre (CuO), óxido de zinc (ZnO), óxido de cobalto (Co_3O_4) y selenito de sodio (Na_2SeO_3) como fuentes de Cu, Zn, Co y Se, respectivamente. La matriz de liberación se formó con cuatro compuestos químicos (Cuadro 2). Los compuestos químicos al igual que las fuentes de minerales traza integraron el agente densificador.

Cuadro 2. Formulación de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza a base de pentóxido de fosforo.

Compuesto	%
Pentóxido de fosforo	-
Carbonato de sodio	-
Óxido de calcio	-
Óxido de magnesio	-
Óxido de cobre	-
Óxido de zinc	-
Óxido de cobalto	-
Selenito de sodio	-
Análisis calculado de minerales traza	
Cobre	10.54
Zinc	4.94
Cobalto	0.75
Selenio	0.40

5.2.2. Elaboración de bolos intrarruminales de lenta liberación

Se diseñaron bolos con diferentes formulaciones y se eligieron los que presentaron las mejores características físicas como dureza, compactación, forma y densidad. Todo este proceso se realizó con la finalidad de obtener el bolo hecho con la formulación apropiada para que contuviera la cantidad necesaria de minerales traza. Los bolos se elaboraron con los compuestos del Cuadro 2, con el fin de evaluar la cinética de disolución en fermentación *in vitro*. Para la fabricación de los bolos se utilizó un proceso térmico (fusión) escrito en la Figura 9:

- a) Los excipientes y las fuentes minerales traza del Cuadro 2 se pesaron en una balanza digital y se mezclaron por 5 minutos.

- b) La mezcla se vertió en crisoles de porcelana con capacidad de 100 mL y se introdujeron a la mufla para su fundición a temperatura aproximada de 800 a 850 °C por 30 minutos.
- c) Se bajó la temperatura de la mufla y se dejó enfriar a temperatura ambiente por 48 horas. Luego se retiraron los crisoles y se colocaron en un desecador.
- d) Finalmente, los bolos se extrajeron de los crisoles y tomaron la forma de la base del molde.

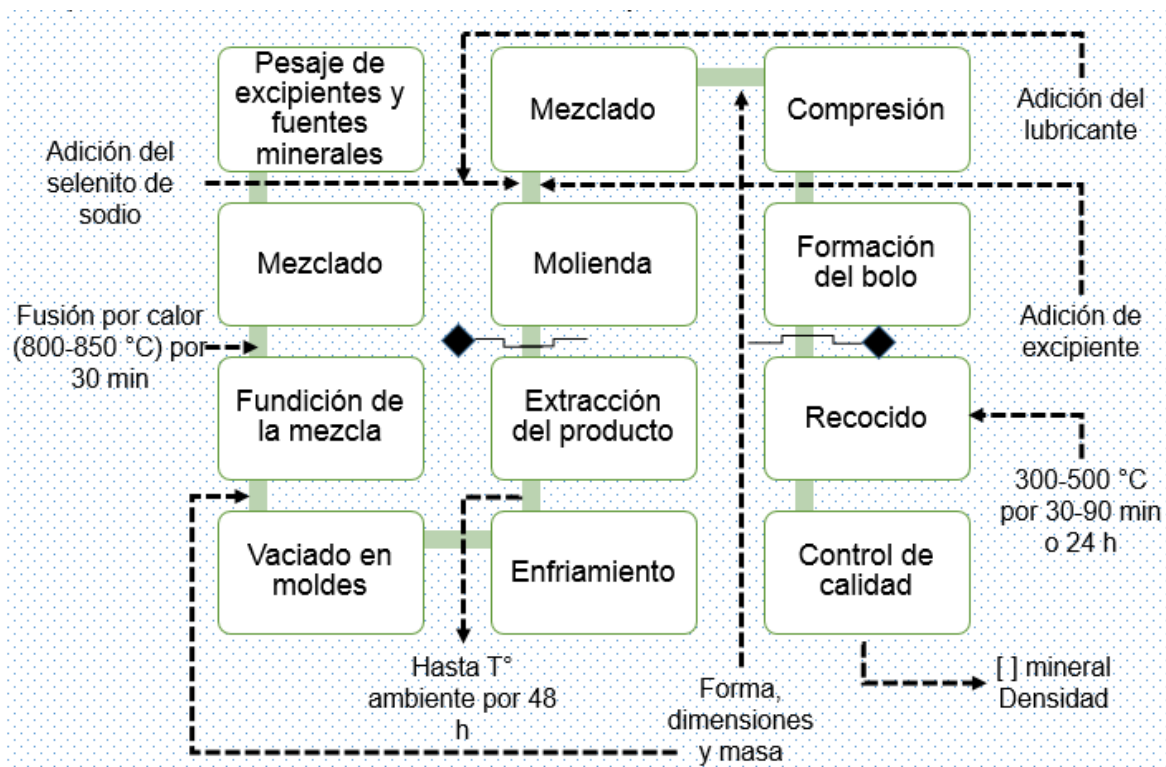


Figura 9. Diagrama general del proceso de elaboración de los bolos por el método de fusión.

La densidad de los bolos se determinó por desplazamiento de agua en una probeta graduada. La masa se obtuvo pesando los bolos y los valores fueron sustituidos en la fórmula de densidad ($\rho=m/V$).

5.2.3. Cinética de disolución de los bolos de lenta liberación con la técnica de fermentación *in vitro*

5.2.3.1. Incubación de los bolos en el Daisy Ankom

Se utilizó solución amortiguadora preparada como se indicó en la etapa I (Saliva de McDougall y líquido ruminal) con relación 4:1, ajustada a pH de 6.5. Se utilizaron dos frascos de digestión, cada uno contenía 1250 mL de solución amortiguadora y 18 bolos. El periodo de digestión de los bolos en fermentación *in vitro* fue de 56 días. El procedimiento fue el siguiente (Figura 10):

- a) Los bolos se pesaron en una balanza analítica para registrar su masa inicial.
- b) Posteriormente, fueron puestos en bolsas de tela para tenerlos identificados y facilitar su extracción para el pesaje.
- c) Los bolos se distribuyeron uniformemente en los frascos considerando un peso promedio en cada frasco. Se introdujeron en la solución amortiguadora y se pasó corriente de CO₂ para mantener las condiciones óptimas de la fermentación.
- d) Los frascos se colocaron en el digestor Daisy Ankom a 39.5 °C con movimiento circular constante.
- e) A las 72 horas los bolos se sacaron para monitorear su masa y hacer el cambio de la solución amortiguadora.
- f) Después de la última lectura de masa, se introdujeron en una estufa a 55° C por 24 horas para determinar el porcentaje de humedad y poder corregir las masas a base seca.

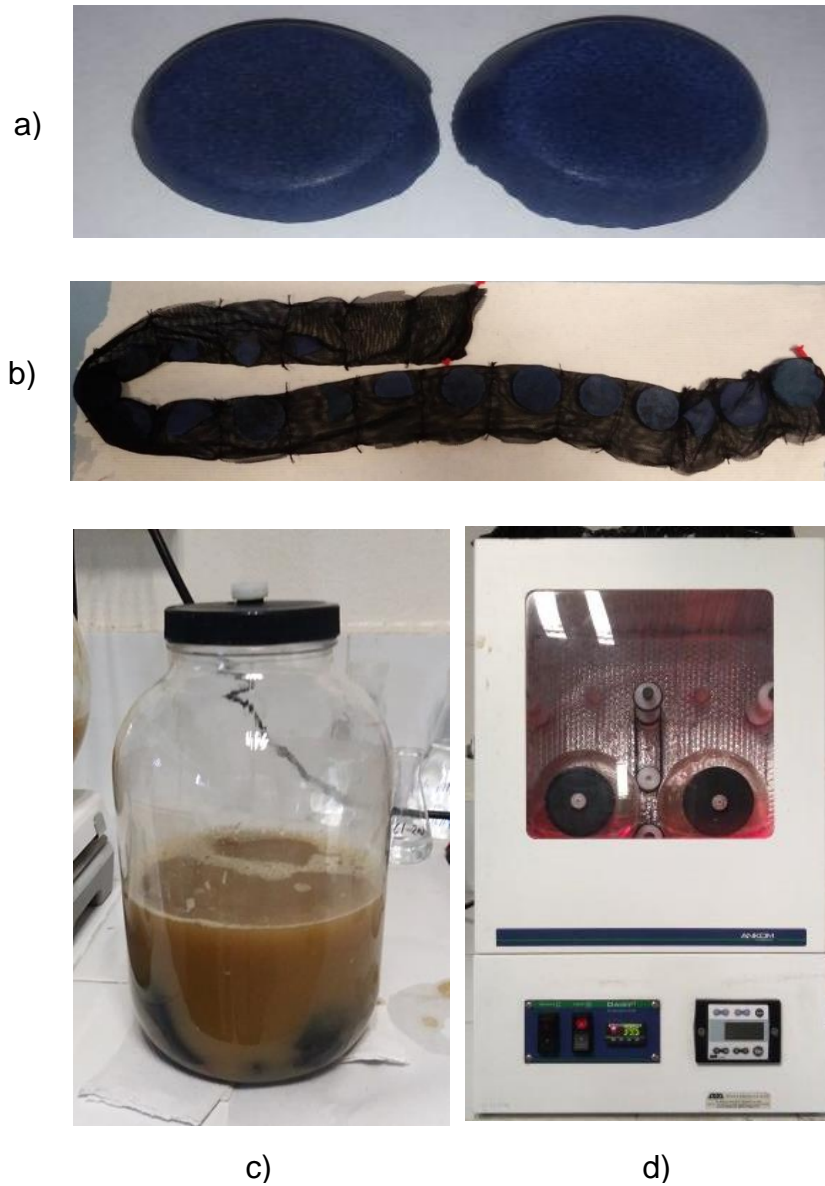


Figura 10. Fases del proceso de fermentación in vitro de los bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza a) Bolos intrarruminales de lenta liberación; b) Bolos cubiertos por una tela para su digestión; c) Bolos intrarruminales de lenta liberación en la solución amortiguadora; d) Digestión de los bolos en el Daisy Ankom.

5.2.4. Análisis estadístico

Se utilizó un modelo de regresión no lineal con el programa CurveExpert Professional versión 2.6.5 para estimar la regresión no lineal entre dos variables. En el modelo se relacionó una variable dependiente (el peso de los bolos), con una variable independiente (el tiempo). Se analizó y comparó el ajuste de varios modelos estándar y se seleccionó el modelo más significativo de acuerdo con el valor de R-cuadrada.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Etapa I

6.1.1. Características físicas de los bolos de lenta liberación

La masa promedio (n=9) de los bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza en la etapa I resultó de 32.174 g, con error estándar de 0.171. La densidad promedio fue de 2.8 g/cm³ y el área superficial de 35.835 cm² (Cuadro 3).

Cuadro 3. Características físicas de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza.

Variables	Tratamientos			Promedio
	T1	T2	T3	
Media de masa inicial (g)	32.208	31.910	32.403	32.174
EEM	0.178	0.258	0.076	0.171
Longitud (cm)	2.65	2.4	2.4	2.483
Diámetro (cm)	2.9	2.9	2.9	2.900
Área(cm ²)	37.354	35.076	35.076	35.835

*EEM: Error Estándar de la Media.

De acuerdo con Cardinal (2000) y Amador (2005), los bolos con una densidad de 2.0 a 3.5 g/cm³ deberán mantenerse en el retículo-rumen y evitar la regurgitación en el ganado en pastoreo. Por lo tanto, este indicador se cumple con los bolos elaborados, contando con una densidad de 2.8 g/cm³.

6.1.2. Erosión diaria y total de bolos intrarruminales de lenta liberación

Las medias de los tratamientos para las variables erosión diaria (EDB) y erosión total (ETB) de los bolos con minerales traza por fermentación *in vitro*, se muestran en el Cuadro 4, hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos 1 y 3. El valor de la EDB ($0.039 \text{ g bolo}^{-1} \text{ día}^{-1}$) en el T1 fue estadísticamente diferente ($P < 0.05$) al valor de la EDB ($0.129 \text{ g bolo}^{-1} \text{ día}^{-1}$) de T3. Sin embargo, estadísticamente el efecto de T2 sobre la EDB fue similar ($P > 0.05$) a la de T1 y T3.

El efecto de los tratamientos sobre la ETB fue similar al de la EDB. El mayor valor de la ETB ($P < 0.05$) se presentó en el T3, el cual fue de $0.902 \text{ g bolo}^{-1}$, respecto a T1 registrando $0.275 \text{ g bolo}^{-1}$.

Cuadro 4. Erosión de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza por fermentación *in vitro*.

Variables	Tratamientos			EEM
	T1	T2	T3	
EDB ($\text{g bolo}^{-1} \text{ día}^{-1}$)	0.039 ^b	0.089 ^{ab}	0.129 ^a	0.009
ETB (g bolo^{-1})	0.275 ^b	0.626 ^{ab}	0.902 ^a	0.063

*Medias de los tratamientos con la misma literal no son diferentes ($P > 0.05$); EDB: Erosión diaria de bolos; ETB: Erosión total de bolos; EEM: Error Estándar de la Media.

Las erosiones de los bolos en los tratamientos evaluados, puede deberse principalmente a la estructura de la matriz de liberación. Es decir, la matriz de liberación debe tener la capacidad de controlar la cinética de liberación y no ser demasiado sensible a las variables fisiológicas del ambiente ruminal (Jaimes, 2009). Por otra parte, se observó

que los bolos de T3 que contenían Fe como agente densificador, presentaron mayor erosión en la superficie y se tornaron a una coloración marrón, esto puede deberse a las reacciones químicas del Fe. Por lo tanto, se cree que el tamaño de la partícula liberada fue mayor respecto a T1 y T2, y en consecuencia presentaron una mayor erosión.

Al no haber diferencias significativas entre T1 y T2 en la erosión, el Cuadro 2 muestra que los bolos presentan estructura similar en la matriz de liberación al no incorporar al Fe como agente densificador. Sin embargo, el hecho de que los bolos no se hayan erosionado en gran cantidad, nos indica que los excipientes de la matriz de liberación es adecuada para resistir al pH, la fricción y el ataque de los microorganismos, permitiendo la liberación controlada de los minerales traza.

Los valores de la erosión total registrada en este estudio son inferiores a las reportadas por Jaimes (2009), este autor en una prueba *in vitro* evaluó la degradación de bolos (13.69 g) con selenio (selenito de sodio y selenato de bario) por 48 horas, y encontró degradaciones promedio de 4.57 g bolo⁻¹. La diferencia significativa posiblemente se deba a que la matriz de liberación estuvo compuesta principalmente por carragenina.

6.1.3. Liberación teórica del Cu, Zn, Co y Se

Los resultados obtenidos para la variable liberación teórica de Cu, Zn, Co y Se por fermentación *in vitro* se muestran en el Cuadro 5. Hubo diferencia significativa entre los tratamientos evaluados. Los bolos que conformaron T3 presentaron mayor liberación de minerales traza en comparación con los bolos de T1 (P<0.05).

Cuadro 5. Liberación teórica de minerales traza obtenidas por fermentación *in vitro*.

Tratamientos	Liberación diaria (mg día ⁻¹ bolo ⁻¹)			
	Cobre	Zinc	Cobalto	Selenio
T1	4.252 ^b	12.755 ^b	0.043 ^b	0.236 ^b
T2	9.669 ^{ab}	29.006 ^{ab}	0.098 ^{ab}	0.537 ^{ab}
T3	13.931 ^a	41.793 ^a	0.141 ^a	0.773 ^a
EEM	0.9741	2.9224	0.0099	0.0541
	Liberación total (mg bolo ⁻¹)			
T1	29.76 ^b	89.28 ^b	0.303 ^b	1.653 ^b
T2	67.68 ^{ab}	203.04 ^{ab}	0.689 ^{ab}	3.76 ^{ab}
T3	97.52 ^a	292.55 ^a	0.993 ^a	5.418 ^a
EEM	6.8189	20.4568	0.0694	0.3788

*Medias de los tratamientos con la misma literal no son diferentes ($P > 0.05$); EEM: Error Estándar de la Media.

En el caso particular del Cu, los bolos de T3 presentaron mejor liberación diaria ($P < 0.05$), con un promedio de 13.931 mg Cu día⁻¹, respecto a T1 con promedio de 4.252 mg Cu día⁻¹. Mientras que los bolos de T2 el valor de la liberación diaria del Cu no fue diferente a los valores de T1 y T3 ($P > 0.05$). Del mismo modo, la liberación diaria del Zn, Co y Se fue mayor en los bolos de T3 respecto a T1 ($P < 0.05$). Como se observa en el Cuadro 5, los valores de la liberación total de Cu, Zn, Co y Se en T1 fueron inferiores estadísticamente a las liberaciones de T3 ($P < 0.05$). El comportamiento de esta variable fue similar a las erosiones diarias y total (Cuadro 4). Al parecer, a medida que aumenta la concentración del mineral en el bolo, se obtiene mayor liberación, como es el caso del Zn, Cu, Se y Co que estuvieron presente en mayores concentraciones en los bolos, respectivamente.

El ganado bovino productor de carne requiere de 10 mg Cu kg^{-1} de MS, sin embargo, el requerimiento puede variar de 4 a 15 mg Cu kg^{-1} dependiendo en gran medida de la concentración de azufre y molibdeno presente en la dieta (NRC, 2000). Considerando que los forrajes tropicales generalmente contienen de 1.2 a $8.1 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ MS (Alvear, 2003; Gámez, 2009; Arteaga, 2014), el consumo de Cu por un bovino de 500 kg de peso que ingiera en promedio 10 kg MS (con 8 mg Cu kg^{-1} en el mejor de los casos) es de $80 \text{ mg Cu día}^{-1}$. Este valor presenta un déficit de 20 mg Cu para cubrir el requerimiento diario del bovino. En esta investigación los bolos de T2 y T3 presentaron liberación de Cu de 9.67 y $13.93 \text{ mg día}^{-1}$, lo cual hace suponer que al administrar dos bolos al animal, el déficit se cubre en su totalidad.

Los valores de la liberación diaria de Cu en este estudio difieren a las reportadas por Hemingway *et al.* (1997), obtuvieron liberaciones de $62 \text{ mg Cu día}^{-1}$. Esta diferencia se puede explicar en gran medida a las condiciones en la que desarrollaron la investigación, es decir, los bolos tenían mayor concentración de Cu (aproximadamente $5,427 \text{ mg}$) y se suspendieron dos bolos en el rumen de vacas con cánulas durante 100 días. De acuerdo al laboratorio de manufactura de los bolos utilizados, indica que están diseñados para que dos bolos liberen $60.3 \text{ mg Cu día}^{-1}$ (Cruz, 2014).

En cuanto al Zn el NRC (2000), establece que las dietas para ganado bovino de carne deben proporcionar 30 mg Zn kg^{-1} . Esta cantidad es necesaria para cubrir el requerimiento del ganado en sus diferentes etapas fisiológicas. Sin embargo, los requerimientos del ganado bovino en pastoreo no están bien definidas; por lo tanto se

debe ofrecer suplemento con Zn, debido a que los forrajes en su mayoría contienen de 7 a 19 mg Zn kg⁻¹ MS (NRC, 2000; Gámez, 2009). Por ejemplo, un bovino de 500 kg que consume en promedio 10 kg MS, debe consumir 300 mg Zn día⁻¹ y considerando que el forraje proporcione 19 mg Zn kg⁻¹ MS, estaría consumiendo 190 mg Zn día⁻¹, con un déficit de 110 mg Zn, el cual puede cubrirse con suplementación. En este estudio los bolos de T2 y T3 liberaron 29.006 y 41.793 mg Zn día⁻¹, por lo tanto, al extrapolar al triple, posiblemente liberarían 87.018 y 125.379 mg Zn día⁻¹ respectivamente. Con estos valores se cubriría el requerimiento del bovino.

En un estudio realizado por Kendall y Telfer (2000) determinaron la liberación aparente del Zn de bolos de vidrio soluble, a partir del balance general del Zn en ovejas estabuladas. Obtuvieron una liberación promedio de 93.25 mg Zn día⁻¹, este valor es superior a la liberación promedio de Zn (27.85 mg día⁻¹) reportada en el presente estudio. Las cantidades liberadas de Zn pudieran deberse a diferencias en la concentración del mineral, método de elaboración y al medio de digestión de los bolos, ya que en esta investigación se realizó con la técnica de fermentación *in vitro*. Sin embargo, la liberación de los bolos de T3 (41.793 mg Zn día⁻¹) se aproximan al valor de 55 mg Zn día⁻¹ reportado por Hemingway *et al.* (1997). Este dato se obtuvo de dos bolos sumergidos en el rumen de vacas fistuladas, por lo tanto, podemos suponer que la liberación de dos bolos en el presente estudio es de 83.586 mg Zn día⁻¹.

Los bolos de T3 se elaboraron con 0.15 % de óxido de cobalto (0.11 % Co elemental), que corresponde a 1.07 mg Co g⁻¹ bolo. La liberación fue de 0.141 mg Co día⁻¹. El NRC

(2000, 2001) y McDowell (2003) recomiendan requerimientos de 0.10 a 0.25 mg kg⁻¹ MS para bovinos de carne y ganado lechero en pastoreo, es decir, si un bovino pesa alrededor de 500 kg, el requerimiento de Co es de 1 mg día⁻¹ si consume aproximadamente 10 kg MS. Además, los estudios más reciente indican la necesidad de incrementar la cantidad de Co para rumiantes a un nivel de 0.3 a 0.5 ppm MS para una óptima actividad microbiana, fermentación y síntesis de vitamina B₁₂ (McDowell, 2003). Es claro que la liberación de Co por el bolo no es suficiente para cubrir el requerimiento, no obstante, los forrajes tropicales contienen <0.08 ppm de Co (McDowell y Arthington, 2005). Hemingway *et al.* (1997) reportaron liberación de 1.08 mg Co día⁻¹, mientras que Cruz (2014) menciona que los bolos fabricados con 239 mg Co liberan 2 mg Co día⁻¹ hasta por cuatro meses. Los bolos comerciales de Inglaterra y Australia aseguran una liberación por un tiempo máximo de 12 meses (Judson *et al.*, 1991).

Respecto a Selenio, los bovinos productores de carne y el ganado lechero requieren 0.3 mg kg⁻¹ MS (NRC, 2000). Por lo tanto, si a un bovino que pesa 500 kg se le administra un bolo, la liberación del Se por el bolo debe ser de 0.006 mg Se kg⁻¹. En este estudio, la liberación calculada del Se en fermentación *in vitro* para T1 fue de 0.236 mg Se día⁻¹, al dividirlo entre los 500 kg es igual a 0.0005 mg Se kg⁻¹, este valor es menor respecto a la recomendación del NRC. Sin embargo, los valores de la liberación en T2 y T3 (0.0011 y 0.0015 mg Se kg⁻¹, respectivamente) se acercan al valor recomendado.

Revilla *et al.* (2008) evaluaron en ovinos la degradación de bolos que contenían 2.35 % de Se elemental y reportaron liberación de 0.177 mg Se día⁻¹. Es evidente que los autores

obtuvieron menor liberación de Se respecto al presente estudio. Las diferencias se deben al peso de los bolos (3 g contra 32.17 g) y posiblemente a las dimensiones del bolo, al medio de digestión y al periodo de investigación. Hemingway *et al.* (1997) encontraron liberación de 0.56 mg Se día⁻¹ con dos bolos. Este valor es similar a la liberación registrada en T2, pero ligeramente inferior a la liberación de los bolos de T3 (0.773 mg Se día⁻¹). En bovinos se han administrado bolos de 30 g, con 360 a 500 mg de Se como selenito de sodio y liberan 3 mg Se día⁻¹, con sistema de expulsión de bomba osmótica (Tasker, 1992).

Gutiérrez (1999) señala que a mayor concentración del mineral, área de contacto, tamaño de partícula y presión de compresión en los bolos son factores claves para incrementar la degradación y liberación de los minerales traza. Por otra parte, Telfer *et al.* (1984) y Ruíz (2009) recomiendan que las medidas de los bolos para bovinos deben ser de 6.5 a 8.5 cm de largo y 2.3 a 3.0 cm de diámetro. En este estudio los bolos tuvieron en promedio 2.48 cm de largo y 2.9 cm de diámetro, por lo que se puede inferir que a mayores dimensiones del bolo se puede obtener mayor liberación del mineral traza y poder cubrir el requerimiento de los rumiantes.

6.1.4. Tasa de liberación

La tasa de liberación de bolos con minerales traza presentó diferencias estadísticas ($P < 0.05$) por efecto de los tratamientos evaluados, las medias de los tratamientos se muestran en el Cuadro 6. Las mayores tasas de liberación se obtuvieron en los bolos de T2 y T3, los que promediaron 3.115 mg cm² día⁻¹, sin existir diferencia estadística entre

ellos; la tasa de liberación promedio de T1 y T2 fue 1.803 mg cm² día⁻¹ y fueron similares estadísticamente. Sin embargo, la tasa de liberación en promedio de T3 fue mayor 73 % respecto a T1. La inclusión de Fe en el bolo, ocasionó mayor erosión, de tal forma, que la diferencia de la tasa de liberación de los bolos de T3 representó 104 % del promedio registrado entre T1 y T2 que no incluyeron Fe.

Cuadro 6. Tasa de liberación de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza obtenida por fermentación *in vitro*.

Tratamientos	Tasa de liberación (mg cm ⁻² día ⁻¹)
T1	1.054 ^b
T2	2.552 ^{ab}
T3	3.678 ^a
EEM	0.2568

*Medias de los tratamientos con la misma literal no son diferentes (P>0.05); EEM: Error Estándar de la Media.

La menor tasa de liberación se explica por presentar mejor compactación, debido a que incluyó 10 % de fosfato de calcio y 0 % de Fe, con respecto a T2 y T3, sin embargo, la mayor tasa de liberación en T3 puede ser por la inclusión de 5 % de Fe, que a la vez, se observó en el bolo un mayor tamaño de partícula, y además presentó mayor erosión en la superficie.

La tasa de liberación de los bolos encontradas en este estudio, son diferentes a las reportadas por Hemingway *et al.* (1997) con vacas fistuladas alimentadas con heno y vacas en pastoreo, al obtener liberaciones por par de bolos de 8.289 y 10.776 mg cm² día⁻¹, respectivamente. Kendall *et al.* (2012) al administrar un bolo de vidrio soluble a

corderos en crecimiento en condiciones de pastoreo, obtuvieron velocidad de disolución promedio de 326 mg día^{-1} , que corresponde aproximadamente a $9.77 \text{ mg cm}^2 \text{ día}^{-1}$. De acuerdo a Telfer *et al.* (1984) recomiendan la tasa de liberación de no más de $25 \text{ mg cm}^2 \text{ día}^{-1}$, lo que hace posible que los bolos administrados al animal puedan liberar los minerales traza requeridos en periodos de hasta un año.

6.2. Etapa II

En la etapa I se evaluó la erosión de los bolos conteniendo Cu, Zn, Co y Se, estos fueron inferiores en la tasa de liberación, pero está dentro de la recomendación por Telfer *et al.* (1984). Por lo tanto, se decidió realizar mediante el método de fusión bolos de lenta liberación que tuvieran los mismos minerales traza, pero con diferente estructura de la matriz de liberación a base de pentóxido de fosforo, de tal forma que permitiera su degradación en mayores periodos de tiempo.

6.2.1. Características físicas de los bolos de lenta liberación

Se elaboraron 36 bolos con la misma formulación y se dividieron en cuatro grupos de acuerdo a su masa. La densidad de los bolos se determinó por desplazamiento de agua al interior de una probeta graduada empleando un bolo en cada ocasión y realizando la prueba por triplicado. El Cuadro 7 muestra los resultados.

Cuadro 7. Medias de masas de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza elaborados a base de pentóxido de fosforo.

Grupos	<i>n</i>	Masa (g)	EEM
1	13	2.187	0.117
2	7	4.473	0.334
3	13	6.86	0.164
4	3	14.721	1.085

**n*: número de bolos; EEM: Error Estándar de la Media.

Los bolos en cada grupo tuvieron aproximadamente el mismo tamaño, aunque su forma fue irregular, debido a que adquirieron la forma de las bases de los crisoles, como se muestra en la Figura 11. Los bolos cuentan con una densidad por arriba de 2.0 g/cm³ lo que asegura su retención en rumen.



Figura 11. Bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza elaborados a base de pentóxido de fosforo.

6.2.2. Cinética de disolución *in vitro* de bolos intrarruminales de lenta liberación

Con los datos de erosión de los bolos en fermentación *in vitro* se ajustó para cada grupo un modelo de regresión no lineal. En las siguientes gráficas (Figura 12) se presenta el

comportamiento de la disolución de los bolos en función del tiempo. La cinética fue similar en los cuatro grupos, se observó en la primera semana después de la inmersión, la mayor disolución. Posteriormente a los 7 días la disolución disminuyó.

Los bolos se elaboraron con 10.54 % Cu, 4.94 % Zn, 0.75 % Co y 0.40 % Se. El promedio de la erosión total para el grupo 1 fue de 0.835 g. De acuerdo a los porcentajes de inclusión, teóricamente corresponden a liberaciones de 88.009 mg Cu, 41.249 mg Zn, 6.262 mg Co y 3.34 mg Se, respectivamente. Los bolos del grupo 2 presentaron erosión de 1.635 g, que corresponde a 172.329 mg Cu, 80.769 mg Zn, 12.262 mg Co y 6.54 mg Se. En el caso del grupo 3 la erosión fue de 2.458 g, con liberaciones de 259.073 mg Cu, 121.425 mg Zn, 18.435 mg Co y 9.832 mg Se. Mientras que en los bolos del grupo 4 la erosión fue de 4.219 g, equivalente a 444.682 mg Cu, 208.418 mg Zn, 31.642 mg Co y 16.879 mg Se.

En las gráficas se puede apreciar que la disolución de los bolos en el inicio del experimento fue elevada, y después de los 7 días fue decreciendo (Figura 12). Esto indica que al administrar un bolo al animal posiblemente muestren aumento significativo de minerales traza en la concentración plasmática en los primeros 7 días del tratamiento, y que después la concentración del elemento se puede mantener o disminuir respecto de la concentración de referencia. Por otro lado, hubiera sido de gran utilidad determinar la concentración de minerales traza en la solución amortiguadora, para tener una idea clara sobre la liberación y efectividad de los bolos durante el periodo de estudio.

El modelo obtenido para predecir la degradación de los bolos en cada grupo indica que a los 180 días desaparecen 0.983, 2.037, 3.227 y 4.744 g para los grupo 1, 2, 3 y 4 respectivamente. Esto permite inferir que los bolos pueden ser efectivos por más de 6 meses. Sin embargo, en las gráficas de la cinética de disolución se puede observar que los bolos presentan disminución significativa en la erosión después de los 7 días, lo cual puede afectar la liberación de los minerales traza y por ende la cantidad necesaria que se requiere para corregir las deficiencias en los rumiantes.

La tasa de liberación teórica se determinó a partir de los valores de erosiones y estimación del área de los bolos, en promedio fue de $3.6206 \text{ mg cm}^2 \text{ día}^{-1}$. Este valor es ligeramente superior al reportado por Zervas (1988), que registró una tasa de disolución en rumen de $2.53 \text{ mg cm}^2 \text{ día}^{-1}$ con bolos de 35 g, con suministro de 11 mg Cu, 0.5 mg Co y 0.21 mg Se. Sin embargo, la liberación de Co y Se son similares a las calculadas en este estudio para los bolos del grupo 4 (0.56 mg Co y 0.30 mg Se), pero difiere con la liberación de Cu (7.940 mg). Esto posiblemente se deba a que los bolos utilizados por el autor tenían mayor concentración de Cu (14 %). En un estudio por Hemingway *et al.* (1997) con vacas fistuladas alimentadas con heno y en pastoreo, registraron tasas de disolución de 8.289 y $10.776 \text{ mg cm}^2 \text{ día}^{-1}$, respectivamente. De igual forma Kendall *et al.* (2012) reportaron disolución de 326 mg día^{-1} , que corresponde a una tasa de liberación de $9.77 \text{ mg cm}^2 \text{ día}^{-1}$.

De acuerdo con Telfer *et al.* (1984) la tasa de liberación total no debe estar por arriba de $25 \text{ mg cm}^2 \text{ día}^{-1}$ para asegurar un tratamiento durante seis meses, incluso utilizando intervalo inferior de velocidad de liberación de hasta $8 \text{ mg cm}^2 \text{ día}^{-1}$ proporcionará minerales traza aproximadamente hasta un año.

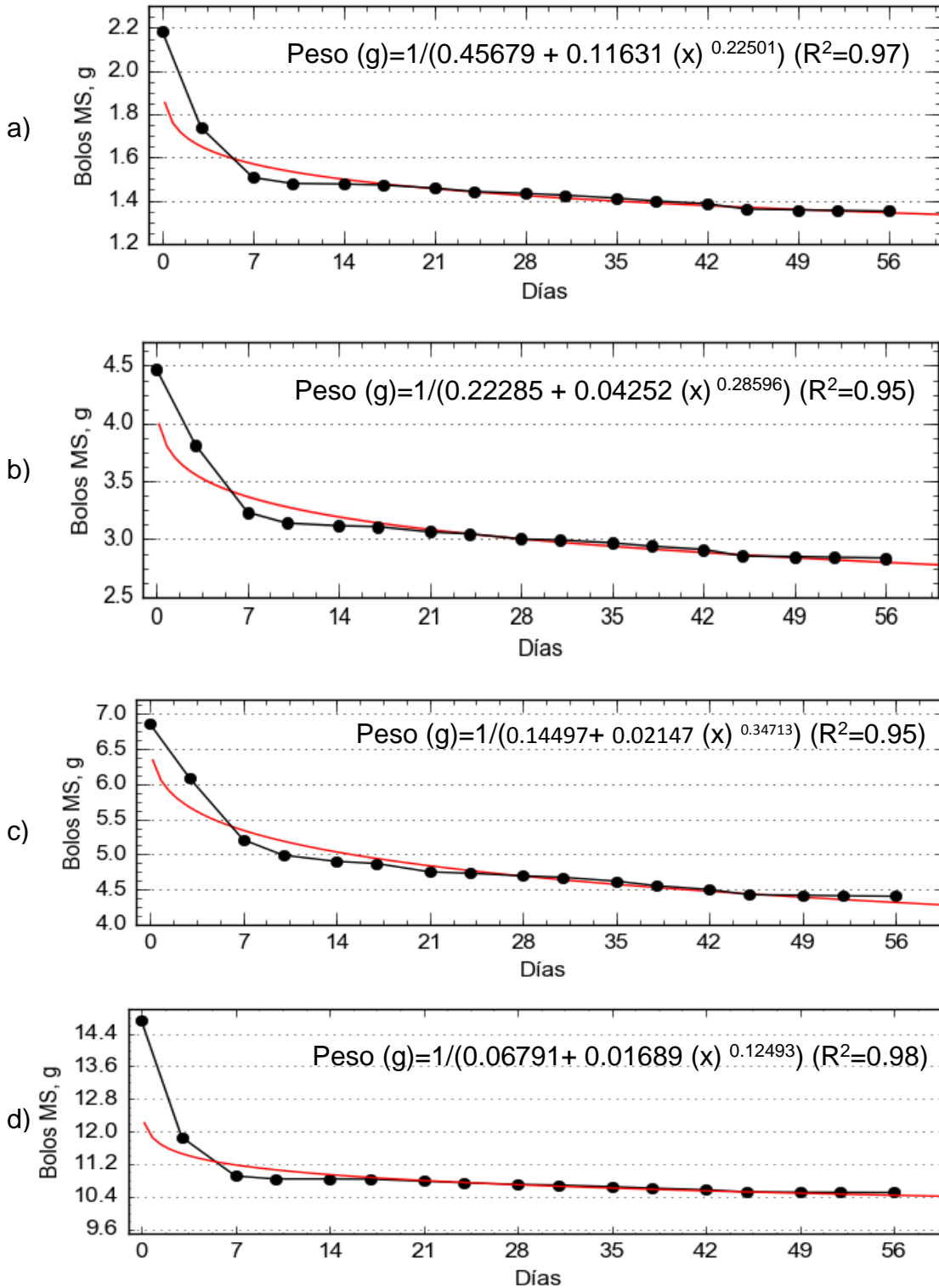


Figura 12. Cinética y curva de ajuste en la disolución de los bolos de lenta liberación con minerales traza en fermentación in vitro. *a): bolos grupo 1; b): bolos grupo 2; c): bolos grupo 3; d): bolos grupo 4.

7. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos y las condiciones experimentales, se concluye lo siguiente:

- Las formulaciones desarrolladas en la etapa I son adecuadas para la elaboración de bolos intrarruminales de lenta liberación con minerales traza, y además cumplen con las características físicas, en particular la densidad superior a 2.0 g/cm³ aseguran su permanencia dentro del rumen.
- Los bolos de T2 y T3 presentaron mejor erosión y tasa de liberación de minerales traza con buenas posibilidades para abatir la deficiencia de estos minerales en los rumiantes en pastoreo.
- La implementación del método de fusión en la fabricación de los bolos intrarruminales de lenta liberación a base de pentóxido de fosforo permitió la obtención de bolos con posibilidades de funcionar como sistemas de liberación prolongada.
- La cinética de disolución de los bolos intrarruminales en fermentación *in vitro* indica que los bolos elaborados a base de pentóxido de fosforo liberan minerales traza hasta por más de 180 días.

8. LITERATURA CITADA

- Ahsan, U., Z. Kamran, I. Raza, S. Ahmad, W. Babar, M. H. Riaz, and Z. Iqbal. 2014. Role of selenium in male reproduction- a review. *Anim. Reprod. Sci.* 146: 55-62.
- Alexander, J. 2015. Selenium. *In: Handbook on the Toxicology of Metals (Fourth Edition)*, 2: 1175-1208.
- Alvear H. E. 2003. Diagnóstico y suplementación mineral en ganado bovino de Zirándaro, Guerrero. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.
- Amador G. E. 2005. Desarrollo de un bolo intra-ruminal para la liberación prolongada de yodo y selenio y su evaluación en el ganado bovino y de la salud animal. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. 139 p.
- Arteaga C. V. 2014. Estado nutricional del ganado y acumulación de forraje en una unidad de producción de becerros. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 102 p.
- Blanco O. M. A., A. K. Spross S, y R. Rosiles M. 2000. Evaluación de comprimidos intrarruminales de selenio por concentración sanguínea y lanar de corderas semiestabuladas. *Vet. Méx.* 31: 121-127.
- Brown, K. M., and J. R. Arthur. 2001. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public. Health Nutr.* 4: 593-599.
- Cano, S. G., J. Rovira, G. Perelló, I. Martorell, N. Tous, M. Nadal, and J. L. Domingo. 2014. Extensive literatura search on the bioavailability of selected trace elements in animal nutrition: Incompatibilities and interactions. EFSA supporting publication, EN-565, 1136 p.

- Cardinal, J. R. 1997. Intraruminal devices. *In: Rathbone, M. J. (ed.). Adv. Drug Deliv. Rev.* 28: 303-322.
- Cardinal, J. R. 2000. Intraruminal controlled release boluses. *In: Rathbone and Gurny (eds). Controlled Release Veterinary Drug Delivery. Biol. Pharm. Consid. Elsevier Sci.* 36: 51-82.
- Ceballos M. A, y F. G. Wittwer M. 1996. Metabolismo del selenio en rumiantes. *Arch. Med. Vet.* 28: 5-18.
- Combs, G. F., and J. P. McClung. 2017. Vitamin B₁₂. *In: The Vitamins (5th Ed.). Fundamental Aspects in Nutrition and Health. Elsevier Sci.* pp: 431-452.
- Corah, L. 1996. Trace mineral requirement of grazing cattle. *Anim. Feed Sci. Tech.* 59: 61-70.
- Cousins, R. J. 2010. Gastrointestinal factors influencing zinc absorption and homeostasis. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 80: 243-248.
- Cousins, R. J., and J. P. Liuzzi. 2018. Trace metal absorption and transport. *In: Said, H. M (ed.). Physiology of the Gastrointestinal Tract (6th Ed.). Ed. Academic Press.* pp: 1485-1498.
- Cousins, R. J., R. K. Blanchard, J. B. Moore, L. Cui, C. L. Green, J. P. Liuzzi, J. Cao, and J. A. Bobo. 2003. Regulation of zinc metabolism and genomic outcomes. *J. Nutr.* 133: 1521S-1526S.
- Crowley, M. M., F. Zhang, M. A. Repka, S. Thumma, S. B. Upadhye, B. S. Kumar, J. W. McGinity, and C. Martin. 2007. Pharmaceutical applications of hot-melt. Extrusion: Part I. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 33: 909-926.

- Cruz D. L. L. M. 2014. Suplementación intraruminal de bolos con minerales traza y vitaminas A, D, E de liberación lenta para evaluar la salud post parto en bovinos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torreón, Coahuila, México. 35 p.
- Das, J. K., R. S. Khan, and Z. A. Bhutta. 2018. Zinc Fortification. *In*: Venkatesh, M. M. G., and Hurrell, R. F. (eds.). Food Fortification in a Globalized World. Ed. Academic Press. pp: 213-219.
- Davis, T. Z., and J.O. Hall. 2017. Selenium. *In*: Gupta, R.C. (ed.), Reproductive and Development Toxicology, (2nd Ed.). Ed. Academic Press. New York. pp: 595-605.
- Fan, L. T., and S. K. Singh. 1989. Controlled release: a quantitative treatment. Polymers Properties and Applications. Ed. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg. 233 p.
- Friedmann, J. P., and M. Conrad. 2018. Selenium and GPX4, a vital symbiosis. *Free Radic. Biol. Med.* 127: 153-159.
- Gómez B. J. R. 2009. Diagnóstico del estado mineral de bovinos en San Juan Del Río, Choapam, Oaxaca. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 66 p.
- Galbraith, M. L., W. R. Vorachek, C. T. Estill, P. D. Whanger, G. Bobe, T. Z. Davis, and J. A. Hall. 2016. Rumen microorganisms decrease bioavailability of inorganic selenium supplements. *Biol. Trace Elem. Res.* 171: 338–343.
- García, D. T., A. L. Teodoro, R. C. I. Ospina, C. A. F. Pachón, and G. J. A. Pardo. 2015. Metabolismo do cobre na nutrição animal: Revisão. *Maringá*, 9: 279-286.
- Garland, T. 2018. Zinc. *In*: Gupta, R. C. (ed.). Veterinary Toxicology (3rd Ed.). Basic and Clinical Principles. Ed. Academic Press. pp: 489-492.

- Goff, J. P. 2018. Invited review: Mineral absorption mechanisms, mineral interactions that affect acid-base and antioxidant status, and diet considerations to improve mineral status. *J. Dairy Sci.* 101: 2763-2813.
- Gutiérrez O. C. 1999. Cinética del selenio ruminal, sanguíneo y fecal a partir de comprimidos intraruminales en ovinos en pastoreo. Tesis de Maestría. Programa de maestría en producción animal: nutrición y alimentación animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 65 p.
- Haase, H. 2017. Zinc signals and immune function. *In: Collins, J. F. (ed.). Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals.* Ed. Academic Press. pp: 261-271.
- Hall, J. O. 2018. Selenium. *In: Gupta, R. C. (ed.). Veterinary Toxicology (3rd Ed.). Basic and Clinical Principles.* Ed. Academic Press. pp: 469-477.
- Hashimoto, A., and T. Kambe. 2015. Mg, Zn and Cu transport proteins: a brief overview from physiological and molecular perspectives. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 61: S116–S118.
- Hefnawy, A. E. G., and P. J. L. Tórtora. 2010. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Ruminant Res.* 89: 185-192.
- Hemingway, R. G., J. J. Parkins, and N. S. Ritchie. 1997. Sustained-release boluses to supply trace elements and vitamins to calves. *Vet. J.* 153: 221-224.
- Jaimes M. J. 2009. Evaluación de sales de selenio orgánico y bolos intra-ruminales de sales de selenio inorgánico. Tesis de Maestría. Programa de maestría en ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. 127 p.

- Jeong, J., and D. J. Eide. 2013. The SLC39 family of zinc transporters. *Mol. Asp. Med.* 34: 612-619.
- Judson, G. H., N. F. Ellis, B. R. Kempe, and M. Shallow. 1991. Long-acting selenium treatment for sheep. *Aust. Vet. J.* 68: 263-265.
- Kendall, N. R., and S. B. Telfer. 2000. Induction of zinc deficiency in sheep and its correction with a soluble glass bolus containing zinc. *Vet. Rec.* 146: 634-637.
- Kendall, N. R., A. M. Mackenzie, and S. B. Telfer. 2001. Effect of a copper, cobalt and selenium soluble glass bolus given to grazing sheep. *Livest. Prod. Sci.* 68: 31-39.
- Kendall, N. R., A. M. Mackenzie, and S. B. Telfer. 2012. The trace element and humoral immune response of lambs administered a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus. *Livest. Sci.* 148: 81-86.
- Kendall, N. R., S. McMullen, A. Green, and R. G. Rodway. 2000. The effect of zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 277-283.
- Kohlmeier, M. 2015. Minerals and trace elements. *In: Nutrient Metabolism (2nd Ed.) Handbook of Nutrients.* Ed. Academic Press. pp: 673-807.
- Kumar, A. A., and D. Parmar. 2017. Role of minerals in reproductive health of dairy cattle: a review. *Int. J. Livest. Res.* 7: 16-18.
- Linder, M. C. 2002. Biochemistry and molecular biology of copper in mammals. *In: Massaro, E. J. (ed.). Handbook of Copper Pharmacology and Toxicology,* Ed. Humana Press. pp: 3–32.

- Lutsenko, S. 2010. Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14: 211-217.
- Lutsenko, S., E. S. LeShane, and U. Shinde. 2007. Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. *Arch. Biochem. Biophys.* 463: 134-148.
- Martínez C. E. 2006. Diagnóstico y suplementación mineral de ganado bovino en condiciones tropicales. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 102 p.
- McDowell, L. R. 2003. *Minerals in Animal and Human Nutrition.* (2nd Ed.). Ed. Elsevier Sci. B.V. 644 p.
- McDowell L. R., y J. D. Arthington. 2005. *Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales.* (4ta Ed.). Universidad de Florida. Gainesville, Florida. USA. 94 p.
- Mesa L. J. M., J. D. García D, D. Corps F, y A. R. Valbuena P. 2016. Trastornos del metabolismo del hierro y el cobre. Hemocromatosis y enfermedad de Wilson. *Medicine* 12: 1094-106.
- Miller, J. K., and R. G. Cragle. 1965. Gastrointestinal sites of absorption and endogenous secretion of zinc in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 48: 370-3.
- Nava O. B. H., y H. A. Navas M. 2017. Incremento de la productividad en proceso de extrusión de perfiles de aluminio con billets de aleación experimental 6063. *Ing. Ind.* 35: 11-25.
- NRC (National Research Council). 2000. *Nutrient Requirements of Beef Cattle.* (7th Rev. Ed.). National Academy Press, Washington, DC. 242 p.

- NRC (National Research Council). 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: (7th Ed.). National Academies Press, Washington, DC. 408 p.
- NRC (National Research Council). 2005. Mineral Tolerance of Animals (2nd Ed.). The National Academies Press. Washington, DC. 510 p.
- Ochoa D. L., M. Igartua O, R. M. Hernández M, A. Gascón R, y J. L. Pedraz M. 2006. Granulación por fusión en mezcladores granuladores de alta velocidad. VITAE, Rev. Fac. Quím. Farm. 13: 40-47.
- Patil, H., R. V. Tiwari, and M. A. Repka. 2016. Hot-Melt Extrusion: from Theory to Application in Pharmaceutical Formulation. AAPS Pharm. Sci. Tech. 17: 20-42.
- Quiroz R. G. F., y J. Bouda. 2001. Fisiopatología de las deficiencias de cobre en rumiantes y su diagnóstico. Vet. Méx. 32: 289-296.
- Ramírez-Orduña, R., R. G. Ramírez, R. H. González, y G. F. W. Haenlein. 2005. Mineral content of browse species from Baja California Sur, México. Small Ruminant Res. 57: 1-10.
- Ramírez- Bribiesca, J. E., J. L. Tórtora, M. Huerta, L. M. Hernández, R. López, and M. M. Crosby. 2005. Effect of selenium-vitamin E injection in selenium-deficient dairy goats and kids on the Mexican plateau. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 57: 77-84.
- Ramírez-Bribiesca, J. E., C. R. Lira, M. R. G. Cruz, y P. A. Romero. 2017. Supplementing selenium and zinc nanoparticles in ruminants for improving their bioavailability meat. *In*: Mihai, G. A. (ed.). Nutrient Delivery. Nanotechnology in the Agri-Food Industry. Ed. Academic Press. pp: 713-747.
- Ramírez-Bribiesca, J. E., J. L. Tórtora, M. Huerta, A. Aguirre, L. M. Hernández. 2001. Diagnosis of selenium status in grazing dairy goats on the Mexican plateau. Small Ruminant Res. 41: 81-85.

- Rathbone, M. J., J. R. Cardinal, and C. R. Ogle. 2000. Mechanisms of drug release from veterinary drug delivery systems. *In*: Rathbone, M. J., and Gurny R. (eds.). *Controlled Release Veterinary Delivery: Biological and Pharmaceutical Considerations*. Ed. Elsevier Sci. pp: 17-50.
- Repka, M. A., S. Bandari, K. V. Raman, A. Q. Vo, H. McFall, M. B. Pimparade, and A. M. Bhagurkar. 2018. Melt extrusión with poorly soluble drugs- an integrated review. *Int. J. Pharm.* 535: 68-85.
- Revilla-Vázquez, A., E. Ramírez-Bribiesca, R. López-Arellano, L. M. Hernández-Calva, J. Tórtora-Pérez, E. García-García, y R. G. Cruz-Monterrosa. 2008. Suplemento de selenio con bolos intrarruminales de selenito de sodio en ovinos. *Agrociencia* 42: 629-635.
- Rodríguez G. A. 2006. Validación del proceso de fabricación de bolos intrarruminales de selenio inorgánico. Tesis para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. 265 p.
- Rosa D. E., y G. A. Mattioli. 2002. Metabolismo y deficiencia de cobre en los bovinos. *Analecta Vet.* 22: 7-16.
- Roy, B., R. P. S. Baghel, T. K. Mohanty, and G. Mondal. 2013. Zinc and male reproduction in domestic animals: a review. *Indian J. Anim. Nutr.* 30: 339-50.
- Ruiz M. D. 2009. Desarrollo de bolos intraruminales por el método de extrusión en caliente. Tesis para obtener el grado de químico farmacéutico biólogo. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. 128 p.
- Salgueiro, M. J., M. Zubillaga, A. Lysionek, M. I. Sarabia, R. Caro, T. De Paoli, A. Hager, and J. Boccio. 2000. Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutr. Res.* 20: 737-755.

- Sáez V, E. Hernáez, L. Sanz. 2002. Sistemas de liberación controlada de medicamentos. Rev Iber Polim 3(3):1-20.
- Seetheram, B., S. Bose, and N. Li. 1999. Cellular import of cobalamin (vitamin B₁₂). J. Nutr. 129: 1761-1764.
- Spears, J. W. 2003. Trace mineral bioavailability in ruminants. J. Nutr. 133: 1506S-1509S.
- Suttle, N. F. 2010. Mineral Nutrition of Livestock. (4th Ed.). CABI Publishing. United Kingdom. 587 p.
- Swain, P. S., S. B. N. Rao, D. Rajendran, G. Dominic, and S. Selvaraju. 2016. Nano zinc, an alternative to conventional zinc as animal feed supplement: a review. Anim. Nutr. 2: 134-141.
- Takagshi, T., T. Hara, and T. Fukada. 2017. Recent advances in the role of SLC39/ZIP zinc transporters in vivo. Inter. J. Mol. Sci. 18: 2708.
- Tasker, J.B. 1992. Current options in selenium supplementation. Proceeding of the 22nd seminar Sheep and Beef Cattle. *In*: Trace Elements in Ruminants. Proc. 22nd Seminar Sheep and Beef Cattle Society, NZVA. 154: 53-59.
- Telfer, S. B., G. Zervas, and P. Knott. 1984. Water soluble glass articles, their manufacture, and their use in the treatment of ruminant animals. United States Patent.
- Torres L. M. E. 2013. Diagnostico mineral de unidades de producción ovina en Tepatitlán, Jalisco. Tesis de Maestría. Programa de maestría en Producción Animal. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 48 p.

- Underwood, E. J. 1981. Los minerales en la nutrición del ganado. (2da Ed.). Ed. Acribia. Zaragoza. España. 133 p.
- Underwood, E. J., and N. F. Suttle. 1999. The mineral nutrition of livestock. (3rd Ed.). Ed. CABI Publishing Wallingford, UK. New York. 614 p.
- Van den Berghe, P. V. E., and L. W. J. Klomp. 2009. New developments in the regulation of intestinal copper absorption. *Nutr. Res.* 67: 658-672.
- Viglierchio M. C. 2000. Aportes de la bioquímica a la interpretación del metabolismo del cobalto. Anuario. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Pampa. pp: 22-28.
- Wang, X., and B. Zhou. 2010. Dietary zinc absorption: a play of Zips and ZnTs in the gut. *IUBMB Life*, 62: 176-182.
- Wright, C. L. 2012. Mineral nutrition and its impact on reproduction. Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle December 3-4; Sioux Falls, SD. pp: 213-221.
- Yasothei, R. 2014. Importance of minerals reproduction in dairy cattle. *Int. J. Sci. Environ. Tech.* 3: 2051-2057.
- Zervas, G. 1988. Treatment of dairy sheep with soluble glass boluses containing copper, cobalt and selenium. *Anim. Feed Sci. Tech.* 19: 79-83.
- Zhao, C. Y., S. X. Tan, X. Y. Xiao, X. S. Qiu, J. Q. Pan, and Z. X. Tang. 2014. Effects of dietary zinc oxide nanoparticles on growth performance and antioxidative status in broilers. *Biol. Trace Elem. Res.* 160: 361-7.