



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

**CARACTERIZACIÓN, CINÉTICA DE LIBERACIÓN Y  
EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD (DL<sub>50</sub>) DE MICRO Y  
NANOCÁPSULAS DE SELPLEX®, SELENITO DE SODIO Y  
VITAMINA E EN VACAS**

**LILIANA VALDIVIEZO MORALES**

**T E S I S**

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

**2016**



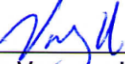



La presente tesis titulada: CARACTERIZACIÓN, CINÉTICA DE LIBERACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD (DL<sub>50</sub>) DE MICRO Y NANOCÁPSULAS DE SELPLEX®, SELENITO DE SODIO Y VITAMINA E EN VACAS.

realizada por la alumna: \_\_\_\_Liliana Valdiviezo Morales \_\_\_\_

bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO	 Dra. Ma. Esther Ortega Cerrilla
ASESOR	 Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas
ASESOR	 Dr. Humberto Vaquera Huerta
ASESOR	 Dra. Leonor Miranda Jiménez
ASESOR	 Dr. Jorge Ramsy Kawas Garza
ASESOR	 Dr. Pedro Zetina Córdoba

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2016

# **CARACTERIZACIÓN, CINÉTICA DE LIBERACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD (DL<sub>50</sub>) DE MICRO Y NANOCÁPSULAS DE SELPLEX®, SELENITO DE SODIO Y VITAMINA E PARA VACAS**

**Liliana Valdiviezo Morales, DC.**

**Colegio de postgraduados, 2016**

## **RESUMEN GENERAL**

El objetivo del presente estudio fue caracterizar, evaluar la cinética de liberación y toxicológica de micro y nanocápsulas de Selplex®, selenito de sodio y vitamina E para su administración vía intramamaria, con dos diferentes tipos de agentes encapsulantes: carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC) y alginato de sodio (NaAlg). Las micro y nanocápsulas fueron elaboradas por el método de nanoprecipitación. La caracterización morfológica de las micro y nanocápsulas fue mediante microscopía electrónica de barrido. La distribución de tamaños de las partículas se determinó mediante la técnica óptica de dispersión de luz dinámica (DLS). Se evaluó la cantidad total encapsulada, el porcentaje de rendimiento y de recuperación, además de la cinética de liberación de SeMet y SeCys (para las nano y microcápsulas de Selplex®), selenito de sodio y por último se determinó  $\alpha$  y  $\gamma$ -tocoferol (para las de vitamina E). Se utilizó como testigo la liberación de cada uno de los activos sin encapsular a través del vehículo de entrega (carbopol 2%). Se observó que para SeCys, el porcentaje de encapsulación mayor se presentó para el T3 con una media de 65.67% con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, para SeMet el porcentaje de encapsulación mayor (numéricamente) fue T3 con una media de 9.6966% sin diferencias en los tratamientos ( $p > 0.05$ ). En el porcentaje de encapsulación de selenito, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Presentando valores bastante altos para todos los tratamientos con medias de 81.33%, 89.67%, 88% y 94.67% de selenito de sodio. Para las capsulas de Vitamina E, en los porcentaje de encapsulación no se observaron diferencia significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamiento ni en interacciones. Con porcentajes de rendimientos bajos para los tres tipos de partículas. En la cinética de liberación, se observó un efecto por el tipo y concentración de polímero para SeMet y SeCys, encontrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los

tratamientos. El mayor control de liberación observado de la SeMet y SeCys fue para los sistemas CMC2SeMet y CMC2SeCys alcanzando un liberación del 0.21 y 1.99% a las 312 h, la liberación se dio de manera ascendente en función al tiempo. La cinética de liberación de las micro y nanocápsulas de selenito de sodio (T3 y T4) fue de manera lenta y constante en función del tiempo. En estos tratamientos (T3 y T4) se alcanzó una liberación del 1.35 y 1.62% a las 312 h, encontrando diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.5$ ) y el testigo. En cuanto al comportamiento de liberación, se observaron valores de  $n$  arriba de 1 para los dos tipos de partículas estudiadas (Selplex® y selenito de sodio), esto nos indica que la liberación de los activos de ambos sistemas está explicado mediante un proceso de relajación de las cadenas poliméricas. Por último, en la evaluación toxicológica se observó que las partículas de NaAlg0.5%Selplex®, NaAlg2%Selplex® y CMC0.5%Selplex® no presentaron toxicidad aguda (muerte) a dosis menores o iguales a 5000 mg kg<sup>-1</sup> de peso vivo. Sin embargo, para el tratamiento CMC2%Selplex® si se presentó una LD<sub>50</sub> de 3807.90 mg kg<sup>-1</sup>. Así pues, para los sistemas NaAlg0.5%Selenito, CMC0.5%Selenito, CMC2%Selenito y NaAlg2%Selenito tuvieron una LD<sub>50</sub> de 8.94 mg kg<sup>-1</sup>, 5.66 mg kg<sup>-1</sup>, 8.94 mg kg<sup>-1</sup> y 12.25 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Se concluye que el método de nanoprecipitación no es el más adecuado al menos para la encapsulación a nano y microescala del Selplex® y Vitamina E. Sin embargo, si es adecuada para la encapsulación de Selenito de sodio, por la afinada presentada del activo con los polímeros utilizados. El mejor control lo tuvo la CMC para ambos activos. Por último, en cuanto a la toxicidad las micro y nanocápsulas de Selplex® tienen un grado de seguridad muy alto pero no así para las de selenito de sodio que presenta una dosis letal menor, pero mayor que los datos presentados en la literatura.

**Palabras clave:** Selenio, microcápsulas, nanocápsulas, cinética de liberación, dosis letal.

# **CHARACTERIZATION, RELEASE AND EVALUATION OF TOXICITY (LD<sub>50</sub>) OF MICRO AND NANOCAPSULES OF SELPLEX®, SODIUM SELENITE AND VITAMIN AND FOR COWS**

**Liliana Valdiviezo Morales, DC.**

**Colegio de postgraduados, 2016**

## **ABSTRACT**

The aim of the present study was to characterize the release and toxicological kinetics of Selplex ® and sodium selenite and vitamin E nanocapsules for intramammary administration with two different types of encapsulating agents: sodium carboxymethylcellulose (NaCMC) and Sodium alginate (NaAlg). The micro and nanocapsules were made by the nanoprecipitation method. The morphological characterization of the micro and nanocapsules was by scanning electron microscopy. The particle size distribution was determined by optical light scattering (DLS). The total encapsulated amount, percent yield and recovery, in addition to the release kinetics of SeMet and SeCys (for nano and microcapsules of Selplex®), sodium selenite and finally  $\alpha$  and  $\gamma$ -tocopherol ( For those of vitamin E). The release of each of the unencapsulated actives through the delivery vehicle (carbopol 2%) was used as a control. It was observed that for SeCys, the highest percentage of encapsulation was presented for T3 with an average of 65.67% with a significant difference ( $p < 0.05$ ). On the other hand, for SeMet the highest (numerically) encapsulation percentage was T3 with a mean of 9.6966% without differences in treatments ( $p > 0.05$ ). In the percentage of selenite encapsulation, no significant differences were observed ( $p > 0.05$ ). Presenting fairly high values for all treatments with averages of 81.33%, 89.67%, 88% and 94.67% sodium selenite. For vitamin E capsules, no significant difference ( $p > 0.05$ ) was observed between treatments or interactions in the percentages of encapsulation. With low yield percentages for all three particle types. In the release kinetics, an effect was observed by the type and concentration of polymer for SeMet and SeCys, finding significant differences ( $p < 0.05$ ) between the treatments. The highest observed release control of the SeMet and SeCys was for the CMC2SeMet and CMC2SeCys systems reaching a release of 0.21 and 1.99% at 312 h, release was given as a function of time. The release

kinetics of sodium selenite (T3 and T4) micro and nanocapsules were slow and constant as a function of time. In these treatments (T3 and T4) a release of 1.35 and 1.62% was reached at 312 h, finding significant differences between treatments ( $p < 0.5$ ) and the control. As for the release behavior, values of  $n$  above 1 were observed for the two types of particles studied (Selplex® and sodium selenite), this indicates that the release of the active of both systems is explained by a relaxation process of the polymer chains. Finally, in the toxicological evaluation it was observed that NaAlg0.5% Selplex®, NaAlg2% Selplex® and CMC0.5% Selplex® particles did not present acute toxicity (death) at doses less than or equal to 5000 mg kg<sup>-1</sup> of Live weight. However, for CMC2% Selplex® treatment, an LD<sub>50</sub> of 3807.90 mg kg<sup>-1</sup> was present. Thus, for the systems NaAlg0.5% Selenite, CMC0.5% Selenite, CMC2% Selenite and NaAlg2% Selenite had an LD<sub>50</sub> of 8.94 mg kg<sup>-1</sup>, 5.66 mg kg<sup>-1</sup>, 8.94 mg kg<sup>-1</sup> and 12.25 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. It is concluded that the nanoprecipitation method is not at least adequate for the nano and microscale encapsulation of Selplex® and Vitamin E. However, if it is suitable for the encapsulation of sodium selenite, by the presented tuning of the active with the Polymers used. The best control was the CMC for both assets. Finally, in terms of toxicity Selplex® micro and nanocapsules have a very high degree of safety, but not for those of sodium selenite that presents a lower lethal dose, but higher than the data presented in the literature.

Key words: Selenium, microcapsules, nanocapsules, release kinetics, lethal dose.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por apoyar a la ciencia en México y permitir concluir mis estudios de Doctorado.

Al Colegio de Postgraduados y al Programa de Ganadería por darme la oportunidad de obtener el grado de Doctora en Ciencia.

A la Dra. Ma. Esther Ortega Cerrilla, por la confianza y apoyo que me brindo en mi formación profesional.

A la Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas, por el apoyo y las facilidades brindadas en los laboratorios de Nanotecnología de la Universidad de las Americas Puebla.

Al Dr. Humberto Vaquera Huerta, al Dr. Jorge R. Kawas, por su valiosa contribución, asesoría en la realización de la presente investigación.

A la Dra. Leonor Miranda Jimenez, por la confianza y apoyo que me brindo en mi formación profesional.

A la Dr. Jorge Ramsy Kawas Garza, por la confianza y apoyo que me brindo en mi formación profesional.

A la Dr. Pedro Zetina Córdoba, por la confianza y apoyo que me brindo en mi formación profesional.

A la Sra. Ana Luisa Espinoza por su apoyo incondicional durante mi doctorado.

Finalmente agradezco a todas esas personas que aportaron en gran forma durante mi investigación.

## DEDICATORIA

A mis padres:

Hipólito Valdiviezo y Carmen Morales, por enseñarme a luchar, por su gran corazón y capacidad de entrega pero sobre todo por enseñarme a ser responsable, gracias a ustedes he llegado a esta meta.

A mis hermanos:

Adriana Valdiviezo y Freddy Valdiviezo por su amor y apoyo incondicional, que me motiva a seguir adelante. Gracias!

A mis amigos:

Miriam H., Francisco C., Adrian C., Uriel H., Yuridia B., Karen P., Rigoberto V., Miguel C., Hector C.,  
Eva S. por su cariño y apoyo.



## CONTENIDO

Pag.

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
Nanotecnología.....	2
Microencapsulación.....	3
Técnicas de micro y nanoencapsulación.....	4
Evaporación/extracción del solvente.....	4
Polimerización interfacial.....	5
Nanoprecipitación.....	5
Secado por aspersion o atomización.....	5
Materiales de encapsulación.....	6
Carboximetilcelulosa sódica (NaCMC).....	6
Alginato de sodio.....	7
Mecanismos de liberación.....	8
Liberación controlada de las micropartículas y nanopartículas.....	8
Caracterización de micro y nanopartículas.....	9
Cuantificación de selenio.....	10
Cuantificación de Vitamina E (Tocoferoles).....	10
Determinación Morfológica de las microcápsulas y nanocápsulas.....	11
Microscopio electrónico de barrido (MEB).....	11
Microscopio electrónico de transmisión (MET).....	12
Características de algunos activos.....	12
SELPLEX®.....	12
Selenometionina.....	12
Selenocisteína.....	13
Selenito de sodio.....	14
Vitamina E.....	14
Importancia de la suplementación macro y micromineral en bovinos.....	16
Metabolismo y absorción mineral en ganado lechero.....	16
Mastitis bovina.....	18
Susceptibilidad a mastitis durante el periodo seco.....	19
La función del selenio y vitamina E en la mastitis.....	20

Estudios toxicológicos .....	22
Toxicidad del selenio .....	23
JUSTIFICACIÓN .....	24
OBJETIVOS GENERALES .....	25
BIBLIOGRAFÍA .....	26
CAPÍTULO I .....	33
SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MICROCÁPSULAS Y NANOCÁPSULAS DE SELPLEX <sup>®</sup> , SELENITO DE SODIO Y VITAMINA E .....	33
RESUMEN .....	33
ABSTRACT .....	35
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	37
OBJETIVO .....	37
HIPÓTESIS .....	37
MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
Material .....	38
Método .....	39
Obtención de micro y nanocápsulas de Selplex <sup>®</sup> , selenito de sodio y vitamina E .....	39
Caracterización de las micro y nanocápsulas de Selplex <sup>®</sup> , selenito de sodio y vitamina E .....	40
Tamaño de partícula .....	40
Microscopía electrónica .....	40
Determinación de eficiencia de encapsulación, recuperación y rendimiento en la encapsulación de los activos. ....	40
Procedimiento cromatográfico .....	41
Curva de calibración de seleniometionina, selenocisteína, selenito de sodio y $\alpha$ -tocoferol y $\gamma$ -tocoferol. ....	42
Curva de calibración de la selenometionina .....	42
Curva de calibración de la selenocisteína .....	43
Curva de calibración de la selenito de sodio .....	44
Curva de calibración de vitamina de $\alpha$ y $\gamma$ – Tocoferol (vitamina E) .....	45
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	48
Morfología .....	48

Fotomicrografía de las micro y nanocápsulas de SELPLEX®, Selenito de sodio y Vitamina E.....	48
Total encapsulado, porcentaje de encapsulación y rendimiento de SELPLEX® .....	50
Total encapsulado, porcentaje de encapsulación y rendimiento de selenito de sodio .....	55
Total encapsulado, porcentaje de encapsulación y rendimiento de vitamina E ( $\alpha$ y tocoferol) .....	58
Tamaño de partícula .....	62
Micro y nanopartículas de Selplex® .....	62
Micro y nanopartículas de Selenito de sodio.....	63
Micro y nanopartículas de Vitamina E .....	65
CONCLUSIÓN.....	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67
CAPITULO II .....	70
EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN PARA LAS MICRO Y NANOCÁPSULAS DE SELPLEX®, SELENITO DE SODIO Y VITAMINA E.....	70
RESUMEN .....	70
ABSTRACT.....	72
JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA .....	74
OBJETIVO.....	74
HIPÓTESIS.....	74
MATERIALES Y MÉTODOS .....	75
Material.....	75
Método .....	75
Evaluación de la cinética de liberación (selenometionina, selenocisteina y selenito de sodio).....	75
Preparación del gel bioadhesivo (carbopol C971) como vehículo de entrega .....	75
Adición de la solución madre para cada activo y nano y/o microcápsulas de cada activo al vehículo ..	75
Cinética de liberación desde el vehículo de entrega de los activos sin .....	76
ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	78
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	78
Evaluación <i>in vitro</i> de la cinética de liberación de Selplex® (Selenometionina y Selenocisteina) y selenito de sodio desde gel bioadhesivo (carbopol al 2%) .....	78
CONCLUSIÓN.....	82
BIBLIOGRAFÍA.....	83
CAPITULO III .....	84

DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA (LD <sub>50</sub> ) DE MICRO Y NANOCÁPSULAS DE SELPLEX® (SELENOMETIONINA Y SELENOCISTEINA) Y SELENITO DE SODIO EN RATONES. ....	84
RESUMEN .....	84
ABSTRACT.....	86
JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA .....	88
OBJETIVO.....	88
HIPÓTESIS.....	88
MATERIALES Y MÉTODOS .....	89
Material biológico .....	89
Partículas.....	89
Determinación de toxicidad aguda .....	90
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	92
Determinación de DL <sub>50</sub> .....	92
Observación del comportamiento posterior a la aplicación de los tratamientos .....	94
BIBLIOGRAFÍA.....	99

<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>PAG.</b>
Cuadro 1. Métodos de encapsulación.....	4
Cuadro 2. Materiales utilizados en la encapsulación. ....	6
Cuadro 3. Métodos para la cuantificación de tocoferoles.....	11
Cuadro 4. Nomenclatura y propiedades físicas de la composición de tocol y tocotrienoles.....	15
Cuadro 5. Composición de las nano y micropartícula generadas en el diseño de experimento.....	39
Cuadro 6. Concentración de SeMet y área, para la construcción de la curva de calibración.....	42
Cuadro 7. Concentración de SeCys y área, para la construcción de la curva de calibración.....	44
Cuadro 8. Concentración de selenito de sodio y área, para la construcción de la curva de calibración. ....	45
Cuadro 9. Concentración de $\gamma$ - tocoferol y área, para la construcción de la curva de calibración. ....	46
Cuadro 10. Concentración de $\alpha$ - tocoferol y área, para la construcción de la curva de calibración.....	47
Cuadro 11. Total de encapsulación (Medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	52
Cuadro 12. Porcentaje de encapsulación (Medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	53
Cuadro 13. Porcentaje de rendimiento (Medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	54
Cuadro 14. Total de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	56
Cuadro 15. Porcentaje de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	57
Cuadro 16. Porcentaje de rendimiento (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	58
Cuadro 17. Total de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	59
Cuadro 18. Porcentaje de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	61
Cuadro 19. Porcentaje de rendimiento (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	62
Cuadro 20. Condiciones experimentales utilizadas para los perfiles de liberación desde el gel bioadhesivo (carbopol 971) para cada activo sin encapsular y encapsulados. ....	76
Cuadro 21. Parámetros cinéticos obtenidos desde las curvas de liberación para el gel bioadhesivo sin y con micro y nanopartículas. ....	81
Cuadro 22. Tratamientos, dosis y número de animales utilizados en el experimento.....	89
Cuadro 23. Cálculos de LD <sub>50</sub> de las micro y nanopartículas de Selplex®.....	92
Cuadro 24. Cálculos de la LD <sub>50</sub> de las micro y nanocápsulas selenito de sodio.....	93

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>PAG.</b>
Figura 1. Estructura de la celulosa (a) y NaCMC con grado de sustitución de 1.5 (b).....	7
Figura 2. Estructura de las dos unidades monoméricas del ácido algínico: $\beta$ -D- Ácido manurónico y $\alpha$ -L-Ácido gulurónico.....	8
Figura 3. Estructura molecular de la metionina y selenometionina mostrando la ubicación de la sustitución del átomo de selenio en lugar del azufre. ....	13
Figura 4. Fórmula de la selenocisteína. ....	14
Figura 5. Estructura química del $\alpha$ -tocoferol.....	15
Figura 6. Curva de calibración para la cuantificación de SeMet. ....	43
Figura 7. Curva de calibración para la cuantificación de SeCys.....	44
Figura 8. Curva de calibración para la cuantificación de selenito de sodio.....	45
Figura 9. Curva de calibración para la cuantificación de $\gamma$ - tocoferol.....	46
Figura 10. Curva de calibración para la cuantificación de $\alpha$ – tocoferol.....	47
Figura 11. Micrografía electrónica de barrido (MEB) de micro y nanocápsulas de Selplex®, selenito de sodio y vitamina E, formuladas mediante el método de nanoprecipitación después de previa liofilización. a).- NaCMC 2% selplex®; b).- NaCMC 0.5% selplex®; c).- NaAlg 2% selplex®; d).- NaAlg 0.5% selplex®; e).- NaCMC 2% NaSe; f).- NaCMC 0.5% NaSe. ....	49
Figura 12. Micrografía electrónica de barrido (MEB) de micro y nanocápsulas de Selplex®, selenito de sodio y vitamina E, formuladas mediante el método de nanoprecipitación después de previa liofilización. f).- NaCMC 0.5% NaSe; g).- NaAlg 2% NaSe; h).- NaAlg 0.5% NaSe; i).- NaCMC 2% Vit E; j).- NaCMC 0.5% Vit E; k).- NaAlg 2% Vit E; l).- NaAlg 0.5% Vit E. ....	50
Figura 13. Total de encapsulación (Medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	52
Figura 14. Porcentaje de encapsulación (Medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	53
Figura 15. Porcentaje de rendimiento (Medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	54
Figura 16. Total de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	56
Figura 17. Porcentaje de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	57
Figura 18. Porcentaje de rendimiento (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	58
Figura 19. Total de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	59
Figura 20. Porcentaje de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	60
Figura 21. Porcentaje de rendimiento (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar. ....	61

Figura 22. Distribución de frecuencia de tamaño de las micro y nanocápsulas de selenito de sodio mediante nanoprecipitación. a).- Alg0.5Sx; b).- Alg2Sx; c).- CMC0.5Sx; d).- CMC2Sx. ....	63
Figura 23. Distribución de frecuencia de tamaño de las micro y nanocápsulas de selenito de sodio mediante nanoprecipitación. a).- CMC0.5Se; b).- CMC2Se; c).- Alg0.5Se; d).- Alg2Se. ....	64
Figura 24. Distribución de frecuencia de tamaño de las micro y nanocápsulas de selenito de sodio mediante nanoprecipitación. a).- Alg0.5VitE; b).- Alg2VitE c).- CMC0.5VitE; d).- CMC2VitE. ....	65
Figura 25. Esquema utilizado para los perfiles de liberación. ....	77
Figura 26. Cinética de liberación de la SeMet y SeCys desde gel bioadhesivo sin encapsular (testigo) y con micro y nanocápsulas en agua bidestilada como medio de disolución a 37°C. ....	79
Figura 27. Cinética de liberación de la Selenito de sodio desde gel bioadhesivo sin encapsular (testigo) y con micro y nanocápsulas en agua bidestilada como medio de disolución a 37°C. ....	80
Figura 28. Distribución aleatoria de los animales.....	90
Figura 29. Administración oral de las micro y nanocápsulas de selplex® y selenio de sodio. ....	91
Figura 30. Necropsia de los ratones. ....	91
Figura 31. Presencia de diarrea en los tratamientos CMC al 0.5%/selplex®, Alg al 0.5%/selplex®, CMC al 2%/selplex® y Alg al 2%/selplex®.....	95
Figura 32. Cambios de color y consistencias en el hígado de ratones. ....	95
Figura 33. Aspecto del estómago e intestino grueso y delgado en ratones.....	97

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Con el fin de incrementar la estabilidad y modificar las características físicas de ingredientes funcionales para su fácil manipulación o bien, controlar la liberación de un fármaco en el sitio específico y/o momento deseado, o bien mantener elementos esenciales dentro de los límites permitidos para salvaguardar la integridad funcional y estructural de los tejidos, se ha recurrido a la utilización de técnicas biotecnológicas que proporcionen estas características tanto químicas como físicas. La encapsulación a escala micro o nanométricas puede ayudar a mejorar la liberación, absorción y/o permitir al compuesto a realizar su acción en el lugar adecuado así como potencializar la eficiencia del bioactivo sin otorgarle propiedades sensoriales indeseables (Sanguansri y Augustin, 2006). El concepto de nano y microencapsulación se deriva de su tamaño. La microencapsulación consiste en rodear o recubrir una sustancia o compuesto sólido y líquido con una envoltura suficientemente resistente y estable, inmisible aunque adherente a la sustancia. Por otro lado, la nanotecnología es un campo de las ciencias aplicadas dedicado al control y manipulación de la materia (nanomateriales) a escalas menores a un micrómetro, a nivel átomos o moléculas (la mil millonésima parte del metro), caracterizándose como un área multidisciplinaria (Waldner, 2010). Dependiendo de la estructura interna del sistema formulado bajo estas técnicas, estas se clasifican como microcápsulas o microesferas, o bien, nanoesferas y nanocápsulas (Lopretti *et al.*, 2011). El objetivo de estas técnicas es proteger sustancias sensibles a factores externos, enmascarar las propiedades organolépticas de las sustancias, controlar la liberación de la sustancia, además de favorecer la manipulación segura de sustancias tóxicas y dirigir la liberación de la droga al órgano blanco (Jyothi *et al.*, 2010).

Existe una gran variedad de materiales utilizados como agentes encapsulantes tales como etilcelulosa, propilmetilcelulosa hidroxil, carboximetilcelulosa sódica, alginato de sodio, gelatina, poliésteres, quitosanos, etc., y se han propuesto diversos métodos para la formulación de micropartículas y nanocápsulas; físicos, químicos y físico-químicos (Lopretti *et al.*, 2011).



Algunos autores destacan las posibles aplicaciones en el área animal como la administración de medicamentos, nutrimentos como probióticos, suplementos y otras sustancias de forma controlada. Para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades sin necesidad de realizar cirugías, así como el avance en los registros de identidad que permita dar seguimiento al historial de un animal o bien del hato, y en el área de reproducción, con inmunosensores hormonales.

La introducción de las innovaciones biotecnológicas en la producción animal, ha creado oportunidades para aumentar el bienestar de las personas, cuyo medio de vida dependen de la ganadería. Sin embargo, la presencia de obstáculos como el deterioro de las tierras, la contaminación ambiental, el calentamiento global, la erosión de los recursos zoogenéticos, la escasez de agua y las nuevas enfermedades atentan contra el crecimiento del sector a nivel mundial (Ruane y Sonnino, 2011). Estos problemas pueden ser resueltos con la aplicación de biotecnologías ganaderas. En los últimos años, las aplicaciones biotecnológicas de micro y nanoencapsulación en el área de la medicina veterinaria y producción animal, han sido de gran interés. El descubrimiento de comportamientos fisicoquímicos no esperados de la materia a escala micro y nanométrica ha sido de gran utilidad en medicina veterinaria y producción animal.

## **Nanotecnología**

Cuando se habla de productos nanotecnológicos se refiere a la manipulación de la materia a escala *nano*; un nanómetro (nm) es la mil millonésima parte de un metro. Se trata de un campo multidisciplinario y cohesionado por la escala de la materia con que se trabaja; a ese nivel la Física, Química, Biología, Ciencia de los Materiales e Ingeniería convergen hacia los mismos principios y herramientas. Una manera menos compleja de definirla es: “Ciencia que se dedica a la fabricación de tecnología en miniatura” (Martins *et al.*, 2008).

El padre de la nanotecnología, Richard Phillips Feynman ganador del premio Nobel de Física en 1959 ante la Sociedad Americana de esta disciplina impartió la conferencia *There is plenty of room at the bottom*, en ella expresó (Feynman R., 1959). “*Los principios de la física tal y como yo lo entiendo no dicen nada en contra de la*

*posibilidad de manipular las cosas átomo a átomo. No es un intento de infringir ley alguna. Es algo, en principio, que puede hacerse, pero que en la práctica no se ha hecho porque somos demasiado grande”. En otra parte señaló: “¿Qué pasaría si pudiéramos disponer los átomos uno por uno a voluntad... No puedo entrever exactamente qué pasaría, pero no me cabe duda que cuando tengamos algún control de las disposiciones de cosas a pequeña escala obtendremos un espectro enormemente mayor de posibles propiedades que las sustancias puedan tener.”*

La materia a esta escala (nanométrica), no se rigen por la ley de la gravedad, sino las leyes cuánticas; fenómenos como la conducción eléctrica, el calor, la resistencia, la elasticidad, la reactividad y otras propiedades, se comportan de manera diferente a los mismos elementos a mayor escala. De esa manera, un material blando puede tornarse duro o podría cambiar de color. Las propiedades de estos productos dependen de cómo estén dispuestos esos átomos. Por ejemplo, si se reubican los átomos del grafito (compuesto por carbono) de la mina de un lápiz se podrían hacer diamantes (carbono cristalizado) o si se reubican los de la arena (compuesta básicamente por sílice) y se añaden otros elementos extras, se harían los chips de un ordenador (Montague, 2008).

### **Microencapsulación**

La microencapsulación es una técnica mediante la cual los compuestos denominados activos, que pueden encontrarse en estado sólidos, líquidos o gaseosos, como; antioxidantes, vitaminas, saborizantes, bactericidas entre otros, son introducidos en una matriz o sistema pared, de naturaleza polimérica con el fin de protegerlos del medio ambiente, de su interacción con otros componentes del alimento, o bien para controlar su liberación (Yañez *et al.*, 2002). La técnica de encapsulación ha permitido solucionar algunos problemas presentes en la aplicación de ingredientes y aditivos alimentarios, como por ejemplo, enmascarar sabores indeseados, reducir la volatilidad e incrementar la estabilidad de activos encapsulados bajo condiciones ambientales adversas (Favaro *et al.*, 2010). Existen diferentes técnicas para la realización del proceso de microencapsulación (Brazel, 1999).

## Técnicas de micro y nanoencapsulación

En la literatura se encuentran diversos métodos aplicados a la encapsulación de agentes activos (Brazel, 1999). Algunos autores clasifican los métodos de encapsulación en procesos físicos, físico-químicos y químicos, como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro. 1. Métodos de encapsulación

<b>Procesos químicos</b>
Polimerización interfacial
Polimerización <i>in situ</i>
Policondensación
<b>Procesos físico-químicos</b>
Coacervación
Encapsulación solución-gel
Microencapsulación asistida con CO <sub>2</sub> supercrítico
<b>Métodos físico-mecánicos</b>
Secado por atomización y congelación
Lecho de fluidizado
Evaporación de solventes

Fuente: Lopretti *et al.*, (2011)

La selección del método de encapsulación dependerá de la aplicación deseada para las micropartículas, el tamaño de partícula requerido, de las propiedades físicas y químicas del agente encapsulante y agente activo, y del costo, entre otros (Magdassi y Vinetsky, 1996; Brazel, 1999). Varias técnicas de encapsulación consideradas nuevas, incluso cuentan con patentes. Sin embargo, cada técnica tiene sus ventajas, limitaciones y aplicaciones.

### Evaporación/extracción del solvente

En este método están incluidos todos los procesos en los que tiene lugar la eliminación del solvente, en el que está disuelto el polímero, ya sea por evaporación o por extracción de este. En todos los casos previamente tiene que formarse una emulsión. En dependencia de la naturaleza de la fase continua de la emulsión que se forme se clasificarán en técnicas de evaporación/extracción del solvente en fase acuosa o en fase oleosa (Gamisans *et al.*, 1999).

## **Polimerización interfacial**

Este método utiliza las ventajas de ciertos polímeros con rápida velocidad de polimerización. Al utilizar ciertos monómeros (ej. cianoacrilato) que se disuelven junto con el fármaco en éter de petróleo y etanol absoluto, para posteriormente ser extruidos a través de una aguja sobre una solución acuosa del surfactante.

## **Nanoprecipitación**

Esta técnica presenta numerosas ventajas, es sencilla, rápida y fácil de realizar. La formación de nanopartículas es instantáneo y el procedimiento completo se lleva a cabo en solo un paso. Para ello, se requieren dos solventes que sean miscibles. El polímero como el fármaco se deben disolver en un primer sistema (el solvente), pero no en el segundo sistema (no solvente). Esto ocurre por una rápida desolvación del polímero cuando la solución del polímero se agrega al no solvente, inmediatamente el polímero precipita, envolviendo y atrapando al fármaco, lo que permite la formulación de nanopartículas de 100 a 300 nm con una estrecha distribución (Romero *et al.*, 2010), además, no requiere de grandes tasas de agitación, sonicación o temperaturas muy altas, condiciones que pueden dañar la estructura de las proteínas. La nanoprecipitación, se emplea para encapsular compuesto lipofílicos, formando nanoesferas (Noronha *et al.*, 2013).

## **Secado por aspersión o atomización**

El secado por aspersión o secado spray es comúnmente utilizado en las industrias farmacéuticas y alimentarias, dado que es un método económico y efectivo para la obtención de microcápsulas o microesferas. Tiene la ventaja de homogenizar el material a encapsular con el agente encapsulante o polímero, la mezcla es alimentada al secador y se atomiza por medio de una boquilla (Yáñez *et al.*, 2002). El tamaño de las partículas formuladas oscila entre 1-100 micrómetros, aunque cabe mencionar que depende de las condiciones del proceso, es decir, está condicionado por las características del agente encapsulante y de las del agente a encapsular. El proceso se compone principalmente de cuatro fases: atomización, contacto de las gotas con el aire caliente, evaporación y separación del producto-aire húmedo.

## Materiales de encapsulación

Los agentes encapsulantes pueden seleccionarse a partir de una gama de polímeros naturales y sintéticos (Cuadro 2), dependiendo del material a encapsular y de las características deseadas en el producto final.

Cuadro 2. Materiales utilizados en la encapsulación.

Tipo de encapsulante	Agente encapsulante
Gomas	Agar, alginato de sodio, carragenina, goma arábica
Carbohidratos	Almidón, dextranos, sacarosas, jarabes de maíz
Celulosas	Etilcelulosa, metilcelulosa, acetilcelulosa, nitrocelulosa, carboximetil-celulosa
Lípidos	Ceras, parafinas, diglicéridos, monoglicéridos, aceites, grasas, ácido esteárico, trisetearina
Proteínas	Gluten, caseína y albumina
Materiales inorgánicos	Sulfato de calcio, silicatos

### Carboximetilcelulosa sódica (NaCMC)

Es un derivado de la celulosa, la cual químicamente corresponde a la sal sódica de la carboximetilcelulosa. Se obtiene mediante tratamiento de la celulosa del algodón o de maderas con hidróxido de sodio y ácido cloroacético, de esta manera, la celulosa de naturaleza aniónica reacciona nucleofílicamente desplazando el átomo de cloro para producir un enlace éter, derivado como un subproducto de cloruro de sodio y glicolato de sodio, los cuales se separan y se obtiene la carboximetilcelulosa (Hao-Ying Li *et al.*, 2010).

Actualmente, la carboximetilcelulosa está siendo objeto de investigaciones para aplicaciones médicas y farmacéuticas, debido a las propiedades de este material, por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad. Debido a las propiedades funcionales y físico-químicas, se le han encontrado diversas aplicaciones en la industria

médica, farmacéutica y agrícola, entre otras. Estas se basan básicamente en el grado de sustitución, es decir el número promedio de grupos carboximetílicos que son sustituidos por cada unidad de glucosa anhidra, o bien por su grado de polimerización y peso molecular. Comercialmente la NaCMC es clasificada en base a su grado de pureza en: técnico (55 -80%), refinado (92 – 96%) y súper refinado (99.5% mínimo), éste último utilizado para productos farmacéuticos. Es soluble en agua, sin embargo al igual que todos los polímeros tienden a aglomerarse. En productos farmacéuticos es utilizada como estabilizador, emulsificador y dispersante de polvos, agentes de films, teniendo así la capacidad de resistencia a ácidos y bases (Figura 1).

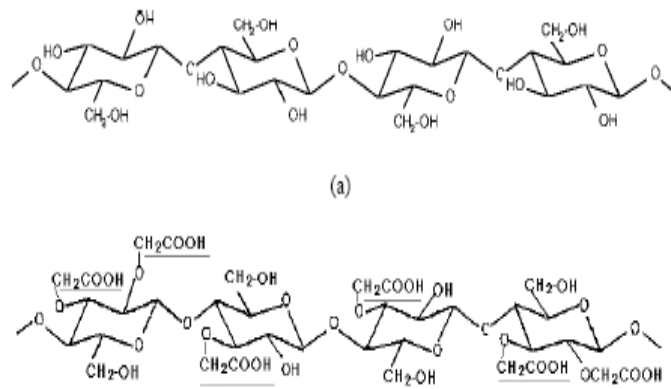


Figura 1. Estructura de la celulosa (a) y NaCMC con grado de sustitución de 1.5 (b)

### Alginato de sodio

El alginato de sodio es un biopolímero distribuido ampliamente en las paredes celulares de algas marinas pardas. El ácido alginico se acumula en las células de las algas en forma de "cuerpos gelatinosos" después de combinarse con las sales de agua del mar. Comúnmente se utiliza, en forma de hidrocoloides para diversas aplicaciones, entre ellas los productos farmacéuticos. El ácido alginico está compuesto de dos ácidos; el ácido manurónico (M) y el ácido gulurónico (G) (Figura 2), los cuales forman tres tipos de segmentos de bloque de homopolímero (Klokk y Melvik, 2002).

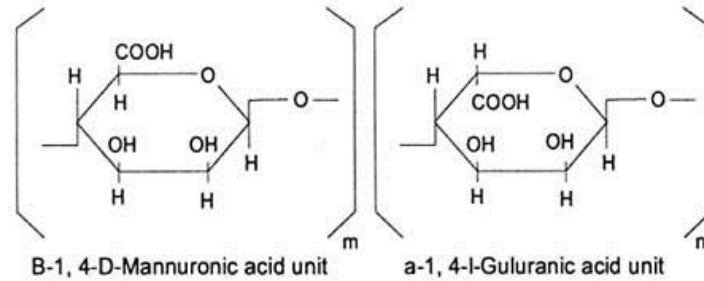


Figura 2. Estructura de las dos unidades monoméricas del ácido algínico:  $\beta$ -D-Ácido manurónico y  $\alpha$ -L-Ácido gulurónico

Las propiedades y funcionalidad de alginato, se basan principalmente: en su capacidad gelificante y la fuerza de gel. Su grupo carboxilo dentro de los ácidos manurónico y gulurónico intercambia iones con facilidad y puede reaccionar con varios tipos de cationes (Mahmoud *et al.*, 2011). Los alginatos tienen innumerables aplicaciones tales como: agente espesante, agente gelificante, estabilizante de dispersiones, coagente de textura o bien, formador de films o películas. Es uno de los polisacáridos más usados debido a su biocompatibilidad, y se encuentra en abundancia en las algas marinas (Mahmoud *et al.*, 2011).

### Mecanismos de liberación

Existen una serie de modelos matemáticos, a través de los cuales es posible explicar las cinéticas de liberación desde las micropartículas tales como: los de primer orden, orden cero, Higuchi, Peppas, Hixson-Crowell, entre otros.

Una forma simple de explicación de estos modelos es la de Higuchi, él explica que el fenómeno de liberación del activo se da por difusión Fickiana (Higuchi, 1963). Por otro lado, de forma más general está la descrita por Peppas, que describe la liberación por el mecanismo de difusión como por hinchamiento (Siepmann y Peppas, 2001).

### Liberación controlada de las micropartículas y nanopartículas

La liberación controlada es el método por el cual uno o más activos estarán disponibles en un tiempo adecuado en un lugar preciso a una velocidad específica (Pothakamury y Barbosa-Canovas, 2005).

En la mayoría de los sistemas de liberación controlada, el componente polimérico es el principal encargado de controlar la liberación del fármaco o activo, mientras que el relleno inorgánico es el encargado de variar la cinética de liberación de los sistemas obtenidos. Para ambos casos, los perfiles de liberación se caracterizan por la presencia de una disminución de la velocidad en la liberación con el tiempo, que está en función con la distancia que tiene que recorrer el activo dentro de la matriz.

La liberación del activo desde una matriz polimérica (micro o nanopartícula) puede estar mediada por distintos tipos de mecanismos: difusión, biodegradación, hinchamiento, presión osmótica y tortuosidad o canalización (Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 2005). La liberación depende de la naturaleza fisicoquímica del compuesto activo y del agente encapsulante, de la interacción entre ambos y del medio de disolución (Brannon y Peppas, 2011; Kou *et al.*, 1988). La ventaja de una matriz polimérica en la liberación, es que la cesión de los compuestos se prolonga en el tiempo y el compuesto activo tiene una mayor vida útil (Brannon y Peppas, 2011).

## **Caracterización de micro y nanopartículas**

### **Tamaño de partícula**

El tamaño de partícula es un factor importante, ya que la ruta de administración determinará el tamaño de las micropartículas. La técnica óptica de dispersión de luz dinámica (DLS) es ampliamente utilizada para la medición de diámetros medios y de distribución de tamaños de partículas de coloides poliméricos de tamaño submicrométrico o nanométricos (Zhou *et al.*, 1991). El instrumental empleado consiste en: i) una fuente de luz láser monocromática que incide sobre una solución muy diluida a analizar; ii) un fotómetro posicionado a un ángulo de detección, medido con respecto a la dirección de incidencia del láser sobre la muestra, y que colecta la luz dispersada por las partículas; y iii) un correlador digital que conjuntamente con un software específico que permite obtener la función de autocorrelación de primer orden de la intensidad de luz dispersada a cada ángulo.



## **Cuantificación de selenio**

El selenio es considerado un elemento esencial y al mismo tiempo tóxico para los seres vivos, esto dependiendo de su concentración y forma química, lo que hace importante su estudio y control, con el objetivo de evitar desórdenes biológicos debidos a su administración en exceso o deficiencia. Debido a que el selenio se presenta en muestras biológicas y medioambientales a niveles traza, es necesario el empleo de técnicas de análisis de elevada sensibilidad.

El poder separador de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), ofrece un gran potencial para la separación de las especies no volátiles, sin necesidad de recurrir a procesos de derivatización. La cuantificación de selenio y selenato, se ha realizado generalmente por cromatografía de cambio aniónico, empleando disoluciones reguladoras de fosfato o citrato como fases móviles (Cobo *et al.*, 1994). Alternativamente, se ha empleado la cromatografía inversa con formación de pares iónicos sobre fases estacionarias de octadecilsílice o poliméricas. La adición de un ligero porcentaje de modificador orgánico (<10% de metanol o acetonitrilo), mejora la separación cromatográfica

## **Cuantificación de Vitamina E (Tocoferoles)**

La unidad básica de la vitamina E es comúnmente dada en Unidades Internacionales (IU). Una IU es equivalente a 1 mg de dl-  $\alpha$ - tocoferil acetato, siendo la forma química más efectiva de todas formas de tocoferoles y tocotrienoles (Strohecker *et al.*, 1965).

En plantas frescas y tejido animal, así como en alimentos sin suplementar, los aceites naturales contendrán  $\alpha$ -tocoferol asociado con otras sustancias reductoras principalmente. Las premezclas y suplementos alimenticios se adicionan con  $\alpha$ -tocoferoles acetato sintético recubierto por un protector. Por otro lado, las plantas frescas y el tejido animal requieren para su cuantificación una homogenización utilizando un Waring Blender o en un Omni-mixer (Strohecker *et al.*, 1965).

Por otro lado, las premezclas que contienen tocoferoles protegidos con una capa protectora (polímero), son procesadas mediante una extracción con hexano caliente;

materiales como gelatina o goma vegetal, siendo estas calentadas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, seguido de una segunda extracción con etanol. Algunos concentrados y farmacéuticos, así como tabletas son procesados mediante un aplicación de fuerza mecánica, química o física con solventes orgánicos como el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, con el único propósito de romper las partículas protegidas (micro o nanocápsulas) (Strohecker *et al.*, 1965).

El contenido de tocoferoles puede ser estimado por diferentes métodos clasificados bajo diferentes categorías; biológicas, físicas y químicas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Métodos para la cuantificación de tocoferoles

<b>Métodos</b>
Colorimetría
Espectrofotometría
Espectrofluorometría
Métodos cromatográficos
Cromatografía de papel
Cromatografía de capa delgada (TLC)
Cromatografía de columna
Cromatografía líquida de alta definición (HPLC)
Cromatografía de líquido- gases (GLC)

*Strohecker et al.* (1965).

## **Determinación Morfológica de las microcápsulas y nanocápsulas**

### **Microscopio electrónico de barrido (MEB)**

El MEB es utilizado para el estudio de morfologías de células individuales o de organismos más complejos incluso algunos, permiten observar a una profundidad de un campo de varios milímetros o micrómetros. El funcionamiento del equipo consiste en que los electrones que impactan la muestra generan una variedad de señales incluyendo electrones secundarios de baja energía de las capas más superficiales de la muestra. Estos a su vez, son colectados, procesados y eventualmente traducidos en forma de series de pixeles en un tubo de rayos catódicos o monitor (Bozzola y Russell, 1992). Además, se requiere de una muestra seca y conductora (se recubre con una fina capa de oro). Una vez recubiertas las partículas de oro, pueden ser observadas en el MEB con voltajes de 15 a 20 Kv para obtener mayores aumentos.

## **Microscopio electrónico de transmisión (MET)**

A diferencia del microscopio óptico compuesto, hace uso de más electrones. Es decir, las radiaciones electromagnéticas originadas de un filamento de tungsteno se hacen converger sobre una muestra por medio de un sistema de lentes condensadores. La iluminación transmitida a través de la muestra es centrada en una imagen y magnificada en primer lugar por una lente objetivo y posteriormente magnificada por una serie de lentes intermedios y proyectores hasta que la imagen es visualizada. La amplificación se produce por un conjunto de lentes magnéticos que forman una imagen sobre una placa fotográfica o sobre una pantalla sensible al impacto de los electrones. Este equipo requiere de un sistema de vacío para la remoción de moléculas de aire que pueden interferir con el flujo de electrones a través de la columna (Bozzola y Russell., 1992).

## **Características de algunos activos**

### **SELPLEX®**

El Selplex® es una fuente orgánica de selenio, en forma de levadura enriquecida de selenio. El selenio en Selplex® se encuentra como selenometionina (SeMet) y esta es la forma de almacenamiento de este elemento en el cuerpo. En el animal la SeMet, se convierte en selenocisteína (SeCys) una forma altamente activa, utilizada rápidamente para producir las proteínas de selenio, empleadas en el metabolismo y reacciones inmunológicas.

### **Selenometionina**

La selenometionina (SeMet) conocida comúnmente como selenoproteína, denominada así por la incorporación de una molécula de selenio en lugar de la molécula de azufre en la proteína (metionina), con una función antioxidante capaz de neutralizar especies reactivas de oxígeno. Además de las propiedades químicas y a los beneficios que la SeMet puede darle al animal por su mayor disponibilidad, enriquece a la leche con selenio (Pehrson y Ortman, 1999). Se sabe que más del 90% de la selenometionina, como forma principal de selenio en la dieta, se absorbe por el mismo mecanismo que la

metionina (Navarro y López, 2000). La figura 3 muestra la estructura de la metionina y selenometionina

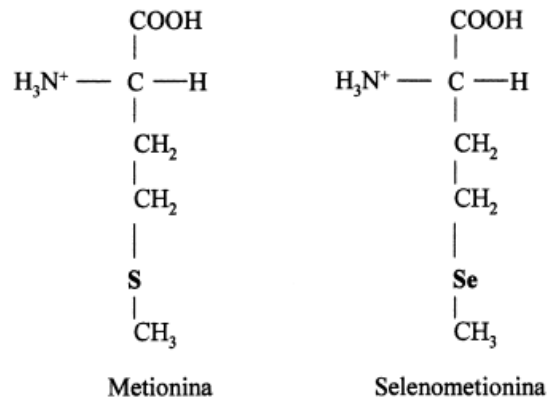


Figura 3. Estructura molecular de la metionina y selenometionina mostrando la ubicación de la sustitución del átomo de selenio en lugar del azufre.

A pesar de que la selenometionina no puede ser sintetizada por el organismo, esta se obtiene de la dieta. El uso de este almacén de selenio en el tejido animal se da cuando se interrumpe su ingesta. La disponibilidad de selenio depende de la absorción intestinal y de su conversión en sus distintas formas biológicamente activas. Las diferentes formas de selenio siguen rutas metabólicas diferentes (Navarro *et al.*, 2000). La selenometionina puede almacenarse al incorporarse aleatoriamente en las proteínas, en lugar de metionina (Navarro *et al.*, 2000; Katsuhiko *et al.*, 2000).

### Selenocisteína

La selenocisteína (SeCys), es considerada como el aminoácido número 21 entre los aminoácidos proteicos o canónicos. A diferencia de las mayorías de los elementos traza, que cumplen una función específica como cofactores enzimáticos, él selenio en las proteínas está presente bajo la forma de un aminoácido: la selenocisteína análogo de la cisteína (Cys), que contiene selenio en lugar de azufre (S) (Figura 4) (Cone *et al.*, 1976). Entre las dos antes mencionadas la diferencia más importante dentro de sus características fisicoquímicas es su pKa. Siendo que la sustitución del átomo de Se por el de S le confiere una mayor capacidad nucleofílica, en un rango más amplio de pH, y

por tanto una mayor reactividad. Además de que las enzimas que contiene la SeCys en el sitio activo, son por norma, catalíticamente más eficiente en comparación a sus homologas en la Cys.

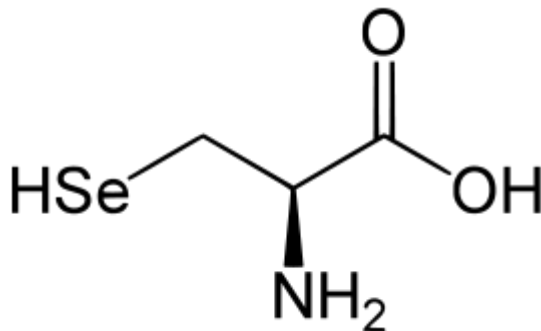


Figura 4. Fórmula de la selenocisteína.

### Selenito de sodio

Selenito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), es la fuente de este mineral más usado para suplementar las dietas de animales. Esta forma inorgánica fue aprobada por la FDA (Bobcek *et al.*, 2004). Es así que las limitaciones del uso del selenio inorgánico (selenito, selenato, selenuro y forma metálica) son bien conocidas: Su toxicidad, ya que actúa como prooxidante cuando se adiciona en altos niveles en la dieta (Martínez *et al.*, 2012), interacciones con otros minerales, tienen baja eficiencia de transferencia de la leche y carne y el mantenimiento de las reservas del organismo, y como consecuencia una elevada proporción del elemento es excretada (Surai, 2006).

### Vitamina E

La vitamina E fue descubierta en 1923 por Herbert Evans y Katherine Bishop, quienes observaron que su deficiencia causaba reabsorción fetal en las ratas e incapacidad reproductiva crónica. La vitamina E o tocoferol es un nutriente antioxidante para la célula. Existen cuatro estructuras químicas  $\beta$ -,  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ - (Cuadro 4). El isómero alfa-tocoferol posee la mayor actividad en los animales (Brigelius-Flohe y Traber, 1999). La exposición a la luz, calor y la peroxidación de la membrana celular la degrada fácilmente (Yamauchi *et al.*, 1998). Esta es una vitamina liposoluble que se disuelve en grasa y

resulta esencial para el organismo dado que es un antioxidante que ayuda a proteger los ácidos grasos. Se encuentra principalmente en la yema de huevo, aceites vegetales (soya, cacahuate, arroz, algodón y coco), los vegetales de hojas verdes, cereales y pan integral. En el tejido animal la forma predominante es  $\alpha$ - tocoferol (Figura 5).

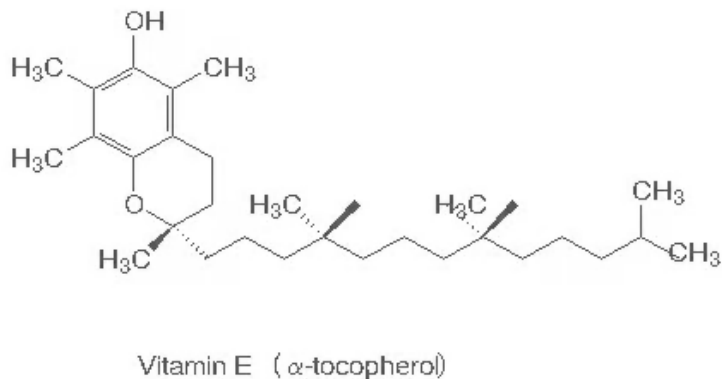


Figura 5. Estructura química del  $\alpha$ - tocoferol

El termino vitamina E en la actualidad se utiliza como un descriptor genérico de tocol y derivados de tocotrienol, que muestra la actividad biológica del  $\alpha$ -tocoferol y a su vez los tocoferoles sirve como sinónimo para todos los metil-tocol (Cuadro 4) (Strohecker *et al.*, 1965).

Cuadro 4. Nomenclatura y propiedades físicas de la composición de tocol y tocotrienoles.

Nombre	Designación estructural	Formula	Peso molecular	Absorción Max. (nm)
<b>Tocol</b>				
$\alpha$ - Tocoferol	5,7,8- Trimetiltocol	$C_{29}H_{50}O_2$	430	292
$\beta$ - Tocoferol	5,8- Dimetiltocol	$C_{28}H_{48}O_2$	416	297
$\gamma$ - Tocoferol	7,8- Dimetiltocol	$C_{28}H_{48}O_2$	416	298
$\delta$ -Tocoferol	8- Metiltocol	$C_{27}H_{46}O_2$	402	298
<b>Tocotrienol</b>				
$\alpha$ - Tocotrienol	5,7,8- Trimetiltocotrienol	$C_{29}H_{44}O_2$	424	
$\beta$ - Tocotrienol	5,8- Dimetiltocotrienol	$C_{28}H_{42}O_2$	410	
$\gamma$ - Tocotrienol	7,8- Dimetiltocotrienol	$C_{28}H_{42}O_2$	410	
$\delta$ - Tocotrienol	8- Metiltocotrienol	$C_{27}H_{40}O_2$	396	

Fuente: Strohecker *et al.* (1965)

Los tocoferoles son de color amarillo pálido y son un aceite viscoso. Algunos pueden ser cristalizados, son solubles en aceite, grasas, acetona, etanol, cloroformo, etil-eter y otros disolventes de grasas.

Una de las funciones más importante de los tocoferoles en el organismo animal es evitar la acción oxidativa de los radicales libres sobre los fosfolípidos de la membrana. Los hechos que se derivan de esta acción protectora están ligados claramente a mejoras sobre la capacidad reproductiva, menor incidencia de metritis y mastitis, menor tasa de retención de placentas y un correcto estado inmune en los terneros a través del calostro (muy rico en tocoferol e inmunoglobulinas). La deficiencia de vitamina E es manifestada a través de síntomas que varían entre especies (Strohecker *et al.*, 1965).

### **Importancia de la suplementación macro y micromineral en bovinos**

Las deficiencias de minerales en el ganado, han sido reportadas en casi todas las regiones del mundo y se consideran como minerales críticos para los rumiantes. En general, los bovinos requieren de unos quince elementos minerales, con la finalidad de garantizar una adecuada nutrición y asegurar una eficiente productividad (Montero y Rafael, 2006). Estos son considerados como el tercer grupo de nutrientes limitantes en la producción animal, debido a que su importancia radica en que son necesarios para la transformación de los alimentos en componentes del organismo. De forma general sus funciones dentro del organismo son: 1) conformación de la estructura ósea y dental (Ca, P y Mg) 2) equilibrio ácido-básico y regulación de la presión osmótica (Na, Cl y K) 3) sistema enzimático y transporte de sustancias (Zn, Cu, Fe y Se) 4) reproducción (P, Zn, Cu, Mn, Co, Se y I) 5) sistema inmune (Zn, Cu, Se y Cr).

### **Metabolismo y absorción mineral en ganado lechero**

Los minerales son esenciales para los procesos metabólicos, la formación de huesos y la producción de leche. Los principales elementos minerales requeridos por el ganado lechero son: calcio, fósforo, magnesio, potasio, sodio, cloro, yodo, hierro, cobre, cobalto, manganeso, zinc y selenio, siendo todos esenciales para el funcionamiento productivo y reproductivo (Diaz, 1985).

Existen diferencias en: absorción, transporte, excreción, tasa de renovación de los tejidos y control homeostático, entre los elementos minerales. Estos procesos están en equilibrio mediante las distintas formas en que el elemento pueda presentarse y están influidas por el pH de los fluidos del organismo, o por la presencia de otros minerales, secreciones hormonales o la adición de quelatos (Ciria *et al.*, 2005). La absorción mineral se da principalmente en el tracto digestivo, aparato respiratorio y piel. El transporte y la tasa de renovación de los minerales, se da una vez absorbido a través del plasma combinados con compuestos orgánicos (Ciria *et al.*, 2005). Las vías de excreción son las heces, orina (Na, K, P, S, Fe, Y Co), sudor (Na, Cl y K) y respiración (Ciria *et al.*, 2005). Cerca del 50% de las enzimas corporales requieren de un mineral para su funcionamiento, interviniendo en el metabolismo de proteínas, aminoácidos, carbohidratos, lípidos, vitaminas, así como de otros minerales.

Como se mencionó anteriormente, el selenio juega un papel muy importante en la acción antioxidante, sin embargo la absorción, metabolismo y utilización depende de la forma química de este (Bügel *et al.*, 2004). Las fuentes de selenio que se adicionan a la dieta del animal se pueden encontrar en dos formas, selenio inorgánico y selenioproteínas.

La absorción del selenio ocurre en el intestino delgado, y mientras el SeMet es absorbido mediante el sistema transportador de metionina, después de la absorción este es incorporado de forma no específica en las proteínas generales del cuerpo en lugar de la metionina y puede actuar como una piscina biológica (pool intracelular) de selenio, la cual puede ser utilizada durante periodos de ingesta subóptima de selenio (Suzuki y Ogra, 2002). Por otro lado, la absorción del selenio inorgánico como el selenito de sodio, es menos eficiente y ocurre principalmente por difusión pasiva (Weiss, 2003). Por el contrario las fuentes inorgánicas que son absorbidos por el intestino delgado se utilizan ya sea metilado y posteriormente excretados (Juniper *et al.*, 2009). La excreción del exceso de Se en el organismo se realiza por medio de compuestos metilados de selenio y selenoazúcares (Chumpitaz *et al.*, 2013).



## **Mastitis bovina**

La mastitis es definida con una inflamación de la glándula mamaria (GM), comúnmente es producto de la presencia de un patógeno que causa la infección intramamaria (IIM), sin embargo la causa también puede ser por una lesión y con menos frecuencia por alergias o neoplasias (Menzies y Ramanoon, 2001).

El riesgo de desarrollo de la mastitis es mayor durante el período de periparto (Alva *et al.*, 2014), en el cual la vaca experimenta una serie de cambios no solo hormonales sino también metabólicos, por la alta demanda energética que se presenta en las vacas en este período y aunado a esto, el estrés del parto.

En base a la sintomatología o de su causa, infecciosa o ambiental, se clasifica de dos formas: la mastitis clínica (MC), caracterizada por un proceso inflamatorio que conlleva a un incremento en el recuento de las células somáticas (RCS) de la leche, además de la presencia en la leche de grumos, acuosa, con sangre, o amarillenta, en casos extremos, se puede presentar septicemia o endotoxemia (Bradley, 2002), por su parte en la mastitis subclínica (MS), no se presentan signos clínicos en la glándula mamaria, pero si una reducción en la producción de leche, que afectan negativamente a la calidad de leche y su diagnóstico es mediante pruebas especiales (prueba de Whiteside, California, etc.) que cuantifican la respuesta celular inflamatoria representado por el RCS (Shearer *et al.*, 2003).

Los mecanismos de defensa de la glándula mamaria se clasifican básicamente en dos: no inmunológico e inmunológico, en el primero se tienen las defensas anatómicas y solubles (son elementos contenidos en la leche con acción sobre las bacterias, se tiene cierto tipo de complemento, lisozima, el sistema lactoperoxidasa-tiocianato, y la lactoferrina) y en el segundo la respuesta humoral y celular. Los mecanismos no inmunológicos (anatómicos o barreras físicas) se consideran la primera línea de defensa de la glándula mamaria, es decir, la forma cónica del pezón y el músculo elástico del que está constituido ofrece poca superficie de exposición a los microorganismos y limita la entrada de las bacterias respectivamente, y la queratina presente contiene elementos bacteriostáticos y leucocitos. Los mecanismos

inmunológicos o bien inmunidad adquirida constituyen un sistema de defensa que reconoce y destruye a todo organismo invasor además de elaborar una memoria inmunitaria. Este está constituido principalmente por anticuerpos o inmunoglobulina secretadas por células plasmáticas y producidas por los linfocitos B, existen cuatro clases de Ig en bovinos: IgG, IgM, IgA y IgE, la primera se divide en tres subclases: IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub> e IgG<sub>2b</sub> producidas por los tejidos locales de la glándula.

Del mismo modo, la defensa celular son células somáticas de origen sanguíneo que emigran a la glándula mamaria en respuesta a una señal antigénica para contrarrestar la infección siendo los polimorfonucleares (PMN) el principal componente. La función principal de los PMN es la fagocitar, destruir y generar agentes oxidantes con capacidad bacteriana, una vez realizada su función son eliminados en el ordeño y son reemplazados por células nuevas.

Los macrófagos intervienen en el proceso de inflamación, emigrando de los capilares al interior de la glándula, una vez ahí fagocitan a los agentes bacterianos y a las células envejecidas o muertas como los neutrófilos. Así pues, el buen funcionamiento de la respuesta celular asegura la detección o eliminación de las infecciones intramamarias.

### **Susceptibilidad a mastitis durante el periodo seco**

El tiempo comprendido desde que finaliza la lactancia, hasta el final de la gestación cuando ocurre el parto, es lo que se conoce como período seco. El período seco es un período preparatorio que debe presentar una duración alrededor de dos meses (60 días) siempre y cuando el manejo productivo y reproductivo haya sido adecuado.

La glándula mamaria bovina tiene un alto grado de susceptibilidad a infecciones intramamarias durante la transición fisiológica de la lactación al periodo seco y del periodo seco a la lactación temprana (Oliver *et al.*, 2000). Una vez que las bacterias penetran la barrera de la punta del pezón, la capacidad funcional de los componentes inmunitarios celulares y solubles de la glándula mamaria determina si se da infección intramamaria.

En numerosas especies estudiadas la deficiencia de selenio aparece asociada a una reducción de la función inmune. En vacas deficitarias en este oligoelemento se ha descrito una reducción de la actividad GSH-Px en las células fagocitarias, y también una disminución de la capacidad bactericida de los neutrófilos frente a distintos agentes etiológicos como *Candida albicans*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (López *et al.*, 1997). Los neutrófilos son el mecanismo primario de las defensas inmunes inespecíficas. La velocidad con la cual estas células pueden ser movilizadas al sitio de infección y la eficiencia con que matan a los patógenos son eventos de importancia crítica en la protección del organismo. La vitamina E y el selenio juegan roles esenciales en estos eventos y la deficiencia de cualquiera de estos nutrientes conduce a un debilitamiento de la función neutofílica y por lo tanto a un aumento en la incidencia de infecciones (Reinoso y Soto, 2009).

### **La función del selenio y vitamina E en la mastitis**

El selenio y la vitamina E son parte del sistema de defensa antioxidante. La vitamina E es un antioxidante soluble en lípidos importante, que protege contra la peroxidación lipídica libre iniciada por radicales (Halliwell y Gutteridge, 1999). En tanto el selenio es parte fundamental de la enzima glutatión peroxidasa que actúa directamente en la protección de las células inmunes del daño oxidativo. Por lo tanto, la suplementación de selenio en la dieta mejora la migración de neutrófilos en sangre a la glándula mamaria e incrementa la capacidad de los neutrófilos y monocitos de fagocitar bacterias, además de proteger a las propias células fagocíticas de un daño oxidativo propio. En estudios previos se ha demostrado que dicha suplementación en el periodo de transición reduce la duración de la mastitis y la incidencia de ésta (Spears and Weiss 2008).

Los minerales traza como el selenio tienen un papel importante en la función inmune interviniendo en la salud de las vacas lecheras en transición. Por otro lado, estudios previos de Hogan *et al.*, (1992, 1993) evidencian que tanto la vitamina E como el selenio reducen la incidencia de mastitis y la duración de los síntomas clínicos de la mastitis. El mayor impacto de la vitamina E sobre la inmunidad está relacionada con la actividad de los neutrófilos. La administración oral o parenteral de la vitamina E en las

vacas lecheras periparturientas no afecta a la actividad fagocítica de neutrófilos pero si mejora la capacidad de los neutrófilos de la sangre para destruir bacterias (Hogan *et al.*, 1992, 1993).

El primer estudios que demostró los efectos que tiene proporcionar la vitamina E y selenio a vacas para reducir problemas de mastitis fueron reportados por Smith *et al.*, (1984), ellos suplementaron con 740 UI de vitamina E y 0.1 mg Se kg<sup>-1</sup> de peso vivo a un hato de vacas lecheras durante el periodo seco y se observó una reducción de 37 % en la incidencia de mastitis clínica para la siguiente lactancia en el hato de vacas suplementadas en relación a las vacas testigo. Por otro lado Smith *et al.*, (1985) verificaron estos resultados, con vaquillas de primera lactancia, a las cuales se les administró como suplemento selenio (0.3 ppm) y vitamina E (1,000 UI d<sup>-1</sup>) 60 días antes del parto y durante la lactancia. Como resultado las vaquillas que fueron suplementadas presentaron niveles plasmáticos de vitamina E y de selenio mayores durante el parto y lactancia, además de una menor incidencia de mastitis. Estudios previos comprueban que la disminución de la actividad de GSH-Px está asociada con un incremento de prostaglandinas en plasma y leche (Ndiweni *et al.*, 1991).

Estudios en rebaños de ovinos (Erskine *et al.*, 1989; Ndiweni *et al.*, 1991) al usar diferentes concentraciones de selenio sugieren que cuando los niveles de este oligoelemento son adecuados, la inflamación de los cuartos afectados es menor o de más corta duración, y señalan a la vez que existe una correlación negativa entre el nivel de selenio y la incidencia de mastitis subclínica diagnosticada mediante un conteo de células somáticas al microscopio. Debido a la importancia de GSH-Px tanto en el mantenimiento de la integridad de las membranas, como el ser la primera barrera defensiva de la ubre, hacen suponer que la vitamina E y el selenio (GSH-Px) tienen una importante función en tratamientos intramamarios (Pastor Meseguer, 1994) debido a la función de ambos antioxidantes en la protección de las membranas frente a la capacidad citotóxica de los peróxidos secretados por los polimorfo nucleares para la destrucción de gérmenes.

Se piensa que la susceptibilidad de una vaca a nuevas infecciones intramamarias durante el periodo del parto son altas, por lo que la suplementación de selenio puede influir en la reducción de la mastitis clínica en vacas lecheras.

### **Estudios toxicológicos**

La toxicología es una disciplina científica que estudia los efectos adversos de distintos agentes en los sistemas biológicos. Esta es una área multidisciplinaria que extrae información de diversas disciplinas relacionadas, que incluyen la biología, química, fisiología, inmunología, patología, farmacología, y salud pública (Kalant *et al.*, 1998).

Según Loomis (1982), el único factor que determina el grado de nocividad de un compuesto es su dosis. A medida que aumenta la dosis de cualquier agente químico desde niveles mínimos a máximos, no aparecen súbitamente efectos indeseables sino que la respuesta, sea beneficiosa o perjudicial, es gradual y está relacionada con los cambios progresivos de la dosis. La dosis correcta diferencia el veneno del remedio" (Goodman y Gillman's, 1996).

La muerte de las especies experimentadas es la respuesta que más comúnmente es utilizada en pruebas toxicológicas ("toxicological testing") preliminares. Cuando una sustancia está siendo evaluada inicialmente, los rangos tóxicos específicos deben ser caracterizados. Generalmente, una dosis es administrada y/o aumentada o disminuida hasta que un rango crítico haya sido encontrado. Este rango va desde que todos los animales sobreviven hasta que todos mueran. (Ottoboni, 1997).

El término de dosis letal media (DL<sub>50</sub>) es el más representativo de la toxicidad aguda de una sustancia y se empezó a desarrollar en 1927 por J.W.Trevan (Jurado, 1989). El valor de la DL<sub>50</sub>, está fundamentado en los numerosos factores que influyen en ella, los mismos que constituyen los factores que afectan la toxicidad (la especie animal, la edad de los animales, el peso de los animales, el sexo de los animales, la línea genética, el estado sanitario, la dieta, la deprivación de alimento, el método de

administración de la sustancia y su estado físico, la temperatura ambiental, el alojamiento, el período estacional) (Jurado, 1989).

DL significa dosis letal, y 50 significa que la dosis es agudamente letal para el 50% de los animales a quienes la sustancia en cuestión fue administrada bajo condiciones de laboratorio controlada. Un nivel "subíndice 0" significa que la dosis no fue letal para ninguno de los animales y un nivel "subíndice 100" significaría de que la dosis fue letal para el 100% de los animales. Las unidades de  $DL_{50}$  son  $mg\ kg^{-1}$ , que significa miligramos de la sustancia por kilogramo de peso corporal del animal. Mientras menor la  $DL_{50}$ , menor son los miligramos de la sustancia por kilogramo de peso corporal que es requerido para matar a los animales y mayor es la toxicidad aguda. Viceversa, mientras mayor la  $DL_{50}$ , menor es la toxicidad aguda.  $DL_{50}$  y toxicidad aguda están inversamente relacionadas (Malachowski, 1995).

### **Toxicidad del selenio**

Las formas elementales de selenio son probablemente inocuas para el hombre; sin embargo, sus compuestos son peligrosos y su efecto es similar al de los compuestos de azufre. Los compuestos de selenio se pueden absorber en cantidades tóxicas a través de los pulmones, el tubo digestivo o por lesiones de la piel. Muchos compuestos de selenio pueden causar quemaduras graves de la piel y las membranas mucosas.

La biodisponibilidad del selenio depende, no sólo de su absorción en el intestino sino también de su conversión en una forma biológicamente activa (Sanz y Díaz, 1993). Uno de los signos, o bien, el más característico de la absorción de selenio es el olor a ajo en el aliento. Este olor se debe probablemente al dimetil-selenio que se produce en el hígado durante la destoxicación del selenio por metilación. El olor desaparece rápidamente al retirar la exposición. Sin embargo, los efectos sistémicos, como palidez, laxitud, irritabilidad, síntomas gastrointestinales vagos y vértigos, no se pueden evaluar con precisión y no son específicos del selenio. Debe estudiarse más detenidamente la posibilidad de lesiones hepáticas y del bazo.

Los niveles séricos de selenio en rumiantes, considerados como adecuados son de 0.08 a 0.3 ppm, considerándose como deficiencia marginal entre 0.026 ppm a 0.079 ppm (Gill *et al.*, 1996). La metodología que tiene más consenso para determinar la concentración en sangre de selenio es a partir de la medición de la enzima glutatión peroxidasa siendo el límite de 130 U g<sup>-1</sup> Hb indicando una deficiencia marginal (Ceballos *et al.*, 1999). En comparación, los totales en sangre de GSH-Px son deficientes cuando son menores de 100 U g<sup>-1</sup> de Hb, marginales de 100-130 U g<sup>-1</sup> Hb y adecuados por encima de 130 U g<sup>-1</sup> de Hb. La dosis de selenio que resulta en toxicidad aguda para rumiantes: para dosis inyectadas (dosis media letal (LD<sub>50</sub>) (-0.15-1.9 mg Kg<sup>-1</sup> PV y para selenio inorgánico oral de 1.9-8.3 mg Kg<sup>-1</sup> PV (Underwood y Suttle, 1999).

## **JUSTIFICACIÓN**

La mastitis es causada por la entrada de un agente patógeno, como consecuencia el sistema inmune desencadena la afluencia de neutrófilos polimorfonucleares (NPM) y otras células blancas de la sangre para el ataque y eliminación al agente patógeno (AP). Se sabe que la actividad de los NPM se ve comprometida en animales con deficiencia de selenio, debido a la importancia que tiene el selenio en la integridad y actividad de la enzima glutatión peroxidasa. Por su parte, la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) como principal antioxidante, elimina las especies reactivas del oxígeno (ROS) producidas durante el proceso de fagocitosis manteniendo de esa manera la integridad de la membrana plasmática. Por ello, la concentración de selenio en el tejido está altamente correlacionada con una mayor actividad de la enzima glutatión peroxidasa. Dada la generalidad de administrar selenio por vía oral, se han realizado investigaciones para encontrar una vía de administración del selenio que permita que éste microelemento llegue al órgano blanco y evite la interacción con compuestos orgánicos, que puedan modificar su forma química, afectando la disponibilidad del selenio al organismo. Por ello, en este estudio se diseñaron y caracterizaron microcápsulas y nanocápsula mucoadhesivas de Selplex® (selenometionina y selenocisteína), selenito de sodio y vitamina E para ser administradas vía intramamaria durante la etapa de transición con una liberación de forma controlada y prolongada que permita una mayor biodisponibilidad de forma directa de selenio en las

células mamarias de la vaca, así como una mayor eficiencia para mantener a la vaca en óptimas condiciones de salud, y mejorar su potencial de producción.

## **HIPÓTESIS GENERAL**

Las microcápsulas y nanocápsulas mucoadhesivas de Selplex® (selenometionina y selenocisteína) y selenio de sodio y vitamina E obtenidas por el método de nanoprecipitación, mostrarán un buen rendimiento y porcentaje de encapsulación en función al tipo y concentración del polímero, además de una entrega del activo controlada y dosificada.

## **OBJETIVOS GENERALES**

- Formular, caracterizar y evaluar en base a sus características fisicoquímicas y morfológicas microcápsulas y nanocápsulas de Selplex® (selenometionina y selenocisteína), selenito de sodio y vitamina E, mediante el método de nanoprecipitación.
- Evaluar la cinética de liberación de cada activo en función al tipo de polímero.
- Determinar la LD<sub>50</sub> de las microcápsulas y nanocápsulas de Selplex® y selenito de sodio en ratones.



## BIBLIOGRAFÍA

- Alva M., N. T. Pérez, A. D. M. Estrada, I. Á. Aguilar, C. Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. 2014. Modulation of the inflammatory response of bovine mammary epithelial cells by cholecalciferol (vitamin D) during *Staphylococcus aureus* internalization. *Microbial pathogenesis*. 77: 24-30pp.
- Bobcek B., R. Lahucky, J. Mrázová, R. Bobcek, K. Novotná, and D. Vasicek. 2004. Effects of dietary organic selenium supplementation on selenium content, antioxidative status of muscles and meat quality of pigs. *Czech Journal of Animal Science-UZPI (Czech Republic)*.
- Bozzola, J. and L. Russell. 1992. Quantitative electron microscopy. Principles and techniques for biologists, 278-304pp.
- Bradley A. J. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal*, 164(2): 116-128pp.
- Brazel C. 1999. Microencapsulation: Offering solutions for the food industry. *Cereal Foods World*. 44: 388-393 pp.
- Brigelius F. R. and Traber M. G. 1999. Vitamin E: function and metabolism. *The FASEB Journal*, 13(10): 1145-1155pp.
- Bügel, S., B. Sandström and L. H. Skibsted. 2004. Pork meat: A good source of selenium?. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 17(4): 307-311pp.
- Ceballos A., F. G. Wittwer, P. A. Contreras, E. Quiroz and H. Böhmwald. 1999. Actividad de glutatión peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo correlacionada con la concentración sanguínea y plasmática de selenio. *Pesq agropec bras*, 34, 2331-2338pp.
- Chumpitaz, C. C. 2013. El selenio, un elemento poco conocido con un rol biológico importante. *Revista de Química*, 25(1-2): 29-33pp.

- Ciria J. C., R. V Marín and De Latorre G J. C. 2005. Avances en nutrición mineral en ganado bovino. *Conferencias. IX Seminario Manejo y Utilización de Pastos y Forrajes en Sistemas de Producción Animal. Universidad Nacional Experimental del Táchira (UNET)*.
- Cobo M., M. Palacios, C. Cámara, F. Reis and P. Quevauviller. 1994. Effect of physicochemical parameters on trace inorganic selenium stability. *Analytica chimica acta*, 286: 371-379pp.
- Cone J. E., R. Del Rio, Davis J y Stadtman T. 1976. Proc Natl Acad Sci USA 73(8): 2659-2663pp.
- Díaz M. T. E. 1985. Alimentación de vacas lecheras (No. Doc. 6264)\* CO-BAC, Santafé de Bogotá).
- Erskine R. J., R.J. Eberhart, Grasso P.J., Scholz R.W. 1989. Induction of Escherichia coli mastitis in cows fed selenium-deficiency or selenium-supplemented diets. *American Journal of Veterinary Research* 40: 2093–2100pp.
- Favaro C., Santana A., Monterrey E., M Trindade and F Netto. 2010. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids* 24: 336-340 pp.
- Feynman R. There's plenty of room at the bottom. Talk at the annual meeting of the American Physical Society; 1959 Dec. 29th; California Institute of Technology.
- Gamisans F., F. Lacoulonche, A. Chauvet, M. Espina, M. García and M. Egea. 1999. Flurbiprofen-loaded nanospheres: analysis of the matrix structure by thermal methods. *International journal of Pharmaceutics*, 179: 37-48pp.
- Goodman And Gillmans. 1996. The Pharmacological Basis Of Therapeutics. International. Edition. 9th Edition. The Mcgraw-Hill Companies. U.S.A.
- Halliwell B., J.M.C. Gutteridge. 1999. In: Free Radicals in Biology and Medicine, third ed. Oxford University Press, New York, USA.

- Hao-Ying Li, S. Xiaosong and C. Peter. 2010. The use of sodium carboxymethylcellulose in the preparation of spray-dried proteins for pulmonary drug delivery. *European J. of Pharm Sci.* 40: 56–61 pp.
- Hogan J. S., W. P. Weiss, and K. L. Smith. 1993. Role of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. *J. Dairy Sci.* 76:2795pp.
- Hogan, J. S., W. P. Weiss, K. L. Smith, and P. S. Schoenberger. 1992. Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. *J. Dairy Sci.* 65:399pp.
- Juniper D. T., R. H. Phipps, E. Ramos-Morales and G. Bertin. 2009. Effects of dietary supplementation with selenium enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in lambs. *Animal Feed Science and Technology.* 149(3): 228-239pp.
- Jurado R. 1989. *Toxicología Veterinaria.* 2a Edición. Salvat Editores S.A. Madrid, España.
- Jyothi N, N. Venkata, P. M. Prasanna, S. N. Sakarkar, K. S. Prabha, P. S. Ramaiah, G. Y. Srawan. 2010. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J. Microencapsul.* 27: 187-197pp.
- Kalant H., W. Roschlav, W. Mcguigan. 1998. *Principles Of Medical Pharmacology.* Ó\* Edition. Oxford Universty Press, New York, U.S.A.
- Katsuhiko N., O. Tomofuni and H. Tatsuya. 2000. Metabolism of selenoaminoacids and contribution of selenium methylation to their toxicity. *J. of Health Source.* 46: 418-421 pp.
- Klokk T. I. and J. E. Melvik. 2002. Controlling the size of alginate gel beads by use a high electrostatic potencial. *J. microencapsulation.* 4: 415-424 pp.
- Kou J. H., G. L. Amidon, P. I. Lee. 1988. pH-dependent swelling and solute diffusion characteristics of poly (hydroxyethyl methacrylate-CO-methacrylie acid) hidrogels. *Pharmaceutical Research.* 5: 592-597pp.

- López Alonso, M. Miranda, M. Hernández, J. C. Castillo and J. L. Benedito. 1997. Glutación peroxidasa (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes. Archivos de medicina veterinaria. 29(2):171-180pp.
- Lopretti M, F. Barriero, I. Fernandes, A. Damboriarena, C. Ottati, A. Olivera. 2011. Microencapsulación de compuestos de actividad biológica.
- Magdassi S. and Y. Vinetsky. 1996. Microencapsulation of oil-in-water emulsions by proteins. En: Microencapsulation. 21-34 pp.
- Mahmoud M. A., S. Abd El-Rasoul, H. A. Sayed, A. I. Mohamed. 2011. Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium–sodium alginate microparticles. Saudi Pharmaceutical Journal.
- Malachowski, M.J. 1995. Health Effects of Toxic Substances. Government Institute Inc.
- Martínez-Gómez N., A. Domínguez-López, E. de Jesús Morales-Rosales, J. Lugo, M. A. Mariezcurrena-Berasain and M. D. M. Berasain. 2012. Efecto de la levadura enriquecida con selenio y selenito de sodio en la dieta de cerdos en finalización sobre el contenido de grasa intramuscular y ácidos grasos. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 15(1): 41-46pp.
- Martins P. R., R. Dulley, R. C. Moraes, C. H. Goulart Árabe, M. de Paula e Silva, R. Viale and N. G. Valenti. 2008. Nanotecnología, sociedade e meio ambiente. Seminário Internacional Nanotecnologia, Sociedade e Meio Ambiente (No. IICA F30-47). Ministério do Desenvolvimento Agrário,. Ministério do Desenvolvimento Agrário (Brasil). Núcleo de Estudos Agrários e Desenvolvimento Rural. IICA, Brasilia (Brasil).
- Menzies P. I. and S. Z. Ramanoon. 2001. Mastitis of sheep and goats. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 17(2): 333-358pp.
- Montague P. Los problemas de la nanotecnología se amontonan y la industria pide ser regulada. [Acceso 6 de junio de 2008]. Disponible en: <http://www.lvejo.org/rachel/dys834.doc>.

- Montero y Rafael. 2006. Suplementacion mineral en bovinos. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/nutricion/articulos/suplementacion-mineral-bovinos-t919/p0.htm> Consultado 29-06-2015).
- Navarro A and M. López. 2000. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *The science of the total environment*. 249: 347-371 pp.
- Ndiweni N. and J. Finch. 1991. The relationship between the vitamin E/selenium status and the incidence of mastitis in dairy herds near Harare Zimbabwe. *Vet. J.* 22: 101-109 pp.
- Noronha C. M., A. F. Granada, S. M. De Carvalho, R. C. Lino, De O.B. Maciel, M. V. & P. L. M. Barreto. 2013. Optimization of  $\alpha$ -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. *Industrial Crops And Products*. 50: 896-903pp.
- Oliver S. P. and L. M. Sordillo. 1988. Udder health in the periparturient period. *Journal of dairy science*, 71(9): 2584-2606pp.
- Oliver, S. P., F. N. Schrick, M.E. Hockett and H. H. Dowlen. 2000. La mastitis clínica y subclínica durante la lactancia temprana afecta el desempeño reproductivo de las vacas lecheras. Páginas 34-51 en Memorias del Consejo Nacional de Mastitis, Cleveland, OH. Natl. Mastitis Counc., Inc., Verona, WI.
- Ottoboni, M.A. 1997. *The Dose That Makes the Poison*. 2nd Edition. International Thomson Publishing Company.
- Pastor M. 1994. Mamitis, *Buiat. Esp.* 4: 6-25 pp.
- Pehrson B, K. Ortman, N. Madjid, U. Trafikowska. 1999. The influence of dietary selenium as selenium yeast or sodium selenite on the concentration of selenium in the milk of suckler cows and on the selenium status of their calves. Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Department of

- Animal Environment and Health, Section of Field Research, SE-532 23 Skara, Sweden.
- Pothakamury y Barbosa-Cánovas Rabbani N. and P. Seville. 2005. The influence of formulation components on the aerosolisation properties of spray-dried powders. *J. Control. Rel.* 110: 130–140 pp.
- Reinoso V. and C. Soto. 2009. Importancia de la Vitamina E y el Selenio en Vacas lecheras. Artigas, Uruguay.
- Ruane J. and A. Sonnino. 2011. Agricultural biotechnologies in developing countries and their possible contribution to food security. *Journal of biotechnology*, 156: 356-363.
- Sanguansri P and M. A. Augustin. 2006. Nanoscale materials development—a food industry perspective *Trends in Food Science & Technology*. 17: 547-556pp.
- Sanz M, C. Díaz. 1993. Urinary seleniuro concentrations. *Clin Chem* 39 (10): 2040-2052pp.
- Shearer J. K. and Jr. B. Harris. 2003. Mastitis in dairy goats. Anim. Sci. Dept. Florida Coop. Ext. Serv. Inst. Food Agri. Sci; Univ. Fl. Gainesville, USA. pp:1-6pp.
- Siepmann J. and N. Peppas. 2001. *Adv. Drug Delivery Rev.* 48: 139-57 pp.
- Smith K. L., H. R. Conrad, B. A. Amiet and D. A. Todhunter. 1985. Incidence of environmental mastitis as influenced by vitamin E and selenium. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.* 37: 482pp.
- Smith K. L., J.H. Harrison, D.D. Hancock, D.A. Todhunter, H.R. Conrad. 1984. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical matistis and duration of clinical symptoms. *Journal of Dairy Science* 67: 1293–1300pp.
- Spears J. W. and W. P. Weiss. 2008. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *The Veterinary Journal*, 176(1): 70-76pp.

- Strohecker R., H. M. Henning and D. D. Libman. 1965. Vitamin assay. Tested methods. *Vitamin assay. Tested methods.*
- Surai P. 2006. Selenium in nutrition and health. United kingdom, nottingham university press. 974 p.
- Suzuki K. T. and Y. Ogra. 2002. Metabolic pathway for selenium in the body: speciation by HPLC-ICP MS with enriched Se. *Food Additives & Contaminants*, 19(10): 974-983pp.
- Underwood E.J and N.F. Suttle. 1999. The mineral nutrition of livestock, 3 a ed. New York. CABI, 614p.
- Waldner J. B. 2010. Nanocomputers and swarm intelligence. John Wiley & Sons.
- Weiss W. P. 2003. Selenium nutrition of dairy cows: comparing responses to organic and inorganic selenium forms. In *Proceeding of the 19th Alltech Annual Symposium Nutrition, Biotechnology Feed Food: 20–23 April 2003; Lexington.* 333-373pp.
- Yamauchi R, K. Goto, K. Kato. 1998. Reaction of  $\alpha$ -tocopherol in heated bulk phasein the presence of methyl-linoleate (13S)-hydroperoxide or methyl linoleate. *Lipids*. 33: 77-85pp.
- Yañez F. J., M. J. Salazar M. L. Chaires, J. H. Jiménez, R. M. Márquez y R. E. Ramos Ramirez. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y perspectiva*. 21: 331-319pp.
- Zhou, Z. and B. Chu. 1991. Light-scattering study on the fractal aggregates of polystyrene spheres: Kinetic and structural approaches. *Journal of colloid and interface science*, 143(2): 356-365pp.

## CAPÍTULO I

### SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MICROCÁPSULAS Y NANOCÁPSULAS DE SELPLEX®, SELENITO DE SODIO Y VITAMINA E

#### RESUMEN

Se sabe que la deficiencia de Selenio (Se) provoca una alteración en el funcionamiento normal del sistema inmunitario. El Se, es un micronutriente esencial en los animales que está presente en los tejidos y es constituyente de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px). La forma citosólica de la GSH-Px cuya función es catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno y de varios peróxidos de hidrógeno orgánicos solubles son las selenoproteína. El objetivo del presente estudio fue diseñar y caracterizar micro y nanocápsulas de liberación controlada de Selplex® (selenometionina y selenocisteína), selenito de sodio y vitamina E para su administración vía intramamaria, evaluando dos tipos de agentes encapsulantes: carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC) y alginato de sodio (NaAlg) a dos concentraciones 0.5% y 2%, para cada agente encapsulante. Las micro y nanocápsulas fueron elaboradas por el método de nanoprecipitación. La caracterización morfológica de las micro y nanocápsulas fue mediante microscopía electrónica de barrido. La distribución de tamaños de partículas de los sistemas se determinó mediante la técnica óptica de dispersión de luz dinámica (DLS) que es ampliamente utilizada para la medición de diámetros medios y de distribución de tamaños de partículas de coloides poliméricos. Para las capsulas de Selplex®, se evaluó la cantidad de seleniometionina y selenocisteína, así como la de selenito de sodio y por último se determinó  $\alpha$  y  $\gamma$ -tocoferol para las de vitamina E. Las variables a evaluar fueron; total encapsulada, el porcentaje de rendimiento, el porcentaje de recuperación. Las microfotografías mostraron forma esférica, ovaladas y en ocasiones formas irregulares. Para SeCys, el porcentaje de encapsulación mayor se presentó para el T3 con una media de 65.67% con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, para SeMet el porcentaje de encapsulación mayor (numéricamente) fue T3 con una media de 9.6966% sin diferencias en los tratamientos ( $p > 0.05$ ). El porcentaje de encapsulación del selenito, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los cuatro tratamientos (T5, T6, T7 y T8). Presentando valores bastante altos para todos



los tratamientos con medias de 81.33%, 89.67%, 88% y 94.67% de selenito de sodio, respectivamente. Para las capsulas de Vitamina E para los porcentaje de encapsulación no se observaron diferencia significativas ( $p>0.05$ ) entre tratamiento ni en interacciones. Presentando porcentajes de rendimientos bajos para los tres tipos de partículas. Se concluye que el método de nanoprecipitación no es el más adecuado al menos para la encapsulación a nano y microescala del Selplex® y Vitamina E, esto debido a los bajos porcentajes de encapsulación presentados. Sin embargo, si es adecuado para la encapsulación de Selenito de sodio, por la afinada presentada del activo con los polímeros utilizados.

Palabras clave: microcápsulas, nanocápsulas, tamaño, total encapsulado, rendimiento

## ABSTRACT

It is known that deficiency of selenium (Se) causes an alteration in the normal functioning of the immune system. Selenium is an essential micronutrient for animals present in the tissues and is a constituent of glutathione peroxidase enzyme (GSH-Px). The cytosolic form of GSH-Px whose function is catalyzing the reduction of hydrogen peroxide and several organic peroxides soluble hydrogen are selenoprotein. The aim of this study was to design and characterize micro and nanocapsules of controlled Selplex® (selenomethionine and selenocysteine), sodium selenite and vitamin E for intramammary administration, evaluating two types of encapsulants release: sodium carboxymethylcellulose (NaCMC) and sodium alginate (NaAlg) at two concentrations 0.5% and 2% for each encapsulant. Micro and nanocapsules were prepared by the method of nanoprecipitation. Morphological characterization of micro and nanocapsules was using scanning electron microscopy. The particle size distribution of the systems was determined by optical technique of dynamic light scattering (DLS) which is widely used for measuring mean diameters and particle size distribution of polymeric colloids. Selplex® for capsules, the amount of selenomethionine and selenocysteine was evaluated, as well as sodium selenite and finally  $\alpha$  and  $\gamma$  was determined tocopherol for vitamin E. The variables were evaluated; Total encapsulated, the percent yield, the percent recovery. Photomicrographs showed spherically shaped, sometimes oval and irregular shapes. For SeCys, the percentage of the encapsulation was presented for T3 with an average of 65.67% with a significant difference ( $p < 0.05$ ). Furthermore, for SeMet encapsulation percentage greater (numerically) it was T3 with an average of 9.6966% no treatment differences ( $p > 0.05$ ). The percentage of encapsulation of selenite, no significant differences ( $p > 0.05$ ) in the four treatments (T5, T6, T7 and T8) were observed. Posing pretty high values for all treatments with averages of 81.33%, 89.67%, 88% and 94.67% sodium selenite, respectively. For Vitamin E capsules for encapsulation percentage no significant difference ( $p > 0.05$ ) between treatment or interactions were observed. Presenting percentages of low yields for the three particle types. It is concluded that the method of nanoprecipitation is not the most suitable at least for the encapsulation of nano and microscale Selplex® and Vitamin E, this due to

the low percentages of encapsulation presented. However, if it is suitable for encapsulation of sodium selenite for active tuned presented with the polymers used.

Key words: microcapsules, nanocapsules, size, total encapsulated, yield

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En este estudio se diseñarán y caracterizarán micro y nanocápsulas mucoadhesivas de Selplex® (selenometionina y selenocisteína), selenito de sodio y vitamina E para su uso durante la etapa de transición de la vaca, con una liberación de forma controlada y prolongada que permita una mayor disponibilidad de forma directa del Selplex® (selenometionina, selenocisteína), selenito de sodio y vitamina E ( $\alpha$ - tocoferoles) en las células mamarias, así como una mayor eficiencia y disponibilidad para el metabolismo celular, para mantener a la vaca en óptimas condiciones de salud, y mejorar su potencial de producción.

## **OBJETIVO**

- Sintetizar y caracterizar micro y nanocápsulas de Selplex® (selenometionina, selenocisteína), selenito de sodio y vitamina E en base a sus características fisicoquímicas y morfológicas mediante la técnica de nanoprecipitación.

## **HIPÓTESIS**

Se espera que las microcápsulas de Selplex® (selenometionina y selenocisteína), selenito de sodio y Vitamina E obtenidas mediante nanoprecipitación muestren una eficiencia mayor de encapsulación, morfología y rendimiento en función al tipo y concentración del polímero.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material

La formulación de las partículas de Selplex®, selenito de sodio y vitamina E se llevó a cabo en los laboratorios de Nanotecnología de la Universidad de las Américas, Puebla; la caracterización de las partículas se realizó en las instalaciones de los laboratorios de Nutrición Animal del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo.

Se utilizó como agente encapsulante; alginato de sodio [Merck, EUA, fórmula:  $(C_6H_7NaO_6)_n$ ] y carboximetilcelulosa de sodio (Merck, EUA, NaCMC), como activos a encapsular Selplex® (como fuente de selenio orgánico), selenito de sodio (como fuente de selenio inorgánico) y vitamina E (tocoferoles). Para el vehículo de entrega Carbopol 971 NF (Merck, EUA, formula:  $C_3H_4O_2$ ), metilparabeno (conservador); trietanolamina (estabilizador de pH, para la elaboración del gel), membrana de diálisis, snake skin (22 mm x 35 pies de diámetro en seco, 34 mm de ancho en seco, 3.7 mL cm<sup>-1</sup>, Prod # 68035 lot # KC132123). Para la fase móvil: ácido acético (0.001%) (Grado analítico, Merck, EUA), metanol (grado analítico, Merck, EUA), acetonitrilo (grado analítico, Merck, EUA).

## Método

### Obtención de micro y nanocápsulas de Selplex®, selenito de sodio y vitamina E

Cuadro 5. Composición de las nano y micropartícula generadas en el diseño de experimento

Tratamiento	Formulación	Polímero	Concentración del polímero	Activo
T1	Selplex®	NaAlg	0.5	SeCys SeMet
T2	Selplex®	NaAlg	2	SeCys SeMet
T3	Selplex®	NaCMC	2	SeCys SeMet
T4	Selplex®	NaCMC	0.5	SeCys SeMet
T5	NaSe	NaAlg	0.5	Selenito de sodio
T6	NaSe	NaAlg	2	Selenito de sodio
T7	NaSe	NaCMC	0.5	Selenito de sodio
T8	NaSe	NaCMC	2	Selenito de sodio
T9	Vitamina E	NaAlg	0.5	α- tocoferol γ- tocoferol
T10	Vitamina E	NaAlg	2	α- tocoferol γ- tocoferol
T11	Vitamina E	NaCMC	2	α- tocoferol γ- tocoferol
T12	Vitamina E	NaCMC	0.5	α- tocoferol γ- tocoferol
Tsx	Selplex	Sin encapsular	-	SeMet SeCys
Tse	Selenito de sodio	Sin encapsular	-	Selenito de sodio
TVit E	Vitamina E	Sin encapsular	-	α- Tocoferol γ- Tocoferol

El método utilizado fue nanoprecipitación, como primer paso se prepararon las disoluciones del encapsulante en las concentraciones 0.5%, 2% para cada uno de los polímeros. Los agentes encapsulantes (polímeros) fueron carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC) y alginato de sodio se mezcló con agua en una razón SeMet:polímero de 1:50.

Posteriormente se realizó la solución/emulsión del activo, se pesaron 40 mg, 40mg y 50 IU de Selplex®, selenito de sodio y Vitamina E respectivamente, en 10 ml de acetona con agitación constante, se llevó al sonicador por 15 min con una amplitud del 50%, la solución se mantuvo con agitación constante durante media hora utilizando un agitador magnético, a una temperatura de 70°C para la evaporación del solvente

orgánico (acetona). Posteriormente las muestras fueron liofilizadas y almacenadas a temperatura ambiente.

## **Caracterización de las micro y nanocápsulas de Selplex®, selenito de sodio y vitamina E**

### **Tamaño de partícula**

El tamaño y distribución de las micro y nanocápsula de Selplex®, selenito de sodio y vitamina E, fue determinado por dispersión de luz dinámica (DLS) con el equipo Nano Zetasizer Malvern, modelo ZEN 3600. Se tomó un ml de muestra por cada uno de nuestros tratamientos, se sónico por 15 min a una amplitud del 50 % y se depositó directamente al equipo para determinar el tamaño y distribución.

### **Microscopía electrónica**

El análisis de la morfología de las microcápsulas y nanocápsulas, se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Para este análisis se tomaron con un pincel las micro y nanocápsulas y se colocaron en el portamuestras de latón, se usó una cinta conductiva doble adhesiva de carbón, posteriormente se recubrió con oro durante cuatro minutos en una ionizadora de metales (Ion Sputter JFC-1100, Jeol, Fine Coat). Las muestras resultantes se observaron en un microscopio electrónico de barrido (JEOL- JSM 6390) a 10 Kv (Bozzola y Russell, 1992).

### **Determinación de eficiencia de encapsulación, recuperación y rendimiento en la encapsulación de los activos.**

Determinación del activo total encapsulado. Para la cuantificación total encapsulada del activo se pesaron 0.05 g de micro y nanocápsulas de cada sistema matricial (tratamiento), posteriormente se aforó a 10 mL con agua destilada y se agitó en un vortex por 30 seg y se filtró con un acrodisco de 0.45  $\mu$ . Finalmente se cuantificó el activo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Los resultados se calcularon mediante una curva de calibración para cada activo utilizando estándares de SeMet, SeCys, selenito de sodio y  $\alpha$ - tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol

Activo total encapsulada =  $(y-0.2033)/22.416$ \*10 mL  
g de polvo de las partículas

(Ecuación 1)

Donde “y” es el área bajo la curva

Recuperación del activo. Representa la cantidad que se obtiene después del proceso de secado. La recuperación se determinó al calcular la razón entre del activo total encapsulado y el activo total teórico (cantidad pesada para ajustar 1:50 SeMet: Polímero).

$$\% \text{ de recuperación del activo} = \left( \frac{\text{mg del activo total encapsulada}}{\text{mg de activo total teorico}} \right) * 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

Rendimiento. El rendimiento de cada muestra (Selplex®, selenito de sodio y vitamina E) se realizó a partir de la relación entre los gramos de polvo de microcápsulas después del secado y los sólidos totales, a partir de la ecuación 3.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left( \frac{\text{g de polvo de Mcps después del secado}}{\text{sólidos totales de la dispersion}} \right) * 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

Solidos totales: 40 mg de Selplex® o selenito de sodio + concentración del recubrimiento (NaCMC ó NaAlg) para las partículas de selenio.

Solidos totales: 50 IU de vitamina E + concentración del recubrimiento (NaCMC ó NaAlg) para las partículas de selenio.

### **Procedimiento cromatográfico**

El análisis de cada activo se realizó por HPLC (Selplex®/NaCMC, Selplex®/NaAlg), selenito de sodio/NaCMC, selenito de sodio/ NaAlg, Vitamina E/NaCMC y Vitamina E/ NaAlg). El equipo consistió en una Hewlett Packard Mod. 1100 equipado con inyector



automático marca Agilent Technologies mod. 1200 utilizando un detector de arreglo de diodos 996 (Waters) y una columna Symmetry® C18 (5µm x 4.6 mm d.i. x 250 mm, Waters) para selenometionina, selenocisteina, selenito de sodio y Spherisob® 5µm ODS (4.6 x 250 mm, Waters) vitamina E, a una temperatura de 25°C, se inyectaron 20 µL. Se utilizó una fase móvil de ácido acético (0.001%) y metanol grado HPLC (1:1 v/v), con un flujo de un mL min<sup>-1</sup>. La detección fue a una longitud de onda de 254 nm.

**Curva de calibración de selenometionina, selenocisteina, selenito de sodio y α-tocoferol y γ-tocoferol.**

**Curva de calibración de la selenometionina**

Se pesaron en una balanza analítica 109 mg de selenometionina y se aforó a 10 mL con agua bidestilada para obtener una solución madre. A partir de la solución madre se prepararon diluciones para obtener un rango de concentración de SeMet entre 0.3125 y 5 µg mL<sup>-1</sup>, las cuales se inyectaron en el HPLC, obteniéndose un área para cada solución (cuadro 6, figura 6). Con una columna Symmetry C18 5µm, 250 x 4.6, con una fase móvil compuesta de agua (50%) con 0.001% Ác. acético; metanol (50). Con una longitud de onda de 254 nm y una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>

Cuadro 6. Concentración de SeMet y área, para la construcción de la curva de calibración.

Concentración (µg mL <sup>-1</sup> )	Área
0.3125	6.43905
0.625	12.95731
1.125	27.57406
2.5	56.54786
5	111.85303

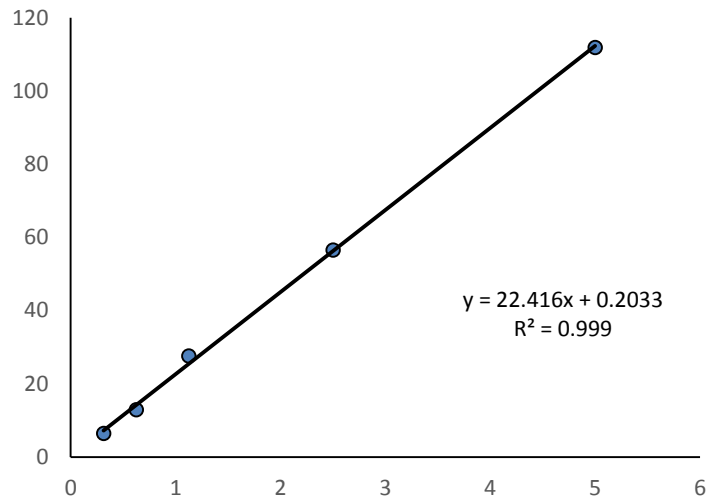


Figura 6. Curva de calibración para la cuantificación de SeMet.

Se obtuvo la siguiente curva de calibración:

$$Y = 22.416x + 0.2033$$

Donde Y corresponde el área bajo la curva y X a la concentración expresada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$

### Curva de calibración de la selenocisteína

Se pesaron en una balanza analítica 100 mg de selenocisteína y se aforó a 10 mL con agua bidestilada para obtener una solución madre. A partir de la solución madre se prepararon diluciones para obtener un rango de concentración de SeCys entre 4 y 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , las cuales se inyectaron en el HPLC, obteniéndose un área para cada solución (cuadro 7, figura 7). Con una columna Symmetry C18 5 $\mu\text{m}$ , 250 x 4.6, con una fase móvil compuesta de agua (50%) con 0.001% Ác. acético; metanol (50). Con una longitud de onda de 254 nm y una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>

Cuadro 7. Concentración de SeCys y área, para la construcción de la curva de calibración.

Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Área
4	0.671375
8	1.01673
16	1.98308
32	4.29399
40	5.50859

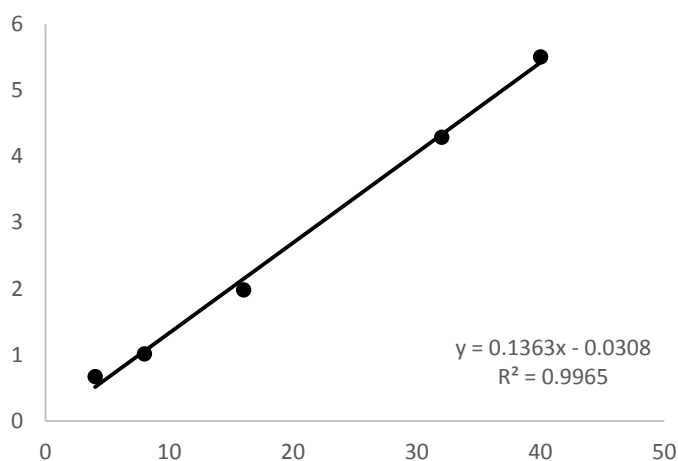


Figura 7. Curva de calibración para la cuantificación de SeCys

Se obtuvo la siguiente curva de calibración:

$$Y = 0.1363x + 0.0308$$

Donde Y corresponde el área bajo la curva y X a la concentración expresada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$

### Curva de calibración de la selenito de sodio

Se pesaron en una balanza analítica 102 mg de selenito de sodio y se aforó a 10 mL con agua bidestilada para obtener una solución madre. A partir de la solución madre se prepararon diluciones para obtener un rango de concentración de selenito de sodio entre 4 y 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , las que se inyectaron en el HPLC, obteniéndose un área para cada solución (cuadro 8, figura 8). Con una columna Symmetry C18 5 $\mu\text{m}$ , 250 x

4.6, con una fase móvil compuesta de agua (50%) con 0.001% Ác. acético; metanol (50). Con una longitud de onda de 254 nm y una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>

Cuadro 8. Concentración de selenito de sodio y área, para la construcción de la curva de calibración.

Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Área
4	1.68841
8	4.34616
16	10.78965
32	24.36487
40	30.46878

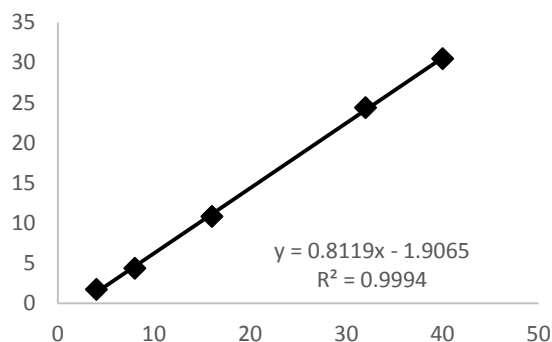


Figura 8. Curva de calibración para la cuantificación de selenito de sodio

Se obtuvo la siguiente curva de calibración:

$$Y = 0.8119x + 1.9065$$

Donde Y corresponde el área bajo la curva y X a la concentración expresada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$

### Curva de calibración de vitamina de $\alpha$ y $\gamma$ – Tocoferol (vitamina E)

Se pesaron en una balanza analítica 100 mg de  $\gamma$  - tocoferol y se aforó a 10 mL con agua bidestilada para obtener una solución madre. A partir de la solución madre se prepararon diluciones para obtener un rango de concentración de  $\gamma$  - tocoferol entre 0.15 y 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , las que se inyectaron en el HPLC, obteniéndose un área para cada solución (cuadro 9, figura 9). Con una columna Hypersil ODS 250 x 4.6, con una fase

estacionaria compuesta de metanol (19%); ACN (75%); Hexano: diclorometano (6%).  
 Con una longitud de onda de 300 nm y una velocidad de flujo de 1.5 mL min<sup>-1</sup>

Cuadro 9. Concentración de  $\gamma$  - tocoferol y área, para la construcción de la curva de calibración.

Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Área
0.15	1.20788
0.3	2.62349
0.6	4.20444
1.25	8.08569
2.5	17.07907

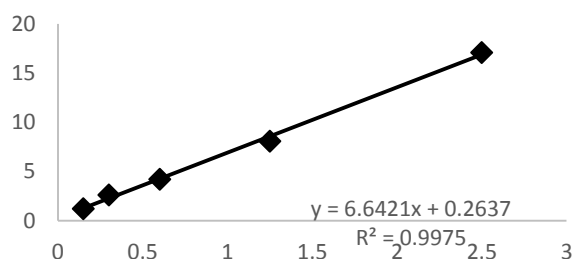


Figura 9. Curva de calibración para la cuantificación de  $\gamma$  - tocoferol

Se obtuvo la siguiente curva de calibración:

$$Y = 6.6421x + 0.2637$$

Donde Y corresponde el área bajo la curva y X a la concentración expresada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$

Se pesaron en una balanza analítica 100 mg de  $\alpha$  - tocoferol y se aforó a 10 mL con agua bidestilada para obtener una solución madre. A partir de la solución madre se prepararon diluciones para obtener un rango de concentración de  $\alpha$  - tocoferol entre 0.06 y 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , las que se inyectaron en el HPLC, obteniéndose un área para cada solución (cuadro 10, figura 10). Con una columna Hypersil ODS 250 x 4.6, con una fase estacionaria compuesta de metanol (19%); ACN (75%); Hexano: diclorometano (6%). Con una longitud de onda de 300 nm y una velocidad de flujo de 1.5 mL min<sup>-1</sup>

Cuadro 10. Concentración de  $\alpha$  - tocoferol y área, para la construcción de la curva de calibración

Concentración ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Área
0.06	20.28748
0.12	28.96387
0.24	54.87755
0.5	119.22099
1	236.23724

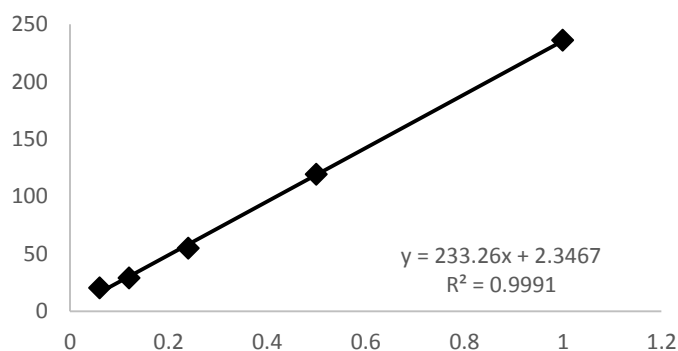


Figura 10. Curva de calibración para la cuantificación de  $\alpha$  – tocoferol.

Se obtuvo la siguiente curva de calibración:

$$Y = 233.26x + 2.3467$$

Donde Y corresponde el área bajo la curva y X a la concentración expresada en  $\mu\text{g mL}^{-1}$

1

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico para las variables de respuesta; activo total encapsulado, porcentaje de recuperación, porcentaje de rendimiento en las microcápsulas y tamaño de partícula, se realizó mediante el programa SAS 9.0 con análisis de varianza usando el procedimiento GLM y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Morfología**

#### **Fotomicrografía de las micro y nanocápsulas de SELPLEX®, Selenito de sodio y Vitamina E**

Las micrografías de las micro y nanocápsulas de Selplex®, selenito de sodio (NaSe) y Vit E se obtuvieron por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) (Figura 11). Para la toma de las fotomicrografías, las muestras fueron liofilizadas previamente. Debido al exceso de polímero, las partículas se observaron embebidas y/o inmersas en el polímero. Este exceso de polímero se pudo haber corregido si las micro y nanocápsulas hubieran sido sometidas a un lavado y centrifugado previo para eliminar el sobrenadante, permitiendo así obtener imágenes de mejor calidad, como lo indica Romero *et al.*, (2010).

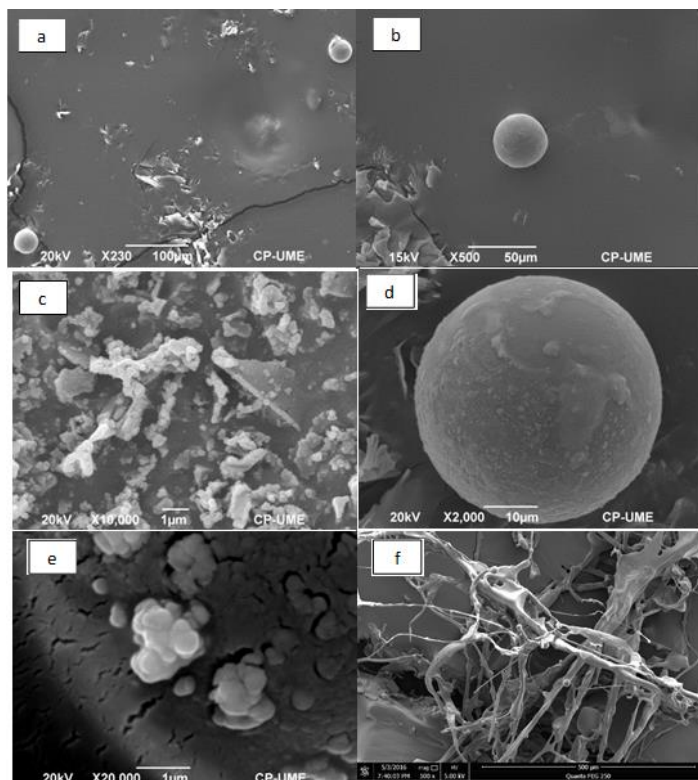


Figura 11. Micrografía electrónica de barrido (MEB) de micro y nanocápsulas de Selplex®, selenito de sodio y vitamina E, formuladas mediante el método de nanoprecipitación después de previa liofilización. a).- NaCMC 2% selplex®; b).- NaCMC 0.5% selplex®; c).- NaAlg 2% selplex®; d).- NaAlg 0.5% selplex®; e).- NaCMC 2% NaSe; f).- NaCMC 0.5% NaSe.



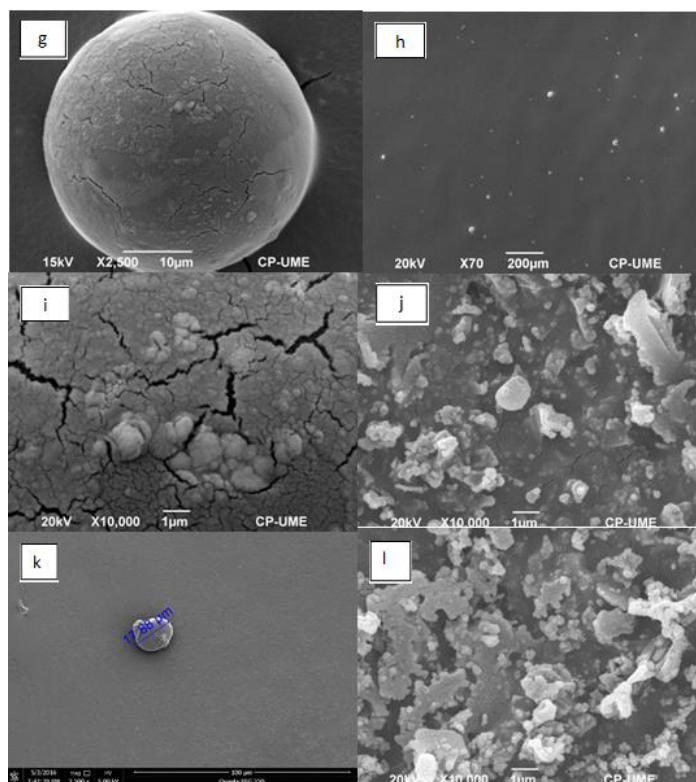


Figura 12. Micrografía electrónica de barrido (MEB) de micro y nanocápsulas de Selplex®, selenito de sodio y vitamina E, formuladas mediante el método de nanoprecipitación después de previa liofilización. f).- NaCMC 0.5% NaSe; g).- NaAlg 2% NaSe; h).- NaAlg 0.5% NaSe; i).- NaCMC 2% Vit E; j).- NaCMC 0.5% Vit E; k).- NaAlg 2% Vit E; l).- NaAlg 0.5% Vit E.

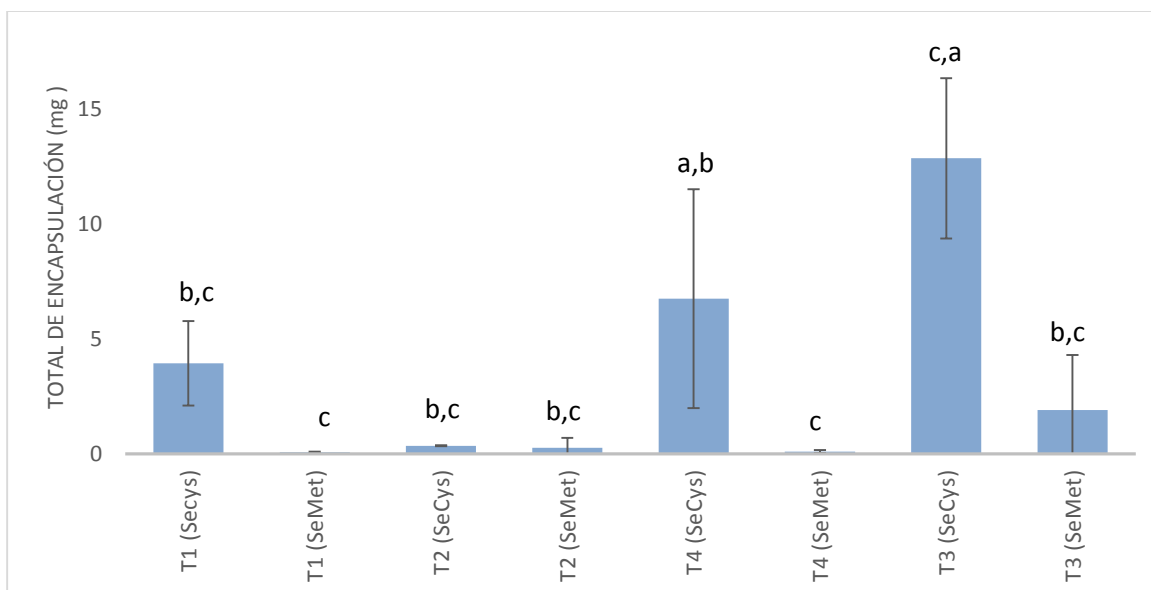
Las microfotografías mostraron forma esférica, ovaladas y en ocasiones formas irregulares (amorfas), característico en micropartículas producidas mediante nanoprecipitación, muy parecidas a las reportadas por Khayata *et al.*, (2012). Se observó además una tendencia a aglomeración entre las partículas más pequeñas (figura 11c,e). Otros autores reportan el mismo comportamiento en la morfología de los sistemas matriciales (Bouchemal *et al.*, 2005; Chorny *et al.*, 2002). En un estudio realizado por Romero *et al.*, 2010, donde reporto un morfología muy parecida de forma esférica y ovaladas con una tendencia a la aglomeración con superficies lisas. En algunos casos las micro y nanocápsulas muestran partículas colapsadas o encogidas.

### **Total encapsulado, porcentaje de encapsulación y rendimiento de SELPLEX®**

En el total de encapsulación del activo, se encontraron diferencias altamente significativas en los tratamientos ( $p < 0.01$ ) (T1, T1, T3 y T4). Particularmente, se

observó que la mayor encapsulación para Secys fue para los T3, T4 con una media de 12.865 mg de SeCys y 6.752 mg de SeCys respectivamente, con una diferencia altamente significativa con un  $p < 0.01$  en el tipo de polímero, observando la mayor encapsulación para la NaCMC, ya que los niveles probados de polímero (2% y 0.5%) no presentaron ningún efecto en la eficiencia de encapsulación. Esto indica que el encapsulante (es decir, el material pared de tipo reservorio o matriz externa para micro y nanocápsulas) tiene un efecto crítico en la eficiencia de encapsulación debido a la estructura fisicoquímica, es decir, las unidades repetitivas de celulosa y sus grupos químicos de "carboximetil de sodio" ( $\text{CH}_2\text{-COONa}$ ) (Cancela *et al.*, 2005; Ma. J *et al.*, 2007) la dan una mayor afinidad por el grupo amino por la selenoproteína (SeCys) durante el proceso de encapsulado. Así pues, Barba *et al.*, (2002) indican que uno de los factores que influyen principalmente en la afinidad de la NaCMC es el grado de sustitución del reactivo utilizado ( $>0.05$ ) (Tong *et al.*, 2008).

Por otra parte, para SeMet la eficiencia de encapsulación mayor (numéricamente) fue T3 con una media de  $1.9014 \text{ mg g}^{-1}$  de polvo de partículas sin diferencias en los tratamientos ( $p > 0.05$ ). Así pues de manera general, se observa que la eficiencia de encapsulación de SeMet y SeCys fue baja, es decir, la encapsulación de las selenoproteínas mediante la levadura enriquecida de selenio (Selplex®) en las micros y nanopartículas por nanoprecipitación fue demasiado baja, ya que lo esperado era alrededor del 70 y 80% de acuerdo con lo reportado en otros estudios (Romero-Pérez *et al.*, 2010). Ésta baja eficiencia de encapsulación se puede atribuir a que no se obtuvo la ruptura total de las micro y nanopartículas debido al poco tiempo (15 min) empleado durante la caracterización de los sistemas.



Medias con las mismas letras no son diferentes ( $p < 0.05$ )

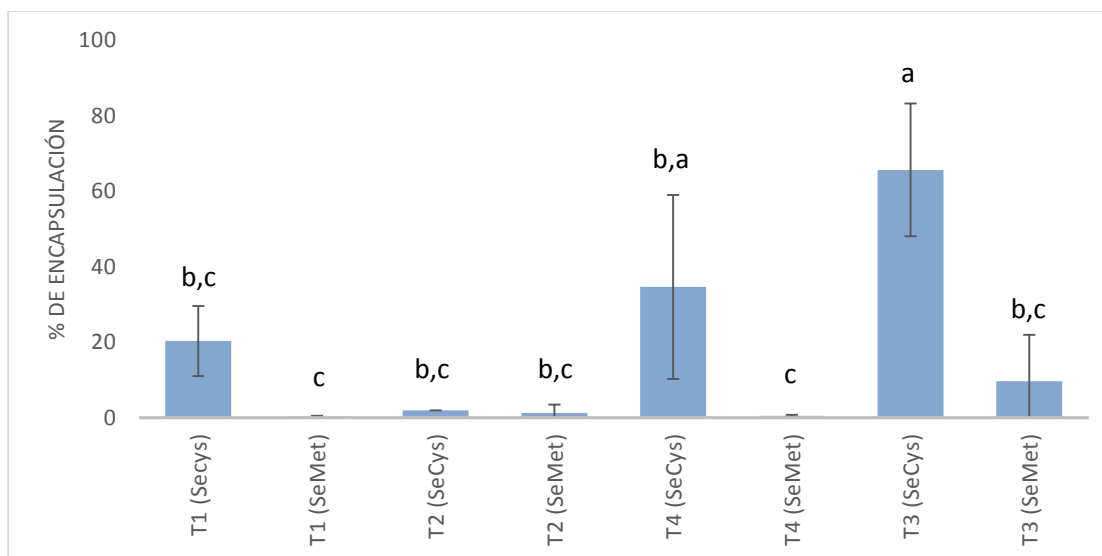
Figura 13. Total de encapsulación (Medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

Cuadro 11. Total de encapsulación (Medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

SISTEMA	TRAT	MEDIA	DS±
ALG0.5SeCys	T1 (Secys)	3.9350	1.8398
ALG0.5SeMet	T1 (SeMet)	0.0609	0.0374
ALG2 SeCys	T2 (SeCys)	0.3478	0.0220
ALG2SeMet	T2 (SeMet)	0.2533	0.4388
CMC0.5SeCys	T4 (SeCys)	6.7525	4.7614
CMC0.5SeMet	T4 (SeMet)	0.0954	0.0622
CMC2SeCys	T3 (SeCys)	12.8646	3.4932
CMC2SeMet	T3 (SeMet)	1.9014	2.3988

\*A cada tratamiento (de los cuatro tratamientos) se determino selenometionina y selenocisteina

Para SeCys, el porcentaje de encapsulación mayor se presentó para el T3 con una media de 65.67% con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) vs T1, T2 y T4, además la NaCMC presentó una mayor encapsulación de los activos (SeMet y SeCys), con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los demás tratamientos. Por otro lado, para SeMet el porcentaje de encapsulación mayor (numéricamente) fue T3 con una media de 9.6966% sin diferencias en los tratamientos ( $p > 0.05$ ). Observando un comportamiento muy similar al total de encapsulación.



Medias con las mismas letras no son diferentes ( $p < 0.05$ )

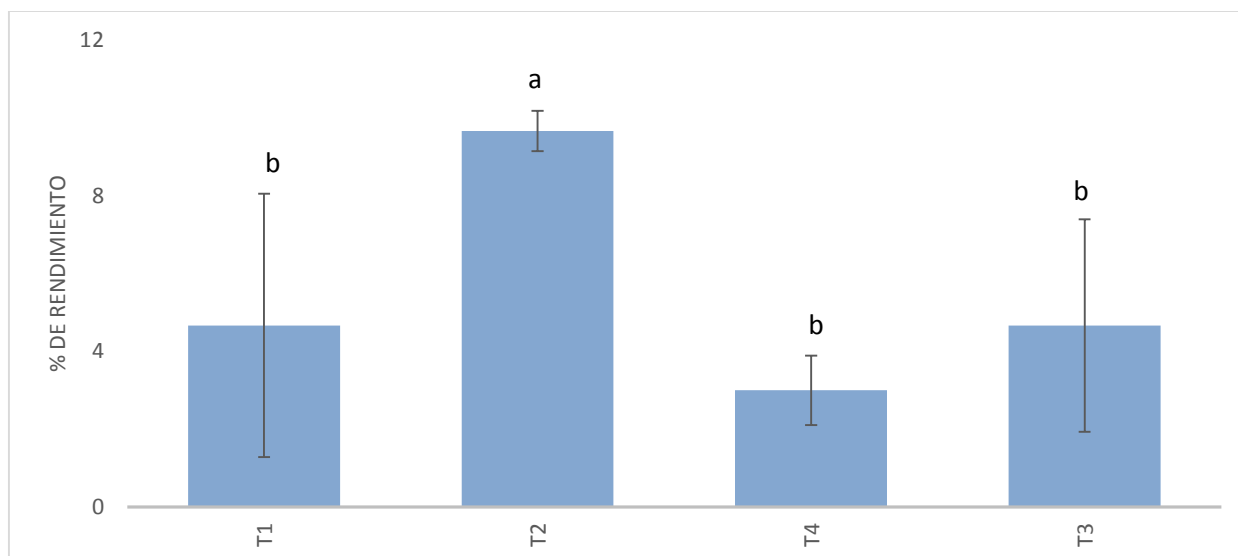
Figura 14. Porcentaje de encapsulación (Medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

Cuadro 12. Porcentaje de encapsulación (Medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

SISTEMAS	TRAT	MEDIA	DS±
ALG0.5SeCys	T1 (Secys)	20.3333	9.2916
ALG 0.5SeMet	T1 (SeMet)	0.3100	0.1931
ALG2 SeCys	T2 (SeCys)	2.0000	0
ALG2SeMet	T2 (SeMet)	1.2933	2.2401
CMC0.5SeCys	T4 (SeCys)	34.6666	24.3790
CMC0.5SeMet	T4 (SeMet)	0.4866	0.3153
CMC2SeCys	T3 (SeCys)	65.6666	17.6163
CMC2SeMet	T3 (SeMet)	9.6966	12.2347

\*A cada tratamiento (de los cuatro tratamientos) se determino selenometionina y selenocisteina

Para la variable de rendimiento, el mayor valor se presentó para el T2 con una media de 9.667% con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos. Esta determinación nos indica cuánto de la masa de polímeros y del activo que se adicionó durante el proceso de encapsulación realmente formaron micro y nanopartículas.



Medias con las mismas letras no son diferentes ( $p < 0.05$ )

Figura 15. Porcentaje de rendimiento (Medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

Cuadro 13. Porcentaje de rendimiento (Medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

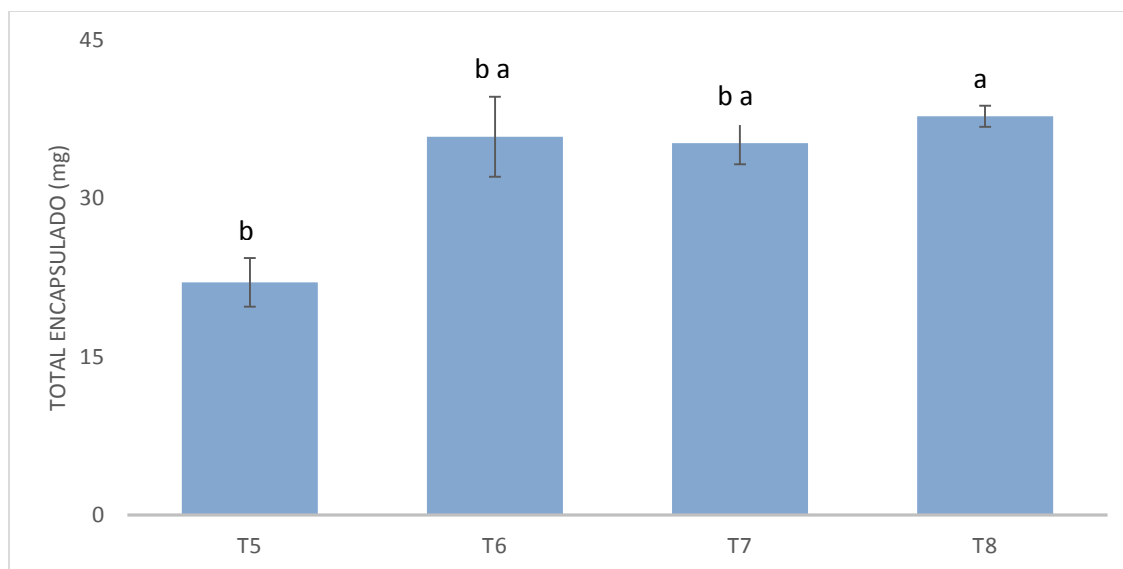
TRAT	TRAT	MEDIA	DS±
ALG0.5SELPLEX®	T1	4.6667	3.3862
ALG2 SELPLEX®	T2	9.6667	0.5164
CMC0.5 SELPLEX®	T4	3.0000	0.8944
CMC2 SELPLEX®	T3	4.6667	2.7325

Por tanto, se observa que el mejor rendimiento es dado para el sistema Alg 2 Selplex®. Estos datos son un tanto parecido a los reportados por Lee *et al.*, (2012), ellos formularon nanopartículas de clorhidrato de Tizanidina, Gatifloxacina y Floconazol, mediante el método de nanoprecipitación, obteniendo rendimientos del 13.8%, 8.6% y 12.7% respectivamente, ellos atribuyendo estos valores al comportamiento químico tanto del polímero como del activo a encapsular y la interacción entre ambas.

Por otro lado, estos resultados están por debajo de los encontrados por Valdiviezo, (2012) de 37.8 a 45.9% utilizando CMC y alginato de sodio como polímero mediante secado por atomización o aspersión (Spray-Drying). Se atribuye, esta diferencia de rendimiento entre estos dos trabajos a la manera de secado de la muestra (liofilización), debido que para este estudio se observaron pérdidas de muestra al momento de liofilizar, provocado por el vacío formado de la liofilizadora.

## **Total encapsulado, porcentaje de encapsulación y rendimiento de selenito de sodio**

Para las micro y nano partículas de selenito de sodio, se observaron diferencias significativas en el modelo ( $p < 0.05$ ) para el total de encapsulamiento, al igual que para el tipo y nivel de concentración de polímero en cada tratamiento. Entre los tratamientos se observó que la mayor encapsulación fue para T8 (37.789 mg de Se) con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), esto puede ser explicado por la concentración del polímero (NaCMC 2%) que tiene la capacidad de proporcionar una solución coloidal (Parsons, 2000) y a su vez formar una película que protege al ingrediente activo de una posible oxidación, siendo atrapado el selenio dentro de los coloides y aumentando su protección durante el proceso de encapsulación (Pothakamury *et al.*, 2005). En cuanto a las medias encontradas en los totales de encapsulación los sistemas seguidos fueron T6 y T7 (35.856 mg de Se, 35.254 g de Se) sin diferencias significativas, sin embargo a pesar de tener obtener valores altos de encapsulación total, dentro de ellos el más bajo fue el T5 con una media de 22.052 mg de Se. Estos resultados coinciden con los de Romero-Pérez *et al.*, (2010), donde prepararon NPs de selenito de sodio mediante el método de nanoprecipitación con Eudragit RL y Eudragit RS para su uso en suplementación mineral en rumiantes, donde obtuvieron un total de encapsulación de 31.58 mg de selenito utilizando etanol, esto se podría atribuirse a la utilización de la acetona (disolvente orgánico) en el presente estudio, la cual tiene una mayor solubilidad en agua vs etanol, debido a los grupos carbonilos que la constituyen, denominándolo como compuestos carbonílicos teniendo propiedades como reactivo o como un buen disolvente (Quesada *et al.*, 2014).



Medias con las mismas letras no son diferentes ( $p < 0.05$ )

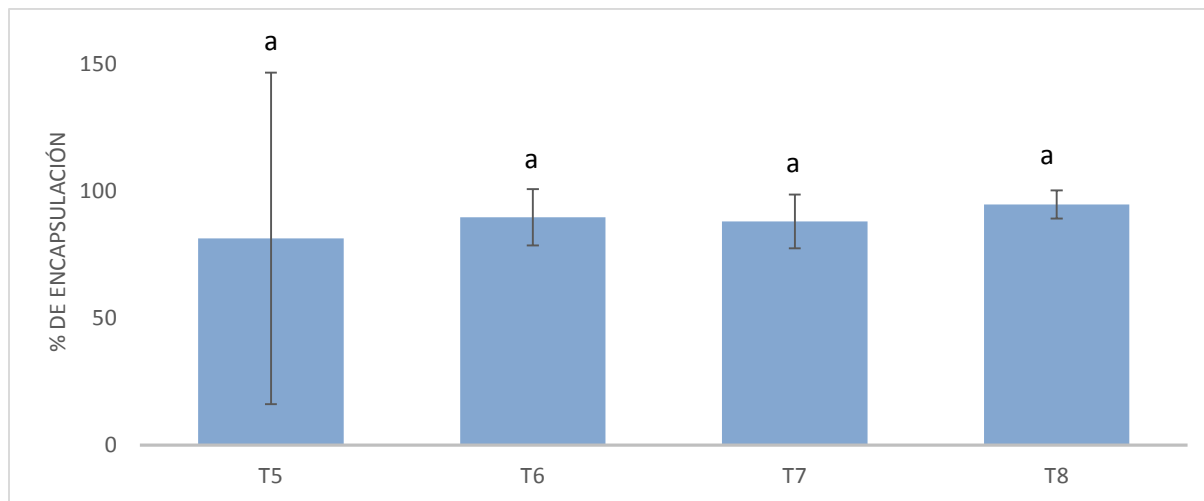
Figura 16. Total de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

Cuadro 14. Total de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

SISTEMAS	TRAT	MEDIA	DS±
ALG0.5Se	T5	22.0515	9.8228
ALG2Se	T6	35.8558	4.5226
CMC0.5Se	T7	35.2544	4.3006
CMC2Se	T8	37.7888	2.1659

Así pues para el porcentaje de encapsulación del selenito, no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los cuatro tratamientos (T5, T6, T7 y T8). Presentando valores bastante altos para todos los tratamientos con medias de 81.33%, 89.67%, 88% y 94.67% de selenito de sodio, respectivamente. Comparando los sistemas matriciales de selplex® vs selenito de sodio, estos últimos sistemas mejoraron el porcentaje de encapsulación seis veces más que los de Selplex®. Esto porcentajes coinciden con los presentados por Romero-Pérez *et al.*, (2010), donde obtuvieron el 78.82% de encapsulación para los sistemas formulados por nanoprecipitación. Autores como Asadi, (2014) han reportado porcentajes de encapsulación de 70 - 75% utilizando como polímero alginato de sodio. Otros autores, como Luo *et al.*, (2010) formularon nanopartículas de selenito de sodio utilizando quitosano/tripolifosfato (TPP) observando

una eficiencia de encapsulación de 60% hasta 95%, datos que coinciden con los de este estudio.



Medias con las mismas letras no son diferentes ( $p < 0.05$ )

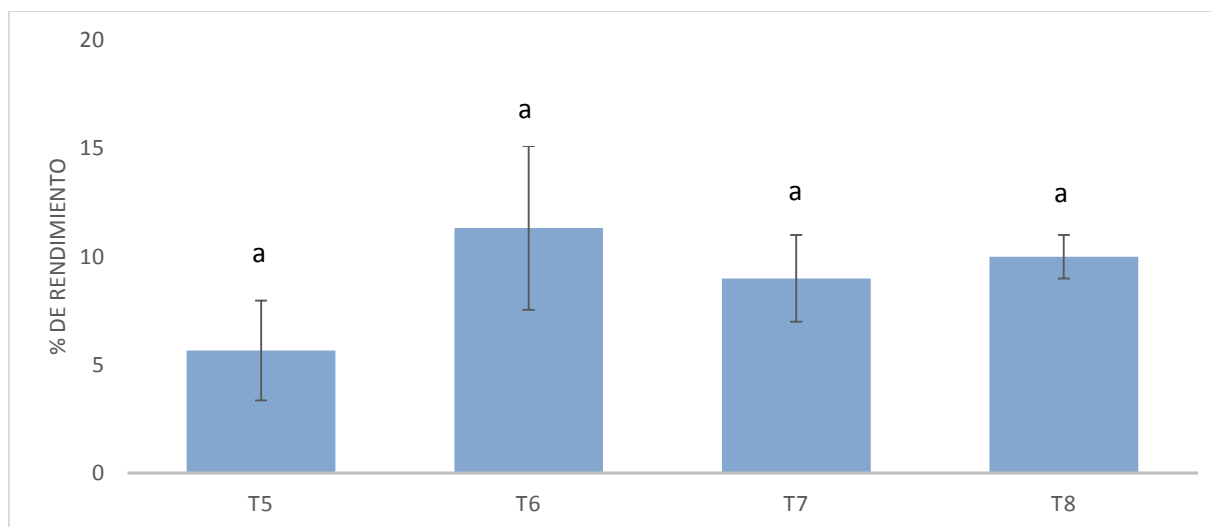
Figura 17. Porcentaje de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

Cuadro 15. Porcentaje de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

SISTEMAS	TRAT	MEDIA	DS±
ALG0.5Se	T5	81.3333	65.1869
ALG2Se	T6	89.6667	11.0604
CMC0.5Se	T7	88.0000	10.5831
CMC2Se	T8	94.6667	5.5076

El porcentaje rendimiento mayor (numéricamente) fue T6 con una media de 11.333% sin diferencias en los tratamientos ( $p > 0.05$ ) (figura 18).





Medias con las mismas letras no son diferentes ( $p < 0.05$ )

Figura 18. Porcentaje de rendimiento (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

Cuadro 16. Porcentaje de rendimiento (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

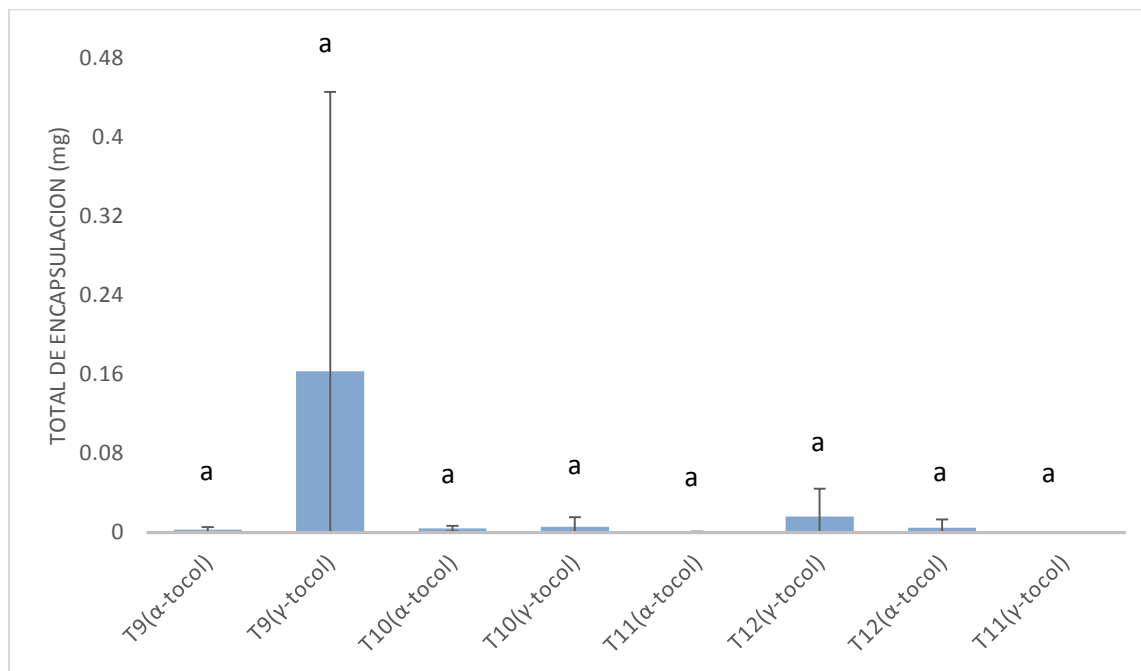
SISTEMAS	TRAT	MEDIA	DS±
ALG0.5Se	T5	5.6667	2.3094
ALG2Se	T6	11.3333	3.7859
CMC0.5Se	T7	9.0000	2.0000
CMC2Se	T8	10.0000	1.0000

Los valores de rendimiento fueron relativamente bajo debido a la pérdida de muestra en el proceso de secado, esto a consecuencia de la descongelación de la muestra. Estos datos son bastante bajos en comparación al estudio realizado por Valdiviezo (2012), donde se formularon microcápsulas de selenometionina mediante secado por aspersión o atomización (Spray-Drying), con rendimientos de 37.8 y 45.9% utilizando los mismo polímeros (NaAlg y NaCMC). Esta diferencia de resultados es atribuido a la técnica de encapsulación utilizada en cada estudio.

### **Total encapsulado, porcentaje de encapsulación y rendimiento de vitamina E ( $\alpha$ y $\gamma$ tocoferol)**

En los tratamientos se observó que la mayor encapsulación para  $\gamma$ - tocoferol fue para T9 con una media de 0.1633 mg de  $\gamma$ - tocoferol, pero sin diferencias significativas ( $p > 0.05$ ). Para  $\alpha$ -tocoferol no hubo diferencias ( $p > 0.05$ ) en todos los tratamientos. Por

tanto, se observa que la cantidad total encapsulada es muy baja, esto puede atribuirse a una degradación de la vitamina E durante el proceso de encapsulación (nanoprecipitación) a consecuencia de las altas temperaturas involucradas en la operación (70 ° C).



Medias con las mismas letras no son diferentes ( $p < 0.05$ )

Figura 19. Total de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

Cuadro 17. Total de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

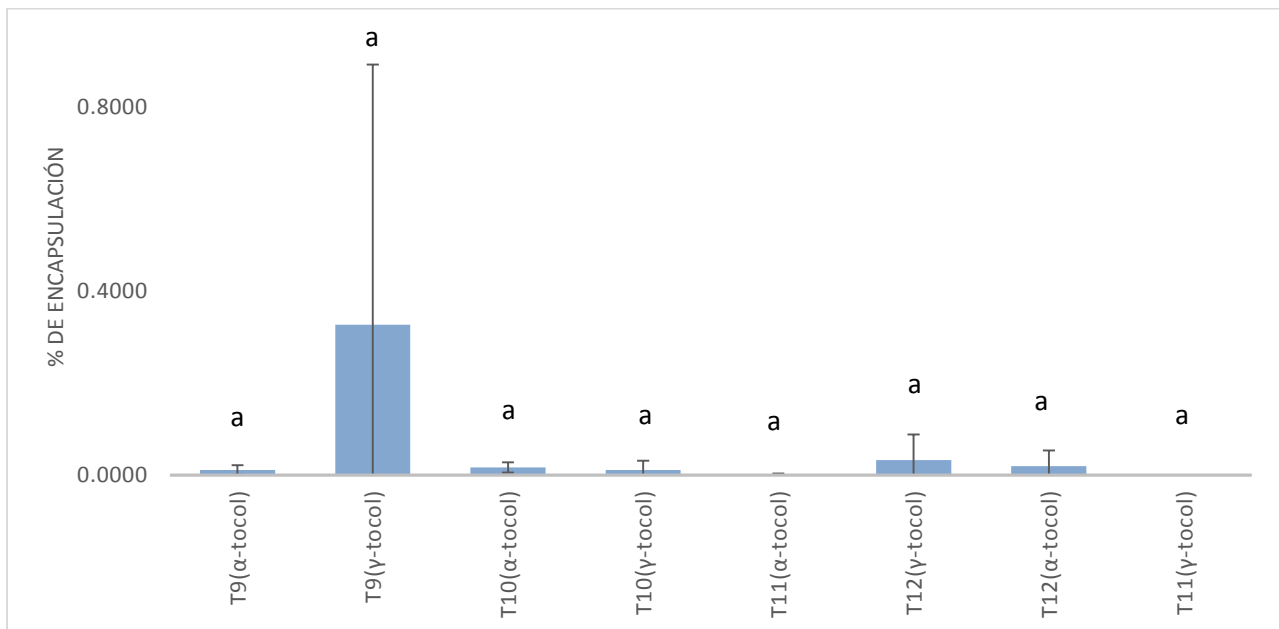
TRAT	TRAT	MEDIA	DS
ALG0.5alfa-Toc	T9(α-tocol)	0.0027	0.0025
ALG0.5gama-Toc	T9(γ-tocol)	0.1633	0.2829
ALG2alfa-Toc	T10(α-tocol)	0.0040	0.0027
ALG2gama-Toc	T10(γ-tocol)	0.0057	0.0098
CMC0.5alfa-Toc	T12(α-tocol)	0.0003	0.0005
CMC0.5gama-Toc	T12(γ-tocol)	0.0162	0.0281
CMC2alfa-Toc	T11(α-tocol)	0.0048	0.0083
CMC2gama-Toc	T11(γ-tocol)	0.0000	0.0000

\*A cada tratamiento (de los cuatro tratamientos) se determino α-tocoferol y γ-tocoferol.

Así pues, en un estudio realizado por Khayata *et al.*, (2012) donde formularon nanopartículas de vitamina E con Policaprolactona (PCL)/poli (dl-lactida-co-glicolida) (PLGA) como agente encapsulante mediante el método de nanoprecipitación

encontraron un porcentaje de encapsulación del 98% muy arriba de lo observado en este estudio. Este contraste de resultados entre estudio, se cree que es por las propiedades oleosas del fármaco y la interacción con los polímeros. Ya que una buena eficiencia de encapsulación se refiere de manera general a la afinidad del tocoferol con el agente encapsulante y la capacidad de protección del mismo al activo (Bouchemal *et al.*, 2005).

En este estudio, en los porcentaje de encapsulación no se observaron diferencia significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamiento ni en interacciones, tanto para  $\alpha$  y  $\gamma$  tocoferol. Lo que se concluye que la afinidad entre la carboximetilcelulosa de sodio y alginato de sodio con la vitamina E es muy baja.



Medias con las mismas letras no son diferentes ( $p < 0.05$ )

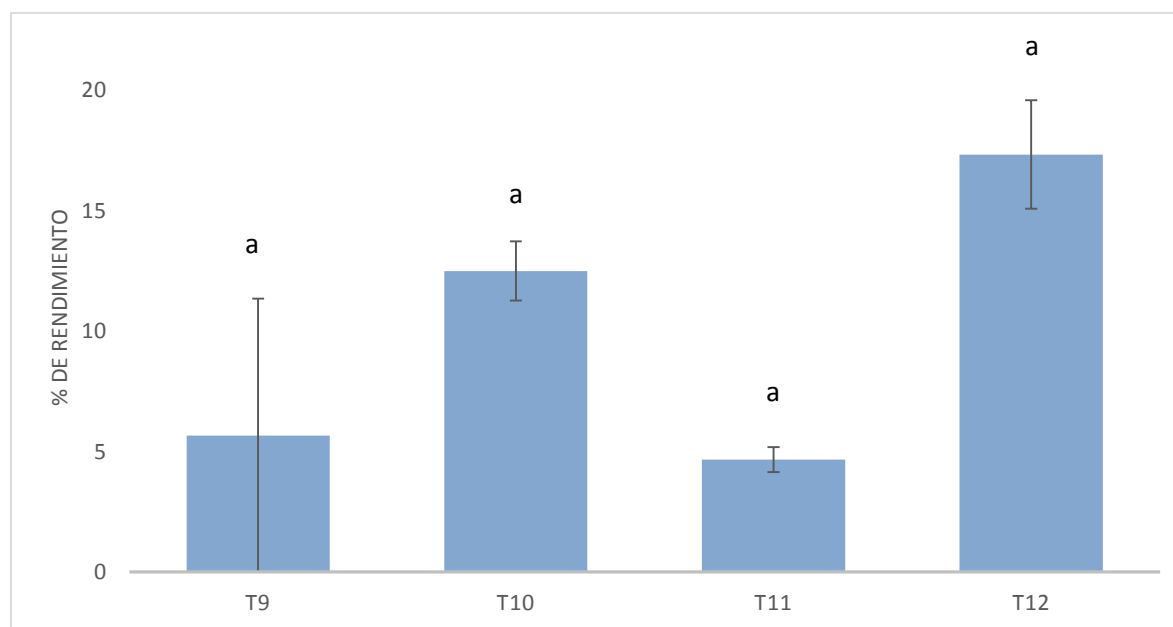
Figura 20. Porcentaje de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

Cuadro 18. Porcentaje de encapsulación (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

TRAT	TRAT	MEDIA	DS±
ALG0.5alfa-Toc	T9(α-tocol)	0.0112	0.0103
ALG0.5gama-Toc	T9(γ-tocol)	0.3267	0.5658
ALG2alfa-Toc	T10(α-tocol)	0.0165	0.0112
ALG2gama-Toc	T10(γ-tocol)	0.0114	0.0197
CMC0.5alfa-Toc	T11(α-tocol)	0.0012	0.0021
CMC0.5gama-Toc	T12(γ-tocol)	0.0324	0.0561
CMC2alfa-Toc	T12(α-tocol)	0.0196	0.0339
CMC2gama-Toc	T11(γ-tocol)	0.0000	0.0000

\*A cada tratamiento (de los cuatro tratamientos) se determino α-tocoferol y γ-tocoferol.

Para el porcentaje de rendimiento, no hubo diferencias significativas ( $p > 0.5$ ) en el tipo de polímero ni en el nivel de concentración. Los tratamientos T12 y T10 obtuvieron las medias más altas numéricamente de 17.33 y 12.5 % respectivamente.



Medias con las mismas letras no son diferentes ( $p < 0.05$ )

Figura 21. Porcentaje de rendimiento (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

Cuadro 19. Porcentaje de rendimiento (medias) de los diferentes sistemas matriciales y su desviación estándar.

TRAT	TRAT	MEDIA	DS±
ALG 0.5 Vit E	T9	5.6667	5.6804
ALG 2 Vit E	T10	12.5000	1.2247
CMC 0.5 Vit E	T11	4.6667	0.5164
CMC 2 Vit E	T12	17.3333	2.2509

El bajo rendimiento puede atribuírsele a dos factores; a la proporción del activo: polímero, que para este estudio fue de 1:50 y 2), debido a la poca asociación o afinidad química entre activo y polímeros. Como lo mencionan Yoo *et al.*, (2006), en un estudio donde probaron las proporción óptimas del activo: polímero, emulsionante y de CaCl<sub>2</sub> para obtener el mejor rendimiento para la formulación de microcápsulas de  $\alpha$ -tocoferol, encontrando que la mejor combinación fue de activo: polímero de 6.6/3.4 (w/w), emulsificante de 1.35% (v/v) y de CaCl<sub>2</sub> de 4.3% (w/v) obteniendo un rendimiento de 57.2%, siendo un valor bastante alto para los encontrados en este trabajo.

## Tamaño de partícula

### Micro y nanopartículas de Selplex®

Para las micro y nanocapsulas de Selplex® se observaron tamaños de 3.19  $\eta$ m hasta 6540  $\eta$ m, encontrando diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre los tratamientos. Sin embargo únicamente hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los nivel concentración del polímero utilizado. Por otro lado, el tipo de polímero no tuvo ningún efecto en la proporción de los tamaños de las capsulas obtenidas en los sistemas. Así pues, las nanocápsulas fueron observadas en una proporción del 37.3% con un rango en los tamaños de 409 a 578 $\eta$ m para el sistema Alg0.5Sx. Sin embargo, la proporción mayor de microcápsulas fueron para los sistemas Alg2Sx, CMC0.5Sx y CMC2Sx con una frecuencia del 59.95%, 32.12% y 57.69% respectivamente, con un tamaño de 6.5 $\mu$ . En las fotomicrografías sé observan micropartículas con tamaños de hasta 50 $\mu$ . Encontrando una tendencia para las micropartículas a los niveles de concentración del polímero del 2%.

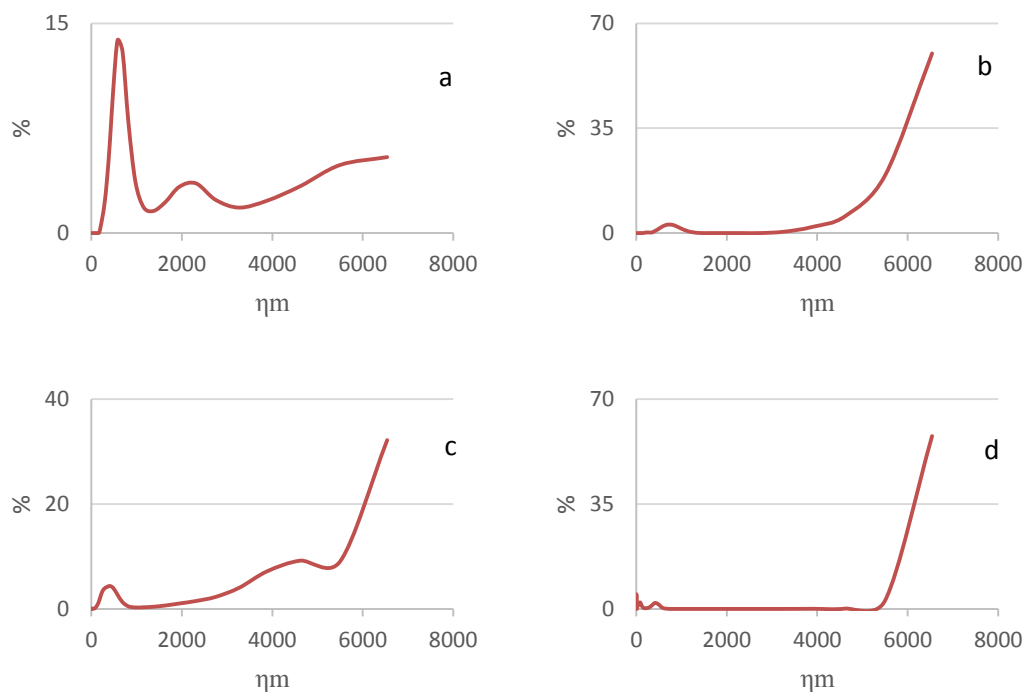


Figura 22. Distribución de frecuencia de tamaño de las micro y nanocápsulas de selenito de sodio mediante nanoprecipitación. a).- Alg0.5Sx; b).- Alg2Sx; c).- CMC0.5Sx; d).- CMC2Sx.

Los tamaños encontrados en este estudio son inferiores a los encontrados por Hosseini *et al.*, (2014), donde microencapsularon nisina utilizando como agente encapsulante al alginato de sodio a través del método de emulsión (w/o) con la finalidad de formular un sistema de entrega sostenida y así mejorar la estabilidad y efectividad de este bactericida en los alimentos, encontrando pues un rango de tamaños de partículas de 47.52 a 110.51 $\mu$ , esta diferencia se le atribuye a las propiedades que otorga el tipo de técnica de encapsulación utilizada (Flores *et al.*, 2013).

### Micro y nanopartículas de Selenito de sodio

Para las capsulas de selenito de sodio se observaron tamaños de 4.52  $\eta$ m hasta 6540  $\eta$ m, encontrando diferencias altamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre los tratamientos, así como diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) por el tipo y la concentración de polímero utilizado. Las partículas más pequeñas fueron observadas en el sistema CMC0.5Se con un 14.8% de un tamaño de 972  $\eta$ m y un proporción de 3.14% para las microcápsulas con tamaños de 6.54 $\mu$  detectado por el DLS (figura 23a). Sin embargo, a

través de las fotomicrografías se observaron capsulas de hasta 50 $\mu$ . Así pues, estos rangos de tamaños son parecidos a los de Chorny *et al.* (2002), ellos observaron nanoesferas cargadas de drogas lipofílicas de tamaños entre 70 y 115  $\eta$ m utilizando el mismo método nanoprecipitación.

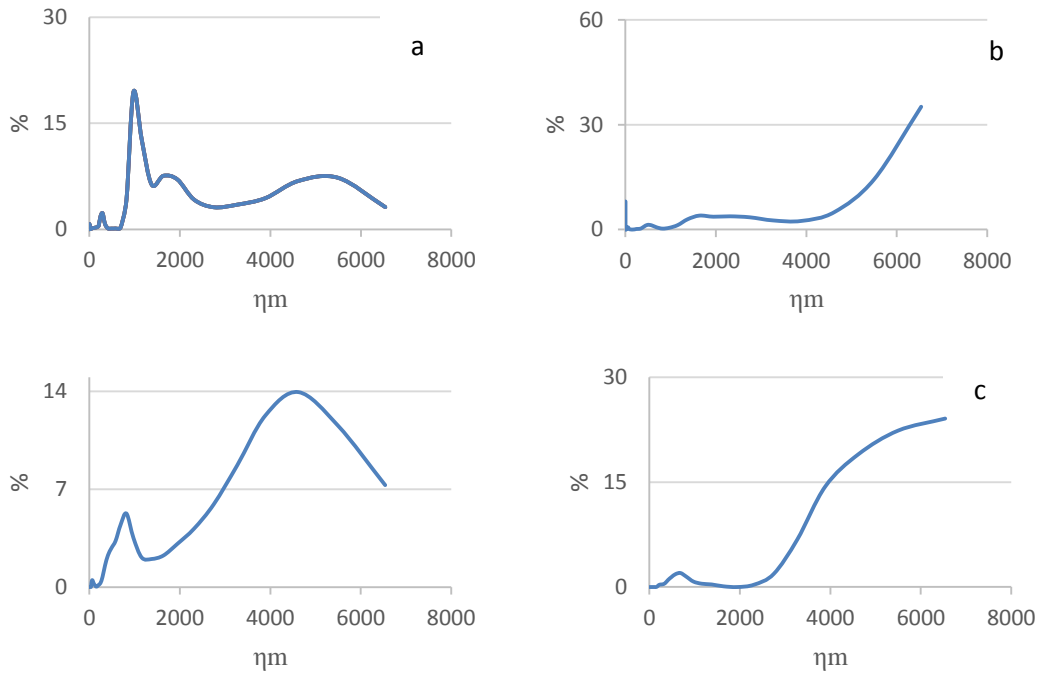


Figura 23. Distribución de frecuencia de tamaño de las micro y nanocápsulas de selenito de sodio mediante nanoprecipitación. a).- CMC0.5Se; b).- CMC2Se; c).- Alg0.5Se; d).- Alg2Se.

La ventaja de tener una variedad amplia (micro y nanocapsulas) en un mismo sistema recae principalmente en los diferentes tiempos de entrega, es decir, las partículas a nano escala se comportan de formas diferentes a las micropartículas del mismo material. Solo reduciendo el tamaño sin cambiar la sustancia, los materiales pueden ser más fuertes, más ligeros, más solubles al agua así como el cambiar la forma de entrega del activo (más rápido o más lenta) o bien, potenciar la actividad o función del fármaco (Rieux *et al.*, 2006).

## Micro y nanopartículas de Vitamina E

Los tamaños observados en las micro y nanopartículas de Vitamina E oscilan entre  $4.28\eta\text{m}$  –  $6.54\mu$  para estos tratamientos. Observando también, como los demás sistemas matriciales en las fotomicrografías cápsulas de hasta  $50\mu$ .

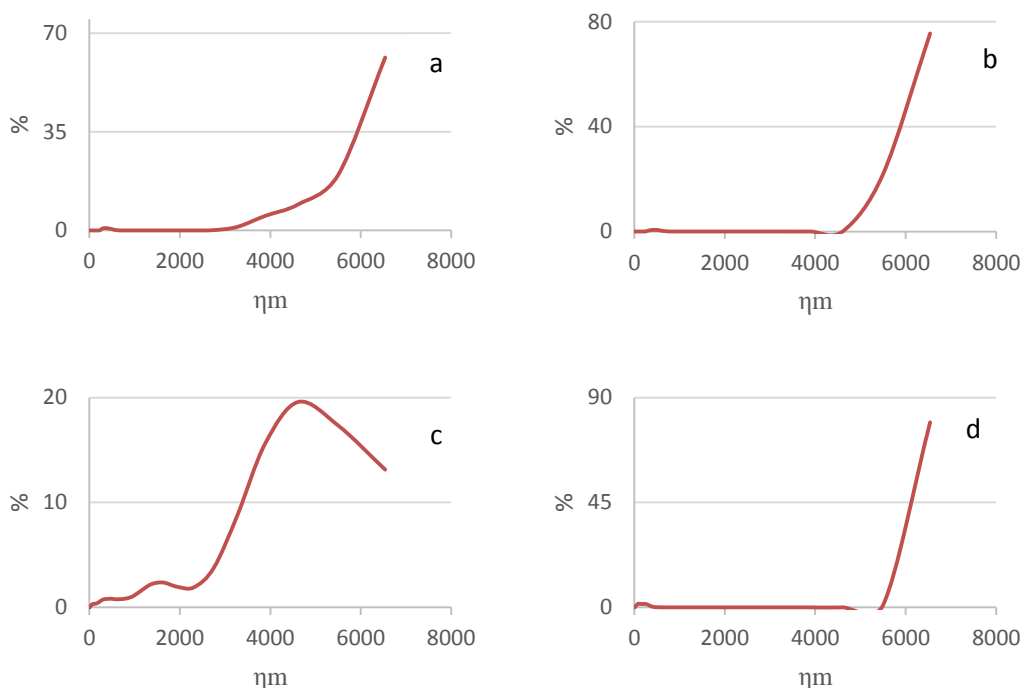


Figura 24. Distribución de frecuencia de tamaño de las micro y nanocápsulas de selenito de sodio mediante nanoprecipitación. a).- Alg0.5VitE; b).- Alg2VitE c).- CMC0.5VitE; d).- CMC2VitE.

Estos datos contrastan con los encontrados por Khayata *et al.* (2012), quienes nanoencapsularon vitamina E por nanoprecipitación, obteniendo tamaños de partículas de entre 165 a 172 nm, esto puede atribuirse a la ausencia de un tenso activo durante el proceso de precipitación que pudo haber modulado el tamaño y forma de las partículas, como lo afirma Chin *et al.* (2011) quienes utilizando el método de nanoprecipitación para encapsular almidón nativo y obtuvieron nanopartículas de tamaño de entre 300 y 400  $\eta\text{m}$ , y que al utilizar un agente tensoactivo o surfactante como hexadecil (cetil) trimetilamonio bromuro (CTAB), observaron un reducción en el tamaño de hasta 150  $\eta\text{m}$  y utilizando un Tween 80 el tamaño obtenido fue de 3200  $\eta\text{m}$ .



## CONCLUSIÓN

Se concluye que el método de nanoprecipitación no es el más adecuado al menos para la encapsulación a nano y microescala del Selplex® y Vitamina E, esto debido a los bajos porcentajes de encapsulación presentados. Sin embargo, si es adecuado para la encapsulación de Selenito de sodio, por la afinada presentada del activo con los polímeros utilizados. La morfología de los sistemas de manera general, fueron iguales para todos los tratamientos con formas esféricas y con una textura tanto lisa como rugosa esta última característica se presentó debido al exceso de polímero en el sistema. En cuanto al tamaño de partícula de los sistemas, se generó una proporción mayor de microcápsulas que de nanocápsulas en los tres tipos de sistemas. Además de que, el tipo de polímero si influyo en el tamaño de partícula únicamente en el sistema de selenito de sodio. En cuanto a la concentración de polímero, este solo tuvo un efecto en las partículas de Selplex® y selenito de sodio.

En base a lo anterior, es evidente la importancia de una apropiada selección de las condiciones para la obtención de un sistema que sea el más adecuado para un determinado tipo de aplicación. Así pues, parámetros tales como el tamaño de partícula, naturaleza del agente de recubrimiento (polímero), solubilidad, biocompatibilidad, especificidad, biodistribución, así como la capacidad para efectuar eficientemente el proceso de transporte y liberación de fármaco, son solo algunas de las características que deberán tomarse en cuenta en el momento de considerar su empleo en el diseño de un vehículo de entrega (micro o nanopartículas).

## BIBLIOGRAFÍA

- Asadi, A. 2014. Streptomycin-loaded PLGA-alginate nanoparticles: preparation, characterization, and assessment. *Applied Nanoscience*. 4(4): 455-460pp.
- Barba C., D Montané, M Rinaudo and X Farriol. 2002. Synthesis and characterization of carboxymethylcelluloses (CMC) from non-wood fibers I. Accessibility of cellulose fibers and CMC synthesis. *Cellulose*. 9(3-4): 319-326pp.
- Bouchemal, K., S. Briancon, H. Fessi, Y. Chevalier, I. Bonnet, E. Perrier. 2005. Simultaneous emulsification and interfacial polycondensation for the preparation of colloidal suspensions of nanocapsules. *Mater. Sci. Eng. C* 26, 472–480pp.
- Cancela M. A., Álvarez E. and Maceiras R. 2005. Effects of temperature and concentration on carboxymethylcellulose with sucrose rheology. *Journal Food Engineere*. 71(4):419–424 pp.
- Chin, S, F., U. C. Pang and S. H Tay. 2011. Size controlled synthesis of starch nanoparticles by a simple nanoprecipitation method. *Carbohydrate Polymers* 86:1817– 1819pp.
- Chorny M.Sc. M, M.D.I. Fishbein, M.D.H.D. Danenberg and Ph.D G Golomb. 2002. Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics. *Journal of Controlled Release* 83:389–400pp.
- Flores–Belmont I. A. and M. T Jiménez–Munguía. 2013. Microencapsulación de compuestos activos con quitosano. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1): 48-56pp.
- Hosseini S. M., H. Hosseini, M. A. Mohammadifar, J. B. German, A. M. Mortazavian, A Mohammadi. 2014. Preparation and characterization of alginate and alginate-resistant starch microparticles containing nisin. *Carbohydrate Polymers*. 103:573-580pp.

- Khayata N., W. Abdelwahed, M.F. Chehna, C. Charcosset and H Fessi. 2012. Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: From laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *International Journal of Pharmaceutics* 423:419– 427pp.
- Lee E. J., S. A. Khan, J. K. Park and K. H. Lim. 2012. Studies on the characteristics of drug-loaded gelatin nanoparticles prepared by nanoprecipitation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(1-2): 297-307pp.
- Luo Y., B. Zhang, W. H. Cheng and Q. Wang. 2010. Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. *Carbohydrate Polymers*, 82(3): 942-951pp.
- Ma J., Y. Xu, B. Fan and B Liang. 2007. Preparation and characterization of sodium carboxymethylcellulose/poly (N-isopropylacrylamide)/clay semi-IPN nanocomposite hydrogels. *European Polymer Journal*, 43(6): 2221-2228pp.
- Parsons D. 2000. Carboxymethylcellulose sodium. In: Kibbe, A.H. (Ed.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3era edition. Pharmaceutical Press, London, UK. 87– 90 pp.
- Pothakamury y Barbosa-Cánovas Rabbani N. and P. Seville. 2005. The influence of formulation components on the aerosolisation properties of spray-dried powders. *J. Control. Rel.* 110: 130–140 pp.
- Quesada J., L. Faba, E. Díaz and S. O. García. 2014. La biomasa como alternativa al petróleo para la obtención de productos químicos: acetona y etanol como moléculas plataforma. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 5(2): 31-49pp.
- Rieux A., V. Fievez, M. Garinot, Y. J. Schneider and V. Prétat. 2006. Nanoparticles as potencial oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J. Control Release* 116: 1-27pp.
- Romero-Pérez A., E. García-García, A. Zavaleta-Mancera, J. E. Ramírez-Bribiesca, A. Revilla-Vázquez, L. M. Hernández-Calva and R. G. Cruz-Monterrosa. 2010.

- Designing and evaluation of sodium selenite nanoparticles in vitro to improve selenium absorption in ruminants. *Veterinary research communications*, 34(1): 71-79pp.
- Tong Q., Q. Xiao and L. T. Lim. 2008. Preparation and properties of pullulan–alginate–carboxymethylcellulose blend films. *Food Research International*. 41(10): 1007-1014pp.
- Valdiviezo Morales, L. (2012). Diseño y caracterización de microcápsulas de seleniometionina. Tesis de maestría, Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo.
- Yoo S. H., Y. B. Song, P. S. Chang and H. G. Lee. 2006. Microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *International journal of biological macromolecules*, 38(1): 25-30pp.

## CAPITULO II

### EVALUACIÓN DE LA CINÉTICA DE LIBERACIÓN PARA LAS MICRO Y NANOCÁPSULAS DE SELPLEX®, SELENITO DE SODIO Y VITAMINA E

#### RESUMEN

La cesión del agente activo desde una micro y nanopartícula a un determinado medio puede producirse en forma inmediata o controlada. En el primer caso, la micropartícula al entrar en contacto con el medio de disolución pierde su integridad por acción de la temperatura, pH u otros factores, cediendo el compuesto rápidamente. El objetivo de este capítulo fue determinar el comportamiento de las cinéticas de liberación para los diferentes tipos de agentes encapsulantes (carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC) y alginato de sodio (NaAlg) y, los diferentes activos (Selenometioina, selenocisteína y selenito de sodio). Se realizó la cinética de liberación de cada activo (sin encapsular) desde el gel bioadhesivo (carbopol 971) y de las micro y nanocápsulas de cada tratamiento (Selplex/NaCMC, Selplex/NaAlg, selenito de sodio/NaCMC, selenito de sodio/NaAlg) en un tubo de diálisis que contenía el gel, posteriormente se sumergió en un vaso de precipitado con agua destilada separados por una membrana sintética. Para el muestreo se tomaron 4 mL con intervalos de tiempos determinados (25, 35, 45 min y 1, 24, 96, 288 y 312 h) y finalmente la cuantificación de los activo se realizó mediante HPLC para cada sistemas matricial (Selplex®/NaCMC, Selplex®/NaAlg, selenito de sodio/NaCMC, selenito de sodio/NaAlg. Se observó un efecto por el tipo y concentración de polímero en la cinética de liberación de la SeMet y la SeCys, encontrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos. El mayor control de liberación observado de la SeMet y SeCys fue para los sistemas CMC2SeMet y CMC2SeCys alcanzando un liberación del 0.21 y 1.99% a las 312 h, la liberación se dio de manera ascendente en función al tiempo. La cinética de liberación de las micro y nanocápsulas de selenito de sodio (T3 y T4) fue de igual forma, es decir se logró que fuera de manera lenta y constante en función del tiempo. En estos tratamientos (T3 y T4) se alcanzó una liberación del 1.35 y 1.62% a las 312 h, encontrando diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.5$ ) y el testigo. Se concluye que la encapsulación del Selplex® y selenito de sodio se comportan de manera tal que favorecen los

objetivos experimentales de esta investigación. Por otro lado, se observó que la carboximetilcelulosa de sodio tuvo el mejor control para la entrega del Selplex® como del selenito de sodio. En cuanto al comportamiento de liberación de cada sistema, se observó valores de  $n$  arriba de 1 para los dos tipos de partículas estudiadas (Selplex® y selenito de sodio), esto nos indica que la liberación de los activos de ambos sistemas está explicado mediante un proceso de relajación de las cadenas poliméricas. Se concluye que la carboximetilcelulosa de sodio tuvo el mejor control para la entrega del Selplex® como del selenito de sodio, aunque se recomienda realizar más estudios a diferentes concentraciones para conocer de manera individual el efecto que pudiera producir en el control de entrega del activo.

Palabras clave: Cinética de liberación, carboximetilcelulosa, alginato de sodio, nanocápsulas y microcápsulas.

## ABSTRACT

The delivery of the active agent from a micro and nanoparticle to a given medium can be produced immediately or controlled. In the first case, the microparticle upon contact with the dissolution medium loses its integrity by the action of temperature, pH or other factors, yielding the compound rapidly. The objective of this chapter was to determine the release kinetics behavior for different types of encapsulating agents (sodium carboxymethylcellulose (NaCMC) and sodium alginate (NaAlg) and the different actives (Selenomethionine, selenocysteine and sodium selenite). Kinetics of the release of each active (unencapsulated) from the bioadhesive gel (carbopol 971) and the micro and nanocapsules of each treatment (Selplex / NaCMC, Selplex / NaAlg, sodium selenite / NaCMC, sodium selenite / NaAlg ) In a dialysis tube containing the gel and then immersed in a beaker with distilled water separated by a synthetic membrane. For the sampling, 4 mL were taken with determined time intervals (25, 35, 45 min and 1, (Selplex® / NaCMC, Selplex® / NaAlg, sodium selenite / NaCMC, sodium selenite / NaAlg), and the amount of the active compounds was determined by HPLC. Effect by the type and concentration of polymer in the release kinetics of SeMet and SeCys, finding significant differences ( $p < 0.05$ ) between the treatments. The highest observed release control of the SeMet and SeCys was for the CMC2SeMet and CMC2SeCys systems reaching a release of 0.21 and 1.99% at 312 h, release was given as a function of time. The release kinetics of sodium selenite (T3 and T4) micro and nanocapsules were similar, that is to say that it was achieved slowly and steadily as a function of time. In these treatments (T3 and T4) a release of 1.35 and 1.62% was reached at 312 h, finding significant differences between treatments ( $p < 0.5$ ) and the control. It is concluded that the encapsulation of Selplex® and sodium selenite behave in a way that favors the experimental objectives of this research. On the other hand, it was observed that sodium carboxymethylcellulose had the best control for delivery of Selplex® and sodium selenite. As for the release behavior of each system, values of  $n$  above 1 were observed for the two types of particles studied (Selplex® and sodium selenite), this indicates that the release of the active of both systems is explained by a Relaxation process of the polymer chains. It is concluded that sodium carboxymethylcellulose had the best control for the delivery of Selplex® and sodium selenite, although it is

recommended to carry out further studies at different concentrations to know individually the effect that could produce in the delivery control of the active.

Key words: release kinetics, carboxymethylcellulose, sodium alginate, nanocapsules and microcapsules.



## **JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA**

Se cree que la baja absorción de selenio en el organismo animal se debe a la reducción del selenio a formas insolubles como selenio elemental y selenuros; es por esto que se deben desarrollar y evaluar nuevas formas de suplementación del selenio que sean más eficiente. La incorporación del selenio a sistemas micro y nanométricos capaces de liberar controladamente su contenido en el órgano blanco o sitio de acción, puede representar una alternativa para mejorar la disponibilidad y entrega eficaz de este mineral. La elaboración de un sistema matricial para una entrega vía intramamarias a vacas lecheras como suplementación mineral, podría representar una solución para el problema de mastitis tan frecuente en las vacas altas productoras de leche.

## **OBJETIVO**

Evaluar el control de la entrega del Selplex® y selenito de sodio, así como el comportamiento de los perfiles de liberación en función del tiempo.

## **HIPÓTESIS**

El proceso de encapsulación le otorgará a los sistemas matriciales una capacidad de entrega de forma controlada y dosificada en función al tiempo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material**

Las micro y nanocápsulas de Selplex® y selenito de sodio utilizadas fueron formuladas en los laboratorio de Nutrición del Colegio de Posgraduados y en los laboratorios de nanotecnología de la Universidad de las Américas, Puebla. La cinética de liberación se realizó en las instalaciones de los laboratorios de Nutrición Animal del Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo.

Para la cinética de liberación de las partículas se utilizó un baño maria, vaso de precipitado, pinzas para refrigerantes y soporte universal. Para la formulación del vehículo de entrega se utilizó Carbopol 971 NF (Merck, EUA, formula:  $C_3H_4O_2$ ), metilparabeno (conservador); trietanolamina (estabilizador de pH, para la elaboración del gel), membrana de diálisis, Snake Skin (22 mm x 35 pies de diámetro en seco, 34 mm de ancho en seco,  $3.7 \text{ mL cm}^{-1}$ , Prod # 68035 lot # KC132123). Para la fase móvil se utilizó, agua (grado analítico, Merck, EUA), metanol (grado analítico, Merck, EUA), acetonitrilo (grado analítico, Merck, EUA).

### **Método**

#### **Evaluación de la cinética de liberación (selenometionina, selenocisteína y selenito de sodio)**

#### **Preparación del gel bioadhesivo (carbopol C971) como vehículo de entrega**

Se pesaron 97.5 g. de agua destilada, se agregó 0.5 g de Carbopol 971 (1%) y 0.5 de metilparabeno (como conservador) con agitación constante. Posteriormente se neutralizó el pH del gel con trietanolamina al 20 % hasta alcanzar un pH=7.

#### **Adición de la solución madre para cada activo y nano y/o microcápsulas de cada activo al vehículo**

A 22 g del vehículo de entrega (gel bioadhesivo) se adicionó 5 ml de la solución madre de cada activo (8 mg/mL) ó 0.5 g de las nano y microcápsulas de cada tratamiento con agitación constante para obtener una dispersión uniforme en el gel.

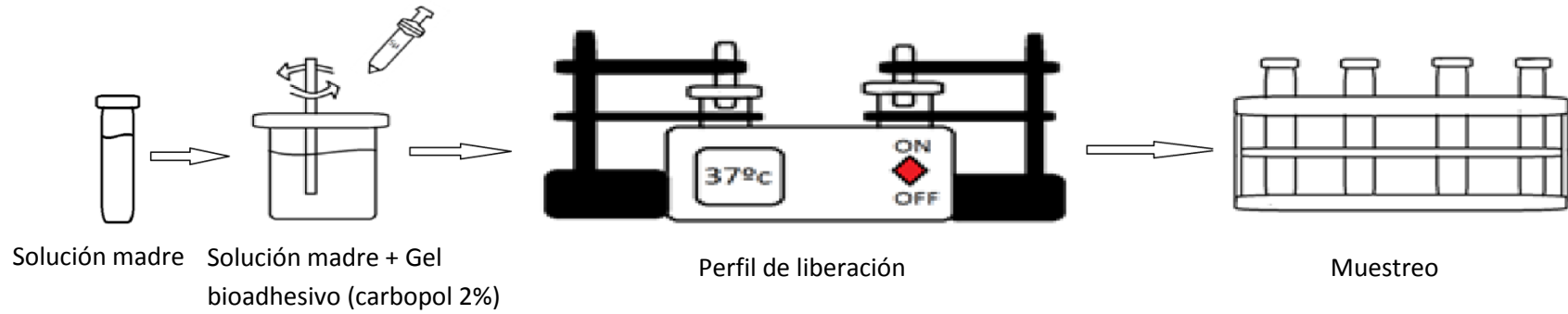
**Cinética de liberación desde el vehículo de entrega de los activos sin encapsular y los activos encapsulados.**

Se estudió la cinética de liberación de cada activo desde el gel bioadhesivo (carbopol 971) adicionando los estándares de cada activo sin encapsular (testigo) ó microcápsulas de cada tratamiento (Selplex®/NaCMC, Selplex®/NaAlg, selenito de sodio/NaCMC, selenito de sodio/NaAlg). El gel (22 g) con o sin microcápsulas se colocó en un tubo de diálisis (8 de largo x 3 cm de diámetro), el cual se sumergió en un vaso precipitado con 20 ml de agua destilada. El agua y gel se separaron por medio de una membrana (Shake Skin), como se muestra en la figura 25. Se tomaron muestras de cuatro ml con intervalos de tiempos conocidos (25, 35, 45 min y 1, 24, 96, 288 y 312 h). Después de cada toma de muestra se repuso el volumen para mantenerse constante y finalmente la cuantificación de los activos se realizó mediante HPLC. En el cuadro 20 se muestran las condiciones experimentales utilizadas en el ensayo.

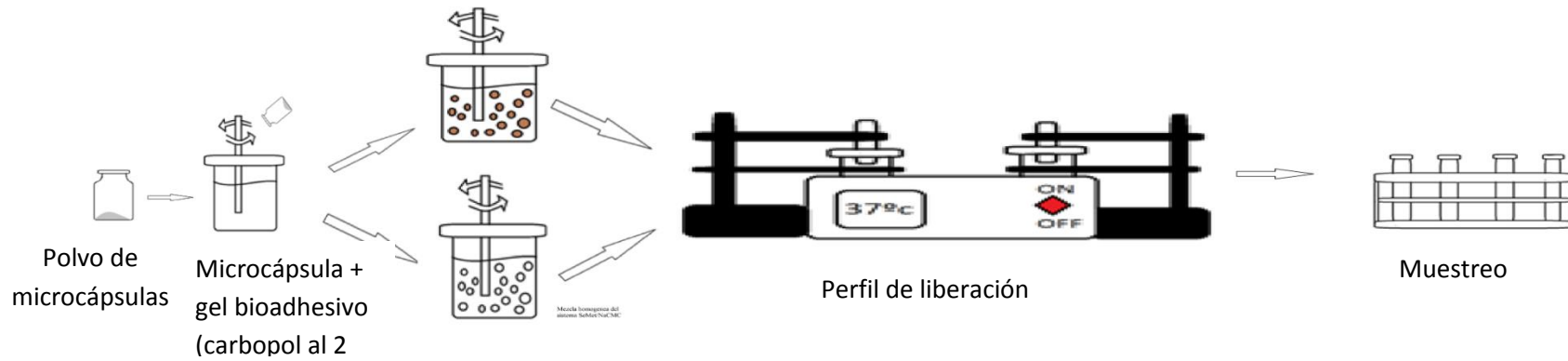
Cuadro 20. Condiciones experimentales utilizadas para los perfiles de liberación desde el gel bioadhesivo (carbopol 971) para cada activo sin encapsular y encapsulados.

Condiciones	Rango
Temperatura	37 ± 0.5 °C
Volumen	20 mL
Medio de disolución	Agua destilada
Volumen de muestra	4 mL
Tiempo de muestreo (gel adicionado con el activo sin encapsular)	25, 35, 45 min y 1, 24, 96, 288 y 312 h
Tiempo de muestreo (gel adicionado con microcápsulas)	1, 24, 96, 288 y 312 h
Cuantificación	HPLC

Activo (sin encapsular) + vehículo de entrega (gel bioadhesivo).



Microcápsulas con el activo + vehículo de entrega (gel bioadhesivo).



**Figura 25. Esquema utilizado para los perfiles de liberación.**

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de la cinética de liberación fue procesada con el programa estadístico SAS 9.0, mediante análisis de varianza usando el procedimiento GLM y la comparación de medias se realizó con una prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. Para investigar la cinética de liberación se utilizaron los modelos matemáticos propuestos por Higuchi (1963) y Korsmeyer *et al.* (1983).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

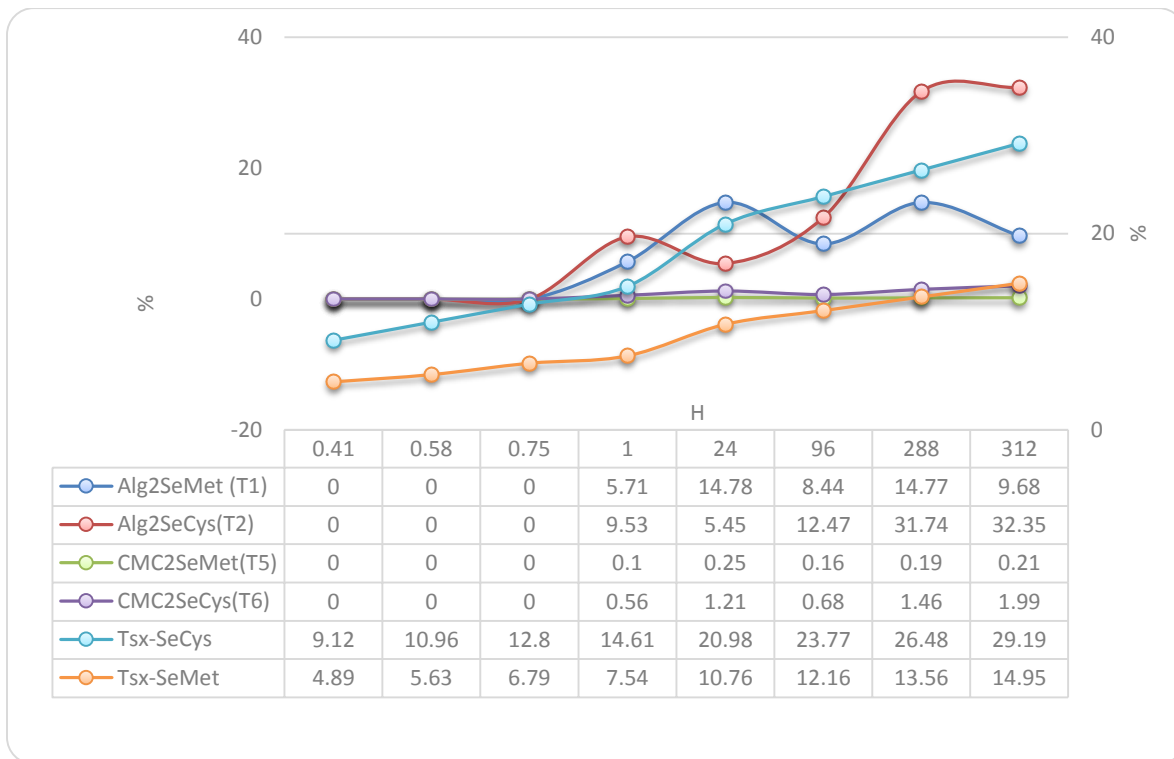
### **Evaluación *in vitro* de la cinética de liberación de Selplex® (Selenometionina y Selenocisteína) y selenito de sodio desde gel bioadhesivo (carbopol al 2%)**

Se observó un efecto por el tipo y concentración de polímero en la cinética de liberación de la SeMet y la SeCys, encontrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los tratamientos.

La cinética de liberación del testigo, Selplex® (sin encapsular) a través del gel bioadhesivo en agua bidestilada, para la SeMet y SeCys mostró una liberación creciente a través del tiempo hasta alcanzar una concentración máxima de 38.86 y 38.53 mg mL<sup>-1</sup> equivalente a un 14 y 29% de liberación a las 312 h (figura 26), esto sugiere que hay un control de entrega del gel bioadhesivo, ya que no se logra alcanzar la liberación en su totalidad a pesar de las horas transcurridas en la cinética de liberación. Este comportamiento de liberación es explicado por las propiedades reológicas del carbopol (gel bioadhesivo) que le da la capacidad de controlar la liberación de una droga o fármaco (Riley *et al.*, 2001).

El mayor control de liberación observado de la SeMet y SeCys fue para los sistemas CMC2SeMet (T5) y CMC2SeCys (T6) alcanzando un liberación del 0.21 y 1.99% a las 312 h, la liberación se dio de manera ascendente en función al tiempo. Comparando los tratamientos 5 y 6 con el testigo la entrega del activo se redujo en un 71% y 14.2% respectivamente, este comportamiento se le atribuye por la relajación viscoelástica (Gonzalez *et al.*, 2011) de la NaCMC, donde la penetración del agua hacia la micro y nanocápsula es controlada por la rapidez de la relajación de sus cadenas (Muñoz y

Zuluaga, 2009), esto sugiere que los procesos de difusión y relajación de tensiones de las cadenas poliméricas tienen lugar en el mismo orden de tiempos, de tal forma que el predominio del proceso de difusión sobre el proceso de la relajación de tensiones de las cadenas del polímero están relacionados fuertemente, con respecto al comportamiento Fickiano (Brannon y Peppas, 2011). Esta pared formada por los polímeros en la encapsulación de los activos, da el control para una liberación del fármaco de forma lenta y constante.



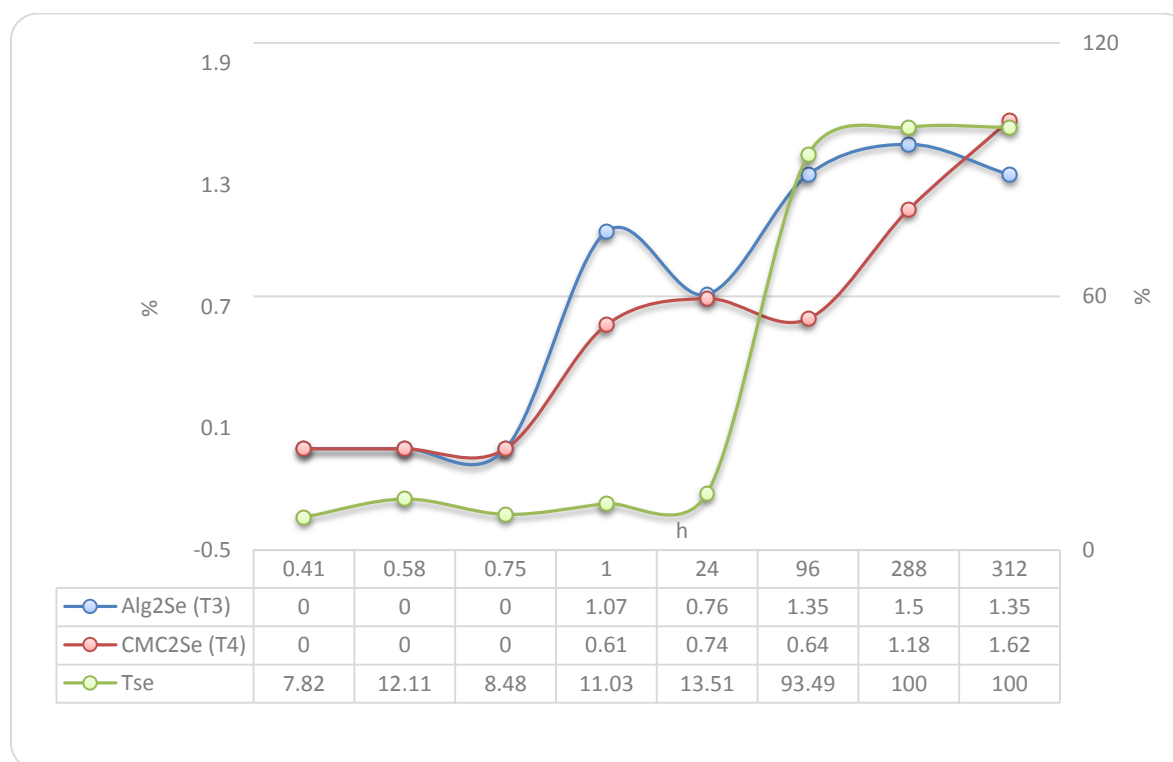
Nota: la escala del eje vertical secundario corresponde a los testigos y el eje vertical primario para los tratamientos T1, T2, T5 y T6.

Figura 26. Cinética de liberación de la SeMet y SeCys desde gel bioadhesivo sin encapsular (testigo) y con micro y nanocápsulas en agua bidestilada como medio de disolución a 37°C.

Así pues, el estudio de la cinética de liberación de un activo que se encuentra dentro de un sistema de liberación, es decir a través de micro o nanopartículas, es de considerable importancia en el desarrollo de estos sistemas, ya que permite calcular constantes que brindan una información muy útil, relacionada con el mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de liberación. El proceso de liberación de un activo

dentro de un sistema de liberación compuesto (micro o nanopartículas) puede llevarse a cabo mediante diversos mecanismos: difusión y relajación o hinchamiento de las cadenas poliméricas (Brannon y Peppas, 2011).

La cinética de liberación de las micro y nanocápsulas de selenito de sodio (Alg2Se (T3) y CMC2Se (T4)) fue de igual forma, es decir se logró que fuera de manera lenta y constante en función del tiempo. En estos tratamientos (T3 y T4) se alcanzó una liberación del 1.35 y 1.62% a las 312 h, encontrando diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) y el testigo. Es decir, la reducción de la cantidad de entrega del selenito de sodio fue bastante evidente, ya que a la hora 288 del testigo (Tse) ya se había liberado el 100%, cuando las micro y nanocápsulas de selenito alcanzaban en promedio para ambos tratamiento el 1.48% de selenito liberado.



Nota: la escala del eje vertical secundario corresponde a los testigos y el eje vertical primario para los tratamientos T1, T2, T5 y T6

Figura 27. Cinética de liberación de la Selenito de sodio desde gel bioadhesivo sin encapsular (testigo) y con micro y nanocápsulas en agua bidestilada como medio de disolución a 37°C.

Este comportamiento de liberación se le atribuye al proceso de hinchamiento del polímero en cada sistema (Alg de Na y NaCMC), esto a consecuencia de que la matriz

polimérica que inicialmente se encuentra en estado cristalino, sufre una transición vítrea y se forma un hidrogel. Este proceso está relacionado con la difusión de un fármaco desde y a través de dicho polímero, bajo difusión a contracorriente de agua o fluido biológico hacia el interior del polímero (Grenier y González, 1994). En este caso los perfiles de liberación se caracterizan por presentar una disminución de la velocidad de liberación con el tiempo, que se relaciona con la mayor distancia que tiene que recorrer el fármaco dentro de la matriz.

Otro factor que influye en la liberación es el tamaño de partícula, debido que en los sistemas existen partículas de tamaño nano y micrométrico, es decir desde 4.28  $\eta$ m hasta 50 $\mu$ , haciendo esto la diferencia en las velocidades de liberación de cada activo teniendo así un equilibrio complejo en la entrega entre ellas.

Con el objetivo de analizar la cinética de liberación del Selplex® (SeMet y SeCys) y selenito de sodio, así como de los mecanismos asociados al proceso de difusión, se ajustaron los perfiles de liberación (13 días) de todas las formulaciones a los modelos matemáticos descritos (Cuadro 21).

Cuadro 21. Parámetros cinéticos obtenidos desde las curvas de liberación para el gel bioadhesivo sin y con micro y nanopartículas.

Ajustes de los perfiles de liberación						
Sistema	Higuchi			Kormeyer & Peppas		
	k $\pm$ DE	Ordenada de origen	r <sup>2</sup>	k	n	r <sup>2</sup>
Alg2Sx (T1)	0.03 $\pm$ 0.04	-6.8524	0.8176	3.47100593	4.5	0.5164
CMC2Sx (T2)	0.002 $\pm$ 0.0021	-2.0368	0.6057	12.7785847	3.14	0.4617
Tsx	0.0924 $\pm$ 0.0445	-11.206	0.8854	2.94309065	6.67	0.9453
Alg2Se (T3)	0.0030 $\pm$ 0.0043	-12.485	0.5226	9.71657968	4.93	0.3132
CMC2Se (T4)	0.0020 $\pm$ 0.0024	-4.8404	0.7803	11.6794551	4.15	0.5326
Tse	0.15 $\pm$ 0.04	0.0643	0.9482	2.79484816	2.16	0.8766



Según el coeficiente de correlación obtenido ( $r^2$ ) después de ajustar los modelos de Higuchi y Kormeyer & Peppas de los tratamientos como de los testigos con el gel bioadhesivo, podemos afirmar que al menos para los tratamientos T2, T3x, T3 y T4, el modelo de Higuchi no es el más apropiado pero si adecuado para T1 y Tse. En el caso de Kormeyer & Peppas este fue adecuado únicamente para T3x y no para el resto de los sistemas.

Por otro lado, el valor de  $n$  oscilo arriba de 1, esto nos indica que la liberación del Selplex® y selenito de sodio está explicado mediante un proceso de relajación de las cadenas poliméricas (Katime *et al.*, 2004).

## **CONCLUSIÓN**

Se concluye que la encapsulación del Selplex® y selenito de sodio se comportan de manera tal que favorecen los objetivos experimentales de esta investigación. Ya que se buscaba proteger de los factores externos a cada uno de los activos para evitar su degradación y, además controlar la entrega del activo.

Por otro lado, se observó que la carboximetilcelulosa de sodio tuvo el mejor control para la entrega del Selplex® como del selenito de sodio, aunque se recomienda realizar más estudios a diferentes concentraciones para conocer de manera individual el efecto que pudiera producir en el control de entrega del activo.

En la evaluación de los modelos de Higuchi y Kormeyer & Peppas, se concluye que el comportamiento de todos los sistemas formulados es dado por la relajación de las cadenas poliméricas de la NaCMC y NaAlg.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Brannon-Peppas L. and N. A. Peppas. 2011. Dynamic and equilibrium SWelling behaviour of pH-sensitive hydrogels containing 2-hydroxyethylmethacrylate. *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium: Silver Jubilee Compendium*, 51pp.
- Gonzalez N., J. Prin, J. Benítez, A. Ramírez, A. García, M. Ramirez, M. Sabino y B. Rojas. 2011. Estudio de la cinética de difusión en hidrogeles sintetizados a partir de acrilamina-co-ácido acrílico con turba y almidón vía calentamiento convencional y bajo radiación microondas. *Rev. Latinam. Metal. Mat.* 32: 136-144 pp.
- Grenier L. and R. González. 1994. Sistemas biomaterial-droga para la liberación controlada de antibióticos. *Biomédica.* 14(1): 30-38pp.
- Higuchi T. 1963. Mechanism of sustained-action Medication: Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J. of Pharmaceutical Sci.* 52: 1145-1149pp.
- Katime I., O. Katime and D. Katime. 2004. Los materiales inteligentes de este Milenio: los hidrogeles polímeros. Servicio Editorial de la Universidad del País Vasco. Bilbao.
- Korsmeyer R., R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, and N. Peppas. 1983. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* 15: 25-35 pp.
- Muñoz G. A. and F. Zuluaga. 2009. Síntesis de hidrogeles a partir de acrilamida y ácido alilmalónico y su utilización en la liberación controlada de fármacos. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 33: 539-548pp.
- Riley R., F. Smart, D. Tsibouklis, J. Dettmar, P. Hampson, F. Alf Davis, J. Kelly and G. Wilber. 2001. An investigation of mucus/polymer rheological synergism using synthesised and characterised poly(acrylic acid). *Int. J. Pharm.* 217: 87– 100 pp.

## CAPITULO III

### **DETERMINACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA (LD<sub>50</sub>) DE MICRO Y NANOCÁPSULAS DE SELPLEX® (SELENOMETIONINA Y SELENOCISTEINA) Y SELENITO DE SODIO EN RATONES.**

#### **RESUMEN**

El selenio es un elemento traza esencial en la dieta, necesario para el mantenimiento de la salud y el crecimiento; sin embargo, su toxicidad podría causar daños graves en función de la dosis y forma química. Así pues, con el interés de reducir la cantidad de selenio en suplementos minerales y los problemas de toxicidad en animales sobredosificados, se buscan nuevas formas de administración de selenio que sean más efectivas para cubrir el requerimiento en los animales, la utilización de selenio protegido a través de micro y nanopartículas, es una opción viable para lograrlo. La toxicidad aguda se define como el efecto (muerte) que ocurre inmediatamente o en un intervalo breve de tiempo después de una administración única o múltiple de tal sustancia. Se realizó una evaluación toxicológica para las micropartículas y nanopartículas de selplex® (selenometionina, selenocisteina) y selenito de sodio, mediante el método Lorke (toxicidad aguda y retardada) con el objetivo de aportar información sobre las dosis letales de los sistemas matriciales formulados. Se utilizaron 96 ratones machos de la cepa CD-1 con un peso promedio de 30 gramos y una edad de cinco semanas. El LD<sub>50</sub> consta de dos fases. Fase 1: se utilizaron nueve animales divididos en tres grupos de tres animales, cada grupo se sometió a diferentes dosis 10, 100 y 1000 mg kg<sup>-1</sup> de peso vivo, se probaron ocho tratamientos; alginato de sodio al 0.5% y 2% con selplex®, carboximetilcelulosa al 0.5% y 2% con selplex®, alginato de sodio al 0.5% y 2% con selenito de sodio y carboximetilcelulosa al 0.5% y 2% con selenito de sodio. Para la fase 2; se utilizaron tres animales, divididos en tres grupos (un animal por cada grupo) a cada animal se le administro 1600, 2900 y 5000 mg kg<sup>-1</sup> de peso vivo. En las dos fases después de la administración de los tratamientos, los ratones fueron colocados bajo observación por 24 horas y los que sobrevivieron fueron observados por una semana (siete días) para evaluar la existencia de alguna reacción tóxica. Una vez terminado el periodo de observación, se realizó la necropsia a todos los animales. Para

los tratamientos alginato de sodio al 2%/Selplex®, alginato de sodio al 0.5%/Selplex® y carboximetilcelulosa al 0.5%/Selplex® no se presentó una toxicidad aguda (muerte) a dosis menores o iguales a 5000 mg kg<sup>-1</sup> de peso vivo, afirmando con esto que el grado de seguridad es alto, para estas formulaciones. Sin embargo, para el tratamiento carboximetilcelulosa al 2%/Selplex® si se presentó la muerte de los animales a una dosis de 5000 mg kg<sup>-1</sup>, determinando una LD<sub>50</sub> de 3807.90 mg kg<sup>-1</sup>. Para las micro y nanopartículas de selenito de sodio y SeNPs el comportamiento para alginato de sodio al 0.5%/Selenito, carboximetilcelulosa al 0.5%/Selenito de sodio y carboximetilcelulosa al 2%/Selenito de sodio tuvieron una LD<sub>50</sub> de 8.94 mg kg<sup>-1</sup>, 5.66 mg kg<sup>-1</sup> y 8.94 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente. Únicamente para alginato de sodio al 2%/selenito de sodio se presentó una dosis ligeramente más alta de LD<sub>50</sub> de 12.25 mg kg<sup>-1</sup>. En la necropsia, únicamente para los tratamientos con selenito de sodio se observó un cambio de color en el hígado y una consistencia muy débil, además de presentarse una inflamación bastante pronunciada y con un color rojo ladrillo en estomago e intestino delgado y grueso. Se concluye que el selplex® tienen un grado de seguridad muy alto, cuando se proporciona mediante estos sistemas matriciales a escalas micro y nanométricas (280nm hasta 50μ). Por otro lado, para los micros y SeNPs de selenito de sodio presenta una dosis letal menor, pero mayor que los datos presentados en la literatura.

Palabras clave: ratones, toxicidad, LD50, selenito de sodio y selplex.

## ABSTRACT

Selenium is an essential trace element in the diet, necessary for the maintenance of health and growth; However, its toxicity could cause severe damage in terms of dose and chemical form. Thus, in the interest of reducing the amount of selenium in mineral supplements and toxicity problems in overdosed animals, new forms of selenium administration are sought that are more effective to meet the requirement in animals, the use of protected selenium Through micro and nanoparticles, is a viable option to achieve this. Acute toxicity is defined as the undesired effect occurring immediately or in a short time interval after a single or multiple administration of such substance. A toxicological evaluation was performed for the microparticles and nanoparticles of selplex® (selenomethionine, selenocysteine) and sodium selenite using the Lorke method (acute and delayed toxicity) to provide information on the lethal doses of formulated matrix systems. 96 male mice of the CD-1 strain with an average weight of 30 grams and, an age of five weeks, were used. The LD50 consists of two phases. Phase 1: nine animals divided into three groups of three animals were used, each group was subjected to different doses 10, 100 and 1000 mg kg<sup>-1</sup> of live weight, eight treatments were tested; 0.5% sodium alginate and 2% selplex®, 0.5% carboxymethylcellulose and 2% selplex®, 0.5% sodium alginate and 2% sodium selenite and 0.5% carboxymethylcellulose and 2% sodium selenite. For phase 2; Three animals, divided into three groups (one animal per group) were given to each animal 1600, 2900 and 5000 mg kg<sup>-1</sup> of live weight. In the two phases after administration of the treatments, the mice were placed under observation for 24 hours and those who survived were observed for a week (seven days) to assess the existence of some toxic reaction. At the end of the observation period, all animals were necropsied. For treatments 2% sodium alginate / Selplex®, 0.5% sodium alginate / Selplex® and 0.5% carboxymethylcellulose / Selplex®, there was no acute toxicity (death) at doses less than or equal to 5000 mg kg<sup>-1</sup> of Weight ratio, thus asserting that the degree of safety is high for these formulations. However, for the treatment 2% carboxymethylcellulose / Selplex® if the animals died at a dose of 5000 mg kg<sup>-1</sup>, determining an LD50 of 3807.90 mg kg<sup>-1</sup>. For sodium selenite microparticles and SeNPs the behavior for 0.5% sodium alginate / Selenite, 0.5% carboxymethylcellulose / sodium selenite and 2%

carboxymethylcellulose / sodium selenite had an LD 50 of 8.94 mg kg<sup>-1</sup>, 5.66 mg Kg<sup>-1</sup> and 8.94 mg kg<sup>-1</sup> respectively. Only a slightly higher dose of LD 50 of 12.25 mg kg<sup>-1</sup> was present for sodium alginate 2% / sodium selenite. At necropsy, only for treatments with sodium selenite showed a change in color in the liver and a very weak consistency, in addition to a fairly pronounced inflammation and a red brick color in the stomach and small and large intestine. It is concluded that selplex® has a very high degree of security when it is provided by these matrix systems at micro and nano-scale scales (280nm to 50µ). On the other hand, for the sodium selenite SeNPs and micros it presents a lower lethal dose, but higher than the data presented in the literature.

Key words: mice, toxicity, LD50, selenite sodium and selplex.

## **JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA**

El estudio de los materiales a escalas nanométricas en las áreas agrícola, pecuaria y en medicina veterinaria, se ha dado de forma lenta debido a los vacíos de conocimientos de materiales a esta escala. Así pues, las características físicas y químicas únicas que ofrecen los nanomateriales a la agricultura, sanidad animal y al sector pecuario pueden representar al mismo tiempo un riesgo para el organismo animal y el medio ambiente. Cuando se manipula la materia a escala atómica y molecular se presentan fenómenos y propiedades totalmente nuevas. Por lo tanto, es indispensable e importante realizar un estudio toxicológico a los sistemas matriciales formulados en esta investigación (micro y nanopartículas de selplex® y selenito de sodio), conocer la naturaleza de la relación dosis-respuesta ( $LD_{50}$ ) y las observaciones de efectos tóxicos.

## **OBJETIVO**

Establecer la  $LD_{50}$  y el efecto tóxico de las micro y nanocápsulas de selplex® (selenometionina y selenocisteína) y del selenito de sodio.

## **HIPÓTESIS**

Se espera que las micro y nanopartículas de selplex® (Selenometionina y selenocisteína) muestren un efecto tóxico (muerte) menor o nulo en los ratones, es decir presenten una  $LD_{50}$  mayor en comparación de las micro y nanopartículas de selenito de sodio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

Se trabajó con 96 roedores machos de la cepa CD-1 de 4 a 6 semanas de edad, con un peso promedio de 30 gr obtenidos del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala- UNAM.

Todo el desarrollo experimental se llevó acabo en el Cuarto de Experimentación Animal del Laboratorio de Fitoquímica-Posgrado en Botánica del COLPOS. En donde se mantuvieron acorde a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y siguiendo las especificaciones técnicas para seguridad y uso de animales de laboratorio.

### Partículas

Las micro y nanopartículas de selplex® y selenito de sodio fueron formuladas en el Laboratorio de Nutrición de rumiantes del Colegio de Posgraduados y en los Laboratorios de Nanotecnología de la Universidad de las América Puebla (UDLAP).

Cuadro 22. Tratamientos, dosis y número de animales utilizados en el experimento.

Tratamientos	Dosis (1era etapa)	Ratones utilizados	Dosis (2da etapa)	Ratones utilizados
Alg de Na al 2%/Selplex®	10 mg kg-1	3	1600 mg kg-1	1
	100 mg kg-1		2900 mg kg-1	
	1000 mg kg-1		5000 mg kg-1	
CMC al 2%/Selplex®	10 mg kg-1	3	1600 mg kg-1	1
	100 mg kg-1		2900 mg kg-1	
	1000 mg kg-1		5000 mg kg-1	
Alg de Na al 0.5%/Selplex®	10 mg kg-1	3	1600 mg kg-1	1
	100 mg kg-1		2900 mg kg-1	
	1000 mg kg-1		5000 mg kg-1	
CMC al 0.5%/Selplex®	10 mg kg-1	3	1600 mg kg-1	1
	100 mg kg-1		2900 mg kg-1	
	1000 mg kg-1		5000 mg kg-1	
Alg de Na al 0.5%/Selenito de sodio	10 mg kg-1	3	1 mg kg-1	1
	100 mg kg-1		2 mg kg-1	
	1000 mg kg-1		4 mg kg-1	
			8 mg kg-1	



Alg de Na al 2%/Selenio de sodio	10 mg kg <sup>-1</sup>	3	15 mg kg <sup>-1</sup>	1
	100 mg kg <sup>-1</sup>		25 mg kg <sup>-1</sup>	
	1000 mg kg <sup>-1</sup>		40 mg kg <sup>-1</sup>	
			60 mg kg <sup>-1</sup>	
CMC al 0.5%/Selenito de sodio	10 mg kg <sup>-1</sup>	3	1 mg kg <sup>-1</sup>	1
	100 mg kg <sup>-1</sup>		2 mg kg <sup>-1</sup>	
	1000 mg kg <sup>-1</sup>		4 mg kg <sup>-1</sup>	
			8 mg kg <sup>-1</sup>	
CMC al 2%/Selenito de sodio	10 mg kg <sup>-1</sup>	3	1 mg kg <sup>-1</sup>	1
	100 mg kg <sup>-1</sup>		2 mg kg <sup>-1</sup>	
	1000 mg kg <sup>-1</sup>		4 mg kg <sup>-1</sup>	
			8 mg kg <sup>-1</sup>	

### Determinación de toxicidad aguda

Para el cálculo de la LD50 se empleó el método de Lorke (Lorke, 1983), con una vía de administración oral, mediante una cánula metálica de 5 cm. La distribución de los animales se realizó en forma aleatoria, tres grupos de tres ratones cada uno (10, 100 y 1000 mg kg<sup>-1</sup>), con un total de nueve animales por tratamientos (Figura 28).



Figura 28. Distribución aleatoria de los animales

Para la segunda etapa fueron tres animales, un animal para cada dosis. Los ratones tenían un peso promedio de 30 g y fueron mantenidos en un ambiente a temperatura controlada de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h, cuyas horas luz correspondían al lapso comprendido entre las 08:30 y las 20:30 horas. Los animales se mantuvieron en jaulas de plástico, con agua y alimento (Rodent Lab Chow 5001) ad-libitum. Previo al inicio del experimento se sometió a los animales a ocho horas de ayuno. Las primeras dos horas posteriores a la administración de los tratamientos correspondientes, los animales fueron

alojados en jaulas distintas los siguientes siete días para su observación. La administración de las micro y nanocápsulas fue vía oral mediante una jeringa dosificadora provista de un catéter, la administración se realizó en una dosis única por animal (Figura 29). Se establecieron tres niveles de dosis para la primera etapa: 10, 100 y 1000 mg kg<sup>-1</sup>. Para la segunda etapa las dosis utilizadas fueron 1, 2, 4, 8, 15, 25, 40, 60 mg kg<sup>-1</sup> o 1600, 2900 y 5000 mg kg<sup>-1</sup> de acuerdo al método de Lorke. Se registró la mortalidad producida por cada dosis y por tratamiento durante siete días.



Figura 29. Administración oral de las micro y nanocápsulas de selplex® y selenio de sodio.

Finalizado el tiempo de observación, todos los animales fueron sometidos a necropsia para visualizar la presencia de cambios patológicos que no fueron visibles externamente (Figura 30).



Figura 30. Necropsia de los ratones.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación de DL<sub>50</sub>

Para los tratamientos alginato de sodio al 2%/Selplex®, alginato de sodio al 0.5%/Selplex® y carboximetilcelulosa al 0.5%/Selplex® no se presentó una toxicidad aguda (muerte) a dosis  $\leq 5000 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso vivo, afirmando con esto que el grado de seguridad es alto, para estas formulaciones (cuadro 23).

cuadro 23. Cálculos de LD<sub>50</sub> de las micro y nanopartículas de Selplex®.

Tratamiento	LD <sub>50</sub>
Alginato de sodio al 2%/Selplex®	$>5000 \text{ mg kg}^{-1}$
Carboximetilcelulosa al 2%/Selplex®	$3807.90 \text{ mg kg}^{-1}$
Alginato de sodio al 0.5%/Selplex®	$>5000 \text{ mg kg}^{-1}$
Carboximetilcelulosa al 0.5%/Selplex®	$>5000 \text{ mg kg}^{-1}$

Sin embargo, para el tratamiento carboximetilcelulosa al 2%/Selplex® si se presentó la muerte de los animales a una dosis de  $5000 \text{ mg kg}^{-1}$ , determinando una LD<sub>50</sub> de  $3807.90 \text{ mg kg}^{-1}$ , este aumento en la toxicidad en relación a los tratamientos anteriores pudiera estar dado por el polímero (CMC) debido a las propiedades físico-bioquímicas y al porcentaje de concentración, que da un control de liberación y entrega del selplex® en el organismo del animal. Contrario a lo reportado en la literatura, Nordberg *et al.*, (2014) observo dosis agudas entre  $1.5$  y  $6 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso vivo para los diferentes selenocompuestos (selenio orgánico e inorgánico) en diferentes especies animales, esto evidencia que la manipulación y administración del selenio a estas escalas mejora de manera considerable su biocompatibilidad, bioeficacia y, además disminuye la toxicidad en comparación con los diferentes selenocompuestos tradicionales tanto inorgánicos y orgánicos (Zhang *et al.*, 2001, 2004, 2005, 2008; Wang *et al.*, 2008; Jia *et al.*, 2005). En un estudio realizado por McAdam, (1987) con ratas alimentadas con torula de levadura (no encapsulada) que contenía D-selenometionina (D-SeMet), L-selenometionina (L-SeMet), selenito de sodio y selenato de sodio, donde observaron efectos adversos como depresión en el crecimiento y muerte a los 29 días a un dosis de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ , esto constata que las micro y SeNPs representan una perspectiva

novedosa para la suplementación mineral, debido a su menor toxicidad y capacidad de liberación gradualmente después de la ingestión de selenio.

Por otro lado, la síntesis de nanopartículas utilizando bacterias, levaduras (como el selplex®) y plantas da la capacidad para cambiar la toxicidad de selenio y aumenta así, la dosis de administración para los cuatro tratamientos de selplex® (levadura enriquecida de selenio) y además disminuye en gran medida los costos de producción (Skalickova *et al.*, 2016).

Sin embargo, para las micropartículas de selenito de sodio y SeNPs el comportamiento para alginato de sodio al 0.5%/Selenito, carboximetilcelulosa al 0.5%/Selenito de sodio y carboximetilcelulosa al 2%/Selenito de sodio tuvieron una LD<sub>50</sub> de 8.94 mg kg<sup>-1</sup>, 5.66 mg kg<sup>-1</sup> y 8.94 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente (Cuadro 24).

Cuadro 24. Cálculos de la LD<sub>50</sub> de las micro y nanocápsulas de selenito de sodio.

Tratamiento	LD <sub>50</sub>
Alginato de sodio al 0.5%/Selenito de sodio	8.94 mg kg <sup>-1</sup>
Alginato de sodio al 2%/Selenio de sodio	12.25 mg kg <sup>-1</sup>
Carboximetilcelulosa al 0.5%/Selenito de sodio	5.66 mg kg <sup>-1</sup>
Carboximetilcelulosa al 2%/Selenito de sodio	8.94 mg kg <sup>-1</sup>

Contrario a los tratamientos con selplex® vs SeNPs con dosis muy altas de la LD<sub>50</sub> este comportamiento se le atribuye a la forma química administrada y estado de oxidación, (Lyons *et al.*, 2007); es decir, un pequeño cambio de la estructura puede influir fuertemente los efectos resultantes. Por otro lado, en otro estudio se observó una toxicidad alta (muerte) de las SeNPs en ratones a niveles supra-nutricionales (niveles arriba de los requerimientos) de 4.0 y 8.0 mg kg<sup>-1</sup>, además de una disminución en el peso corporal, con presencia de lesiones en el hígado (presencia de células apoptóticas), riñones, pulmones y timo (He *et al.*, 2014). Así pues, estos sistemas matriciales dan la ventaja de administrar estas dosis asegurando un margen de seguridad muy amplio y la posibilidad de cubrir los requerimientos minerales en tiempos prolongados.

En el caso del tratamiento de alginato de sodio al 2%/Selenio de sodio, se observó un aumento en la LD<sub>50</sub> de 12.25 mg kg<sup>-1</sup> en comparación a los demás tratamientos de selenito probados, sin embargo estos resultados son siete veces más tóxicos con los encontrados por Zhang *et al.*, (2001) con SeNPs (Nano-Se; selenito elemental Nano rojo) con una LD<sub>50</sub> de 113 mg kg<sup>-1</sup>, este aumento en la LD<sub>50</sub> se le atribuye al agente encapsulante; albumina de suero bovino, ya ellos sugiere que la adhesión o el reacomodo de los átomos de la proteína con el selenio disminuye de manera considerable la toxicidad.

Se sabe que en los mamíferos los selenocompuestos inorgánicos son más letales que los selenocompuestos orgánicos. Y dentro de los selenocompuestos orgánico la presencia de efectos tóxicos es más con selenocisteína en comparación con selenometionina (McAdam, 1987), mientras que en la forma gris y negro elemental de selenio son biológicamente inactivos y no tóxicos en la naturaleza. En acuicultura, se ha observado un variedad de cambios tóxicos en peces y en embriones de peces expuestos a las nanopartículas, principalmente en el estrés oxidativo de lípidos, apoptosis, y en expresión génica (Chen *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2010).

### **Observación del comportamiento posterior a la aplicación de los tratamientos**

Posterior a la administración de los tratamientos se pudo observar una disminución leve en la movilidad física, conducta pasivo y piloerección durante la primera hora para todos los tratamientos. Para el caso de los tratamientos de alginato de sodio al 2%/Selplex®, carboximetilcelulosa al 2%/Selplex®, alginato de sodio al 0.5%/Selplex® y carboximetilcelulosa al 0.5%/Selplex® en la primera fase, durante el transcurso de los días, la actividad física de los ratones se fue normalizando, no se observó ninguna muerte en los siete días que duró la observación. Debido a que no se presentó ninguna muerte, al cabo de los siete días se realizó la necropsia donde no se encontraron cambios entre los órganos de los ratones tratados, debido a que no se presentó toxicidad a esas dosis se aumentaron las dosis, en esta parte el comportamiento después de la aplicación fue similar a la de las dosis de la primera fase, únicamente se

presentó una leve diarrea (Figura 31) los primeros dos días, normalizándose al tercer día. En la necropsia, para los tratamientos de selenito de sodio se observó un cambio de color en el hígado (rojo oscuro) de los ratones (Figura 32).

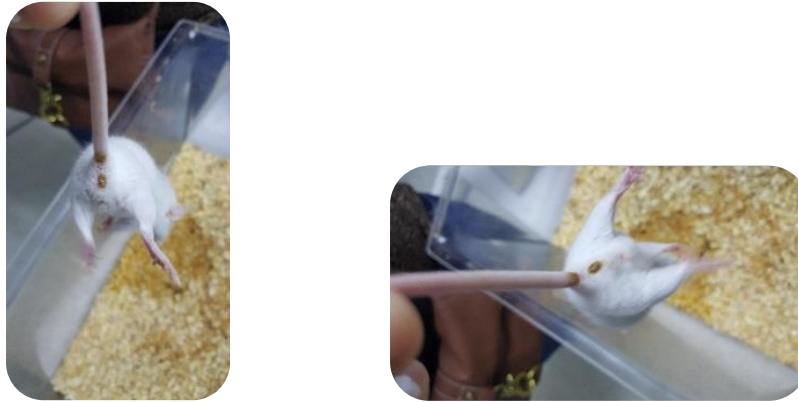


Figura 31. Presencia de diarrea en los tratamientos CMC al 0.5%/selplex®, Alg al 0.5%/selplex®, CMC al 2%/selplex® y Alg al 2%/selplex®

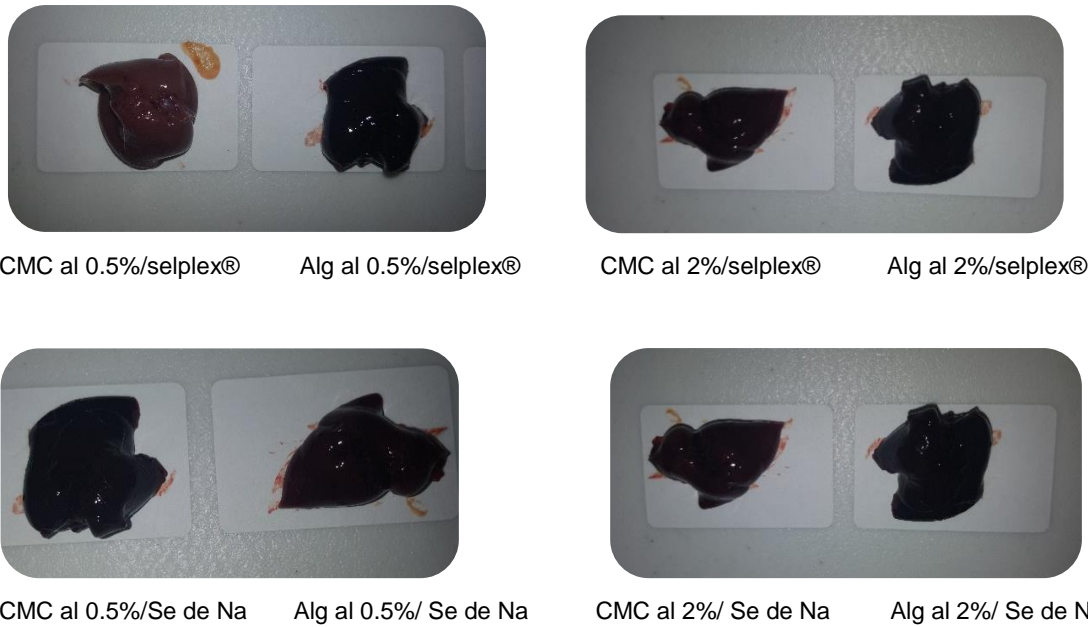


Figura 32. Cambios de color y consistencias en el hígado de ratones.

Por otro lado, para los tratamientos alginato de sodio al 0.5%/Selenito de sodio, carboximetilcelulosa al 0.5%/Selenito de sodio y carboximetilcelulosa al 2%/Selenito de sodio se presentó la muerte en función de las dosis, para la dosis de 10 mg kg<sup>-1</sup> la muerte ocurrió a la hora y media, para la dosis de 100 mg kg<sup>-1</sup> ocurrió a los 40 minutos

y para la dosis más alta  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  en 15 minutos. En la necropsia, para estos tratamientos se observó un hígado de color rojo bastante oscuro y friable estos resultados coinciden con los encontrados por McAdam, (1987) con la presencia de alteraciones patológicas irreversibles y graves, con una picnosis y necrosis en el hígado. También, tanto el estómago como el intestino delgado y grueso presentaron una inflamación bastante pronunciada y con un color rojo ladrillo. Para las dosis de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  las heces de los ratones se presentaron de color negro.



Testigo



Testigo



Alg de Na al 2%/Selplex®



CMC al 2%/Selplex®



Alg Na al 0.5%/Selplex®



CMC al 0.5%/Selplex®

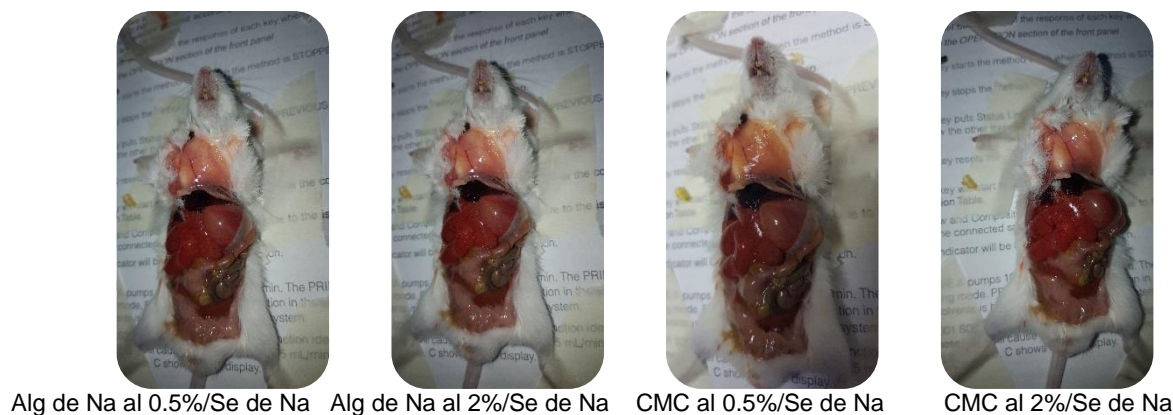


Figura 33. Aspecto del estómago e intestino grueso y delgado en ratones.

## CONCLUSIÓN

Se concluye en base a lo observado que el selplex® tienen un grado de seguridad muy alto, cuando se proporciona mediante estos sistemas matriciales a escalas micro y nanométricas (280nm hasta 50µ). Por otro lado, para los micros y SeNPs de selenito de sodio presenta una dosis letal menor, pero mayor que los datos presentados en la literatura. Afirmando así que el grado de toxicidad del selenio lo determina principalmente la forma química en la que es proporcionado. Por ello, el principal propósito de la LD<sub>50</sub> es conocer y evaluar el riesgo toxicológico a los animales, asociados el agente químico y a las condiciones de exposición. Es evidente que la situación ideal es uno en que el agente, el sistema biológico, y las condiciones de exposición utilizados para las pruebas de toxicidad sean idénticas a aquellos para los cuales estas pruebas están siendo dirigidas. Así pues, el ratón y un rumiante tienen muchas diferencias anatómicas como morfológicas en su organismo, aunque ambos son mamíferos, la mayoría de los efectos de las sustancias tóxicas son similares. Ya que existen dos principios que hay que tener en cuenta cuando se realizan pruebas de toxicidad en animales; el primero, los efectos producidos en una especie animal a causa de las sustancias administradas; y el segundo, que la exposición de animales de experimentación a agentes tóxicos en dosis altas es un método necesario y válido para descubrir posibles peligros a animales de interés zotécnicos e incluso al hombre, que están expuestos a dosis mucho más bajas.



La  $DL_{50}$  proporciona información acerca de los tipos de efectos tóxicos producidos, sobre la aparición de toxicidad, la duración de toxicidad, y así transpolar esa información a otras especies (en base al peso vivo).

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Chen Z, H. Meng, G. Xing, C. Chen, Y. Zhao, G. Jia. 2006. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol Lett.* 163:109–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.10.003>.
- Choi J.W., S. Kim, T.M. Kim, Y.M. Kim, H.W. Seo, T.S. Park, J.W. Jeong, G. Song and J.Y. Han. .2010. Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells. *PLoS One* 5, e12968.
- He Y., S. Chen, Z. Liu, C. Cheng, H. Li and M. Wang. 2014. Toxicity of selenium nanoparticles in male Sprague–Dawley rats at supranutritional and nonlethal levels. *Life sciences*, 115(1): 44-51pp.
- Jia X, N. Li, J. A. Chen. 2005. Subchronic toxicity study of elemental Nano-Se in Sprague–Dawley rats. *Life Sci.* 76(17):1989–2003pp.
- Lorke, D. 1983. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of toxicology.* 54(4): 275-287pp.
- Lyons M. P., T. T Papazyan and P. F. Surai. 2007. Selenium in food chain and animal nutrition: Lessons from nature. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20(7): 1135-1155pp.
- McAdam P. A. (1987). Chronic toxicity and retention of dietary selenium fed to rats as D-or L-selenomethionine, selenite, or selenate. *Nutrition Research.* 7(6): 601-610pp.
- Nordberg G. F., B. A. Fowler and M. Nordberg (Eds.). 2014. *Handbook on the Toxicology of Metals.* Academic Press.
- Nordberg G., and G. Nordberg. Metales: Propiedades químicas y toxicidad productos químicos. línea]. Disponible en: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT>, 2, 63pp.
- Skalickova S., V. Milosavljevic, K. Cihalova, P. Horky, L. Richtera and V. Adam. 2016. Perspective of selenium nanoparticles as a nutrition supplement. *Nutrition.*

- Wang H., J. Zhang and H. Yu. 2007. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: comparison with selenomethionine in mice. *Free Radical Biology and Medicine*. 42(10): 1524-1533.
- Zhang J, H. Wang, X. Yan, L. Zhang. 2005. Comparison of short-term toxicity between Nano-Se and selenite in mice. *Life Sci*. 76:1099–109.
- Zhang J, H. Wang, Y. Bao, L. Zhang. 2004. Nano red elemental selenium has no size effect in the induction of seleno-enzymes in both cultured cells and mice. *Life Sci*. 75(2): 237–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2004.02.004>.
- Zhang J, X. Gao, L. Zhang, Y. Bao. 2001. Biological effect of a nano red elemental selenium. *Biofactors*. 15:27–38.
- Zhang J, X. Wang, T. Xu. 2008. Elemental selenium at nano size (Nano-Se) as a potential chemopreventive agent with reduced risk of selenium toxicity: comparison with semethylselenocysteine in mice. *Toxicol Sci*. 101(1):22–31.