



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

---

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

## **DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROCÁPSULAS DE SELENIOMETIONINA**

**LILIANA VALDIVIEZO MORALES**

**T E S I S**

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

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO**

**2012**

La presente tesis titulada: Diseño y caracterización de microcápsulas de seleniometionina realizada por la alumna: Lillana 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:

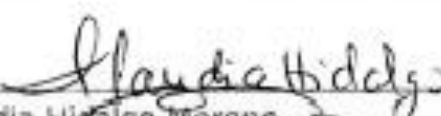
MAESTRA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

  
Dra. Ma. Esther Ortega Cerrilla


ASESOR

  
Dra. Claudia Hidalgo Moreno

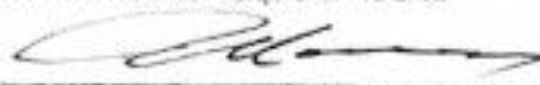
ASESOR

  
Dra. Soledad Paz Robert Canales

ASESOR

  
Dr. Humberto Vaquera Huerta

ASESOR

  
Dr. Jorge Ramsy Kawas Garza

# DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROCÁPSULAS DE SELENIOMETIONINA

Liliana Valdiviezo Morales, MC.

Colegio de Postgraduados, 2012

El objetivo del presente estudio fue diseñar y caracterizar microcápsulas de liberación controlada de seleniometionina de administración vía intramamaria, con dos diferentes de tipos de agentes encapsulantes (carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC) y alginato de sodio  $((C_6H_7NaO_6)_n)$ ). Las microcápsulas fueron elaboradas por el método de secado por atomización; se utilizó un secador mini Spray-dryer. La caracterización morfológica de las microcápsulas fue mediante microscopía electrónica de barrido. La distribución de las partículas por tamaño para ambos sistemas se determinó con un equipo MasterSize X (1.2b MALVERN) y etilenglicol como dispersante. Se evaluó la cantidad de seleniometionina total encapsulada, el porcentaje de rendimiento, el porcentaje de recuperación, el tamaño de la partícula y la cinética de liberación de seleniometionina desde las microcápsulas; se utilizó como testigo la liberación de la seleniometionina sin encapsular a través del vehículo de entrega (carbopol 2 %). Las variables de respuesta (SeMet total encapsulada, porcentaje de recuperación y porcentaje de rendimiento) fueron significativamente diferentes, con intervalos del 95% de confianza. Las cinéticas de liberación de ambos sistemas (SeMet/NaCMC y SeMet/ $(C_6H_7NaO_6)_n$ ) tuvieron un mayor ajuste al modelo matemático de Korsmeyer. La variación de  $n$  para ambos sistemas fue entre 0.5718 y 0.6064, lo que sugirió que la naturaleza del proceso de liberación de la seleniometionina fue por un mecanismo de difusión no fickiano o anómalo. Por lo tanto, el método de secado por atomización resulta una alternativa viable para elaborar microcápsulas de SeMet, además de que el agente encapsulante carboximetilcelulosa obtuvo una mayor eficiencia para el encapsulado de la seleniometionina y protegió la SeMet de la degradación térmica. Por otro lado, la carboximetilcelulosa de sodio mostró un mayor control de la entrega del activo, así como un mayor ajuste de datos a los modelos de Higuchi (1963) y Korsmeyer *et al.* (1983).

**Palabras clave:** Seleniometionina, microcápsulas, cinética de liberación, carboximetilcelulosa de sodio, alginato de sodio.

# DESIGN AND CHARACTERIZATION OF MICROCAPSULES OF SELENOMETHIONINE

Liliana Valdiviezo Morales, MC.

Colegio de Postgraduados, 2012

The aim of this study was to design and characterize controlled release microcapsules of selenomethionine (SeMet) of intramammary administration, with two different types of encapsulating agents (sodium carboxymethylcellulose (NaCMC), and sodium alginate). The microcapsules were prepared by applying the spray drying method, using a Mini Spray-dryer. Morphological characterization of the microcapsules was made by scanning electron microscopy. The distribution of particles by size was determined for both systems with a computer MasterSize X (1.2b MALVERN) and ethylene glycol as a dispersant. We evaluated the amount of the total encapsulated selenomethionine, the yield percentage, the recovery percentage, the particle size and the release kinetics of selenomethionine from the microcapsules. We used as control the release of unencapsulated selenomethionine through the delivery vehicle (carbopol 2%). The overall response variables of encapsulated SeMet, percentage of recovery and percentage of yield were significantly different with an interval of 95% confidence. The release kinetics of both systems (SeMet/NaCMC and SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>) had a better fit to the mathematical model by Korsmeyer. The variation of  $n$  for both the systems were between 0.5718 and 0.6064, suggesting that the nature of the release process of selenomethionine was through a diffusion mechanism not following the Fick equation neither anomalous.

Therefore, the spray drying method is a viable alternative to prepare SeMet microcapsules. In addition, the encapsulating agent of SeMet resulted more efficient and protected SeMet from thermal degradation. Moreover, NaCMC showed better control of delivery of active, as well as a further data adjustment to the models of Higuchi (1963) and Korsmeyer *et al.* (1983).

**Keywords:** Selenomethionine, microcapsules, release kinetics, sodium carboxymethylcellulose, sodium alginate.

## **Agradecimientos**

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

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

Al colegio de Postgraduados y al programa de Ganadería por darme la oportunidad de obtener el grado de Maestro en ciencias.

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

A la Dra. Claudia Hidalgo Moreno, por el apoyo que me ha brindado.

A la Dra. Soledad Paz Roberts Canales, por su asesoría en el laboratorio de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química y Ciencia y Tecnología Farmacéutica, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, en Santiago de Chile.

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

A la M.C. Greta Hanako Rosas Saíto, por su gran apoyo en el laboratorio de Microscopía en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

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

## **Dedicatoria**

A mis padres:

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

A mis amigos:

Miriam, Isabel, Eva, Paulina, Eleazar y Pamela por su cariño y apoyo. Y en especial a Amaury por haber compartido las alegrías y dificultades durante mi investigación, superando los obstáculos para alcanzar un objetivo en común.

# CONTENIDO

Pag.

	Introducción.....	1
1.	Justificación.....	5
2.	Objetivos generales.....	6
2.1	Objetivos particulares.....	6
3.	Hipótesis.....	7
4.	Revisión de literatura.....	8
4.1	Selenio y su relación en el organismo animal.....	8
4.2	El selenio en la dieta animal y su absorción en el rumen.....	8
4.3	Fuentes inorgánicas y orgánicas de selenio en la naturaleza.....	13
4.4	Importancia del selenio en la glándula mamaria.....	17
4.5	Encapsulación.....	19
4.6	Secado por aspersión o atomización.....	20
4.7	Materiales de encapsulación.....	21
4.8	Carboximetilcelulosa sódica (NaCMC).....	22
4.9	Alginato de sodio.....	23
4.10	Mecanismo de liberación.....	24
5.	Materiales y métodos.....	26
5.1	Materiales.....	26
5.2	Obtención de microcápsulas de seleniometionina.....	26
5.3	Caracterización de las microcápsulas de seleniometionina.....	27
5.3.1	Microscopía electrónica.....	27
5.3.2	Determinación de eficiencia de encapsulación, recuperación y rendimiento para encapsulación de seleniometionina.....	27
5.3.2.1	Determinación de seleniometionina superficial.....	27
5.3.2.2	Determinación de seleniometionina total encapsulada.....	28
5.3.2.3	Recuperación de SeMet.....	28
5.3.2.4	Rendimiento.....	28
5.3.3	Procedimiento cromatográfico.....	29
5.4	Curva de calibración de seleniometionina.....	29
5.5	Estudio de perfil de liberación de seleniometionina.....	30
5.5.1	Preparación del gel biodhesivo (carbopol C971) como vehículo de entrega.....	30
5.5.2	Adición de la solución madre y microcápsulas de seleniometionina al vehículo.....	31
5.5.3	Perfil de liberación desde el vehículo de entrega de la SeMet sin encapsular y SeMet encapsulada.....	31
6.	Análisis estadístico.....	33
7.	Resultados y discusión.....	34
7.1	Fotomicrografía.....	34
7.2	Caracterización de las micropartículas para los sistemas de seleniometionina con carboximetilcelulosa y alginato de sodio (SeMet/NaCMC y SeMet/(C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> ).....	38
7.2.1	Porcentaje de encapsulación de las micropartículas.....	38

7.3	Evaluación de la cesión de seleniometionina <i>in vitro</i> .....	41
7.3.1	Cinética de liberación de seleniometionina desde el gel bioadhesivo con SeMet sin encapsular.....	41
7.3.2	Cinética de liberación de seleniometionina desde gel bioadhesivo con micropartículas de SeMet/NaCMC y SeMet/(C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> .....	42
7.4	Ajustes de los modelos matemáticos analizados.....	44
8.	Conclusiones.....	46
9.	Literatura citada.....	47



Cuadro	<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	Pag.
1.	Materiales utilizados en la encapsulación.....	22
2.	Formulación para la obtención de microcápsulas de seleniomtionina.....	27
3.	Concentración de SeMet y área, para la construcción de la curva de calibración.....	29
4.	Condiciones experimentales utilizadas para los perfiles de liberación desde el gel bioadhesivo (carbopol 971) con la SeMet sin encapsular y SeMet encapsulada.....	31
5.	Contenido de seleniomtionina total encapsulada, rendimiento, recuperación y tamaño de partícula para las micropartículas de seleniomtionina con carboximetilcelulosa y alginato de sodio (SeMet/NaCMC y SeMet/(C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> ).....	38
6.	Parámetros cinéticos obtenidos desde las curvas de liberación para el gel bioadhesivo sin y con micropartículas (SeMet/NaCMC) y SeMet/(C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> .....	45

1.	Posible mecanismo de interacción entre la vitamina E y el selenio en la prevención del daño oxidativo.....	12
2.	Localización de los sistemas antioxidantes dentro de la célula, donde se destaca la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) y la vitamina E.....	12
3.	Estructura molecular de la metionina y seleniomtionina mostrando la ubicación de la sustitución del átomo de selenio en lugar del azufre.....	14
4.	Métodos de encapsulación.....	20
5.	Estructura de la celulosa (a) y NaCMC con grado de sustitución de 1.5 (b).....	23
6.	Estructura de las dos unidades monoméricas del ácido algínico: $\beta$ -D-Ácido manurónico y $\alpha$ -L-Ácido gulurónico.....	23
7.	Curva de calibración para la cuantificación de SeMet.....	30
8.	Esquema utilizado para los perfiles de liberación.....	32
9.	Micrografía mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) de SeMet/NaCMC con una razón 1:50 (activo: agente encapsulante), mediante el método de secado por atomización a una temperatura de entrada de 200 °C con un flujo de alimentación al 5%.....	35
10.	Micrografía (MEB) de microcápsulas de SeMet/(C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> con una razón 1:50 (activo: agente encapsulante), mediante el método de secado por atomización a una temperatura de entrada de 200°C y un flujo de alimentación al 5%.....	37
11.	Perfil de liberación de seleniomtionina sin encapsular desde gel bioadhesivo en agua bidestilada a 37°C .....	41
12.	Perfil de liberación de seleniomtionina desde gel bioadhesivo con micropartículas de SeMet/NaCMC en agua bidestilada como medio de disolución a 37°C .....	42
13.	Perfil de liberación de seleniomtionina desde gel bioadhesivo con micropartículas de SeMet/(C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> en agua bidestilada como medio de disolución a 37°C.....	43
14.	Perfil de liberación de SeMet desde Gel bioadhesivo sin (testigo) y con micropartículas en agua bidestilada como medio de disolución a 37°C. ....	44

## Introducción

En los sistemas de producción extensivos e intensivos la suplementación mineral es necesaria para una producción eficiente. Por ello, las raciones de los rumiantes deben, ser balanceada para aportar las cantidades necesarias de proteína, energía, vitaminas, macro y microminerales para lograr un determinado nivel productivo. Siempre se ha considerado que el aporte de proteína y energía representa la principal limitante en la producción animal (Pfander, 1971), dejando a un lado la suplementación mineral. Sin embargo, la deficiencia de minerales disminuye el aprovechamiento de estos nutrientes (McDowell y Hernández, 1975). Para lograr una buena nutrición no es solo importante considerar el aporte de energía y proteína, sino también la de minerales pues aunque son incorporados en cantidades muy pequeñas, son necesarios para mantener un buen estado fisiológico, metabólico y de salud del organismo en general (Georgievskii *et al.*, 1992).

Los macrominerales son aquellos compuestos que el animal necesita en grandes cantidades, mientras que los microminerales incluyen aquellos que se necesitan en menor proporción (Bach y Devant, 2004). Los macro y microminerales juegan un papel importante en el organismo animal, estos tienen la función de ser intermediarios metabólicos celulares de las reacciones biológicas del cuerpo, precursores bioquímicos, mantienen la integridad de los tejidos, así como en la actividad reproductiva y nerviosa. Además de mejorar la actividad de enzimas antioxidantes, así como ser activadores de los sistemas enzimáticos o componentes de los compuestos orgánicos (Church y Pond, 1996; Sahagún, 1998). El organismo del animal, los tejidos y fluidos corporales contienen cantidades variables de minerales, que además son constituyentes de los huesos, los dientes, el músculo, sangre y de las células nerviosas.

De las etapas fisiológicas a lo largo de la vida de una vaca lechera en producción, el parto y posparto son las más críticas (Greg *et al.*, 1998). La etapa fisiológica de transición de una vaca en lactación la mantiene siempre bajo stress constante, a consecuencia del alto requerimiento nutricional que demanda la producción de leche. En estas etapas la vaca se encuentra más susceptible a la presencia de desórdenes metabólicos,

los cuales frecuentemente incluyen: fiebre de leche, retención placentaria, desplazamiento de abomaso, y mastitis (Greg *et al.*, 1998), esta última representa un problema económico de gran importancia para la industria lechera mexicana.

La mastitis es considerada una de las enfermedades infecciosas más costosas en la industria lechera, debido a que causa una disminución en la producción de leche del 4 al 30 % y en su calidad. Además, se incrementan los costos del cuidado de salud del hato y se desechan prematuramente más vacas de alta producción, lo que ocasiona pérdidas económicas muy fuertes. Esta enfermedad puede representar el 70 % de los gastos totales para el ganadero lechero, resultando en una pérdida de billones de dólares cada año (Bradley y Green, 2001; Hoblet *et al.*, 1991; Philpot *et al.*, 1999).

La mastitis puede ser causada principalmente por factores ambientales o bien, por microorganismos patógenos, transmitidos por una mala técnica de manejo en la ordeña o porque las instalaciones no cumplan con las normas sanitarias necesarias, como; el material de cama, estancamiento de estiércol, lodo y agua. Existen organismos causantes de mastitis como: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus galactiae*, *Corynebacterium spp.*, y *Mycoplasma spp.* (Riffon *et al.*, 2001). En la actualidad se han reportado más de 100 microorganismos como causantes de infecciones intramamarias. Además, la constitución anatómica de la ubre, la expone constantemente a lesiones y agentes patológicos de diversos orígenes (Báez, 2002).

El primer estudio 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.* (1985a) 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.

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.

El selenio es un mineral traza esencial, que cumple un papel importante en la alimentación y salud del ganad lechero, de acuerdo con Hogan *et al.* (1993) mejora el sistema inmunológico mediante el aumento de la actividad de neutrófilos, con lo que se reduce la incidencia y gravedad de mastitis en las vacas). El National Research Council (NRC, 2001) establece el requerimiento para ganado lechero en 0.3 mg de selenio kg<sup>-1</sup>.

Las fuentes naturales de selenio pueden ser de naturaleza inorgánicas u orgánicas, sin embargo, a estas últimas se les ha considerado de mayor importancia, ya que por sus características químicas tienen mayor disponibilidad, siendo más fáciles de utilizar por la célula animal (Underwood y Suttle, 2003).

Con la finalidad de maximizar la eficiencia de absorción y utilización del selenio por el organismo del animal y dada la importancia de este microelemento, se han estudiado diversas fuentes y formas para su administración. La vía de administración juega un papel importante en la absorción y utilización del selenio por el organismo. Una de las técnicas de administración más antiguas es mediante la inyección intramuscular, seguida de la administración oral y la mezcla del selenio con el alimento, con el uso de bolos ruminales que liberan selenio gradualmente por periodos de más de 120 días (Revilla *et al.*, 2007), y también de manera indirecta, por la aplicación del selenio en pastizales, que previenen su deficiencia en animales en pastoreo (Hansen *et al.*, 1993).

Dada la generalidad de administrar selenio por vía oral, y considerando a las condiciones que presenta el rumen, en cuanto a pH y flora microbiana, 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 afectar o modificar su forma química, afectando la disponibilidad del selenio al organismo. En el presente trabajo se plantea suplementar selenio orgánico (seleniometionina, SeMet) asociado con un polímero en forma de micropartícula, por vía intramamaria, con el objetivo de controlar la liberación de la SeMet mediante su encapsulación y la formulación de un gel como vehículo de entrega para aumentar la eficiencia de utilización de la seleniometionina por las células de la glándula mamaria.

## **1. Justificación**

En este estudio se diseñaron y caracterizaron microcápsulas mucoadhesivas como fuente de selenio orgánico (SeMet) para aplicarlas a las células secretoras de la glándula mamaria para proteger la integridad del sistema de membranas y a su vez, reforzar el sistema inmune durante el periodo de secado y los primeros días post-parto. La forma de administración será vía intramamaria mediante un gel bioadhesivo como vehículo de entrega para la seleniometionina y con una liberación de forma controlada y prolongada. Esto permitirá una mayor disponibilidad de forma directa de selenio en las células mamarias de la vaca, 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.

## **2. Objetivos generales**

- Proponer una metodología para formular y caracterizar microcápsulas de seleniometionina que proporcionen de forma directa el selenio a la glándula mamaria

### **2.1 Objetivos particulares**

- Elaborar microcápsulas de seleniometionina con alginato de sodio o carboximetilcelulosa, utilizando la metodología de secado por atomización.
- Caracterizar las microcápsulas de seleniometionina, de acuerdo a su eficiencia de encapsulación, morfología y tamaño de partícula.
- Estudiar el perfil de liberación de seleniometionina desde las microcápsulas de seleniometionina *in vitro*.



### **3 Hipótesis**

- Se espera que las microcápsulas de SeMet obtenidas por secado por atomización muestren una eficiencia de la encapsulación mayor en carboximetilcelulosa sódica respecto a alginato de sodio. El perfil de liberación de seleniometionina será función del tipo de agente encapsulante y de las características fisicoquímicas del mismo.

## **4 Revisión de literatura**

### **4.1 Selenio y su relación en el organismo animal**

El selenio, es un elemento no-metal, existente en varias formas alotrópicas, es decir en la naturaleza se encuentra en diferentes formas químicas. Fue descubierto en 1817 por Berzelius y Gahn en los lodos de las cámaras de plomo de una fábrica de ácido sulfúrico de Gripsholm. Tiene un peso atómico de 78,96 y número atómico 34. Existe en varias formas: rojo amorfo o vítreo; rojo cristalino (monocíclico); gris metálico (hexagonal) y el selenio negro, que es la variedad metálica, en estado muy fino de subdivisión. En el orden de abundancia de los elementos, ocupa el sexagésimo noveno lugar, es un elemento bastante escaso ya que su contenido en la corteza terrestre es de 0.09 ppm. Se encuentra en cantidades muy pequeñas pero detectables en todos los suelos, tanto forestales como agrícolas. Se ubica en la tabla periódica entre el azufre y el telurio. Puede existir en los estados de oxidación  $2^-$ , 0,  $4^+$  y  $6^+$ . La presencia y la concentración del selenio esta determinada por diversos factores tales como el pH, condiciones de óxido-reducción, solubilidad de sus sales, interacciones biológicas y reacciones cinéticas (McNeal y Balistrieri, 1989).

Debido a las formas presentes de selenio en la naturaleza y las diferencias bioquímicas entre ellas, se pueden ocasionar modificaciones en la isomería del selenio al interactuar con la flora microbiana y causar oxidación o reducción, o bien formación de compuestos orgánicos. Según McNeal y Balistrieri (1989), los procesos químicos y biológicos pueden limitar su movilidad y biodisponibilidad para animales y plantas.

### **4.2 El selenio en la dieta animal y su absorción en el rumen**

El problema más común en una dieta es conocer la cantidad adecuada de minerales que se deben adicionar, por lo que es recomendable realizar un análisis bromatológico del alimento, para saber si se tiene deficiencias de nutrientes. En base a esto, se debe considerar: la necesidad de proporcionar un suplemento mineral, que depende de las necesidades del animal menos el aporte de los alimentos. En el caso del selenio, la necesidad mínima es de

0.1 ppm por kg de materia seca (MS), con una seguridad máxima de 5 ppm, un intervalo de seguridad de 50 ppm y un límite legal máximo de 5 mg de Se kg<sup>-1</sup> MS (NRC, 2001). La concentración tóxica y aguda para bovinos es de 3-40 ppm y 20 mg kg<sup>-1</sup> de peso vivo (Bach y Devant, 2004).

La deficiencia del selenio en rumiantes en crecimiento, origina la enfermedad del músculo blanco con daños en tejidos muscular (miopatía). En el curso de la enfermedad, se pueden depositar sales de calcio en las fibras musculares (Hansen *et al.*, 1993). Así mismo, el consumo insuficiente de selenio en animales adultos se ha relacionado con varias manifestaciones clínicas como alteraciones en la reproducción, reducción de la resistencia a enfermedades, mortalidad perinatal y manifestaciones subclínicas como retraso del crecimiento y disminución en la producción de lana (Underwood y Suttle, 1999).

El nivel máximo tolerable de selenio propuesto por el NRC (2001) es de 5 mg kg<sup>-1</sup> de MS. El envenenamiento se caracteriza por postura y movimientos anormales, diarrea, respiración forzada, dolor abdominal, postración y muerte. Los signos observados están relacionados con el grado de intoxicación y la cantidad de selenio consumido. El tiempo en presentarse la muerte está también relacionado con la cantidad que se ha consumido y puede variar de horas a días (James *et al.*, 1989).

El selenio es un elemento indispensable para el funcionamiento normal de los músculos, corazón, hígado, riñones, páncreas y otros órganos. El organismo lo necesita para la síntesis de la enzima glutatión peroxidasa (Rotruck *et al.*, 1973), encargada de degradar agentes oxidantes y conjuntamente con la vitamina E actúa como un antioxidante, para inhibir a los radicales libres peroxil y alkoxil que atacan las membranas de fosfolípidos, a su vez refuerza la función inmune.

El selenio y la vitamina E están estrechamente relacionados, ya que la deficiencia de uno, incrementa los requerimientos del otro, debido a sus roles complementarios (Weiss *et al.*, 1997). También, el selenio es necesario para mantener la morfología pancreática normal, entre otras cosas para producir lipasa pancreática, enzima responsable de la absorción

normal de los lípidos y tocoferoles del aparato digestivo (Church y Pond, 1992; 1996; Ensminger y Olentine, 1983).

Existen grandes diferencias en su absorción, transporte, excreción, tasa de renovación en los tejidos y control homeostático. Estos procesos se rigen dependiendo de la forma en que se encuentre este mineral y el pH de los fluidos del organismo, así como de la presencia de otros minerales y de las secreciones hormonales. En general, la absorción de los microminerales es muy baja, con excepción del hierro, yodo y selenio.

La baja absorción del selenio en rumiantes, en comparación con no rumiantes se debe a la reducción del selenio en la dieta y a formas insolubles de selenio como el selenio elemental o selénidos en el rumen. La mayoría de los estudios indican que la disponibilidad del selenito y el selenato sódico son similares (Underwood y Suttle, 2003). Las formas orgánicas como las levaduras con selenio, son más disponibles que las formas inorgánicas. Se sabe que el porcentaje de absorción de las diferentes formas de selenio varía entre 30 y 60 %, aunque en trigo y levaduras el porcentajes de disponibilidad es altos, este último con un 100 % de absorción (Bach y Devant, 2004).

Por otro lado, puede ocurrir la asociación de minerales con fracciones fibrosas, que alteran la disponibilidad de los mismos, incluso cuando están expuestas a los diferentes ambientes de cada compartimiento que forma el tubo digestivo del rumiante. Asimismo, la interacción entre los propios microminerales puede disminuir notablemente su absorción (Underwood y Suttle, 2003), y afectar cualquier fase de la asimilación y metabolismo. Las interacciones actúan formando complejos iónicos no absorbibles en el intestino, creando una competencia entre iones similares que compiten por las mismas vías metabólicas y la inducción de proteínas unidas a metales inespecíficos.

La suplementación de selenio por vía oral es absorbida mediante una serie de procesos complejos durante el metabolismo animal, siendo principalmente absorbido eficazmente en el duodeno. La absorción del selenio *per se* es independiente del sodio y parece ocurrir por difusión simple puesto que en la mayoría de los principales ingredientes se encuentra presente en forma libre o unido a péptidos como selenoaminoácidos tales como

seleniometionina y seleniocisteína. Para el caso de rumiantes, su absorción probablemente se efectúa como seleniometionina y seleniocisteína, como consecuencia de la incorporación del selenio inorgánico a los aminoácidos, incorporados con la ayuda de la flora microbiana del rumen. Sin embargo, factores exógenos y endógenos afectan la disponibilidad oral, lo cual hace que el metabolismo de este elemento sea un evento muy complejo y dinámico. Estos factores incluyen la cantidad y forma química del mineral, la solubilidad en el contenido gastrointestinal, la condición física del animal y la interacción con otros elementos (Church y Pond, 1996; Wolfram, 1999).

Después de la absorción, el selenio es transportado por el plasma en asociación con un aminoácido plasmático, y así penetrar a todos los tejidos donde se almacena principalmente como seleniometionina y seleniocisteína. El selenio, se incorpora a las células rojas sanguíneas, leucocitos, mioglobina, nucleoproteínas, miosina y varias enzimas, que incluyen el citocromo c y la aldolasa (Church y Pond, 1996). Por último, la excreción del exceso de selenio se efectúa a través de los pulmones, heces y orina (Church y Pond, 1996).

El selenio actúa a través de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) (Rotruck *et al.*, 1973), reduce peróxidos formados. La GSH-Px protege las membranas celulares destruyendo los peróxidos de hidrógeno y peróxidos lipídicos que pueden causar la desnaturalización irreversible de proteínas celulares esenciales, dando lugar a degeneración y necrosis (figura 1). La actividad de la enzima GSH-Px se considera un buen indicador del estatus de selenio en rumiantes (Stowe y Herdt, 1992).

La enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) junto con la vitamina E y algunos otros agentes antioxidantes reducen los efectos destructivos sobre la célula viva de reacciones peroxidativas (figura 2). La vitamina E previene la formación de peróxidos grasos por secuestro de radicales libres antes de que ellos inicien la peroxidación lipídica (Maas, 1990).

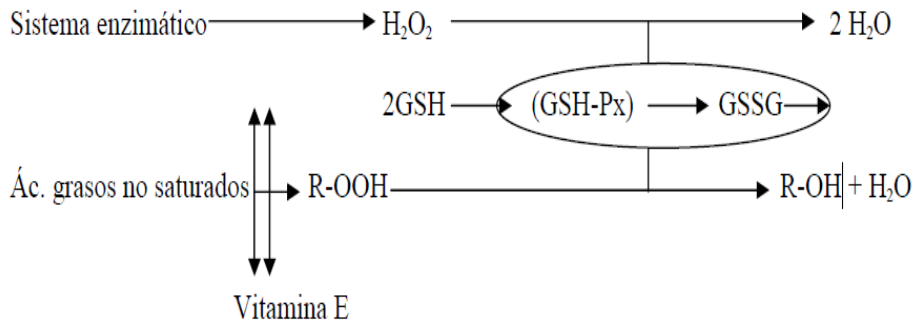
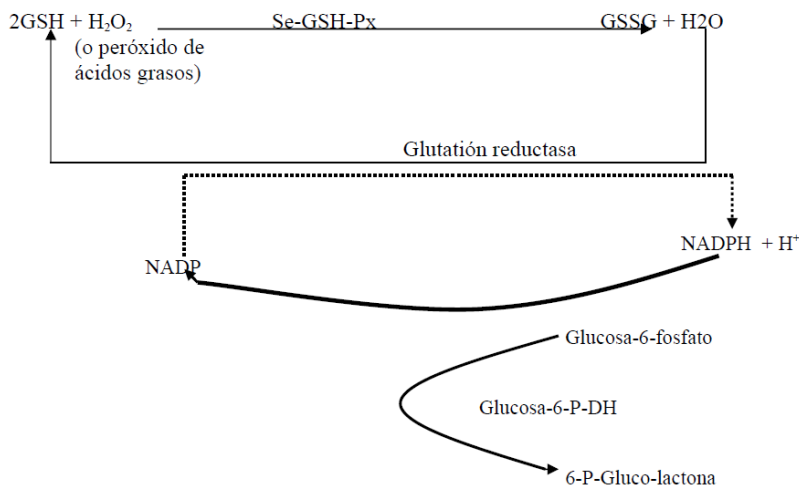


Figura 1. Posible mecanismo de interacción entre la vitamina E y el selenio en la prevención del daño oxidativo.



(Fuente: Maas, 1990).

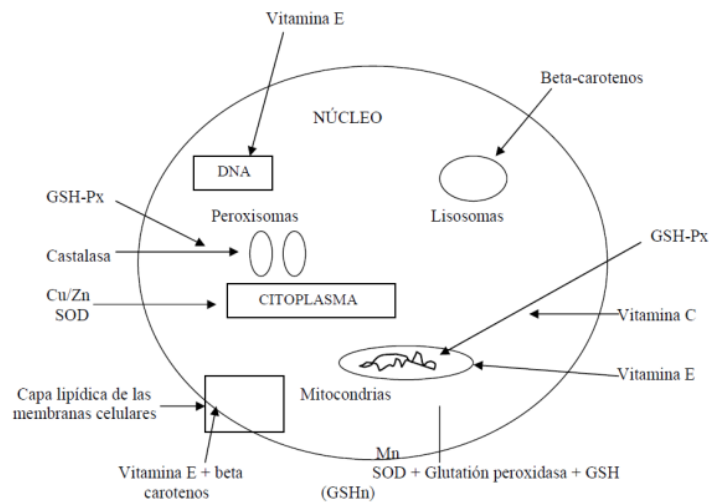


Figura 2. Localización de los sistemas antioxidantes dentro de la célula, donde se destaca la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) y la vitamina E. (Bendich, 1978).

### 4.3 Fuentes inorgánicas y orgánicas de selenio en la naturaleza

La suplementación de selenio en animales, se ha llevado a cabo generalmente por vía oral, utilizando comúnmente el selenio en su forma inorgánica. Actualmente existen formas químicas inorgánicas de selenio que se incluyen en diversas pre-mezclas minerales. Unas de las más comunes es el selenito de sodio,  $^{75}\text{Se}$ ,  $^{77\text{m}}\text{Se}$ ,  $^{81}\text{Se}$ , selenuro ( $\text{Se}^{2-}$ ), selenio elemental ( $\text{Se}^0$ ) y selenato ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ).

El selenato de bario es una fuente adecuada de aporte de selenio. Además, este producto tiene la ventaja de mantener los niveles de selenio durante varios meses debido a su lenta liberación desde el sitio de aplicación (Knowles *et al.*, 1999). La suplementación de las vacas con selenato de bario aumentó significativamente la concentración de GSH-Px a partir del día 30 post-suplementación, alcanzando niveles superiores a 200 UI g Hb<sup>-1</sup> durante el período de partos, apropiados para vacas en lactancia (Ceballos *et al.*, 1998).

Existen diferentes fuentes orgánicas de selenio presentes en la naturaleza, llamados suplementos orgánicos de microelementos donde, el selenio se encuentra quelado con aminoácidos ó péptidos, tales como seleniometionina y selenocisteina, es decir, el metal es quelado por los grupos amino y carboxilo del aminoácido protegiéndolos así de la degradación en el rumen, debido a que estos enlaces son muy fuertes, de tal forma que el ion metálico es liberado solo cuando entra en contacto con algún sitio de utilización en el organismo del animal (Diego, 1994).

El selenio orgánico se puede administrar con cultivos de levadura, comúnmente los productos comerciales contienen seleniocisteina, se reporta mejor disponibilidad del mineral en esta forma. La seleniometionina es la forma predominante de selenio encontrada en los ingredientes de los alimentos.

La seleniometionina (SeMet) conocida comúnmente como selenioproteína, 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 agotar las especies reactivas. 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 (Ortman y Pehrson, 1999). Se sabe que más del 90 % de la seleniomtionina, como forma principal de selenio en la dieta, se absorbe por el mismo mecanismo que la metionina (Navarro y López, 2000).

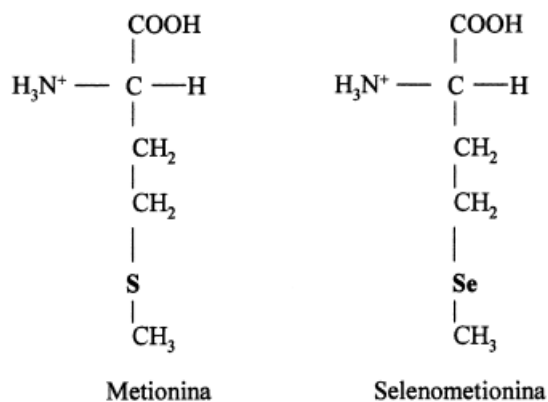


Figura 3. Estructura molecular de la metionina y seleniomtionina mostrando la ubicación de la sustitución del átomo de selenio en lugar del azufre.

A pesar de que la seleniomtionina 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 seleniomtionina puede almacenarse al incorporarse aleatoriamente en las proteínas, en lugar de metionina (Navarro *et al.*, 2000; Katsuhiko *et al.*, 2000).

Xuxia *et al.* (2009), estudiaron el efecto de la incorporación de nanopartículas de selenio elemental (T-1) y seleniomtionina (T-2) en la carpa (*Carassius auratus gibelio*). En ambos sistemas se observó la incorporación significativa ( $P < 0.05$ ) de selenio en el músculo ( $16.42 \pm 1.07 \text{ mg g}^{-1}$  y  $13.52 \pm 1.31 \text{ mg g}^{-1}$ ) con respecto al testigo ( $6.10 \pm 0.78 \text{ mg g}^{-1}$ ). Se encontró en los dos sistemas T-1 y T-2 un aumento significativo del nivel de glutation peroxidasa (GSH-Px) en plasma y en hígado de carpas, y en la ganancia de peso respecto al testigo. En contraste, no se observó un efecto de los tratamientos en la tasa de supervivencia y conversión alimenticia.



Por otro lado, Shi Li-guang *et al.* (2009), realizaron un estudio en rebaños de borregos machos deficientes en selenio y un rebaño testigo, que fueron suplementados con nano-selenio, en los cuales encontraron resultados positivos en las variables reproductivas, en la concentración de selenio en los testículos, así como una mayor actividad de la GSH-Px en los testículos y semen, así como una disminución en el porcentaje de espermatozoides anormales.

Petre *et al.* (2008), realizaron un experimento en la región de Vysocina en la Republica Checa con vacas de raza Charolais a las que suplementaron con selenio orgánico (levadura enriquecida con Se). Encontrando que la forma orgánica tiene una mayor eficiencia comparada con su forma inorgánica (selenito de sodio), aumentando los niveles de selenio (orgánico) en sangre, calostro y leche y con un incremento en la actividad de la GSH-Px.

El selenio en la naturaleza, se presenta de forma orgánica e inorgánica. La forma química de selenio orgánico es predominante en las plantas. En alimentos como el grano de maíz (Olson y Embry, 1973), pasta de trigo (Beilstein *et al.*, 1999) y levadura enriquecida el selenio se encuentra como seleniometionina y seleniocisteina.

La concentración de selenio en plantas forrajeras y granos, depende de la concentración de selenio en el suelo (Stevens *et al.*, 1985). Este hecho explica las diferencias en la concentración de selenio en sangre y en los tejidos en animales en diferentes zonas geográficas. Por otra parte, las plantas con una mayor masa radicular o con raíces profundas, tienden a tener las mayores concentraciones de selenio (Hartfiel y Schulte, 1988). El maíz, trigo y soya cultivados en suelos con altas concentraciones, en ocasiones llegan a alcanzar un contenido de SeMet de un 80 % del selenio total en el tejido vegetal (Guo y Wu, 1998).

Una de las fuentes de selenio comúnmente usadas en la alimentación de rumiantes es el selenito sódico ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), pero su uso se ve limitado por el riesgo de toxicidad cuando no se balancea adecuadamente o no se mezcla perfectamente en las sales o en el alimento. El selenio es un elemento muy tóxico para los animales, ya que tiene un margen muy reducido

de tolerancia entre su requerimiento y toxicidad, lo que hace que el margen de seguridad al suplementarlo sea reducido, por lo cual es importante contar con productos que proporcionen selenio con un alto grado de seguridad para el animal. Es por ello que se han realizado diversos trabajos de investigación, variando la vía de administración y las distintas formas de selenio presentes en los alimentos.

En un trabajo realizado con borregas lactantes, Wolfram (1999) menciona que la disponibilidad del selenio inorgánico (selenito) es del 91 al 93 % y del 95 al 97 % en su forma orgánica (seleniometionina). En ovejas, el 66 al 69 % de los selenitos o selenuros fueron excretados en las heces, mientras que la excreción fue menor (54 %) cuando se suministró selenio en su forma orgánica.

Kincaid *et al.* (1999) suplementaron selenio orgánico (Sel-Plex50<sup>MR</sup>) a vacas gestantes encontrando que la concentración de selenio en la sangre en terneros recién nacidos aumentó significativamente en comparación con las vacas que no se suplementaron. Knowles *et al.* (1999), al suplementar selenio orgánico en vacas productoras de leche encontraron un incremento dos o tres veces mayor en la concentración del mineral en sangre, leche e hígado, al compararlo con una fuente inorgánica. Pehrson *et al.* (1999) al comparar el efecto de la suplementación de selenio en forma inorgánica como selenito y en forma orgánica mediante un cultivo de levadura, observaron que los niveles de selenio en la sangre de becerros fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) y que diez de cada once animales tuvieron más de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de selenio en la sangre en el grupo que recibió la suplementación de selenio orgánico, mientras que en el grupo con la fuente inorgánica, siete de nueve becerros tuvieron valores mayores de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  y dos de nueve menos de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de sangre. Esto sugiere, que las formas orgánicas de selenio son biológicamente más disponibles, además de que este tipo de selenoproteínas puede almacenarse al incorporarse a las proteínas aleatoriamente, al tomar el lugar de algunos aminoácidos (Navarro *et al.*, 2000; Katsuhiko *et al.*, 2000).

Por su parte, Ortman y Pehrson (1999) y Suoranta *et al.* (1993) reportaron que al suplementar selenio inorgánico a las madres para disminuir las necesidades de selenio en sus

crías, el resultado no fue satisfactorio debido a la pobre disponibilidad de esos compuestos para aumentar el contenido de selenio en leche. En el mismo estudio (Ortman y Pehrson, 1999) reportan que al proporcionar diariamente selenio orgánico a vacas, se tuvieron concentraciones más altas de este mineral en la leche que al suplementar selenito de sodio, cubriendo de manera más adecuada las necesidades del becerro.

#### **4.4 Importancia del selenio en la glándula mamaria**

La glándula mamaria es una modificación de la glándula sudorípara, que tiene la capacidad de secretar leche, esta es una glándula accesoria del sistema reproductivo. Está constituida por un sistema de soporte, uno secretor compuesto por células epiteliales, un sistema de conductos para el transporte de la leche, además de sangre, con una extensión del sistema linfático y del sistema nervioso que ayudan al balance de los fluidos circulando hacia adentro y hacia afuera de la ubre, lo que ayuda a prevenir infecciones. Anatómicamente, la ubre bovina está constituida por cuatro glándulas mamarias separadas con un peso de 11 a 28 kg las mitades tanto izquierda como derecha son totalmente independientes.

El pezón es la primera línea de defensa contra la penetración de bacterias dentro de la ubre. Normalmente, el esfínter cierra el canal del pezón fuertemente cuando la vaca no es ordeñada, por lo que el ingreso de bacterias ocurre generalmente durante el ordeño. Los organismos presentes en la leche o en la punta del pezón son impulsados dentro del canal del pezón y de la cisterna cuando existe la entrada indeseable de aire en la unidad de ordeño, es decir, cuando existe el desprendimiento o pérdida de la unidad o bien la remoción de la pezonera sin haber antes cerrado el vacío. Después del ordeño, el canal del pezón permanece dilatado por una o dos horas e inclusive, el canal del pezón dañado puede permanecer parcialmente o permanentemente abierto. Los microorganismos patógenos en el ambiente (materia fecal, cama, etc.), o aquellos que se encuentran en lesiones de la piel de la punta del pezón, pueden invadir fácilmente y abrir total o parcialmente el canal.

El mecanismo patógeno causante de mastitis consiste en que después de la entrada del microorganismo infeccioso, se presenta una invasión en el tejido mamario que tiene

como respuesta la inflamación, lo que aumenta la presión circulatoria y disminuye el aporte de nutrientes y de oxígeno, impidiendo el acceso de sangre portadora de oxígeno y nutrientes venoso que acumula toxinas y productos tóxicos de la muerte celular como bacterias, además de una exudación de plasma, que al salir de los vasos venosos, presenta edemas seguido de inflamación, cerrando el círculo vicioso, además de que puede presentarse necrosis o abscesos.

La consecuencia más importante de la reducción de la actividad inmune en animales con bajos niveles de selenio, la constituye el aumento en la incidencia de patologías mamarias. No obstante, si tenemos en cuenta que durante el período de lactación, sobre todo en la fase inicial de la misma, las células de la glándula mamaria están sometidas a una intensa actividad metabólica, con una demanda mayor de selenio. Aunque, no se conoce con exactitud el papel de este oligoelemento (selenio) en la ubre, Maas (1990) indica que la menor actividad de GSH-Px representa posiblemente el factor etiológico más importante en este tipo de procesos, debido a la influencia de esta enzima sobre la actividad de los leucocitos polimorfonucleares, considerados de primera importancia en la fagocitosis y muerte intracelular de patógenos mamarios (Ndiweni *et al.*, 1991). La suplementación con selenio y vitamina E parece a su vez optimizar la resistencia que presenta el animal, aumentando la función de los macrófagos (Ndiweni y Finch, 1995).

Diversos estudios 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 en 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 señala 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.

#### **4.5 Encapsulación**

La microencapsulación es una técnica mediante la cual compuestos activos sólidos, líquidos o gaseosos (antioxidantes, vitaminas, sabores, bactericidas entre otros) son introducidos en una matriz o sistema pared de naturaleza polimérica con el fin de proteger los activos 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).

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 la figura 4.

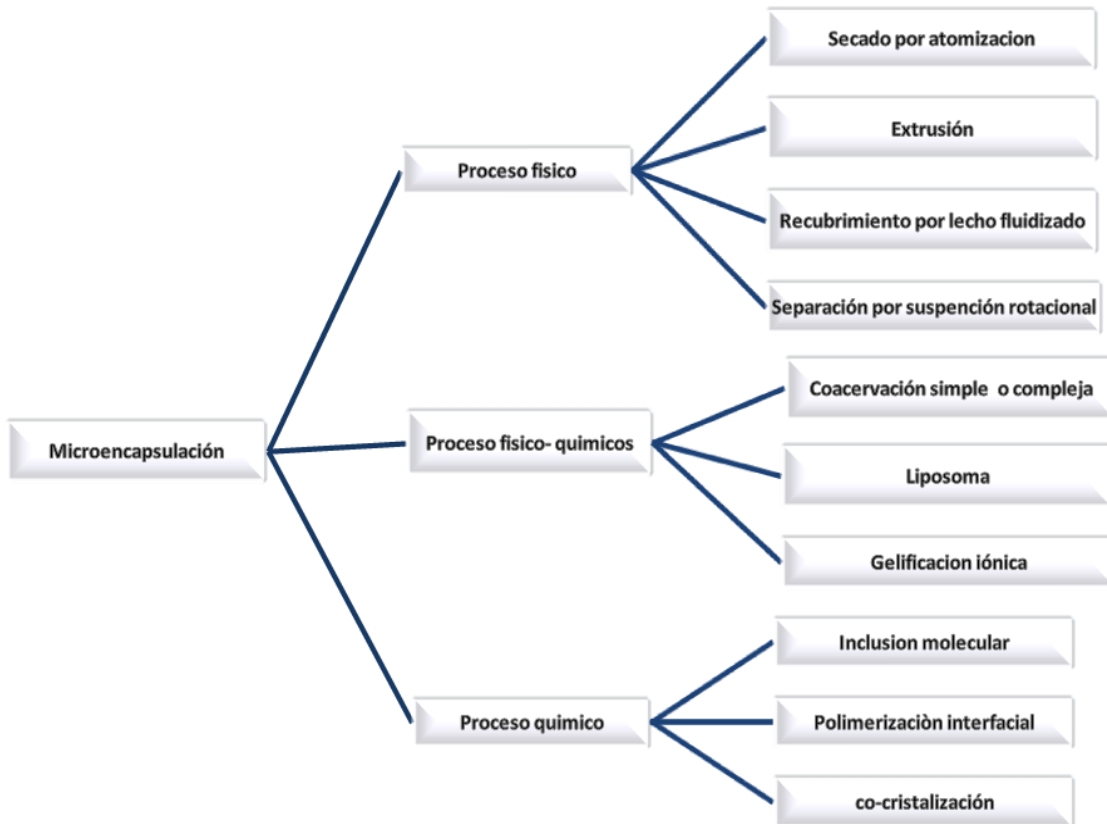


Figura 4. Métodos de encapsulación

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 & Vinetsky, 1996; Brazel, 1999).

#### 4.6 Secado por aspersión o por atomización

El secado por atomización o también llamado spray-drying es un método ampliamente utilizado por la industria alimentaria por ser un proceso simple, flexible y de bajo costo. Por definición, corresponde a la transformación de un fluido en un polvo, atomizándolo en forma de gotas minúsculas en un medio de secado en caliente. El tamaño de las partículas obtenidas por este método en general se encuentra entre 10 y 100  $\mu\text{m}$ , dependiendo de las condiciones del proceso (Pedroza-Islas, 2002). Además es método de encapsulación, permite obtener micropartículas en polvo, que facilitan el transporte,

manipulación y almacenamiento del producto (Murugesan y Orsat, 2011). Por último, otra ventaja de este proceso es su utilidad para materiales sensibles al calor, ya que el tiempo de exposición a temperaturas es muy corto (5-30 s) (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Sin embargo, este método se considera una técnica de inmovilización más que una tecnología de encapsulación verdadera, ya que parte del compuesto activo puede quedar expuesto superficialmente sobre la micropartícula (Vos *et al.*, 2010).

El proceso de secado por aspersión consiste básicamente de cuatro etapas (Yáñez *et al.*, 2002): (1) preparación del fluido de alimentación (mezcla del material a encapsular y del encapsulante), (2) homogeneización del fluido, (3) atomización por medio de una boquilla o disco, (4) deshidratación de las partículas atomizadas (las gotas toman contacto con el aire a alta temperatura, el agua o solvente se evapora obteniéndose las micropartículas) (Shahidi y Han, 1993). Finalmente las micropartículas son recolectadas.

#### **4.7 Materiales de encapsulación**

Los agentes encapsulantes pueden seleccionarse a partir de una gama de polímeros naturales y sintéticos, dependiendo del material a encapsular y de las características deseadas en el producto final. Los agentes encapsulantes más utilizados para el método de secado por aspersión se resumen en el siguiente cuadro 1.

Para procesos de secado por atomización, el agente encapsulante debe presentar un alto grado de solubilidad, una baja viscosidad en solución (35-45% en contenido de sólidos), buenas propiedades emulsificantes y de secado, un carácter no higroscópico, sabor suave, no ser reactivo y bajo costo (Murúa *et al.*, 2009). Para esta investigación se utilizaron dos tipos de agentes encapsulantes: carboximetilcelulosa y alginato de sodio.

Cuadro 1. Materiales utilizados en la encapsulación.

<b>Tipo de encapsulante</b>	<b>Agente encapsulante</b>
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	1, caseína y albumina
Materiales inorgánicos	o de calcio, silicatos

#### 4.8 Carboximetilcelulosa sódica (NaCMC)

Es un derivado de la celulosa, la cual químicamente corresponde a la sal sódica de la carboximetilcelulosa (figura 5). 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, obteniéndose como subproductos 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, ya que es conocido por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja toxicidad. Debido a las propiedades funcionales, fisico-químicas, de biocompatibilidad, biodegradabilidad y a su baja toxicidad, este biopolímero, ha encontrado diversas aplicaciones en la industria médica, farmacéutica y en agricultura, entre otros. 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 super refinado (99.5% mínimo), siendo 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.

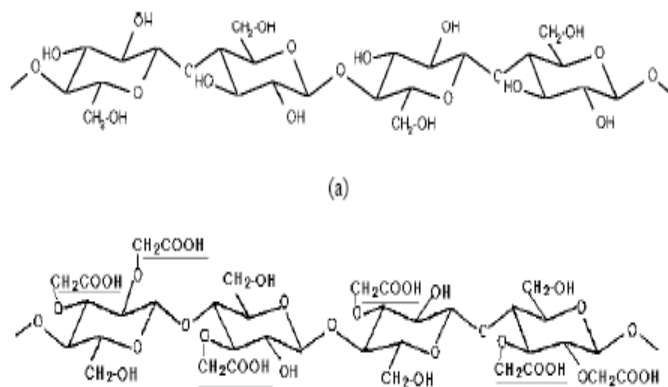


Figura 5. Estructura de la celulosa (a) y NaCMC con grado de sustitución de 1.5 (b)

#### 4.9 Alginato de sodio

El alginato de sodio es un biopolímero distribuido ampliamente en las paredes celulares de algas marinas pardas. El ácido algínico se acumula en las células de las algas en forma de ‘‘cuerpos gelatinosos’’ después de combinarse con las sales de agua del mar. Se ha utilizado, en forma de hidrocoloides para diversas aplicaciones, entre ellas los productos farmacéuticos. El ácido algínico está compuesto de dos especies el ácido manurónico (M) y el ácido gularónico (G) (figura 6), los cuales forman tres tipos de segmentos de bloque de homopolímero (Klokk y Melvik, 2002).

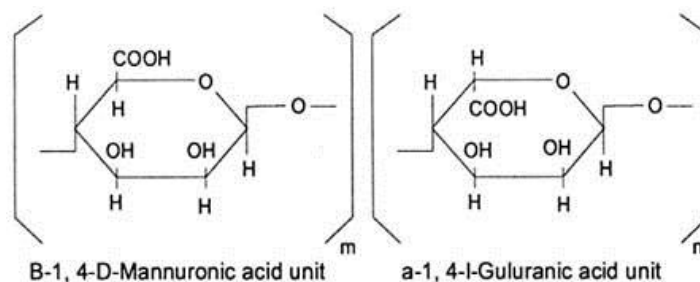


Figura 6. Estructura de las dos unidades monoméricas del ácido algínico:  $\beta$ -D-Ácido manurónico y  $\alpha$ -L-Ácido gularónico

Las propiedades y funcionalidad del alginato, en especial la capacidad gelificante y la fuerza de gel. El 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 en diversas categorías tales como: agente espesante, agente gelificante, estabilizante de dispersiones, coagente de textura o bien, formador de films o películas.

El alginato de sodio, es uno de los polisacáridos más usados debido a su biocompatibilidad, la cual son una fuente natural abundante en las algas marinas y la facilidad extraordinaria que tiene para realizar inmobilizaciones (Mahmoud *et al.*, 2011).

#### **4.10 Mecanismos de liberación**

La cesión del agente activo desde una micropartícula 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. La cesión controlada ocurre cuando los activos son liberados desde las micropartículas en un sitio y/o tiempo determinado a velocidades específicas (Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 2005).

Existe una gran diversidad de sistemas que son utilizados, dependiendo de la forma de preparación y del agente encapsulante utilizado, logrando así una liberación controlada. Estos sistemas son:

1. Sistemas de liberación controlados por disolución.
2. Sistemas de liberación controlados por difusión.
3. Sistemas de liberación controlados por difusión y disolución.
4. Sistemas de liberación controlados por penetración de agua.
5. Sistemas de liberación controlados químicamente.
6. Hidrogeles

## 7. Sistemas de liberación controlados por resinas de intercambio iónico.

En la práctica, no es común encontrar un único sistema de liberación, sino más bien, una combinación de estos mecanismos (Pothakamury y Barbosa-Cánovas, 2005).

Los modelos matemáticos más utilizados en el estudio del mecanismo mediante el cual ocurre el proceso de liberación se encuentran los propuestos por Higuchi *et al.* (1963) y Korsmeyer *et al.* (1983). Korsmeyer *et al.* (1983) propusieron un modelo matemático que es generalmente lineal para valores de  $M_t/M_0 < 0,6$ . Este modelo explica los mecanismos de liberación de fármacos donde se presenta erosión y/o disolución de la matriz, y no es más que una forma generalizada de la ecuación de Higuchi que se expresa como:

$$\frac{M_t}{M_0} = K \cdot t^n \dots \dots \dots (a)$$

Por otro lado, Higuchi *et al.* (1963) propuso un modelo matemático para describir el proceso empírico de liberación de fármacos, el cual cumple con la Ley de Fick y representado de la siguiente forma:

$$\frac{M_t}{M_0} = K \cdot t^{1/2} \dots \dots \dots (b)$$

Donde:

$M_t/M_0$  = es la fracción del fármaco liberado en un tiempo  $t$

$t$  = es el tiempo

$K$  = es la constante de velocidad de liberación.

El valor del exponente  $n$  nos indica sobre la cinética de liberación del fármaco, si  $n$  es igual a 0.5, la liberación del fármaco tiene lugar a través de un fenómeno de difusión de tipo Fickian (modelo matemático de Higuchi), si  $n$  toma valores entre 0.5 y 1 indica que la liberación del fármaco es debida a un mecanismo de difusión no Fickian o anómalo y cuando  $n$  es igual a 1, el mecanismo de liberación del fármaco depende del proceso de relajación de las cadenas poliméricas (Karime *et al.*, 2004).

## 5 Materiales y métodos

La elaboración y caracterización de las microcápsulas de L-seleniometionina se llevó a cabo en las instalaciones de los laboratorios de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química y Ciencia y Tecnología Farmacéutica, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, en Santiago de Chile.

El análisis de microscopía electrónica de las microcápsulas, se realizó en el laboratorio de Microscopía Electrónica, de las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

### 5.1 Materiales

Se utilizó L-seleniometionina (SeMet Sigma, grado de pureza 98 %, EUA, fórmula:  $C_5H_{11}NO_2Se$ ) como fuente de selenio orgánico; 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); Carbopol 971 NF (Merck, EUA, fórmula:  $C_3H_4O_2$ ), metilparabeno (conservador); trietanolamina (estabilizador de pH, para la elaboración del gel). Agentes encapsulantes: alginato de sodio [Merck, EUA, fórmula:  $(C_6H_7NaO_6)_n$ ] y carboximetilcelulosa de sodio (Merck, EUA, NaCMC)

### 5.2 Obtención de microcápsulas de seleniometionina

El agente encapsulante carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC) ó alginato de sodio  $[(C_6H_7NaO_6)_n]$  se mezcló con agua y con SeMet, en una razón SeMet:polímero de 1:50, de acuerdo a la formulación que se muestra en el cuadro 2. La solución se mantuvo con agitación constante durante media hora utilizando un agitador magnético.

La suspensión resultante se alimentó al secador por atomización. Se utilizó alimentación y flujo de aire de secado en paralelo. Las condiciones de secado fueron; temperatura del aire de entrada de 200° C, velocidad de alimentación de 5 mL min<sup>-1</sup>, flujo de aire de 600 Lh<sup>-1</sup> y presión de atomización de 20 psi. Las microcápsulas resultantes fueron almacenadas en envases de polipropileno a -20°C hasta el momento de su utilización.

Cuadro 2. Formulación para la obtención de microcápsulas de seleniometionina.

Sistema	SeMet/NaCMC	SeMet/(C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>
Agente encapsulante (g)	2	2
SeMet (mg)	40	40
Agua (g)	97.96	97.96

### 5.3 Caracterización de las microcápsulas de seleniometionina

#### 5.3.1 Microscopía electrónica

El análisis de la morfología de las microcápsulas, se realizó mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). Para este análisis se tomó con un pincel las microcápsulas en polvo y se colocó en el portamuestras de latón, se usó una cinta conductiva doble adhesiva de carbón, posteriormente se recubrió con oro durante 4 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).

#### 5. 3. 2 Determinación de Eficiencia de encapsulación, recuperación y rendimiento para la encapsulación de seleniometionina.

**5.3.2.1 Determinación de seleniometionina superficial.** Para determinar la SeMet superficial, se pesó 0.05 g de microcápsulas para los sistemas SeMet/NaCMC y SeMe/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub> en una balanza analítica, se aforó a 10 mL con 2-propanol y se agitó en un vortex por 30 seg. Luego, se filtró con un filtro Millipore (0.22 µm). La cuantificación

se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Los resultados se calcularon mediante una curva de calibración de SeMet (0.0218-0.1308 mg mL<sup>-1</sup>, r<sup>2</sup> = 0.9954) y el porcentaje de SeMet superficial se calculó utilizando la ecuación 1.

$$\% \text{ de SeMet superficial} = \frac{(x - 453189)/20000000) * 10 \text{ mL}}{\text{g de polvo de las microcápsulas}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde x = es el área bajo la curva

**5.3.2.2 Determinación de seleniometionina total encapsulada.** Para la cuantificación total encapsulada de SeMet se pesaron 0.05 g de microcápsulas de seleniometionina de los sistemas SeMet/NaCMC y SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>, posteriormente se aforó a 10 mL con agua destilada y se agitó en un vortex por 30 seg. Finalmente se cuantificó la seleniometionina mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Los resultados se calcularon mediante una curva de calibración de SeMet (0.0218-0.1308 mg mL<sup>-1</sup>, r<sup>2</sup> = 0.9954).

$$\text{SeMet total encapsulada} = \frac{(x-453189)/20000000) * 10 \text{ mL}}{\text{g de polvo de las microcápsulas}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde “x” es el área bajo la curva

**5.3.2.3 Recuperación de SeMet.** Representa la cantidad que se obtiene después del proceso de secado. La SeMet recuperada se determinó al calcular la razón entre SeMet total encapsulada y SeMet total teórico (cantidad pesada para ajustan 1:50 SeMet: Polímero que fue 18.8527 mg), de acuerdo a la siguiente ecuación 3.

$$\text{Porcentaje de recuperación de SeMet} = \left( \frac{\text{mg de SeMet total encapsulada}}{\text{mg de SeMet total teorico}} \right) * 100 \quad (\text{Ec. 3})$$

**5.3.2.4 Rendimiento.** El rendimiento del polvo de microcápsulas en ambos sistemas (SeMet/NaCMC, SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>, 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 4.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left( \frac{\text{g de polvo de Mcps después del secado}}{\text{sólidos totales de la dispersion}} \right) * 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

Sólidos totales: 40 mg de SeMet + 2 g del recubrimiento (NaCMC ó  $-(C_6H_7NaO_6)_n$ )

### 5.3.3 Procedimiento cromatográfico

El análisis de seleniometionina se realizó por cromatografía líquida de alta eficiencia, basándose en la metodología de Chiaki *et al.* (2009) para los sistemas SeMet/NaCMC y SeMet/ $(C_6H_7NaO_6)_n$ . El equipo consistió de una bomba L-6200 (Merck-Hitachi); detector de arreglo de diodos 996 (Waters) y una columna Symmetry® C18 (5µm x 4.6 mm d.i. x 250 mm, Waters). Se utilizó una fase móvil isocrática de agua-metanol (1:1 v/v) al 0.001% de ácido acético, con un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La detección fue a una longitud de onda de 210 nm.

### 5.4 Curva de calibración de seleniometionina

Se pesó en una balanza analítica 109 mg de seleniometionina 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 0.0218 y 0.1308 mg mL<sup>-1</sup>, las cuales se inyectaron en el HPLC, obteniéndose un área para cada solución (cuadro 3, figura 7).

Cuadro 3. Concentración de SeMet y área, para la construcción de la curva de calibración.

Concentración (mg mL <sup>-1</sup> )	Área
0.0218	751393
0.0327	1132395
0.0436	1156921
0.0654	1527673
0.0872	1890063
0.1308	2488240

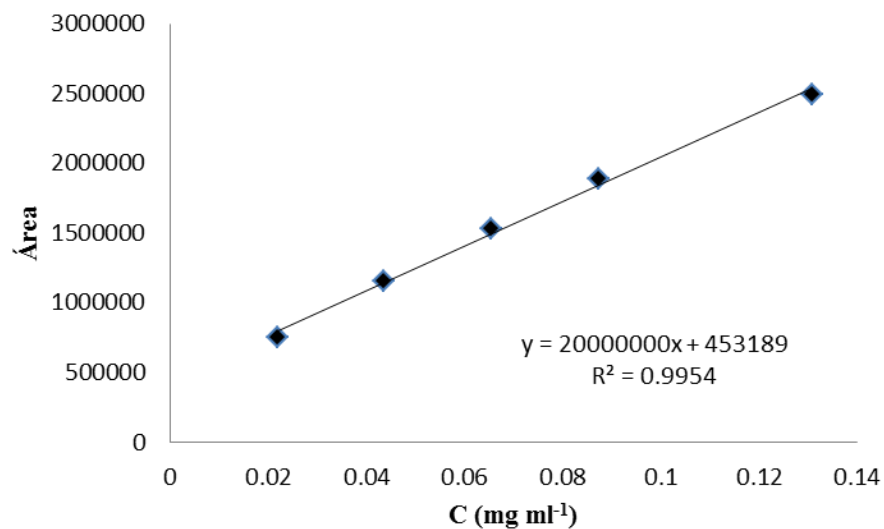


Figura 7. Curva de calibración para la cuantificación de SeMet.

Se obtuvo la siguiente curva de calibración:

$$Y = 200000000x + 453189$$

Donde Y corresponde el área bajo la curva y X a la concentración expresada en mg mL<sup>-1</sup>

## 5.5 Estudio de perfil de liberación de seleniometionina

### 5.5.1 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 (2 %) 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.



### 5.5.2 Adición de la solución madre y microcápsulas de seleniometionina al vehículo

A 21g del vehículo de entrega (gel bioadhesivo) se adicionó 0.5 µL de la solución madre de SeMet (10 mg/mL) ó 0.3 g de las microcápsulas de SeMet, con agitación para obtener una dispersión uniforme en el gel.

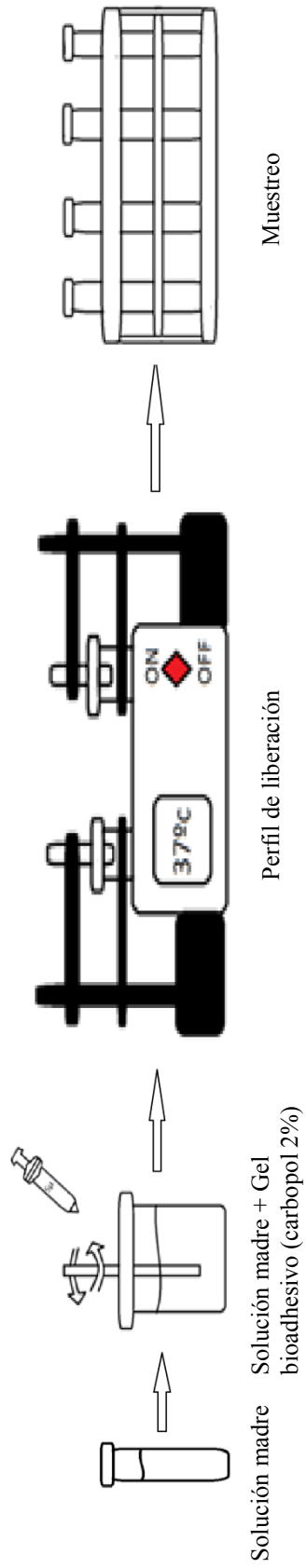
### 5.5.3 Perfil de liberación desde el vehículo de entrega de la SeMet sin encapsular y SeMet encapsulada.

Se estudió el perfil de liberación de seleniometionina desde el gel bioadhesivo (carbopol 971) adicionado de seleniometionina ó microcápsulas de seleniometionina [SeMet-NaCMC y SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>]. El gel (21 g) con o sin microcápsulas se colocó en un tubo de diálisis (10 de largo x 3 cm de diámetro), el cual se sumergió en un vaso precipitado con 50 mL de agua destilada. El agua y gel se separaron por medio de una membrana (shake skin), como se muestra en la figura 8. Se tomaron muestras de 5 mL con intervalos de tiempos conocidos. Después de cada toma de muestra se repuso el volumen para mantenerse constante y finalmente la cuantificación de la SeMet se realizó mediante HPLC. En el cuadro 4 se muestran las condiciones experimentales utilizadas en el ensayo.

Cuadro 4. Condiciones experimentales utilizadas para los perfiles de liberación desde el gel bioadhesivo (carbopol 971) con la SeMet sin encapsular y SeMet encapsulada.

Condiciones	Rango
Temperatura	37 ± 0.5 °C
Volumen	50 mL
Medio de disolución	Agua destilada
Volumen de muestra	5 mL
Tiempo de muestreo (gel adicionado con seMet)	0.08, 0.25, 0.42, 0.58, 0.75, 3, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 48, 56, 78, 102, 125, 200 h.
Tiempo de muestreo ( (gel adicionado con microcápsulas)	8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312 h
Cuantificación	HPLC

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



Microcápsulas de SeMet + vehículo de entrega (gel bioadhesivo).

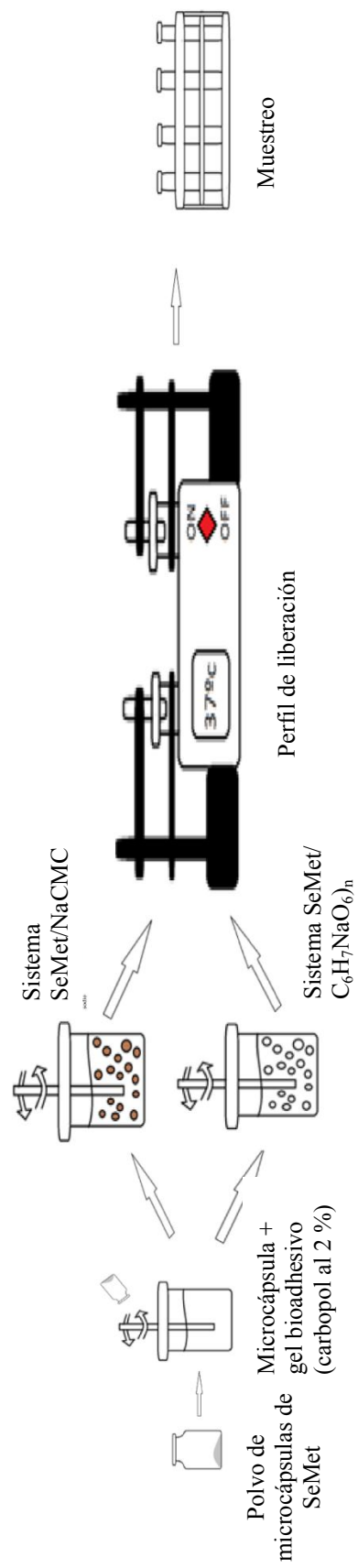


Figura 8. Esquema utilizado para los perfiles de liberación.

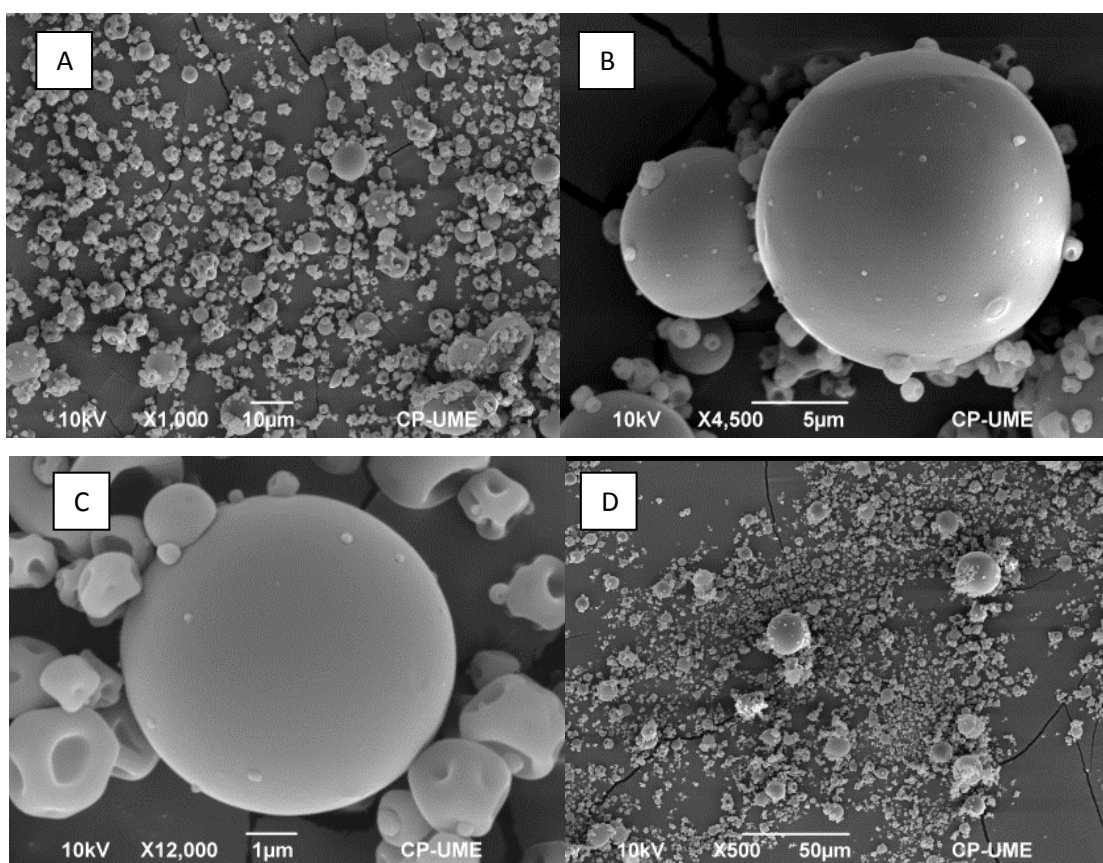
## 6 Análisis estadístico

Para investigar el efecto de los tratamientos sobre las variables de respuesta, SeMet total encapsulada, porcentaje de rendimiento y porcentaje de recuperación en las microcápsulas, se usó la técnica de remuestreo *Bootstrap* (Efron y Tibshirani, 1993) con las que se obtuvieron intervalos del 95 % de confianza para determinar la diferencia de medias entre tratamientos. Para investigar la cinética de liberación se utilizaron los modelos matemáticos propuestos por Higuchi (1963) y Korsmeyer *et al.* (1983).

## 7 Resultados y Discusión.

### 7.1 Fotomicrografía

Las microfotografías para el sistema SeMet/NaCMC, muestran microcápsulas de forma esférica y en ocasiones esferas irregulares (Figura 9), característico en micropartículas producidas mediante el secado por atomización (Rivas, 2010). Se observó además una tendencia a aglomeración entre las partículas más pequeñas (9G). En la mayoría de los casos las micropartículas muestran partículas colapsadas o encogidas.



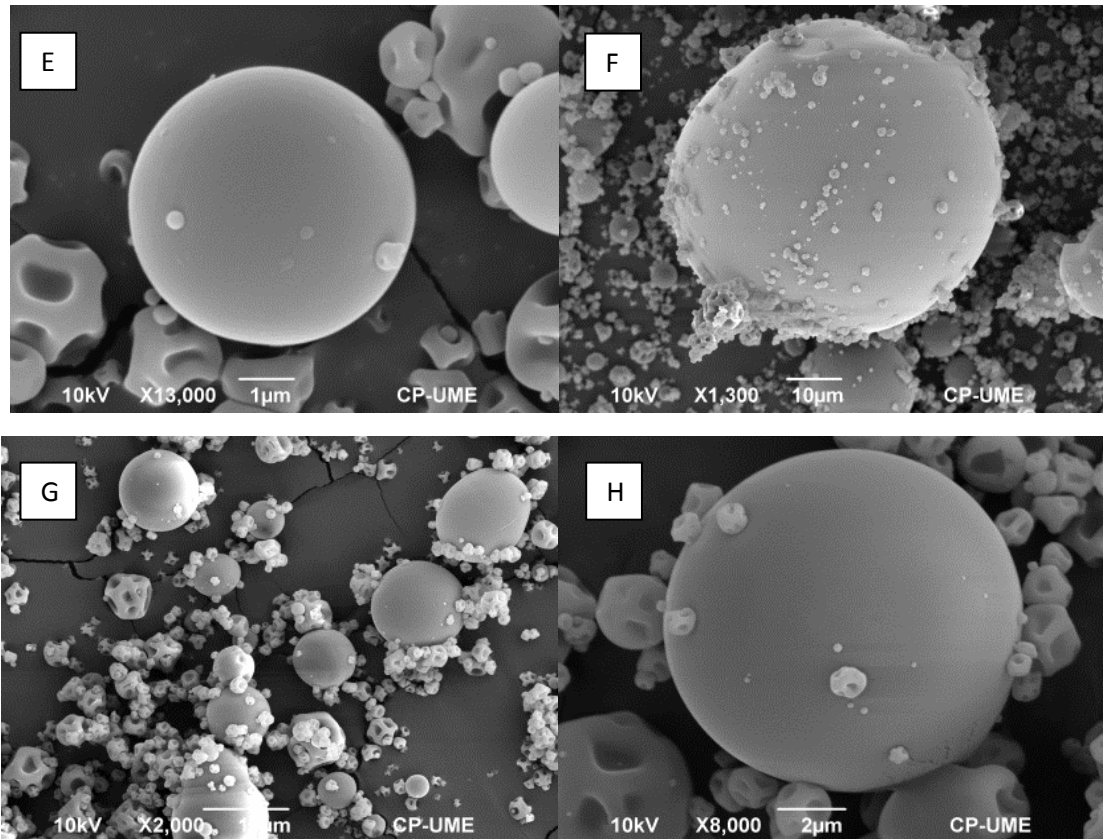


Figura 9. Micrografía mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) de SeMet/NaCMC con una razón 1:50 (activo: agente encapsulante), mediante el método de secado por atomización a una temperatura de entrada de 200°C con un flujo de alimentación al 5%. Las fotografías de izquierda a derecha poseen una amplitud de (A) X1000, (B) X4500, (C) X12000, (D) X500, (E) X13000, (F) X1300, (G) X2000 y (H) X8000, respectivamente.

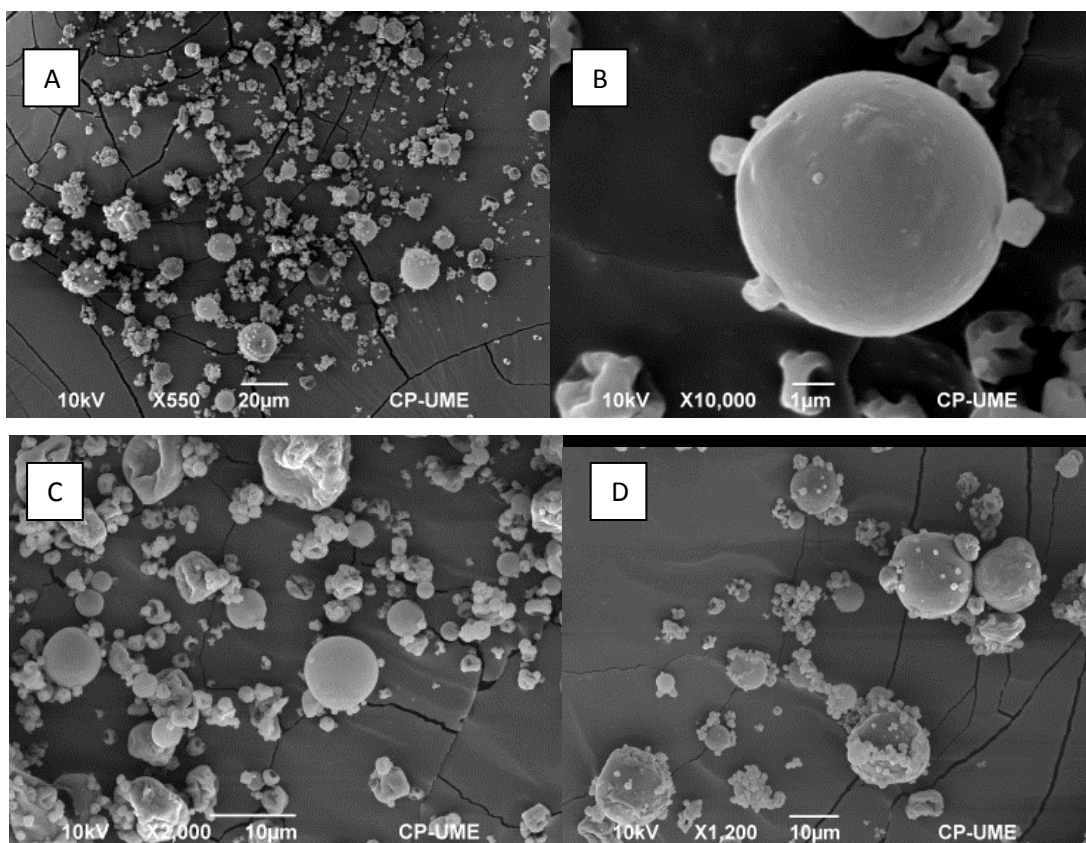
La morfología irregular observada puede deberse a la formación interna de vacuolas y abolladuras, depresión y fracturación externa como lo reporta Sheu y Rosenberg (1998) en microestructuras constituidas por polisacáridos mediante secado por atomización, también sugirieron que la morfología resulta un efecto de la composición química y estructural del material encapsulante y de los parámetros de secado, durante el proceso de encapsulación.

Los resultados referentes a la morfología fueron similares a los reportados por Hao-Ying Li *et al.* (2010), quienes microencapsularon fosfato alcalino (AKP), con carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC) como polímero mediante el secado por



atomización, siendo similar la morfología de sus micropartículas con las obtenidas en este trabajo.

La morfología para las microcápsulas (Figura 10) recubiertas con alginato de sodio [SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>], y la microcápsulas con NaCMC fueron esféricas e irregulares, pero a diferencia de las microcápsulas de NaCMC las de alginato de sodio presentaron superficies rugosas. Se observó que las microcápsulas más grandes tuvieron una morfología más esférica, mientras que las más pequeñas presentaron hoyuelos y formas irregulares.



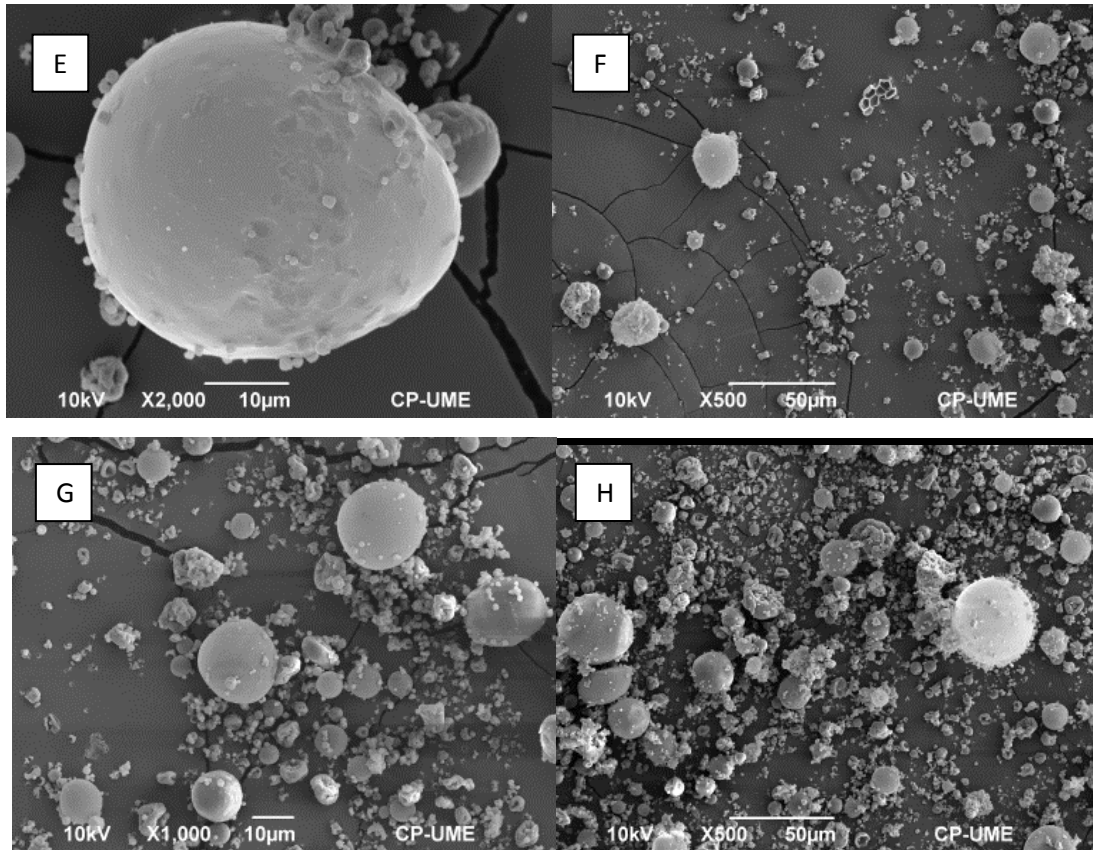


Figura 10. Micrografía (MEB) de microcápsulas de  $\text{SeMet}/(\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6)_n$  con una razón 1:50 (activo: agente encapsulante), mediante el método de secado por atomización a una temperatura de entrada de  $200^\circ\text{C}$  y un flujo de alimentación al 5%. Las fotografías de izquierda a derecha poseen una amplitud de (A) X550, (B) X10000, (C) X2000, (D) X1200, (E) X2000, (F) X500, (G) X1000 y (H) X500, respectivamente.

Tanto la forma y superficie resultante para el sistema  $\text{SeMet}/(\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6)_n$ , fueron similares a las del sistema  $\text{SeMet}/\text{NaCMC}$  en su mayoría, sin embargo se presentó un número mayor de micropartículas con formas irregulares y superficie rugosa. Se observó que las partículas más grandes tomaron morfología más esférica, mientras que las más pequeñas presentaron abolladuras y formas irregulares. La morfología resultante de las micropartículas se atribuye principalmente a las condiciones del proceso de encapsulación (parámetros de secado). La formación de superficies dentadas en secado por atomización se ha atribuido al encogimiento de las partículas durante el proceso de secado (Alamilla-Beltrán *et al.*, 2005), lo cual puede ocurrir a altas o bajas temperaturas. A bajas temperaturas del aire de entrada hay menos difusión de agua y las partículas tienen más tiempo para encoger. A altas temperaturas del aire de entrada, la rápida evaporación y alta presión dentro de las partículas produce encogimiento. Por otro lado, la morfología de las

micropartículas también puede ser modificada por la temperatura de alimentación (Ronkart *et al.*, 2007; Hirofumi *et al.*, 1998).

## 7.2 Caracterización de las micropartículas para los sistemas de seleniometonina con carboximetilcelulosa y alginato de sodio (SeMet/NaCMC y SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>).

### 7.2.1 Porcentaje de encapsulación de las micropartículas.

En el cuadro 5 se presenta el contenido de SeMet total encapsulada, así como el rendimiento y recuperación para las micropartículas de los sistemas SeMet/NaCMC y SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>, obtenidas mediante secado por atomización.

El contenido de SeMet total encapsulada, rendimiento y recuperación para las micropartículas que utilizaron NaCMC como agente encapsulante, fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) que aquellas con alginato de sodio. Estos resultados muestran el efecto del tipo de agente encapsulante sobre la encapsulación de seleniometonina. Diferentes agentes encapsulantes tienen diferentes parámetros óptimos en el secado por atomización porque las características como solubilidad y viscosidad afectan la velocidad de formación de la costra (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Kenyon, 1995).

Cuadro 5. Contenido de seleniometonina total encapsulada, rendimiento, recuperación y tamaño de partícula para las micropartículas de seleniometonina con carboximetilcelulosa y alginato de sodio (SeMet/NaCMC y SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>)

Sistema	SeMet total teórico (mg SeMet g <sup>-1</sup> polvo)	SeMet totales encapsulada (mg SeMet g <sup>-1</sup> polvo)	Rendimiento (%)	Recuperación (%)	Tamaño de partícula (µm)
SeMet/NaCMC	18.85	18.08 ± 1.08	45.9 ± 3.9	96 ± 6	4.46
SeMet/Alg Na	18.85	10.16 ± 2.26	37.8 ± 1.7	54 ± 12	5.23

SeMet total teórico: Cantidad de SeMet pesada inicialmente antes del secado por atomización. Valores expresados como media ± DE.

Agüero *et al.* (2007) al encapsular cefazolina con alginato de sodio por gelificación iónica reportaron porcentajes de rendimientos entre 63.75 y 83.40 %. De modo similar, Ahmed *et al.* (2010), para la encapsulación de diclofenaco con alginato de sodio por



emulsificación o gelificación interna reportaron rangos de rendimiento entre 79.55 % - 97.41 %. En este trabajo se encontró un rendimiento menor de 54 % para el sistema SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>. Así, el método de encapsulación jugaría un rol importante sobre el rendimiento de las micropartículas obtenidas. Los alginatos son considerados como polímeros de bloques (Chan *et al.*, 2002), debido a sus propiedades químicas, por lo que su uso para encapsulación por gelificación iónica puede considerarse como una alternativa.

Hao-Ying Li *et al.* (2010) microencapsularon una proteína fosfato alcalino (AKP) mediante secado por atomización, usando como polímero la NaCMC, con el objetivo de controlar la entrega de la AKP por vía pulmonar. Reportaron rendimientos 45.3 % y recuperación después del secado de 73.7 %, indicando una degradación substancial de la AKP durante el proceso. En contraste, cuando se aumentó la proporción de NaCMC se observó una diferencia significativa ( $p < 0.01$ ) con una actividad de 94.2 % mayor a lo esperado. Estos autores concluyeron que el aumento en la proporción de NaCMC disminuyó la pérdida de AKP, además de que se mejoró significativamente el porcentaje de recuperación de la enzima después del secado por atomización, los resultados de estos investigadores coinciden con lo observado en este estudio.

Las microcápsulas del sistema SeMet/NaCMC mostraron un porcentaje de recuperación significativamente mayor, respecto al sistema SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>. Obteniendo un intervalo del 95 % de confianza en la diferencia de medias entre tratamientos (Lim. inf. 25.02, Lim. inf. 60.7767), nótese que el “0” no lo incluye. Esto sugirió que el agente encapsulante NaCMC protegió a la seleniometionina de la degradación térmica durante el proceso de secado por atomización. La NaCMC 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, la SeMet podría haber sido atrapada dentro de los coloides aumentando su protección durante el secado por atomización (Rabbani y Sevilla, 2005).

Siendo de  $96 \% \pm 5.66$  para el sistema SeMet/NaCMC y de  $54 \% \pm 12.02$  para el sistema SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>. De igual forma, se obtuvo un intervalo del 95 % de confianza en la diferencia de medias entre tratamientos (Lim. inf. 25.02, Lim. inf. 60.7767), nótese que el “0” no lo incluye. Estos resultados revelan el efecto del tipo de agente encapsulante sobre la interacción de SeMet-polímero, ya que estos polímeros tienen diferencias estructurales. El aumento en la capacidad de encapsulación de la NaCMC, puede ser atribuida a la formación de enlaces de hidrógeno entre el azufre de la metionina y los grupos hidroxilos de la carboximetilcelulosa.

Por otro lado, se ha reportado que un mayor grado de sustitución de la NaCMC modifican sus propiedades reológicas (Reología Newtoniana) y favorecen sus propiedades de solubilidad al contacto con el agua, su estabilidad térmica, coloidal, que es de interés particular en procesos de formulación y empaque de la industria farmacéutica.

### 7.3 Evaluación de la cesión de seleniometionina *in vitro*.

#### 7.3.1 Cinética de liberación de seleniometionina desde gel bioadhesivo con SeMet sin encapsular.

En la figura 11 se presenta el perfil de liberación de seleniometionina desde gel bioadhesivo con SeMet sin encapsular en agua a 37°C

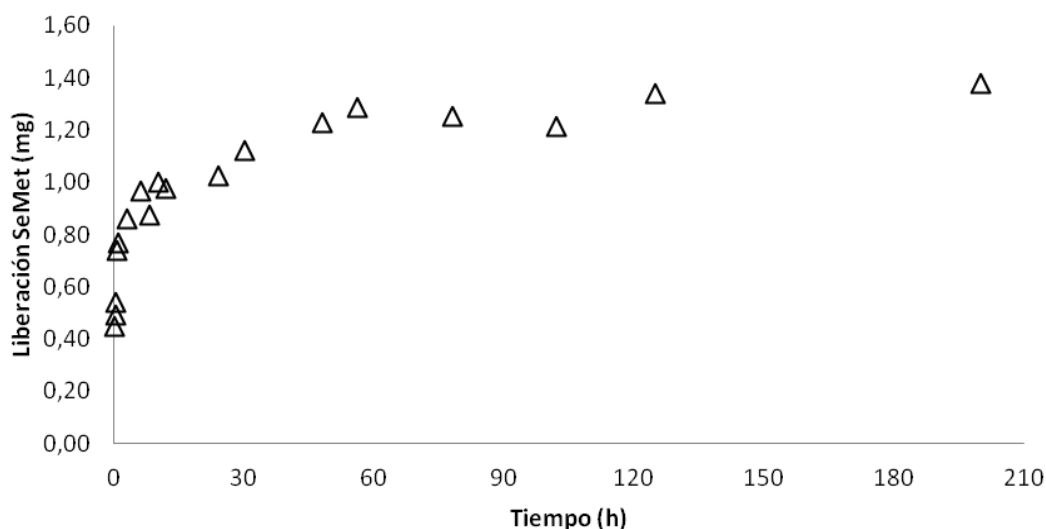


Figura 11. Perfil de liberación de seleniometionina sin encapsular desde gel bioadhesivo en agua bidestilada a 37°C.  $\Delta$  SeMet + gel bioadhesivo (carbopol al 2%).

El perfil de liberación del testigo, SeMet (sin encapsular) + gel bioadhesivo en agua bidestilada, mostró una liberación creciente a través del tiempo hasta alcanzar una concentración máxima de  $1.56 \text{ mg mL}^{-1}$  (28%) de liberación a las 200 h, esto sugirió que la entrega del activo fue por difusión donde se advirtió un control en la entrega del activo, lo que permitió incorporar cantidades muy dispersantes del fármaco y se mantuvo una excelente bioadhesión. Esto es debido a que, generalmente, el mecanismo de mucoadhesión se divide en dos etapas: la primera que se caracteriza por el contacto entre el mucoadhesivo y la membrana, a través de la difusión y la hinchazón de la formulación; la segunda etapa fue de consolidación, es decir, el efecto de la humedad en los materiales, que permite que las moléculas formen enlaces débiles de van der Waals así como enlaces de hidrógeno (Smart, 2005; Hagerstrom, 2003). Se usó al carbopol C971 como un vehículo de entrega para la SeMet por sus propiedades reológicas, como su grado de mucoadhesividad y

capacidad de controlar la liberación de la droga (Riley *et al.*, 2001), entre otras, perfilan a este como una alternativa potencial para la entrega de compuestos bioactivos.

En teoría, un gel con funciones bioadhesivas y características ideales tendría la rápida adhesión a la capa membranal o a la mucosa, sin presentar cambios en sus propiedades físicas, con mínimo de interferencia en la liberación del activo. Además de no producir sustancias tóxicas, y ser biodegradable (Smart *et al.*, 1984).

### 7.3.2 Cinética de liberación de seleniometionina desde gel bioadhesivo con microcápsulas de SeMet/NaCMC y SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>

En las figuras 12 y 13 se presenta el perfil de liberación de seleniometionina desde gel bioadhesivo con micropartículas de SeMet/NaCMC y SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub> en agua bidestilada a 37°C.

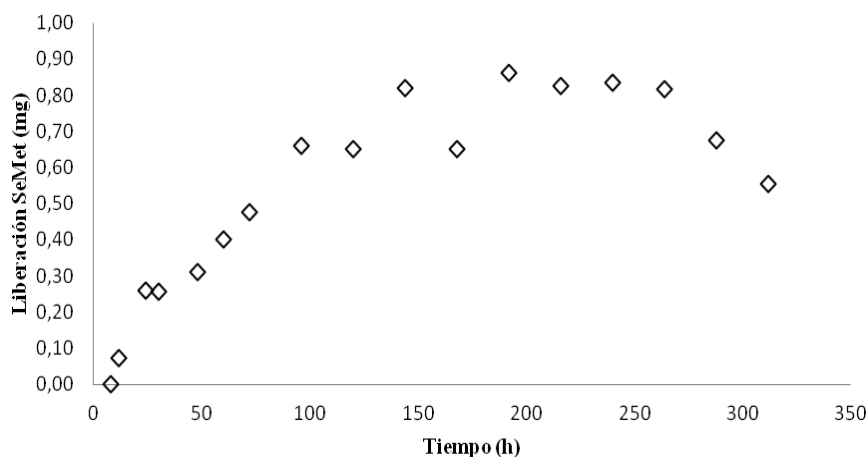


Figura 12. Perfil de liberación de seleniometionina desde gel bioadhesivo con micropartículas de SeMet/NaCMC en agua bidestilada como medio de disolución a 37°C. ◇ SeMet/NaCMC + gel bioadhesivo.

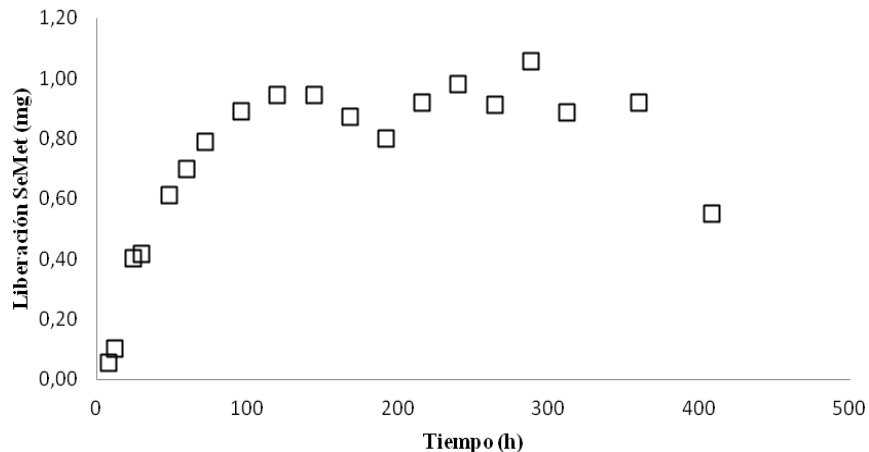


Figura 13. Perfil de liberación de seleniometionina desde gel bioadhesivo con micropartículas de SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub> en agua bidestilada como medio de disolución a 37°C. □ SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub> + gel bioadhesivo.

La evolución de la liberación de seleniometionina desde el gel con micropartículas de SeMet/NaCMC presentó un aumento de la liberación hasta las 264 h (0.82 mg mL<sup>-1</sup>) y luego se observa un descenso a partir de 288 h. Un comportamiento similar se observó para el gel con micropartículas de SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>, con un aumento hasta las 300 h y luego un descenso, sugiriendo que a estos tiempos comienza a degradarse la seleniometionina en el medio de disolución (Mark, 1984).

Sang-Ho *et al.* (2006), reportaron datos similares en un estudio al microencapsular  $\alpha$ -tocoferol, usando como agente encapsulante alginato de sodio por gelificación iónica, simulando el fluido gastrointestinal (pH 1.2) tuvo una liberación a las 24 h de un 28.8 %, por otro lado en un ambiente de simulación del fluido intestinal, la liberación fue de un 81.5%, presentando más del 50% de la liberación a las 4 h, esto indicó que las micropartículas de alginato de sodio fueron más estables bajo condiciones ácidas. El alginato de sodio como material de recubrimiento fue estructuralmente resistente en condiciones acidas (pH 1.2), pero con una liberación rápida del activo bajo condiciones levemente alcalinas y/o neutras, similar a las condiciones del agua destilada utilizada como medio de disolución en este estudio.

En la figura 14, se muestra un resumen de los tres sistemas estudiados gel bioadhesivo sin micropartículas y gel bioadhesivo con micropartículas de SeMet/NaCMC y SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>. En este gráfico se observa que los sistemas con micropartículas ejercen un control de la liberación de seleniometionina con respecto al control.

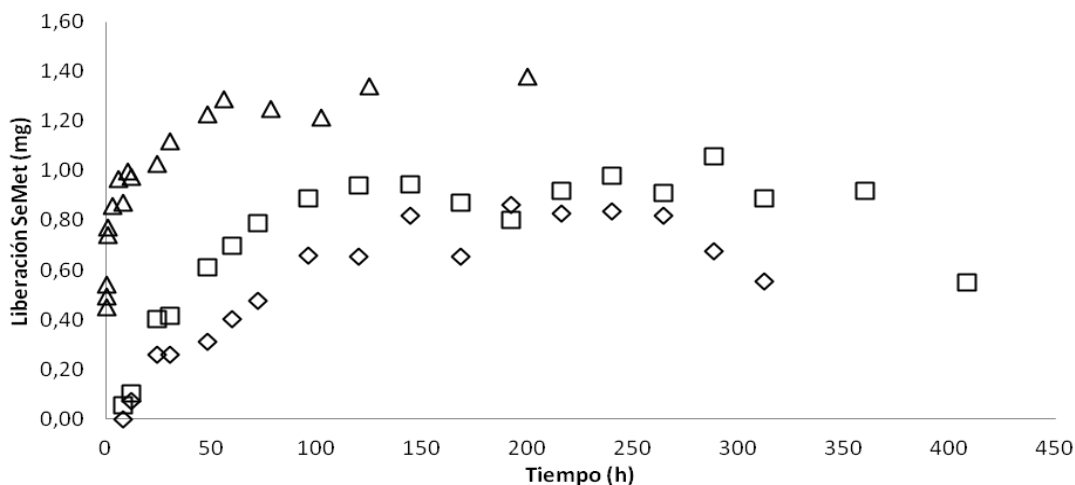


Figura 14. Perfil de liberación de SeMet desde Gel bioadhesivo sin (testigo) y con micropartículas en agua bidestilada como medio de disolución a 37°C. Δ SeMet + gel bioadhesivo. □ SeMet/ (C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub> en gel bioadhesivo y ◇ SeMet/ NaCMC en gel bioadhesivo.

#### 7.4 Ajuste de los modelos matemáticos analizados

Para el estudio del mecanismo de liberación de la SeMet de las microcápsulas, se ajustó la media de los perfiles de liberación para cada sistemas (Cuadro 6) a las ecuaciones propuestas por Higuchi (1963) y Korsmeyer *et al.* (1983), utilizadas comúnmente en la industria farmacéutica (Cuerda *et al.*, 2003). Los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) para el testigo (SeMet/Gel bioadhesivo) y para el sistema matricial SeMet/NaCMC un mayor ajuste para ambos modelos, a diferencia de los resultados para el sistema SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub> con un  $r^2$  bajo. Para el caso del modelo Higuchi (1963), el valor de  $k$  para los tratamientos (SeMet/NaCMC y SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>) son cercanos a cero, parámetro utilizado para determinar también el ajuste de los datos (Aragón *et al.*, 2009).

Cuadro 6. Parámetros cinéticos obtenidos desde las curvas de liberación para el gel bioadhesivo sin y con micropartículas (SeMet/NaCMC) y SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub>.

Sistema	Korsmeyer <sup>a</sup>			Higuchi <sup>b</sup>	
	k	n	r <sup>2</sup>	k	r <sup>2</sup>
SeMet/Gel bioadhesivo	0.0003	0.1412	0.94	0.0106	0.81
SeMet/NaCMC + Gel	0.0168	0.6064	0.82	0.0003	0.76
SeMet/(C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NaO <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> + Gel	0.0042	0.5718	0.69	0.0008	0.53

<sup>a</sup>  $F = M_t/M_o = k \cdot t^n$  de acuerdo a Korsmeyer *et al.* (1983).

<sup>b</sup>  $F = M_t/M_o = k \cdot t^{1/2}$  de acuerdo a Higuchi (1963)

Los valores de  $n$  para los sistemas SeMet/(C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>6</sub>)<sub>n</sub> y SeMet/ NaCMC fueron de 0.57 y 0.60 respectivamente, lo que indicó que la liberación de la SeMet (activo) fue mediante un mecanismo de difusión no fickiano o anómalo termino referente al comportamiento de las cadenas poliméricas del agente encapsulante (Erdener *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2011 ). Esto significa que, la liberación de la SeMet está controlada parcialmente, por la relajación viscoelástica (Gonzalez *et al.*, 2011), donde la penetración del agua hacia la microcapsula es controlada por la rapidez de la relajación de sus cadenas (Gustavo 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, 1989).

## 8 Conclusiones

El método de secado por atomización resultó una alternativa viable para elaborar microcápsulas de SeMet debido a que es un proceso económico, flexible y de buena calidad. La eficiencia de encapsulación se encontró entre 54 a 96 %, lo que indica que la pérdida de activo fue muy baja.

El porcentaje de rendimiento, recuperación y la seleniometionina total encapsulada fueron mayores para el sistema de SeMet/NaCMC. es decir, el agente encapsulante carboximetilcelulosa protegió la SeMet con mayor eficiencia de la degradación térmica. Además el perfil de liberación para el sistema SeMet/NaCMC mostró un mayor control en la entrega del activo.

Finalmente se obtuvieron microcápsulas adecuadas, para liberar de forma controlada la seleniometionina y proporcionar selenio de forma orgánica a la glándula mamaria.



## 9 Literatura citada

- Alamilla-Beltrán, L., Chanona-Pérez, J. J., Jiménez Aparicio, A. R. and Gutiérrez-López, G. F. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering*. 67:179-184
- Agüero L., J. Garcia, O. Valdés, D. Zaldivar, y I. Pérez. 2007. Soporte polimérico en forma de micropartículas para la liberación de cefazolina. VII Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería Habana, Cuba.
- Ahmed M., A. Sorifa, and J.B. Eun. 2010. Effect of pretreatments and drying temperatures on sweet potato flour. *International. J of F. Sci and Tech* 45: 726-732 pp.
- Aragón F. A., S. R. González, y G. N. Brizuela. 2009. Estudio cinético de liberación in vitro en un biomaterial compuesto por HAP-200/POVIAC/CaCO<sub>3</sub>. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 10: 119-130 pp.
- Bach A. y M. Devant. 2004. Microminerales en la nutrición del rumiante: aspectos técnicos y consideraciones legales. IRTA. XX curso de especialización FEDNA. Barcelona, España.
- Báez G. 2002. Estudio epidemiológico de mastitis subclínica bovina en el sector II de Téjaro, Michoacán. (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México. 40-4 p.
- Balassa L. and J. Brody. 1968. Microencapsulation. *Food Engineering*. 88-91 pp.
- Beilstein M. A., S. C Vendeland, E. Barofsky, O. N. Jensen, and P. D. Whanger. 1999. Selenoprotein W of rat muscle binds glutathione and an unknown small molecular weight moiety. *J. Of Inorganic Biochemistry*. 61: 117-124 pp.

- Bozzola J. and L. Russel. 1992. Specimen Preparation for Scanning Electron. *In: S. Marks (Ed) Electron Microscopy. Publishers Services. Canada. 58 p.*
- Bradley J. and M. Green. 2001. Adaptation of *Escherichia coli* to the Bovine Mammary Gland *J. of Clinical Microbiology. 39:1845-1849 pp.*
- Brannon P., L. and N. Peppas. 1989. Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. IX. The mechanisms of drug release from ph-sensitive swelling-controlled systems. *J. Controlled Release. 8: 267-274 pp.*
- Brannon L. and N. Peppas. 1990. Dynamic and equilibrium swelling behaviour of pH-sensitive hidrogels containing hydroxythyl methacrylate. *Biomaterials. 11: 635- 644 pp.*
- Brazel C. 1999. Microencapsulation: Offering solutions for the food industry. *Cereal Foods World. 44: 388-393 pp.*
- Constantinidis I., I. Rask, R. C. Long, and A. Sambanis. 1999. Effects of alginate composition on the metabolic, secretory, and growth characteristics of entrapped bTC3 mouse insulinoma cells. *Biomaterials. 20: 2019–27 pp.*
- Ceballos A., F. G. Wittwer y P. A. Contreras. 1998. Actividad sanguínea de glutatión peroxidasa en bovinos lecheros a pastoreo: variación según la edad y época del año. *Arch-Med.Vet. 30: 13-21 pp.*
- Cuerda C., B. Marín y C. Valenzuela. 2003. Un modelo de desorción para describir los procesos de liberación *in vitro*. *Biofarmacia y Farmacocinética. 453-456 pp.*
- Chan L., H. Lee, and P. Heng. 2002. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. *Int. J. Pharm. 242: 259–262 pp.*

- Church D. y W. Pond. 1996. Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales. 1<sup>ra</sup> ed. Editorial Noriega Limusa, México. D.F.
- Darrabie M., W. Kendall, and E. Opara. 2006. Effect of alginate composition and gelling cation on microbead swelling. *J. of Microencapsulation*. 23: 613-621 pp.
- Diego H. 1994. Características de un Mineral Quelatado; Suplementación en la dieta y su Influencia en la Respuesta Inmunológica (Mastitis). *Biotecnología en la industria de la alimentación animal*. 4:185 – 199.
- Efron, B., y R. Tibshirani. 1993. *An Introduction to the Bootstrap*. Marcel and Decker. 186 p.
- Erdener K., S. Dursun, S. Nurettin, and G. Olgun. 2001. Radiation induced acrylamide/citric acid hydrogels and their swelling behaviors. *J. macromol Mater. Eng.* 286: 34-42 pp.
- Ensminger E. y C. Olentine. 1983. *Alimentos y Nutrición de los Animales*. Editorial El ATENEO. 51-52 y 55-56 pp.
- Escobar J., D. García, D. Zaldivar y I. Katime. 2002. Hidrogeles. Principales Características en el Diseño de Sistemas de Liberación Controlada de Fármacos. *Revista iberoamericana Polímeros*. 3:3 p.
- Erskine R., R. Eberhardt, and P. Crasso. 1989. Induction of *E. coli* mastitis in cows fed selenium-deficient or selenium-supplemented diet. *Am. J. Vet. Res.* 50: 2093-2100 pp.
- Favaro C., A. Santana, E. Monterrey, 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.

- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. 2007. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*. 40: 1107–1121.
- Georgievskii V., B. Annenkov, and V. Samokhin. 1992. *Mineral Nutrition of Animal*. Butterworths. London. 463 p.
- 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.
- Greg B., V. Rick, and F. John. 1998. Controlling Milk Fever and hypocalcemia in dairy cattle: Use of dietary cation-anion difference (DCAD) in formulating dry cow rations. College of Agriculture and Home Economics, New México State University.
- Guo X. and L. Wu. 1998. Distribution of free seleno-amino acids in plant tissue of *Melilotusindica* L. grown in selenium-laden soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 39: 207- 214 pp.
- Hagerstrom H., K. Edsman, and M. Stromme. 2003. Low-frequency dielectric spectroscopy as a tool for studying the compatibility between pharmaceutical gels and mucous tissue. *J. Pharm. Sci.* 92:1869-1881 pp.
- Hartfiel, W, and W. Schulte. 1988. Selenmangel in der Bundesrepublik (II). *Aktuelle Ernährungsmedizin*. 13:77-82.
- Hansen D., R Hathaway, and J. Oldfield. 1993. White muscle and other selenium-responsive diseases of livestock. *Pacific Northwest Extension*.

- 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.
- Héctor A. 2003. *Fármacos de Acción Prolongada: Mecanismos de Liberación. Usos de Distintos Modelos.* Unidad de Producción de Medicamentos, Facultad de Ciencias Exactas, CP B1900AJL, Pcia. de Buenos Aires, Argentina. *Lat. Am. J. Pharm.* 22: 355-64 pp.
- 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: 1145-1149.
- Hirofumi T., Y. Takehiko, H. Tomoaki., Y. Hiromitsu, and K. Yoshiaki. 1998. Spray-dried composite particles of lactose and sodium alginate for direct tableting and controlled releasing. *Inter. J. of Pharm.* 174: 91-100 pp.
- Hoblet K., G. Schnitkey, D. Arbaugh, J. Hogan, and K. Smith. 1991. Costs associated with selected preventive practices and with episodes of clinical mastitis in nine herds with low somatic cell counts. *J. Am. Vet. Mec. Assoc.* 199: 190-196 pp.
- Hogan J., W. Weiss, K. Smith. 1993. Role Of vitamin E and selenium in host defense against mastitis. *J. Dairy Sci.* 76: 2795-2803 pp.
- Joo D., M. Cho, J. Lee, J. Park, J. Kwak, Y. Ha, and Bucholz. 2001. New strategy for the cultivation of microalgae using microencapsulation. *J. Microencapsulation* 5: 567-576 pp.
- James L., R. Short, K. Panter, R. Molyneux, L. Stuart, and R. Bellows. 1989. Pine needle abortions in cattle: a review and report of 1973-1984 research. *Cornell Vet.* 79 : 39 p.

- Juniper D., R. Phipps, D. Givens, A. Jones, C. Green, and G. Bertin. 2008. Tolerance of ruminant animals to high dose in-feed administration of selenium enriched yeast. *J. Anim. Sci.* 86:197–204 pp.
- Käistner H., R. Dönges, and J. Hilbig. 1997. Structure and solution properties of sodium carboxymethyl cellulose, *Colloids Surf. A.* 123-124: 307-328 pp.
- Katime D., O. Katime. y I. Katime. 2004. Los materiales inteligentes de este milenio: los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones. Servicio editorial de la Universidad del país Vasco. Capítulos 1; 7, 15-20, 121-228 pp.
- 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.
- 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.
- Klock G, H. Frank, R. Houben, T. Zekorn, A. Horcher, U. Siebers, M. Wohrle, K. Federlin, and U. Zimmermann. 1994. Production of purified alginates suitable for use in immune isolated transplantation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 40:638–43 pp.
- Kondo T. 1990. Preparation and permeability characteristics of microcapsule membranes. *J. Controlled Release.* 11: 215-224 pp.
- Kenyon M. 1995. Modified starch, maltodextrin and corn syrup solids as wall material for food encapsulation. En su: Risch, Encapsulation and controlled release of foods ingredients Washington DC, 2º ed., Washington DC, American Chemical Society. 42-50 p.

- Kincaid, R. L., M. Rock, y F. Awadeh. 1999. Selenium for Ruminants: Comparing Organic and Inorganic Selenium for Cattle and Sheep: Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium. Edited by T.P. Lyons and K. A. Jacques. 537-543 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.
- Knowles S., N. Grace, K. Wurms, and J. Lee. 1999. Significance of amount and form of dietary selenium on blood, milk and casein selenium concentrations in grazing cows. *J. Dairy Sci.* 82:429 pp.
- Levine D., S. Sulkin, and I. Van-Heukelen. 1983. The design and development of microencapsulated diets for the study of nutritional requirements of brachuryan crab larval. *in*: C. J. Berg (ed) *The Culture of Marine Invertebrates. Selecting Readings.* 193-203 pp.
- Li Y, C. Shoemaker, J. Ma, X. Shen and F. Zhong. 2008. Paste viscosity of rice starches of different amylose content and carboxymethylcellulose formed by dry heating and the physical properties of their films. *Food Chem.* 109: 616-623 pp.
- Maas J. 1990. Selenium deficiency in cattle. *En: Proceeding XVI World Buiatrics Congress, Salvador, Brasil.* 3-13 pp.
- Magdassi S. and Y. Vinetsky. 1996. Microencapsulation of oil-in-water emulsions by proteins. *En: Microencapsulation.* 21-34 pp.
- Mahan D. 2000. Effects of organic and inorganic selenium sources and levels on sow colostrum and milk selenium content. *J. Anim. Sci.* 78:100-105 pp.

- Mahmoud M. Ahmed, Saleh Abd El-Rasoul, H. Auda Sayed, A. Ibrahim Mohamed. 2011. Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium–sodium alginate microparticles. Saudi Pharmaceutical Journal.
- Mark X. 1984. Characterization of selenomethionine in proteins. Methods in enzymology. 107: 620-623 pp.
- McDowell R. and U. Hernandez. 1975. Intensive Systems for Beef Production in the Tropics. J. Anim. Sci. 41: 1228-1237 pp.
- McNeal M. and S. Balistrieri. 1989. Geochemistry an occurrence of selenium: An overview. In: Selenium in agriculture and the environment, Soil Science Society of America. Special publication. 23:1-13 p.
- Muñoz G. y F. Zuluaga. 2009. Síntesis de hidrogeles a partir de acrilamida y ácido alilmalónico y su utilización en la liberación controlada de fármacos. Rev. Acad. Col. Cienc. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 129: 539-548 pp.
- Murugesan R. and V. Orsat. 2011. Spray drying of elderberry (*Sambucus nigra L.*) juice to maintain its phenolic content. Drying Technology. 29:1729-1740.
- Murúa P., Beristain G. and Martínez B. 2009. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified 50 starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. Journal of Food Engineering. 91: 380-386 pp.
- 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.



- Ndiweni N., T. Field, M. Williams, J. Booth, and J. Finch. 1991. Studies on the incidence of clinical mastitis and blood levels of vitamin E and selenium in dairy herds in England, *Vet. Rec.* 129: 86-88 pp.
- Ndiweni N., J. Finch. 1995. Effects of in vitro supplementation of bovine mammary gland macrophages and peripheral blood lymphocytes with alpha-tocopherol and sodium selenite: implications for udder defenses. *Vet. Immunol. Immunopath.* 47: 111-121 pp.
- Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 2001. Dairy Cattle Nutrition Committee on Animal Nutrition Board on Agriculture and Natural Resources National Research Council. 381p.
- Oblitas F., Contreras P., Bohmwald H. y Wittwer F. 2000. Efecto De La suplementación con selenio sobre la actividad sanguínea de glutatión peroxidasa (GSH-Px) y ganancia de peso en bovinos selenio deficientes mantenidos a pastoreo. *Arch. med. vet.* 32: 55-62 pp.
- Ortman K., and B. Pehrson. 1999. Effect of selenate as a feed supplement to dairy cows in comparison to selenite and selenium yeast. *J. Anim. Sci.* 77:3365–3370 pp.
- Olson O. and L. Embry. 1973. Chronic selenite toxicity in cattle. *Proc. S. D. Acad. Sci.* 52: 50-58 pp.
- Parsons D. 2000. Carboxymethylcellulose sodium. *In*: Kibbe, A.H. (Ed.), *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 3<sup>era</sup> edition. Pharmaceutical Press, London, UK. 87–90 pp.
- Pastor M. 1994. Mamitis, *Buiat. Esp.* 4: 6-25 pp.
- Pedroza I. 2002. Alimentos Microencapsulados: Particularidades de los procesos para la microencapsulación de alimentos para larvas de especies acuícolas. *En*: "Avances en

Nutrición Acuícola VI". Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. Cancun, Quintana Roo, México.

Pehrson B., K. Ortman, N. Madjit, and U. Trafikowska. 1999. The influence of dietary selenium yeast or sodium selenite on the concentration of selenium in the milk of suckler cows and on the selenium status of their 65 calves. *J. Anim. Sci.* 77:3371 p.

Petre S., I. Josef, B. Michal, H. Jaroslava, R. Radko, and J. Frantisek. 2008. Influence of organic versus inorganic dietary selenium supplementation on the concentration of selenium in colostrum, milk and blood of beef cows. *Acta Veterinaria Scandinavica*.

Pfander W. 1971. Animal Nutrition in the Tropics-Problems and Solution. *J. Anim. Sci.* 33: 843-849 pp.

Philip F., O. Olobayo, C. Larry, I. Modupe, A. Anthony, and U. Michael. 2008. Preparation and evaluation of mucinated sodium alginate microparticles for oral delivery of insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70: 777–783 pp.

Philpot W. 1999. Aumento de la rentabilidad mediante el mejoramiento de la calidad de leche y la reducción de la mastitis. En: *Curso de Perfeccionamiento Mejoramiento de la Calidad Higiénica de Leche de Pequeños Productores*. 49-84 p.

Popplewell L. 2001. Evaluating encapsulation economics. *Perfumer & Flavorist* 26(2): 2-6. properties of novel alginate-silice-deshydrogenase hybrid biocomposite yeast. *Ind. Eng. Res.* 45:511 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.

Revilla V., B. Ramírez, A. López, C. Hernández, P. Tórtora, G. García, y M. Cruz. 2007. Suplemento de selenio con bolos intrarruminales de selenito de sodio en ovinos.

Facultad de Estudios Superiores, Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México. Ganadería. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. Agrociencia.

- Riffon R., K. Sayasith., H. Khalil, P. Dubreuil, M. Drolet, and J. Lagacé. 2001. Development of a Rapid and Sensitive Test for Identification of Major Pathogens in Bovine Mastitis by PCR. *J. of Clinical Microbiology*. 39: 2584-2589 pp.
- Rivas Reyes Caridad. 2010. Microencapsulado y estabilidad enzimática del jugo de chirimoya (*Annona cherimola Mill*). Tesis de posgrado Maestría. Instituto Profesional Nacional. 70 p.
- 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.
- Robert P., R. Carlsson, N. Romero, and L. Masson. 2003. Stability of spray-dried encapsulated carotenoid pigments from rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*) oleoresin. *J. Ame. Oil Chem. Soc.*, 80:1115-1120 pp.
- Ronkart S., C. Deroanne, M. Paquot, C. Fougnyes, J. Lambrechts, and C. Blecker. 2007. Characterization of the physical state of spray-dried Inulin. *Food Biophysics*. 2: 83-92 pp.
- Rotruck J., A. Pope and H. Ganther. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 179: 585–590 pp.
- Sahagún R. 1998. Importancia de los Minerales Orgánicos en la Nutrición de la Cerda Moderna. De: Biotecnología en la industria de la alimentación animal. Vol. VI. Alltech México. 91–114 pp.
- Shahidi, F., Han, X., 1993. Encapsulation of Food Ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 6: 501-547

- Suoranta K., E. Sinda, and R. Pihlak. 1993. Selenium of the selenium yeast enters the cow's milk. *Nor. J. Agric. Sci. Suppl* 11:215 p.
- Sheu T. and M. Rosenberg. 1998. Microstructure of microcapsules consisting of whey proteins and carbohydrates. *J. of Food Sci.* 63: 491–494 pp.
- Shi Li-guang, R. Yang, W. Yue, W. Xun, C. Zhang, Y. Ren, L. Shi, and F. Lei. 2009. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. *Anim. Reprod. Sci.* 118: 248–254 pp.
- Smart J., I. Kellaway, and H. Worthington. 1984. An in vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 36: 295-299 pp.
- Smart J. 2005. Las bases y los mecanismos subyacentes de la mucoadhesión. *Adv. Drug Del. Rev.* 57: 1556-1568 pp.
- Smith K., H. Conrad, B. Amiet, and D. Todhunter. 1985a. Incidence of environmental mastitis as influenced by vitamin E and selenium. *Kiel. Milchwirtsch. Forschungsber.* 37:482 p.
- Smith K., J. Harrison, D. Hancock, D. Todhunter, and H. Conrad. 1984. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *J. Dairy Sci.* 67:1293 p.
- Sang-Ho Y., B. Young, S. Pahn, and G. Hyeon. 2006. Microencapsulation of tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *International Journal of Biological Macromolecules* 38: 25–30 pp.

- Stevens J., W. Olson, R. Kraeme, and J. Archambeau. 1985. Serum selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in cattle grazing forages of various selenium concentrations. *Ame. J. of Vete. Research.* 46: 1556-1560 pp.
- Stowe D. and T. Herdt. 1992. Clinical Assessment of Selenium Status of Livestock. *J. Anim. Sci.* 70:3928 pp.
- Vos, M.J., M.P. Zijlstra, B. Kanon, Waarde-Verhagen Van, M.A., E.R Brunt, H.M. Oosterveld-Hut, S. Carra, O.C. Sibon, and H.H. Kampinga. 2010. HSPB7 is the most potent polyQ aggregation suppressor within the HSPB family of molecular chaperones. *Hum. Mol. Genet.* 23: 4677--4693.
- Underwood E. and N. Suttle. 1999. *Mineral Nutrition of Livestock.* 3ed. London: CAB International. Edinburgh, UK. 456 p.
- Underwood E. and N. Suttle. 2003. *Los Minerales En La Nutrición Del Ganado (3ªed).* Acribia, Zaragoza.
- Weiss W., J. Hogan, D. Todhunter, and K. Smith. 1997. Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:1728-1737 pp.
- Wolffram S. 1999. Absorption and metabolism of selenium: Differences between inorganic and organic sources: Biotechnology in the feed industry. *Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium.* Edited by T.P. Lyons and K. A. Jacques. 547-560 pp.
- Xuxia Z., W. Yanbo, G. Qing, and Li. Weifen. 2009. Effects of different dietary selenium sources (selenium nanoparticle and selenomethionine) on growth performance, muscle composition and glutathione peroxidase enzyme activity of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). *Aquaculture.* 291:78–81 pp.

Yáñez F. J., S. Montoya, M. L. Chaires, H. J. Jiménez., R. M. Márquez, y R. E. 2002.  
Ramos. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. Avance y  
perspectiva. 21: 313-319.