

# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

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

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

## **CARACTERIZACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE MICRO Y NANOCÁPSULAS DE SEL-PLEX® PARA LA PREVENCIÓN DE MASTITIS**

**REYNA ARGELIA GALICIA GONZALEZ**

**T E S I S**  
**PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL**  
**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO**

**2020**

La presente tesis titulada: **Caracterización y esterilización de micro y nanocápsulas de Sel-Plex® para la prevención de mastitis**, realizada por la alumna: **Reyna Argelia Galicia González**, bajo 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(A)   
DRA. MARÍA ESTHER ORTEGA CERRILLA

ASESOR (A)   
MC. CUAUHTÉMOC NAVA CUELLAR

ASESOR (A)   
DRA. LEONOR MIRANDA JIMÉNEZ

ASESOR (A)   
DRA. MÓNICA RAMÍREZ MELLA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, octubre de 2020

# **CARACTERIZACIÓN Y ESTERILIZACIÓN DE MICRO Y NANOCÁPSULAS DE SEL-PLEX® PARA LA PREVENCIÓN DE MASTITIS**

**Reyna Argelia Galicia González, M.C.**

**Colegio de Postgraduados, 2020**

## **RESUMEN**

El presente estudio tuvo como objetivo elaborar micro y nanocápsulas de selenio orgánico (Sel-Plex®) para su administración intramamaria, así como determinar el método de esterilización adecuado y analizar los cambios morfológicos del proceso. Las cápsulas se elaboraron por el método de nanoprecipitación con carboximetilcelulosa de sodio al 2 %. Se evaluaron dos métodos de esterilización, que fueron por irradiación  $\gamma$  en una cámara de cobalto-60 y por rayos UV a 257.7 nm, en una campana de flujo laminar. Para determinar la eficiencia del método de esterilización se realizó un conteo en placa con medio LB a 24, 72 y 144 horas de irradiación. Finalmente, los cambios morfológicos debido al proceso se analizaron por microscopía electrónica de barrido (MEB). Se obtuvieron las micro y nanocápsulas de selenio orgánico (Sel-plex®) y se observó que a dosis de 0.10, 0.25 y 0.50 mg esterilizadas con irradiación  $\gamma$ , no se registró crecimiento de colonias en las placas de cultivo en ningún tiempo de irradiación, en comparación con el control sin esterilizar ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, se observó que la pared externa presento protuberancias, formas amorfas y aglomeración de micropartículas en comparación con los controles que no se esterilizaron, las cuales eran esféricas y lisas. Por otro lado, para las micro y nanocápsulas a dosis 0.10, 0.25 y 0.50 mg esterilizadas con rayos UV se registró crecimiento microbiano de 1.09, 1.07 y 1.01 UFC respectivamente, que fue directamente con el testigo ( $p < 0.05$ ). se concluye que el método de irradiación  $\gamma$  modifica la morfología de las micro y nanocápsulas de Sel-Plex® pero garantiza la esterilidad del producto, por lo que es factible su administración intramamaria.

**Palabras clave:** carboximetilcelulosa, nanocápsulas, selenometionina.

# **CHARACTERIZATION AND STERILIZATION OF SEL-PLEX® MICRO AND NANOOCAPULES FOR THE PREVENTION OF MASTITIS**

**Reyna Argelia Galicia González, M.C.**

**Colegio de Postgraduados, 2020**

## **ABSTRACT**

This study aimed to develop micro and nanocapsules of organic selenium (Sel-Plex®) for intramamaria administration, as well as to determine the appropriate sterilization method and analyze morphological changes in the process. The capsules were made by the nanoprecipitation method with 2% sodium carboxymethylcellulose. Two sterilization methods were evaluated, which were by  $\gamma$  irradiation in a cobalt-60 chamber and by UV rays at 257.7 nm, in a laminar flow hood. To determine the efficiency of the sterilization method, a plate count with LB medium was performed at 24, 72 and 144 hours of irradiation. Finally, morphological changes due to the process were analyzed by scanning electron microscopy (MEB). Micro and nanocapsules of organic selenium (Sel-plex®) were obtained and it was observed that at doses of 0.10, 0.25 and 0.50 mg sterilized with  $\gamma$  irradiation, no colony growth was recorded in the culture plates at any irradiation time, compared to unil sterilized control ( $p < 0.05$ ). However, it was observed that the outer wall had bumps, amorphous forms and agglomeration of microparticles compared to controls that were not sterilized, which were spherical and smooth. On the other hand, for micro and nanocapsules at doses 0.10, 0.25 and 0.50 mg sterilized with UV rays microbial growth of 1.09, 1.07 and 1.01 CFUs was recorded respectively, which went directly with the witness ( $p < 0.05$ ). it is concluded that the  $\gamma$  irradiation method modifies the morphology of Sel-Plex micro and nanocapsules® but ensures the sterility of the product, so its intramamaria administration is feasible.

**Keywords:** carboxymethylcellulose, nanocapsules, selenomethionine.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología **CONACYT** por el apoyo económico (11833073) otorgado para poder realizar mis estudios de maestría en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, en el programa educativo Recursos Genéticos y Productividad Ganadería.

A todos los que laboran en el Colegio y forman parte de esta gran institución educativa.

A la **Dra. María Esther Ortega Cerrilla**, que me brindó la confianza y apoyo para concluir esta investigación.

A mis asesores, **Dr. Cuauhtémoc Nava, Dra. Leonor Miranda, Dra. Mónica Ramírez**.

En especial, a los doctores **Eulogio de la Cruz Torres e Israel Castillo** por brindarme su apoyo en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares en Toluca, Estado de México y en el Laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo, respectivamente.

A **Dios**, por permitirme llegar hasta esta etapa de mi vida.

A mis padres, **Victorino** Galicia y **Gudulia** González.

Para mis hermanos **Blanca** Galicia, **Alberto** Galicia, **Irán** Galicia y **Víctor** Galicia.

A **Jair Castro** por todo el apoyo que me brindo para terminar este proyecto y por estar tanto tiempo junto a mí.

A mis grandes amigos que siempre estarán en mi corazón en donde quiera que estén mi Nacho y mi amado Bimbo el negrito.

A todos, gracias por estar a mi lado....



## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>LISTADO DE CUADRO</b> .....	ix
<b>LISTADO DE FIGURAS</b> .....	x
<b>I.INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II.OBJETIVOS</b> .....	3
<b>2.1 Objetivo general</b> .....	3
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	3
<b>III.JUSTIFICACIÓN</b> .....	4
<b>IV.HIPÓTESIS</b> .....	5
<b>V. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	6
<b>5.1 Nanotecnología</b> .....	6
<b>5.2 Micro y nanoencapsulación</b> .....	6
<b>5.2.1 Técnicas para micro y nanoencapsulación</b> .....	7
<b>5.3 Agentes encapsulantes</b> .....	9
<b>5.3.1 Carboximetilcelulosa</b> .....	9
<b>5.4 Morfología y caracterización de micro y nanocápsulas</b> .....	10
<b>5.5 Importancia de los diferentes métodos de esterilización</b> .....	10
<b>5.6 Métodos de esterilización</b> .....	10
<b>5.6.1 Irradiación gamma</b> .....	11
<b>5.6.2 Irradiación UV</b> .....	11
<b>5.6.3 Esterilización por calor húmedo</b> .....	12
<b>5.7 Selenio (Se)</b> .....	13
<b>5.8 Fuentes de Selenio</b> .....	13
<b>5.8.1 Sel-Plex ®</b> .....	14
<b>5.9 Metabolismo de Se</b> .....	14
<b>5.10 Toxicidad del Se</b> .....	15
<b>5.11 Suplementación mineral en ganado bovino</b> .....	16
<b>5.12 Mastitis</b> .....	16
<b>VI.MATERIALES Y METODOS</b> .....	18

<b>6.1 Localización</b> .....	18
<b>6.2 Desarrollo del trabajo de investigación</b> .....	19
<b>6.2.1 Materiales</b> .....	19
<b>6.3 Microencapsulación</b> .....	19
<b>6.4 Tratamientos</b> .....	21
<b>6.5 Esterilización de micro y nanocápsulas con irradiación gamma</b> .....	22
<b>6.6 Esterilización de micro y nanocápsulas con irradiación UV</b> .....	22
<b>6.7 Preparación de medio de cultivo y siembra de micro y nanocápsulas de Sel-Plex®</b> .....	23
<b>6.8 Caracterización de micro y nanocápsulas de Sel-Plex®</b> .....	23
<b>6.8.1 Microscopía electrónica</b> .....	23
<b>6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	24
<b>VII.RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	25
<b>7.1 Esterilidad de micro y nanocápsulas de Sel-Plex®</b> .....	25
<b>7.2 Caracterización de micro y nanocápsulas de Sel-Plex®.</b> .....	28
<b>7.2.1 Morfología</b> .....	28
<b>VIII.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	35
<b>IX.REFERENCIAS</b> .....	36



## LISTADO DE CUADRO

<b>Cuadro 1.</b> Tipos de irradiación UV.....	11
<b>Cuadro 2.</b> Temperatura y tiempo utilizados en el método por calor. ....	12
<b>Cuadro 3.</b> Propiedades químicas del selenio .....	13
<b>Cuadro 4.</b> Formulación de micro y nanocápsulas con diferentes proporciones de Sel-Plex® (0.10, 0.25 y 0.50 mg) .....	20
<b>Cuadro 5.</b> Composición de micro y nanocápsulas generadas después de la formulación .....	21
<b>Cuadro 6.</b> Composición de micro y nanocápsulas generadas para ser esterilizadas y evaluadas en diferentes tiempos .....	22
<b>Cuadro 7.</b> Determinación de UFC/mg para la esterilidad de micro y nanocápsulas de Sel-Plex® a diferentes dosis.....	27

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema sobre el diseño de microcápsulas y microesferas .....	7
<b>Figura 2.</b> Esquema sobre el proceso de emulsión/evaporación .....	8
<b>Figura 3.</b> Técnica de nanoprecipitación para microcápsulas .....	9
<b>Figura 4.</b> Rutas metabólicas del Se .....	15
<b>Figura 5.</b> Localización geográfica, colegio de postgraduados campus montecillos, lugar donde se realizó la presente investigación. ...	18
<b>Figura 6.</b> Fotografía del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) .....	19
<b>Figura 7.</b> Micrografía (electrónica de barrido) de micro y nanocápsulas de Sel-Plex®, esterilizadas con irradiación $\gamma$ , formuladas mediante el método de nanoprecipitación y liofilización. Las fotografías de izquierda a derecha poseen amplitud de: (A) 150 X, (B) 10, 000 X, (C) 5, 000 X y (D) 2,000 X, respectivamente.....	29
<b>Figura 8.</b> Micrografía (electrónica de barrido) de micro y nanocápsulas de Sel-Plex®, esterilizadas con irradiación $\gamma$ , formuladas mediante el método de nanoprecipitación y liofilización. Las fotografías de izquierda a derecha poseen amplitud de: (A) 2, 000 X, (B) 4, 000 X, (C) 2, 000 X y (D) 800 X, respectivamente. ....	30
<b>Figura 9.</b> Micrografía (electrónica de barrido) de micro y nanocápsulas de Sel-Plex®, esterilizadas con irradiación $\gamma$ , formuladas mediante el método de nanoprecipitación Y liofilización. Las fotografías poseen amplitud de: (A) 900 X y (B) 1, 600 X.....	31
<b>Figura 10.</b> Micrografía (electrónico de barrido) de micro y nanocápsulas de Sel-Plex® no esterilizadas, formuladas mediante el método de nanoprecipitación y liofilización. Las fotografías poseen amplitud de: (A) 3, 000 X y (B) 4, 000 X, respectivamente.....	32

**Figura 11.** Micrografía (electrónico de barrido) de micro y nanocápsulas de Sel-Plex® no esterilizadas, formuladas mediante el método de nanoprecipitación después de previa liofilización. Las fotografías poseen amplitud de: (A) 5, 000 X, (B) 7, 000 X y (C) 5, 000 X, respectivamente.....33

**Figura 12.** Micrografía (electrónico de barrido) de micro y nanocápsulas de Sel-Plex® no esterilizadas, formuladas mediante el método de nanoprecipitación después de previa liofilización. Las fotografías poseen amplitud para (A) 8, 000 X, (B) 30, 000 X y (C) 2, 000 X. ....34

## I. INTRODUCCIÓN

En México se cuenta con un total de 2, 506,130 cabezas de ganado lechero (SIAP, 2017), con producción de 12, 008, 239 litros de leche hasta el año 2019, aunque algunos estados como Veracruz, México y Coahuila disminuyeron su producción hasta en 2.6 % (SIAP, 2019). La producción de leche hoy en día tiene como metas satisfacer la cantidad y calidad de leche producida (Heejin *et al.*, 2019), sin embargo, se ven afectadas por diversos factores dentro de los cuales, está la mastitis que es una enfermedad que causa elevadas pérdidas económicas debido a que disminuye su producción (4 al 30%), incrementar los costos por tratamientos médicos y desecho prematuro de animales (Moreira *et al.*, 2018).

Las infecciones intramamarias pueden ser resultado de enfermedades que no se trataron correctamente en el periodo de producción láctea anterior y que se desarrollaron durante el periodo seco (Green *et al.*, 2002). En estudios de campo se han evaluado estas infecciones en el periodo seco y durante la lactancia; sin embargo, no se ha podido determinar su impacto en la mastitis clínica, por lo cual es importante estudiar las infecciones intramamarias durante el periodo seco, para prevenir la mastitis clínica en la siguiente lactancia (Bradley and Green, 2001). Se ha visto que 50-70 % de la mastitis bovina se origina durante el periodo seco, por lo tanto, las estrategias de prevención de mastitis se deben aplicar en este periodo. Actualmente, ha aumentado el interés para desarrollar nuevas estrategias de manejo en vacas secas para la prevención de mastitis, entre estas se encuentran: la administración de Se, infusiones intramamarias (hidrogel de quitosano)(Lanctôt *et al.*, 2017), selladores de pezones externos e internos, entre otros (Hoque *et al.*, 2016).

En estudios realizados en rumiantes se ha encontrado que al administrar diferentes fuentes de Se (orgánicas e inorgánicas) a diferentes vías de administración (oral, intramuscular, subcutánea, etc.) puede mejorar su absorción, además de aumentar la protección del sistema inmune, la capacidad antioxidante y mejorar el rendimiento productivo y reproductivo (Zheng *et al.*,

2019). En el ganado lechero se ha encontrado que al administrarlo durante el periodo seco aumenta la respuesta inmune de los cuartos mamarios lo que podría reducir significativamente las infecciones intramamarias, mientras que la deficiencia de este mineral podría estar relacionada con mayor incidencia de éstas (Hoque *et al.*, 2016).

El Se es un oligoelemento esencial en todas las especies y la deficiencia de este es común. Sin embargo, su administración es limitada debido a la alta toxicidad del mineral (Wang *et al.*, 2019). En un estudio realizado por Valdiviezo, (2016), donde se administró Se orgánico (Sel-Plex®) aplicado a ratones, se encontró que utilizando unidades de 5000 mg kg<sup>-1</sup> PV, no provocó toxicidad, demostrando que se puede utilizar esta fuente de Se sin presentar riesgo. Para ganado lechero se encuentra que la dosis recomendada es de 0.1 a 0.3 mg kg de MS. La aplicación de este mineral, por lo general se ha realizado de manera oral en el alimento, en bloques nutricionales o bolos, por vía intramuscular y subcutánea, pero este mineral está expuesto a diversos factores que impiden el máximo aprovechamiento en el organismo, por lo que se ha recurrido a la utilización de técnicas biotecnológicas que proporcionan ciertas características a cualquier activo para que no sufran cambios (Sanguansri y Augustin, 2006), aunado a lo anterior, la aplicación de activos por vía intramuscular, subcutánea e intravenosa debe pasar por un proceso de esterilización para evitar que algún agente patógeno pueda causar daño al organismo o al mismo material aplicado. En este estudio se elaboraron micro y nanocápsulas de Se orgánico (Sel-Plex®) a diferentes dosis (0.10, 0.25 y 0.50 mg), empleando como agente encapsulante (AE) carboximetilcelulosa de sodio (NaCMC) a concentración de 2%. Se estudiaron dos métodos de esterilización (irradiación  $\gamma$  y UV), para asegurar que el Se llegase estéril al órgano blanco, como manera de comprobación se realizaron medios de cultivos microbiológicos de los encapsulados esterilizados y se caracterizaron para ver su estructura.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Elaborar, esterilizar y caracterizar micro y nanocápsulas de Sel-Plex® para su aplicación vía intramamaria

### **2.2 Objetivos específicos**

Elaborar micro y nanocápsulas de Sel-Plex® con carboximetilcelulosa de sodio al 2 %, mediante el método de nanoprecipitación.

Esterilizar por irradiación  $\gamma$  micro y nanocápsulas de Sel-Plex® a diferentes dosis (0.10, 0.25 y 0.50 mg).

Esterilizar por irradiación UV micro y nanocápsulas de Sel-Plex® a diferentes dosis (0.10, 0.25 y 0.50 mg).

Sembrar en medios de cultivo LB micro y nanocápsulas de Sel-Plex® esterilizadas por irradiación gamma y UV.

Caracterizar micro y nanocápsulas de Sel-Plex® previamente esterilizadas.

### III. JUSTIFICACIÓN

La mastitis es causada por distintos agentes patógenos o por mal manejo de la ordeña. Como consecuencia, el sistema inmune desencadena la afluencia de neutrófilos polimorfonucleares (NPM) y otras células blancas de la sangre para el ataque y eliminación al agente patógeno (AP) (Ndiweni y Finch, 1996). Se sabe que, la actividad de los NPM se ve comprometida en animales con deficiencia de Se, debido a la importancia que tiene el Se en la integridad y actividad de la enzima glutatión peroxidasa (Gpx). La concentración de Se en el tejido está altamente correlacionada con mayor actividad de la enzima glutatión peroxidasa (Chafik *et al.*, 2019). Dada la generalidad de administrar este mineral por vías oral, intramuscular y subcutánea, se han realizado investigaciones para encontrar una vía de administración que permita que este microelemento llegue al órgano blanco y evite la interacción con compuestos orgánicos, que puedan modificar su forma química, afectando la disponibilidad del Se al organismo. Por ello, en este estudio se diseñaron, esterilizaron y caracterizaron microcápsulas y nanocápsula de Sel-Plex® (selenometionina y selenocisteína), para ser administradas vía intramamaria durante la etapa de transición con una liberación de forma controlada y prolongada que permita mayor biodisponibilidad de forma directa de Se en las células mamarias de la vaca, así como mayor eficiencia para mantener a la vaca en óptimas condiciones de salud, y mejorar su potencial de producción.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Las micro y nanocápsulas de Sel-Plex® a diferentes dosis (0.10, 0.25 y 0.50 mg) elaboradas serán estériles después de aplicarles los diferentes métodos de esterilización (irradiación gama y UV) y su caracterización no será modificada.



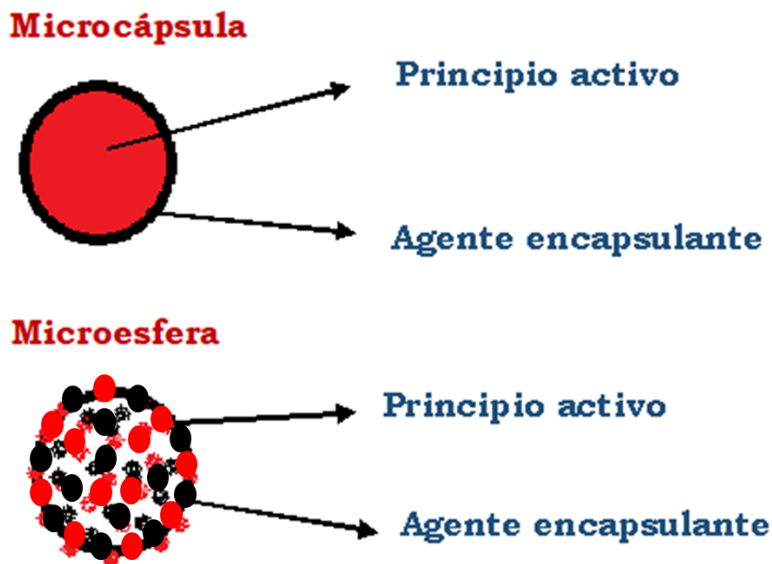
## V. REVISIÓN DE LITERATURA

### 5.1 Nanotecnología

La palabra nanotecnología proviene del latín “nanus” y el griego “nanos”, que significa enano, siendo Richard Phillips Feynman el padre de esta disciplina (Tekade *et al.*, 2017). Esta ciencia se encarga de materiales a nivel de tamaños inferiores a 1000 nm (un nanómetro es la milmillonésima parte de un metro). Sin embargo, la nomenclatura se actualiza constantemente, encontrando que para micropartículas y nanopartículas se tiene un rango de tamaño de 1 a 100 nm (Leon *et al.*, 2020). El equilibrio entre las reducciones de tamaño a nivel funcional, debe entenderse claramente al determinar qué procesos pueden usarse para una reducción de tamaño en particular, se debe tomar en cuenta que se desea uniformidad y distribución de tamaño para mejor control de funcionalidad y calidad del material, ya que algunos propósitos son: absorción de agua mejorada, liberación controlada, biodisponibilidad y tasas de catálisis más rápidas (Sanguansri y Augustin, 2006).

### 5.2 Micro y nanoencapsulación

La micro y nanoencapsulación de diferentes bioactivos (fármacos, proteínas, pre y probióticos o algunas enzimas) se puede definir como un proceso de recubrimiento y protección de dichos activos, ya sean; sólidos o líquidos, combinados con materiales llamados agentes encapsulantes, para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. Siendo el producto una microcápsula, nanocápsula, microesfera o nanoesfera, dependiendo de su morfología, estructura interna y tamaño (Lopretti *et al.*, 2007). Las micro y nanocápsulas tienen su principio activo incluido en una especie de reservorio recubierto por una fina película de material encapsulante. Para las micro y nanoesferas el principio activo se encuentra altamente disperso bajo la forma de diminutas partículas o de moléculas en una matriz de material que puede ser lo mismo del recubrimiento (figura 1). La obtención de micro o nanoesferas dependerá de las propiedades fisicoquímicas del principio activo y del material de recubrimiento, así como de la metodología elegida para su elaboración (Rani *et al.*, 2017).



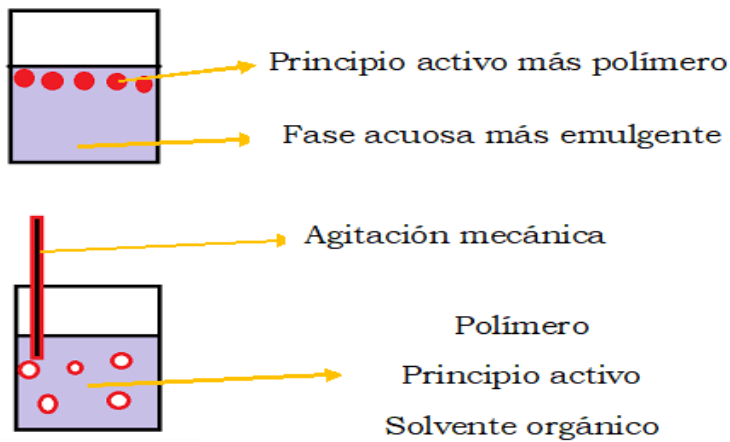
**Figura 1.** Esquema sobre el diseño de microcápsulas y microesferas

### 5.2.1 Técnicas para micro y nanoencapsulación

Se conocen diversas técnicas para la elaboración de micro y nanoencapsulados, siendo las emulsiones de Pickering uno de los métodos más usados (Urrejola *et al.*, 2018). A continuación, se mencionan algunas técnicas utilizadas para micro y nanoencapsular algún activo.

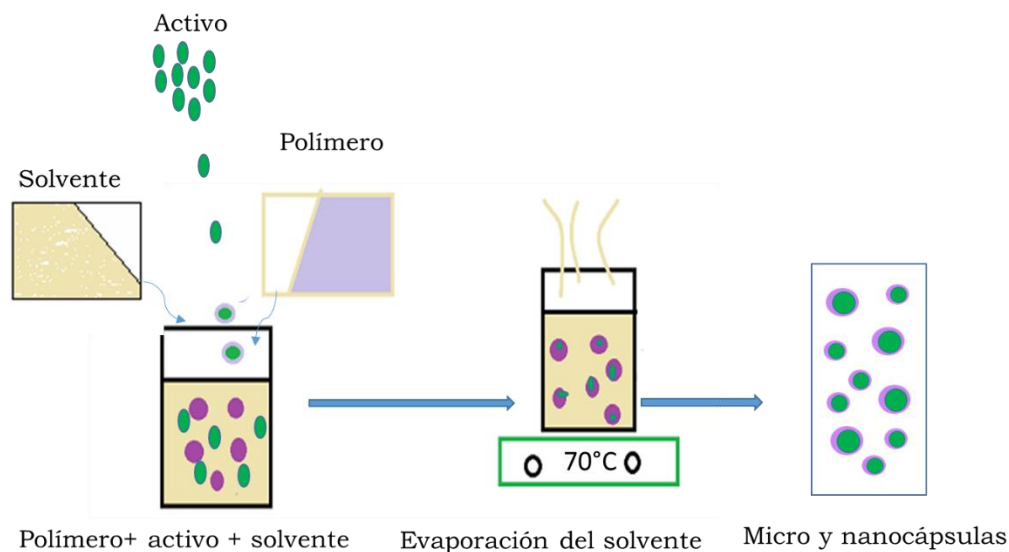
Se dividen en procesos químicos, físicos y fisicoquímicos.

- **Emulsión-Evaporación:** emulsión de dos fases, una fase acuosa con un gel emulsionante y la otra orgánica inmisible en agua, con un principio activo y un agente encapsulante. Se ocupa un ultrasonido o un sistema de agitación con velocidad variable, esto para obtener una emulsión. Posteriormente se realiza la evaporación del solvente orgánico, el agente encapsulante se precipita encapsulando al principio activo, creando nanopartículas para la síntesis de formación de micelas (figura 2) (Lee *et al.*, 2016).



**Figura 2.** Esquema sobre el proceso de emulsión/evaporación

- **Emulsión doble o múltiple:** se permite encapsular moléculas hidrófilas debido a la doble emulsión, donde una molécula hidrófila se une a un surfactante y se disuelven en agua, sin embargo, este procedimiento suele ser tóxico, por lo que puede afectar la estabilidad de algunos componentes (Urrejola *et al.*, 2018).
- **Difusión de emulsificación:** se utiliza un solvente parcialmente soluble como acetona, en el que se disuelven polímeros o compuestos bioactivos, posteriormente, se emulsionan en una fase acuosa que contiene un estabilizador que evita la agregación de las gotas en la emulsión. Por último, se agrega agua a la emulsión para que se disuelva el solvente y se precipiten las nanopartículas (Rani *et al.*, 2017).
- **Nanoprecipitación:** las moléculas bioactivas se disuelven en acetona, y se mezclan con polímeros disueltos en sustancias donde no se pueda disolver el bioactivo, la acetona es evaporada y las nanopartículas permanecen en una suspensión acuosa (figura 3).



**Figura 3.** Técnica de nanoprecipitación para microcápsulas

### 5.3 Agentes encapsulantes

Los agentes encapsulantes pueden afectar a la calidad de las micro y nanocápsulas, ya que estos están relacionados con la estabilidad, biodisponibilidad y la liberación controlada de los compuestos, los agentes encapsulantes pueden ser polímeros naturales y sintéticos, pero cada agente encapsulante da como resultado diferentes propiedades físico químicas y se selecciona alguno dependiendo del bioactivo a encapsular y del producto final deseado (Li et al., 2018).

#### 5.3.1 Carboximetilcelulosa

En los últimos años, los polímeros de carbohidratos naturales se han utilizado en las aplicaciones de la ciencia biomédica y farmacéutica atribuidas a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad. La celulosa se extrae del algodón, paja de arroz y algunas maderas. Los derivados de celulosa son polímeros hidrofílicos, tienen la capacidad de formar gel en medio acuoso y mejorar las propiedades mecánicas, especialmente a nivel de nano (Li et al., 2018). Comercialmente la NaCMC es clasificada en base a su grado de pureza en: técnico (55 -80%), refinado (92 – 96%) y súper refinado (99.5%). 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, teniendo así la capacidad de resistencia a ácidos y bases (Hao-Ying Li *et al.*, 2010).

#### **5.4 Morfología y caracterización de micro y nanocápsulas**

Para comprender las nanopartículas y cómo sus propiedades influyen en sus aplicaciones se han desarrollado diversas técnicas para su análisis, sin embargo, no existe una técnica que pueda expresar con exactitud todo sobre las nanopartículas. Cada método utilizado proporciona una pieza del rompecabezas para aplicarlas; debemos saber cómo y cuándo se utilizan, y que cuidados se deben considerar para la interpretación de los datos, por lo tanto, en todos los casos, se deben usar múltiples técnicas para la comprensión profunda de estas nanopartículas (Campbell *et al.*, 2020).

#### **5.5 Importancia de los diferentes métodos de esterilización**

Antoine-Henri Becquerel (1852-1908) es conocido por su descubrimiento de la radiactividad en 1895, pero poco después descubrieron que la radiación ionizante era letal para los organismos vivos (Nordion, 2010). Los microorganismos como bacterias, hongos y virus contribuyen al deterioro de los alimentos, fármacos u otro activo procesado, causando desde pequeñas infecciones hasta la muerte, por lo que es muy importante la eliminación o control de estos. Sin embargo, los diferentes procesos utilizados para la esterilización o desinfección pueden afectar las propiedades del material (McKeen, 2018).

#### **5.6 Métodos de esterilización**

Entre los procesos para el control de agentes infecciosos en el área médica para esterilización y desinfección se encuentran la irradiación y, rayos ultravioleta de microondas e infrarroja y los procesos térmicos por calor húmedo (autoclave) y calor seco (McKeen, 2018).

### 5.6.1 Irradiación gamma

La radiación gamma, se representa con letra griega ( $\gamma$ ), es uno de los tres tipos de radiactividad natural. Son radiaciones electromagnéticas, tienen suficiente energía para ionizar la materia y pueden dañar o destruir células vivas, por lo que son útiles para la esterilización. La fuente de rayos gamma proviene de un irradiador gamma Cobalt-60. El Cobalto-60 radioactivamente beta se desintegra en níquel-60 y emite dos rayos gamma con energías de 1.17 y 1.33 MeV.6 (Craven, 2020).

### 5.6.2 Irradiación UV

La irradiación UV es un buen método para la esterilización de materiales biomédicos poliméricos (Sionkowska *et al.*, 2006), sin embargo se considera de desinfección y su efecto bactericida ocurre a 240–280 nm y depende del tiempo de exposición del activo. Las radiaciones UV se extienden en un amplio espectro electromagnético subdividido en cuatro clases descritas en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Tipos de irradiación UV

Tipo de irradiación UV	Longitud de onda
UV-A	400 a 315 nm
UV-B	315 a 280 nm
UV-C	280 a 200 nm
vacío UV	200 a 100 nm

La mejor esterilización con UV se obtiene generalmente utilizando UV-B y UV-C, con efecto máximo a 254 nm. Los rayos UV-C consisten en longitudes de onda de alta energía, pero, como tales, no penetran profundamente en la muestra ya que interactúan rápidamente con la materia, lo que limita la esterilización a superficies o materiales transparentes. El efecto bactericida de UV-A es bajo en comparación con UV-B y UV-C, pero un mayor tiempo de exposición puede tener una acción esterilizante. Finalmente, el vacío UV también tiene una acción de esterilización, pero sigue siendo inadecuado porque estas longitudes de onda

muy cortas se disipan demasiado rápido en agua y en distancias muy cortas (Chif *et al.*, 2019).

### 5.6.3 Esterilización por calor húmedo

De los métodos disponibles para la esterilización, el método por calor húmedo es el más utilizado, debido a su bajo costo y no es tóxico (Adler, Scherrer, y Daschner, 1998). El instrumento más utilizado para este tipo de esterilización es el autoclave, el cual elimina a los agentes contaminantes con vapor a alta presión, a temperatura mínima de 121 °C, con tiempo aproximado de 15 a 20 minutos, dependiendo del tamaño y contenido a esterilizar. Se logra la esterilización cuando todas las superficies alcanzan temperaturas de 121 °C (Vetten, Yah, Singh, y Gulumian, 2014). Para asegurar la confiabilidad del método, es necesario controlar; temperatura, tiempo adecuado y la entrada de aire al equipo (Lerouge, 2010).

Este método se puede aplicar a líquidos no acuosos o materiales en polvo seco. No se recomienda para materiales sensibles a la temperatura (Fracalossi *et al.*, 2016). Su acción es destruir o inactivar todos los microorganismos expuestos a vapor, así como hidratar las esporas haciéndolas más sensibles al proceso (Stammen *et al.*, 2012). Las condiciones estándar de esterilización se resumen en el cuadro 2.

**Cuadro 2.** Temperatura y tiempo utilizados en el método por calor.

	Temperatura(°C)	Tiempo (min)	Referencia
Máximo	170	60	Fracalossi <i>et al.</i> , (2016).
	160	120	
	150	150	
Mínimo	120	20	Cornelia <i>et al.</i> , (2012)

## 5.7 Selenio (Se)

El Se es un elemento químico, no metálico, del grupo 16 y periodo 4 de la tabla periódica, que presenta las propiedades químicas descritas en el cuadro 3. Siendo un microelemento esencial tanto en animales como humanos, siendo que en forma de selenocisteína comprende varias enzimas específicas (Vignola *et al.*, 2009), una de ellas es la enzima glutatión peroxidasa (GPx), enzima que cataliza reacciones que son necesarias para la conversión de peróxidos de hidrógeno, protegiendo así las membranas celulares contra el daño oxidativo (Lee *et al.*, 2016). En otros estudios se ha demostrado que el Se regula la inflamación, la respuestas inmunes, la actividad antitumoral y tiroides en animales (Lin, 2014).

**Cuadro 3.** Propiedades químicas del selenio

Configuración electrónica:	[Ar] 3d <sup>10</sup> 4s <sup>2</sup> 4p <sup>4</sup>
Número atómico:	34
Peso atómico:	78,96 u
Densidad (g/ml):	4,79
Punto de ebullición (°C):	685
Punto de fusión (°C):	217
Estados de oxidación:	-2, +2, 0, +4, +6
Isotopos naturales estables:	74Se, 76Se, 77Se, 78Se, 80Se y 82Se

## 5.8 Fuentes de Selenio

Al Se lo podemos encontrar en formas orgánicas e inorgánicas, la mayoría de sus formas químicas orgánicas contienen Se en estado (-2) y en las especies inorgánicas (selenatos y selenitos) encontramos estados de oxidación más altos (Molina, 2019). El selenito de sodio es una fuente inorgánica y comercial utilizada como suplemento en alimentos para animales; sin embargo, esta fuente es tóxica. Otra fuente de Se es la orgánica derivada de las levaduras, que contiene alta concentración de Se-metionina, ahora se ha vuelto comercialmente accesible después de su aprobación como aditivo para alimentos en los EUA y en la EEC



(2006). Esta fuente alternativa de Se ha impulsado nuevas investigaciones para determinar qué forma de suplemento de Se sería eficaz para la nutrición de animales (Vignola *et al.*, 2009).

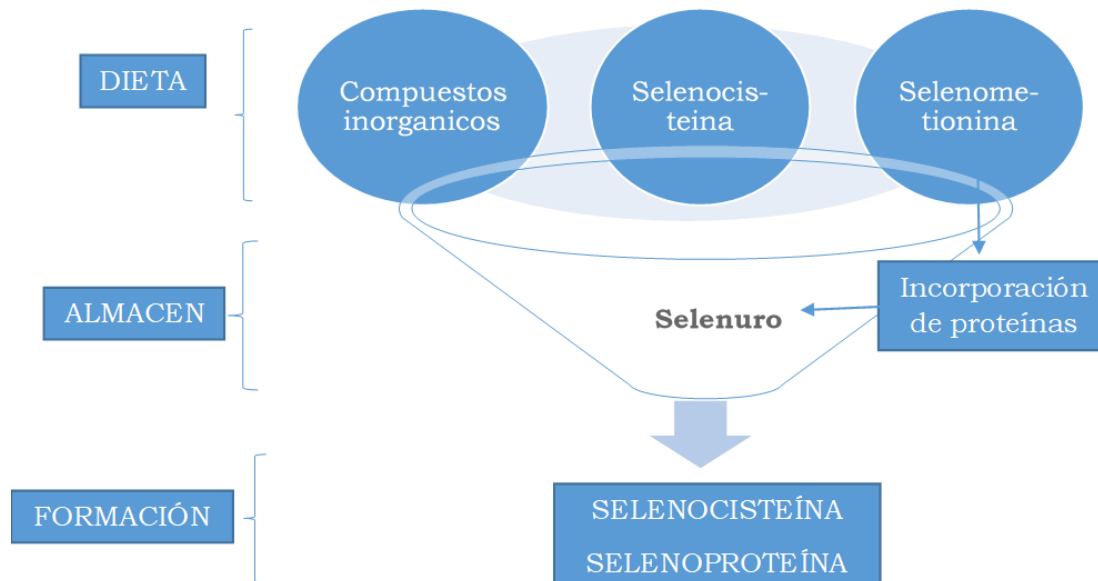
### **5.8.1 Sel-Plex ®**

La fuente orgánica de Se (Sel-Plex ®) en forma de levadura enriquecida elaborada por Alltech, disponible en concentraciones de 1,000 y 2,000 ppm de Se. Ha sido empleado ampliamente en varias investigaciones que señalan su importancia como reemplazo del selenito de sodio, ya que ha demostrado que, es equivalente o incluso superior en términos de absorción intestinal, rendimiento e inducción de plumas en aves (Edens, 2015). Un estudio con ratones tratados con Sel-Plex mostraron aumento modesto pero significativo en la actividad de GSH-Px en comparación con los ratones con una dieta normal ( $P < 0,5$ ), por lo que, estos datos sugieren que el Se orgánico puede minimizar la oxidación del ADN y el ARN (Lovell, Xiong, Lyubartseva y Markesbery, 2009).

## **5.9 Metabolismo de Se**

El Se puede formar enlaces covalentes con el carbono y se encuentra en variedad de compuestos como: selenoaminoácidos, selenocisteína (SeCys), selenometionina (SeMet) y selenoproteínas (White, 2018). Este mineral ejerce sus funciones biológicas a través de selenoproteínas estas como son: la defensa contra el estrés oxidativo, mantenimiento del estado redox celular, señalización redox y participación en el metabolismo de la hormona tiroidea (Ećimović *et al.*, 2018). En la figura 4 se muestra como el Se se absorbe en el tracto gastrointestinal, y tras su absorción, se distribuye a través del plasma unido principalmente a la selenoproteína P (proteína sintetizada en el hígado y liberada a la circulación), a la selenoproteína W (proteína muscular). Los tejidos en los cuales el Se se distribuye son principalmente en el hígado, riñones, páncreas y músculos. La selenometionina es almacenada en el organismo incorporándose a las proteínas de forma aleatoria, ocupando el lugar de la metionina; cuando es catalizada, libera Se en forma de selenuros. En cambio, la selenocisteína no se almacena sino que es catalizada directamente y el Se obtenido da lugar a otra

reserva de Se. Los compuestos inorgánicos (selenito y selenato) son almacenados directamente en forma de selenuros, precursor de la selenocisteína, que formará parte de las selenoproteínas. El Se se excreta en la orina, heces y por otras vías, que incluyen la exhalación en la respiración y la pérdida a través del cabello y las células de la piel (Casals *et al.*, 2005).



**Figura 4.** Rutas metabólicas del Se

En animales, el Se puede acumularse en altas concentraciones en diferentes órganos. En aves, se ha demostrado que se acumula en pituitaria, pineal, suprarrenales, riñones, páncreas, cerebro, ovario y testículos. En mamíferos puede acumularse en los órganos reproductivos con niveles más altos en los testículos en comparación con otros tejidos (Edens, 2015).

### 5.10 Toxicidad del Se

Los oligoelementos, esenciales o no esenciales, también pueden volverse tóxicos para los organismos vivos en altas concentraciones (Papadomichelakis *et al.*, 2018). El Se es un mineral requerido en muchas funciones biológicas, no obstante, su utilización tiene considerado margen de tolerancia, debido a que es tóxico en cantidades elevadas (Lee *et al.*, 2016). Los síntomas por intoxicación

dependen si se trata de una toxicidad aguda o crónica. En la toxicidad aguda los signos característicos son: náuseas, vómitos, diarrea, aliento a ajo, pérdida de pelo y fatiga. Para la toxicidad crónica (selenosis) los signos característicos son: fragilidad y pérdida de cabello, uñas con manchas blancas, trastornos gastrointestinales, pérdida de dientes y daño neurológico. Si la intoxicación es debida a la inhalación de Se, los síntomas son: mareos e irritación de mucosas, acumulación de líquido en los pulmones, bronquitis, neumonía, fiebre, dolor de garganta, conjuntivitis, vómitos, dolores abdominales, diarrea y expansión del hígado (Hernández y Rios, 2009).

En los últimos años, varios informes destacaron la utilidad de la suplementación con dosis altas de Se en animales ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$  de PV) como máximo en la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) en EUA y China (Zhang *et al.*, 2020).

### **5.11 Suplementación mineral en ganado bovino**

Los minerales traza se incluyen en niveles bajos en la dieta, pero son esenciales para el rendimiento y la salud, incluida la integridad de los tejidos, la fertilidad, la producción de leche y la función inmune (Bach *et al.*, 2015). Uno de estos minerales es el Se, al suministrarse como suplemento se demostró que era esencial en varias funciones del organismo, como: reducir el estrés oxidativo y tener un gran efecto en el sistema inmune bovino, sin embargo, una deficiencia puede dar como resultado bajos rendimientos tanto productivos como reproductivos (Bicalho *et al.*, 2014). La administración de Se recomendada por el NRC (2011) es de  $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$  de MS y en estudios realizados se ha administrado de  $0.5$  hasta  $0.7 \text{ mg}^{-1}$  en la dieta.

### **5.12 Mastitis**

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria, causada por varios microorganismos patógenos y de acuerdo con a la fase en la que se presenta se clasifica en: clínica, subclínica y crónica. La mastitis clínica se caracteriza por un proceso inflamatorio que conlleva a incremento en el recuento de las células

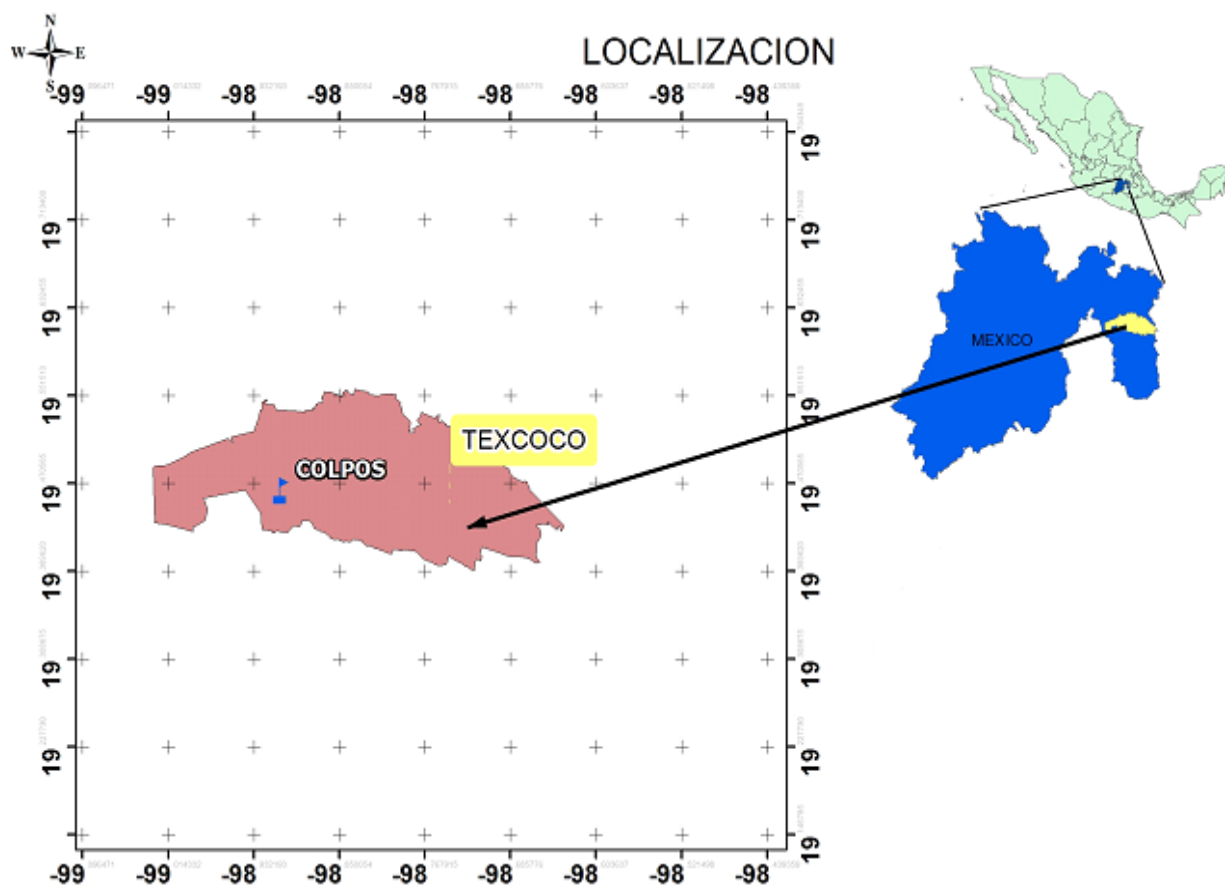
somáticas (RCS) presentes en leche, además de grumos en la misma, acuosa, con sangre, o amarillenta, en casos extremos, se puede presentar septicemia o endotoxemia (Bradley, 2002). La mastitis subclínica, no presenta signos clínicos en la glándula mamaria, pero sí reducción en la producción de leche, que afectan negativamente su calidad. Su diagnóstico es mediante pruebas especiales (Whiteside, California, etc.) que cuantifican la respuesta celular inflamatoria representado por el RCS (Shearer *et al.*, 2003). En la mastitis crónica, puede haber el reemplazo de tejido secretor sano por tejido fibrótico, dañando la capacidad de sintetizar leche (Gonçalves *et al.*, 2020). Los efectos de una mastitis crónica, por tipo de patógeno, sobre la leche y los componentes de la leche aún no se han estudiado a fondo (Mushtaq *et al.*, 2018). El riesgo de desarrollo de la mastitis es mayor durante el período de parto (Alva *et al.*, 2014), en el cual la vaca experimenta una serie de cambios tanto hormonales como metabólicos.

Los mecanismos de defensa de la glándula mamaria se clasifican en: no inmunológico e inmunológico. En el primero se tienen las defensas anatómicas y solubles (son elementos contenidos en la leche con acción sobre las bacterias), se consideran la primera línea de defensa de la glándula mamaria, es decir, la forma cónica del pezón y el músculo elástico del que está constituido ofrece poca superficie de exposición a los microorganismos y limita la entrada de las bacterias respectivamente y en el segundo la respuesta humoral y celular; que está constituida principalmente por anticuerpos o inmunoglobulinas secretadas por células plasmáticas y producidas por los linfocitos B. Existen cuatro clases de Ig en bovinos: IgG, IgM, IgA y IgE, la primera se divide en tres subclases: IgG1, IgG2a e IgG2b producidas por los tejidos locales de la glándula (Shearer *et al.*, 2003).

## VI. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 Localización

La elaboración y formulación de micro y nanocápsulas se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal y el laboratorio de Fitoquímica del Colegio de Postgraduados (Figura 5), Campus Montecillo ubicado en el Km 36.5, carretera Federal México-Texcoco, Montecillo, Estado de México; la cual, se localiza geográficamente a 19°29 N y 98°53 O, altitud de 2250 msnm, con precipitación anual de 644.8 mm y temperatura media anual de 15.2 °C (García, 1981).



**Figura 5.** Localización geográfica, colegio de postgraduados campus montecillos, lugar donde se realizó la presente investigación.

La esterilización por irradiación gamma a las micro y nanocápsulas de Sel-Plex®, se realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) (Figura 6) ubicado en el km. 36.5 de la Carretera México-Toluca s/n, La Marquesa, municipio de Ocoyoacac, México.



**Figura 6.** Fotografía del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ)

## **6.2 Desarrollo del trabajo de investigación**

### **6.2.1 Materiales**

Se utilizó levadura enriquecida con Se (Sel-Plex®) como fuente orgánica. Como agente encapsulante (AE): carboximetilcelulosa (NaCMC) (Merck, EUA, NaCMC) al 2%. Tubos de ensaye (polipropileno) de 16x100 mm con capacidad de 15 mL, papel parafilm, agua bidestilada, acetona, micro pipetas graduadas de 1 mL, cajas Petri, medio de cultivo LB, campana de flujo laminar con luz ultravioleta, autoclave, incubadora y mecheros.

### **6.3 Microencapsulación**

Para la micro y nanoencapsulación de Sel-Plex® a diferentes dosis (0.10 mg, 0.25 mg y 0.50 mg kg<sup>-1</sup>) se empleó el método de nanoprecipitación (Urrejola *et al.*, 2018). En este proceso primero se realizó la formulación para corregir el peso por el grado de pureza del AE, por lo que se tiene que revisar el porcentaje de pureza al que fue hecho el producto. Para este trabajo se usó NaCMC al 98%, por lo tanto, se preparó una solución con el AE NaCMC al 2%, para ello se ocupó un matraz Erlenmeyer de 1 L donde se mezclaron 979.6 mL de agua bidestilada y 20.4 gr de NaCMC y se cubrió el matraz con papel parafilm, posteriormente se

llevó a una plancha con agitador magnético durante 36 h con agitación constante hasta lograr homogenizar el producto. Como segundo paso se realizó la solución/emulsión del activo, se pesó el activo en este caso Sel-Plex®, pero al igual se corrigió el peso por el grado de pureza por lo que se consideró la concentración partes por millón (ppm) del Se. El Sel-Plex® utilizado contenía 2000 ppm de Se, por lo tanto, se formuló de la siguiente manera (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Formulación de micro y nanocápsulas con diferentes proporciones de Sel-Plex® (0.10, 0.25 y 0.50 mg)

<b>Activo</b>	<b>Dosis (mg)</b>	<b>Peso corregido (g) para cada dosis</b>
	0.10	0.05
Sel-Plex®	0.25	0.125
	0.50	0.25

Una vez que se obtuvo el peso correcto de cada una de las dosis quedando las formulaciones descritas en el Cuadro 5, se colocó el Sel-Plex® en vasos de precipitado de 40 mL y se agregaron 10 mL de acetona grado HPLC, se cubrió con suficiente papel parafilm y se llevaron a un baño ultrasónico durante 30 min. Transcurrido el tiempo de sonicación se sacaron los vasos de precipitado y se agregó a cada uno 10 mL del polímero NaCMC al 2% previamente preparado, posteriormente se colocó dentro de cada vaso un agitador magnético pequeño y se llevaron a una placa de calentamiento a temperatura de 70°C y agitación constante, durante 30 minutos. Todo esto para la evaporación del solvente orgánico (acetona).

Terminado el proceso cada muestra se vació en tubos de ensaye de polipropileno de 15 mL tapando cada tubo con suficiente papel parafilm, después

se introdujeron dentro de un matraz Erlenmeyer con tapón y se guardaron en una ultracongeladora a temperatura de -80 °C por 24 horas. Cabe mencionar que en 3 horas se alcanza la temperatura deseada.

Por último, si se desea almacenar por un largo periodo estas muestras, deben ser liofilizadas, para ello el matraz se colocó en una liofilizadora con las siguientes condiciones: Mbar 0.042 y a -49 °C. Se aseguró que la muestra tuviera peso constante, esto se obtuvo a los 3 días de liofilización, para finalizar las muestras fueron retiradas y almacenadas a temperatura ambiente.

**Cuadro 5.** Composición de micro y nanocápsulas generadas después de la formulación

<b>Formulación</b>	<b>Activo</b>	<b>Dosis (mg)</b>	<b>AE al 2%</b>
1	Sel-Plex®	0.10	NaCMC
2	Sel-Plex®	0.25	NaCMC
3	Sel-Plex®	0.50	NaCMC

#### **6.4 Tratamientos**

Las unidades experimentales (placas con medio de cultivo, LB) se distribuyeron completamente al azar en 9 tratamientos con 10 repeticiones cada una como lo muestra el cuadro 6.



**Cuadro 6.** Composición de micro y nanocápsulas generadas para ser esterilizadas y evaluadas en diferentes tiempos

<b>Tratamiento</b>	<b>N</b>	<b>Polímero 2 %</b>	<b>Activo</b>	<b>Dosis (mg)</b>	<b>Esterilización</b>	<b>Tiempos de muestreo (h)</b>		
1	10	CMC	Sel-Plex®	0.10	γ	24	72	144
2	10	CMC	Sel-Plex®	0.25	γ	24	72	144
3	10	CMC	Sel-Plex®	0.50	γ	24	72	144
4	10	CMC	Sel-Plex®	0.10	UV	24	72	144
5	10	CMC	Sel-Plex®	0.25	UV	24	72	144
6	10	CMC	Sel-Plex®	0.50	UV	24	72	144
7	10	CMC	Sel-Plex®	0.10	Testigo	24	72	144
8	10	CMC	Sel-Plex®	0.25	Testigo	24	72	144
9	10	CMC	Sel-Plex®	0.50	Testigo	24	72	144

### **6.5 Esterilización de micro y nanocápsulas con irradiación gamma**

Las micro y nanocápsulas obtenidas se colocaron en una cámara de irradiación gama de cobalto-60 con intervalo en la dosis mínima 11.91 y máxima 13.54 kGy durante 60 min, posteriormente se colocaron en bolsas “ziploc” a temperatura ambiente hasta su utilización.

### **6.6 Esterilización de micro y nanocápsulas con irradiación UV**

Para la esterilización de micro y nanocápsulas obtenidas se aplicó irradiación con luz UV, donde, cada tratamiento se colocó en una campana de flujo laminar y rayos UV con intervalo de onda de 257.7 nm durante 60 min, posteriormente se colocaron en bolsas “ziploc” a temperatura ambiente hasta su utilización.

## **6.7 Preparación de medio de cultivo y siembra de micro y nanocápsulas de Sel-Plex®**

Se utilizó medio general, Luria-Bertani (LB) ya que no se busca algún microorganismo en específico, también se ocupó asas bacteriológicas, guantes estériles, cubre bocas, mechero de Bunsen, cajas Petri, vaso de precipitado de 1 L, autoclave y campana de flujo laminar.

Se esterilizó todo el material en autoclave, se llevó todo a la campana de flujo laminar, se colocó un mechero y se vertió el medio de cultivo en las cajas Petri, posteriormente, se sellaron y permanecieron hasta la solidificación del mismo, es muy importante que después del solidificado se le dé vuelta para evitar que las burbujas de vapor de agua condensadas no lo humedezcan.

Una vez obtenido el medio se prosiguió a siembra de las micro y nanocápsulas ya esterilizadas por ambos métodos. Se realizó con cada tratamiento con 10 repeticiones cada uno. Posteriormente, se llevaron a una incubadora a temperatura de 34 °C. Para verificar el crecimiento de microorganismos se dejaron en la incubadora por 24, 72 y 144 horas y se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC).

## **6.8 Caracterización de micro y nanocápsulas de Sel-Plex®**

### **6.8.1 Microscopía electrónica**

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

## 6.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El experimento se desarrolló bajo el diseño completamente al azar con arreglo de medidas repetidas en el tiempo.

El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \delta_{j(i)} + P_k + (\tau P)_{ik} + E_{ijk}$$

Donde:

- $Y_{ij}$  = variable respuesta en observaciones k, repeticiones j, tratamiento i.
- $\mu$  = media general
- $\tau_i$  = efecto del i-esimo tratamiento
- $\delta_{j(i)}$  = error aleatorio asociado con el j-esima placa dentro del i-esimo tratamiento
- $P_k$  = efecto del k-esimo tiempo
- $(\tau P)_{ik}$  = interacción tratamiento x tiempo
- $E_{ijkl}$  = error aleatorio asociado con k-esima medida repetida dentro de j-esima placa.

Los datos se analizaron mediante el modelo lineal mixto (MIXED) y la comparación de medias se hizo mediante la prueba de Tukey utilizando el paquete estadístico SAS ver. 9 (2002).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Esterilidad de micro y nanocápsulas de Sel-Plex®

El Cuadro 7 muestra diferencias ( $p < 0.05$ ) en los valores de UFC en las micro y nanocápsulas de Sel-plex® a diferentes dosis (0.10, 0.25 y 0.50 mg), donde los tratamientos T1, T2, y T3 no mostraron presencia de UFC, en comparación con los tratamientos T4, T5 y T6, con medias 1.09, 1.07 y 1.01 y los tratamientos testigo T7, T8 y T9 con medias de 1.80, 1.93 y 1.92, que mostraron presencia de UFC, aumentando su crecimiento en relación al tiempo. Es importante señalar que para los tratamientos T4, T5 y T6 presentaron UFC, siendo diferentes a los tratamientos testigo T7, T8 y T9, en donde hubo mayor presencia de éstas.

Las micro y nanocápsulas tratadas con irradiación gamma mostraron ser estériles, sin que se observaran diferencias ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos y tiempos, ya que no se presentaron UFC. Estos resultados son similares a los reportados por Puthli y Vavia (2008) donde se utilizó Levonorgestrel (LNG) y con todas las dosis irradiación gamma probadas se observó que no hubo crecimiento microbiano.

Los tratamientos T4, T5 y T6 esterilizados con rayos UV, presentaron UFC bajas. Sin embargo, la cantidad aumentó al transcurrir el tiempo desde las 24 horas hasta las 144 horas. En cuanto a los tratamientos testigo T7, T8 y T9, que fueron los no esterilizados, presentaron alta contaminación, mostrando gran cantidad de UFC desde el tiempo 1 hasta el tiempo 3. En el trabajo realizado por Tan *et al.* (2020), se reportó que la exposición de micro y nanocápsulas de polen a rayos UV con duración de tratamiento de 0, 1, 5, 15 y 30 min, no produjo

cambios en la morfología general, ni cambios claros en la morfología de la superficie a nano escala, sin embargo, no garantizaron la esterilidad de las cápsulas.

Preem *et al.* (2019) reportaron que los tratamientos de microcápsulas de cloranfenicol que no recibieron algún método de esterilización presentaron contaminación, dando como resultado crecimiento microbiano. Los resultados observados en microcápsulas del fármaco cloranfenicol con polímero policaprolactona esterilizadas con el método de irradiación gamma y rayos UV a diferentes tiempos de exposición, para los tratamientos con esterilización gamma no se observó crecimiento bacteriano en ningún tiempo garantizando la esterilidad de las microcápsulas. Sin embargo, las que fueron esterilizadas con rayos UV a tiempos de 15, 30 y 60 min, solo mostraron esterilidad aquellas que tuvieron mayor tiempo de exposición a la luz UV; en tanto que las demás presentaron crecimiento bacteriano, esto es similar a lo encontrado en este trabajo. En cuanto a la morfología se tomaron micrografías antes y después de ser esterilizadas las microcápsulas de este fármaco y se observó que no hubo ningún cambio en los métodos de esterilización aplicada.

Los diferentes métodos de esterilización pueden generar cambios fisicoquímicos en el producto esterilizado. Los cambios en la química de la superficie inducidos por rayos UV, son impulsados predominantemente por aumentos en el contenido total de oxígeno, con mayores proporciones de unión de cetona ( $R^2C=O$ ) y unión de carbono-oxígeno (COR) (Tan *et al.*, 2020). Todo esto puede afectar desde la composición hasta la liberación del activo (Yang *et*

al., 2010). Por lo que es importante seguir estudiando los efectos de los medios de esterilización.

**Cuadro 7.** Determinación de UFC/mg para la esterilidad de micro y nanocápsulas de Sel-Plex® a diferentes dosis.

Tratamiento	Tiempos			
	24h	72h	144h	<b>X</b>
T1	0 <sup>1</sup>	0 <sup>1</sup>	0 <sup>1</sup>	0 <sup>a</sup>
T2	0 <sup>1</sup>	0 <sup>1</sup>	0 <sup>1</sup>	0 <sup>a</sup>
T3	0 <sup>1</sup>	0 <sup>1</sup>	0 <sup>1</sup>	0 <sup>a</sup>
T4	0.85 <sup>2</sup>	1.24 <sup>3</sup>	1.18 <sup>4</sup>	1.09 <sup>b</sup>
T5	0.81 <sup>2</sup>	1.18 <sup>34</sup>	1.21 <sup>34</sup>	1.07 <sup>bc</sup>
T6	0.85 <sup>2</sup>	1.1 <sup>5</sup>	1.1 <sup>5</sup>	1.01 <sup>c</sup>
T7	1.24 <sup>4</sup>	2.04 <sup>3</sup>	2.14 <sup>67</sup>	1.80 <sup>d</sup>
T8	1.54 <sup>8</sup>	2.12 <sup>69</sup>	2.14 <sup>6910</sup>	1.93 <sup>e</sup>
T9	1.45 <sup>8</sup>	2.1 <sup>379</sup>	2.27 <sup>10</sup>	1.92 <sup>e</sup>
<b>X</b>	0.75 <sup>x</sup>	1.08 <sup>y</sup>	1.11 <sup>z</sup>	

x, y, z: Diferencias entre columnas.

a, b, c, d, e: Diferencias entre hileras.

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10: Diferencias entre tratamientos.

T1, T2 y T3 son tratamientos esterilizados con irradiación y

T4, T5 y T6 son tratamientos esterilizados con rayos UV

T7, T8 y T9 son tratamientos sin esterilización

## **7.2 Caracterización de micro y nanocápsulas de Sel-Plex®.**

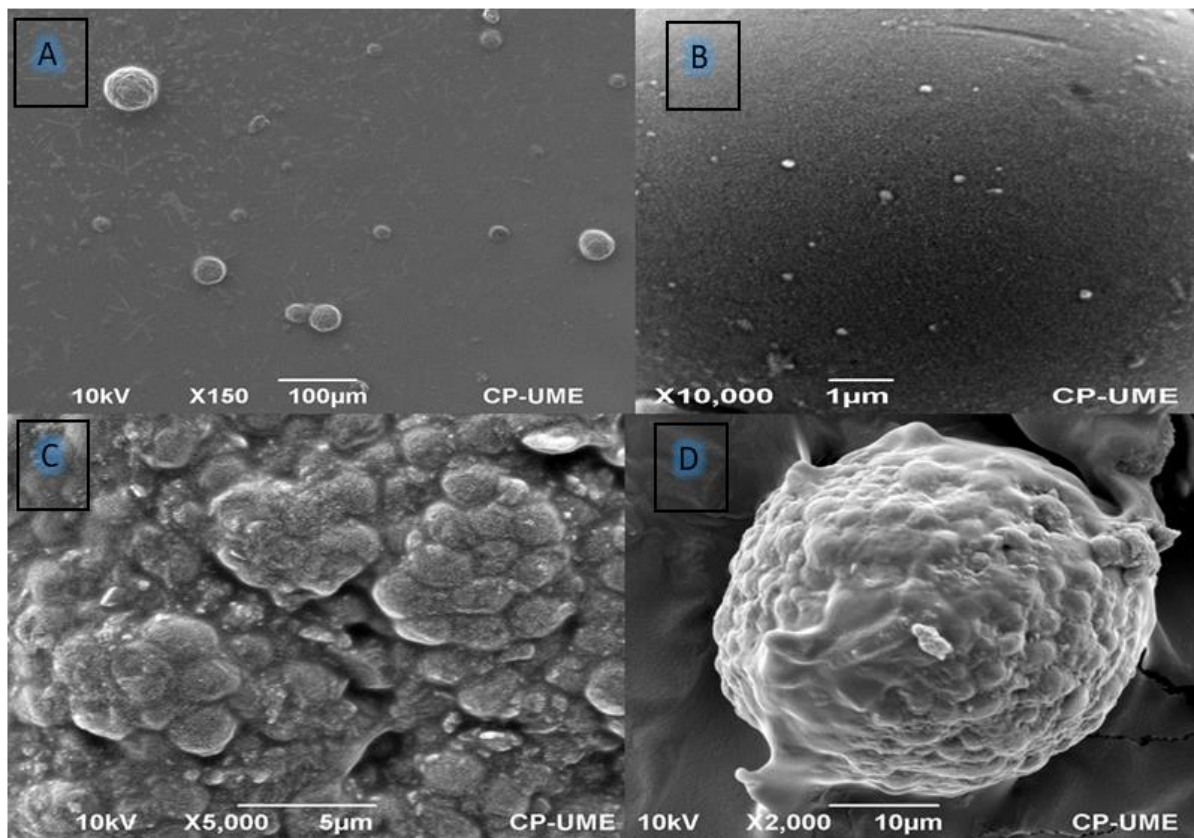
### **7.2.1 Morfología**

Las fotomicrografías de las micro y nanocápsulas de Sel-Plex® a diferentes dosis (0.10, 0.25 y 0.50 mg) esterilizadas con irradiación  $\gamma$ , correspondientes a los tratamientos T1, T2 y T3, se obtuvieron por (MEB) (Figuras 7, 8 y 9). Las micro y nanocápsulas mostraron formas ovaladas e irregulares (amorfas). En la figura 7 C y D, se aprecia que la capa exterior de las cápsulas presentó erupciones. En menor cantidad se observan para todos los tratamientos, micro y nanocápsulas con una parte de la pared exterior lisa y otra con erupciones (Figura 8 C), contrario a lo reportado por Puthli y Vavia (2008), donde observaron microcápsulas esféricas y lisas (sin grietas y poros) después de ser esterilizadas por irradiación  $\gamma$ . Cabe mencionar, que estas fueron microcápsulas de levogestrona con caseína como polímero. La morfología resultante de las micro y nanocápsulas se atribuye principalmente a las condiciones del proceso de encapsulación (parámetros de secado). La formación de superficies dentadas durante el secado, se ha atribuido al encogimiento de las partículas durante este proceso (Alamilla *et al.* 2005). Zhong *et al.* (2020) reportan que la tasa de liberación se vio significativamente afectada por la relación capa/núcleo, en microcápsulas de nitrapirina con resina debido a que se observó en la capa exterior rugosidad y microporos.

En los tratamientos T1, T2 y T3, se pudo observar aglomeración entre las partículas como lo muestra la Figura 8 D; sin embargo, se observa que las microcápsulas pueden extruirse entre sí y tener deformación sin romperse

debido a la buena elasticidad de la cubierta de la cápsula (Figura 9), equivalente a lo que observado por Weigang *et al.* (2009), donde las microcápsulas se extruían entre sí y la apariencia cambiaba de esfericidad a pentágono o hexágono debido a la elasticidad de la pared de la microcápsula.

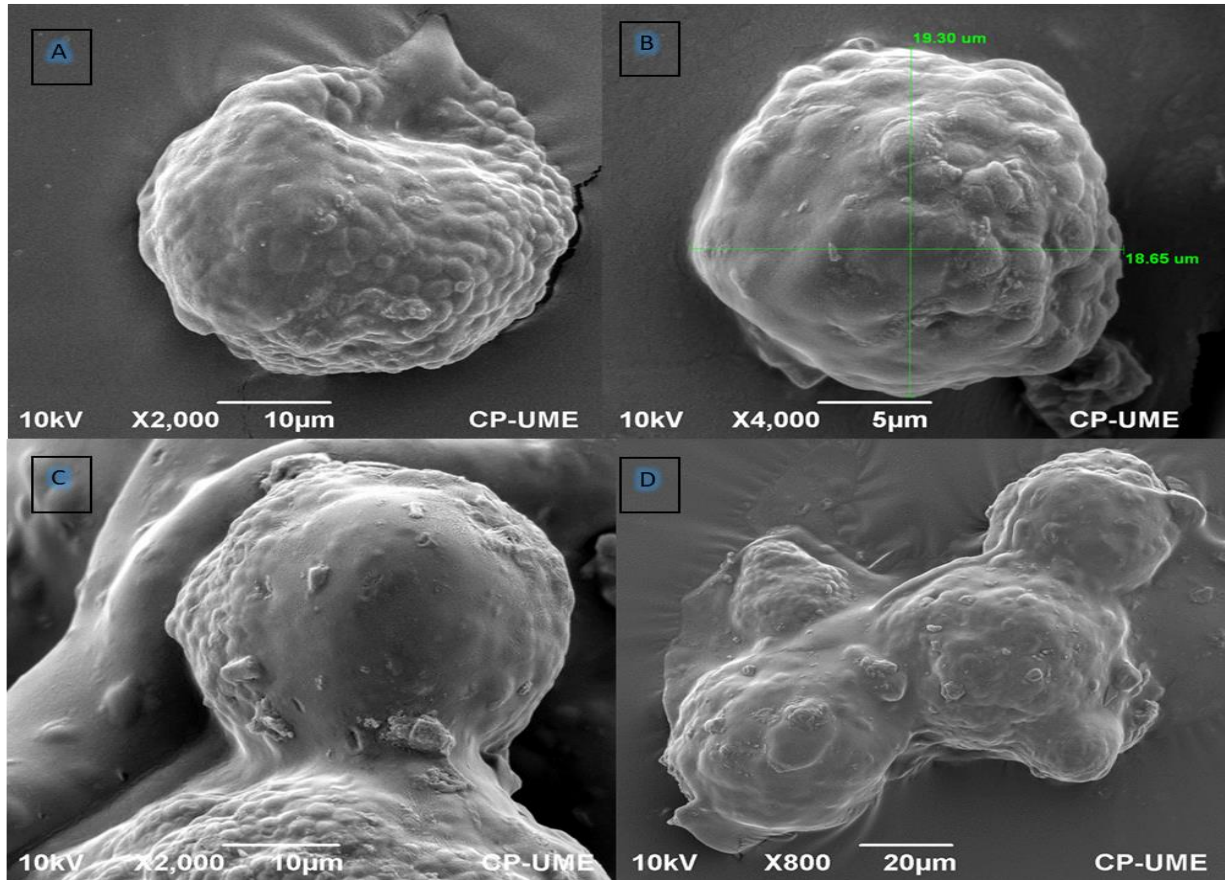
**Tratamiento 1.** (0.10 mg/Sel-Plex®/CMC 2%/esterilización  $\gamma$ )



**Figura 7.** Micrografía (electrónica de barrido) de micro y nanocápsulas de Sel-Plex®, esterilizadas con irradiación  $\gamma$ , formuladas mediante el método de nanoprecipitación y liofilización. Las fotografías de izquierda a derecha poseen amplitud de: (A) 150 X, (B) 10, 000 X, (C) 5, 000 X y (D) 2,000 X, respectivamente.

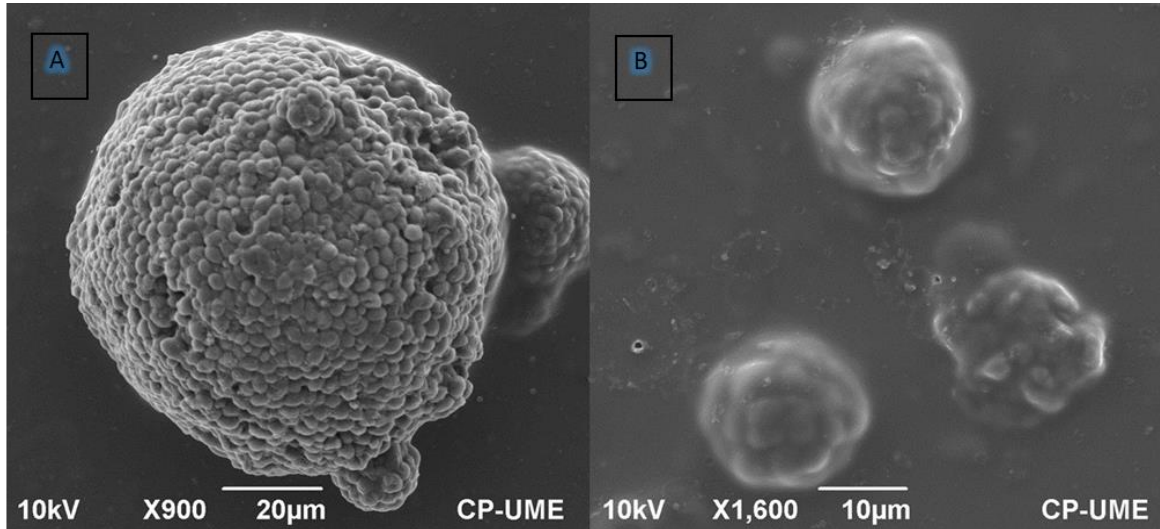


**Tratamiento 2.** (0.25 mg/Sel-Plex®/CMC 2%/esterilización  $\gamma$ )



**Figura 8.** Micrografía (electrónica de barrido) de micro y nanocápsulas de Sel-Plex®, esterilizadas con irradiación  $\gamma$ , formuladas mediante el método de nanoprecipitación y liofilización. Las fotografías de izquierda a derecha poseen amplitud de: (A) 2, 000 X, (B) 4, 000 X, (C) 2, 000 X y (D) 800 X, respectivamente.

**Tratamiento 3.** (0.50 mg/Sel-Plex®/CMC 2%/esterilización  $\gamma$ )



**Figura 9.** Micrografía (electrónica de barrido) de micro y nanocápsulas de Sel-Plex®, esterilizadas con irradiación  $\gamma$ , formuladas mediante el método de nanoprecipitación y liofilización. Las fotografías poseen amplitud de: (A) 900 X y (B) 1, 600 X.

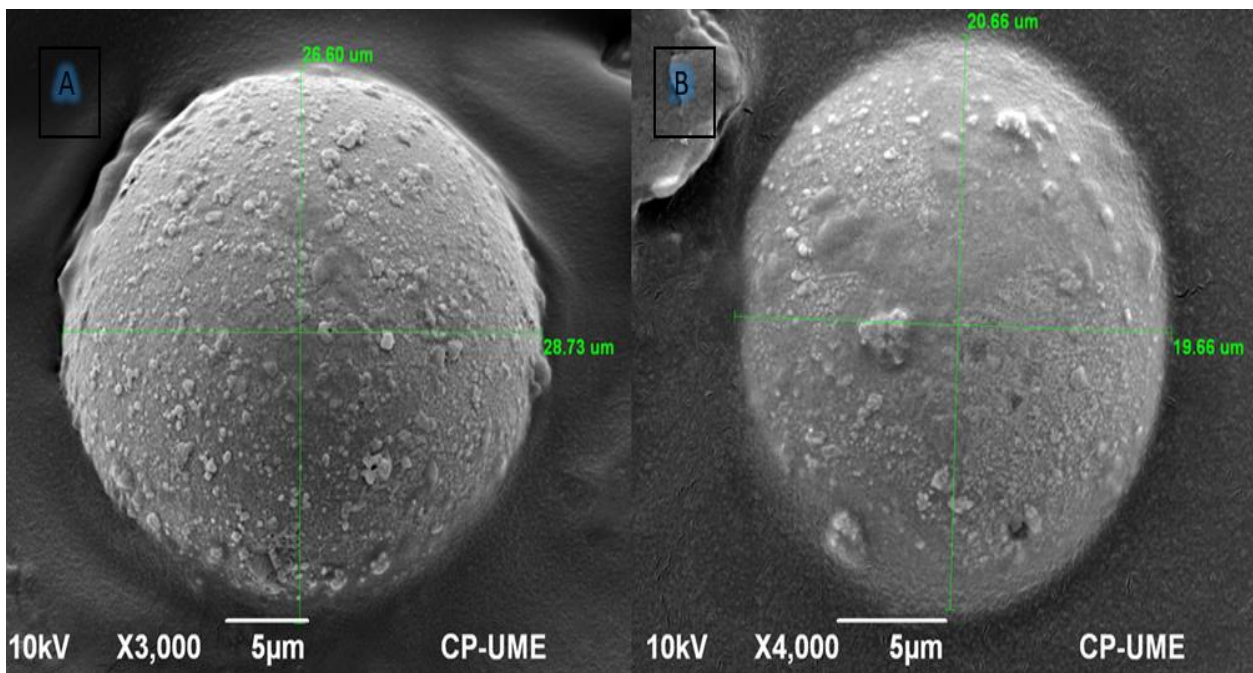
Los tratamientos T7, T8 y T9 no recibieron ningún método de esterilización. Se pudo observar que las microcápsulas presentaron formas circulares y esféricas, característico en micropartículas producidas mediante el proceso de nanoprecipitación, con paredes rugosas y con grietas como se observa en las Figuras 10, 11 y 12C; sin embargo, no son transparentes y lisas como lo reportado por Dai *et al.* (2017), donde se observaron microcápsulas de fertilizantes elaboradas con NaCMC, donde las microcápsulas presentaron transparencia y la pared exterior era totalmente lisa (sin grietas ni agujeros), uniformes y flexibles.

Gaserod *et al.* (1998) encontraron que las cápsulas de alginato de calcio tienen una superficie rugosa. En otro estudio reciente realizado por Zaeim *et al.* (2020), también se encontraron microcápsulas rugosas, elaboradas con alginato de sodio, que es un polisacárido. Es posible atribuir que la rugosidad de las paredes es característico de agentes encapsulantes como los polisacáridos incluyendo el

NaCMC, que muestra ese mismo comportamiento en las micro y nanocápsulas en este trabajo.

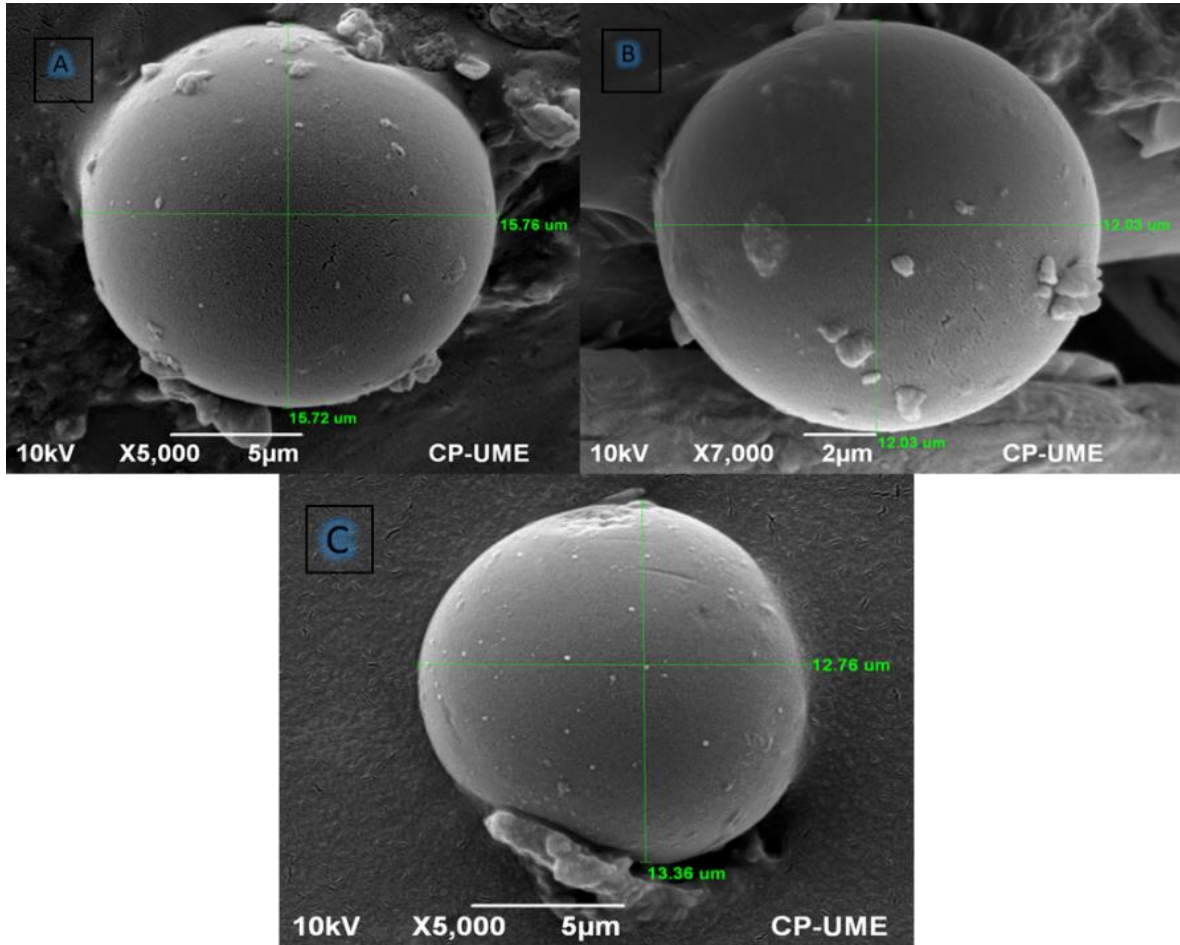
Algunas nanocápsulas presentaron formas circulares, pero entre más pequeñas, la forma cambiaba a ovalada o amorfas como lo muestra la Figura 12B, con aglomeraciones entre ellas como se observa en la figura 12A. Romero *et al.* (2010), reportaron una morfología muy parecida de forma esférica y ovaladas con una tendencia a la aglomeración con superficies lisas. En algunos casos las micro y el nanocápsulas muestran partículas colapsadas o encogidas.

**Tratamiento 7.** (0.10 mg/Sel-Plex®/NaCMC 2%/sin esterilización)



**Figura 10.** Micrografía (electrónica de barrido) de micro y nanocápsulas de Sel-Plex® no esterilizadas, formuladas mediante el método de nanoprecipitación y liofilización. Las fotografías poseen amplitud de: (A) 3, 000 X y (B) 4, 000 X, respectivamente.

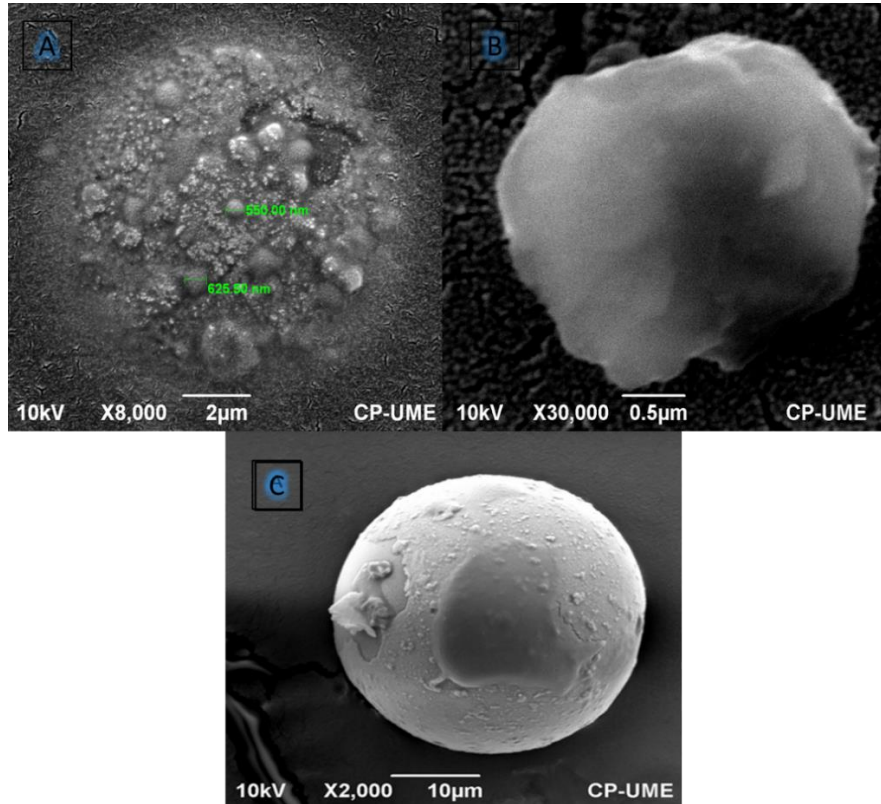
**Tratamiento 8.** (0.25 mg/Sel-Plex®/CMC 2%/sin esterilización)



**Figura 11.** Micrografía (electrónico de barrido) de micro y nanocápsulas de Sel-Plex® no esterilizadas, formuladas mediante el método de nanoprecipitación después de previa liofilización. Las fotografías poseen amplitud de: (A) 5, 000 X, (B) 7, 000 X y (C) 5, 000 X, respectivamente.



**Tratamiento 9.** (0.50 mg/Sel-Plex®/CMC 2%/sin esterilización)



**Figura 12.** Micrografía (electrónico de barrido) de micro y nanocápsulas de Sel-Plex® no esterilizadas, formuladas mediante el método de nanoprecipitación después de previa liofilización. Las fotografías poseen amplitud para (A) 8, 000 X, (B) 30, 000 X y (C) 2, 000 X.

Las micro y nanocápsulas no esterilizadas en este trabajo, son parecidas a las encontradas por Valdiviezo *et al.* (2016), quienes obtuvieron micro y nanocápsulas por el método de nanoprecipitación, realizando posteriormente análisis de liberación, donde el resultado no se vio afectado a pesar de las diversas formas y estructuras. Puthli y Vavia (2008) reportaron que la liberación del fármaco LNG no se vio afectado debido a la morfología y esterilización, alcanzando una liberación de hasta 30 días. Por lo que para las micro y nanocápsulas esterilizadas con irradiación Gamma, aunque no tienen una estructura redonda y esférica, la cubierta es compacta y flexible, por lo que la propiedad de liberación pudiera no ser afectada.

### **VIII. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

- Se concluye que la esterilidad de micro y nanocápsulas varía de acuerdo al método de esterilización. Por lo que las micro y nanocápsulas con dosis de 0.10, 0.25 y 0.50 mg de Sel-Plex® con NaCMC al 2 % esterilizadas por irradiación  $\gamma$  (T1, T2 y T3) fueron estériles, aunque su caracterización se vio alterada.
- Se recomienda analizar la liberación del activo de micro y nanocápsulas esterilizadas con irradiación  $\gamma$ , para garantizar que su morfología no afecte la entrega del activo.
- Para micro y nanocápsulas esterilizadas con el método de rayos UV se deben probar más tiempos de exposición a la irradiación, hasta garantizar su esterilidad y posteriormente evaluar su morfología y liberación.

## IX. REFERENCIAS

- Adler, S., Scherrer, M., & Daschner, F. D. (1998). Costs of low-temperature plasma sterilization compared with other sterilization methods. *Journal of Hospital Infection*, 40(2), 125–134. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(98\)90091-3](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(98)90091-3)
- Bach, A., Pinto, A., & Blanch, M. (2015). Association between chelated trace mineral supplementation and milk yield , reproductive performance , and lameness in dairy cattle. *Livestock Science* 182 (2015) 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.10.023>
- Bicalho, M. L. S., Lima, F. S., Ganda, E. K., Foditsch, C., Meira, E. B. S., Machado, V. S., ... Bicalho, R. C. (2014). Effect of trace mineral supplementation on selected minerals , energy metabolites , oxidative stress , and immune parameters and its association with uterine diseases in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 97 :4281–4295. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2013-7832>
- Bradley, A. J., & Green, M. J. (2001). An Investigation of the Impact of Intramammary Antibiotic Dry Cow Therapy on Clinical Coliform Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 84(7), 1632–1639. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74598-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74598-5)
- Campbell, J., Burkitt, S., Dong, N., & Zavaleta, C. (2020). Nanoparticle characterization techniques. *Nanoparticles for Biomedical Applications*.

Elsevier. 129-144. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816662-8.00009-6>

Casals, G. M., Santamaria, M. T., Piquet, R. D., & Gimeno, A. M. B. (2005). Importancia del selenio en la práctica clínica, *Química Clínica* 2005; 24 (3) 141-148.

Chafik, A., Essamadi, A., Çelik, S. Y., Solak, K., & Mavi, A. (2019). Characterization of an interesting selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) protecting cells against environmental stress: The *Camelus dromedarius* erythrocytes Se-GPx. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18 (2019), 101000. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.038>

Chif, S., Quéméneur, M., Barani, A., Angeletti, B., Didry, M., Grégori, G., & Pradel, N. (2019). Impact of sterilization methods on dissolved trace metals concentrations in complex natural samples : Optimization of UV irradiation. *MethodsX*. 6 (2019), 1133–1146. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.04.020>

Craven, E. (2020). An alternative maximum dose testing method for electron beam sterilization processes. *Radiation Physics and Chemistry*, 173(August 2019), 108937. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2020.108937>

Dai, R. Y., You, S. Y., Lu, L. M., Liu, Q., Li, Z. X., Wei, L., ... Yang, Z. Y. (2017). High blades spreadability of chlorpyrifos microcapsules prepared with polysiloxane sodium carboxylate/sodium carboxymethylcellulose/gelatin via complex coacervation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and*



Engineering Aspects, 530(February, 2017), 13–19.  
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.06.057>

Ečimović, S., Velki, M., Vuković, R., Čamagajevac, I. Š., Bošnjaković, R., Grgić, M., ... Filipović-, V. (2018). Acute toxicity of selenate and selenite and their impacts on oxidative status, efflux pump activity, cellular and genetic parameters in earthworm *Eisenia andrei*. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.08.095>

Edens, F. (2015). Sel-Plex ® Improves Spermatozoa Morphology in Broiler Breeder Males. *International Journal of Poultry Science*. 8 (9): 853-861. (September 2009). <https://doi.org/10.3923/ijps.2009.853.861>

Fracalossi, C., Corte, R., Dua, K., Satiko, I., Jesus, T. De, & Pinto, A. (2016). Impact of sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 82, 181–195.  
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2016.07.016>

Gåserød, O., Jolliffe, I. G., Hampson, F. C., Dettmar, P. W., & Skjåk-Bræk, G. (1998). The enhancement of the bioadhesive properties of calcium alginate gel beads by coating with chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*, 175(2), 237–246. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(98\)00277-4](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(98)00277-4)

Gonçalves, J. L., Kamphuis, C., Vernooij, H., Araújo, J. P., Grenfell, R. C., Juliano, L., ... dos Santos, M. V. (2020). Pathogen effects on milk yield and composition in chronic subclinical mastitis in dairy cows. *Veterinary Journal*, 262, 105473. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2020.105473>

- Green, M. J., Green, L. E., Medley, G. F., Schukken, Y. H., & Bradley, A. J. (2002). Influence of Dry Period Bacterial Intramammary Infection on Clinical Mastitis in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*. 85(10) 2589–2599. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74343-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74343-9)
- Heejin, K., Younjeong, M., & Byoungju, C. (2019). Real-time temperature monitoring for the early detection of mastitis in dairy cattle: Methods and case researches. *Computers and Electronics in Agriculture*, 162(April, 2019), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2019.04.004>
- Hernández Mendoza, H., & Rios Llugo, M. J. (2009). Redalyc.Rol biológico del selenio en el humano. *Química Viva*. vol. 8, núm. 2 (agosto, 2009) pp. 64-79. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86311783003>
- Hoque, M. N., Das, Z. C., Rahman, A. N. M. A., & Hoque, M. M. (2016). Effect of administration of vitamin E , selenium and antimicrobial therapy on incidence of mastitis , productive and reproductive performances in dairy cows. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 4(2), 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2016.11.001>
- Lanctôt, S., Fustier, P., Taherian, A. R., Bisakowski, B., Zhao, X., & Lacasse, P. (2017). Effect of intramammary infusion of chitosan hydrogels at drying-off on bovine mammary gland involution. *Journal of Dairy Science*, 100(3), 2269–2281. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12087>
- Lee, B. K., Yun, Y., & Park, K. (2016). PLA micro- and nano-particles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 176–191.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.05.020>

Lee, S., Walugembe, R., Won, S., Katya, K., & Bai, S. C. (2016). Dietary selenium requirement and toxicity levels in juvenile Nile tilapia , *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture*. Volume 464, 1 November 2016, Pages 153-1581. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.06.027>

Leon, L., Chung, E. J., & Rinaldi, C. (2020). A brief history of nanotechnology and introduction to nanoparticles for biomedical applications. *Nanoparticles for Biomedical Applications*. Elsevier, pp 1-4. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816662-8.00001-1>

Lerouge, S. (2010). Sterilisation and cleaning of metallic biomaterials. *Metals for Biomedical Devices*. pp. 303–326. <https://doi.org/10.1533/9781845699246.3.303>

Li, Y., Wu, L., Weng, M., Tang, B., Lai, P., & Chen, J. (2018). Effect of different encapsulating agent combinations on physicochemical properties and stability of microcapsules loaded with phenolics of plum ( *Prunus salicina* Lindl.). *Powder Technology* 340 (2018) 459–464. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2018.09.049>

Lin, Y. (2014). Effects of dietary organic and inorganic selenium on the growth , selenium concentration and meat quality of juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*. 430, (2014). 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.03.048>

- Lopretti, M, Barreiro, f, Fernandes, I, Damboriarena, A, Ottati, C, Oliveira, A. (2007). Microencapsulación de compuestos de actividad biológica. INNOTECH Publicacion Anual Del Laboratorio Tecnológico Del Uruguay, (February 2011), 19–23. <https://doi.org/10.26461/innotec.v0i2>
- Lovell, M. A., Xiong, S., Lyubartseva, G., & Markesbery, W. R. (2009). Organoselenium (Sel-Plex diet) decreases amyloid burden and RNA and DNA oxidative damage in APP/PS1 mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 46(11), 1527–1533. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.008>
- McKeen, L. (2018). Introduction to Food Irradiation and Medical Sterilization. The Effect of Sterilization Methods on Plastics and Elastomers. pp, 1-40. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814511-1.00001-9>
- Molina, E. M. (2019). Selenio : un elemento tóxico.
- Moreira, L. H., Pereira de Souza, J. C., de Lima, C. J., Salgado, M. A. C., Fernandes, A. B., Andreani, D. I. K., ... Zângaro, R. A. (2018). Use of photodynamic therapy in the treatment of bovine subclinical mastitis. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 21(October 2017), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.12.009>
- Mushtaq, S., Shah, A. M., Shah, A., Lone, S. A., Hussain, A., Hassan, Q. P., & Ali, M. N. (2018). Bovine mastitis: An appraisal of its alternative herbal cure. *Microbial Pathogenesis*, 114(August 2017), 357–361. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.024>

Ndiweni, N., & Finch, J. M. (1996). Effects of in vitro supplementation with  $\alpha$ -tocopherol and selenium on bovine neutrophil functions: Implications for resistance to mastitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 51(1–2), 67–78. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(95\)05515-0](https://doi.org/10.1016/0165-2427(95)05515-0)

Nordion. (2010). *The History of Food Irradiation*. Nordion.

Papadomichelakis, G., Zoidis, E., Pappas, A. C., Danezis, G., Georgiou, C. A., & Fegeros, K. (2018). Dietary organic selenium addition and accumulation of toxic and essential trace elements in liver and meat of growing rabbits. *Meat Science*, 145 (July, 2018), pp. 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.07.022>

Preem, L., Vaarmets, E., Meos, A., Jõgi, I., Putrinš, M., Tenson, T., & Kogermann, K. (2019). Effects and efficacy of different sterilization and disinfection methods on electrospun drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 567(April, 2019), pp. 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118450>

Puthli, S., & Vavia, P. (2008). Gamma irradiated micro system for long-term parenteral contraception: An alternative to synthetic polymers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35(4), 307–317. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.07.009>

Rani, S., Sharma, A. K., Khan, I., & Gothwal, A. (2017). Polymeric Nanoparticles in Targeting and Delivery of Drugs. *Nanotechnology-Based Approaches for Targeting and delivery of Drugs and Genes*. Elsevier, pp. 223–255.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809717-5.00008-7>

Romero-Pérez, A., García-García, E., Zavaleta-Mancera, A., Ramírez-Bribiesca, J. E., Revilla-Vázquez, A., Hernández-Calva, L. M., ... Cruz-Monterrosa, R. G. (2010). Designing and evaluation of sodium selenite nanoparticles in vitro to improve selenium absorption in ruminants. *Veterinary Research Communications*, 34(1), 71–79. <https://doi.org/10.1007/s11259-009-9335-z>

Sanguansri, P., & Augustin, M. A. (2006). Nanoscale materials development - a food industry perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 17(10), 547–556. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.010>

SIAP ( Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2017). Bovino leche población ganadera 2008-2017, 1. Retrieved from [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/412564/Bovino\\_leche\\_2017.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/412564/Bovino_leche_2017.pdf)

SIAP ( Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2018). Panorama de la leche. <https://doi.org/10.1080/09537280600875273>

Sionkowska, A., Kaczmarek, H., & Wisniewski, M. (2006). The influence of UV irradiation on the surface of chitosan films. *Surface Science*. 600 (18), 3775–3779. <https://doi.org/10.1016/j.susc.2006.01.090>

Stammen, E., Thiele, R., Stefan, B., Cornelia, B., Dilger, K., & Jochen, B. (2012). *International Journal of Adhesion & Adhesives* Withstanding frequent steam

- sterilisation: Innovative technique to bond glass and stainless steel composites in biotechnology and endoscopic medicine. *International Journal of Adhesion & Adhesives*. 33(2012), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2011.10.005>
- Tan, E. L., Potroz, M. G., Ferracci, G., Wang, L., Jackman, J. A., & Cho, N. J. (2020). Hydrophobic to superhydrophilic tuning of multifunctional sporopollenin for microcapsule and bio-composite applications. *Applied Materials Today*, 18(2010), pp. 1-11. 100525. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.100525>
- Tekade, R. K., Maheshwari, R., Soni, N., Tekade, M., & Chougule, M. B. (2017). Nanotechnology for the Development of Nanomedicine. In *Nanotechnology-Based Approaches for Targeting and Delivery of Drugs and Genes*. (pp. 3–61). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809717-5.00001-4>
- Urrejola C, M., Soto V, L., Zumarán C, C., Peñaloza Pablo, J., Alvarez, B., Fuentevilla, I., & Haidar S, Z. (2018). Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura , Métodos de Elaboración , Características , Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa ( Layer-by-Layer Self-Assembly ). *Journal Morphol.* 36(4), 1463–1471.
- Vetten, M. A., Yah, C. S., Singh, T., & Gulumian, M. (2014). Challenges facing sterilization and depyrogenation of nanoparticles: Effects on structural stability and biomedical applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(7), 1391–1399.

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.03.017>

Vignola, G., Lambertini, L., Mazzone, G., Giammarco, M., Tassinari, M., Martelli, G., & Bertin, G. (2009). Effects of selenium source and level of supplementation on the performance and meat quality of lambs. *Meat Science* 81 (2009) 678–685. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.11.009>

Wang, Z., Tan, Y., Cui, X., Chang, S., Xiao, X., Yan, T., ... Hou, F. (2019). Effect of different levels of selenium yeast on the antioxidant status, nutrient digestibility, selenium balances and nitrogen metabolism of Tibetan sheep in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Small Ruminant Research*. 180(October, 2019), pp. 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.10.001>

Weigang, L., Gang, W., Hongzheng, C., & Mang, W. (2009). Preparation and characterization of gelatin/SDS/NaCMC microcapsules with compact wall structure by complex coacervation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 333(1–3), 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2008.09.046>

White, P. J. (2018). BBA - General Subjects Selenium metabolism in plants. *BBA - General Subjects*, 1862(11), 2333–2342. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.05.006>

Yang, Z., Peng, H., Wang, W., & Liu, T. (2010). Crystallization behavior of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/layered double hydroxide nanocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 116(5), 2658–2667. <https://doi.org/10.1002/app>



- Zaeim, D., Sarabi-Jamab, M., Ghorani, B., Kadkhodae, R., Liu, W., & Tromp, R. H. (2020). Microencapsulation of probiotics in multi-polysaccharide microcapsules by electro-hydrodynamic atomization and incorporation into ice-cream formulation. *Food Structure*, 25(18), pp. 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2020.100147>
- Zhang, S., Wu, Z., Heng, J., Song, H., Tian, M., Chen, F., & Guan, W. (2020). Combined yeast culture and organic selenium supplementation during late gestation and lactation improve preweaning piglet performance by enhancing the antioxidant capacity and milk content in nutrient-restricted sows. *Animal Nutrition*, 6(2), 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2020.01.004>
- Zheng, Y., Dai, W., Hu, X., & Hong, Z. (2019). Effects of dietary glycine selenium nanoparticles on loin quality, tissue selenium retention, and serum antioxidation in finishing pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 260(October 2019), pp. 1-7, 114345. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114345>
- Zhong-qing, Z., Qiang, G., Jing-min, Y., Yan, W., Jing-yi, Y., Xue, Z., ... Hong-ge, S. (2020). Fabrication and release behavior of nitrapyrin Microcapsules: Using modified melamine-formaldehyde resin as shell material. *Science of the Total Environment*, 704(2020), pp. 1-9, 135394. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135394>