



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y
PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

**DISEÑO Y EVALUACION DE NANOPARTICULAS DE SELENITO
DE SODIO PARA SU USO EN RUMIANTES**

ATMIR ROMERO PEREZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, ABRIL DE 2008.

Se presenta la tesis titulada “**DISEÑO Y EVALUACION DE NANOPARTICULAS DE SELENITO DE SODIO PARA SU USO EN RUMIANTES**” realizada por el alumno: **Atmir Romero Pérez** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

Dr. EFRÉN RAMÍREZ BRIBIESCA

ASESOR

Dra. ELIZABETH GARCÍA GARCÍA

ASESOR

Dra. RAQUEL LOPEZ ARELLANO

ASESOR

Dr. JORGE TÓRTORA PÉREZ

ASESOR

Dr. GERMAN D. MENDOZA MARTINEZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, que me permitió continuar con mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado.

A mi profesor consejero el Dr. Efrén Ramírez Bribiesca y a mis asesores, la Dra. Elizabeth García García, la Dra. Raquel Lopez Arellano, el Dr. Jorge Tortora Pérez y el Dr. Germán Mendoza Martínez por su valiosa colaboración en la realización de esta investigación.

A la Dra. Araceli Zavaleta Mancera y Dra. Alma Revilla Vázquez por su apoyo y disponibilidad.

Para todos los que contribuyeron en la realización de esta tesis, mi respeto y agradecimiento.

Dedico esta tesis a las personas que mas quiero, mi familia, que siempre me apoya y me impulsa a seguir adelante, en especial a mi sobrina Ana Camila y a ti Diana por todo el amor que me das.

INDICE

	Página
INDICE DE CUADROS.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEORICO.....	3
2.1. Selenio	3
2.1.1. Características químicas del selenio.....	3
2.1.2. Formas de suplementación.....	4
2.1.2.1. Inorgánicas.....	5
2.1.2.2. Orgánicas.....	6
2.1.3. Requerimientos.....	7
2.1.4. Deficiencia.....	8
2.1.5. Toxicidad.....	8
2.1.6. Fisiología y metabolismo del selenio.....	9
2.1.6.1. Funciones.....	9
2.1.6.2. Metabolismo.....	12
2.1.6.3. Excreción.....	13
2.2. El rumen.....	
2.3. Nanociencia y nanotecnología.....	15
2.3.1. Antecedentes.....	15
2.3.2. Procesos de asociación de fármacos a sistemas nanométricos.....	19
2.3.3. Polímeros empleados en la preparación de nanopartículas..	25
2.3.4. Caracterización de nanopartículas.....	27
2.3.4.1. Tamaño de partícula.....	27
2.3.4.2. Morfología.....	28
2.2.4.2.1. Microscopia electrónica de barrido (MEB).....	30
2.2.4.2.2. Microscopia electrónica de transmisión (MET)...	32
2.3.4.3. Potencial Zeta.....	34
2.3.4.4. Índice de polidispersidad.....	35
2.3.5. Transporte de nanopartículas a través de la mucosa intestinal.....	35
2.3.6. Expectativas de desarrollo en la nanotecnología pecuaria...	37
III. JUSTIFICACIÓN.....	41
IV. HIPÓTESIS.....	42
V. OBJETIVOS.....	43
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
6.1. Fabricación de nanopartículas.....	44
6.1.1. Nanopartículas cargadas de selenio.....	44
6.1.1.1. Método de Emulsión – Evaporación.....	44
6.1.1.1.1. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en proporción 30:70 y solvente acetona.....	44
6.1.1.1.2. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en	

proporción 40:60 y solvente acetona.....	44
6.1.1.1.3. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en proporción 30:70 y solvente etanol.....	45
6.1.1.1.3. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en proporción 40:60 y solvente etanol.....	45
6.1.1.2. Método de Nanoprecipitación.....	46
6. 1. 2. Nanopartículas cargadas de fluoresceína.....	46
6.2. Caracterización de nanopartículas.....	46
6.2.1. Eficiencia de encapsulación de selenio.....	47
6.2.2. Tamaño de partícula.....	47
6.2.3. Morfología de nanopartículas.....	47
5.2.3.1. Nanopartículas preparadas por el método de emulsión– evaporación.....	47
5.2.3.1. Nanopartículas preparadas por el método de nanoprecipitación.....	48
6.3. Disolución de nanopartículas y estudios de liberación.....	48
6.3.1. Preparación de soluciones buffer.....	48
6.3.2. Prueba de disolución a diferente pH.....	49
6.4. Análisis estadístico.....	50
6.4.1. Propiedades fisicoquímicas y morfológicas.....	50
6.4.1.1. Diseño experimental.....	50
6.4.1.2. Análisis estadístico.....	50
6.4.2. Estudios de liberación de selenio.....	51
6.4.2.1. Diseño experimental.....	51
6.4.2.2. Análisis estadístico.....	51
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
7.1. Nanopartículas de selenito de sodio.....	53
7.1.1. Método de Emulsión – Evaporación.....	53
7.1.1.1. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en proporción 30:70 y solvente acetona.....	53
7.1.1.2. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en proporción 40:60 y solvente acetona	55
7.1.1.3. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en proporción 30:70 y solvente etanol.....	57
7.1.1.4. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en proporción 40:60 y solvente etanol.....	59
7.1.2. Método de Nanoprecipitación.....	60
7.2. Nanopartículas de fluoresceína.....	63
7.3. Estudios de liberación de selenio en función del pH y tiempo.....	
VIII. CONCLUSIONES.....	72
IX. LITERATURA CITADA.....	74

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Pagina
1	Selenoproteínas que llevan acabo funciones nutricionales.....	10
2	Selenoproteínas con funciones desconocidas.....	12
3	Métodos de preparación de nanopartículas en función de la matriz polimérica.....	27
4	Comparación de escalas nanométricas en estructuras biológicas.	38
5	Tamaño, potencial z y PDI de diferentes sistemas nanométricos...	66
6	Tamaño, potencial z y PDI de nanopartículas preparadas con diferentes métodos.....	66
7	Tamaño, potencial z y PDI de nanopartículas preparadas con diferentes solventes.....	67
8	Tamaño, potencial z y PDI de nanopartículas preparadas con diferentes proporciones de polímeros.....	68
9	Correlaciones entre tamaño, potencial z y PDI.....	69
10	Regresión cuadrática de las características de nanopartículas.....	69
11	Liberación de selenio ($\mu\text{g/mL}$) con diferentes buffers y tiempos en nanopartículas elaboradas con Eudragit RL 100 - RS 100 y selenito de sodio.....	70

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Sistema digestivo en rumiantes.....	15
2	Distribución de las publicaciones y actas de congresos sobre nanotecnología para el periodo 2003-2004.....	17
3	Diferentes tipos de nanopartículas.....	20
4	Clasificación de nanopartículas.....	21
5	Preparación de nanopartículas por precipitación de polímero.....	24
6	Estructura química de Eudragit RL y RS.....	26
7	Asociación de la muestra con los electrones.....	29
8	Diagrama de la columna del MEB.....	31
9	Diagrama de la columna del MET.....	33
10	Modelo de doble capa de una partícula coloidal.....	35
11	Micrografía electrónica de barrido de partículas de selenito de sodio generadas por emulsión-evaporación, utilizando acetona y una proporción Eudragit RL 100 : RS 100 (30:70).....	54
12	Micrografía electrónica de barrido de partículas de selenito de sodio generadas por emulsión-evaporación, utilizando acetona y una proporción Eudragit RL 100 : RS 100 (40:60).....	56
13	Micrografía electrónica de barrido de partículas de selenito de sodio generadas por emulsión-evaporación, utilizando etanol y una proporción Eudragit RL 100 : RS 100 (30:70).....	57
14	Micrografía electrónica de barrido de partículas de selenito de sodio generadas por emulsión-evaporación, utilizando etanol y una proporción Eudragit RL 100 : RS 100 (40:60).....	59
15	Micrografía electrónica de barrido de nanopartículas de selenito de sodio generadas por nanoprecipitación sin centrifugar, A) aglomeradas y B) dispersas.....	61
16	Micrografía electrónica de barrido de nanopartículas de selenito de sodio generadas por nanoprecipitación centrifugadas a 27, 000 rpm previo a la observación.....	62
17	Distribución de frecuencias de nanopartículas de selenito de sodio generadas por nanoprecipitación y centrifugadas a 27, 000 rpm previo a la observación.....	64
18	Micrografía electrónica de barrido de nanopartículas de fluoresceína generadas por Nanoprecipitación A) sin centrifugar y B) centrifugadas a 27,000 rpm.....	65

DISEÑO Y EVALUACION DE NANOPARTICULAS DE SELENITO DE SODIO PARA SU USO EN RUMIANTES

RESUMEN

El selenito de sodio, el suplemento de selenio mas usado en rumiantes en la prevención de la deficiencia del elemento y las enfermedades resultantes, fue encapsulado por nanoprecipitación y emulsión-evaporación en nanopartículas poliméricas. Fue evaluado el efecto del método de preparación de nanopartículas, proporciones de polímeros (Eudragit RL 100 y RS 100) y solvente empleado (etanol y acetona), sobre las características fisicoquímicas (potencial z, índice de polidispersidad y porcentaje de encapsulación) y la morfología (tamaño de partícula y forma) de las nanopartículas. El tamaño de partícula obtenido presentó valores de 34.64 a 213.86 nm. Tanto el tamaño como el potencial z y el PDI se incrementaron ($P < 0.05$) cuando se utilizó el método de nanoprecipitación al igual que cuando se utilizó el solvente etanol. No se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) para las diferentes proporciones de polímeros, probablemente porque las diferencias entre las proporciones no eran tan marcadas. Con el método de emulsión-evaporación se obtuvo un porcentaje de encapsulación de 26% mientras que con el método de nanoprecipitación la encapsulación fue de 78%. Las nanopartículas que se formaron con el método de nanoprecipitación presentaron una forma esférica con una gran variación en el tamaño, mientras que las observadas en el método emulsión-evaporación fueron tanto esféricas como irregulares con un tamaño de partícula más homogéneo. La liberación de selenio de las nanopartículas fue mayor en condiciones de pH ácido. Esta condición puede representar una mejor disponibilidad del selenio a nivel intestinal.

Palabras clave: Nanopartículas; Selenito de sodio; Eudragit; Rumiantes.

DESIGN AND EVALUATION OF SODIUM SELENITE NANOPARTICLES FOR RUMINANTS

Abstract

Sodium selenite, predominant selenium supplement for ruminants used in the prevention of selenium deficiency and the treatment of nutritional muscular dystrophy (white muscle disease) and cardiac myopathy, was encapsulated by nanoprecipitation and emulsion-evaporation methods, within polymeric nanoparticles. The effect of methods, polymer proportion (Eudragit RL and RS) and solvent (ethanol and acetone) on the physicochemical (drug entrapment, polydispersity index (PDI) and z potential) and morphological characteristics (particle morphology and particle size) was evaluated. Particle size from each nanoparticle formulation ranged from 36.64 to 213.86 nm. Particle size, z potential and PDI increased when nanoprecipitation and ethanol were used. No significant differences were observed when different polymeric proportions were used. Selenium entrapment was 26% when emulsion-evaporation method was used and 78% with nanoprecipitation. Nanoparticles produced by nanoprecipitation were spherical and present a great variation in particle size, on the other hand, nanoparticles produced by emulsion-evaporation were spherical as well as amorphous and present a homogeneous nanoparticle size distribution. The release of selenium from nanoparticles was higher in acid pH, this condition may represent a better availability of the mineral in the small intestine.

Key words: Nanoparticles; Sodium selenite; Eudragit; Ruminants.

I. INTRODUCCION.

Las células y tejidos del organismo animal contienen elementos minerales en diversas combinaciones funcionales y químicas, con concentraciones características del elemento y en cada tejido (Underwood y Suttle, 1999). Para entender la importancia de los minerales hay que tomar en cuenta que aproximadamente 5% del peso corporal de los animales corresponde a minerales (McDowell, 1997).

Las concentraciones de los elementos esenciales deben mantenerse dentro de límites bastante estrechos para salvaguardar la integridad funcional y estructural de los tejidos y para mantener inalterado el crecimiento, la salud así como la productividad del animal (Underwood y Suttle, 1999). Los desbalances de minerales (deficiencias o excesos) en suelo y forrajes han sido relacionados con la baja producción, enfermedades y problemas reproductivos de los rumiantes en pastoreo (McDowell, 1997). Es por eso que los minerales se han ubicado como el tercer factor nutricional más importante en la producción animal (Domínguez, 1993).

Aunque el cuerpo contiene muchos elementos minerales, solo se ha demostrado que 15 son esenciales para ovinos. Siete son macrominerales: sodio, cloro, calcio, fósforo, magnesio, potasio, y azufre. Los otros ocho son elementos traza: yodo, hierro, molibdeno, cobre, cobalto, manganeso, zinc y selenio (NRC, 2001).

Dentro de los microminerales, el selenio juega un papel muy importante en la producción animal, inicialmente fue considerado solo de interés científico, unos años después se demostró su valor en la prevención de la necrosis hepática en ratas y se observaron en diversos países enfermedades en animales de granja sensibles a la administración de selenio (Underwood y Suttle, 1999).

Varias formas de suplementar selenio han sido desarrolladas. La más antigua es en forma inyectada, sin embargo también se ha proporcionado combinado con el alimento, en mezclas minerales ofrecidas al animal a libre acceso o en forma de bolos intraruminales que liberan el selenio gradualmente por periodos de más de 120 días. De una manera indirecta el selenio también ha sido aplicado en pastizales junto con fertilizantes previniendo exitosamente deficiencias en animales en pastoreo (Hansen *et al.*, 1993), sin embargo este selenio no se encuentra protegido del ambiente ruminal y puede ser transformado a formas menos disponibles o incorporado a los microorganismos ruminales por lo que su absorción a nivel intestinal se ve reducida. Debido a lo anterior, en el presente trabajo se plantea la suplementación de selenio, asociado a polímeros en forma de nanopartículas que lo protegen durante su paso por el retículo-rumen de la acción de los microorganismos y que serian capaces de liberarlo a nivel de abomaso y duodeno por acción del pH ácido, característico de estas porciones del tubo digestivo, mejorando la disponibilidad y absorción de este mineral en el intestino.

II. MARCO TEORICO.

2.1. Selenio.

El selenio fue descubierto en 1817 por un científico sueco que encontró un residuo rojo en el material de desecho que se formaba durante la producción de ácido sulfúrico en una mina de sulfuro de cobre de Falun (Suecia). Debido a que sus propiedades químicas eran similares al telurio, se describió como tal, hasta que poco después Jon Jacob Berzelius descubrió que se trataba de un nuevo elemento con propiedades únicas (McNeal y Balistreri, 1989).

2.1.1. Características químicas del selenio.

El selenio tiene número atómico 34 y un peso molecular de 78.96. Está localizado en el grupo del oxígeno en la tabla periódica, entre el azufre (no metal) y el telurio (metal). El selenio se clasifica en el grupo VIA de la tabla periódica de los elementos. Tiene tanto propiedades metálicas como no metálicas y es considerado un metaloide. Se localiza entre los metales telurio y polonio y entre los no metales oxígeno y azufre por grupo y entre los no metales arsénico y bromo por periodo. El selenio puede existir en los estados de oxidación 2^- , 0 , 4^+ y 6^+ . La concentración y asociación del selenio en un ambiente determinado depende del pH y las condiciones de oxidación-reducción, la solubilidad de sus sales, interacciones biológicas y reacciones cinéticas (McNeal y Balistreri, 1989).

Se han identificado seis isótopos estables de selenio presentes en la naturaleza y al menos pueden ser producidos siete isótopos inestables. Los isótopos ^{75}Se , $^{77\text{m}}\text{Se}$ y ^{81}Se , pueden ser utilizados para cuantificar selenio (NRC, 1983).

Según McNeal y Balistreri (1989), el selenio puede existir como selenuros (Se^{2-}), selenio elemental (Se^0), selenito (SeO_3^{2-}) y selenato (SeO_4^{2-}). Cada estado de oxidación muestra un comportamiento químico diferente. Los selenuros y el

selenio elemental se presentan en ambientes ácidos, reductores y ricos orgánicamente. Los selenuros metálicos y el selenio elemental son insolubles y por lo tanto no son biológicamente disponibles. Para las condiciones redox y de pH de la mayoría de los suelos y ambientes acuáticos, los selenitos y selenatos deben ser las formas dominantes de selenio.. El selenato es biológicamente disponible debido a la solubilidad de sus sales y su pobre adsorción por partículas. La acción microbiana puede cambiar la evolución del selenio a través de la oxidación o reducción, o mediante la formación de compuestos orgánicos.

Los procesos químicos y biológicos, pueden reducir el selenito a selenio elemental, lo cual limita su movilidad en el ambiente y su disponibilidad para plantas y animales, sin embargo, la oxidación de selenito a selenato en ambientes alcalinos y muy oxidativos, puede incrementar la movilidad de selenio y su asimilación por las plantas (McNeal y Balistrieri, 1989)

2.1.2. Formas de suplementación.

El selenio consumido en alimentos y suplementos se presenta en varias formas orgánicas e inorgánicas que incluyen a la selenometionina (fuentes vegetales, animales y suplementos), selenocisteína (principalmente fuentes animales), selenato y selenito (principalmente suplementos) (Rayman, 2000).

La deficiencia de selenio puede prevenirse de diferentes maneras, el método de elección depende de las condiciones productivas de los animales. Los principales métodos de suplementación de selenio en ganado son el uso de premezclas comerciales, bloques minerales, inyecciones de selenio, bolos ruminales, bomba osmótica ruminal, y de manera indirecta, la aplicación de fertilizantes con selenio. Según Rieux *et al.* (2006) la suplementación por vía oral es la mejor ruta a elegir para la administración de fármacos debido a su naturaleza no invasiva. Esta vía presenta la ventaja de evitar el daño tisular, el dolor y el malestar asociado a las inyecciones. El uso simultáneo de dos métodos puede proporcionar resultados

aditivos no dañinos, pero estas prácticas son necesarias en muy pocas ocasiones (Hansen *et al.*, 1993; McDowell, 1997; Underwood y Suttle, 1999). Suministrar alimentos con niveles elevados de selenio ha resultado una medida efectiva de suplementación tanto en rumiantes como en no rumiantes (Ammerman y Miller, 1972).

2.1.2.1. Inorgánicas.

Las sales inorgánicas para suplementar selenio más utilizadas han sido el selenito y selenato de sodio, sin embargo de manera experimental se han evaluado fuentes como el selenato de bario (Jiménez *et al.*, 1998), selenito de calcio (Henry *et al.*, 1988), o selenio elemental (Wang *et al.*, 2007).

Jannes *et al.* (1989) encontraron en ovinos suplementados con selenito de sodio, que hasta el 84 % del selenio en eritrocitos estaba asociado con la enzima glutatión peroxidasa, y solo el 64% estaba asociado a la enzima cuando la fuente de selenio fue trigo con alto nivel de selenio (9.8 µg de Se/g).

Según Guyot *et al.* (2007), la actividad de la enzima glutatión peroxidasa en plasma se incrementó tanto al suplementar vía oral con 5 ppm de selenito de sodio o de levadura enriquecida con selenio, sin embargo los valores más altos se presentaron cuando se proporcionó la forma orgánica.

Jiménez *et al.* (1998), al emplear diferentes fuentes inorgánicas de selenio para suplementar ovejas gestantes (selenito de sodio, selenato de bario y una mezcla de selenio más albendazol) concluyeron que el selenato de bario fue el mejor tratamiento, ya que presentó un mayor incremento en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa, tanto en plasma como en sangre, para madres y crías.

En un experimento realizado para determinar la biodisponibilidad relativa de fuentes inorgánicas de selenio, con altos niveles de inclusión, tomando como base al selenito de sodio, Henry *et al.* (1988), concluyeron que la mejor fuente para

suplementar selenio es el selenato de sodio (133%), seguido del selenito de calcio (101%) y selenito de sodio (100%)

Recientemente Wang *et al.* (2007) demostraron que el selenio elemental, a nivel nano (20-60 nm), comparado con la selenometionina, tienen la misma eficiencia para incrementar la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa y tioredoxina reductasa.

2.1.2.2. Orgánicas.

El selenio en la dieta se presenta en una variedad de formas químicas y muchas de sus acciones biológicas dependen de la forma en que sea consumido (Finley, 1999). Actualmente existen de manera comercial suplementos con sales orgánicas que pueden ser incorporados en la dieta de los rumiantes. Estos productos son obtenidos a partir del cultivo de cepas específicas de *Saccharomyces cerevisiae* en medios ricos en selenio inorgánico para sintetizar sales orgánicas, principalmente L-selenometionina. Las sales orgánicas son mejor absorbidas y retenidas, ya que se absorben de manera activa y pueden ser incorporadas directamente a selenoproteínas en el hígado o a proteínas corporales (Alltech Biotechnology Center, 2002). Por su parte King (2001) menciona que la selenometionina se absorbe y retiene más eficientemente que el selenato o selenito inorgánico y el selenito es absorbido más eficientemente que el selenato.

Debido a que la L-selenometionina es la forma natural más común de selenio en los alimentos, la L-selenometionina o fuentes alimenticias como levadura enriquecida con selenio son formas apropiadas para suplementar selenio en humanos; para animales la DL-selenometionina es aceptable. La selenometionina ingerida, puede ser transformada directamente a formas reactivas de selenio o almacenada en lugar de metionina en las proteínas corporales. Los cereales y forrajes de corte contienen selenio principalmente en forma de selenometionina, la

cual es incorporada a la proteína en lugar de metionina, ya que el tRNA^{Met} no discrimina entre metionina y selenometionina (Schrauzer, 2000).

Domínguez (2002), evaluó la influencia del selenio y cromo orgánicos en el crecimiento, uso de nutrientes, estado inmune y características de la canal de ovinos en engorda intensiva. Observo que el suplementar selenio y cromo de fuentes orgánicas, mejora el crecimiento y la eficiencia productiva, el balance de nitrógeno, así como la digestibilidad de la materia seca y de la proteína. Las concentraciones séricas de inmunoglobulina G se ven aumentadas al suplementar cromo y selenio orgánicos. La combinación de cromo y selenio orgánicos contribuye de manera importante en la modificación de la composición corporal de ovinos en engorda intensiva.

El selenito y selenato tienen una capacidad limitada para incrementar las concentraciones de selenio en leche, mientras que la sal orgánica es más efectiva (Ortman y Pehrson, 1999). Según Rock *et al.* (2000), la suplementación de selenio a borregas, con levadura enriquecida, en comparación con selenito de sodio, incrementó la concentración de selenio en hígado y sangre de los corderos recién nacidos y en el calostro.

Las fuentes orgánicas de selenio son preferidas para suplementar, en parte porque son menos tóxicas, aunque pudieran ser más tóxicas en periodos largos de consumo, debido a la retención no específica de selenio como selenometionina en las proteínas corporales en lugar de su excreción (Rayman, 2000).

2.1.3. Requerimientos.

Las múltiples interacciones entre minerales hacen difícil determinar los requerimientos de minerales específicos para borregos, debido a que la falta o la abundancia de un mineral puede dar otras deficiencias o toxicidades, sin embargo el requerimiento de selenio se ha establecido entre 0.1 y 0.3 ppm (NRC, 2001).

2.1.4. Deficiencia.

La deficiencia de Se en rumiantes en crecimiento, conduce a la presentación de la enfermedad del músculo blanco con daños en el tejido muscular (miopatía). En el curso de la enfermedad, pueden ser depositadas sales de calcio en las fibras musculares, en ciertas partes del cuerpo del animal afectado (Hansen *et al.*, 1993). Asimismo, el insuficiente consumo de Se en animales adultos se ha relacionado con varias manifestaciones clínicas como alteraciones en la reproducción, reducción de la resistencia a enfermedades, mortalidad perinatal y subclínicas como retraso del crecimiento y disminución en la producción de lana (Underwood y Suttle, 1999).

2.1.5. Toxicidad.

El nivel máximo tolerable de selenio propuesto por el NRC (2001) es de 2 ppm. 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 a la cantidad de selenio consumido y puede variar de horas a días (James *et al.*, 1989).

Cristaldi *et al.* (2004) no observaron signos de toxicidad por selenio como laminitis, malformaciones de pezuñas o pérdida de cabello, suministrando 10 ppm de selenio como selenito durante un año. De acuerdo con esto parece ser que el nivel máximo tolerable de selenio sugerido por el NRC para rumiantes podría haber sido subestimado.

Recientemente, Zhang *et al.* (2004) realizaron estudios en ratones suplementando nanopartículas de selenio elemental (20-60 nm) y selenito de sodio vía oral, a una

dosis de 6mg/kg de peso corporal al día, demostrando que el selenio a nivel nano, es menos tóxico que el selenito de sodio

Aunque la seleniometionina es considerada la fuente de suplementación más apropiada debido a su excelente biodisponibilidad y baja toxicidad en comparación con otras fuentes de selenio, Wang *et al.* (2007) concluyeron que el selenio elemental a nivel nano (20-60 nm) comparado con la seleniometionina, tienen la misma eficiencia para incrementar la actividad de las enzimas glutatión peroxidasa y tioredoxina reductasa, sin embargo, resulta menos tóxico.

2.1.6. Fisiología y metabolismo del selenio.

2.1.6.1. Funciones.

El selenio es biológicamente importante porque (i) es esencial en el metabolismo animal y el vegetal, (ii) en muchos áreas las dietas no contienen suficiente selenio para cubrir los requerimientos de los animales y en otras áreas es tóxico para los animales cuando se presenta en altas concentraciones en el agua, suelo y plantas (Mayland *et al.*, 1989).

Casi todo el selenio en los tejidos animales está asociado con proteínas. La forma en la cual el selenio se incorpora en las proteínas y actúa biológicamente es como selenocisteína. Se puede encontrar selenio en las proteínas como, seleniometionina y complejos de selenio con metales pesados. Han sido identificadas enzimas que contienen selenocisteína en mamíferos e incluyen a la familia de la glutatión peroxidasa, irotironina deiodinasa (tres isoformas), tioredoxin reductasas (probablemente tres isoformas), selenofosfato sintetasa, selenoproteína P (glucoproteína), Selenoproteína W (una proteína muscular con funciones poco conocidas), Selenoproteína epitelial de la próstata, selenoproteína espermática y una selenoproteína presente en riñón (Cuadro 1) (Burk y Hill, 1993; Allan *et al.*, 1999; Rayman, 2000).

Cuadro 1. Selenoproteínas que llevan acabo funciones nutricionales.

Selenoproteína	Función
Glutación peroxidadasas (GPx1, GPx2, GPx3, GPx4)	Enzimas antioxidantes: remueven peróxido de hidrogeno e hidroperóxidos lipidicos y fosfolipidicos (de esta manera mantienen la actividad de las membranas, modulando la síntesis de eicosanoides, modificando la inflamación y posiblemente la propagación de daño oxidativo a biomoléculas como lípidos, lipoproteínas y DNA).
Selenoproteína mitocondrial del esperma	Forma de glutación peroxidasa (GPx4): protege a las células espermáticas del daño oxidativo, así como su madurez y estabilidad.
Iodotironina-desiodinasa (tres isoformas)	Producción y regulación del nivel de T3 a partir de T4.
Tioredoxina-reductasa (tres isoformas)	Reducción de los nucleótidos en la síntesis de DNA, mantenimiento del estado redox intracelular, indispensable para la proliferación y viabilidad de las células, reguladoras de la expresión genética por control redox de la unión de factores de transcripción al DNA.
Selenofosfato-sintetasa SPS2	Necesaria para la síntesis del selenofosfato, precursor de la selenocisteína y, por tanto, de la síntesis de las selenoproteínas
Selenoproteína P	Proteína plasmática que parece tener un efecto protector de las células endoteliales frente al ataque de peroxinitritos
Selenoproteína W	Necesaria la para función muscular.

Cuadro 1. continuación...

Selenoproteína del epitelio prostático, 15kDa	Localizada en las células epiteliales de la próstata ventral. Parece tener una función redox similar a la GPx4. Quizá posee acción protectora de las células secretoras contra al carcinoma.
Selenoproteína unida al DNA de las espermatides, 34kDa	Actividad similar a la glutatión-peróxidos. Se encuentra en el estómago y núcleo de los espermatozoides. Puede proteger el desarrollo del esperma.
Selenoproteína de 18kDa	Selenoproteína de gran importancia que se encuentra en riñón y muchos otros órganos. Presente incluso en los estados de deficiencia en selenio

Rayman (2000)

El selenio es importante para las funciones del cuerpo como son el crecimiento, la reproducción, prevención de varias enfermedades y protección de la integridad de los tejidos. El selenio protege las membranas biológicas de la oxidación, esto se explica ya que es un constituyente esencial de la glutatión peroxidasa, enzima que protege las membranas celulares y subcelulares del daño oxidativo (McDowell, 1997).

El selenio tiene otras funciones independientes de la glutatión peroxidasa, tales como la presencia de una Selenoproteína enzimática en la mitocondria de los espermatozoides, la incorporación del selenio en las bases puricas o pirimidicas del RNA de bacterias creciendo en presencia de selenito o en la síntesis de prostaglandinas (NRC, 1983). El selenio también forma parte de la yodotironina iodinasa, una Selenoproteína unida a membrana capaz de convertir la tetrayodotironina a triyodotironina, la forma fisiológicamente activa de la hormona tiroidea (Underwood y Suttle, 1999). Recientemente se ha demostrado que el selenio medía algunas acciones vinculadas a las de la insulina, tanto *in vivo* como

in vitro, sin embargo el mecanismo de esta acción no ha sido aclarado (Stapleton, 2000). Existen otras Selenoproteínas (Cuadro 2) que se han descubierto pero cuya función no está claramente definida.

Cuadro 2. Selenoproteínas con funciones desconocidas

Selenoproteína	Abreviatura	Estudios significativos
Selenoproteína R	SelR	63
Selenoproteína T	SelT	63
Selenoproteína N	SelN	69
Selenoproteína X	SelX	69
Selenoproteína Zf1	SelZf1	69
Selenoproteína Zf2	SelZf2	69

Behne y Kyriakopoulos (2001)

2.1.6.2. Metabolismo.

El abomaso no es un órgano de absorción. La mayor absorción de selenio ocurre en el intestino delgado y ciego de borregos (NRC, 1983). La eficiencia de absorción de varios minerales traza y los factores de la dieta que afectan la biodisponibilidad de los minerales, difieren entre rumiantes y no rumiantes. La absorción de selenio es mayor en no rumiantes (85 %) que en rumiantes (34 %). Se cree que la baja absorción de selenio en rumiantes se debe a la reducción del selenio de la dieta a formas insolubles, como selenio elemental o selenuros en el ambiente ruminal (Spears, 2003).

El selenio en las dietas de rumiantes no solamente es utilizado por el animal, sino también por las bacterias ruminales, que lo requieren funcionalmente y metabolizan una parte. La mayor parte del selenio en el líquido ruminal de borregos suplementados, fue insoluble, lo cual indica la influencia del ambiente ruminal en la biodisponibilidad del elemento (Serra *et al.*, 1994).

El selenio incorporado por los microorganismos ruminales puede resultar disponible para el animal, cuando dichos microorganismos son digeridos en el intestino mediante la acción enzimática. Aunque las bacterias incorporan selenio a sus células, también convierten mucho del selenio de la dieta a formas no disponibles. Las sales inorgánicas de selenio son más fácilmente convertidas a estas formas no disponibles que las sales orgánicas. La menor absorción de selenio en rumiantes que en no rumiantes se, debe aparentemente a la conversión de selenio inorgánico a formas no disponibles por los microorganismos ruminales. Dado que el selenio celular parece estar en sales orgánicas, probablemente puede ser más disponible para el animal (Whanger *et al.*, 1978; Jannes, 1989).

2.1.6.3. Excreción.

Según Mayland *et al.* (1989), la orina es la principal ruta de excreción en no rumiantes, ya sea cuando se proporciona oralmente o en forma inyectada. La principal ruta de excreción de selenio en animales rumiantes, depende del modo de administración y la edad de los animales. Cuando el selenio es ingerido, la mayor parte se excreta en las heces, en formas no disponibles para las plantas. En contraste el selenio inyectado ya sea por vía intravenosa o subcutánea, se excreta principalmente en la orina. Los corderos que no han desarrollado las funciones del rumen, pueden excretar de 66 a 75 % del selenio ingerido a través de la orina.

Bajo ciertas condiciones, cantidades significativas de selenio en forma de dimetil selenuro, son exhaladas por los animales como un compuesto volátil. Este compuesto es formado en los animales por la metilación de selenito. La cantidad exhalada aumenta con el incremento del consumo de selenio y es mayor con la administración oral de selenito que de selenato o selenometionina. Esta vía de excreción, es un mecanismo importante por el cual el animal remueve selenio, especialmente cuando la dieta tiene una concentración relativamente alta (Mayland *et al.*, 1989).

2.2. El rumen

Los rumiantes son llamados así porque rumian, es decir, mastican el bolo de la rumia. Tienen un estomago que consiste en un estomago anterior no secretor y un comportamiento estomacal secretor (abomaso). El estomago anterior consta de tres compartimientos (el retículo, el rumen y el omaso) y es un saco donde se lleva a cabo la fermentación microbiana de los alimentos ingeridos. El abomaso, como el estomago de los animales no rumiantes se encarga en gran medida de la hidrólisis de proteínas mediante pepsina en un medio ácido (Mc Donald *et al.*, 1995).

Los microorganismos del rumen, consisten principalmente en una población mixta interdependiente de bacterias anaerobias, pero también de hongos del tipo de levaduras y de protozoarios. La fermentación ruminal da lugar principalmente, a ácidos grasos volátiles, células microbianas y los gases metano y dióxido de carbono. Los gases se eliminan por eructación y los ácidos grasos volátiles se absorben, en su mayor parte a través de la pared ruminal. Las células microbianas, pasan al abomaso e intestino delgado, acompañando a los componentes de los alimentos no degradados; ahí, son digeridos por las enzimas segregadas por el animal, absorbiéndose los productos de la digestión. El rumen permite a los animales el uso de alimentos fibrosos, confiere la capacidad para degradar celulosa, permite la síntesis de proteína microbiana de gran valor biológico y proporciona todos los componentes de la vitamina B (Mc Donald *et al.*, 1995).

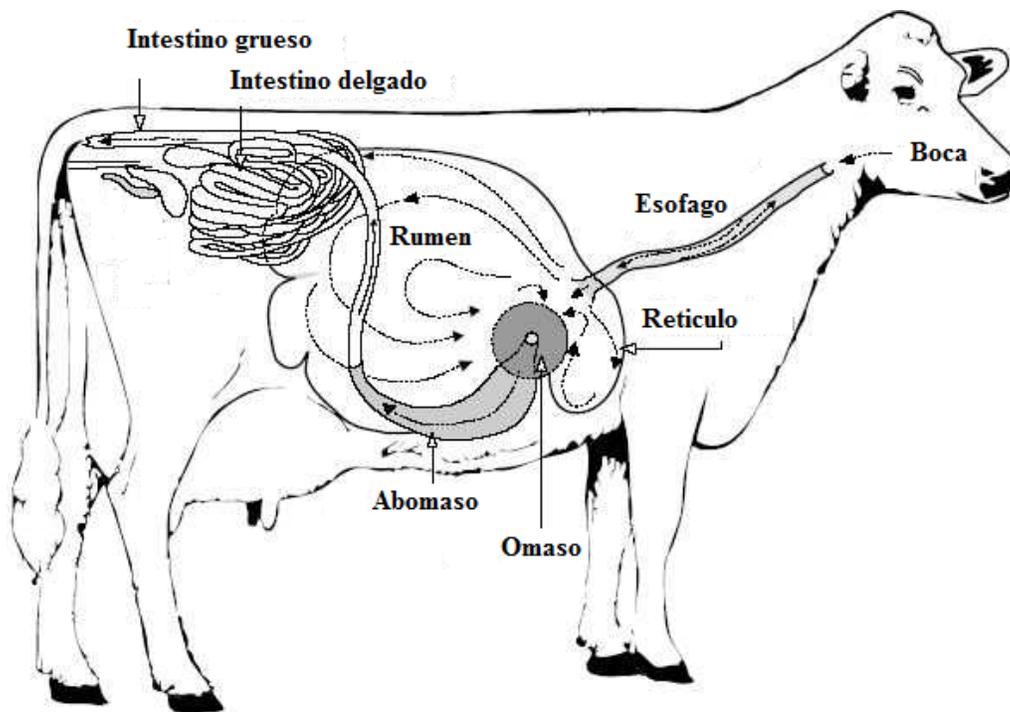


Figura 1. Sistema digestivo en rumiantes.

2.3. Nanociencia y nanotecnología.

2.3.1. Antecedentes.

Las nanociencias y las nanotecnologías son nuevas áreas de investigación y desarrollo cuyo objetivo es el control, tanto del comportamiento como de la estructura fundamental de la materia a escala atómica y molecular (Bankinter, 2005).

En 1959, en una ponencia titulada "There Is Plenty of Room at the Bottom" (Hay mucho espacio por debajo), el físico Richard Feynman propuso un nuevo campo de estudio para la ciencia: la tecnología a escala atómica y molecular. "Los principios de la física, que yo sepa, no están en contra de la posibilidad de manipular cosas átomo por átomo", afirmó Feynman ante la American Physical Society, dejando el campo abierto para quien quisiera explorarlo. Este hecho

suscitó el interés por el desarrollo de la tecnología a una escala diminuta, que continúa en la actualidad y que probablemente desemboque en una revolución silenciosa de impacto en múltiples ámbitos de nuestra vida cotidiana (Bankinter, 2005).

En primer lugar, se puede definir la nanociencia como el estudio del comportamiento y la manipulación de materiales a escala atómica o molecular para entender y explotar sus propiedades, que son significativamente distintas de aquellas propiedades a mayor escala (Bankinter, 2005), por otra parte, existen múltiples definiciones de nanotecnología, sin embargo, la versión más común la define como la habilidad para hacer cosas, medir, ver, predecir y crear a escala atómica y molecular, además de explotar las nuevas propiedades encontradas a dichas escalas (Huw, 2003).

El prefijo nano proviene del griego y significa 'enano', y en ciencia y tecnología quiere decir 10^{-9} (0,000000001). Un nanómetro (nm) es una milmillonésima parte de un metro (Bankinter, 2005). Nano es una medida, no un objeto. A diferencia de "biotecnología", donde la palabra misma explica que la vida (bios) es manipulada por el arte humano (techne), nanotecnología indica solamente el tamaño del arte. Se necesitan 10 átomos de hidrógeno alineados uno junto al otro para igualar el largo de un nanómetro (ETC Group, 2004).

El término nanotecnología fue acuñado por Norio Taniguchi, de la Universidad de Tokio, en 1974, con el objetivo de distinguir entre la ingeniería llevada a cabo a escala micro (10^{-6}) y la llevada a cabo a escala nano (10^{-9}), (Bankinter, 2005).

Para comprender el potencial de esta tecnología es clave saber que las propiedades físicas y químicas de la materia cambian a escala nanométrica: la conductividad eléctrica, el color, la resistencia, la elasticidad y la reactividad, entre otras propiedades, se comportan de manera diferente a como lo hacen en los mismos elementos a mayor escala (Bankinter, 2005).

Las partículas de nano escala se comportan de formas diferentes a las macro partículas del mismo material. Solo reduciendo el tamaño, sin cambiar la sustancia, los materiales pueden ser más fuertes o más ligeros o más solubles al agua o más resistentes al calor o conducir mejor la electricidad. Una sustancia que luce roja si mide un metro, puede ser verde si la convertimos en nano partícula; algo que es suave y maleable en la macro escala, puede ser más fuerte que el acero en la nano escala. Un sólo gramo de material catalizador, hecho de partículas de 10 nanómetros de diámetro puede ser 100 veces más reactivo que la misma cantidad del mismo material de partículas de un micrómetro de diámetro. La industria está explotando los cambios en las propiedades de los materiales en la nano escala para crear nuevos productos y nuevos mercados (ETC Group, 2004).

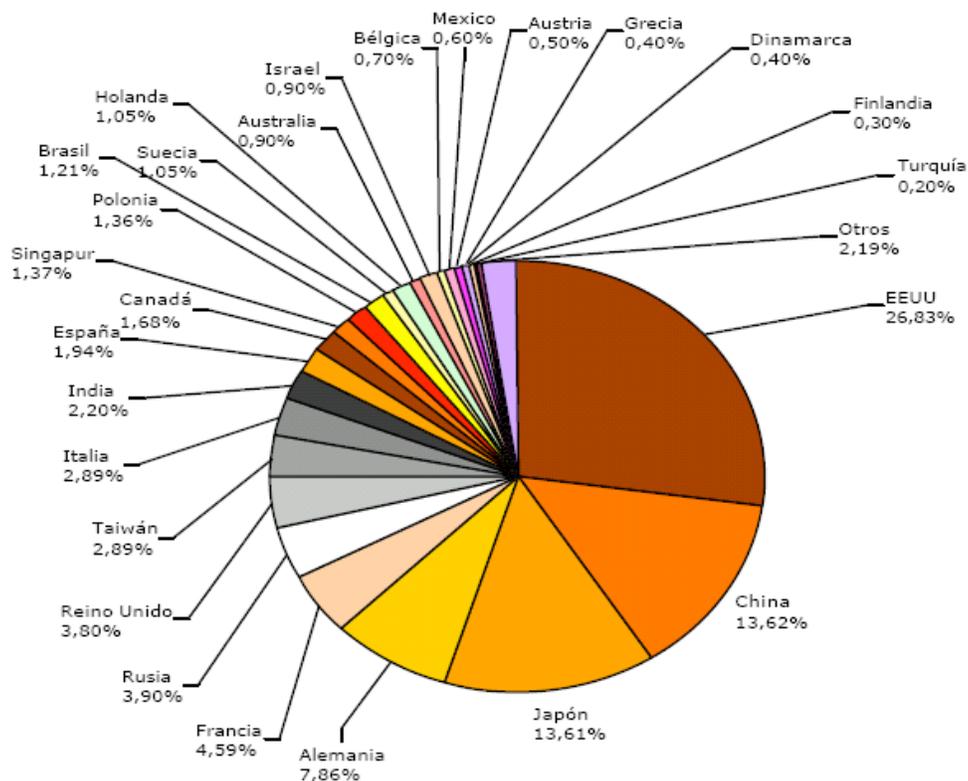


Figura 2. Distribución de las publicaciones y actas de congresos sobre nanotecnología para el periodo 2003-2004. (Bankinter, 2005).

Si relacionamos la definición realizada de nanotecnología y los aspectos que la componen con las investigaciones que se están llevando a cabo, podemos hablar de dos corrientes distintas de investigación que pueden circunscribirse al campo de la nanotecnología:

Una forma de caracterizar a la nanotecnología es distinguiendo entre el proceso de fabricación *top-down* y *bottom-up*. La tecnología *top-down* se refiere a la fabricación de estructuras a nanoescala, sin embargo, *top-down* significa más que una simple miniaturización, a un nivel nano, entra en juego diferentes leyes de la física y las propiedades de materiales tradicionales cambian. Por otra parte, la tecnología *bottom-up* (igualmente conocida como nanotecnología molecular) se enfoca a la creación de estructuras orgánicas e inorgánicas, átomo por átomo o molécula por molécula. Esta es el área de la nanotecnología que ha causado más expectativa (Huw, 2003).

Las principales áreas de aplicación de la nanotecnología se encuentran en el diseño de nuevos materiales, la electrónica, la medicina y la energía. En realidad, el diseño de nuevos materiales constituye la base para el desarrollo del resto de las áreas. El desarrollo de nuevos materiales, con propiedades hasta ahora no explotadas y a veces incluso desconocidas, es probablemente el campo más desarrollado y de mayor impacto (Bankinter, 2005). Las “materias primas” de la nanotecnología no son madera, caucho o acero. Son los elementos de la tabla periódica a partir de los cuales se constituye todo (ETC Group 2004).

Se puede afirmar que desde hace décadas existen algunos productos que se comercializan masivamente y que utilizan nanomateriales. Así, existe ropa de esquí que contiene nanofibras que repelen el agua o bolas de tenis que usan polímeros de barro que prolongan su duración hasta dos veces más que las tradicionales (Bankinter, 2005).

Además de estos avances tangibles, se ha seguido investigando con un enfoque *bottom-up*, de abajo hacia arriba, que permite la construcción de bloques de

materiales o estructuras que son diseñados y ensamblados de forma controlada, con propiedades específicas diferentes a las que hasta ahora se conocían. Así, los nanotubos, las nanopartículas, los puntos cuánticos o las nanocápsulas, son algunos de los principales materiales que ya se están produciendo, pero que aún deben superar algunas dificultades para ser fabricados a gran escala (Bankinter, 2005).

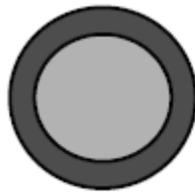
2.3.2. Procesos de asociación de fármacos a sistemas nanométricos.

Aunque no existen evidencias de que el consumo de sales orgánicas de selenio ofrezca mayores ventajas prácticas en la alimentación del ganado, ya que los suplementos inorgánicos restauran rápidamente el nivel normal de selenio con un costo económico más bajo (Underwood y Suttle, 1999), existe interés en reducir la cantidad de selenio en suplementos minerales y alimentos comerciales de animales por razones ambientales como la contaminación de suelos (Wang y Lovell, 1997) y para reducir problemas de toxicidad en animales sobredosificados. Es por eso que se deben implementar nuevas formas de administración de selenio que sean efectivas para cubrir el requerimiento de los animales, al mismo tiempo que reduzcan su excreción en heces y toxicidad, en este sentido, la utilización de selenio protegido de la degradación ruminal por nanopartículas, es una opción viable para lograrlo.

La encapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas (sabores, vitaminas o aceites esenciales), son introducidas en una matriz o sistema pared, con el objetivo de impedir su pérdida, para protegerlos de la reacción con otros compuestos presentes en el alimento o para impedir que sufran reacciones de oxidación debido a la luz o al oxígeno. Una ventaja adicional es que un compuesto encapsulado se libera gradualmente del compuesto que lo ha englobado o atrapado y se obtienen productos alimenticios con mejores características sensoriales y nutricionales, sin embargo, una de las limitaciones en

las técnicas de encapsulación son los altos costos de producción y la falta de disponibilidad de materiales que puedan utilizarse (Yañez *et al.*, 2002).

Las nanopartículas son sistemas coloidales que varían en tamaño de 1 a 1000 nm. Están divididos en dos categorías: nanocapsulas y nanoesferas (Figura 2). Las primeras son sistemas vesiculares con una cubierta polimérica y un núcleo interno. Las segundas consisten en una matriz polimérica. Sus propiedades de liberación controlada y la protección que ofrecen a los compuestos de interés, hacen a estos nanosistemas muy ventajosos en el campo de la liberación de fármacos, particularmente en el tubo gastrointestinal, donde las condiciones son muy adversas (Rieux *et al.*, 2006), además de que llegan exactamente al objetivo marcado y, por tanto, se evitan posibles efectos no deseados de los fármacos (Bankinter, 2005).



Nanocapsula



Nanoesfera

Figura 3. Diferentes tipos de nanopartículas (Delie y Blanco, 2005).

Las nanopartículas se pueden dividir en: naturales o artificiales (Figura 3), este último grupo se divide a su vez en manufacturadas, aquellas que son objeto de producción, y derivadas, aquellas que son producto de procesos industriales, de la contaminación en la carretera (Bankinter, 2005).

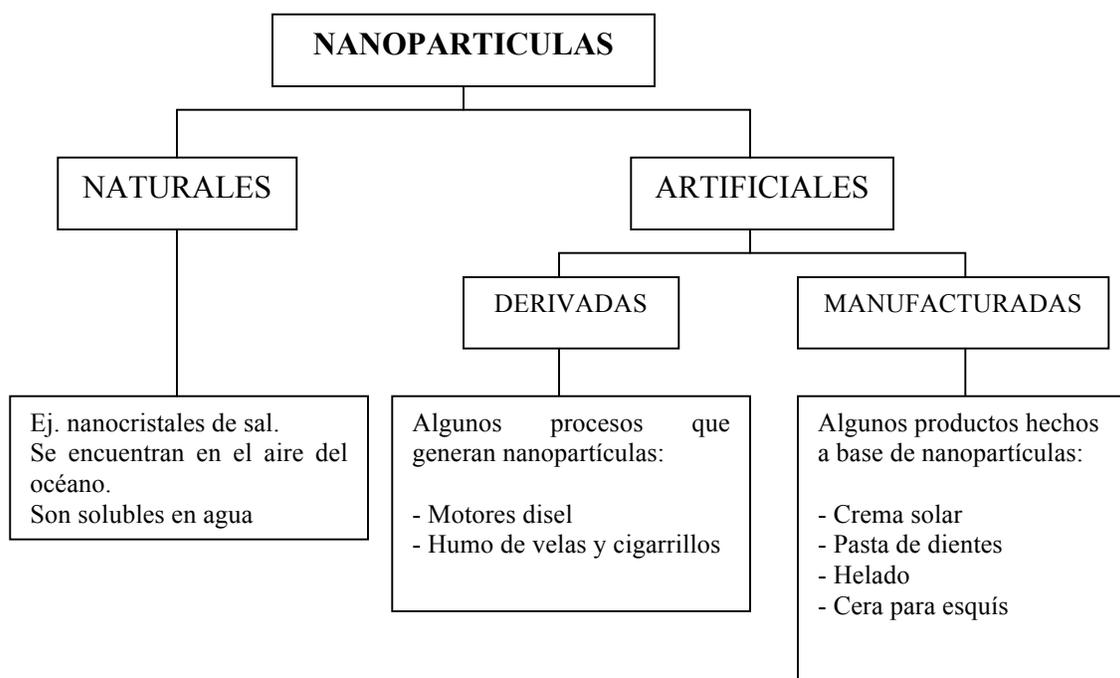


Figura 4. Clasificación de nanopartículas.

Tecnológicamente existe un gran número de métodos para manufacturar nanopartículas, permitiendo una gran variación en su estructura, composición y propiedades fisicoquímicas. La elección del método de preparación depende esencialmente del polímero y de las características de solubilidad del compuesto activo que va a ser asociado con las nanopartículas (Rieux *et al.*, 2006).

Las nanopartículas pueden ser producidas por polimerización de monómeros sintéticos, o por la dispersión de polímeros sintéticos o macromoléculas naturales (Delie y Blanco, 2005). Pueden ser utilizadas múltiples técnicas, las cuales se escogen principalmente en función de la hidrofobicidad del fármaco que se pretende encapsular (Rieux *et al.*, 2006).

El método de emulsión-evaporación para uso farmacéutico fue propuesto en un principio por Gurny *et al.* (1981) y esta basado en la patente de Vanderhoff *et al.* (1979), en la que un polímero disuelto en un solvente orgánico inmisible en agua. La solución orgánica se dispersa en una fase acuosa que contiene un

emulsificador y fácilmente forma una emulsión. Sin embargo la adición de estabilizadores es requerida frecuentemente para evitar la formación de hojuelas de polímero. La emulsificación continua bajo agitación previene el colapso de las partículas. El método de emulsión-evaporación es interesante debido a la utilización de solventes orgánicos farmacéuticamente aceptables, alta encapsulación, reproducibilidad y fácil producción a gran escala.

El método de Nanoprecipitación (Figura 4), se emplea para encapsular compuestos lipofílicos, formando nanoesferas (Rieux *et al.*, 2006). Recientemente Bilati *et al.* (2005), han adaptado esta técnica para encapsular compuestos hidrofílicos.

Esta técnica presenta numerosas ventajas, ya que es una técnica sencilla, rápida y fácil de realizar. La formación de nanopartículas es instantánea y el procedimiento completo se lleva a cabo en solo un paso. En resumen, se requieren dos solventes que sean miscibles. Idealmente, tanto el polímero como el fármaco se deben disolver en un primer sistema (el solvente), pero no en el segundo sistema (no solvente). La nanoprecipitación ocurre por una rápida desolvatación del polímero cuando la solución del polímero se agrega al no solvente. En efecto, tan pronto como el solvente que contiene el polímero se difunde en el medio dispersante, el polímero precipita, envolviendo y atrapando inmediatamente al fármaco. La nanoprecipitación a menudo permite la producción de nanopartículas pequeñas (100-300 nm) con una estrecha distribución. Este método no requiere grandes tasas de agitación, sonicación o temperaturas muy altas, condiciones que pueden dañar la estructura de proteínas. Además, no siempre se necesitan surfactantes y los solventes orgánicos tóxicos, generalmente se excluyen de la formulación Bilati *et al.* (2005).

Los agentes activos de la superficie (surfactantes) son sustancias que a bajas concentraciones, se adsorben en las superficies o interfaces de un sistema y alteran la energía libre y la tensión superficial o interfacial. Los surfactantes tienen una estructura característica, con regiones polares (hidrofílicas) como no polares

(hidrofóbicas) en la misma molécula, por lo que se dice que tienen una naturaleza anfipática (Corrigan and Healy, 2007).

Pluronic es una familia de tres bloques de copolímeros (óxido de etileno-óxido de propileno-óxido de etileno), son de considerable interés en la industria biotecnológica y farmacéutica por sus cualidades surfactantes únicas, baja toxicidad y mínima respuesta inmune (Huang *et al.*, 2001).

Dentro de los ingredientes encapsulados utilizados en alimentos se encuentran: saborizantes (especias, aceites, sazonadores y edulcorantes), acidulantes, álcalis, buffers (ac. ascórbico, cítrico, fumárico, bicarbonato), lípidos (ac. linoleico), agentes redox (blanqueadores, maduradores), enzimas, microorganismos, antioxidantes, colorantes, aceites esenciales, aminoácidos, vitaminas y minerales (Yañez *et al.*, 2002).

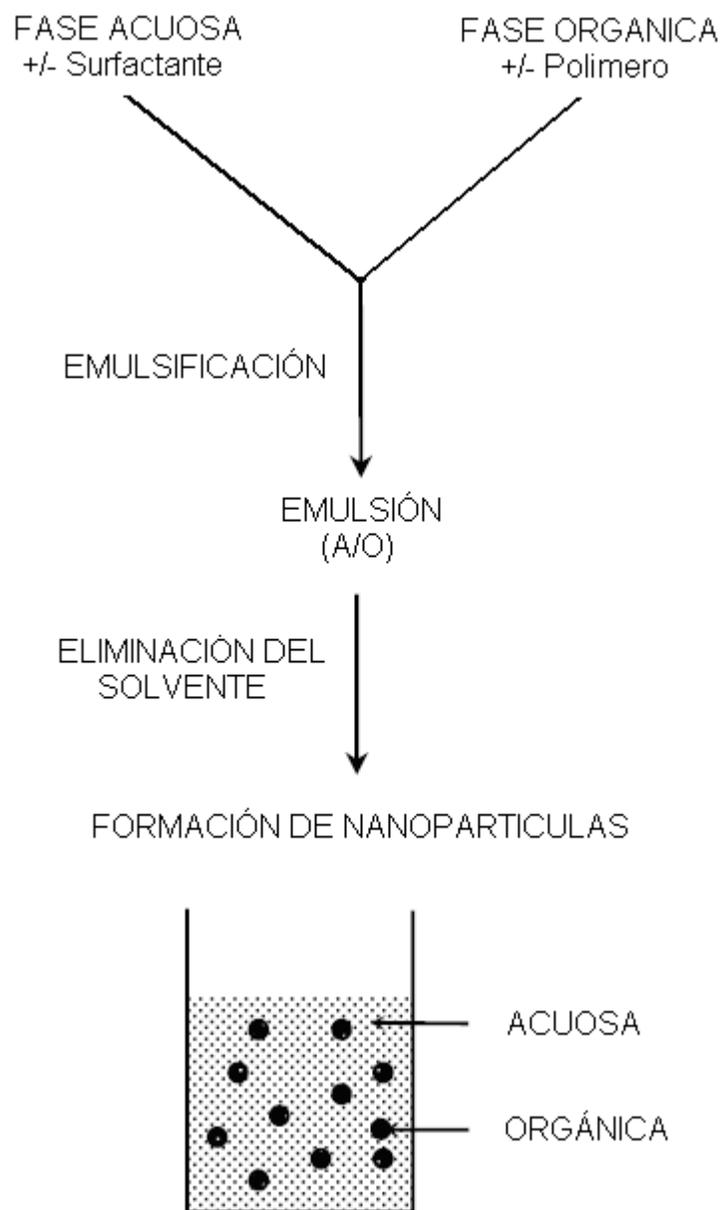


Figura 5. Preparación de nanopartículas por precipitación de polímero.

Los mecanismos de liberación de las nanopartículas se pueden llevar a cabo por una disolución normal en agua, por esfuerzos de cizalla, por temperatura, por reacciones químicas y enzimáticas, por cambios en la presión osmótica o por cambios en el pH (Yañez *et al.*, 2002).

El desarrollo de partículas sensibles al pH se atribuye a su habilidad para liberar el ingrediente activo selectivamente en diferentes partes del tubo digestivo. Los principales materiales empleados en la preparación de nanopartículas incluyen polímeros biodegradables, entre los cuales se encuentran algunos polímeros sintéticos, derivados acrílicos como el Poly(metacrilato-acido-co-etilacrilato) (Eudragit RL100 y RS 100), el cual ha sido utilizado exitosamente para la liberación controlada de principios activos en el tubo gastrointestinal.

Los polímeros de Eudragit son una serie de polímeros de acrilato y metalacrilato disponibles en diferentes formas (Figura 5). Eudragit RL y Eudragit RS son insolubles en medio acuoso, pero se disuelven en los fluidos digestivos volviéndose permeables. La permeabilidad de estos polímeros se debe a la presencia de grupos amonio cuaternarios en su estructura (Haznedar and Dortunç, 2004; Omari *et al.*, 2004). Según Pignatello *et al.* (2001), la diferencia entre Eudragit RS y RL radica únicamente en la cantidad de grupos amonio cuaternarios que contienen. Eudragit RS tiene un menor contenido de grupos cargados (4.5-6.8 % de grupos amonio) y se considera menos permeable al agua en comparación con Eudragit RL (8.8-12 % de grupos amonio).

2.3.3. Polímeros empleados en la preparación de nanopartículas.

Según Rieux *et al.* (2006) el criterio fundamental en la elección de un polímero, para la liberación controlada de un fármaco, son la biodisponibilidad, biocompatibilidad, facilidad de producción y tasa de degradación, para permitir la liberación controlada del fármaco encapsulado en nanopartículas. La naturaleza de los polímeros presentes en la formulación tiene una influencia significativa en el tamaño de partícula y el patrón de liberación. Los polímeros naturales generalmente liberan los fármacos más rápidamente que los polímeros sintéticos, los cuales pueden prolongar el periodo de liberación de días a varias semanas.

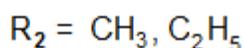
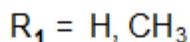
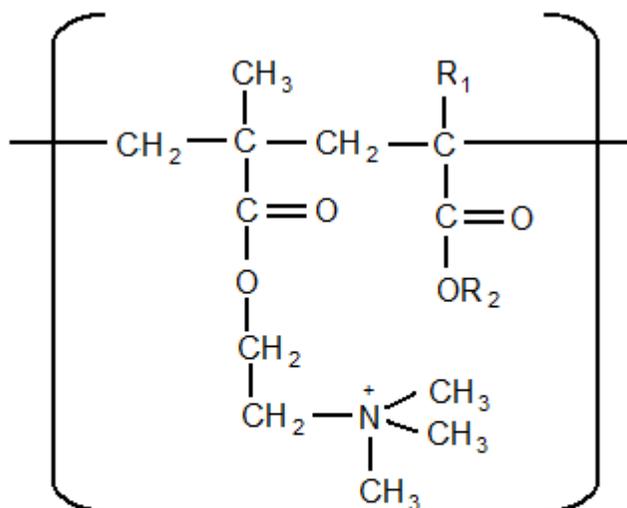


Figura 6. Estructura química de Eudragit RL y RS (Nguyen *et al.*, 2006).

Las nanopartículas formadas de polímeros, son de especial interés desde el punto de vista farmacéutico. En primer lugar, son más estables en el tubo gastrointestinal que otros vehículos coloidales como los liposomas y pueden proteger sustancias encapsuladas del ambiente gastrointestinal. En segundo lugar, el uso de varios materiales poliméricos mejora la regulación de las características fisicoquímicas (ej. hidrofobicidad, potencial zeta), las propiedades de liberación (ej. retrasar, prolongar, activar) y comportamiento biológico (ej. especificidad, bioadhesión, incremento en el consumo celular) de las nanopartículas (Rieux *et al.*, 2006).

Los polímeros empleados en la formulación de nanopartículas (Cuadro 3) pueden ser sintéticos (ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA), poli-metil-metalacrilato y poli-alcali-cianoacrilatos) o naturales (albúmina, gelatina, alginato o quitosán). El poliéster solo y en combinación con otros polímeros, son la forma más común para la preparación de nanopartículas, son altamente

biocompatibles y biodegradables. Más recientemente, se han desarrollado formulaciones que utilizan polímeros naturales (Rieux *et al.*, 2006).

Cuadro 3. Métodos de preparación de nanopartículas en función de la matriz polimérica (Rieux *et al.*, 2006).

Polímeros	Método de preparación
<i>Polímeros sintéticos</i>	
Polianoacrilato de alquilo	Polimerización de monómeros
Polimetacrilato de alquilo	
Poliestireno	
Polivinilpiridina	Nanoprecipitación
Poli- ϵ -caprolactona	
Acido polilactico	
Acido poliláctico-co-glicólico	
Polimetacrilato	Evaporación del solvente
Poli- ϵ -caprolactona	
Acido polilactico	
Acido poliláctico-co-glicólico	
Poli- β -hidroxibutirato	
Etilcelulosa	Salting out
Polimetacrilato de alquilo	
Acido polilactico	
Acido poliláctico-co-glicólico	
<i>Polímeros naturales</i>	
Albúmina	Desolvatación, desnaturalización, gelatinización iónica
Caseína	
Gelatina	
Quitosan	
Etilcelulosa	

2.3.4. Caracterización de nanopartículas.

2.3.4.1. Tamaño de partícula.

El movimiento de las partículas coloidales en un medio dispersante es una forma de movimiento Browniano. La interacción de las partículas dispersas con el medio (líquido o gas), provocan un movimiento irregular y aleatorio de las partículas a partir de su posición original en el espacio. De acuerdo con la teoría de Stokes-

Einstein, el tipo de movimiento o su velocidad, depende de la viscosidad, temperatura y tamaño molecular del medio en el que se encuentran suspendidas. Esta teoría es la base para medir el tamaño de partícula utilizando la espectrofotometría de correlación de fotones (Williams y Vaugh, 2007).

Las técnicas de dispersión de luz han sido el punto de apoyo para la determinación del tamaño de partícula y su distribución. Se han utilizado varias teorías para calcular la distribución del tamaño de partícula y el ángulo de la luz difractada, considerando que cuando la luz se dirige hacia una partícula, puede ser desviada o absorbida por la misma, lo cual dependerá de su tamaño y de la longitud de onda de la fuente luminosa (Williams y Vaugh, 2007).

La medición de la distribución del tamaño de particular utilizando la espectrofotometría de correlación de fotones, requiere diluir las dispersiones de partículas menores a 6 μm de diámetro. Es relativamente simple y no costoso realizar estas mediciones, y el análisis computarizado de los resultados es posible. La espectrofotometría de correlación de fotones esta bien adaptada para medir nanopartículas ya que toma ventaja del movimiento Browniano, el cual es exclusivo de partículas coloidales. La espectrofotometría de correlación de fotones mide la velocidad de una partícula en movimiento y correlaciona esta velocidad con su tamaño. Un láser es utilizado como fuente de radiación y se detecta la frecuencia en la variación de la dispersión. Los cambios en la frecuencia debidos, al movimiento de las partículas, son directamente relacionados a la velocidad y son utilizados para calcular el tamaño de partícula en base a la teoría del movimiento Browniano y construir una distribución del tamaño de partícula (Williams y Vaugh, 2007).

2.3.4.2. Morfología.

Debido a las limitaciones en resolución por el microscopio óptico, el microscopio electrónico juega un papel importante en la caracterización de las micro y nano

partículas. En este equipo se evalúa la morfología y el tamaño de partícula (Williams y Vaughn, 2007).

Un microscopio electrónico es aquél que utiliza electrones en vez de fotones para formar imágenes de objetos diminutos. Los microscopios electrónicos permiten alcanzar una capacidad de aumento muy superior a los microscopios convencionales (hasta 500.000 aumentos comparados con los 1000 de los mejores microscopios ópticos) debido a que la longitud de onda de los electrones es mucho menor que la de los fotones (Bozzola y Russell, 1992). El microscopio electrónico funciona con un haz de electrones generados por un cañón electrónico, acelerados por un alto voltaje y focalizados por medio de lentes magnéticas todo esto en un ambiente de alto vacío ya que los electrones necesitan un ambiente libre de las moléculas del aire. Los microscopios electrónicos sólo se pueden ver en blanco y negro puesto que no utilizan la luz (Bozzola y Russell, 1992).

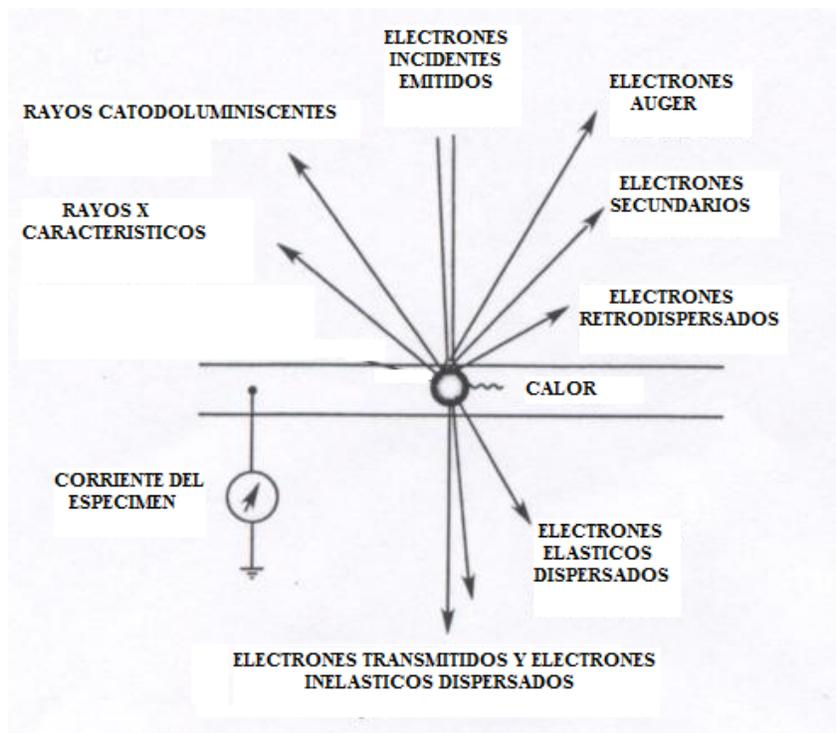


Figura 7. Asociación de la muestra con los electrones.

2.3.4.2.1. Microscopio electrónico de barrido (MEB).

Las lentes objetivas del MEB, no forman una imagen del espécimen de acuerdo a los principios ópticos, sino que estas lentes son usadas para crear una imagen desmagnificada y un haz de electrones que se barre sobre la superficie de una muestra conductora de electricidad (Figura 8). El MEB puede ser utilizado por los biólogos para estudiar las morfologías externas de células individuales o de organismos completos. Algunos MEB permiten insertar especímenes de 3 a 5 pulgadas y ser observados con una profundidad de campo de varios milímetros. De esta manera los electrones que impactan la muestra generan una variedad de señales incluyendo electrones secundarios de baja energía de las capas más superficiales de la muestra (Figura 7). Algunos de estos electrones son colectados, procesados y eventualmente traducidos en forma de series de *pixeles* en un tubo de rayos catódicos o monitor (Bozzola y Russell, 1992). El MEB de alto vacío (10^{-5} Torr) requiere que la muestra este seca y sea conductora. Una forma de hacer conductora la muestra es recubriéndola con oro o paladio, el cual se ioniza en un ionizador de metales bajo condiciones de alto vacío. La evaluación de la composición química de nanopartículas, así como la evaluación del contenido de fármaco pueden llevarse a cabo utilizando espectroscopía de energía dispersa, la cual esta disponible como un componente adicional de la unidad de microscopía (Williams y Vaughn, 2007). Las partículas cubiertas pueden observarse en el MEB en voltajes de 15 a 20 Kv para obtener grandes aumentos.

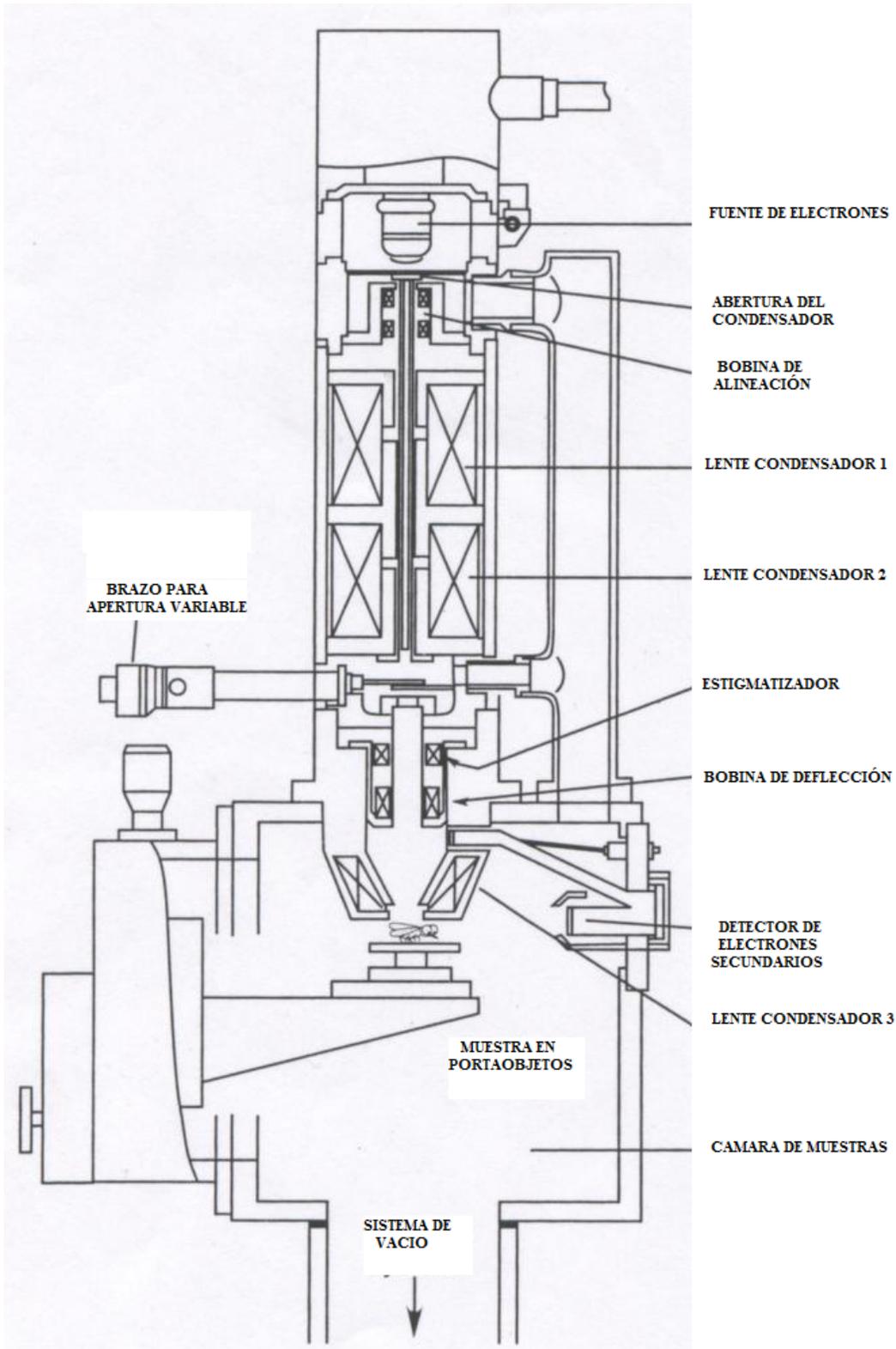


Figura 8. Diagrama de la columna del MEB.

2.3.4.2.2. Microscopio electrónico de transmisión (MET).

El MET es similar en muchos sentidos al microscopio óptico compuesto, pero el MET usa electrones. Las radiaciones electromagnéticas originadas de un filamento de tungsteno se hacen converger sobre una muestra por medio de un sistema de lentes condensadores. La iluminación transmitida a través de la muestra es centrada en una imagen y magnificada en primer lugar por un lente objetivo y posteriormente magnificada por una serie de lentes intermedios y proyectores hasta que la imagen visual es visualizada. La amplificación se produce por un conjunto de lentes magnéticas que forman una imagen sobre una placa fotográfica o sobre una pantalla sensible al impacto de los electrones (Figura 9). El MET requiere un complejo sistema de vacío para remover moléculas de aire que pueden interferir con el flujo de electrones a través de la columna (Bozzola y Russell, 1992). De forma similar a el MEB, el MET es un utilizado para evaluar el tamaño de partícula y la morfología de las nanopartículas. Esta técnica se realiza en bajo vacío (10^{-1} a 10^{-3} Torr) y requiere que la muestra este seca. El MET proporciona imágenes con mayor resolución que las del MEB, pero estas son imágenes planas que no permiten caracterizar la morfología superficial en tercera dimensión. Esta técnica requiere de la adición de un agente contrastante como el acetato de uranilo y osmio y citrato de plomo para mejorar el contraste. A diferencia de la MEB, este tipo de microscopia electrónica transmite electrones a través de la muestra en lugar de reflejarla; por lo que la muestra debe ser suficientemente delgada (100 nm) para permitir que los electrones la atraviesen (Williams y Vaugh, 2007).

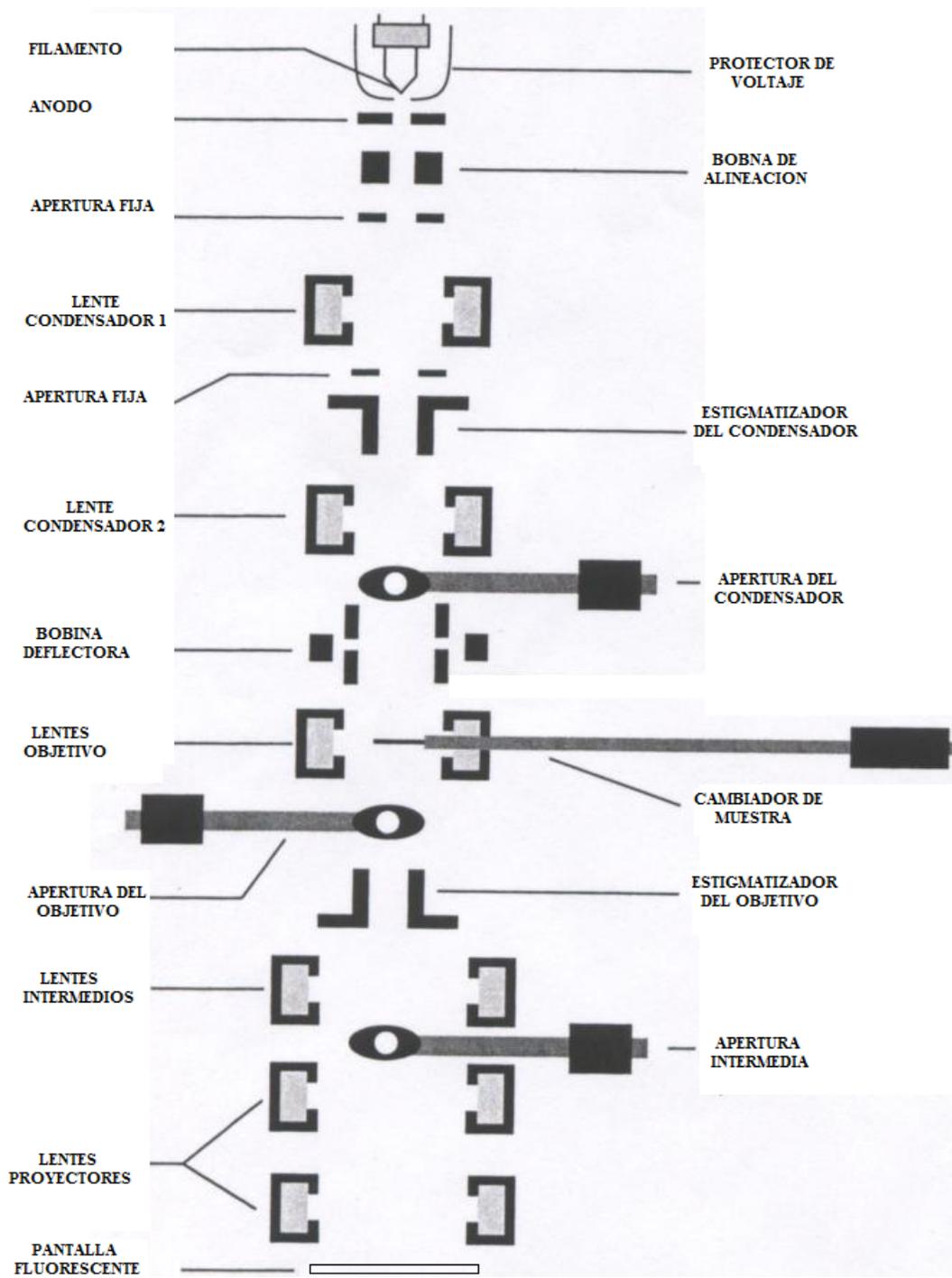


Figura 9. Diagrama de la columna del MET.

2.3.4.3. Potencial Zeta.

Una nanopartícula coloidal, generalmente es negativa, aunque también puede ser positiva y su atmósfera cargada positivamente produce un potencial eléctrico relativo a la solución. Este tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa. La caída del potencial y la distancia entre partículas es un indicador de la fuerza repulsiva entre ellas, en función de la distancia a las cuales estas fuerzas entran en juego. Un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern (Figura 6). Este potencial es conocido como el potencial zeta, el cual es importante porque puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse. El potencial zeta puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento de las partículas puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre ellas (Zeta-Meter, 1997).

La magnitud del potencial zeta, da una idea de la estabilidad del sistema coloidal. Si todas las partículas en suspensión tienen un potencial zeta marcadamente negativo o positivo, tenderán a repelerse unas a otras. Sin embargo, si las partículas tienen valores bajos de potencial zeta, no habrá fuerza que prevenga que las partículas se junten y precipiten (Malvern Instruments, 2007).

En general, la línea que divide entre una suspensión estable y una inestable que se precipita, se establece a +30 mV o -30 mV. Suspensiones con potenciales zeta mayores a +30 mV o más negativos que -30 mV, normalmente se consideran estables (Malvern Instruments, 2007).

El método más común para determinar el potencial zeta es la microelectroforesis, en la cual, los movimientos de partículas individuales, bajo la influencia de un campo eléctrico conocido se, siguen microscópicamente (Chiu and Tian, 2007).

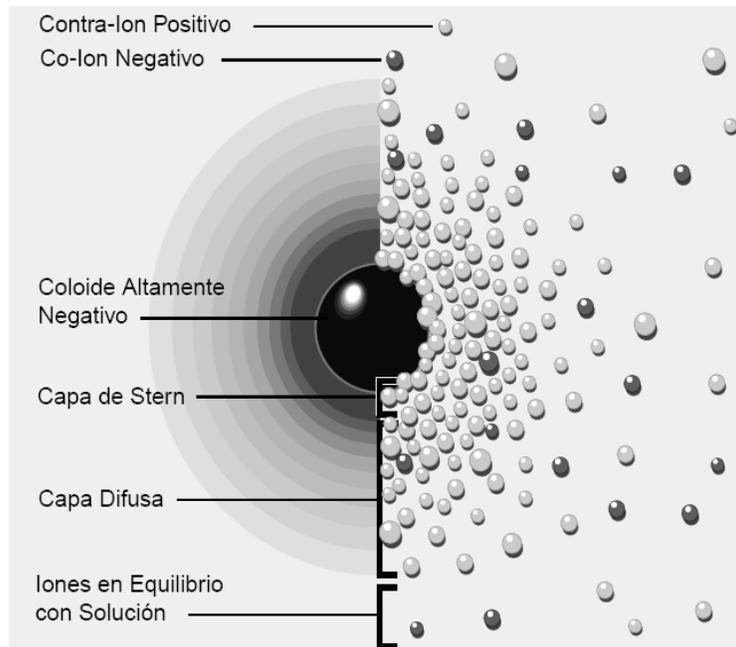


Figura 10. Modelo de doble capa de una partícula coloidal (Zeta-Meter, 1997).

2.3.4.4. Índice de polidispersidad.

El índice de polidispersidad (PDI) es una medida de la homogeneidad de las partículas y oscila entre 0 y 1. Cuanto más se acerque a cero la polidispersidad, más homogéneas serán las partículas de la suspensión (Ghosh *et al.*, 2004)

2.3.5. Transporte de nanopartículas a través de la mucosa intestinal.

La administración oral de nanopartículas, es considerada la ruta más conveniente y económica de liberación de sus compuestos, sin embargo, la absorción de nanopartículas presenta dificultades pues existen barreras a la absorción. Para que sean absorbidas, deben pasar a través de dos barreras, el moco intestinal y la mucosa, lo cual hace que la absorción sea baja y variable (Norris *et al.*, 1998).

Existen diferentes tipos de células y estructuras conformando el epitelio intestinal. El epitelio de las vellosidades intestinales está principalmente constituido de

enterocitos y exocritos caliciformes. Una de las principales funciones de los enterocitos es controlar el paso de macromoléculas y de patógenos, y al mismo tiempo, permitir la absorción de nutrientes dietarios. Los exocritos caliciformes producen, glucoproteínas de alto peso molecular, principalmente mucina suspendida en una solución de electrolitos (Rieux *et al.*, 2006), la cual, cubre la superficie intestinal con una capa adherente y continua, cuya principal función es proteger a la mucosa intestinal de sustancias dañinas potencialmente, patógenos microbianos o químicos, además de mantener una diferencia de pH entre el lumen gastrointestinal y la superficie del epitelio (Norris *et al.*, 1998).

Las nanopartículas, teóricamente pueden atravesar el epitelio intestinal por la ruta paracelular, entre las células y por la transcelular, a través de las células. En condiciones fisiológicas la ruta paracelular está limitada por el reducido tamaño de los espacios intercelulares y por las uniones estrechas entre las células epiteliales. El transporte transcelular de nanopartículas ocurre por un proceso llamado transcitosis. Comienza con un proceso de endocitosis que tiene lugar en la membrana apical de la célula y posteriormente la nanopartícula es transportada en vesículas a través de la célula y liberada en el polo basolateral (Rieux *et al.*, 2006).

Las células del epitelio intestinal tienen esta posibilidad de trasladar partículas, aunque su capacidad es considerada limitada. El transporte transcelular de nanopartículas generalmente comienza con su incorporación a través de algún mecanismo de endocitosis (pinocitosis o macropinocitosis). Ambos son procesos activos, requieren energía para la interiorización de las nanopartículas. La macropinocitosis es un proceso activo dependiente de actina, pero no está mediado por receptores. Se pueden interiorizar grandes cantidades de fluido conteniendo nanopartículas por macropinocitosis, con formación de vesículas de varios tamaños pero todas menores de 5 μm (Rieux *et al.*, 2006).

Han sido identificadas varias propiedades que influyen en la absorción de nanopartículas, incluyendo su carga, la hidrofobicidad de su superficie y su

tamaño (Norris *et al.*, 1998). La membrana de las células epiteliales y el tubo gastrointestinal son lipoproteicos, por lo cual, se prevé que nanopartículas hidrofóbicas tienen mayor absorción, en comparación con partículas hidrofílicas. La eficiencia de absorción de partículas de hasta 100 nm en el tubo gastrointestinal es 15 a 250 veces mayor que la de nanopartículas de más tamaño, por lo que la preparación de nanopartículas menores de 100 nm incrementa la absorción (Wang *et al.*, 2004).

Esta claro que la absorción de nanopartículas es baja y variable. Las múltiples barreras físicas y fisiológicas presentes en el tracto gastrointestinal, asociadas con consideraciones especiales que necesitan las nanopartículas, disminuyen su absorción, pero es insignificante. Las partículas más pequeñas ($\leq 5 \mu\text{m}$) son absorbidas y parecen entrar al sistema circulatorio. La absorción de micropartículas de hasta $5 \mu\text{m}$ a través de la mucosa celular en un principio se consideraba imposible, actualmente es generalmente aceptado que pueden atravesar exitosamente la barrera epitelial, aunque los mecanismos por los que se lleva a cabo siguen causando controversia (Norris *et al.*, 1998).

2.2.6. Expectativas de desarrollo en la nanotecnología pecuaria.

En el ámbito de la producción animal, la nanotecnología presenta un interesante potencial en diferentes campos relacionados con el control de la salud o el monitoreo de funciones biológicas.

Si un animal resulta afectado por una enfermedad, pueden pasar días e incluso semanas o meses antes de que los signos se hagan evidentes. A esas alturas, la infección puede haberse extendido lo suficiente como para hacerse incontrolable y acabar con la vida del animal afectado.

La nanotecnología opera a la misma escala que los virus o las bacterias (Cuadro 4) y por lo tanto mantiene el potencial para la detección y erradicación tempranas

de las enfermedades que producen. Por ejemplo, un sistema de tratamiento inteligente podría consistir en un dispositivo en miniatura implantado en el animal que muestrea saliva regularmente. Mucho antes de que aparezca la fiebre el sistema integrado de detección y control detectaría la presencia de la enfermedad (Scott, 2005).

Cuadro 4. Comparación de escalas nanométricas en estructuras biológicas (Scott, 2005).

Estructuras biológicas	Tamaño (nm)
Leucocitos	10, 000
Bacterias	1, 000-10,000
Virus	75-100
Proteínas	5-50
ADN	~ 2
Átomo	~ 0.1

También se han desarrollado experimentalmente nanotubos, que implantados bajo la piel en vacas de leche podrán ser utilizados como sensores en tiempo real de los niveles de hormonas. Esto permitirá conocer con precisión el estado del ciclo reproductivo del animal (Scott, 2005).

Desde la perspectiva del tratamiento, se han utilizado nanopartículas para introducir fármacos y genes en las células afectadas por una enfermedad o bien para identificar y destruir determinadas células. En este último caso, se han empleado nanocristales cuánticos, elementos que se diseñaron en los años 80 para aplicaciones ópticas. Cuando uno de estos cristales es excitado remite luz fluorescente en una longitud de onda determinada que depende directamente del tamaño del cristal. Si estos nanocristales son inyectados en el torrente circulatorio de un animal pueden detectar células que funcionan mal y ponerlas en evidencia mediante iluminación específica. Igualmente se han diseñado nanopartículas que pueden ser inyectadas en la sangre de un animal, y concentrarse en torno a un

tumor. Si se sitúa al animal cerca de la luz infrarroja, las nanopartículas absorben rápidamente esta energía y se calientan hasta los 55°C, quemando el tumor sin dañar los tejidos cercanos (Hirsch *et al.*, 2003).

El desarrollo de tratamientos inteligentes a escala nanométrica, plantea la posibilidad de diseñar dispositivos que contienen diminutas dosis de fármacos u hormonas convenientemente empaquetadas que liberarían su contenido hasta alcanzar a las células objetivo en el animal (Scott, 2005).

Estos sistemas, conocidos como “dosificadores inteligentes” deben poseer la combinación de algunas de las siguientes propiedades; control temporal, autorregulación o regulación remota, capacidad de ser preprogramados y de reconocer sus tejidos blanco. Estos dosificadores funcionarían según los mismos principios que regulan la inyección de combustible en los modernos motores de explosión, los cuales mediante sensores ajustan de manera precisa y continua el aporte de gasolina (Scott, 2005).

Otro interesante campo de aplicación son los nanosensores biodegradables. Estos podrán ser implantados en los animales y permitirán su localización constante, así como la monitorización de su estado de salud, enviando la información a un computador central. Igualmente, podrán ser utilizados en el control de productos animales, ya que permitirían la detección de cantidades muy pequeñas de contaminantes, virus o bacterias en la cadena alimentaria (Scott, 2005).

Las nanopartículas se están ensayando en la actualidad para dosificar de manera más eficaz sustancias atrayentes que incrementan la apetencia en los alimentos (Scott, 2005).

La nanotecnología es parte del futuro en la producción animal. Esta tecnología tiene un potencial enorme para beneficiar a la agricultura, la ganadería y los sistemas alimenticios. Sin embargo, como sucede con cualquier nueva tecnología,

existe la responsabilidad ética de utilizarla prudentemente y de reconocer sus riesgos potenciales e impredecibles que pueden venir de la mano con sus aplicaciones positivas (Scott, 2005).

III. JUSTIFICACION

El selenio no se absorbe en rumen y abomaso, el principal sitio de absorción es el intestino delgado. Se cree que la baja absorción de selenio en rumiantes se debe a la reducción del selenio de la dieta a formas insolubles en el ambiente ruminal, como selenio elemental y selenuros; es por esto que se deben desarrollar y evaluar nuevas formas de suplementar en forma eficiente el selenio en la dieta de los rumiantes. La incorporación del selenio a sistemas nanométricos capaces de liberar controladamente su contenido en duodeno, puede representar una alternativa para mejorar la disponibilidad y absorción de este mineral.

IV. HIPOTESIS

Las nanopartículas formadas con polímeros sensibles a pH, resulta una alternativa que puede mejorar la disponibilidad de selenito de sodio en rumiantes, a través de su liberación en ambientes de pH ácido como el que caracteriza al abomaso y el duodeno.

V. OBJETIVOS

Objetivos generales

- Estudiar la influencia de la proporción de Eudragit RL 100 y RS 100, tipo de solvente, y método de preparación de nanopartículas de selenito de sodio sobre sus características fisicoquímicas y morfológicas a fin de optimizar el proceso de nanoencapsulación.
- Estudiar el comportamiento de perfiles de liberación de selenio de nanopartículas de selenito de sodio en función del pH del medio de disolución.

Objetivos particulares

- Obtener nanopartículas de selenito de sodio variando la proporción de Eudragit RL 100 y RL 100, el tipo de solvente y su método de preparación.
- Determinar las características fisicoquímicas (porcentaje de encapsulación, índice de polidispersidad, y potencial z) y morfológicas (tamaño y forma) de las nanopartículas obtenidas bajo diferentes condiciones para optimizar el proceso de nanoencapsulación.
- Determinar los perfiles de liberación de selenio *in vitro* en función del pH del medio de disolución de las nanopartículas de selenito de sodio optimizadas.

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1. Fabricación de nanopartículas.

La elaboración de nanopartículas de selenito de sodio se realizó en las instalaciones del Laboratorio Experimental Multidisciplinario Farmacia, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM.

6.1.1. Nanopartículas cargadas de selenio.

Se prepararon nanopartículas conteniendo selenito de sodio por los métodos de emulsión-evaporación y de nanoprecipitación, a fin de evaluar sus características fisicoquímicas y morfológicas.

6.1.1.1. Método de Emulsión - Evaporación.

6.1.1.1.1. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en proporción 30:70 y solvente acetona.

Se disolvieron 60mg de Eudragit RL y 140 mg de Eudragit RS en 16 mL de acetona, agitando con ultraturrax a 9500 rpm (solución orgánica). Posteriormente se disolvieron 20 mg de selenito de sodio en 52 mL de solución Pluronic al 0.5% m/v (solución acuosa), se agregó la solución orgánica a la solución acuosa utilizando una jeringa y se mantuvo bajo agitación magnética (500 rpm) durante 3 minutos. Posteriormente se agitó con ultraturrax (9500 rpm) durante tres minutos y finalmente se eliminó la acetona calentando a 70 °C durante 30 minutos con agitación magnética.

6.1.1.1.2. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en proporción 40:60 y solvente acetona

Se disolvieron 60mg de Eudragit RL y 140 mg de Eudragit RS en 16 mL de acetona agitando con ultraturrax a 9500 rpm (solución orgánica). Posteriormente

se disolvieron 20 mg de selenito de sodio en 52 mL de solución Pluronic al 0.5% m/v (solución acuosa), se agregó la solución orgánica a la solución acuosa utilizando una jeringa y se mantuvo bajo agitación magnética (500 rpm) durante 3 minutos. Posteriormente se agitó con ultraturrax (9500 rpm) durante tres minutos y finalmente se eliminó la acetona calentando a 70 °C durante 30 minutos con agitación magnética.

6.1.1.1.3. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en proporción 30:70 y solvente etanol.

Se disolvieron 60mg de Eudragit RL y 140 mg de Eudragit RS en 16 mL de etanol agitando con ultraturrax a 9500 rpm (solución orgánica). Posteriormente se disolvieron 20 mg de selenito de sodio en 52 mL de solución Pluronic al 0.5% m/v (solución acuosa), se agregó la solución orgánica a la solución acuosa utilizando una jeringa y se mantuvo bajo agitación magnética (500 rpm) durante 3 minutos. Posteriormente se agitó con ultraturrax (9500 rpm) durante tres minutos y finalmente se eliminó el etanol calentando a 70 °C durante 30 minutos con agitación magnética.

6.1.1.1.4. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en proporción 40:60 y solvente etanol.

Se disolvieron 60mg de Eudragit RL y 140 mg de Eudragit RS en 16 mL de etanol agitando con ultraturrax a 9500 rpm (solución orgánica). Posteriormente se disolvieron 20 mg de selenito de sodio en 52 mL de solución Pluronic al 0.5% m/v (solución acuosa), se agregó la solución orgánica a la solución acuosa utilizando una jeringa y se mantuvo bajo agitación magnética (500 rpm) durante 3 minutos. Posteriormente se agitó con ultraturrax (9500 rpm) durante tres minutos y finalmente se eliminó el etanol calentando a 70 °C durante 30 minutos con agitación magnética.

6.1.1.2. Método de Nanoprecipitación

Las nanopartículas cargadas de selenio se prepararon por el método de nanoprecipitación descrito por Fessi (Fessi *et al.*, 1989). Se disolvieron 400 mg de Eudragit RL 100 y 600 mg de Eudragit RS en 10 mL de etanol, colocándolos en un sistema de sonicación (Transsonic 570/H, ELMA) durante 15 minutos (solución orgánica). Posteriormente se disolvieron 200 mg de selenito de sodio en una solución acuosa (20 ml) de Pluronic F68 al 0.5 % m/v. La solución orgánica se inyectó a la solución acuosa manteniéndola en agitación magnética (500 rpm) durante 5 minutos y se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente durante 24 horas.

6. 1. 2. Nanopartículas cargadas de fluoresceína.

Se utilizó el método de nanoprecipitación. Se disolvieron 500 mg de Eudragit RL y RS (200 mg y 300 mg respectivamente) en 5 mL de etanol, colocándolos en un sistema de sonicación durante 15 minutos (solución A). Posteriormente se disolvieron 10 mg de fluoresceína (colorante) en 5 mL de etanol manteniéndola en agitación magnética (500 rpm) y a una temperatura de 60 °C (solución B). Se mezclaron ambas soluciones (A y B) y se mantuvieron en agitación durante 2 minutos (solución C). En seguida, se inyectó una solución acuosa (40 mL) de Pluronic F68 al 0.5 % m/v a la solución C manteniéndola en agitación magnética (500 rpm) durante 5 minutos. Se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente durante 24 horas.

6.2. Caracterización de las nanopartículas.

La caracterización de las nanopartículas se llevó a cabo en las instalaciones del Laboratorio Experimental Multidisciplinario Farmacia, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM y en la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados.

6.2.1. Eficiencia de encapsulación de selenio.

Las nanopartículas se centrifugaron por una hora a 27, 000 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en 10 mL de agua desionizada. Tanto el sobrenadante como el pellet resuspendido se sometieron a una digestión ácida, adicionando a cada uno, ácido nítrico concentrado (10 ml) y calor (80 °C), hasta que adquirieran un aspecto transparente (30 min aproximadamente). Posteriormente se analizaron para determinar su concentración de selenio por medio de espectrofotometría de absorción atómica (SpectrAA, Varian).

6.2.2. Tamaño de partícula

El tamaño de partícula, el potencial z y el índice de polidispersidad se determinaron utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK) y colocando 1 mL de nanopartículas en la celda (Clear disposable zeta cell, mod. DTS1060C). Como regla si se quiere que exista repulsión entre las nanopartículas y no se aglomeren, se debe asegurar que el valor de potencial z sea mayor de +30 mV o menor a -30 mV, esto asegura que el sistema será estable en el tiempo. Los valores del índice de polidispersidad están dados en un rango de 0 a 1; un valor más alto indica una menor homogeneidad en la distribución del tamaño de partícula.

6.2.3. Morfología de nanopartículas.

6.2.3.1. Nanopartículas preparadas por el método de emulsión – evaporación.

Inmediatamente después de elaborar las nanopartículas, se tomaron 10 µL, se depositaron en tubos tipo Eppendorf de 2 mL y se llevaron a un volumen de 1 mL con agua desionizada. Se agitó con un vortex, se tomaron dos gotas de 20 µL, una se depositó en un portamuestras sobre cinta conductiva de carbón y otra en un portamuestras sin cinta conductiva. Se dejaron secar por 24 h a temperatura

ambiente y se cubrieron con una capa de oro por 7 min. en una ionizadora de metales (Ion Sputter JFC-III00). Finalmente, se observaron al microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-35C).

6.2.3.1. Nanopartículas preparadas por el método de nanoprecipitación.

Inmediatamente después de elaborar las nanopartículas, se tomaron 10 μL , se depositaron en tubos tipo Eppendorf de 2 mL y se llevaron a un volumen de 1 mL con agua desionizada. Se agitó con un vortex, se tomó una gota de 20 μL y se depositó en un portamuestras. Por otro lado las nanopartículas restantes se centrifugaron a 27,000 rpm durante una hora. El pellet formado se resuspendió en 50 mL de agua desionizada se tomaron 10 μL , se depositaron en tubos tipo Eppendorf de 2 mL y se llevaron a un volumen de 1 mL con agua desionizada. Se agitó con un vortex, se tomó una gota de 20 μL y se depositó en un portamuestras. Las muestras se dejaron secar por 24 hrs. a temperatura ambiente y se cubrieron con una capa de oro por 7 min. en una ionizadora de metales (Ion Sputter JFC-III00). Finalmente, se observaron al microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6390).

6.3. Disolución de nanopartículas y estudios de liberación.

6.3.1. Preparación de soluciones buffer.

Las soluciones buffer se prepararon siguiendo los métodos propuestos por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (200). En seguida se describen los pasos para obtener buffers con pH 2, 3 y 4.

SA FOSFATOs pH 2.0 (Fosfato dibásico de sodio-fosfato monobásico de potasio).

En un matraz volumétrico de 1000 mL, se disolvieron 8.95 g de fosfato dibásico de sodio y 3.40 g de fosfato monobásico de potasio en 900 ml de agua desionizada. Se ajusto el pH con acido fosfórico y se llevó a volumen con agua desionizada.

SA FOSFATOs pH 3.0 (Fosfato dibásico de sodio).

Se disolvieron 7.1 g de fosfato dibásico de sodio anhidro en aproximadamente 800 ml de agua desionizada, se ajustó el pH a 3.0 con acido fosfórico y se ajustó el volumen para obtener 1000 mL de solución.

SA DE ACETATO DE SODIO-ACIDO ACETICO pH 4.0

En un matraz volumétrico de 1000 ml se disolvieron 5.44 g de acetato de sodio trihidratado en 900 ml de agua desionizada. Se agregó acido acético glacial para ajustar el pH a 4.0 y se llevó a volumen con agua desionizada.

6.3.2. Prueba de disolución a diferente pH.

En un vaso de precipitados de 1000 mL se agregaron 900 mL de agua desionizada y se colocó en una parrilla de agitación. Se preparó un sistema de diálisis colocando el volumen total de la suspensión de nanopartículas después de su elaboración. Esta prueba solo se realiza para las nanopartículas producidas por el método de nanoprecipitación. El sistema de diálisis se preparó depositando la suspensión de nanopartículas en una membrana de diálisis de celulosa regenerada (Spectra/Por®) con un peso molecular de 3500 y se sello con pinzas para membrana (Spectra/Por®). El sistema de diálisis se colocó en el vaso de precipitados y se mantuvo bajo agitación magnética durante 30 min. Para purificar las nanopartículas eliminando el selenito de sodio que no fue encapsulado. Se prepararon 4 sistemas de diálisis que contenían 5 mL cada uno de la suspensión

de nanopartículas purificadas, posteriormente y se colocaron en vasos de precipitados de 250 mL que contenían 200 mL de soluciones buffer con diferente pH (2, 3 y 4) y agua desionizada. Se mantuvieron bajo agitación magnética a 37 °C y se tomaron muestras de los buffers y agua en intervalos de 15 min durante 2 hrs. El volumen de la muestra fue de 20 mL y se repusieron después de tomar la muestra adicionando el mismo volumen de buffer o agua retirado. Las muestras fueron analizadas para determinar su contenido de selenio mediante espectrofotometría de absorción atómica (SpectrAA, Varian).

6.4. Análisis estadístico.

6.4.1. Propiedades fisicoquímicas y morfológicas

6.4.1.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar donde los tratamientos corresponden a los diferentes sistemas y las unidades experimentales fueron los lotes de nanopartículas. Cada tratamiento contó con tres repeticiones.

6.4.1.2. Análisis estadístico

En relación con los datos del estudio de las propiedades fisicoquímicas (potencial z y PDI) y morfológicas (tamaño), la información fue procesada con el programa estadístico SAS V8 (1999), mediante análisis de varianza usando el procedimiento GLM y la comparación de medias se realizó con una prueba de TUKEY con un nivel de significancia de 0.05. El modelo estadístico usado es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable respuesta en tratamiento i, repetición j.

μ = Media general

T_i = Efecto del tratamiento i.

ε_{ij} = Error aleatorio $\sim N(0, \sigma^2)$

6.4.2. Estudios de liberación de selenio

6.4.2.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4x9; cuatro valores de pH (2, 3, 4 y 6) y nueve tiempos (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 y 120 minutos), con tres repeticiones cada uno.

6.4.2.2. Análisis estadístico

En relación con los datos del estudio de liberación de selenio, la información fue procesada con el programa estadístico SAS V8 (1999), mediante análisis de varianza usando el procedimiento GLM y la comparación de medias se realizó con una prueba de TUKEY con un nivel de significancia de 0.05. El modelo estadístico usado fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable respuesta en la repetición k, nivel j de B y nivel i de A.

μ = Media general

A_i = Efecto del factor A al nivel i.

B_j = Efecto del factor B al nivel j.

$(AB)_{ij}$ = Efecto de la interacción AB al nivel i, j.

ε_{ijk} = Error aleatorio $\sim N(0, \sigma^2)$

Para la comparación de medias de los diferentes métodos (nanoprecipitación y emulsión-evaporación), solventes (etanol y acetona) y proporciones de polímeros (Eudragit RL 100 y RS 100 en proporciones 30:70 y 40:60) se realizó una prueba de t de student con un $\alpha = 0.05$.

Por otra parte, se realizó un análisis de correlación entre las variables evaluadas y se obtuvieron modelos de regresión utilizando el paquete estadístico SPSS 14.0.

VII. RESULTADOS Y DISCUSION.

7.1. Nanopartículas de selenito de sodio.

7.1.1. Método de Emulsión – Evaporación

7.1.1.1. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en proporción 30:70 y solvente acetona

Las partículas producidas por este método (Cuadro 5), presentaron un tamaño de partícula de 44.82 nm, con un PDI de 0.379 lo cual indica una distribución adecuada en el tamaño de partícula. El PDI puede tomar valores de 0 a 1; los más cercanos a uno indican una distribución menos homogénea del tamaño de partícula. El potencial z fue de 26.70 mV, valor que se encuentra por debajo de lo recomendado (30 mV) para que el sistema sea estable y no se aglomere (Malvern Instruments, 2007). Los valores de potencial z y de PDI fueron similares a los obtenidos con el método E. E. Acetona 40:60. Las tres variables medidas para este sistema, obtuvieron los valores más altos, con respecto a los valores mínimos dentro del método emulsión-evaporación ($P \leq 0.05$). El tamaño de partícula se incrementó en 29.38%, el potencial z en 38.34% y el PDI en 62.66%. El porcentaje de encapsulación fue de 28.3%, considerado un valor bajo en comparación con otros estudios. Ubrich *et al.* (2005), prepararon nanopartículas de ciclosporina A utilizando Eudragit RL 100 y RS 100 para utilizarlas en conejos, obteniendo porcentajes de encapsulación de 70 y 85 % para Eudragit RL 100 y Eudragit RS 100, sin embargo la encapsulación la realizaron empleando el método de nanoprecipitación, además, la ciclosporina A es un compuesto hidrofóbico lo cual pudo favorecer la asociación del fármaco con el polímero. Nguyen *et al.* (2006), prepararon nanopartículas de Eudragit RL 100 y RS 100 empleando el método de emulsión-difusión y los solventes butanona, acetato de metilo y cloroformo, pero sin la utilización de agentes surfactantes, los cuales reducen la tensión superficial y funcionan como estabilizadores en el proceso de elaboración de nanopartículas. Las nanopartículas producidas con Eudragit RL 100 presentaron un tamaño de

partícula de 66 y 75 nm utilizando butanona y acetato de metilo respectivamente, con un PDI de 0.140 mientras que las nanopartículas producidas con Eudragit RS 100 presentaron un tamaño de partícula de 121 y 127 nm con butanona y acetato de metilo respectivamente, con un PDI de 0.170. Las nanopartículas preparadas con cloroformo presentaron aglomeración como consecuencia de la baja estabilidad del sistema. Esto es debido a la solubilidad parcial en agua de los solventes butanona y acetato de metilo, ambos reducen la tensión superficial e incrementan la estabilidad de las nanopartículas, mientras que solventes poco solubles en agua como el cloroformo no presentan esta característica. El valor mas alto de PDI (0.379) para partículas con selenito de sodio utilizando acetona, puede ser debido a la baja solubilidad que presenta este solvente en agua, por lo que no reduce satisfactoriamente la tensión superficial y como consecuencia, la estabilidad del sistema disminuye.

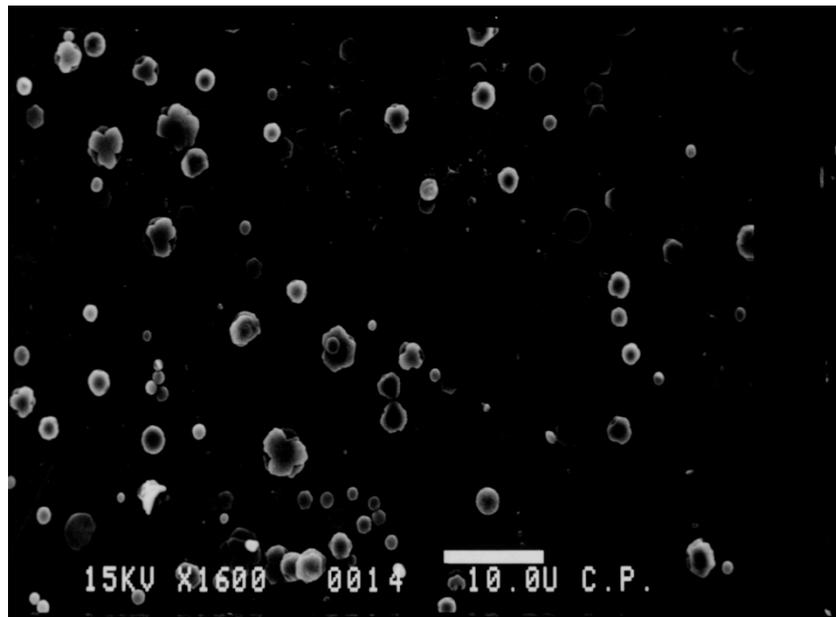


Figura 11. Micrografía electrónica de barrido de partículas de selenito de sodio generadas por emulsión-evaporación, utilizando acetona y una proporción Eudragit RL 100 : RS 100 (30:70).

Las imágenes obtenidas para todos los diferentes métodos de preparación corresponden a las muestras que se prepararon sin utilizar cinta conductiva, ya

que de esta manera se obtuvieron mejores imágenes. El estudio de las partículas con MEB, permitió caracterizar la forma y tamaño (Figura 11). Se observaron partículas sólidas, individuales y aglomeradas, de formas esféricas, irregulares y poliédricas (0.6 – 5 μm). Es posible que las formas irregulares fueran generadas por la aglomeración de partículas durante el proceso de producción. El tamaño de las partículas observadas no corresponde al obtenido con el zeta sizer. Es probable que las partículas más pequeñas no pudieran ser visualizadas debido a que fueron diluidas en 1:100 y no se utilizó otro procedimiento para aislarlas, por lo que puede existir una gran cantidad de polímero libre en el cual las nanopartículas quedan atrapadas impidiendo su caracterización. Lamprecht *et. al.* (2004) utilizaron el método de emulsión - evaporación para producir micropartículas de tacrolimus las cuales caracterizaron exitosamente en el MEB, estas resultaron esféricas y con un tamaño de partícula de 30 – 60 μm facilitando su caracterización. Los mismos autores observaron que al disminuir la temperatura con un baño de hielo al momento de preparar las nanopartículas, se generaban partículas más lisas que cuando se preparaban a temperatura ambiente, ya que de este modo se producían partículas porosas.

7.1.1.2. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en proporción 40:60 y solvente acetona

Las nanopartículas producidas por este método presentaron un porcentaje de encapsulación de 21.76%, mientras que otros autores (Galindo *et al.*, 2005), han reportado valores entre 50 a 88% de encapsulación utilizando un polímero de la misma familia, Eudragit L100-55, para producir nanopartículas de ibuprofen, con los métodos de nanoprecipitación y salting-out. El tamaño de partícula, potencial z y PDI, tomaron valores de 42.67 nm, 25.93 mV y 0.374 respectivamente, todos presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) con los demás sistemas (Cuadro 5). El PDI refleja una distribución aceptable del tamaño de partícula, ya que entre más cercano a cero sea este valor, más homogéneas serán las partículas. El potencial z fue similar ($P > 0.05$) a los sistemas E. E. Acetona 30:70 y E. E. Etanol

40:60; éste resultó menor al recomendado (30 mV) para mantener la estabilidad del sistema (Malvern Instruments, 2007).

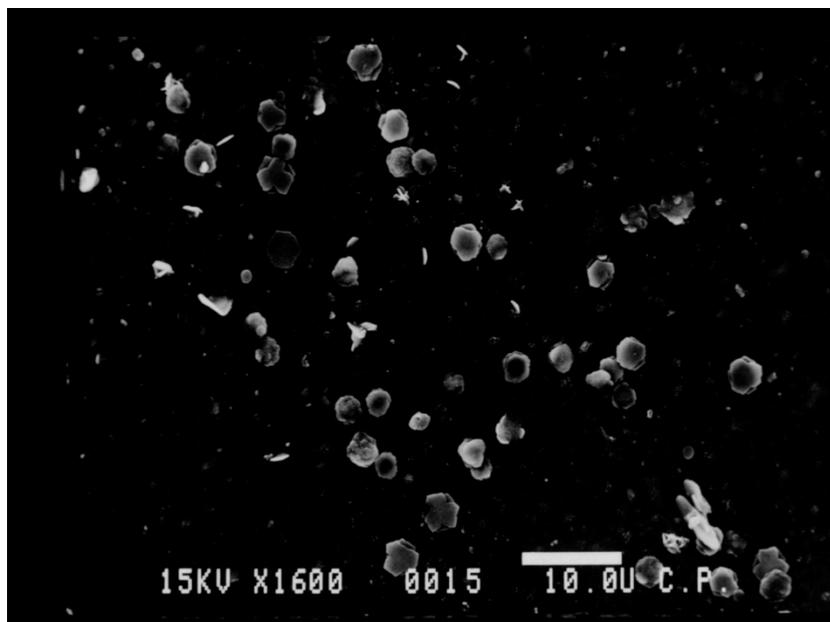


Figura 12. Micrografía electrónica de barrido de partículas de selenito de sodio generadas por emulsión- evaporación, utilizando acetona y una proporción Eudragit RL 100 : RS 100 (40:60).

En el MEB (Figura 12), se observaron partículas de 1 - 4 μm de formas irregulares y poliédricas. Es posible que el método de preparación, favoreció la aglomeración de estas partículas en estructuras de mayor tamaño, ya que el zeta sizer registró un tamaño de partícula promedio de 42.67 nm; Es probable que partículas de menor tamaño no fueron observadas en el microscopio debido a que se encontraban inmersas en el polímero. Cabe mencionar que estas partículas solo se diluyeron 1:100 y no fueron purificadas mediante ningún otro procedimiento, por lo que puede existir exceso de polímero el cual interfiere con las observaciones en el MEB. Jain *et. al.* (2006) utilizaron una técnica similar (doble emulsión- evaporación) a la utilizada en este estudio y el polímero Eudragit L100 para producir micropartículas de insulina. Se obtuvieron imágenes en MEB que presentaban partículas esféricas con una superficie lisa; antes de observar las micropartículas al MEB, estas fueron aisladas mediante centrifugación (10, 000 g x

10 min) y lavadas tres veces con agua destilada, posteriormente se resuspendieron en agua destilada y fueron sometidas a liofilización. A diferencia del baño de oro utilizado en el presente estudio para cubrir las muestras, las micropartículas fueron cubiertas con una capa de 30-40 nm de carbón. Estos procedimientos permitieron caracterizar exitosamente las micropartículas generadas.

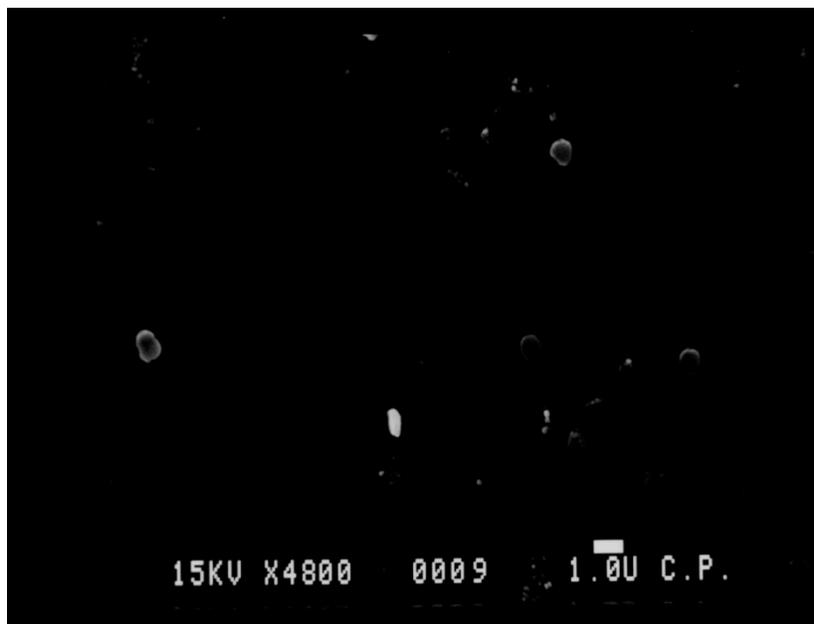


Figura 13. Micrografía electrónica de barrido de partículas de selenito de sodio generadas por emulsión-evaporación, utilizando etanol y una proporción Eudragit RL 100 : RS 100 (30:70).

7.1.1.3. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en proporción 30:70 y solvente etanol

En el Cuadro 5, el tamaño de partícula obtenido (34.64 nm), fue el menor al compararlo con los demás sistemas ($P \leq 0.05$), del mismo modo tanto el potencial z como el PDI, presentaron los valores más bajos al compararlos con los diferentes sistemas generados (19.13 mV y 0.233 respectivamente). El potencial z obtenido, no presentó diferencias significativas con el sistema E. E. Etanol 40:60 ($P > 0.05$) y se encuentra muy por debajo de el mínimo recomendable que es de

30 mV (Malvern Instruments, 2007), por lo que se esperaría que el sistema sea poco estable en el tiempo. Contrariamente, con este sistema se presenta la mejor distribución del tamaño de partícula debido a su relación directa con los valores bajos de PDI, ya que cuando es más cercano a cero, más homogéneo será el tamaño de partícula. El porcentaje de encapsulación fue de 25.46%. Otros autores han reportado porcentajes de encapsulación de 70 y 85 % utilizando los mismos polímeros (Ubrich *et al.*, 2005). Con el MEB, se observaron un número reducido de partículas irregulares (Figura 13) con un tamaño de 2.5 μm . La baja cantidad de partículas observadas podría ser un indicador de la poca estabilidad del sistema. Haznedar y Dortunç (2004), prepararon microesferas de acetazolamida con el método de evaporación del solvente utilizando los polímeros Eudragit RL 100 y RS 100, ellos observaron con una proporción de polímero:fármaco baja (1:1), la ausencia de partículas esféricas independientemente del polímero empleado. Cuando la cantidad de fármaco y solvente se mantuvo constante y la proporción polímero:fármaco se incrementó (2:1), se obtuvieron partículas esféricas, sin embargo, cuando la proporción polímero:fármaco fue de 3:1, la superficie de las partículas fue irregular debido a la excesiva concentración de polímero. En el presente estudio no se evaluó la proporción polímero:fármaco, sin embargo, al utilizar el método de emulsión evaporación, se empleó una proporción de 10:1, lo cual pudo generar partículas irregulares y al mismo tiempo interferir con la observación en el MEB debido a la excesiva cantidad de polímero.

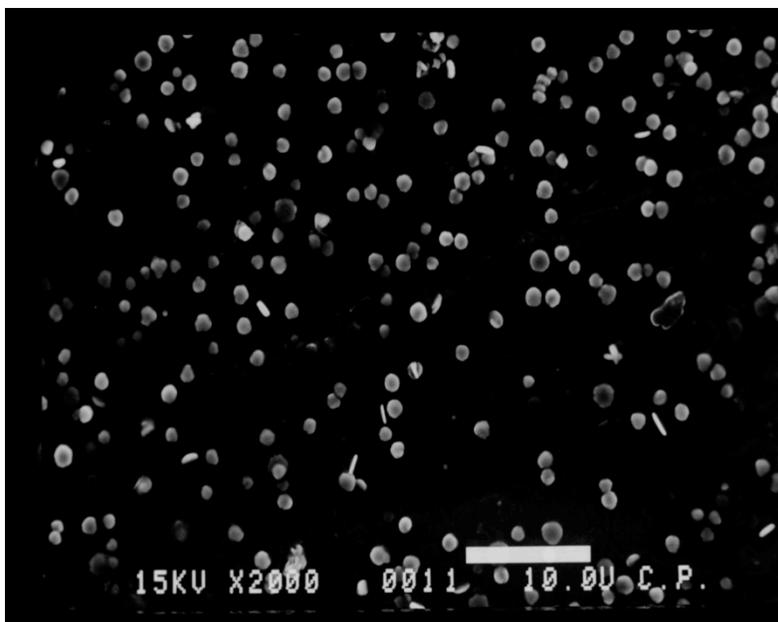


Figura 14. Micrografía electrónica de barrido de partículas de selenito de sodio generadas por emulsión-evaporación, utilizando etanol y una proporción Eudragit RL 100 : RS 100 (40:60).

7.1.1.4. Polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 en proporción 40:60 y solvente etanol

El tamaño de partícula fue de 38.96 nm. Se presentó una buena distribución del tamaño de partícula (PDI = 0.343), los valores bajos de PDI indicaron un tamaño más uniforme de las nanopartículas. Se obtuvo un valor bajo para el potencial z (22.66 mV), similar al que presentan los sistemas E. E. Etanol 30:70 y E. E. Acetona 40:60 ($P > 0.05$), por lo que se espera una baja estabilidad del sistema en el tiempo (Cuadro 5). El porcentaje de encapsulación fue de 27.48% el cual es bajo en comparación con lo reportado por otros autores como Galindo *et al.* (2005) quienes obtuvieron porcentajes de encapsulación para ibuprofen de 86% a nivel laboratorio y de 62% al realizar la encapsulación a gran escala, utilizando el método emulsión-difusión.

Las partículas generadas con este método se presentan en la Figura 14. Se observan partículas con un tamaño de 1 – 3 μm . La apariencia fue sólida y

presentaron formas esféricas en su mayoría, aunque también se observaron algunas partículas amorfas las cuales pueden ser partículas con exceso de polímero o partículas unidas. De Jaeghere *et al.* (2001), elaboraron nano y micropartículas de un compuesto altamente lipofílico (RR01) utilizando el método de emulsión-difusión. Antes de ser observadas al microscopio, las partículas fueron redispersadas en agua, agitándolas vigorosamente con vortex y sometidas 30 s a sonicación, lo cual permitió observar de manera individual las partículas, con una superficie arrugada, aparentemente derivada de partículas esféricas originales, distorsionadas por la pérdida del volumen interno como resultado de la evaporación del solvente empleado en su preparación.

7.1.2. Método de Nanoprecipitación

Las nanopartículas producidas por este método presentaron un porcentaje de encapsulación de 78.82%. En el Cuadro 5, las tres variables medidas obtuvieron los mayores valores ($P \leq 0.05$). El tamaño de partícula fue de 213.86 nm, el cual es superior en un 617% al valor más bajo obtenido para esta variable, que se presentó con el sistema E. E. Etanol 30:70 (34.64 nm). El potencial z fue de 31.86 mV y es superior en un 166% al obtenido con el sistema E. E. Etanol 30:70, resultando el valor más bajo (19.13 mV). El potencial z obtenido con nanoprecipitación es superior al mínimo recomendado para sistemas coloidales (30 mV) y garantiza la estabilidad del sistema a través del tiempo (Malvern Instruments, 2007). Schaffazick *et al.* (2005), elaboraron nanopartículas de melatonina por el método de nanoprecipitación, utilizando el polímero Eudragit S100. Las nanopartículas presentaron un tamaño entre 126 y 246 nm, similar al obtenido en el presente estudio, además un potencial Z de -33 a -36 mV el cual calificaron como adecuado para una formulación estable. Es posible que el potencial z positivo de las nanopartículas generadas en el presente estudio, utilizando los polímeros Eudragit RL 100 y RS 100, se deba a los grupos amonio presentes en su molécula.

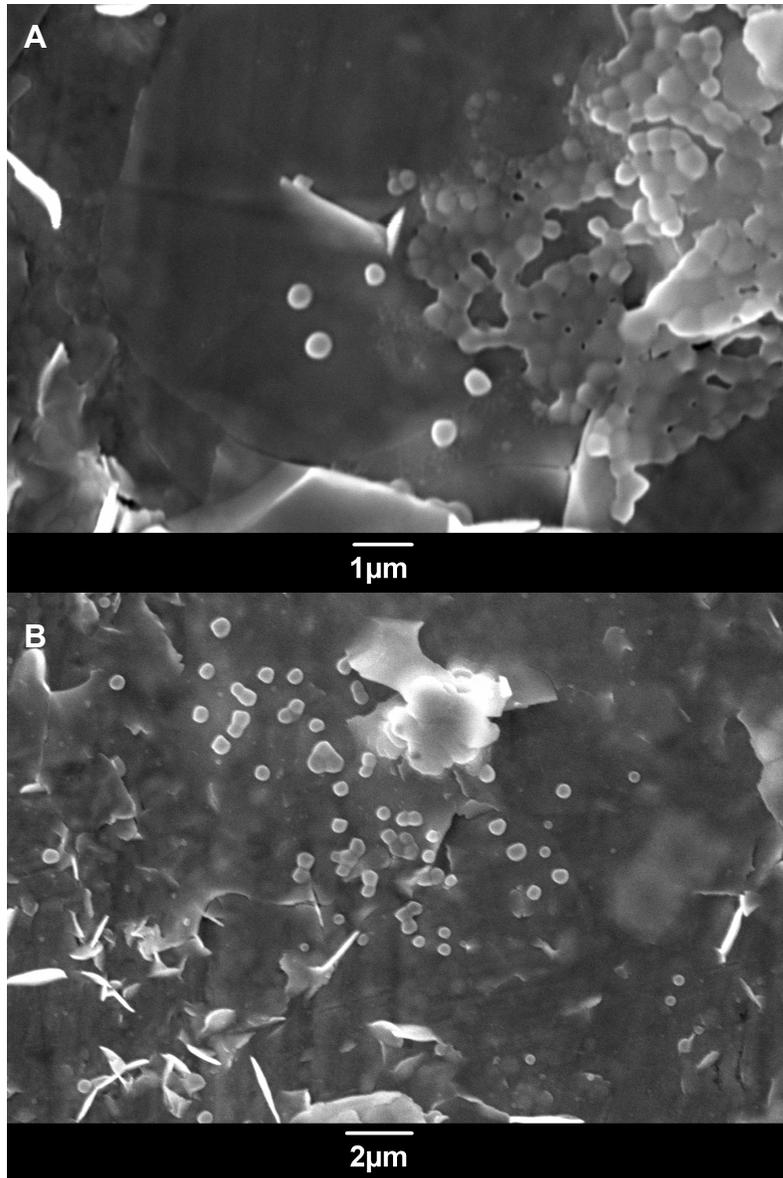


Figura 15. Micrografía electrónica de barrido de nanopartículas de selenito de sodio generadas por nanoprecipitación sin centrifugar, A) aglomeradas y B) dispersas.

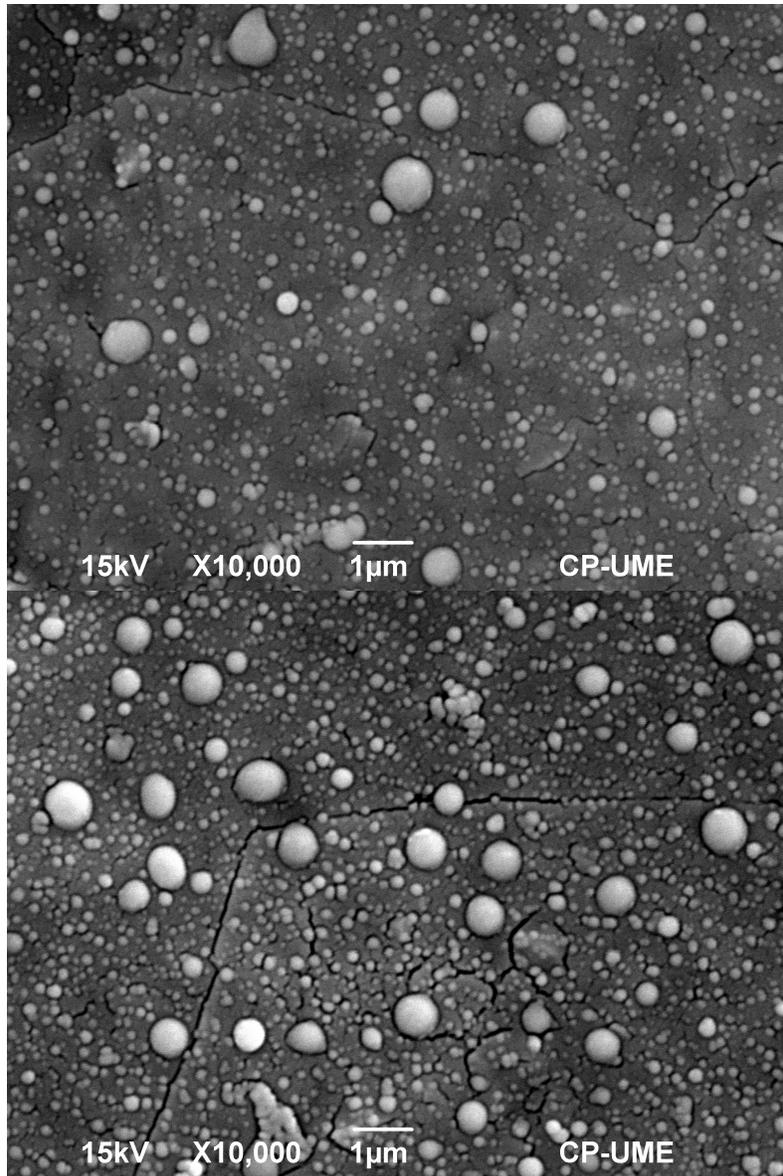


Figura 16. Micrografía electrónica de barrido de nanopartículas de selenito de sodio generadas por nanoprecipitación centrifugadas a 27, 000 rpm previo a la observación.

En las Figuras 15 y 16, las nanopartículas son sólidas, con tendencia a la aglomeración, de forma esférica y lisas, pero con variaciones en el tamaño de partícula observado con el MEB ($\leq 50 - 1000$ nm). Esta variación se puede explicar por su elevado PDI (0.497), ya que entre mayor sea, menos homogéneas serán las nanopartículas. El PDI obtenido fue superior en un 212% al presentado por el sistema E. E. Etanol 30:70 el cual obtuvo un valor de 0.233. Las nanopartículas que se sometieron a centrifugación (Figura 11), permitieron obtener imágenes de mejor calidad, debido a que el polímero que no forma parte de nanopartículas, fue eliminado en el sobrenadante y no interfiere con la caracterización; estas nanopartículas presentaron un tamaño de $\leq 50 - 1000$ nm cuando fueron observadas en el MEB. El proceso de centrifugación permitió aislar nanopartículas de menor tamaño para ser observadas en el MEB (Figura 11). Las nanopartículas que no fueron sometidas a centrifugación (Figura 10), presentaron un tamaño de 200 - 400 nm.

Los resultados para el tamaño de nanopartículas que fueron analizados en el MEB y que fueron preparadas por el método de nanoprecipitación y sometidas a centrifugación, se presentan en la Figura 17. Más del 80 % de las partículas observadas presentan un tamaño entre 51 y 300 nm. Sin embargo, las nanopartículas más numerosas fueron las que tenían un tamaño entre 51 y 100 nm.

7.2. Nanopartículas cargadas de fluoresceína

En el MEB se pudieron apreciar nanopartículas sólidas, esféricas y lisas (Figura 18). El tamaño de las nanopartículas observadas fue de 100 – 600 nm. La centrifugación de la muestra y su posterior dilución (1:100) permitió observar las partículas en forma aislada. El diámetro promedio de las nanopartículas obtenido con zeta sizer fue de 373.0 nm, el PDI fue de 0.049, este último indica una muy buena distribución del tamaño de partícula, debido a que entre más cercano sea a cero, más homogéneas son las nanopartículas. El potencial z de 36.33 mV nos

indica que el sistema es estable, porque supera el mínimo recomendado (30 mV) para mantener la estabilidad de sistemas coloidales (Malvern Instruments, 2007). No se realizaron estudios de encapsulación, lo cual nos garantizaría el uso de estas nanopartículas en otros estudios, debido a que las demás características son idóneas.

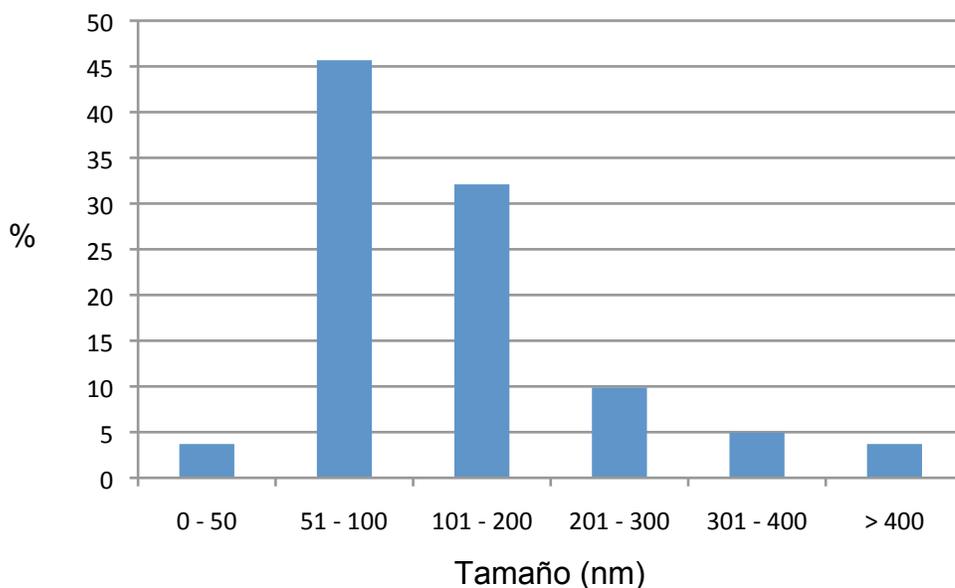


Figura 17. Distribución de frecuencias de selenito de sodio generadas por nanoprecipitadas a 27, 000 rpm previo a la observación.

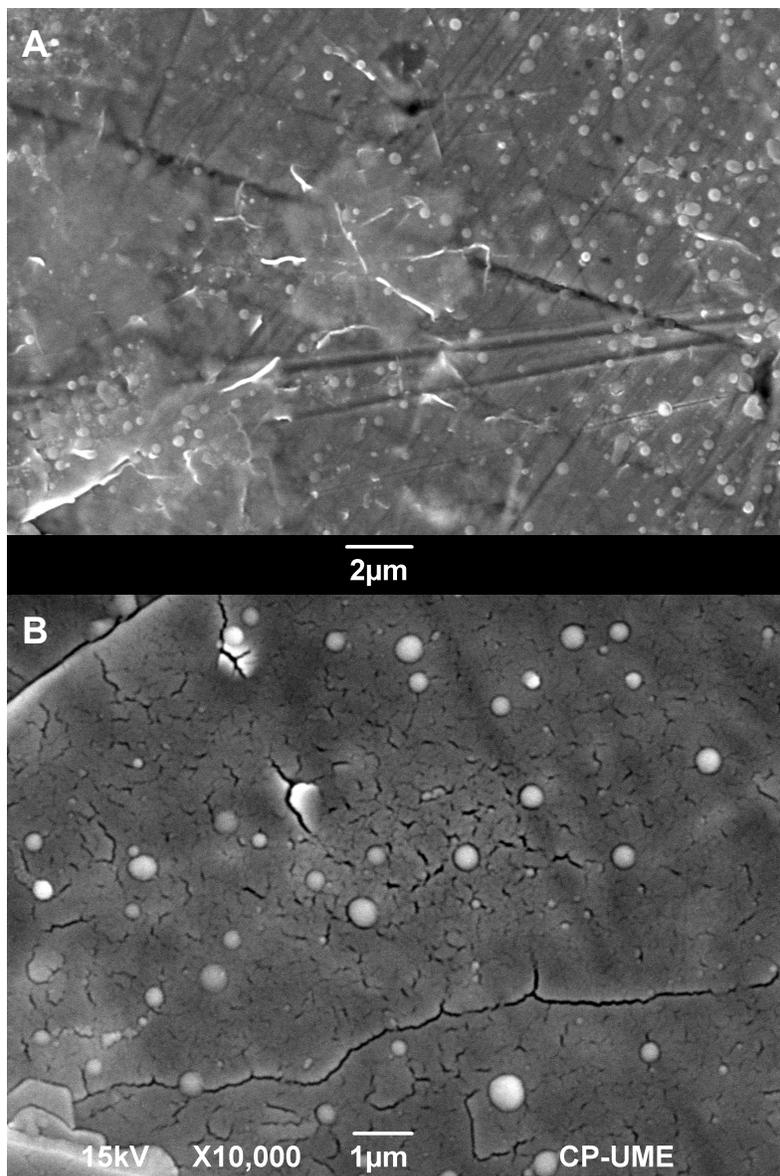


Figura 18. Micrografía electrónica de barrido de nanopartículas de fluoresceína generadas por Nanoprecipitación A) sin centrifugar y B) centrifugadas a 27,000 rpm.

Cuadro 5. Tamaño, potencial z y PDI de diferentes sistemas nanométricos.

Sistema	Tamaño (nm) SD	Potencial Z (mV) SD	PDI SD
E. E. Acetona 30:70	44.82 ± 0.551 b	26.70 ± 1.153 b	0.379 ± 0.004 b
E. E. Acetona 40:60	42.67 ± 0.220 c	25.93 ± 2.421 cb	0.374 ± 0.014 b
E. E. Etanol 30:70	34.64 ± 0.058 e	19.13 ± 1.002 d	0.233 ± 0.004 d
E. E. Etanol 40:60	38.96 ± 0.610 d	22.66 ± 1.002 cd	0.343 ± 0.003 c
N. P. Etanol 40:60	213.86 ± 1.380 a	31.86 ± 0.751 a	0.494 ± 0.005 a

Medias con la misma letra por columna no son diferentes (P>0.05)

E.E. = Emulsión-Evaporación

N.P. = Nanoprecipitación

30:70 = 30% Eudragit RL y 70% de Eudragit RS

40:60 = 40% Eudragit RL y 60% de Eudragit RS

Las diferencias entre métodos, solventes y proporciones se presentan en los cuadros 6, 7 y 8. El método por el cual se prepararon las nanopartículas, influyó significativamente en las características evaluadas ($P \leq 0.05$). Las nanopartículas producidas por el método de nanoprecipitación fueron 431% más grandes que las generadas por el método de emulsión-evaporación. El potencial z y el PDI se incrementaron en un 34.9% y 48.7% con el método de nanoprecipitación. El método de nanoprecipitación generó nanopartículas de mayor tamaño las cuales presentan un potencial z superior al mínimo recomendado para que sea estable (30 mV), sin embargo presenta un elevado PDI indicando que el tamaño de partícula tiene una gran variación.

Cuadro 6. Tamaño, potencial z y PDI de nanopartículas preparadas con diferentes métodos.

Método	Tamaño (nm) SD	Potencial Z (mV) SD	PDI SD
Emulsión - Evaporación	40.277 ± 4.056 a	23.608 ± 3.384 b	0.332 ± 0.062 b
Nanoprecipitación	213.870 ± 1.379 b	31.867 ± 0.750 a	0.494 ± 0.004 a

Medias con la misma letra por columna no son diferentes (P>0.05)

El solvente empleado en la preparación (Cuadro 7), influyó significativamente en las variables evaluadas ($P \leq 0.05$). Al utilizar etanol, el tamaño de partícula se incrementó en un 18%, el potencial z lo hizo en un 25% y el PDI en un 30%. Aunque el uso de etanol garantiza una mayor estabilidad del sistema, hay que tomar en cuenta que su mayor PDI nos indica que las nanopartículas generadas

con este solvente serán menos homogéneas en su tamaño. Según Raula *et al.* (2004), la formación de nanopartículas esféricas y su morfología puede ser afectada por las condiciones experimentales. La solubilidad del polímero en el solvente y la volatilidad del solvente son probablemente los factores más importantes que afectan la formación de nanopartículas, en ese sentido, es importante tener presente una definición de calidad de solvente. Cuando la solubilidad del polímero se incrementa, la calidad del solvente para el polímero mejora y viceversa. En un buen solvente las cadenas de polímero están expandidas y se contraen cuando la calidad del solvente disminuye. En un buen solvente las interacciones polímero-solvente predominan, mientras que en un solvente de mala calidad predominan las interacciones entre las cadenas de polímero. En el presente estudio, los polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 presentaron una mejor solubilidad en el solvente acetona, aun así, la solubilidad en etanol fue buena. Esta diferencia en solubilidad del polímero en los diferentes solventes, puede explicar las diferencias observadas en las variables evaluadas.

Cuadro 7. Tamaño, potencial z y PDI de nanopartículas preparadas con diferentes solventes.

Solvente	Tamaño (nm) SD	Potencial Z (mV) SD	PDI SD
Etanol	43.451 ± 1.236 a	26.317 ± 1.747 a	0.376 ± 0.009 a
Acetona	36.805 ± 2.395 b	20.900 ± 2.132 b	0.288 ± 0.060 b

Medias con la misma letra por columna no son diferentes (P>0.05)

Para el caso de las diferentes proporciones de polímeros (Cuadro 8), no se presentaron diferencias significativas en ninguna de las variables evaluadas (P > 0.05). Nguyen *et al.* (2006), utilizaron los polímeros Eudragit RL100 y RS 100 para elaborar nanopartículas libres de surfactante y observaron que se presentaban diferencias significativas en el tamaño de partícula, cuando se utilizó Eudragit RL 100, el tamaño fue de 66 – 75 nm mientras que cuando se empleó el polímero Eudragit RS 100 el tamaño de partícula fue de 121 – 127 nm, lo cual se puede explicar por la alta densidad de grupos amonio en Eudragit RL 100, en este sentido es recomendable evaluar proporciones de polímeros con diferencias más

marcadas y el uso de los polímeros Eudragit RL 100 y RS 100 de manera individual en trabajos posteriores.

También se evaluó la interacción solvente-proporción y se encontró que hay interacción en las tres variables evaluadas: tamaño de partícula ($P \leq 0.0001$), potencial z ($P \leq 0.0396$) y PDI ($P \leq 0.0001$).

Cuadro 8. Tamaño, potencial z y PDI de nanopartículas preparadas con diferentes proporciones de polímeros.

Proporción	Tamaño (nm) SD	Potencial Z (mV) SD	PDI SD
30:70	39.735 ± 5.585 a	22.917 ± 4.255 a	0.306 ± 0.080 a
40:60	40.818 ± 2.073 a	24.300 ± 2.438 a	0.359 ± 0.019 a

Medias con la misma letra por columna no son diferentes ($P > 0.05$)

30:70 = 30% Eudragit RL y 70% de Eudragit RS

40:60 = 40% Eudragit RL y 60% de Eudragit RS

El Cuadro 9 muestra una buena correlación entre las diferentes variables evaluadas. Se aprecia que al incrementarse el tamaño de partícula, también lo hace el potencial z, por lo que se puede inferir que a mayor tamaño, las nanopartículas se vuelven más estables, ya que entre mayor sea el valor para potencial z, los sistemas coloidales presenta una mejor estabilidad. El tamaño también presenta una buena correlación con el PDI, por lo que se puede decir que a mayor tamaño, las nanopartículas son menos homogéneas, ya que con valores más altos del índice de polidispersidad, mayor será la variación en el tamaño de partícula. El potencial z y el PDI también presentaron buena correlación, lo cual nos indica que al incrementarse el potencial z y el PDI de manera conjunta, los sistemas se vuelven más estables pero se incrementa la variación en el tamaño, por lo tanto se tiene que buscar un equilibrio entre estas dos variables para lograr un sistema que sea estable y a la vez presente una buena distribución en el tamaño de partícula.

Cuadro 9. Correlaciones entre tamaño, potencial z y PDI.

Variables	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)	PDI
Tamaño (nm)	1	0.912	0.930
Potencial Z (mV)	0.912	1	0.881
PDI	0.930	0.881	1

Debido a que las variables tamaño, potencial z y PDI muestran una buena correlación, se generaron algunos modelos de regresión descritos en el Cuadro 10, con su respectivo coeficiente de determinación.

Cuadro 10. Regresión cuadrática de las características de nanopartículas.

Ecuación de regresión	R ²	P
$Y = -27.075 + 4.718x - 0.078x^2$ ^a	0.871	≤0.001
$Y = 64.604 - 264.314x - 504.584x^2$ ^b	0.921	≤0.001
$Y = 36.848 - 153.418x - 331.037x^2$ ^c	0.811	≤0.001

^aY = Tamaño de partícula; x = Potencial Z.

^bY = Tamaño de partícula x = PDI.

^cY = Potencial Z.; x = Tamaño de partícula.

5.2.3. Estudios de liberación de selenio en función del pH y tiempo

El Cuadro 11 presenta la liberación de selenio a diferentes pH y tiempos. Al momento de introducir las nanopartículas en el medio de dilución la liberación fue mínima, incrementándose gradualmente hasta alcanzar su máxima liberación en un tiempo no mayor de 45 min. Hubo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en la liberación de selenio a los diferentes tiempos dentro de cada pH. Las soluciones con pH menores de 4, incrementó la liberación de selenio en más de 62 % con respecto al pH de 6. Posteriormente la liberación se mantiene constante y comienza a disminuir ligeramente conforme avanza el tiempo de exposición en diferentes pH (Figura 19).

Los resultados obtenidos pueden tener un impacto positivo en la producción animal ya que el pH del rumen puede oscilar de 5.5 a 7.2, el pH del duodeno se mantiene entre los límites 1.6 a 2.5 y el pH duodenal varía de 2.6 a 3.0. No se presenta absorción de selenio en el rumen y abomaso. La mayor absorción de

selenio ocurre en el intestino delgado y ciego (NRC, 1983). La baja absorción de selenio en rumiantes se debe a la reducción del selenio en la dieta a formas insolubles en el ambiente ruminal (Spears, 2003). Los microorganismos presentes en el rumen son capaces de incorporar selenio a sus células, sin embargo, gran parte del selenio en la dieta es transformado a formas no disponibles para el animal. El pH del abomaso y duodeno es menor de 4, con esta condición las nanopartículas presentan la máxima liberación. Este resultado proporciona ventajas en la disponibilidad del mineral: 1) La baja liberación de selenio en las nanopartículas con un pH de 6, proporcionaría la cantidad necesaria del microelemento al metabolismo de los microorganismos ruminales. 2) La máxima liberación de selenio de las nanopartículas con un pH menor de 4, favorecería su liberación en abomaso y duodeno, beneficiando la absorción intestinal del microelemento. Aunque es un trabajo *in vitro*, los resultados son alentadores para poder ser evaluados en pruebas *in vivo*.

Cuadro 11. Liberación de selenio ($\mu\text{g}/\text{mL}$) con diferentes buffers y tiempos en nanopartículas elaboradas con Eudragit RL 100 - RS 100 y selenito de sodio.

Tiempo (min)	pH			
	2	3	4	6
0	2.9 \pm 1.1 G	0.2 \pm 0.3 D	4.5 \pm 1.2 F	7.5 \pm 0.7 D
15	24.0 \pm 0.6 D	17.5 \pm 0.5 D	30.1 \pm 0.2 A	14.3 \pm 1.2 BC
30	31.8 \pm 0.3 A	25.5 \pm 1.4 B	23.5 \pm 0.4 ED	16.6 \pm 1.2 A
45	29.5 \pm 0.4 B	28.6 \pm 0.7 A	23.0 \pm 1.9 ED	13.4 \pm 2.2 BC
60	27.3 \pm 0.7 C	23.4 \pm 0.3 C	25.2 \pm BCD	15.5 \pm 1.2 AB
75	25.0 \pm 1.2 D	27.4 \pm 0.5 A	24.9 \pm 0.6 CD	13.0 \pm 1.0 BC
90	19.5 \pm 0.5 E	17.4 \pm 0.4 D	26.9 \pm 0.7 BC	12.3 \pm 0.2 BC
105	18.8 \pm 0.8 E	18.0 \pm 0.6 D	27.6 \pm 0.9 AB	11.6 \pm 0.4 C
120	16.3 \pm 0.3 F	17.7 \pm 0.1 D	21.3 \pm 1.1 E	11.9 \pm 0.6 C

Medias con la distinta letra por columna no diferentes ($P \leq 0.05$).

Las soluciones utilizadas fueron: Fosfato dibásico de sodio-fosfato monobásico de potasio pH 2.0, Fosfato dibásico de sodio pH 3.0, Acetato de sodio-acido acético pH 4.0 y agua desionizada con pH 6.

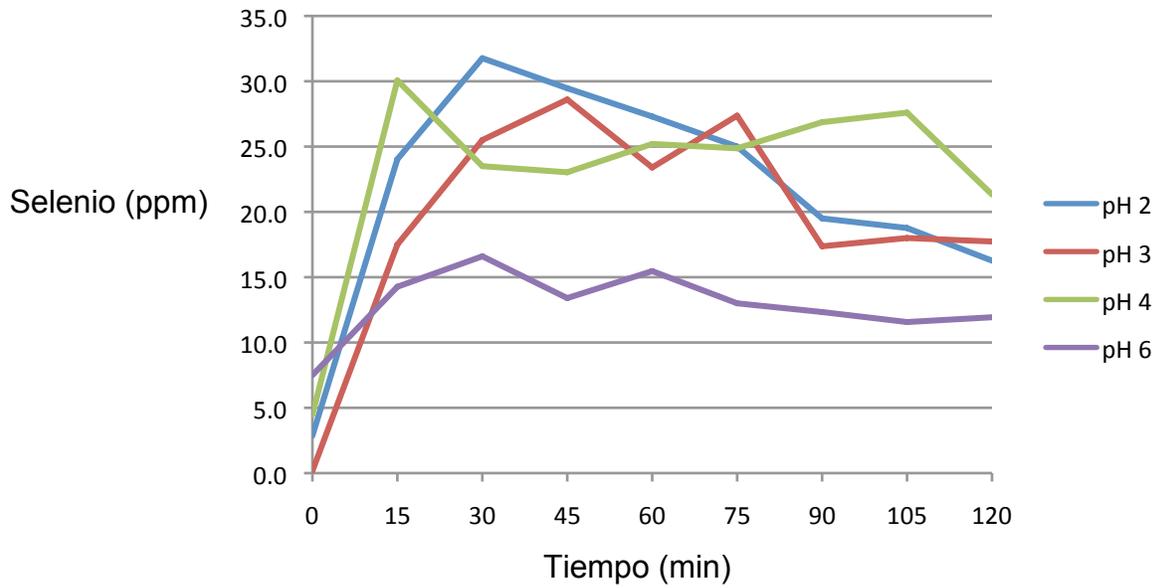


Figura 19. Liberación de selenio (μg) de nanopartículas elaboradas con diferentes buffers y tiempos en un agitador RL 100 - RS 100 y selenito de sodio.

VIII. CONCLUSIONES

- Se prepararon satisfactoriamente nanopartículas de selenito de sodio con las metodologías empleadas.
- Las nanopartículas producidas con los métodos de emulsión-evaporación y nanoprecipitación, fueron diferentes en su morfología. El método de nanoprecipitación generó nanopartículas con formas completamente esféricas, mientras que con el método de emulsión-evaporación se presentaron una gran cantidad de partículas amorfas.
- El método de nanoprecipitación generó nanopartículas más grandes que las generadas con el método de emulsión-evaporación, sin embargo, las primeras presentaron un PDI mayor al método emulsión-evaporación. Los resultados indican que las partículas producidas por nanoprecipitación tienen un tamaño de partícula menos homogéneo. El método de nanoprecipitación generó nanopartículas más estables en base a su potencial z.
- El solvente utilizado influyó significativamente en las variables evaluadas. Al utilizar etanol se formaron nanopartículas más grandes que las producidas con acetona, resultando más estables, pero con un tamaño de partícula menos homogéneo.
- Las diferentes proporciones de polímeros no influyeron sobre las variables evaluadas. Es necesario realizar mas estudios aumentando las proporciones y el uso de los polímeros de manera individual.
- Las variables evaluadas presentaron correlaciones aceptables. Al incrementarse el tamaño de partícula también lo hacen el potencial z y el PDI, al incrementarse el PDI se incrementa el potencial z, es por esto que

se tiene que buscar un equilibrio entre las tres para obtener partículas de buen tamaño, estables y con una buena distribución del tamaño de partícula.

- La mayor liberación del selenio de las nanopartículas, se presentó con un pH menor a 4.

IX. LITERATURA CITADA

- Allan, C. B., G. M. Lacourciere and T. C. Stadtman. 1999. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Annu. Rev. Nutr.* 19: 1-16.
- Alltech Biotechnology Center. 2002. FDA approval of Alltech's organic selenium, Sel-PlexTM, for use in pig and poultry diets. *Bulletin*. Nicholasville, KY, USA. 22 p.
- Ammerman C. B. and S. M. Miller. 1972. Biological availability of minor mineral ions: a review. *J. Anim. Sci.* 35: 681-694.
- Bankinter. 2006. Nanotecnología: La revolución industrial del siglo XXI. Fundación de la Innovación Bankinter. www.ftforum.org (consulta de 21 de agosto de 2006)
- Behne D. and Kyriakopoulos A. 2001. Mamalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 21: 453-473
- Bilati, U., E. Allémmann and E. Doelker. 2005. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Euro. J. Pharm. Sci.* 24:67-75.
- Burk R. F. and Hill K. E. 1993. Regulation of selenoproteins. *Annu. Rev. Nutr.* 13: 65-18.
- Chiu, L. L. and Y. Tian. 2007. Zeta Potential. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Informa Healthcare. U. S. A. 4128 p.

- Cristaldi, L. A., L. R. McDowell, C.D. Buergelt, P. A. Davis, N. S. Wilkinson and F. G. Martin. 2004. Tolerance of inorganic selenium (selenite) in wether sheep. *Small Rumin. Res.* 56: 205-213.
- Corrigan, O. I. 2007. Surfactants in Pharmaceutical Products and Systems. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Informa Healthcare. U. S. A. 4128 p.
- De Jaeghere, F. E., E. Allemann, E. Doelker, R. Gurny, R. Cerny, B. Galli, A.F. Steulet, I. Müller, and H. Schütz. 2001. pH-Dependent dissolving nano- and microparticles for improved peroral delivery of a highly lipophilic compound in dogs. *AAPS Pharmsci.* 3:1-8
- Delie F. and Blanco P. M. J. 2005. Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs. *Molecules* 10:65-80.
- Domínguez, V. I. 1993. Diagnostico del Estado Mineral de Ovinos Bajo Condiciones de Pastoreo en Tenango del Valle, México. Tesis de Maestría. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 59 pp.
- Domínguez, V. I. A. 2002. Influencia de cromo y selenio orgánicos en el crecimiento, uso de nutrientes, estudio inmune y características de la canal de ovinos en engorda intensiva. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. de México.
- ETC Group. 2004. La inmensidad de lo mínimo: Breve introducción a las tecnologías de nano escala. Canadá. 9 p.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2000. 7a. edición.

- Fessi, H., F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita. 1989. Nanocapsules deposition by interfacial polymer deposition following solvent replacement. *Int. J. Pharm.* 55:R1-R4.
- Finley, J. W. 1999. Does selenium accumulation in meat confer a health benefit to the consumer?. *Proceedings of the American Society of Animal Science.*
- Ghosh, P. K., M. L. Umrethia, R. J. Majithiya and R. S. R. Murthy. 2004. Preparation and physicochemical characterisation of caprylocapryl macrogol -8- glycerides microemulsion for oral drug delivery. *Ars. Pharm* 45:353-372.
- Gurny R, N. A Peppas, D. D. Harrington, G. S. G. S. Banker. 1981. Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs. *Drug Dev Ind Pharm.* 7:1-25.
- Guyot, H., P. Spring, S. Andrieu y F. Rollin. 2007. Comparative responses to sodium selenite and organic selenio supplements in Belgian Blue cows and calves. *Livestock Sci.* 111:259-263.
- Hansen, D., R. Hathaway and J. E. Oldfield. 1993. White muscle and other selenium-responsive diseases of livestock. *Pacific Northwest Extension.*
- Haznedar S. and B. Dortunç. 2004. Preparation and in vitro evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide. *Int. J. Pharm.* 269:131-140.
- Henry P. R., M. G. Echevarria, C. B. Ammerman y P. V. Rao. 1998. Estimation of the relative biological availability of inorganic selenium sources for ruminants using tissue uptake of selenium. *J. Anim. Sci.* 66:2306—2312.

- Hirsch L.R., R. J. Stafford, J. A. Bankson, S.R. Sershen, B. Rivera, R.E. Price, J.D. Hazle, N. J. Halas and J. L. West. 2003. Nanoshell -mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:13549-13554.
- Huang, K., B. Lee and P. B. Messersmith. 2001. Synthesis and characterization of self-assembling block copolymers containing adhesive moieties. Polymer Preprints 4:14-148.
- Huw A., A. 2003. Future Technologies, Today's Choices. Greenpeace Environmental Trust. Canonbury Villas, London. 69 p
- James, L. F., Panter, H. F., Mayland, M. R., Miller and D. C. Baker 1989. Selenium poisoning in livestock: A review and progress. In: Selenium in agriculture and the environment, Soil Science Society of America. Special publication no. 23. Madison, WI. USA. 123 – 131 p.
- Jannes, B. J., J. T. Deagen, M. A. Beilstein and P. D. Whanger. 1989. Comparative metabolism of organic and inorganic selenium by sheep. J. Agric. Food Chem. 37:1358-1363.
- Jiménez A., S. Andrés, J. Sánchez, R. Barrera, M. Benito, M. C. Mañe. 1998. Evaluation of different prophylactic methods against selenium deficiency in sheep grazing on range in Southwestern Spain. Small Ruminant Research 29:193–199.
- King, C. J. 2001. Effect of reproduction on the bioavailability of calcium, zinc and selenium. J. Nutr. 131: 1355S-1358S.
- Malvern Instruments. Zeta Potential: An Introduction in 30 minutes. <http://www.malvern.co.uk> (consulta de 20 de noviembre de 2007).

- Mayland, H. F., L. F., James, K. E., Panter and J. L., Sonderegger. 1989. Selenium in seleniferous environments. In: Selenium in agriculture and the environment, Soil Science Society of America. Special publication no. 23. Madison, WI. USA. 15 - 50 p.
- Mc Donald, R. A. Edwards, J. F. D. Greenhalgh y C. A. Morgan. 1995. Nutricion animal. 5^a ed. London, United Kingdom.
- McDowell, L. R., J. Velázquez-Pereira y G. Valle. 1997. Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales. Boletín. 3^a Edición. Departamento de Zootecnia, Centro de Agricultura Tropical, Universidad de Florida. Gainesville, Florida. 83 p.
- McNeal, M. J. and S. L. Balistrieri,. 1989. Geochemistry and occurrence of selenium: An overview. In: Selenium in agriculture and the environment, Soil Science Society of America. Special publication no. 23. Madison, WI. USA. 1-13 p.
- Nguyen C. A., Y. N. Konan-Kouakou, E. Allémann, E. Doelker, D. Quintanar-Guerrero, H. Fessi and R. Gurny. 2006. Preparation of surfactant-free nanoparticles of methacrylic acid copolymers used for film coating. AAPS Pharm. Sci. Tech 7:E1-E7.
- Norris, A. D., N. Puri and P. J. Sinko. 1998. The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. Adv. Drug Del. Rev. 34: 135-154.
- NRC. 2001. Nutrient requirements dairy cattle. 7th revised edition. National Academy Press. Washington, D. C. 381 p.
- NRC. 1983. Selenium in nutrition. Revised edition. National Academy Press. Washington, D. C. 174 p.

- Omari, D. M., M. Derar, A. Sallam, A. Abd-Elbary and M. El-Samaligy. 2004. Lactic acid-induced modifications in films of Eudragit RL and RS aqueous dispersions. *Int. J. Pharm.* 274:85-96.
- 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.
- Pignatello, R., M. Ferro, G. De Guido, G. Salemi, M. A. Vandelli, S. Guccione, M. Geppi, C. Forte and G. Puglisi. 2001. Preparation, characterization and photosensitivity studies of solid dispersions of diflunisal and Eudragit RS100® and RL100®. *Int. J. Pharm.* 218:27-42
- Rayman, M. P. 2000. The importance of selenium to human health. *Lancet* 356:23341.
- Rieux, A., V. Fievez, M. Garinot, Y. J. Schneider and V. Pr at. 2006. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J. Control Release* 116: 1-27.
- Rock, M. J., Kincaid R. L. y Carstens G. E. 2001. Effects of prenatal source and level of dietary selenium on passive immunity and thermometabolism of newborn lambs. *Small Rumin. Res.* 40: 129-138.
- SAS. 1999. SAS/STAT User's Guide, Version 8. SAS Inst., Inc., Cary, North Carolina.
- Schaffazick S.R., A.R. Pohlmann, C.A.S. de Cordova, T.B. Creczynski-Pasa, S.S. Guterres. 2005. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation. *Int. J. of Pharm.* 289:209-213.

- Schrauzer, G. N. 2000. Selenomethionine: a review of its nutritional significance, metabolism and toxicity. *J. Nutr.* 130: 1653-1656.
- Scott, N. R. 2005. Nanotechnology and animal health. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 2005, 24:425-432
- Serra, A. B., K. Nakamura, T. Matsui, T. Harumoto and T. Fujihara. 1994. Inorganic selenium for sheep I. Selenium balance and selenium levels in the different ruminal fluid fractions. *AJAS.* 7: 83-89.
- Spears, J. W. 2003. Trace mineral bioavailability in ruminants. *J. Nutr.* 133: 1506S-1509S.
- Stapleton, S. R. 2000. Selenium: an insulin-mimetic. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1874-1879.
- Ubrich, N., C. Schmidt, R. Bodmeier, M. Hoffman y P. Maincent. 2005. Oral evaluation in rabbits of cyclosporin-loaded Eudragit RS or RL nanoparticles. *Int. J. of Pharm.* 288:169-175.
- Underwood, E. J. and N. F. Suttle. 1999. The mineral nutrition of livestock. 3rd ed. CABI Publishing. New York, USA. 624 p.
- Vanderhoff J. W, M. S. El-Aasser, J. Ugelstad, inventors. 1979. Polymer emulsification process. US patent 4 177 177.
- Wang C. and R. T. Lovell. 1997. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 152: 223-234.

- Wang, H., J. Zhang and H. Yu. 2007. Elemental selenium at nano size possesses lower toxicity without compromising the fundamental effect on selenoenzymes: Comparison with selenomethionine in mice. *Free Rad. Biol. and Med.* 42:1524-1533.
- Wang X., Dai J., Chen Z, Zhang T., Xia G, Nagai T. and Zhang Q. 2004. Bioavailability and pharmacokinetics of cyclosporine A-loaded pH-sensitive nanoparticles for oral administration. *J. Control. Release.* 97: 421– 429
- Whanger, P. D., P. H. Weswing and J. E. Oldfield. 1978. Selenium, sulfur and nitrogen levels in ovine rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.* 46: 515-519.
- Williams, R. O. and M. V. Vaughn. 2007. Nanoparticle engineering. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.* Informa Healthcare. U. S. A. 4128 p.
- Yañez F. J., M. J. Salazar M.L. Chaires, J. H. Jiménez, R. M. Márquez y R. E. Ramos Ramírez. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y perspectiva.* 21: 331-319.
- Zeta-Meter, Inc. 1997. *Zeta-Potential: A Complete Course in 5 Minutes.* Staunton, USA. Zeta-Meter, Inc. 8 p.
- Zhang, J., H. Wang, X. Yan and L. Zhang. 2005. Comparison of short-term toxicity between Nano-Se and selenite in mice. *Life Science.* 76:1099-1109.