



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE PROCESOS FARMACEUTICOS:

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE SELENIO CON BOLOS
INTRARRUMINALES SOBRE LAS CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS EN
BOVINOS LECHEROS

SERVICIO SOCIAL TITULACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

VIVIANA OLIVIA ORTIZ AGUILAR

ASESORAS: DRA. ALMA LUISA REVILLA VAZQUEZ
DRA. RAQUEL LOPEZ ARELLANO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente estudio se desarrolló en el Área de Experimentación Animal de la Coordinación General de Estudios de Postgrado del Centro de Producción Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, en el Laboratorio de Estudios Multidisciplinarios de Química, en el Laboratorio de Estudios Multidisciplinarios Farmacia y en la Sección de Química Analítica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1; al respecto se agradece el apoyo económico a la DGAPA UNAM mediante el proyecto PAPIIT INN212903, PAPIME EN215404.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a *mis padres*, porque gracias a todo el amor, el apoyo y la confianza que me han brindado toda la vida he logrado cumplir una de mis más grandes metas y sé que sin ellos no lo hubiera conseguido, sobre todo a ellos por haberme dado el regalo más grande que puede existir, *la vida*. **LOS AMO.**

A mi hermosa bebe *Paula Valeria*, a ti mi amor porque eres la personita que ilumina mi vida, que me impulsa a seguir adelante, luchar, superarme y ser mejor persona cada día, espero que algún día te sientas orgullosa de mí, chiquita linda, **TE AMO**, siempre lo haré.

A mis hermanos: *Cristina, Ana Karen y Armando*, porque han sido una parte fundamental en mi vida, gracias por todos esos momentos de alegría, enojo y tristeza que hemos pasado juntos y que seguramente lo seguiremos haciendo, sin ustedes mi vida no tendría sabor. **LOS QUIERO MUCHO.**

A todos *mis tíos* por el absoluto cariño y apoyo que me han brindado y que siguen haciendo, gracias por ser parte de mi familia.

A G R A D E C I M I E N T O S

A *Dios* por brindarme la fuerza necesaria para superar todos los obstáculos de la vida, por darme el entusiasmo y la dicha de haber alcanzado una mis grandes metas. Gracias por ser tan maravilloso conmigo.

Porque este proyecto no se hubiera logrado sin la guía de mis asesoras *la Dra. Raquel López A. y a la Dra. Alma Luisa Revilla V.*, gracias por confiar en mí, por darme la oportunidad de demostrarles y demostrarme que era capaz de cumplir de manera satisfactoria con este proyecto, gracias por todos los consejos y el apoyo brindado.

De manera importante quiero dar mi agradecimiento a mis sinodales por hacerme notar mis errores y llevar a bien el término de éste trabajo.

A mis profesores de toda la carrera por todos los conocimientos brindados sin más interés que el de generar alumnos mejor preparados para triunfar en la vida.

Quiero dar las gracias a una persona que contribuyó en el mejoramiento del presente estudio: a la Dra. Helgi Jung por su ayuda en la aclaración y comprensión de los resultados obtenidos.

Diana gracias por ser mi mejor amiga, por estar siempre conmigo, por todo el apoyo y la confianza que me otorgas sin mayor interés que el de la amistad.

De manera muy, muy especial, gracias, a ti Leslie, mi otra mejor y grande amiga por estar a mi lado incondicionalmente, por haberte convertido en parte fundamental de

mi meta, ya que sin ti no habría sacado este proyecto adelante, mil, mil gracias por todo el cariño y la amistad que me brindas.

A todos mis amigos: Pedro, Wendy, Liliana, Clara, Asaf, Gerardo, Ana Laura, Vanessa, Adrian, Raul, David, Christian. De manera muy especial a: Selene, Carina, Ana María, José y Armando por haber sido mis compañeros y amigos durante toda la carrera; porque lo siguen siendo, mil gracias por todos los momentos divertidos que pasamos dentro y fuera de la facultad, siempre los llevaré en mi corazón.

Gracias Mashenka, Aidee y Angel porque sin conocerme me otorgaron su amistad, apoyo y comprensión, gracias por compartir este proyecto.

Sobre todo mi agradecimiento y respeto a ti UNAM.

ÍNDICE

Contenido	Página
Abreviaturas	
Resumen	1
1. Antecedentes	5
1.1 Introducción.	5
1.2 Absorción de selenio y formas de suplementación.	6
1.3 Efecto de la suplementación de selenio con bolos intrarruminales sobre sus concentraciones plasmáticas en bovinos lecheros.	9
1.4 Determinación de la biodisponibilidad de una forma farmacéutica sólida	10
1.5 Determinación de la biodisponibilidad	12
1.5.1 Determinación de la biodisponibilidad en función de la velocidad de absorción.	12
1.5.2 Cálculo de la biodisponibilidad a partir de los niveles plasmáticos.	13
2. Objetivos	16
3. Material y Métodos	17
3.1 Material	18
3.1.1 Equipos	18
3.1.2 Material	18
3.1.3 Reactivos	19
3.1.4 Gases	19
3.1.5 Muestra biológica	19
4. Metodología	20
4.1 Localización	21
4.2 Manejo de Unidades Experimentales	22
4.3 Dosis	23
4.4 Alimentación	23
4.5 Obtención de muestra	24
✦ Diagrama de flujo I. Tratamiento de unidades experimentales	25
✦ Diagrama de flujo II. Tratamiento de muestra biológica	26

4.6 Tratamiento de muestra biológica	27
4.7 Digestión de las muestras biológicas.	27
4.8 Cuantificación.	28
4.9 Análisis Farmacocinético	29
5.0 Resultados y Discusión	30
5.1 Características de los bolos intrarruminales utilizados en el estudio	31
5.2 Perfiles plasmáticos de selenio	36
5.3 Efecto del bolo con selenito de sodio sobre los niveles de selenio en plasma	40
5.3.1 Administración del bolo intrarruminal.	40
5.3.2 Efecto del bolo de selenito de sodio sobre el peso de las unidades experimentales	44
5.3.3 Área Bajo la Curva	47
5.3.4 Farmacocinética	49
6.0 Conclusiones	55
7.0 Referencias	57
Anexos	67

INDICE DE TABLAS, CUADROS Y FIGURAS

TABLAS

1. Especies de selenio en organismos vivos.
2. Parámetros farmacocinéticos utilizados en los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia tras la administración de dosis única.
3. Bolos ruminales de 13g
4. Bolos ruminales de 7.2g
5. Peso de grupo Tratamiento
6. Peso de grupo Placebo
7. Dosis administrada para el grupo Tratamiento y Grupo Placebo
8. Curva de calibración
9. Dimensiones Físicas de los Bolos Densos de Selenito de Sodio
10. Valores de la curva de Calibración
11. Parámetros estadísticos de la curva de calibración
12. Análisis de Variancia
13. Análisis de regresión.
14. Resultados de las concentraciones basales de Selenio en Plasma (Grupo Placebo)
15. Resultados de las concentraciones basales de Selenio en Plasma (Grupo Tratamiento)
16. Resultados de la concentración de Selenio en Plasma (Grupo Tratamiento).
17. Resultados de la concentración de Selenio en Plasma (Grupo Placebo).
18. Peso de las unidades experimentales del grupo Tratamiento.
19. Peso de las unidades experimentales del grupo Placebo.
20. Resultados de Área Bajo la Curva de los niveles de Selenio en vacas Holstein
21. Parámetros farmacocinéticos del grupo tratamiento.

22. Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa estadístico WinNonlin (UE860)
23. Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa estadístico WinNonlin (UE861)
24. Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa estadístico WinNonlin (UE867)
25. Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa estadístico WinNonlin ((UE870)
26. Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa estadístico WinNonlin ((UE142)
27. Calendario de muestreo
28. Condiciones de digestión ácida.
29. Evaluación del granulado.
30. Resultados de la concentración de selenio basal en plasma de la unidad experimental 860 (Grupo tratamiento).
31. Resultados de la concentración de selenio basal en plasma de la unidad experimental 861 (Grupo tratamiento).
32. Resultados de la concentración de selenio basal en plasma de la unidad experimental 867 (Grupo tratamiento).
33. Resultados de la concentración de selenio basal en plasma de la unidad experimental 870 (Grupo tratamiento).
34. Resultados de la concentración de selenio basal en plasma de la unidad experimental 142 (Grupo tratamiento).
35. Resultados de la concentración de Selenio basal en plasma de la unidad experimental 863(Grupo Placebo).
36. Resultados de la concentración de Selenio basal en plasma de la unidad experimental 395 (Grupo Placebo).
37. Resultados de la concentración de Selenio basal en plasma de la unidad experimental 864 (Grupo Placebo).
38. Resultados de la concentración de Selenio basal en plasma de la unidad experimental 876 (Grupo Placebo).

39. Resultados de la concentración de Selenio basal en plasma de la unidad experimental 874 (Grupo Placebo).
40. Resultados de la concentración de selenio en plasma de la unidad experimental 860 (Grupo tratamiento).
41. Resultados de la concentración de selenio en plasma de la unidad experimental 861 (Grupo tratamiento).
42. Resultados de la concentración de selenio en plasma de la unidad experimental 867 (Grupo tratamiento).
43. Resultados de la concentración de selenio en plasma de la unidad experimental 870 (Grupo tratamiento).
44. Resultados de la concentración de selenio en plasma de la unidad experimental 142 (Grupo tratamiento).
45. Resultados de la concentración de selenio en plasma de la unidad experimental 863 (Grupo placebo).
46. Resultados de la concentración de selenio en plasma de la unidad experimental 395 (Grupo placebo).
47. Resultados de la concentración de selenio en plasma de la unidad experimental 864 (Grupo placebo).
48. Resultados de la concentración de selenio en plasma de la unidad experimental 876 (Grupo placebo).
49. Resultados de la concentración de selenio en plasma de la unidad experimental 874 (Grupo placebo).
50. Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa estadístico WinNolind
51. Peso (Kg) de las unidades experimentales del Grupo Placebo.
52. Peso (Kg) de las unidades experimentales del Grupo Tratamiento

CUADROS

1. Ecuación de modelo lineal.
2. Hipótesis del sistema.
3. Hipótesis del intercepto

FIGURAS

1. Sistema digestivo de un rumiante mostrando la posición relativa de los órganos digestivos.
2. Bolos utilizados para la suplementación de selenio (13g)
3. Bolos utilizados para la suplementación de selenio (7.2g)
4. Animales utilizados en el estudio
5. Espectrofotómetro de absorción Atómica con sistema de atomización por generador de hidruros.

GRAFICAS

1. Grafico de peso inicial de los grupos experimentales
2. Curva de calibración para selenio por EAA-GH
3. Curva de calibración
4. Concentración de selenio basal en plasma en función del tiempo en el grupo Placebo.
5. Concentración de selenio basal en plasma de cada unidad experimental en función del tiempo en el grupo Placebo.
6. Concentración de selenio basal en plasma en función del tiempo en el grupo Tratamiento.
7. Concentración de selenio basal en plasma de cada unidad experimental en función del tiempo en el grupo Tratamiento.
8. Perfiles plasmáticos en medicamentos de lenta liberación
9. Concentración de selenio en plasma en función del tiempo en el grupo Tratamiento
10. Concentración de selenio en plasma en función del tiempo en el grupo Placebo
11. Comportamiento de los pesos del grupo Tratamiento
12. Comportamiento de los pesos del grupo Placebo
13. Comparación de ABC entre los grupos Tratamiento y Placebo.
14. Resultados obtenidos con el programa Winnolin (UE 860)

15. Resultados obtenidos con el programa Winnolin (UE 861)
16. Resultados obtenidos con el programa Winnolin (UE 867)
17. Resultados obtenidos con el programa Winnolin (UE 870)
18. Resultados obtenidos con el programa Winnolin (UE 142)
19. Concentración basal de selenio en plasma en función del tiempo (UE 860).
20. Concentración basal de selenio en plasma en función del tiempo (UE 861)
21. Concentración basal de selenio en plasma en función del tiempo (UE 867)
22. Concentración basal de selenio en plasma en función del tiempo (UE 870)
23. Concentración basal de selenio en plasma en función del tiempo (UE 142)
24. Concentración basal de selenio en plasma en función del tiempo (UE 863).
25. Concentración basal de selenio en plasma en función del tiempo (UE 395).
26. Concentración basal de selenio en plasma en función del tiempo (UE 864).
27. Concentración basal de selenio en plasma en función del tiempo (UE 876).
28. Concentración basal de selenio en plasma en función del tiempo (UE 874).
29. Concentración de selenio en plasma en función del tiempo (UE 860)
30. Concentración de selenio en plasma en función del tiempo (UE 861)
31. Concentración de selenio en plasma en función del tiempo (UE 867)
32. Concentración de selenio en plasma en función del tiempo (UE 870)
33. Concentración de selenio en plasma en función del tiempo (UE 142)
34. Concentración de selenio en plasma en función del tiempo (UE 863)
35. Concentración de selenio en plasma en función del tiempo (UE 395)

36. Concentración de selenio en plasma en función del tiempo (UE 864)
37. Concentración de selenio en plasma en función del tiempo (UE 876)
38. Concentración de selenio en plasma en función del tiempo (UE 874)
39. Perfiles de los pesos de las UE del Grupo Placebo
40. Perfiles de los pesos de las UE del Grupo Tratamiento

ABREVIATURAS

ABC	Área Bajo la Curva
ABC INF_obs	Área Bajo la Curva Infinito Observada
Abs	Absorbancia
APhA	Asociación de Farmacéuticos Americanos
Cmax	Concentración Máxima
Conc	Concentración
Corr_XY	Correlación XY
CV	Coefficiente de Variación
D	Dosis
DESVEST	Desviación Estándar
EEA	Espectrofotometría de Absorción Atómica
EEA – GH	Espectrofotometría de Absorción Atómica por Generador de Hidruros
F	Fármaco
FDA	Food and Drug Administration
°C	Grados Centígrados
g	Gramos
gl	Grados de Libertad
GSH	Glutación
GSH-Px	Glutación Peroxidasa
GSSG	Glutación Oxidada
HCl	Ácido Clorhídrico
HNO ₃	Ácido Nítrico
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
hrs	Horas
H ₂ Se	Ácido Selenhídrico
ID	Identificación
k _a	Constante de absorción

Kg	Kilogramo
L	Litro
M	Molar
MAT	Tiempo Medio de Absorción
mcg	Microgramo
µg	Microgramo
min	Minutos
mL	Mililitro
MRT	Tiempo de Vida media de Retención
MRTINF_obs	Tiempo de Vida media de Retención Infinito Observado
NaBH ₄	Borohidruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
Na ₂ SeO ₄	Selenato de Sodio
Na ₂ SeO ₃	Selenito de Sodio
ng	nanogramo
No	Número
O ₂	Oxígeno
O ₂ ·	Superóxido
OH	Hidroxilo
ppb	Partes por billón
%	Por ciento
%p/p	Por ciento peso/peso
r ²	Coefficiente de determinación
r	Coefficiente de correlación
R. A.	Reactivo Analítico
rpm	Revoluciones por Minuto
Q	Cantidad
s	Segundos
S	Desviación Estándar
SC	Suma de cuadrados
Se	Selenio

Se-Cys	Selenocisteína
-SeH	Grupo Selenol
SeO ₄ ²⁻	Selenato
SeO ₃ ²⁻	Selenito
STD	Estándar
t _{1/2}	Tiempo de Vida Media
T _{máx}	Tiempo máximo
UE	Unidad Experimental
W	Watts

RESUMEN

RESUMEN

Underwood en 1981 consideraba que eran 22 elementos minerales los esenciales para las formas superiores de vida animal. Éstos comprenden siete minerales principales o macronutrientes: calcio, fósforo, potasio, sodio, cloro, magnesio y azufre, y 15 elementos minerales micronutrientes o elementos traza: hierro, yodo, cinc, cobre, manganeso, cobalto, molibdeno, selenio, cromo, estaño, vanadio, flúor, silicio, níquel y arsénico.

Cuando los animales no cuentan o bien no consumen raciones adecuadas de minerales no satisfacen sus necesidades y como consecuencia se generan desórdenes nutritivos que provocan enfermedades agudas y severas por déficit o toxicidad mineral, caracterizadas por signos clínicos bien definidos, desde alteraciones patológicas y alta mortalidad, hasta cambios ligeros y transitorios difíciles de diagnosticar con certeza y que suelen expresarse como crecimiento, producción y fertilidad insatisfactoria o poco económica. Las deficiencias o toxicidades leves adquieren gran importancia en la nutrición del ganado por su difusión y facilidad con que pueden ser confundidas con los efectos de agotamiento por desnutrición, deficiencia proteica o varios tipos de infección. (Underwood y Suttle 2003).

Hasta hace pocos años los microminerales se añadían a las dietas para controlar deficiencias nutricionales tales como la anemia (hierro), la paraqueratosis (zinc) y el bocio (yodo). Sin embargo, trabajos publicados en los últimos años han demostrado de forma fehaciente que cantidades adicionales de ciertos elementos traza mejoran aspectos productivos distintos de los clásicos síntomas de deficiencia. Debido a los problemas que se presentan en la salud y producción del ganado lechero (rumiantes) a causa de los bajos niveles de elementos traza, se hace necesario realizar un estudio acerca de las concentraciones de dichos elementos en nuestro caso, en el organismo de estos animales. De ahí el propósito de este trabajo

Los datos de biodisponibilidad proporcionarán un estimado de la fracción absorbida, así como de su subsiguiente distribución y eliminación del selenio. La biodisponibilidad podrá documentarse con un perfil de exposición sistémica que se obtendrá midiendo la

concentración de selenio en circulación general (plasma) en función del tiempo; esto se logrará mediante la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Generador de Hidruros.

Los estudios de biodisponibilidad de un producto son elementos importantes desde el punto de vista tecnológico (desarrollo de fórmula y proceso), y también desde un aspecto regulatorio (obtención de una patente y registro del medicamento, permiso para su venta) y constituyen un elemento esencial de la seguridad para el usuario.

De acuerdo con lo anterior, es necesario utilizar determinaciones farmacocinéticas en una matriz biológica accesible como sangre, plasma y/o suero para determinar la liberación del selenio desde los bolos hacia la circulación sistémica; por lo tanto en este trabajo se llevará a cabo la administración de un bolo de lenta liberación de selenito de sodio a bovinos lecheros a fin de determinar algunos parámetros farmacocinéticos que ayuden a establecer la biodisponibilidad de los bolos elaborados.

ANTECEDENTES

I ANTECEDENTES

1. 1 Introducción

Cuando los animales no cuentan o bien no consumen raciones adecuadas de minerales no satisfacen sus necesidades y como consecuencia se generan desórdenes nutritivos que provocan enfermedades agudas y severas por déficit o toxicidad mineral, caracterizadas por signos clínicos bien definidos, desde alteraciones patológicas y alta mortalidad, hasta cambios ligeros y transitorios difíciles de diagnosticar con certeza y que suelen expresarse como crecimiento, producción y fertilidad insatisfactoria o poco económica. Deficiencias o toxicidades pequeñas adquieren gran importancia en la nutrición del ganado por su difusión y facilidad con que pueden ser confundidas con los efectos de agotamiento por desnutrición, deficiencia proteica o varios tipos de infección. (Underwood y Suttle 2003).

Durante muchos años el interés biológico por el selenio se limitó a sus efectos tóxicos sobre los animales. Dos enfermedades que afectan de forma natural a los animales de granja, *vértigo ciego* y *enfermedad alcalina*, fueron identificadas como manifestaciones de la intoxicación aguda y crónica de selenio respectivamente. Estos descubrimientos estimularon las investigaciones encaminadas a determinar selenio en tierras, vegetales y tejidos animales para poder determinar consumos mínimos que resulten tóxicos y desarrollar métodos prácticos de prevención y control (Underwood y Suttle 2003).

Las deficiencias de selenio en varias especies animales se manifiesta por signos clínicos específicos y no específicos. La severidad depende del grado de deficiencia y el esfuerzo al que es expuesto el animal. Las enfermedades bien conocidas por deficiencia de selenio incluye la distrofia muscular nutricional en rumiantes, necrosis hepática en ratas, degeneración pancreática, suspensión reproductiva, encefalomalacia en pollos y otras (Shamberger 1983, L. Pavlata, A. Pechova, J. Illek. 2000).

Se ha señalado que la concentración de selenio en el cuerpo de un animal depende de la especie, de la preinfección, de los niveles de este mineral en el órgano y de la forma química que se administra. También la vía de administración es importante, pues cuando se inyecta selenito de sodio subcutáneo en ovejas se advierte que la fracción de la dosis retenida es más alta en dosis bajas que en dosis altas. La alta concentración de selenio en el hígado es un porcentaje relativamente constante, la retención de selenio en este órgano esta relacionado con la ruta de administración del selenio.

1.2 Absorción de selenio y formas de suplementación

La absorción de selenio es mucho más baja en rumiantes (animales de cuatro estómagos) que en los animales no rumiantes. La baja absorción de ciertos minerales (Selenio, Cobre, etc.) en ganado lechero es debido a modificaciones que ocurren en el ambiente ruminal. La biodisponibilidad del selenio se reduce por el alto contenido de sulfuro en la dieta y la presencia de glucósidos cianogénicos en ciertas leguminosas. Se ha reportado que cuando los animales son suplementados con selenio orgánico como la selenometionina se obtienen niveles de éste en tejido y en leche mayores que los obtenidos con selenito de sodio (Jerry W. Spears. 2002).

Las especies de selenio encontradas en los organismos vivos se muestran en la tabla 1, éstas se dividen en 2 grupos: selenoproteínas y otras especies en las que se encuentran sales inorgánicas y selenoaminoácidos. Los primeros se presentan como productos de reacciones enzimáticas tales como reducción, metilación y reacciones de síntesis de selenoaminoácidos (Lobinski R. 2000).

Tabla 1. Especies de selenio en organismos vivos.

<i>Selenio en proteínas</i>	
Selenoproteínas	Residuos de selenocisteinil
Proteínas conteniendo selenio	Residuos de selenometinil
<i>Otras especies de selenio</i>	
Selenio inorgánico	Selenito (SeO_3^{2-}), selenato (SeO_4^{2-})
Selenio metilado	Monometilselenol, dimetilselenuro, iones trimetilselenonio
Selenoaminoácidos	Selenocistina, selenometionina, Selenometilselenocisteína, selenoglutatión

El selenio se presenta a diversos niveles en los tejidos y el tejido más rico: el riñón puede contener 15-20 veces la concentración de selenio con relación al tejido más pobre: el músculo.

La eficacia de la absorción de varios minerales traza y la dieta son factores que afectan la biodisponibilidad de los minerales grandemente entre los animales de cuatro estómagos y los no rumiantes. En las vacas la digestión microbiana en el rumen y el retículo precede a la digestión principal que se efectúa en el abomaso y el intestino delgado (Figura 1). Las dietas del ganado lechero usualmente son altas en fibra y la digestión adecuada de fibra ocurre vía fermentación microbiana en el rumen. Sin embargo 1) la asociación de minerales con fracciones de fibra en alimentos y/o la asociación de minerales con constituyentes de fibra no digerible en el tracto gastrointestinal puede alterar la biodisponibilidad de algunos minerales traza en el ganado vacuno. El pH en el ambiente ruminal es solo ligeramente ácido (6.0-6.8), y en el rumen pueden existir minerales traza en forma insoluble. Muy pocos complejos metálicos que son formados en el rumen son totalmente insolubles bajo las condiciones ácidas en el abomaso (Jerry W. Spears. 2002).

La baja absorción de selenio en ganado vacuno se debe al resultado de la reducción de selenio en la dieta de formas insolubles como selenio elemental o selenidos en el ambiente ruminal. El selenio y el sulfuro son química y físicamente similares y ciertos estudios indican que el incremento de sulfuro en la dieta reduce la biodisponibilidad del selenio (Jerry W. Spears. 2002).

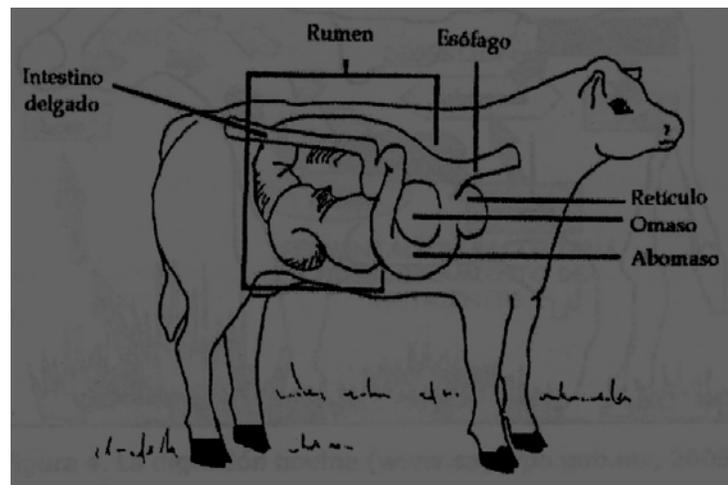


Figura 1. Sistema digestivo de una vaca mostrando la posición relativa de los órganos digestivos (Gyurik, 1988)

Diferencias en la biodisponibilidad en la cantidad de selenio en el forraje o entre la concentración y el forraje de la dieta pueden estar relacionadas por diferencias en el contenido de sulfuro o la presencia de compuestos tales como glucósidos cianogénicos los cuales son antagonistas del selenio (Jerry W. Spears. 2002).

De acuerdo a Davison y Kennedy (1993) el selenio administrado por vía parenteral en forma de selenito se incorpora rápidamente a proteínas plasmáticas ricas en selenocisteína, especialmente en animales deficientes en selenio, y puede utilizarse para la síntesis de otras selenoproteínas debido a la actividad de enzimas como la selenocisteína β liasa. Aunque la selenometionina se absorbe y distribuye bien, su conversión a selenocisteína para la síntesis de proteínas funcionales es lenta (Henry y Ammerman, 1995).

El selenio inyectado se acumula principalmente en el hígado y se excreta mayoritariamente con la bilis (Langlands e tal., 1986). No es muy confiable asumir que valores de pérdidas endógenas fecales son independientes del consumo de selenio ya que existen referencias que aumentan a medida que el consumo de materia seca también lo hace. A pesar de que la eliminación de selenio por orina corresponde a una cantidad

pequeña, relativa a las pérdidas por heces en rumiantes, éstas pueden estar entre 40-50% de la ingestión total de selenio en animales deficientes en selenio con un balance negativo (Langlands e tal., 1986).

El principal componente del selenio plasmático es la selenoproteína P, una molécula nueva con más de diez residuos seleno-cisteína (Se-Cys) que se incorpora a la cadena peptídica. Otra selenoproteína aislada por primera vez de corazón y músculo (Whanger et al., 1973), recibió posteriormente el nombre de selenoproteína W (Vendeland et al., 1993) y se observó que contenía un gramo de selenio por cada mol de Se-Cys (Whanger et al., 1977b), pero su función sigue sin aclararse. Durante una deficiencia de selenio, las concentraciones de la proteína W en el músculo disminuyen pero se mantienen las del cerebro, mientras que un exceso en la ingestión de selenio (3mg Kg^{-1} Materia Seca) aumenta los niveles de éste en todos los tejidos del animal exceptuando el cerebro. El selenio se presenta en plasma en concentraciones menores que en los eritrocitos pero responde mucho más rápido a oscilaciones en la ingestión (Underwood E. J. y Suttle N. F. 2003).

1.3 Efecto de la suplementación de selenio con bolos intrarruminales sobre sus concentraciones plasmáticas en bovinos lecheros

Las pequeñas cantidades de selenio que son necesarias para suplementar a los animales hacen posible su administración a rumiantes mediante bolos, Kuchel y Buckley (1969) desarrollaron un bolo de selenio elemental, relleno de hierro que era lo suficientemente denso para permanecer en el rumen de los animales, en donde lentamente liberaba selenio por periodos prolongados de tiempo.

La 6ª y 7ª ediciones del NRC (Nacional Research Council) correspondientes al año de 1989 y 2001, respectivamente, definen los requerimientos de selenio como 0.3mg/Kg de MS (Materia Seca) para todas las clases de ganado lechero.

El suministro apropiado de selenio a animales en gestación es importante para prevenir algunos desórdenes y también para asegurar que el becerro nacerá con niveles adecuados de selenio. La concentración de selenio en leche se incrementa cuando las vacas son suplementadas con éste mineral (Van Saun et al., 1989). Mayores cantidades de selenio en la leche pueden tener efectos positivos en la salud del becerro y del ser humano (Grace et al., 1997).

Las regulaciones de la FDA (1997) limitan la suplementación de selenio a 0.3mg/Kg de dieta en la mayoría de las situaciones, la cantidad de selenio suplementado mantendrá al ganado en buen estado. Las concentraciones de selenio en sangre total deberán ser mayores a 0.118 µg/mL o aproximadamente de 0.08 µg/mL de plasma (Jukola et al., 1996). Basados en los datos disponibles, el requerimiento de selenio recomendado son de 0.3mg/Kg de la dieta en base seca.

En rumiantes se manejan dosis de 0.1 a 1mg de Se/Kg peso vivo. La suplementación en bovinos se realiza con 25 o 30 mg de selenio como selenito de sodio.

1.4 Determinación de la biodisponibilidad de una forma farmacéutica sólida

Para determinar la biodisponibilidad de un fármaco se hace uso del estudio del tránsito del fármaco a través del organismo, bien sea de sus niveles plasmáticos en la circulación sistémica o a través de la cuantificación del fármaco en otros fluidos biológicos, como puede ser la orina o la sangre.

La biodisponibilidad se puede establecer tanto a partir de las curvas *de niveles plasmáticos* como a partir de las curvas de excreción urinaria y, teniendo en cuenta que puede evaluarse a partir de la administración de dosis únicas (lo cual se realizará en este

estudio) o en condiciones de estado de equilibrio estacionario tras un régimen posológico de dosis múltiples.

El perfil de la biodisponibilidad de un medicamento corresponde al comportamiento cronológico de la presencia del principio activo en el organismo receptor estudiado, tal que puedan describirlo los niveles plasmáticos. Este perfil es una función directa de la biodisponibilidad del medicamento o de la disposición del principio activo (Aiache, 1983). Los parámetros que determinan la biodisponibilidad se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos utilizados en los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia tras la administración de dosis única

Parámetro	Significado
ABC_0^∞	Área bajo la curva de niveles plasmáticos, desde tiempo cero hasta infinito.
Q_e	Cantidad de fármaco inalterado excretado en orina.
$C_{m\acute{a}x}$	Nivel plasmático máximo.
MRT	Tiempo medio de residencia
$T_{1/2}$	Semivida de la fase de disposición terminal de las curvas de niveles plasmáticos.
T_{max}	Tiempo al que se alcanza el nivel plasmático máximo.

1.4.1 Factores que influyen en la biodisponibilidad

- Factores relacionados con el principio activo.
- Factores relacionados con la forma de dosificación:
 - ☉ Factores de formulación
 - ☉ Factores tecnológicos o de proceso

1.4.2 Factores relacionados con el individuo:

- Factores fisiológicos
- Factores patológicos

1.5 Determinación de la biodisponibilidad

La forma de evaluar la biodisponibilidad depende del tipo de fluido analizado. Lo que se busca es una variable que se relacione linealmente con la cantidad que alcanza la circulación general o bien que represente adecuadamente la cinética de la disposición. Así que la fracción de la dosis administrada que accede a la circulación sistémica puede determinarse a partir de las curvas de *niveles plasmáticos* o a partir de datos de excreción urinaria, al ser la sangre y la orina dos líquidos biológicos fácilmente muestreables (José Domenech B. et al).

1.5.1 Determinación de la biodisponibilidad en función de la velocidad de absorción

Puesto que la estimación de la biodisponibilidad debe abordarse desde dos puntos de vista: el de la magnitud y el de la velocidad. Esta última es un tanto complicada debido a la dificultad para caracterizar y cuantificar el proceso de la absorción de los fármacos. Dicho proceso (de absorción) se ve modificado por diversas variables fisiológicas (vaciado gástrico, motilidad intestinal, modificaciones del flujo sanguíneo) y patológicas que distorsionan la cinética del proceso de absorción lo cual hace muy difícil su tratamiento matemático si se pretende obtener parámetros precisos y fiables de dicho proceso.

Algunos parámetros indicativos de la velocidad de absorción son los siguientes:

a) Parámetros puntuales:

- $t_{máx}$
- $C_{máx}$

b) Parámetros no compartimentales:

- $C_{máx}/ABC_0^{\infty}$
- MAT (*Tiempo Medio de Absorción*)

- $ABC_{máx} / ABC_0^{\infty}$
- c) Parámetros compartimentales:
 - k_a (Constante de absorción)
- d) Grado de absorción

1.5.2 Cálculo de la biodisponibilidad a partir de los niveles plasmáticos

En la determinación de la biodisponibilidad a partir de dosis únicas, según el principio del equilibrio de masas, se asume que la cantidad de fármaco que accede al plasma es igual a la cantidad de fármaco que se elimina del plasma. De manera que matemáticamente se asumirá que a tiempo infinito toda la cantidad de fármaco que ha accedido al plasma se habrá eliminado (José Domenech B. et al).

$$F * D = Q_{e\infty}$$

La biodisponibilidad en magnitud o fracción de dosis que accede inalterada a la circulación sistémica, F, puede determinarse a partir de la siguiente expresión:

$$F = \frac{Cl * ABC_0^{\infty}}{D}$$

La biodisponibilidad se puede evaluar de manera absoluta o de manera relativa:

La biodisponibilidad general se evalúa bajo la suposición de que tras una administración intravenosa, toda la cantidad proporcionada entre al torrente sanguíneo. De esta manera el área abajo la curva de la dosis intravenosa representa el área que se debe obtener tras dar la misma dosis por otra vía. La fórmula siguiente indica el cálculo:

$$\text{Biodisponibilidad absoluta} = \left[\frac{ABC_x}{ABC_{iv}} \right] * \left[\frac{D_{iv}}{D_{ix}} \right]$$

El valor obtenido representa el valor de la fracción proporcionada que alcanza la circulación general.

Sin embargo, ya sea porque no es posible la administración intravenosa o que no se requiere evaluar la biodisponibilidad absoluta, también se puede evaluar la Biodisponibilidad relativa, que consiste en comparar las áreas bajo la curva obtenidas para un medicamento bajo prueba y otro que haya probado ser eficaz y seguro en la terapia, esto es lo que se denomina bioequivalencia si se comparan las biodisponibilidades relativas de equivalentes farmacéuticos.

$$\text{Disponibilidad relativa} = \frac{ABC_X}{ABC_{STD}} * \frac{D_{STD}}{D_X}$$

La definición de biodisponibilidad indica que todo estudio debe consistir en la evaluación de las características de un medicamento en un ente biológico intacto. Esto implica a la variabilidad biológica como una dificultad que tiene que ser considerada.

Básicamente un estudio de biodisponibilidad persigue los siguientes objetivos: obtención de información para elegir una vía de administración, forma farmacéutica, formulación, control de calidad del medicamento y establecimiento de la bioequivalencia .

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- ∅ Determinar los niveles de selenio total en plasma para estimar los parámetros farmacocinéticos (Cmax, Tmax, ABC) de bolos intrarruminales con selenito de sodio en rumiantes.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ∅ Seleccionar las unidades experimentales para el estudio.
- ∅ Definir los tiempos de muestreo y condiciones de tratamiento de la muestra para las determinaciones de selenio en plasma.
- ∅ Determinar la concentración de selenio total en plasma mediante espectrofotometría de Absorción Atómica por generación de hidruros previa digestión ácida asistida por microondas de las muestras.
- ∅ Analizar los niveles de selenio en plasma con el programa WinNonlin para estimar los parámetros farmacocinéticos de los bolos con selenito de sodio.

MATERIAL Y METODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 EQUIPOS

- * Balanza Analítica BOECO Máx. 120g Min. 0.01g Alemania.
- * Horno de Microondas Mars 5 CEM corporation Falcon USA.
 - Carrusel con 14 tubos de teflón HP500 plus temperatura máxima 210°C y presión máxima 350psi.
 - Sensor de temperatura de fibra óptica CEM modelo FOT-L-CEM-1, rango – 50°C A 250°C.
- * Espectrofotómetro de Absorción Atómica Spectral AA 220 Varian Australia.
 - Generador de Hidruros VGA 77 Varian Australia.

3.1.2 MATERIAL

- * Membranas para los vasos HP-500 safety membranas CEM 140 piezas. Use part #431300 Falcon USA.
- * Lámpara de selenio HC Lamp-Se Varian Australia No. Parte 56-101270-00, No. De serie 01K0308
- * Micropipeta Finnpipette Labsystems capacidad de 100-1000 µL
- * Micropipeta Finnpipette Labsystems capacidad de 5-50 µL
- * Micropipeta Finnpipette Labsystems capacidad de 1-5 µL
- * Matraz volumétrico de 25mL. Kimax México. Tipo “A”
- * Matraz volumétrico de 50mL. Kimax México. Tipo “A”
- * Matraz volumétrico de 1000mL. Kimax IVA Argentina vidrio borosilicato.
- * Probeta de 1000mL IVA Argentina patente No. 151475 vidrio borosilicato.
- * Probeta de 10mL de vidrio.
- * Tubos vacutainer® K₃EDTA Becton Dickinson de 5mL.
- * Agujas vacutainer 21gx 38mm (0.8x38mm) Becton Dickinson, Catalogo No. 367223

3.1.3 REACTIVOS

- * Ácido Nítrico R. A. 65.4% de pureza J. T. Baker de México
- * Ácido clorhídrico R.A. 36.5-38% de pureza J. T. Baker de México
- * Agua desionizada 18.2 Ω cm Millipure
- * Borohidruro de sodio 98% de pureza J. T. Baker USA.
- * Estándar de Selenio High-Purty 1000 \pm 3 μ g/mL en 2% de ácido nítrico con 99.999% de pureza.
- * Hidróxido de sodio perlas 98.4% de pureza bajo en carbonatos J. T. Baker de México.
- * Peróxido de Hidrógeno en solución al 30% J. T. Baker de México.

3.1.4 GASES

- * Acetileno 99.5% de pureza AGA de México
- * Aire comprimido
- * Nitrógeno 99.9% de pureza AGA de México

3.1.5 MUESTRA BIOLÓGICA

- * Sangre de vaca, raza Holstein.

4. METODOS

Se utilizaron dos tipos de bolos en los que la única diferencia entre ellos fue el tamaño porque así se pudo ajustar la dosis recomendada para cada unidad experimental.

Para la formulación de los bolos intrarruminales se incluyó al selenito de sodio como fuente de selenio, mientras que se utilizó hierro reducido como agente densificador a fin de evitar la regurgitación del bolo por parte del animal, las tablas 3 y 4 muestran la composición de los bolos intrarruminales así como la función de los excipientes.

Tabla 3. Formulación de bolos intraruminales de 13g

<i>Componente</i>	<i>Función</i>	<i>Cantidad por bolo (g)</i>
Selenito de sodio	Principio Activo	2.00**
Cutina HR	Excipiente Lípidico	3.900
Talco	Excipiente (Lubricante)	0.065
Hierro Reducido	Agente densificador	6.840
Total		13.000

**Selenito de Sodio (Na_2SeO_3) equivalente a 900mg de Selenio.

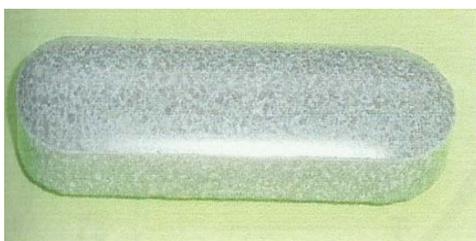


Figura 2. Bolos utilizados para la suplementación de selenio (13g)

Tabla 4. Formulación de bolos intrarruminales de 7.2g

<i>Componente</i>	<i>Función</i>	<i>Cantidad por bolo (g)</i>
Selenito de sodio	Principio Activo	1.107**
Cutina HR	Excipiente Lípidico	2.160
Talco	Excipiente (Lubricante)	0.108
Hierro Reducido	Agente densificador	3.789
Total		7.200

**Selenito de Sodio (Na_2SeO_3) equivalente a 498.15 mg de Selenio

**Figura 3. Bolos utilizados para la suplementación de selenio (7.2g)**

La fabricación de los bolos se llevo acabo en el L.E.M. Farmacia de la FES-C, campo1.

4.1 Localización de las unidades experimentales

El estudio se llevó a cabo en el Área de Experimentación Animal de la Coordinación General de Estudios de Postgrado del Centro de Producción Agropecuaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, en el Estado de México. El módulo se localiza a una altitud de 2252msnm, a una latitud norte de 19° 41' 32'' y una longitud oeste 99° 11' 42''. Caracterizado por un clima templado subhúmedo, con un promedio de precipitación pluvial anual de 1200mm, con vientos dominantes del noroeste, una humedad relativa de 67.9% y una temperatura anual promedio de 14.7°C.

4.2 Manejo de Unidades Experimentales

Se utilizaron 10 vacas raza Holstein de aproximadamente un año de edad, sin gestaciones previas a la investigación, con un peso promedio de 260-280Kg y un sistema de producción estabulado.

Una vez que se contaba con las unidades de experimentación había que aleatorizar los grupos de estudio, lo cual se realizó a través de los pesos de los animales.

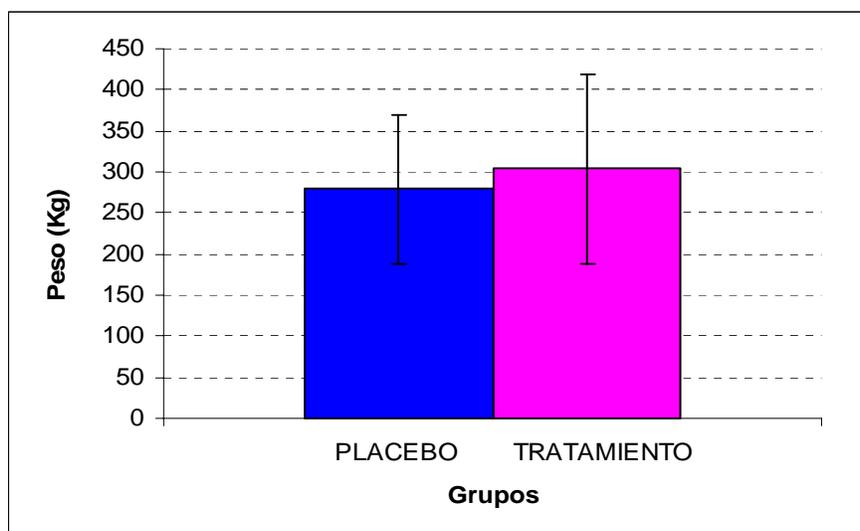
Tabla 5. Peso de grupo Tratamiento

Grupo Tratamiento	
ID	Peso (Kg)*
860	275
861	268
867	226
870	240
142	508
Promedio	303.4
DESVEST	116.12

Tabla 6. Peso de grupo Placebo

Grupo Placebo	
ID	Peso (Kg)*
395	435
864	263
863	271
874	213
876	215
Promedio	279.4
DESVEST	90.98

* Peso correspondiente al inicio del estudio



Grafica 1. Grafico de peso inicial de los grupos experimentales

Se llevo a cabo una sola administración del bolo intrarruminal a cada unidad experimental (grupo placebo [bolo placebo] y grupo tratamiento [bolo con selenito de sodio] a la dosis recomendada 2.6-3.6mg Se/Kg) a los 15 días después de haber iniciado el estudio.

4.3 Dosis

A los animales del grupo Tratamiento se les administro vía oral un bolo de Selenito de Sodio de lenta liberación (dosis 2.6-3.6 mg Se/Kg) y al grupo Placebo se les administro vía oral un bolo placebo (tabla 7).

Se utilizó selenito de sodio (Na_2SeO_3) como forma inorgánica para la suplementación; éste contiene un 45% de selenio.

Tabla 7. Dosis administrada para el grupo Tratamiento y Grupo Placebo

No. ID	Peso (Kg)	Dosis a administrar (mg de Se)
860	275	900
861	268	900
867	226	900
870	240	900
142	508	1800
295	435	Bolo Placebo
864	263	Bolo Placebo
863	271	Bolo Placebo
874	213	Bolo Placebo
876	215	Bolo Placebo

Los bolos administrados fueron elaborados en LEM-Farmacia de la FESC- Campo 1.

4.4 Alimentación

La alimentación se basaba en silo de maíz adicionado con urea y suero de leche, alfalfa y agua, el alimento se proporcionaba ad libitum por la mañana y por la tarde.

4.5 Obtención de muestras

La muestra de sangre se obtuvo por punción coccígea, se tomó muestra cada 72 hrs. durante 15 días, previos a la administración del bolo de lenta liberación, en el día 15 de experimentación se administró dicho bolo a cada unidad experimental y enseguida se tomó la muestra; a partir de la administración del bolo se tomaba muestra cada 72 hrs. y posteriormente cuando los niveles descendieron el muestreo se hizo más espaciado. El muestreo se llevó a cabo durante 3 meses.

Las muestras fueron colectadas con agujas vacutainer en tubos con EDTA sódico de 5mL.

Las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos para obtener el plasma e inmediatamente después llevar a cabo su tratamiento para finalmente poderlas analizar.



Figura 4. Animales utilizados en el estudio.

Diagrama de Flujo I

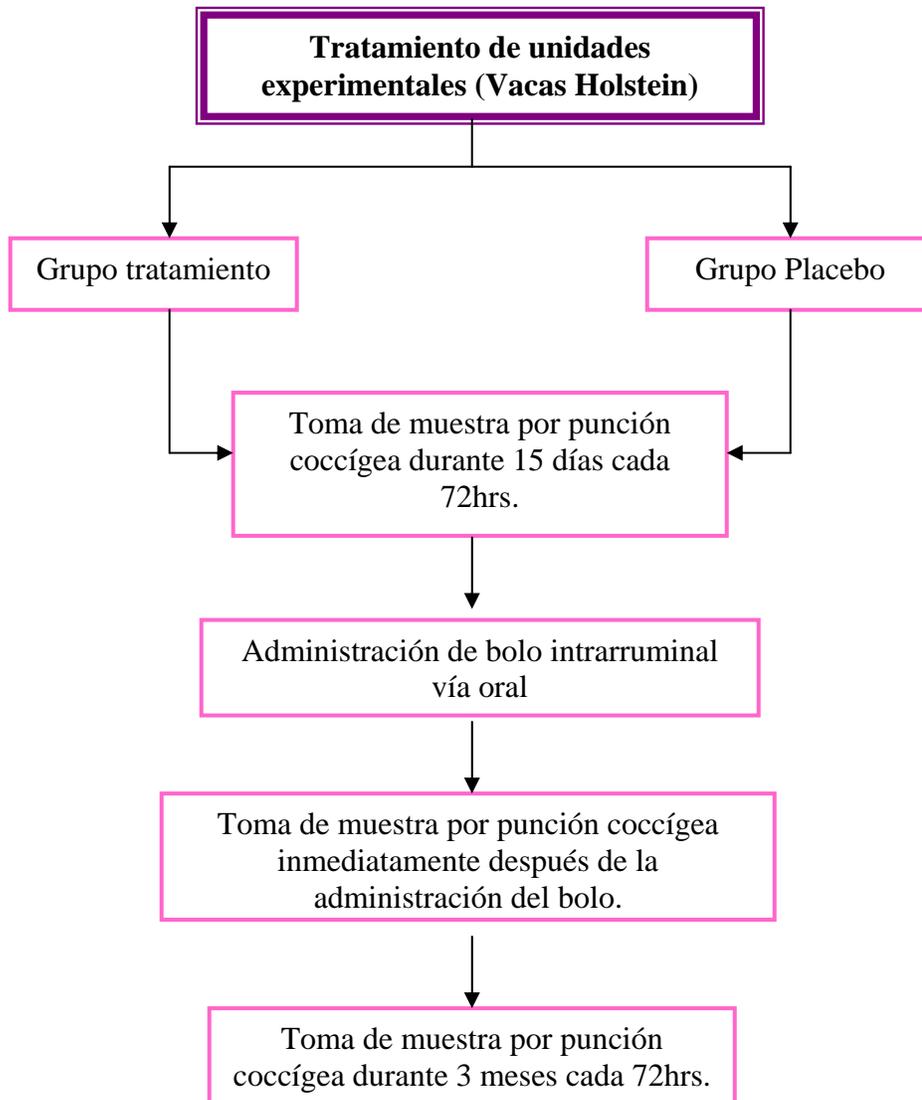
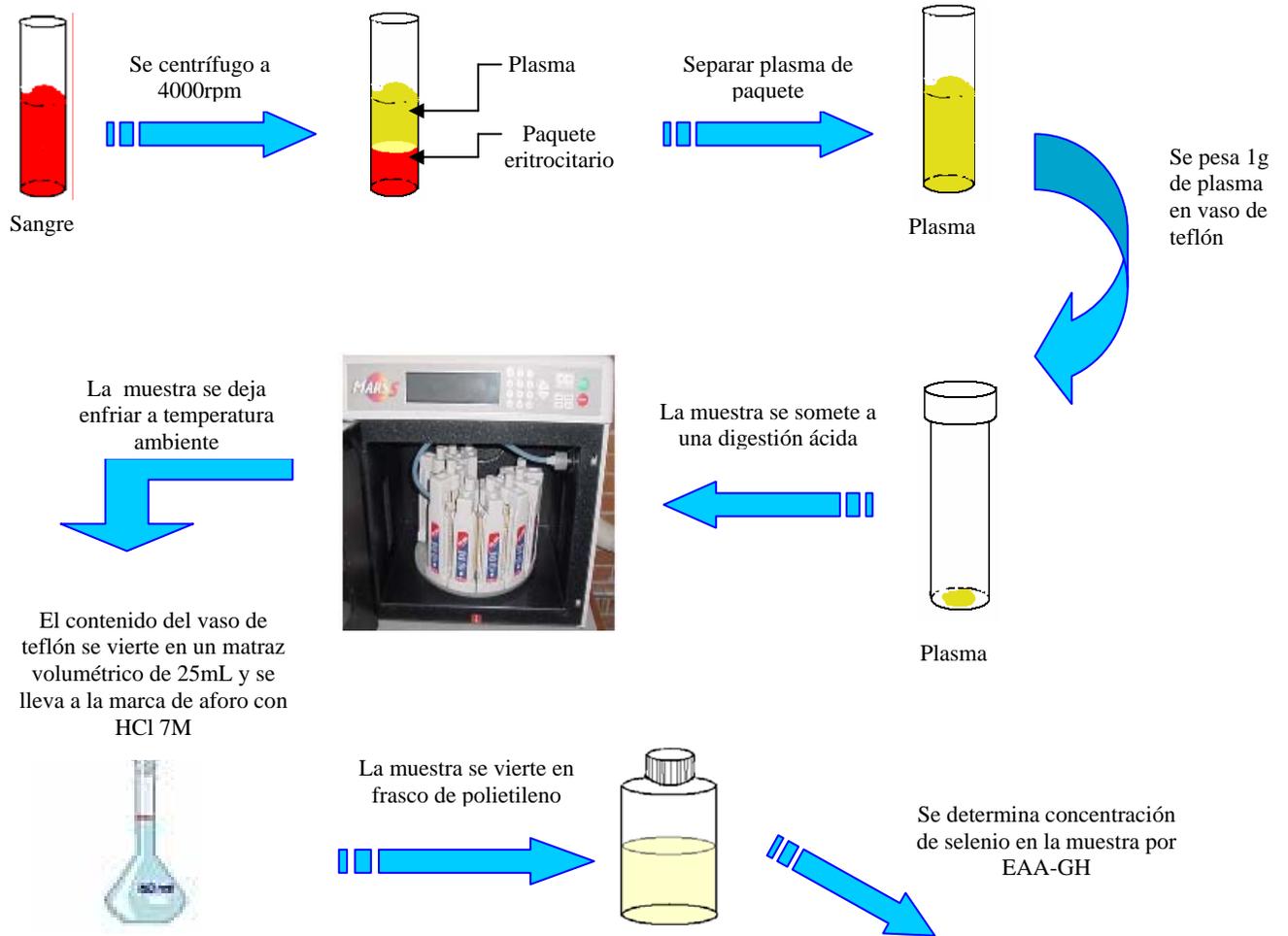


Diagrama de Flujo II

Tratamiento de Muestra Biológica



4.6 Tratamiento de muestra biológica

El acondicionamiento de la muestra se llevó a cabo mediante el método de digestión ácida en horno de microondas (Gleason Huerta. 2004, Hernández Cruz. 2005, Baeza. 2005).

1. Se pesa 1 gramo de muestra (plasma) en un vaso de teflón utilizando una balanza analítica.
2. Posteriormente se agregan 3mL de agua desionizada y 5 mL de ácido nítrico concentrado.
3. Seguido se adiciona 1mL de peróxido de Hidrógeno (H₂O₂)
4. La muestra se mantuvo 30 minutos en reposo.
5. Posteriormente la muestra se somete a digestión ácida en el Horno de microondas.

4.7 Digestión de las muestras biológicas

1. Se colocan los vasos en el carrusel así como el sensor de temperatura en el vaso control; el carrusel se instala dentro del horno y el censer de temperatura se conecta a la entrada que hay dentro del horno.
2. La digestión se lleva acabo utilizando las siguientes condiciones (Gleason Huerta. 2004):

Potencia (W)	Potencia (%)	Tiempo de Alcance (min.)	Temperatura (°C)	Presión (psi)	Tiempo de Mantenimiento (min.)
1200	100	6.24	100	350	5.12
1200	100	4.15	140	350	6.12

- De temperatura ambiente se pasa a 100°C en 6.24 minutos.
- Se mantiene la temperatura de 100°C durante 5.12 minutos.
- Se pasa de 100°C a 140°C en 4.15 minutos.
- Se mantiene la temperatura de 140°C durante 6.12 minutos.

- Finalmente se lleva a cabo una etapa de enfriamiento.
3. Posterior a la etapa de enfriamiento cada muestra se transfiere a un matraz volumétrico de 25mL y se lleva hasta el volumen de aforo con ácido clorhídrico 7M.
 4. Finalmente se trasvasan las muestras en frascos de polietileno para su posterior análisis.

4.8 Cuantificación

Para llevar a evaluar la cantidad de selenio total en plasma se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica con el sistema atomización de generador de hidruros (Nonato Nonato), este sistema permite cuantificar concentraciones del grado de partes por billón (ppb). La espectrofotometría de absorción atómica por generador de hidruros requiere del uso de gases como el acetileno y nitrógeno, los cuales son utilizados a una presión de de 20psi para acetileno y de 50psi para nitrógeno.

En el sistema atomización de generador de hidruros se utiliza un flujo en los capilares de 7mL/minuto para la muestra, mientras que para el ácido y el reductor fue de 1mL/minuto.



Figura 5. Espectrofotómetro de absorción Atómica con sistema de atomización por generador de hidruros.

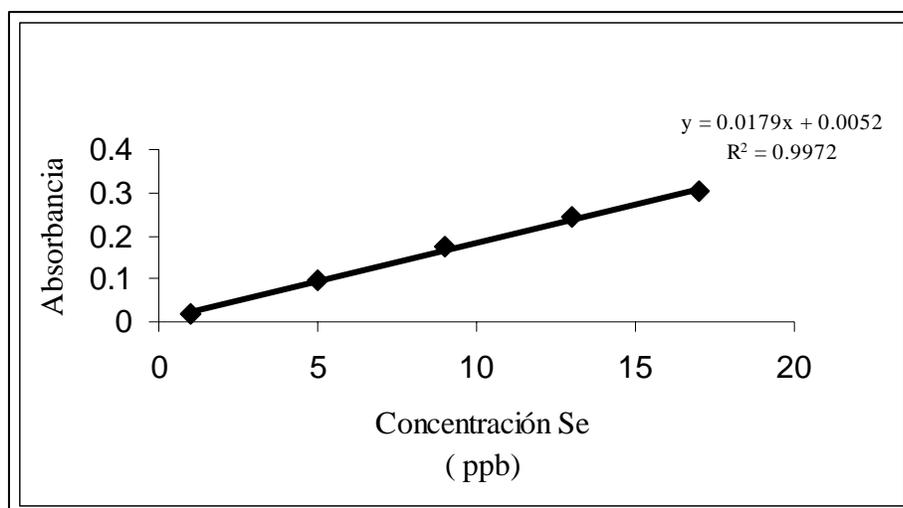
La curva de calibración utilizada se preparó a partir de un stock de 2000 mcg/L, las concentraciones de la curva fueron de 1, 5, 9, 13 y 17 ppb (mcg/L), la tabla 8 muestra los

valores de concentración y absorbancia de la curva utilizada, dichos valores se encuentran representados en el grafico 2; las absorbancias de las muestras se interpolaron en dicha curva, obteniendo así las concentraciones de las muestras.

Tabla 8. Curva de Calibración

Sistema	Conc. ($\mu\text{g/L}$)	Absorbancia
1	1.00	0.0182
2	5.00	0.0952
3	9.00	0.1727
4	13.00	0.2428
5	17.00	0.3022

Grafico 2. Curva de calibración para selenio por EAA-GH



4.9 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

Los parámetros farmacocinéticos de la administración vía oral fueron calculados de los resultados obtenidos de tiempo - Concentración utilizando el programa WINNONLIN análisis NO COMPARTMENTAL Version 4.1 Build 200307301056 Core Version 16May2003. Este análisis se realizó para cada una de las unidades experimentales del grupo tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Características de los bolos intrarruminales utilizados en el estudio

En la tabla 9 se muestran las características de los bolos con selenito de sodio utilizados en el presente estudio.

Tabla 9. Dimensiones Físicas de los Bolos de Selenito de Sodio utilizados en el estudio.

Característica	Estadística	Bolo de 7.2 g	Bolo de 13 g
Largo (mm)	Media	35.5213	45.0167
	CV	0.0204	0.0223
	DESVEST	0.0574	0.0495
Ancho (mm)	Media	10.89	13.3155
	CV	0.0763	0.075
	DESVEST	0.7282	0.5632
Espesor (mm)	Media	10.7502	13.8813
	CV	0.6131	0.1648
	DESVEST	5.7031	1.1872
Densidad (g/ml)	Media	2.4298	2.1756
	CV	0.8095	0.3661
	DESVEST	33.3155	16.8275
Peso (g)	Media	7.3028	13.0125
	CV	1.2972	13.2
	DESVEST	17.7630	101.4409
Uniformidad de Contenido (%)	Media	15.2417	15.682
	CV	0.2382	0.2141
	DESVEST	1.5628	1.3653

Dado que la determinación de selenio se realizó por espectrofotometría de absorción atómica primero se hizo una curva de calibración en un intervalo de concentraciones de 1 a 17 mcg/L. Los resultados obtenidos de dicha curva se muestran en la tabla 10 y en la

grafica 3. En la tabla 11 se comparan los resultados obtenidos y los criterios de aceptación remarcando que se satisfacen las exigencias para aceptar una curva de calibración. Estos resultados nos permiten evidenciar la confiabilidad del sistema utilizado para las determinaciones de selenio.

Tabla 10. Valores de la curva de Calibración

Conc STD Se mcg/L	Abs	Fecha	Abs/conc
1	0.0185	170106	0.0185
1	0.0181	170106	0.0181
1	0.0182	170106	0.0182
5	0.0969	170106	0.0194
5	0.0951	170106	0.019
5	0.0935	170106	0.0187
9	0.1729	170106	0.0192
9	0.1744	170106	0.0194
9	0.1707	170106	0.019
13	0.2423	170106	0.0186
13	0.2434	170106	0.0187
13	0.2427	170106	0.0187
17	0.3007	170106	0.0177
17	0.3035	170106	0.0179
17	0.3023	170106	0.0178
	Promedio		0.0186
	DESVEST		0.0006
	CV		3.0177

Los valores de absorbancia de las muestras a analizar eran interpolados sobre esta curva de calibración y así se determinó la concentración de selenio en las muestras.

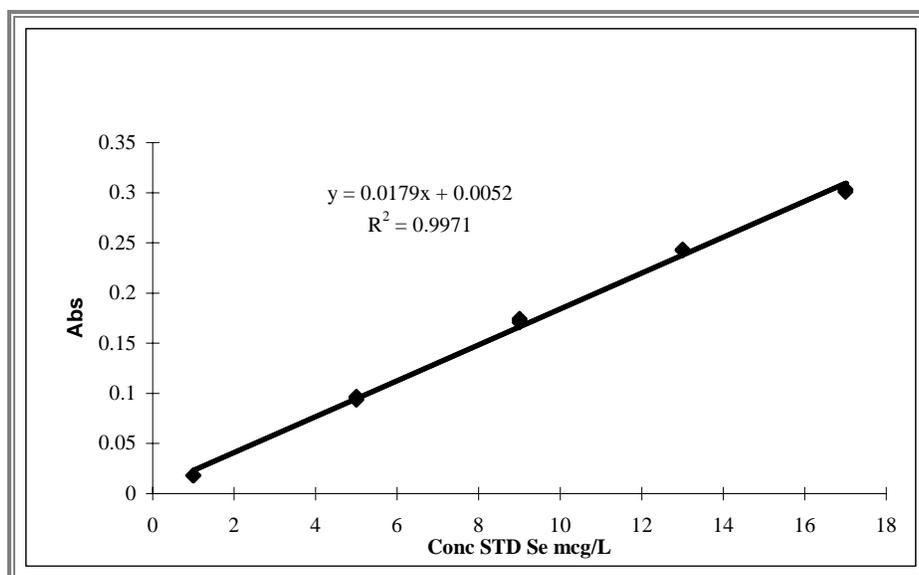


Gráfico 3. Curva de Calibración

De acuerdo los valores de la tabla 11 que muestra el análisis de regresión de la curva de calibración se observa que el coeficiente de determinación explica el 99.71% de la variabilidad en la absorbancia por los cambios en la concentración de Selenio. El coeficiente de correlación nos indica una relación fuerte entre las variables.

Tabla 11. Parámetros estadísticos de la curva de calibración.

Parámetro	Valor obtenido
Coefficiente de correlación múltiple	0.9985
Coefficiente de determinación R^2	0.9971
Intercepto (b)	0.0052
Pendiente (m)	0.0179

El modelo lineal que permitió estimar las concentraciones en las muestras de plasma es el que se describe en la siguiente ecuación (cuadro 1) obtenida a partir de un análisis de regresión (tabla 11):

$$\text{Abs} = 0.0052 + 0.0179 * \text{Conc}$$

Cuadro 1. Ecuación de modelo lineal.

<p>H₀: No existe relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.</p> <p>H₁: Existe relación lineal entre la concentración y la propiedad medida.</p> <p>Criterio de aceptación:</p> <p>Si $F_{Cal} < F_{Crítica}$ no se rechaza H₀.</p> <p>Si $F_{Cal} > F_{Crítica}$ se rechaza H₀.</p>

Cuadro 2. Hipótesis del sistema

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza (Tabla 12) se contrastan las hipótesis planteadas en el cuadro 2. Como el estadístico F calculado a partir de los resultados obtenidos es mayor al valor crítico que corresponde a un nivel de significancia de alfa de 0.05 y grados de libertad de la regresión de uno y del residuo, de trece, se acepta la hipótesis alterna que implica una dependencia de tipo lineal entre los niveles de concentración de selenio y la respuesta analítica que es la absorbancia de cada una de las soluciones de la curva de calibración.

Tabla 12. Análisis de Variancia.

Fuente	G. L.	Suma de Cuadrados	Promedio de los cuadrados	F _{calculado}	Valor crítico de F ($\alpha = 0.05; gl 1/13$)
Regresión	1	0.1535	0.1535	4507.49	6.59E-18
Residuos	13	0.0004	3.41E-05		
Total	14	0.1539			

La prueba del intercepto (b) evaluada para la recta establece la siguiente hipótesis:

H₀: b = 0 La ordenada al origen es cero.

H₁: b ≠ 0 La ordenada al origen es diferente a cero.

Criterio de aceptación:

Si $t_{\text{Cal}} < t_{\text{Crítica}}$ no se rechaza H₀.

Si $t_{\text{Cal}} > t_{\text{Crítica}}$ se rechaza H₀.

Cuadro 3. Hipótesis del intercepto

Tabla 13. Análisis de Regresión.

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	Inferior 95%	Superior 95%
Intercepto	0.0052	0.0028	1.8506	0.0870	-0.0008	0.0113
mcg/L	0.0178	0.0002	67.1379	6.59E-18	0.0173	0.0184

El intervalo de confianza del intercepto considera el cero (ver tabla 13) por lo tanto se acepta la hipótesis nula (cuadro 3) que implica que a una concentración de cero no hay respuesta de selenio en el instrumento utilizado. Esto muestra evidencia de la confiabilidad del método para estimar los niveles de selenio.

Existe una relación lineal altamente significativa entre la concentración de selenio y la absorbancia de la muestra.

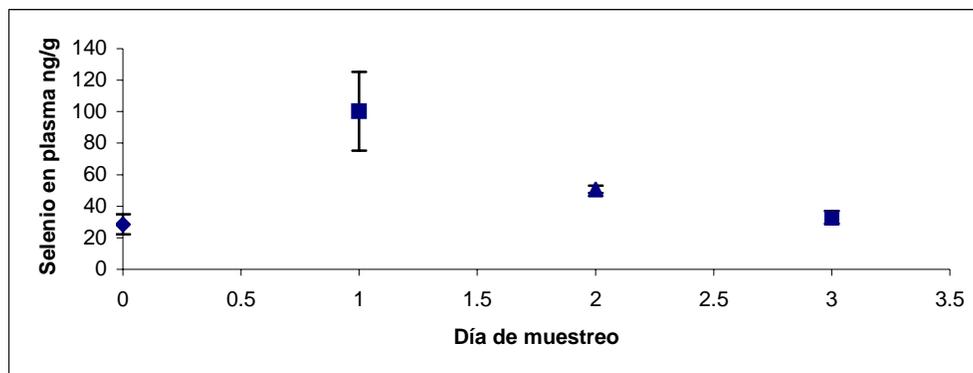
5.2 Perfiles plasmáticos de selenio

Para poder determinar las condiciones iniciales de las unidades experimentales se requirió de realizar un muestreo de sangre (por punción coccígea) cada 72 horas durante 15 días a fin de establecer los niveles de selenio endógeno en plasma, en los 2 grupos de estudio (grupo placebo y grupo tratamiento), dichos valores se presentan en las tablas 14 y 15 respectivamente.

Tabla 14. Resultados de las concentraciones basales de Selenio en Plasma (Grupo Placebo).

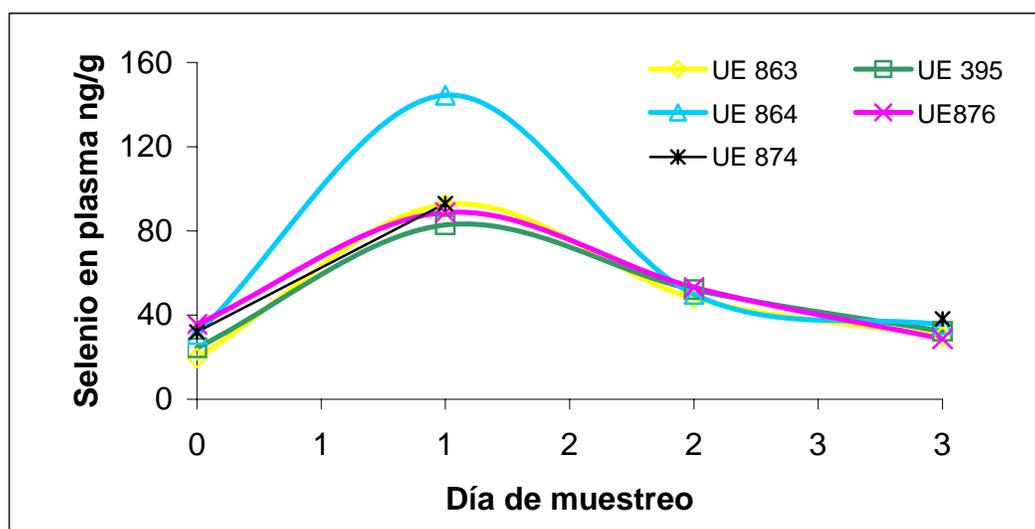
ng de Se por g de plasma (Grupo Placebo)							
Día muestreo	No. ID					Promedio	DESVEST
	863	395	864	876	874		
0	19.58	24.44	30.85	35.55	32.06	28.50	6.41
1	92.50	82.92	144.39	88.73	93.01	100.31	24.97
2	47.94	52.03	49.80	53.08		50.72	2.30
3	30.09	32.32	35.40	28.71	38.26	32.96	3.90
Promedio	47.53	47.93	65.11	51.52	54.45		

Como se puede ver en la grafica 4, las concentraciones basales de selenio en plasma en el grupo Placebo, en la segunda toma de muestra hay una mayor desviación de los datos, que en el resto de los días de muestreo, esto se puede explicar con la grafica 5.



Gráfica 4. Concentración de selenio basal en plasma en función del tiempo en el grupo Placebo.

La grafica 5 muestra las concentraciones de selenio basal en plasma por cada unidad experimental en las 4 tomas de muestra durante los 15 días de análisis inicial. Éste grafico muestra como no hay mucha variación en los datos excepto en la segunda toma de muestra, un valor, el de la unidad experimental 864, presenta un mayor nivel de selenio en plasma que el resto de los animales, esto explica la desviación en el segundo punto de la grafica 4.



Gráfica 5. Concentración de selenio basal en plasma de cada unidad experimental en función del tiempo en el grupo Placebo.

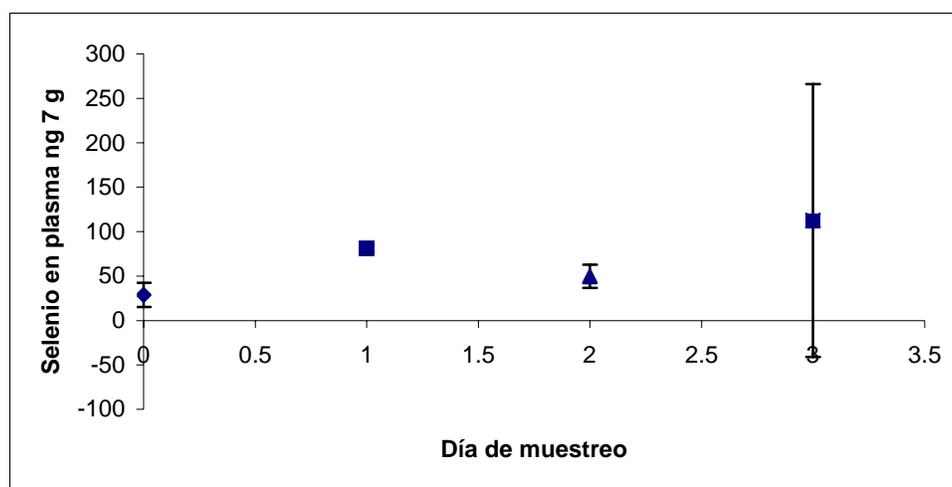
De acuerdo a la NRC (1980), los valores adecuados de selenio en plasma son de 80 a 500ppb (ng/g) y de acuerdo a las gráfica 4 y 5 que muestran los niveles iniciales de selenio de las unidades experimentales, se puede ver que éstas se encuentran por debajo de los niveles adecuados según el NRC.

La tabla 15 contiene las cantidades de selenio basal para el grupo tratamiento, estas concentraciones son similares a las del grupo placebo.

Tabla 15. Resultados de las concentraciones básicas de Selenio en Plasma (Grupo Tratamiento).

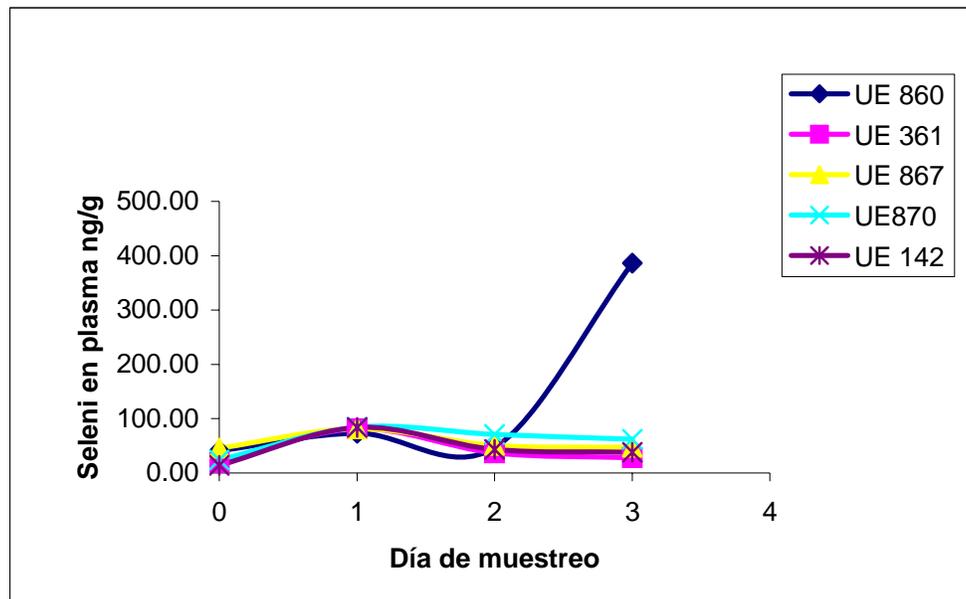
ng de Se por g de Plasma (Grupo Tratamiento)							
Día muestreo	No. ID					Promedio	DESVEST
	860	861	867	870	142		
0	40.94	19.40	45.61	23.89	14.31	28.83	13.71
1	73.44	81.61	81.54	84.36	83.56	80.91	4.35
2	46.69	36.69	51.05	70.84	43.21	49.70	12.93
3	386.44	28.04	47.76	62.05	38.26	112.51	153.64
Promedio	136.88	41.44	56.50	60.29	44.84		

Al graficar los valores básicos de selenio en plasma del grupo tratamiento (Grafica 6) se observa que la concentración del último muestreo hay una diferencia muy grande.



Grafica 6. Concentración de selenio basal en plasma en función del tiempo en el grupo Tratamiento.

En la grafica 7 se puede ver que el punto que está generando la alta desviación en los datos se debe a la cantidad de selenio en plasma de la unidad experimental 860, ya que el valor de concentración se elevó.



Grafica 7. Concentración de selenio basal en plasma de cada unidad experimental en función del tiempo en el grupo Tratamiento.

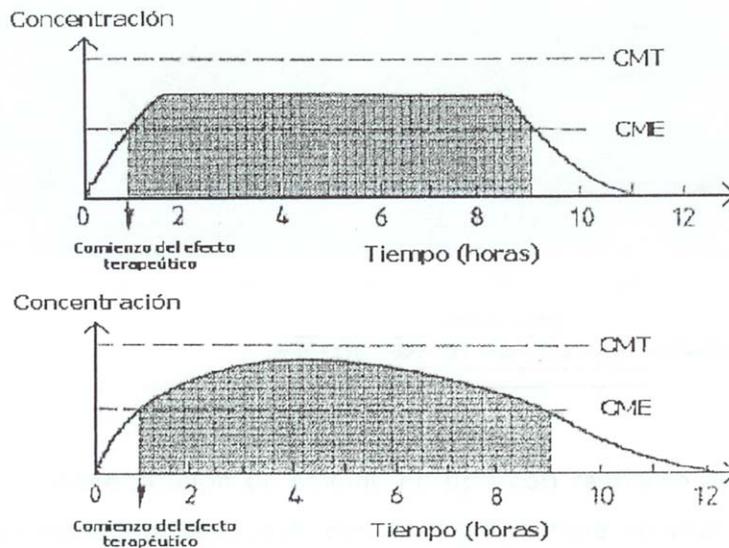
Aquí al igual que en el grupo placebo los niveles de selenio en plasma se encuentran por debajo de los niveles adecuados según el NRC, como se puede ver en la tabla 15 las concentraciones que se determinaron durante el muestreo basal van de 28 a 112 ppb.

Al mantener niveles por debajo de lo normal se indica que las unidades experimentales se encuentran en un estado deficiente de selenio, lo cual permitió que se observara un efecto de los bolos administrados.

5.3 EFECTO DEL BOLO CON SELENITO DE SODIO SOBRE LOS NIVELES DE SELENIO EN PLASMA

5.3.1 Administración del bolo intrarruminal

Una vez administrado el bolo, se esperaría que las concentraciones de selenio en plasma, aumentaran de manera prolongada hasta llegar a un máximo y posteriormente fueran descendiendo lentamente como se muestra en la grafica 8.



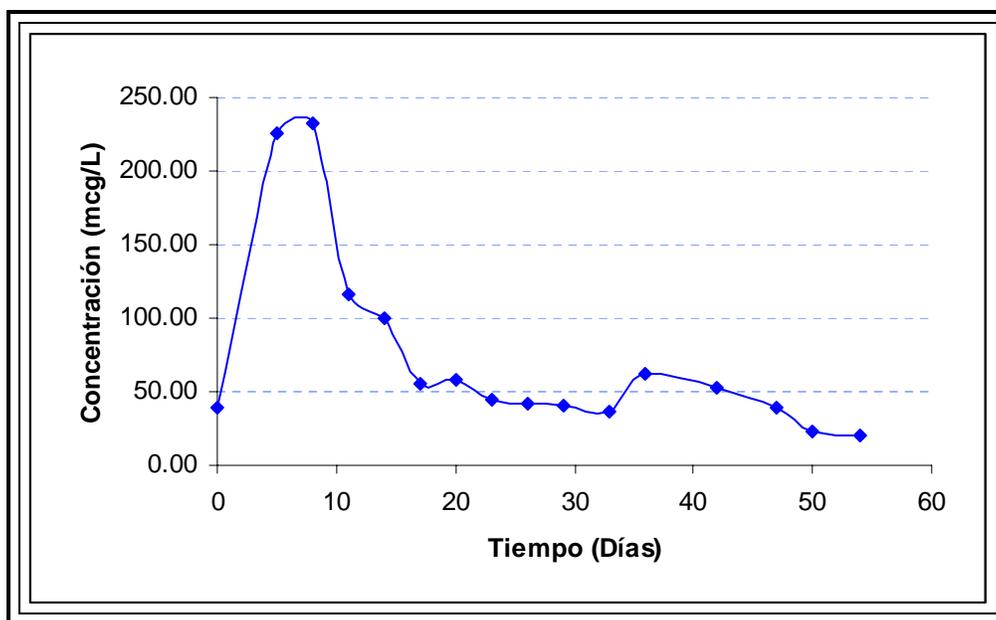
Grafica 8. Perfiles plasmáticos en medicamentos de lenta liberación.

De acuerdo a la figura anterior (grafica 8) se pensaría que los perfiles plasmáticos de este estudio fueran similares, sin embargo como se puede ver en la tabla 16 el aumento en la concentración se dio rápidamente (en el segundo punto graficado) y posteriormente fueron descendiendo lentamente.

Tabla 16. Resultados de la concentración de Selenio en Plasma (Grupo Tratamiento).

Día	Muestra	Grupo	Concentración (mcg/L)
0	plasma	Tratamiento	39.19
5	plasma	Tratamiento	226.19
8	plasma	Tratamiento	232.88
11	plasma	Tratamiento	116.80
14	plasma	Tratamiento	99.98
17	plasma	Tratamiento	55.01
20	plasma	Tratamiento	58.26
23	plasma	Tratamiento	44.08
26	plasma	Tratamiento	41.77
29	plasma	Tratamiento	41.03
33	plasma	Tratamiento	37.15
36	plasma	Tratamiento	62.17
42	plasma	Tratamiento	52.29
47	plasma	Tratamiento	38.63
50	plasma	Tratamiento	22.79
54	plasma	Tratamiento	20.08

La grafica 9 muestra que si se presentó un aumento en la concentración de selenio en el grupo tratamiento posterior a la administración del bolo de selenito de sodio, pero el aumento se presento muy rápido, por lo que no se logro ver un aumento pausado, lo que probablemente se hubiera obtenido muestreando mínimo 5 tomas más antes del máximo valor.



Grafica 9. Concentración de selenio en plasma en función del tiempo en el grupo Tratamiento.

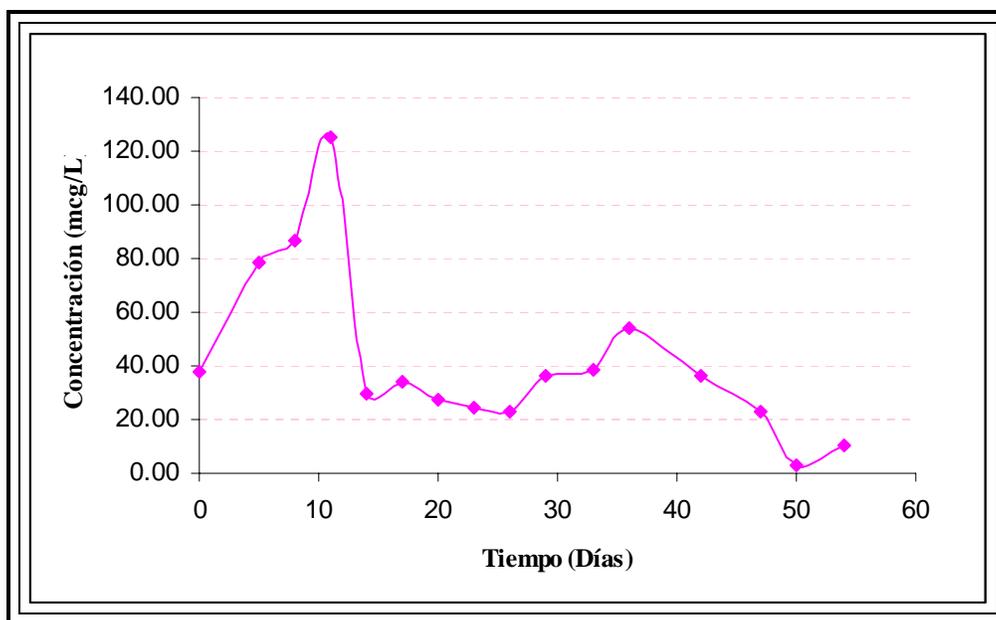
En los perfiles de selenio en plasma obtenidos de la administración del bolo de lenta liberación (grafica 9) se observan de forma general dos fases, la primera de liberación inmediata y la segunda de lenta liberación.

La siguiente tabla (17) contiene los valores de selenio en plasma del grupo placebo, aquí se tiene un punto (en el 11 día de estudio posterior ala administración) que da una concentración alta de selenio y posteriormente descienden manteniendo así los días restantes del estudio.

Tabla 17. Resultados de la concentración de Selenio en Plasma (Grupo Placebo).

Día	Muestra	Grupo	Concentración (mcg/L)
0	plasma	Placebo	38.09
5	plasma	Placebo	78.54
8	plasma	Placebo	86.75
11	plasma	Placebo	125.27
14	plasma	Placebo	29.57
17	plasma	Placebo	33.81
20	plasma	Placebo	27.16
23	plasma	Placebo	24.30
26	plasma	Placebo	23.10
29	plasma	Placebo	36.35
33	plasma	Placebo	38.53
36	plasma	Placebo	53.92
42	plasma	Placebo	36.33
47	plasma	Placebo	22.88
50	plasma	Placebo	3.33
54	plasma	Placebo	10.46

En la grafica 10 podemos ver como después del día 11 de estudio las concentraciones de selenio disminuyeron, lo cual puede atribuirse a una pérdida de selenio al estar en un estado de estrés provocado por el mismo estudio.



Grafica 10. Concentración de selenio en plasma en función del tiempo en el grupo Placebo.

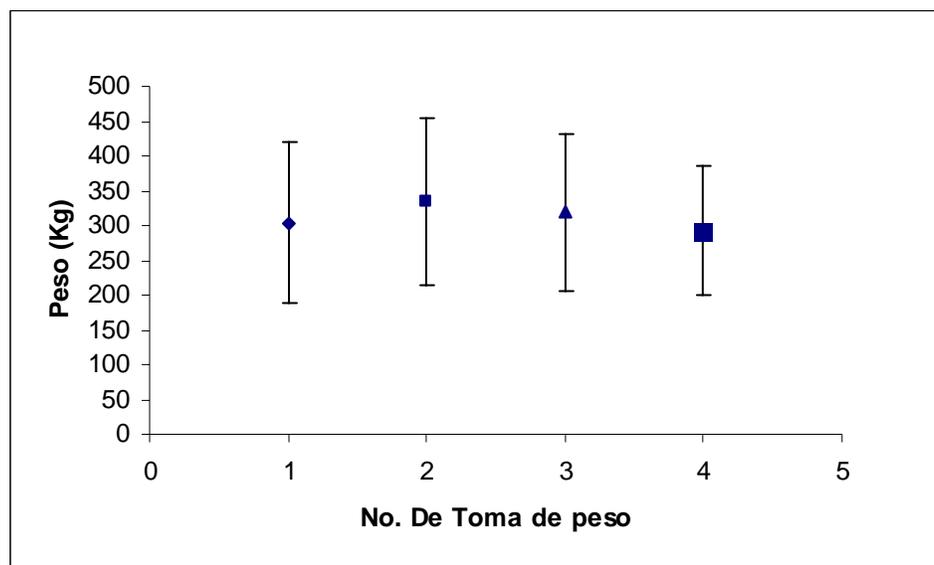
De manera general comparando el grupo tratamiento con el grupo placebo se puede observar que los niveles de selenio en plasma en el grupo al que se administro el bolo con selenito de sodio son mayores que en el grupo placebo.

5.3.2 Efecto del bolo de selenito de sodio sobre el peso de las unidades experimentales

La tabla 18 y grafica 11 se muestra la evolución del peso de los animales del grupo tratamiento en donde no se observa una diferencia importante, excepto en el día 14 se presento un ligero aumento de peso, pero como no hubo una tendencia ascendente del peso conforme al tiempo, puede decirse que el bolo no afecto de manera significativa en el peso de los animales; en promedio el peso de los animales del grupo tratamiento durante el estudio fue de 300 Kg.

Tabla 18. Peso de las unidades experimentales del grupo Tratamiento

Grupo Tratamiento				
No. ID	Día de estudio / Peso (Kg)			
	1	14	25	32
861	268	302	284	256
142	508	547	521	458
860	275	288	276	251
867	226	259	255	236
870	240	274	262	260
Promedio	303.4	334	319.6	292.2
DESVEST	116.12	120.14	113.16	93.13

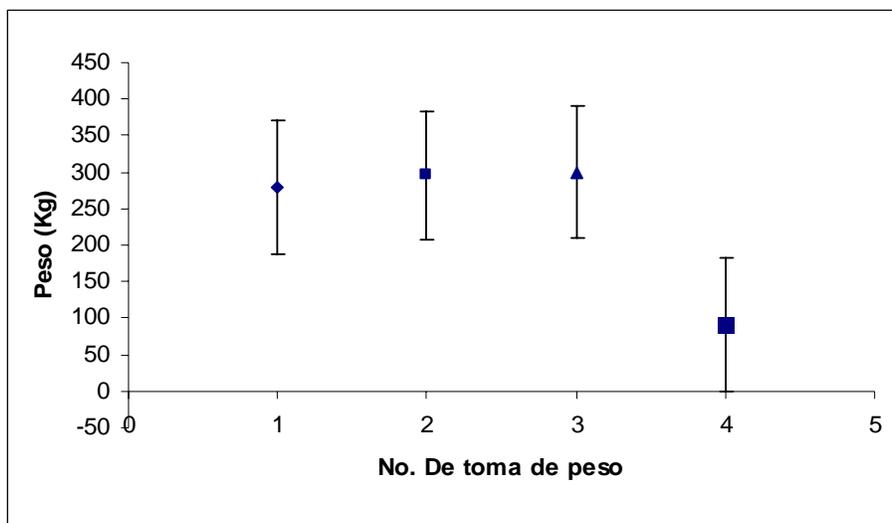


Gráfica 11. Comportamiento de los pesos del grupo Tratamiento

La tabla 19 y grafica 12 se muestra la evolución del peso de los animales del grupo placebo en donde no se observa una diferencia importante, por lo que se puede decir que el bolo no afectó de manera significativa en el peso de los animales; en promedio el peso de los animales del grupo placebo durante el estudio fue de 90Kg.

Tabla 19. Peso de las unidades experimentales del grupo Placebo

Grupo Placebo				
No. ID	Día de estudio / Peso (Kg)			
	1	14	25	32
876	215	228	232	214
874	213	218	223	217
395	435	438	450	440
864	263	297	300	288
863	271	300	296	290
Promedio	279.4	296.2	300.2	289.8
DESVEST	90.98	87.88	90.92	91.66



Gráfica 12. Comportamiento de los pesos del grupo Placebo.

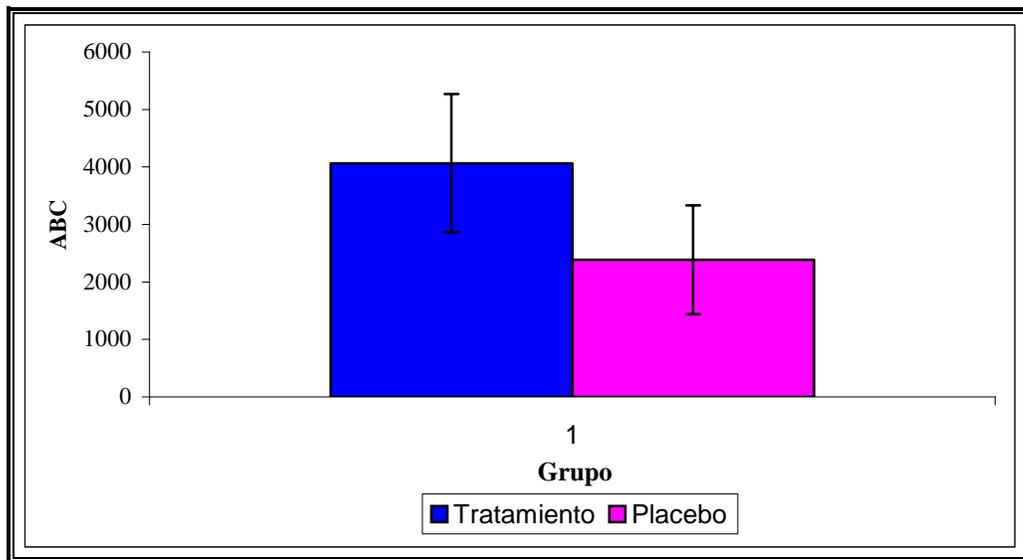
5.3.3 Área bajo la curva

El área bajo la curva (ABC) se determinó por medio del método de los trapezoides, la tabla 20 presenta el valor promedio de las áreas bajo la curva de grupo Tratamiento y grupo Placebo.

Tabla 20. Resultados de Área Bajo la Curva de los niveles de Selenio en vacas Holstein.

ID	Grupo	ABC	ABC MEDIA	S
860	Tratamiento	2895.60	4064.51656	1202.70255
861	Tratamiento	3589.12169		
867	Tratamiento	3980.59142		
870	Tratamiento	3768.21583		
142	Tratamiento	6089.05677		
863	Placebo	3762.84433	2386.73914	947.285867
864	Placebo	1692.11341		
876	Placebo	1841.45844		
874	Placebo	2250.54038		

La siguiente grafica (13) representa el área bajo la curva de los grupos tratamiento y placebo, como se puede ver hay una mayor desviación en el grupo tratamiento que en el placebo, el ABC del grupo tratamiento fue de 4064.51656 días/mcg/L en tanto que el del grupo placebo fue de 2386.73914 días/mcg/L.



Grafica 13. Comparación de ABC entre los grupos Tratamiento y Placebo

5.3.4 Farmacocinética

Para determinar un modelo farmacocinético, las concentraciones plasmáticas de selenio se sometieron a un análisis farmacocinético con el programa Winonlin, y así determinar el modelo farmacocinético al cual se ajustaran los resultados, sin embargo no fue posible obtener un modelo farmacocinético que describiera la evolución del selenio administrado, por lo que se consideran dentro de un modelo no compartimental.

Muy probablemente no se pudo realizar un modelaje que se ajustara a modelos bicompartimentales acerca del desempeño del selenio administrado a las unidades experimentales debido a que no se contaba con mayores datos antes de que se alcanzará la concentración máxima; así como tampoco se pudo observar una eliminación total del selenio administrado debido a que las unidades experimentales cuentan con selenio endógeno. Sin embargo si se lograron determinar los parámetros farmacocinéticos que se muestran en la tabla 21.

Tabla 21. Parámetros farmacocinéticos del grupo tratamiento.

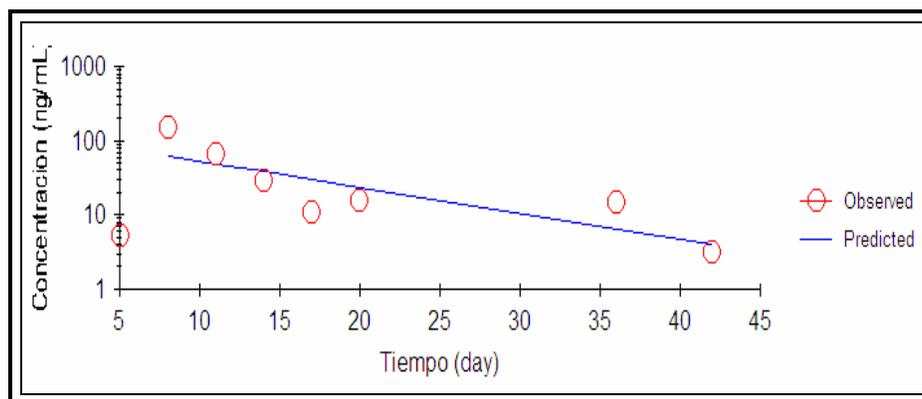
Variable	Promedio	Variante	Media	Rango	CV%
Cmax (mcg/L)	213.5	8076.8	204.8	221.2	42
Tmax (Días)	5.6	1.8	5	3	23.9
t _{1/2} (Días)	7.24	52.6	4.1	17.6	100.1
MRT	13	7.7	12	7	21.2
ABC (días/mcg/L)	2357.9	1521842.6	2200.7	3257.9	52.3
Corr_XY	-0.9	0	-0.9	0.1	-6.9

En las tablas 22, 23, 24, 25 y 26 se presentan los valores de los parámetros que se lograron determinar con el programa Winnolin Versión 4.1 Build 200307301056 Core Versión 16May2003 para cada unidad experimental del grupo tratamiento.

Tabla 22. Parámetros farmacocinéticos obtenido con el programa estadístico WinNonlin (UE 860)

Vaca	Rsq	Corr_XY	Cmax (mcg/L)	MRT (día)	Fluido
860	0.7013	-0.8374	1,466,000	151,385	Plasma

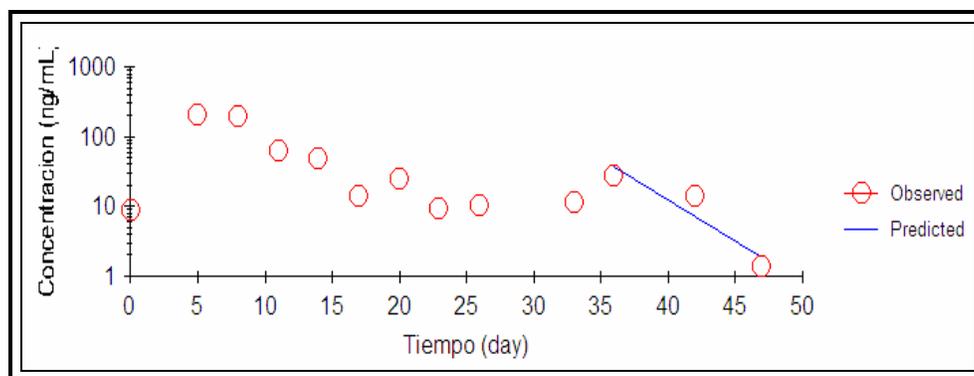
Las graficas 14, 15, 16, 17 y 18 muestran los valores que se tomaron para ajustarlos a un modelo, que como ya se mencionó no se logro establecer.



Gráfica 14. Resultados obtenidos con el programa Winnolin (UE 860)

Tabla 23. Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa estadístico WinNonlin (UE 861)

ID de Vaca	Rsq	Corr_XY	Cmax (mcg/L)	MRT (día)	Fluido
861	0.5480	-0.7403	2,048,300	120,739	Plasma

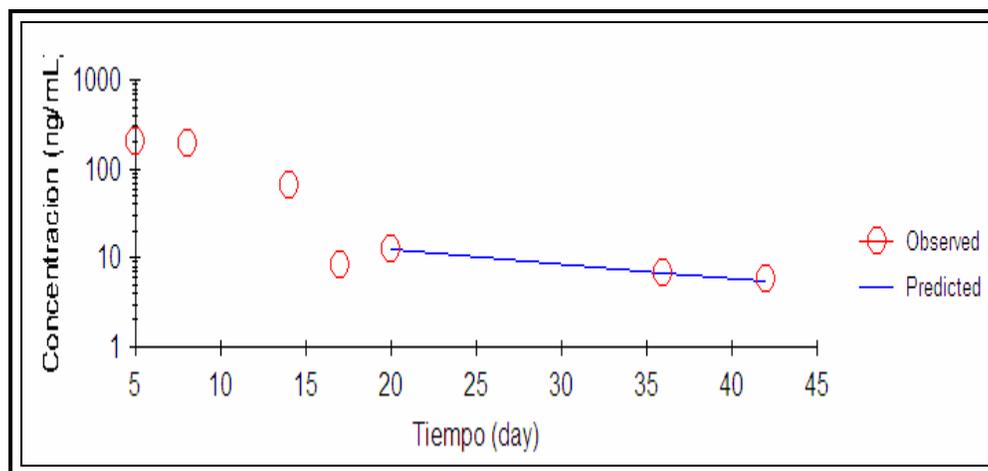


Gráfica 15. Resultados obtenidos con el programa Winnolin (UE 861)

Esta gráfica así como las correspondientes a las otras UE (867, 870, 142) solo 3 de los datos se lograron ajustar al modelo no compartimental.

Tabla 24. Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa estadístico WinNonlin ((UE867)

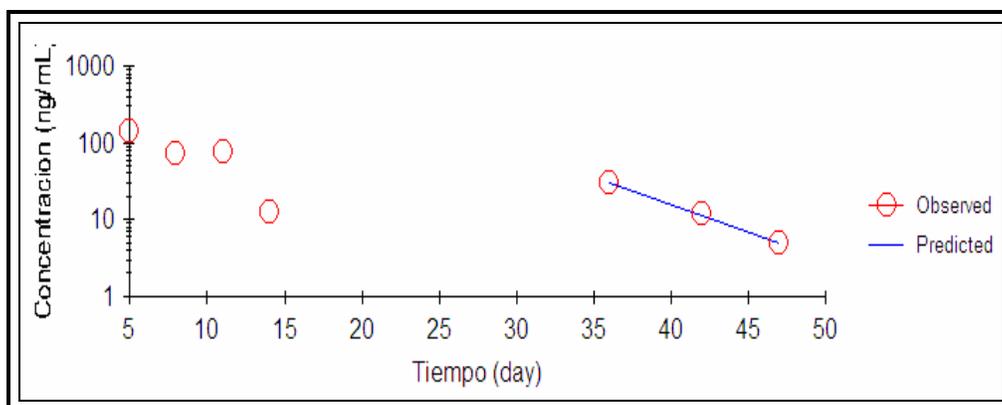
ID de Vaca	Rsq	Corr_XY	Cmax (mcg/L)	MRT (día)	Fluido
867	0.9903	-0.9951	2,084,900	95,754	Plasma



Grafica 16. Resultados obtenidos con el programa Winnolin (UE 867)

Tabla 25. Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa estadístico WinNonlin (UE 870)

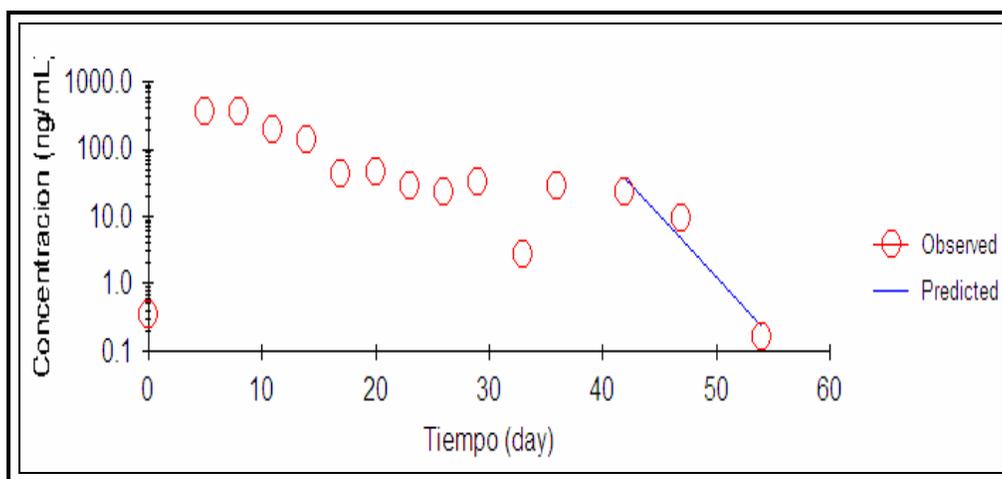
ID de Vaca	Rsq	Corr_XY	Cmax (mcg/L)	MRT (día)	Fluido
870	0.9988	-0.9994	1,432,400	166,160	Plasma



Gráfica 17. Resultados obtenidos con el programa Winnolin (UE 870)

Tabla 26. Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa estadístico WinNonlin (UE142)

ID de Vaca	Rsq	Corr_XY	Cmax (mcg/L)	MRT (día)	Fluido
142	0.9314	-0.9651	3,644,800	120,882	Plasma



Gráfica 18. Resultados obtenidos con el programa Winnolin (UE 142)

Mediante el programa Winnolin se determinaron los parámetros farmacocinéticos de modelo independiente, de manera que se observó que el bolo de selenito de sodio aumento los niveles de selenio en plasma alcanzando un Tmax de 5 días posteriores a su

administración, y a la par que se obtiene una C_{max} promedio de 204.83 mcg/L y un $t_{1/2}$ de 4.16 días, para el grupo tratamiento. Para poder determinar la dosis adecuada de selenio se requiere previamente conocer que tan deficiente son los animales con respecto a este mineral y con relación a la velocidad de liberación que tiene la forma farmacéutica administrada. Por consiguiente con los parámetros farmacocinéticos que determinamos (C_{max} , T_{max} , ABC) de los bolos administrados y además conociendo estos mismos parámetros en tejidos y en paquete eritrocitario el medico veterinario podrá determinar los regímenes de dosificación.

A fin de determinar la biodisponibilidad relativa de los bolos de selenito de sodio de lenta liberación se obtuvo el ABC por medio del método trapezoidal de cada nivel de concentración del grupo tratamiento, de manera que en promedio se obtuvo un ABC de 2200.78 días/mcg/L. Este valor es diferente al calculado con los indicados en la tabla 20 porque el programa WinonLin discrimina datos aberrantes y en dicha tabla se consideraron todos los datos de la curva.

CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

- ☞ Las condiciones de operación que permitieron determinar los niveles de selenio en plasma fueron:
 - Establecimiento del tiempo de toma de muestra.
 - Estado de la muestra (plasma), para poder cuantificar la cantidad de selenio en ésta.
 - Optimización de la técnica de análisis por espectrofotometría de absorción atómica por generador de hidruros de la muestra.

- ☞ Este estudio permitió estimar los parámetros farmacocinéticos de los bolos con selenito de sodio por el análisis de selenio en muestras de plasma sanguíneo de vacas. Los valores que encontramos fueron:
 - Área bajo la curva (ABC) : 2200.78 días/mcg/L
 - Concentración máxima de selenio en plasma (C_{\max}): 204.83 mcg/L
 - Tiempo para alcanzar la concentración máxima de selenio en plasma (T_{\max}): 5 días.

- ☞ La concentración de selenio en plasma sanguíneo de los animales a los que se administro el bolo con selenito de sodio resulto mayor con respecto al grupo que recibió el bolo placebo.

- ☞ El ABC del grupo al que se proporcionó el bolo con selenito de sodio fue 2 veces mayor al ABC del grupo al que se administró el bolo placebo.

- ☞ El bolo de selenito de sodio no presentó efecto significativo sobre el peso de las unidades de experimentación (vacas).

REFERENCIAS

7.0 REFERENCIAS

1. Agay D., Sandre C., Ducros V., Faure H., Cruz C., Alonso A., Rouse A., Chancerelle Y. 2005. "Optimization of selenium status by a single intraperitoneal injection of Se en Se-deficient rat: possible application to burned patient treatment". *Free radical biology & Medicine*.
2. Alin S. de Aluja, Adame P. 1977. "Miopatia degenerativa en becerros". *Veterinaria Mex.* 8:2-11.
3. Andrea B., Milena C., Vera S., Mája C., Bohuslav, B., Jirí S. 2005. "Whole blood selenium content in healthy adults in the Czech Republic". *Science of the Total Environment*. 338:183-188.
4. Armando S. Shimada. "Fundamentos de nutrición animal comparativa". 2ª. Impresión corregida: septiembre 1984. Ed. Consultores en producción animal. S. C. 1984. pp 205-207,224,226.
5. Baeza, H. María G.. "Validación de un método de digestión ácida en horno de microondas para la cuantificación de selenio por absorción atómica en materia prima y fluido ruminal" 2005. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México.
6. Batáriová A., Černá M., Spěvačková V., Čejchanová M., Beně B., Šmíd J. 2005. "Whole blood selenium content in healthy adults in the Czech Republic". *Science of the Total Environment*. 338:183-188.
7. Boguslaw Lipinski. 2005. "Rationale for the treatment of cancer with sodium selenite". *Medical hypotheses*. 64:806-810.
8. Brooks R. R., Willis A., Liddle R. J. 1983. "Optimum Conditions for hydride generation of selenium and its determination by atomic absorption spectrophotometry". *Assoc. off anal chem.* 66 (1):130-134.
9. Brown R. M. Fry R. C., Et al. 1981. "Interference by volatile nitrogen oxides and transition-metal catalysis in the preconcentration of arsenic and selenium as hydrides". *Anal. Chem.* 53:1560-1566.
10. Cardinal John R. 1997. "Intarruminal Devices". *Advanced drug delivery reviews*. 28: 303-322.
11. Cas Lek Cesk.1999 Feb22;138(4):99-106.

12. Cristaldi L. A., McDowell L. R., Buergelt C. D., Davis C. D., Wilkinson N. S., Martin F. G. 2005. "Tolerance of inorganic selenium in wether sheep". *Small ruminant research*. 56:205-213.
13. Davis P. A., McDowell L. R., Wilkinson N. S., Buergelt C. D., Van R., Ewldon R. N., Marshall T. T. 2005. "Effects of selenium levels in ewe diets on selenium in milk and the plasma and tissue selenium concentrations of lambs". *Small Ruminant and research*.
14. Dayana L N., Eliane P. S., Juliano S B., Sergio R. M., Valderi L D., Erico M. F. 2005. "Interference of nitrite and nitrogen dioxide on mercury and selenium determination by chemical vapor generation atomic absorption spectrometry". *Spectrochimica acta par B*. 60:731-736.
15. Dietrich B., Chistian H., Henning P., Doris R., Hildegard G. and Antonios Kyriakopoulos. 1998. "Speciation of selenium in the mammalian organism". *The analyst*. 123:871-873.
16. Douglas Skoog. "Principios de análisis instrumental". 5ª. Edición. Ed. McGraw-Hill, 2001. Madrid España, pp 213-215,219-237.
17. Ebba B. Ingvar A. B., Lars-Erid B., Thomas L., Gösta S., Andrejs S., Staffan S., Agneta O. 2002. "Trace element levels in whole blood and serum from Swedish adolescents". 286:129-141.
18. Efrén Ramírez B., Efrén Hernández C., Luz M. Hernández C., Jorge L. Tórtora P. 2004. "Efecto de un suplemento parenteral con selenito de sodio en la mortalidad de corderos y los valores hemáticos de selenio". *Agrociencia* 38:43-51.
19. Efrén Ramírez B., Jorge L. Tortora P., Maximino Huerta, A. Aguirre, L. M. Hernández. 2001. "Diagnosis of selenium status in grazing dairy goats on the mexican plateau". *Small ruminant research*. 41:81-85
20. Enjalbert F., Lebreton P., Salat O. and Schelcher F. 1999. "Effects of pre- or postpartum selenium supplementation on selenium status in beef cows and their calves". *J. Anim. Sci*. 77:223-229.
21. Enrique Amador González. "Fabricación de un bolo de liberación prolongada con sulfametazina sodica para el tratamiento de coccidiosis en cabras". Tesina Especialización en procesos farmacéuticos. Facultad de Estudios superiores Zaragoza. 1999.
22. Enrique Amador González. "Desarrollo de un bolo intrarruminal para la liberación prolongada de yodo y selenio y su evaluación en ganado bovino". 2005. Tesis de Maestria en ciencias de la producción y de la salud animal. Facultad de Estudios superiores Cuautitlán.

23. Érico Marlon M. F., Leticia L.C. da Silva, Juliano S. B., Ana P. F. S., Renato Z., Valder L. D., José N. G. P. 2001. "Minimization of volatile nitrogen oxides interference in the determination of arsenic by hydride generation atomic absorption spectrometry". *Spectrochimica Acta Part B*. 56:1883-1891.
24. Ferrer E., Alegría A., Barberá R., Farré R., Lagarda M., Monleon J. 1999. "Whole blood selenium content in pregnant women". *The Science of the Total Environment*. 227:139-143.
25. Gavin E. Arteel, Helmut Sies. 2001. "The biochemistry of selenium and the glutathione system". *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 10:153-158.
26. Gaytan, S. Griselda. "Comparación de la biodisponibilidad de selenito de sodio y de selenio orgánico en bolos intrarruminales de lenta liberación en ganado ovino". 2005. Tesis de Maestría en ciencias de la producción y de la salud animal. Cuautitlan Izcalli, Edo. De México. 2005.
27. Gómez M. M., Gasparic T., Palacios M. A., Camara C. 1998. "Determination of five selenium compounds in urine by liquid chromatography with focused microwave assisted digestion and hydride generation-atomic absorption spectrometric detection". *Analytica Chimica Acta*. 374: 241-251.
28. González. C. María R. "Estudio de biodisponibilidad y de los parámetros farmacocinéticos de bolos de sulfametazina sodica en ovinos". 2005. Tesis de Maestría en ciencias de la producción y de la salud animal. Cuautitlan Izcalli, Edo. De México.
29. Gleason Huerta M. Eugenia. "Desarrollo y optimización de los métodos de digestión ácida en horno de microondas para la cuantificación de selenio en muestras biológicas": Tesis Q. F. B. Cuautitlán Izcalli (México) México: UNAM.
30. Grace. N. d., Lee J., Milles R. A., Death A. F. 1997. "Influence of Se status on milk Se concentrations in dairy cows". *N. Z. J. Ag. Res.* 40: 75-78.
31. Gunter S. A., Beck P. A., Phillips J. M. 2003. "Effects of supplementary selenium source on the performance and blood measurements in beef cows and their calves". *J. Anim. Sci.* 81:856-864.
32. Gupta S., Gupta Kumar H., Soni J. 2005. "Effect of Vitamin E and selenium supplementation on concentrations of plasma cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle". *Theriogenology*. 64:1273-1286.
33. Gyurik Robert J. 1988. "Rumen retention devices" in *Drug Delivery Devices*. Editado por Praveen Tyle. Ed. Marcel Dekker, USA. Capítulo 4. Pag.549-561.

34. Hardee Gregory E., Baggot J. Desmond, "development and Formulation of veterinary dosage forms". 2nd. Edition. Ed. Marcel Dekker inc. New York 1998.
35. Helgi J. C., Enrique H. C. 2003. " Biodisponibilidad y Bioequivalencia". Tópicos Selectos de Tecnología Farmacéutica. AFM.pa. 12-14.
36. Hemingway R. G., Parkins J. J. and Ritchie N. S. 1997. "Sustained-release Boluses to Supply Trace Elements and Vitamins to Calves". The Veterinary Journal. 153:221-224.
37. Hernández Cruz Elivet Sandra."Validación de los métodos de digestión ácida en horno de microondas para la determinación de selenio en leche y plasma".Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, Estado de México. 2005
38. Hobard H. Willard, "Métodos instrumentales de análisis",1^a. Edición. Ed. Continental, 6^a. Impresión, 1984, México D. F. Pp 388-392.
39. Jeffrey J. Wichtel, Gregory P. Keefe, John A. Van Leeuwen, Elizabeth Spangler, Mary A. McNiven, Timothy H. Ogilvie. 2004. "The selenium status of dairy herds in Prince Edward Island". Can Vet J. 45:124-132.
40. Jerry W. Spears. 2002. "Trace mineral bioavailability in ruminants". The Journal of Nutrition 11th meeting of the organization international "Trace Elements in Man and Animals (TEMA).
41. José Domenech B., José Martínez L., José María Plá D., "Biofarmacia y Farmacocinética. Vol. II Biofarmacia". Editorial Síntesis. Pp. 39-40, 391-393, 399,
42. Jukola E., Hakkarainen J., Saloniemi H. And Sankari S. 1996. "Blood selenium, vitamin E, vitamin A, and β -carotene concentrations and udder health, fertility treatments, and fertility". J. Dairy Sci. 79:838-845.
43. Kantola M., Purkunen R., Kroöger O,M Tiinubg A, Juravskaja J., Pasanen M., Seppänen K., Saarikoski S., Vartianinen T. 2004. "Selenium in pregnancy: is selenium an active defective ion against environmental chemical stress?". Environmental Research. 96:51-61.
44. Kendall N.R., Mackenzie A. M., Telfer S.B. 2001. "Effect of a copper, cobalt and selenium soluble glass bolus given to grazing sheep". Livestock Production Science. 68:31-39.
45. Knowles S. O., Grace N. D., Wurms K., Lee J. 1999. "Significance of amount and form of dietary selenium on blood, milk and casein selenium concentrations in grazing cow". J. Dairy Sci. 82:429-437.

46. Koenig K.M., Rode L.M., Cohen R.D.H., and Buckley W.T. 1997. "Effects of diet and chemical form of selenium on selenium metabolism in sheep". *J. Anim. Sci.* 75:817-827.
47. Kuchel, R. E., Buckley R. A. 1969. "The provision of Se to sheep by means of heavy pellets. *Aust. J. Agric. Res.* 201: 1099-1107.
48. Langlands J. P., Donald G. E., Bowles J. E. and Smith A. J. 1991. "Subclinical selenium insufficiency. 1. Selenium status and the response in liveweight and wool production of grazing ewes supplemented with selenium". *Australian Journal of Experimental Agriculture.* 31:25-31.
49. Langlands J. P., Donald G. E., Bowles J. E. and Smith A. J. 1991. "Subclinical selenium insufficiency. 2. The response in reproductive performance of grazing ewes supplemented with selenium". *Australian Journal of Experimental Agriculture.* 31:33-5.
50. Langlands J. P., Donald G. E., Bowles J. E. and Smith A. J. 1991. "Subclinical selenium insufficiency. 3. The selenium status and productivity of lambs born to ewes supplemented with selenium". *Australian Journal of Experimental Agriculture.* 31:37-43.
51. Lawson, D.C., Rithcie N.S., Parkins J. J., Hemingway R.G., Gresham H. R. 1990. "Use of a sustained release bolus for enhancing selenium status in cattle". *The Veterinary Record.* 127:67-8.
52. Lobinski R., Edmonds J. S., Suzuki K.T., and Uden P.C. 2000. "Species-selective determination of selenium compounds in biological materials". 72(3):447-461.
53. López M. A., Miranda M., Hernández J., Castillo C., Benedito J. L. 1997. "Glutación peroxidasa (GSH-Px) en las patologías asociadas a las deficiencias de selenio en rumiantes". *Arch. Med. Vet.* 29 (2):1-14.
54. Lorenzo A. Ma. J., Bermejo B., A., Cocho de Juan J. A., Fraga B. J., Bermejo B. P. 2005. "Selenium levels in related biological samples: Human placenta, maternal and umbilical cord blood, hair and nails". 2nd. International Festem Symposium. *J. Of Trace Elements in Medicine and Biology.* 19:49-54.
55. Maas J, Gale FD, Peauroi JR, Case JT, Littlefiel ES, Gay CC, Koller LD, Crisman RO, Weber DW, Warner DW, et al. 1993. "The correlation between serum selenium and blood selenium in cattle". *Vet Diagn Invest.* 5(2):145-47.
56. Maus R.W., Martas F.A., Belyea R.L., and Weiss M. F. 1980. "Relationship of dietary selenium to selenium in plasma and milk from dairy cows". *J. Dairy Sci.* 63:532-537.

-
57. Mc Dowell L. R., Conrad J. H., Ellis G. L., Loosli J.K., “Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales”. 1984.. Departamento de ciencia animal centro de agricultura tropical Universidad de Florida, Gainesville, y la Agencia de los Estados Unidos para el desarrollo Internacional.
 58. Mc Dowell L.R., Valle G., Cristaldi L., Davis P. A., Rosendo O., and Wilkinson N.S. “Selenium availability and methods of selenium supplementation for grazing ruminants”. Proceedings 13th. Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, pp 86-102.
 59. Mc Pearson A., Chalmers J. S. 1984. “Methods of selenium supplementation of ruminants”. *Veterinary Record*. 115:544-546.
 60. Mendoza Jarillo Virginia. “Contribución al estudio de los micro nutrientes: el selenio”. Tesis. Química Farmacéutica Bióloga. Cuautitlan Izcalli, Estado de México 1989.
 61. Miguel Ángel Blanco O., Alfredo Kurt Spross S., René Rosiles M., 1998. “Evaluación de comprimidos intrarruminales de selenio por concentración sanguínea y lanar de corderas semiestabuladas”. *Vet. Méx.*, 31(2) 2000.
 62. Muth O.G. 1970. “Selenium-Responsive disease of sheep”. Department of Veterinary Medicine
 63. Natalia C., Pilar V., Ignacio L., Manuel H. 2000. “Selenium determination in biological fluids using zeeman background correction electrothermal atomic absorption spectrometry”. *Analytical biochemistry*. 280:195-2000.
 64. National Research Council NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, 7th revised edition. Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Washington DC. National Academy Press.
 65. Nonato Fernando. “Sistemas de atomización utilizados en espectrofotómetro de AA Flama, Horno de grafito, generador de hidruros y vapor frío, para análisis de muestras complejas”. Tesis Ingeniero Químico. Cuautitlán Izcalli (México) México: UNAM, 1997. pp 5-9.28-33, 56-58.
 66. Oldfield J. E. 2002. “ A brief history of selenium research: From alkali disease to prostate cancer (from poison to prevention)”: American Society of Animal Science.
 67. 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.
 68. Pawel Kościelniak, Renata Wietecha. 2003. “A critical look at the recovery test as a way for evaluation of analytical accuracy”. *Analytical letters*. 36 (4):861-870.
-

-
69. Pavlata L., Pechová A. Dvorák R. 2004. "Microelements in colostrum and blood of cows and their calves during colostrum nutrition". Acta Vet. Brno 73:421-429.
 70. Pavlata L., Pechová A. Illek J. 2000. "Direct and indirect assessment of selenium status in cattle – a comparison". Acta Vet. Brno. 69:281-287.
 71. Pehrson B., Ortman K., Madjid N., Trafikowska U. 1999. "The influence of dietary selenium as Selenium yeast or sodium selenite on the concentration of selenium in the milk of suckler cows and on the selenium status of their calves". J. Anim. Sci. 77:3371-3376.
 72. Peter C., Harriet To., Chethaka K., Julian F. 2004. "Selective and identification of Se containing compounds-review and recent developments". J. Chromatography A. 1050:85-93.
 73. Ping-Chi H., Yueliang L. 2002. "Antioxidant nutrients and lead toxicity". Toxicology. 18:33-44.
 74. Robinson J. J., Ashworth C. J., Rooke J. A., Mithcell L. M., McEvoy T.G. 2005. "Nutrition and fertility in ruminant livestock". Nimal Feed Science and Technology.
 75. Rowntree J., Hill G., Hawkins D., Link J. Rincker M., Bednar G., Kreft R. "Effect of Se on Selenoprotein activity and thyroid hormone metabolism in beef and dairy cows and calves". Animal Nutrition.
 76. Sarabia M. M. "Desarrollo de un bolo de liberación prolongada con selenio orgánico de levaduras para bovinos productores de leche". (Tesis de Maestría) Cuautitlán Izcalli (México) México: UNAM, 200
 77. Sameeh M. Abutarbush, Otto M. Radostits. 2003. "Congenital nutritional muscular dystrophy in a beef calf". Can Vet J. 44: 738-739.
 78. Scott M. L. 1972. "The selenium dilemma". Department of Poultry Science and Graduate School of Nutrition. Editorial Paper.803-806.
 79. Segerson, E.G., Riviere G. J., Dalton H. L., and Whitacre M. D. 1981. "Retained placenta of Holstein cows treated with selenium and vitamin E". J. Dairy Sci. 64:1833-1836.
 80. Selenium for Animal. Salt and trace minerals for livestock, poultry and other animals.
 81. Selenium in Nutrition. Revised edition National Academy Press. Washington D. C. 1983.
 82. Sheppard A. D., Blom L., Grant A. B. "Levels of selenium in blood and tissues associated with some selenium deficiency diseases in New Zealand sheep".
-

-
83. Skoog Douglas A., Holler James F., Nieman Timothy A. Principios de análisis instrumental. 5ª. Edición. Ed. Mc Graw-Hill/Interamericana. 2001.
 84. Steven J. H. and Vince P. P. 2001. "Assessment of selenium effects in lotic ecosystems". *Ecotoxicology and environmental safety*. 50:161-166.
 85. Telfer, S. B., Zewas G., Knott P. 1983. "Water soluble glass articles, their manufacture and their use in the treatment of ruminant animals". U. K. Patent App. GB 2116421 A.
 86. Uden P. C., Boakye H. T., Kahakachchi C., Tyson J. F. 2004. "Selective detection and identification of Se containing compounds—review and recent developments". 1050 (1):85-93
 87. Ujang Tinggi. 2003. "Essentiality and Toxicity of Selenium and its status in Australia: a review". *Toxicology Letters* 137:103-110.
 88. Underwood E. J. y Suttle N. F. Los minerales en la nutrición del ganado 3ª. Edición. Ed. Acribia S. A. Zaragoza (España) 2003. pp 2-6,431-485.
 89. Valadez P. Juan Carlos. "Comparación de la forma inorgánica de suplementación de selenio sobre la toxicidad en ovinos". 2005. Tesis de Maestría en ciencias de la producción y de la salud animal. Facultad de Estudios superiores Cuautitlán.
 90. Vanegas J. A., Reynolds j., Atwill E. R. "Effects of an injectable trace mineral supplement on fist-ser conception rate of dairy cows". *Veterinary Medicine Teaching and Research Center, University of Califo*.
 91. Virginia Mendoza Jarillo. "Contribución al estudio de los micronutrientes: el Selenio". Tesis de licenciatura. FES Cuautitlán.
 92. Van Saun, r. J., Herat T. H., Store H. D. 1989. "Maternal and fetal selenium concentrations and their interrelationships in dairy cattle". *J. Nutr.* 119: 1128-1137.
 93. Whanger p. D., Weswig P. H., Schmitz J. A., Oldfield J. E. 1977. "effects of selenium and vitamin E deficiencies on reproduction, growth, blood components, and tissue lesins in sheep fed purified diets". *J. Nutr.* 107:1288-1297.
 94. Yamato S., Tamami Y. and Kazuo T. 1998. "Effects of dietary selenium species on Se concentrations in hair, blood, and urine". *Toxicology and applied pharmacology*. 152:309-314.
 95. Yamato S., Yasumitsu O. And Kazuo T. 1999. "Speciation of metabolites of selenate in rats by HPLC-ICP-MS". *The analyst*. 124: 1237-1241.
-

SITIOS WEB

1. http://www.engrormix.com/s_articles-view. Suplementación de vacas con selenio orgánico y la identificación de las fracciones de proteínas ricas en selenio en la leche.
2. http://es.wikipedia.org/wiki/Plasma_sangu%C3%ADneo. 18/040/06.
3. <http://www.araucaria2000.cl/scirculatorio/sistemacirculatorio.htm> 18/0406.
4. www.naya.org.ar/congreso2002/ponencias/guillermo_de_la_fuente.htm 180406
5. <http://fda.gov/cvm/guidance/guideline33.html#thr>. Food and Drug Administration. 1989. Target Safety Guidelines for New Animal Drugs. Office of New Animal Evaluation..
6. Street Eduardo, Wittwer Fernando, Contreras A. Pedro, Ceballos A., Böhmwald, Andaur M., Leían V., Kruze J., Matamoros R. “Efecto de una suplementación preparto con selenato de bario sobre la lipoperoxidación en vacas lecheras alimentadas con una ración selenio deficiente”. [www.veterinaria.uxhile.cl/cd/xi congreso/patologia/M24PAT](http://www.veterinaria.uxhile.cl/cd/xi_congreso/patologia/M24PAT)

ANEXOS

ANEXO I

Tabla 27. Calendario de muestreo

Mes / Día	Domingo	Lunes	Martes	Miércoles	Jueves	Viernes	Sábado
ENERO		1	2	3	4	5	6
	7	8	9	10	11	12	13
	14	15	16	17	18	19	20
	21	22	23	24	25	26	27
	28	29	30	31			
FEBRERO					1	2	3
	4	5	6	7	8	9	10
	11	12	13	14	15	16	17
	18	19	20	21	22	23	24
	25	26	27	28	29	30	
MARZO							1
	2	3	4	5	6	7	8
	9	10	11	12	13	14	15
	16	17	18	19	20	21	22
	23	24	25	26	27	28	29
	30	31					
ABRIL			1	2	3	4	5

 Día de toma de muestra

ANEXO II

Preparación de soluciones

◆ Ácido Clorhídrico (HCl) 7M.

- Tomar 590mL de HCl concentrado.
- Poner una pequeña cantidad de agua desionizada en un matraz volumétrico de 1L.
- Vertir el ácido concentrado en el matraz volumétrico de 1L.
- Llevar a la marca de aforo con agua desionizada.

◆ Borohidruro de Sodio al 1%.

- Pesar 0.508g de Hidróxido de Sodio (NaOH) y 0.612g de Borohidruro de Sodio
- Disolver con agua desionizada.
 - Si no se pesa exactamente se realiza la siguiente conversión:

$$\frac{(\text{Peso NaOH}_{\text{real}}) (\text{Peso NaBH}_4\text{teórico})}{\text{Peso NaOH}_{\text{teórico}}} = \text{Peso NaBH}_4$$

- Vertir en un matraz volumétrico de 100mL y llevar a la marca de aforo con agua desionizada.

◆ Preparación de la curva de calibración

- Del estándar de Selenio High-Purity, tomar 50 μ L con una micropipeta
- Vaciar el volumen tomado con la micropipeta en un matraz volumétrico de 25 mL.
- Con agua desionizada llevar a la marca de volumen de aforo; así se tendrá una concentración de 2000mcg/L.
- De la solución stock tomar los siguientes volúmenes mostrados en la siguiente tabla con micropipetas y vaciar el contenido en matraces aforados de 50mL.

SISTEMA	CONCENTRACION ppb	VOLUMEN μL
1	1	25
2	5	125
3	9	225
4	13	325
5	17	425

- e) Con HCl 7M llevar a la marca de volumen de aforo cada matraz volumétrico de 50 mL.

ANEXO III

Tratamiento de las muestras

1. Con ayuda de una micropipeta de capacidad de 1-5mL se pesa 1 gramo de muestra (plasma) en un vaso de teflón utilizando una balanza analítica. y se registran los pesos.
2. Posteriormente adicionar 3mL de agua desionizada y 5 mL de ácido nítrico concentrado.
3. Seguido se adiciona 1mL de peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)
4. La muestra se mantuvo 30 minutos en reposo
5. Colocar a cada tapón de los vasos una membrana HP-500 safety.
6. Cerrar los vasos con los tapones, colocarlos en las chaquetas y en las bases de plástico para montarlas en el carrusel.
7. Montar las bases que contienen a los vasos en el carrusel, colocando en el vaso control el sensor de Temperatura.
8. Posteriormente la muestra se somete a digestión ácida en el Horno de microondas.

Digestión de las muestras

1. Conectar y encender el Horno de microondas.
2. Indicar menú, revisar métodos, presionar en la pantalla “select” y elegir “Plasma 2–HP500” .
3. Abrir la puerta del Horno y colocar el carrusel hasta que embone en la base del horno.
4. Conectar el sensor de temperatura en la pared superior del horno y verificar que la pantalla nos indique una temperatura.
5. Verificar que gire adecuadamente el carrusel oprimiendo “↺”.
6. Cerrar la puerta del horno y oprimir el botón “Start” para iniciar a digestión las muestras (plasma)

7. La digestión se lleva a cabo utilizando las siguientes condiciones:

Tabla 28. Condiciones de digestión.

Potencia (W)	Potencia (%)	Tiempo de Alcance (min.)	Temperatura (°C)	Presión (psi)	Tiempo de Mantenimiento (min.)
1200	100	6.24	100	350	5.12
1200	100	4.15	140	350	6.12

- De temperatura ambiente se pasa a 100°C en 6.24 minutos.
 - Se mantiene la temperatura de 100°C durante 5.12 minutos.
 - Se pasa de 100°C a 140°C en 4.15 minutos.
 - Se mantiene la temperatura de 140°C durante 6.12 minutos.
 - Finalmente se lleva a cabo una etapa de enfriamiento.
8. Al término de la digestión, abrir la puerta del horno, desconectar el sensor de temperatura del horno y sacar el carrusel.
9. Apagar el Horno de microondas y desconectarlo
10. Quitar el sensor de temperatura del vaso control y desmontar del carrusel las bases de plástico que contienen los vasos.
11. Colocar las bases que contienen los vasos encaquetados en la campana de extracción de gases.
12. Dejarlos reposar durante 1 hora para que se enfríen.
13. Desmontar las chaquetas de las bases de plástico y sacar los vasos de las chaquetas para evitar que estas se mojen.
14. Posterior a la etapa de enfriamiento cada muestra se transfiere a un matraz volumétrico de 25mL y lleva hasta el volumen de aforo con ácido clorhídrico 7M.
15. Finalmente se trasvasan las muestras en frascos de polietileno para su posterior análisis.

ANEXO IV***Cuantificación***

Se utiliza un espectrofotómetro de absorción atómica con el sistema de generador de hidruros, la presión de los gases fue de 50psi para nitrógeno y de 20psi para acetileno.

El flujo de la muestra fue de 7mL/minuto y el ácido y reductor de 1mL/minuto.

La curva de calibración utilizada fue de 1- 17ppb (mcg/L), las absorbancias de las muestras se interpolaron en dicha curva, obteniendo así las concentraciones de las muestras.

Manejo del EAA

1. Abrir los tanques de gas de nitrógeno y acetileno (para el caso de acetileno, la presión del tanque no debe ser menor a 100psi), verificando que la compresora esté encendida y que la presión de los gases sea la indicada para el equipo.
2. Abrir las llaves de gas de aire, acetileno y nitrógeno, que se encuentran en el laboratorio de analítica.
3. Colocar la chimenea, el generador de hidruros módulo VGA-77, la celda de cuarzo y la ventana de la flama.
4. Conectar la manguera de drenaje de desechos en la parte inferior del módulo VGA-77 y se termina de conectar esta manguera en un frasco de desechos.
5. Colocar los tubos capilares de ácido (A), reductor (R) y muestra (M) en el la bomba peristáltica del generador de Hidruros, para controlar el flujo.
6. Ajustar los tubos capilares con el controlador de flujo y oprimiendo la barra de presión.
7. Este módulo cuenta con un cable independiente y se debe conectar al módulo VGA-77 y a la corriente eléctrica.
8. Alinear la ranura del quemador paralelamente con el haz de luz, utilizando una tarjeta marcada con una línea perpendicular a la ranura del quemador.

9. En la ventana se muestra el controlador de la altura del quemador, un controlador manual se localiza a un lado de la cámara de atomizado y otro controlador es para mover el quemador adentro / afuera.
10. El quemador cuenta con una palanca con la que se puede girar.
11. Conectar la trampa en la celda de cuarzo.
12. Montar la celda de cuarzo en un soporte metálico especial.
13. Colocar la ventana de seguridad.
14. Encender el equipo con el botón de encendido y apagado del instrumento.
15. Estabilizar el flujo en el Generador de Hidruros con agua desionizada.
16. Encender el Generador VGA-77.
17. Al medir el flujo, colocar los capilares en las soluciones correspondientes, solo el de la muestra se coloca en agua hasta estabilizar el equipo.
18. Encender la computadora.

ANEXO V***Manejo del Software***

1. Acceso directo a SpectrAA
2. Dar clic en el Icono Worksheet; para editar el método.
3. Dar clic en New; para crear un nuevo método.
4. Se abre una nueva ventana y se da Clic en el icono de Develop
 - Add methods
 - Element: Se
 - Matrix: HCl
 - Method type: X vapor
 - OK
5. Se da clic en el icono de Edit Methods
6. De la ventana que se abre, se da clic en la pestaña de Type/Mode
 - Element: Se
 - Matrix: HCl
7. Luego se da clic en la pestaña de Standars y se colocan las concentraciones a utilizar.
 - Units: mcg/L
 - Sampling Mode: manual
 - Flame type: air/acetylene
 - Air flow: 13.5
 - Acetylene flow: 2.0
8. Posteriormente se da clic en la pestaña de Measurement
 - Measurement Mode: Integration
 - Calibration Mode: Concentración
 - Replicates: estándar 3
and sample 3
9. Finalmente se da clic en la pestaña de Optical
 - Lamp position:

10. Después se da clic en instrument:
 - Optimize: Estabilizar 10 min hasta tener la línea verde.
 - Verificar con la tarjeta marcada el haz de luz.
 - Poner 6.1 mm de altura del haz de luz en la ventana.
 - En la ventana se muestra el controlador de la altura del quemador con una línea verde y un valor que debe ser mayor de 1.
 - Rescale: para disminuir el voltaje, mover los tronillos de la lámpara hasta lo más que suba la línea verde.
 - Rescale: para ajustar la señal y anotar el voltaje sin celda
 - Voltaje sin celda
11. Cambiar el agua por HCl y colocar los 3 capilares en el HCl.
12. Tapar de arriba el separador gas-líquido con papel, para que avance, hasta que no haya 2 fases y se muestre homogéneo el sistema.
13. Colocar los capilares en las soluciones correspondientes: reductor (R) en Borohidruro de sodio, ácido (A) en HCl y muestra (M) en agua.
14. Cuando el sistema esté homogéneo y no haya efervescencia en el separador gas-líquido, indica que el sistema se ha estabilizado.
15. Colocar la celda de cuarzo con la trampa y cerrar la ventana de flama.
16. Verificar en la barra verde que la señal de un valor arriba de 6.0
17. Se da un Rescale: para que aumente el valor a 0.9 y anotar el voltaje con celda.
18. Encender el generador de hidruros.
 19. Mover la celda sujetándola de su soporte, hasta que quede libre la ranura del quemador (aprox. 45° de inclinación).
 20. Encender la flama con el botón rojo de Ignición
 21. Colocar lentamente la celda en su lugar y encender la campana.
 22. Dar un clic en Optimize Signal: la barra mostrará la señal de absorbancia detectada por el instrumento. La señal debe ser aprox. 0.0
 23. Dar clic en Ints zero: que ajusta la señal a cero de absorbancia, debe de dar 0.00
 24. Leer la curva de calibración, colocando el capilar de la muestra en los sistemas.

25. Colocar la concentración media (estándar 3) de la curva de calibración y leer, si da la absorbancia esperada o una línea azul, es indicativo de que si esta leyendo Se.
26. Retirar el capilar del sistema y colocarlo en el contenedor de HCl.
27. Esperar a que la señal esté en cero, se presiona ok y se cierra la ventana.
28. Se seleccionan las celdas a utilizar y se presiona start
29. Leer la curva de calibración, colocando el capilar de la muestra en los sistemas.
30. Una vez aceptada la curva de calibración, leer cada una de las muestras
31. Ya que se terminan de realizar las lecturas, se guardan y se cierra el programa Spectr AA así como la computadora.
32. Colocar los tres capilares en HCl durante 5 minutos y posteriormente en agua otros 5 minutos.
33. Apagar y desmontar el equipo.
34. Cerrar las llaves de paso de las líneas de los gases y los tanques.

ANEXO VI

<i>Evaluación del granulado</i>

Tabla 29. Evaluación del granulado

Característica	Estadística	Valor obtenido
Bel. Flujo Dinámico (g/s)	Media	14.7533
	CV (%)	0.4684
	Máximo	14.8600
	Mínimo	14.6700
Vel. Flujo Estático (g/s)	Media	7.4733
	CV	2.0271
	Máximo	7.6800
	Mínimo	7.2800
Angulo Reposo (grados)	Media	44.6667
	CV	1.1194
	Máximo	45.0000
	Mínimo	44.0000
Humedad (%)	Media	0.1000
	CV	86.6025
	Máximo	0.2000
	Mínimo	0.1000
Dens. Aparente (g/ml)	Media	1.2422
	CV	0.9675
	Máximo	1.2600
	Mínimo	1.2300
Dens. Compactada (g/ml)	Media	1.4433
	CV	0.9165
	Máximo	1.4600
	Mínimo	1.4300
Índice de Carr (%)	Media	14.0000
	CV	0.0000
	Máximo	14.0000
	Mínimo	14.0000
Índice de Haussner	Media	1.1600
	CV	0.0000
	Máximo	1.1600
	Mínimo	1.1600
Tamaño de partícula (micrones)	Media	721.4310
	CV	0.2269
	Máximo	722.8960
	Mínimo	717.9270

ANEXO VII

Tabla 30. Resultados de la concentración de Selenio basal en plasma de la unidad experimental 860 (Grupo tratamiento).

Fecha	Día de estudio	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra
170106	0	1.0217	25	0.0347	0.8	19.58
200106	1	0.5054	25	0.0347	1.87	92.50
230106	2	1.0221	25	0.0347	1.96	47.94
260106	3	1.0137	25	0.0347	1.22	30.09

Grafica 19. Concentración basal de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 860)

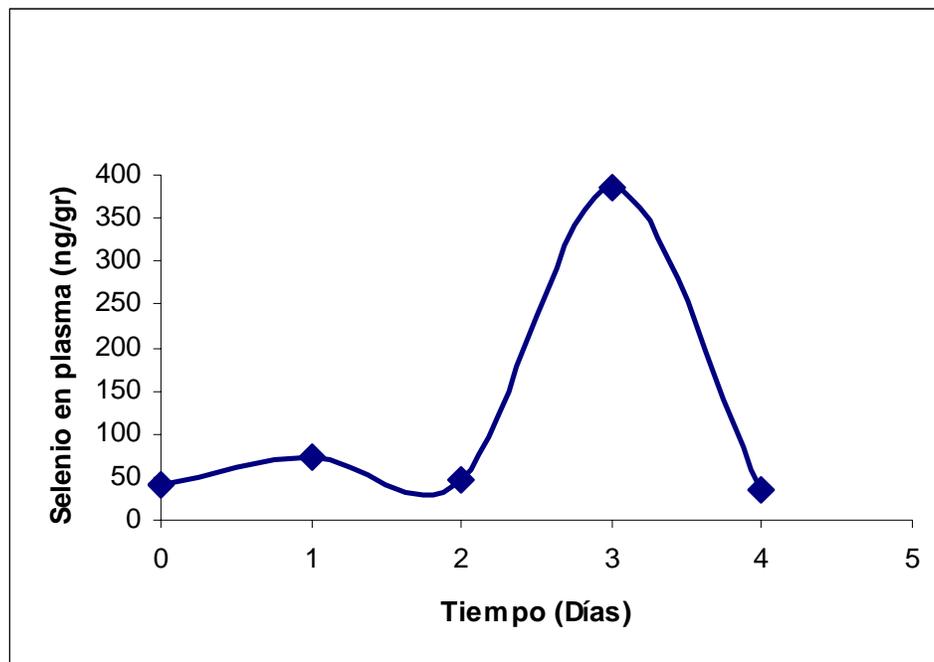


Tabla 31. Resultados de la concentración de Selenio basal en plasma de la unidad experimental 861 (Grupo tratamiento).

Fecha	Día de estudio	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra
170106	0	1.0049	25	0.0177	0.78	19.40
200106	1	0.5085	25	0.0313	1.66	81.61
230106	2	1.0151	25	0.028	1.49	36.70
260106	3	1.0164	25	0.0327	1.14	28.04

Grafica 20. Concentración basal de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 861)

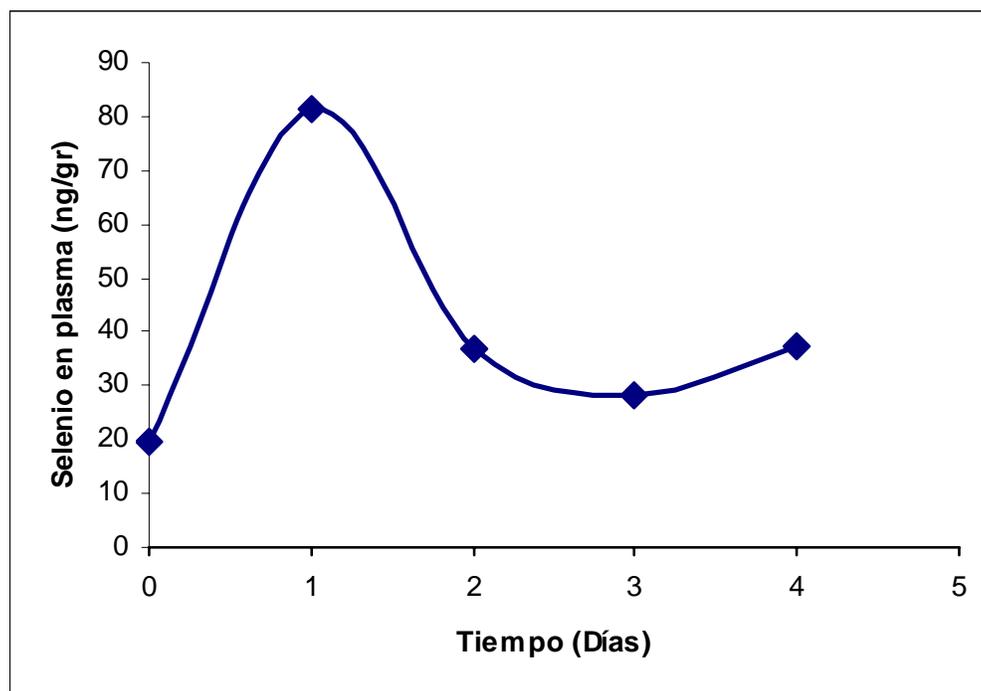


Tabla 32. Resultados de la concentración de Selenio basal en plasma de la unidad experimental 867 (Grupo tratamiento).

Fecha	Día de estudio	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra
170106	0	1.0193	25	0.0397	1.86	45.62
200106	1	0.5089	25	0.0312	1.66	81.55
230106	2	1.0186	25	0.0395	2.08	51.05
260106	3	1.0049	25	0.0525	1.92	47.77

Grafica 21. Concentración basal de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 867)

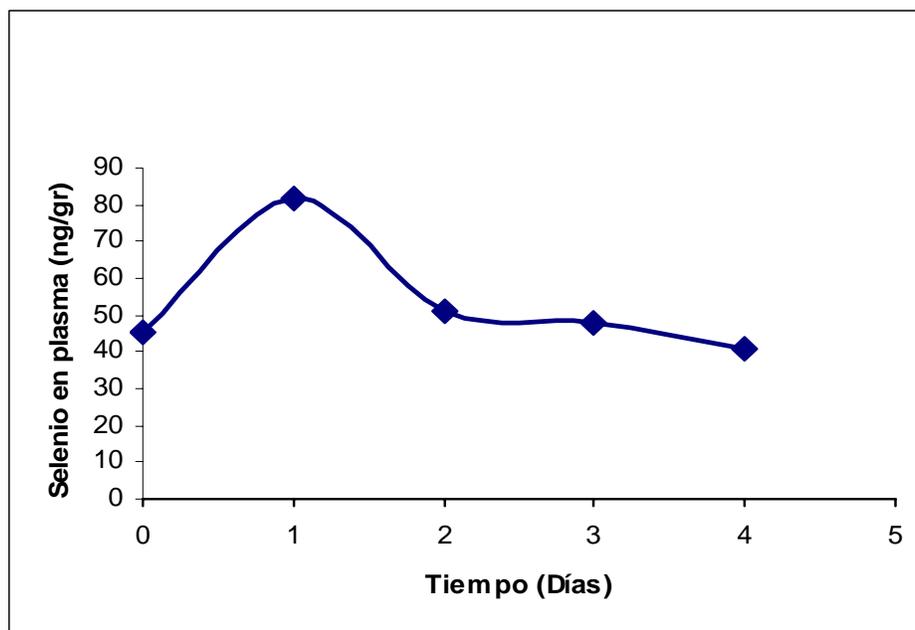


Tabla 33. Resultados de la concentración de Selenio basal en plasma de la unidad experimental 870(Grupo tratamiento).

Fecha	Día de estudio	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra
170106	0	1.0149	25	0.0217	0.97	23.89
200106	1	0.5097	25	0.0325	1.72	84.36
230106	2	1.0163	25	0.0552	2.88	70.85
260106	3	1.0153	25	0.0666	2.52	62.05

Grafica 22. Concentración basal de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 870)

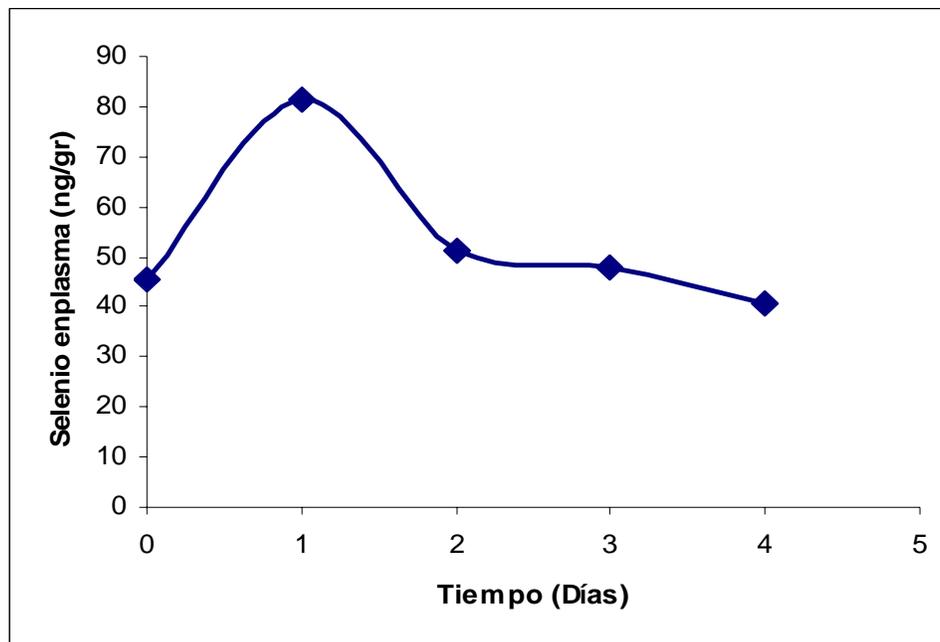


Tabla 34. Resultados de la concentración de Selenio basal en plasma de la unidad experimental 142(Grupo tratamiento).

Fecha	Día de estudio	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra
170106	0	1.0128	25	0.0133	0.58	14.32
200106	1	0.5086	25	0.0321	1.7	83.56
230106	2	1.0181	25	0.0332	1.76	43.22
260106	3	1.0193	25	0.0434	1.56	38.26

Grafica 23. Concentración basal de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 142)

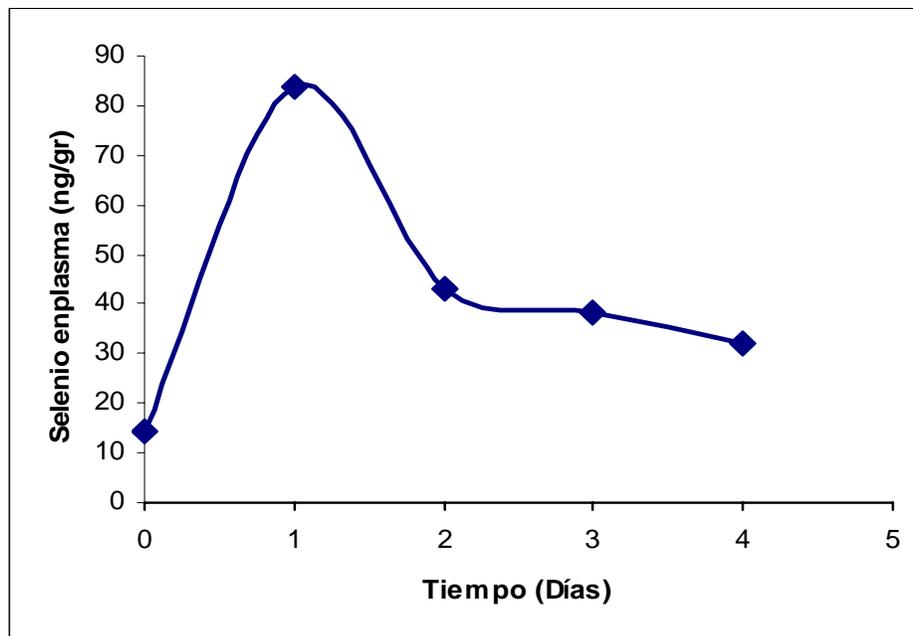


Tabla 35. Resultados de la concentración de Selenio basal en plasma de la unidad experimental 863(Grupo Placebo).

Fecha	Día de estudio	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra
170106	0	1.0076	25	0.0356	1.65	40.94
200106	1	0.5004	25	0.0276	1.47	73.44
230106	2	1.0226	25	0.0362	1.91	46.69
260106	3	1.0228	25	0.5665	15.81	386.44

Grafica 24. Concentración basal de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 863)

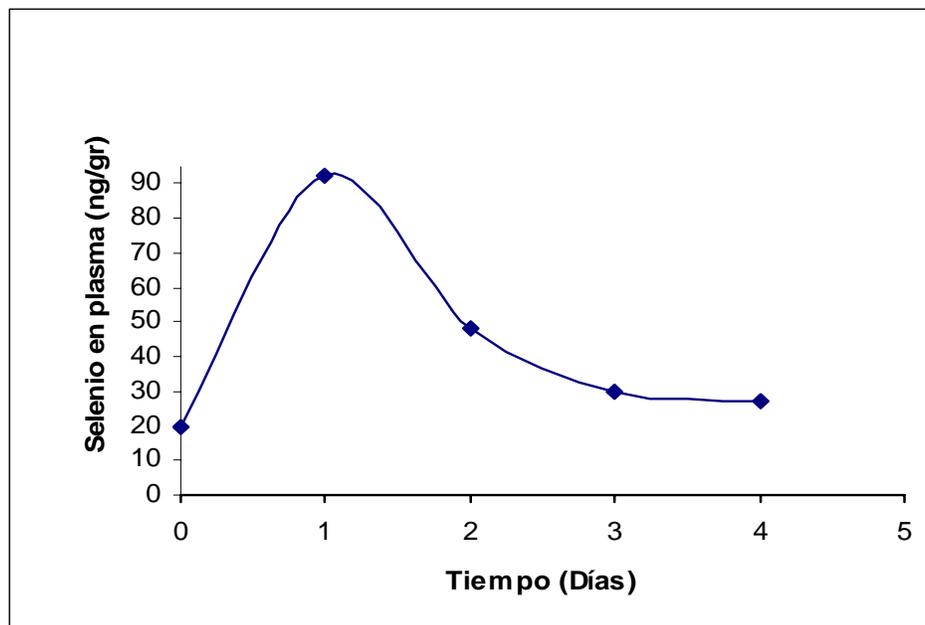


Tabla 36. Resultados de la concentración de Selenio basal en plasma de la unidad experimental 395(Grupo Placebo).

Fecha	Día de estudio	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra
170106	0	1.0021	25	0.022	0.98	24.45
200106	1	0.5065	25	0.0317	1.68	82.92
230106	2	1.033	25	0.0409	2.15	52.03
260106	3	1.0287	25	0.0378	1.33	32.32

Grafica 24. Concentración basal de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 395)

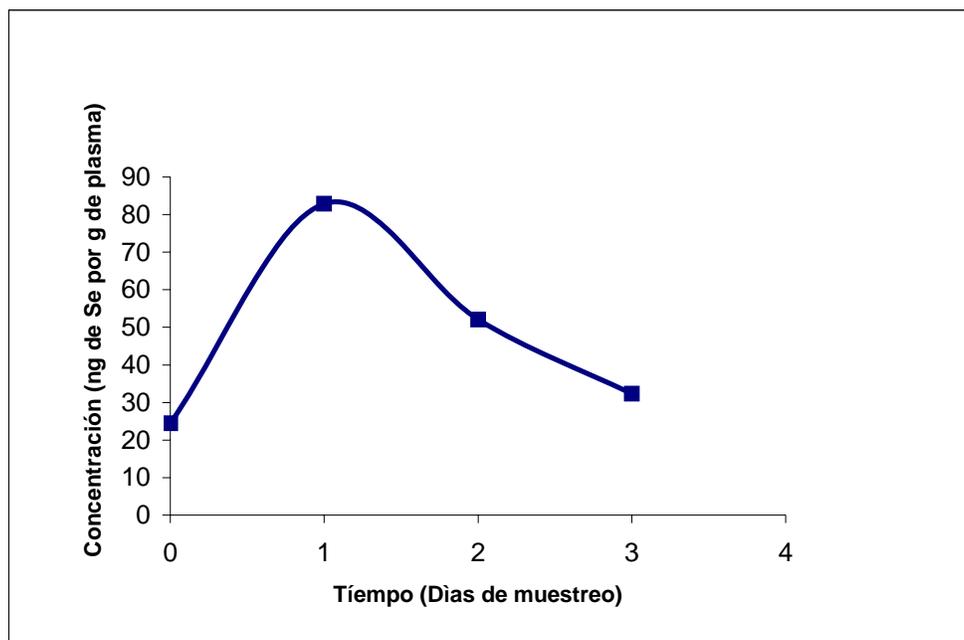


Tabla 37. Resultados de la concentración de Selenio basal en plasma de la unidad experimental 864(Grupo Placebo).

Fecha	Día de estudio	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra
170106	0	1.0048	25	0.0274	1.24	30.85
200106	1	0.5021	25	0.0275	2.9	144.39
230106	2	1.004	25	0.0379	2	49.80
260106	3	1.0168	25	0.0404	1.44	35.41

Grafica 26. Concentración basal de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 864)

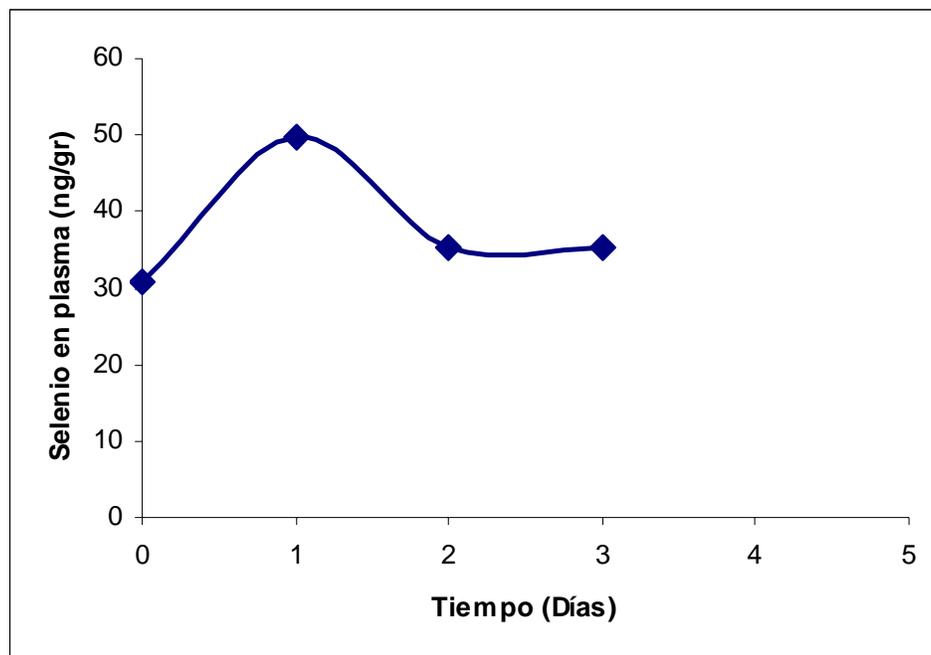


Tabla 38. Resultados de la concentración de Selenio basal en plasma de la unidad experimental 876(Grupo Placebo).

Fecha	Día de estudio	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra
170106	0	1.0054	25	0.0313	1.43	35.56
200106	1	0.5043	25	0.0338	1.79	88.74
230106	2	1.0125	25	0.0409	2.15	53.09
260106	3	1.0186	25	0.0336	1.17	28.72

Grafica 27. Concentración basal de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 876)

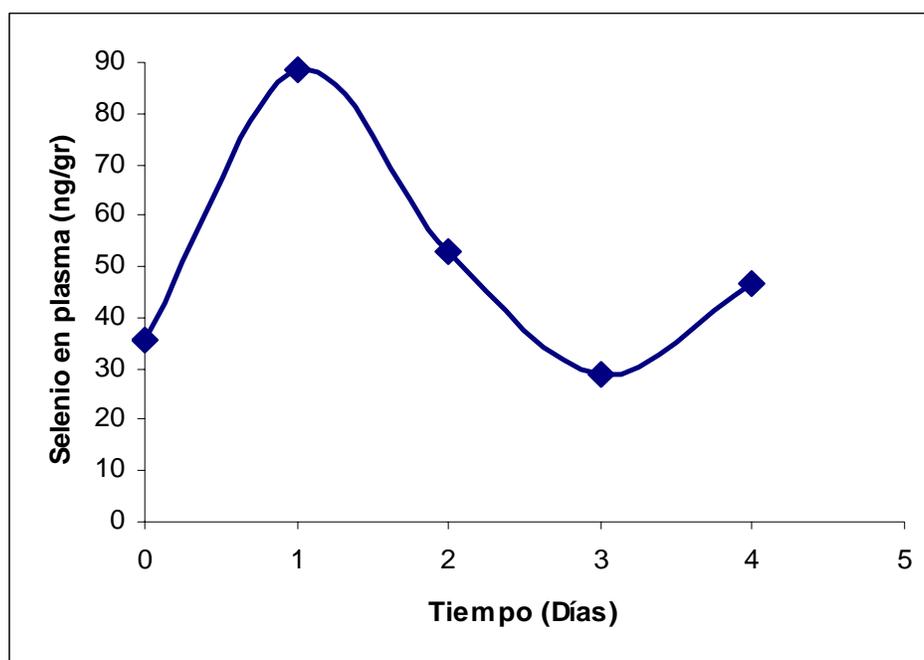
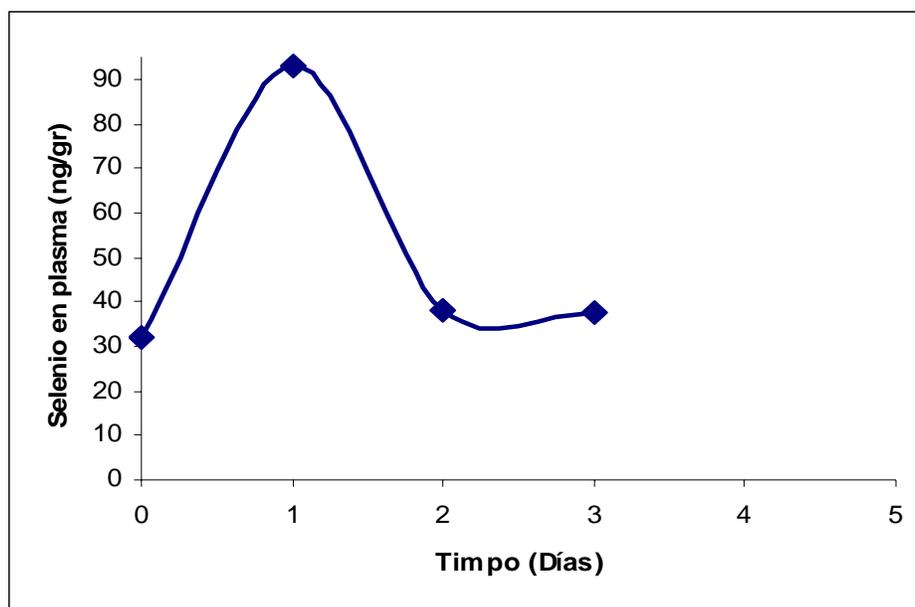


Tabla 39. Resultados de la concentración de Selenio basal en plasma de la unidad experimental 874(Grupo Placebo).

Fecha	Día de estudio	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra
170106	0	1.0057	25	0.0284	1.29	32.07
200106	1	0.508	25	0.0358	1.89	93.01
230106	2	1.0137	25	0.4613		0.00
260106	3	1.0193	25	0.0435	1.56	38.26

Grafica 28. Concentración basal de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 874)



ANEXO VIII

Tabla 40. Resultados de la concentración de Selenio en plasma de la unidad experimental 860 (Grupo tratamiento).

Fecha	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra	mcg/L Se basal	mcg/L Se animal*
0	1.0046	25	0.0407	1.45	36.08	43.82	-7.73
5	1.0042	25	0.0536	1.97	49.04	43.82	5.22
8	1.0109	25	0.1686	7.7	190.42	43.82	146.60
11	1.0203	25	0.109	4.52	110.75	43.82	66.93
14	1.0212	25	0.0763	2.95	72.22	43.82	28.39
17	1.0098	25	0.0594	2.21	54.71	43.82	10.89
20	1.007	25	0.063	2.37	58.84	43.82	15.01
23	1.0073	25	0.0451	1.62	40.21	43.82	-3.61
26	1.0323	25	0.0437	1.57	38.02	43.82	-5.79
29	1.0066	25	0.0236	1.26	31.29	43.82	-12.52
33	1.017	25	0.0248	1.32	32.45	43.82	-11.37
36	1.0203	25	0.0493	2.37	58.07	43.82	14.25
42	1.027	25	0.0411	1.93	46.98	43.82	3.16
47	1.0069	25	0.0159	0.93	23.09	43.82	-20.72
50	1.0086	25	0.0101	0.59	14.62	43.82	-29.19
54	1.0248	25	0.0095	0.56	13.66	43.82	-30.15

* Este valor se obtuvo al restar al promedio de concentraciones básicas cada una de las concentraciones.

Grafica 29. Concentración de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 860)

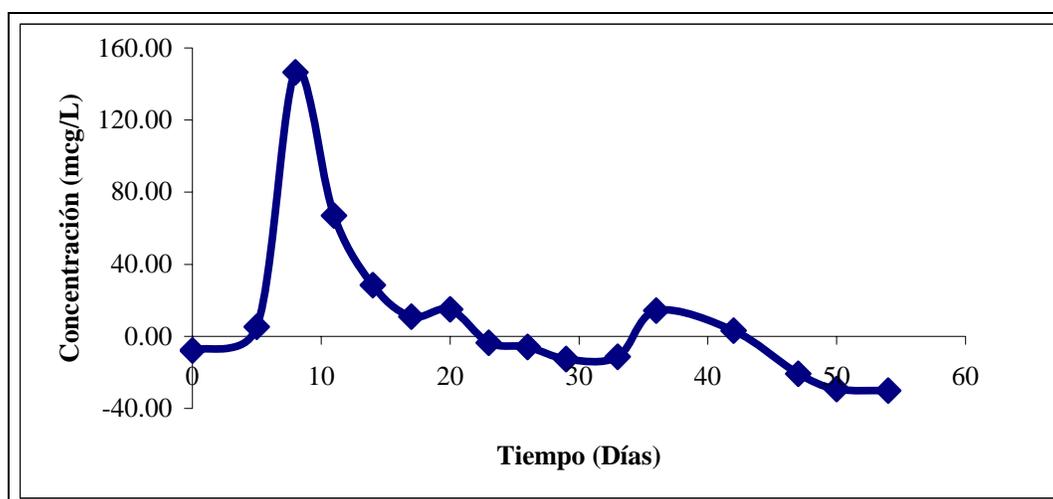


Tabla 41. Resultados de la concentración de Selenio en plasma de la unidad experimental 861 (Grupo tratamiento).

Fecha	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra	mcg/L Se basal	mcg/L Se animal*
0	1.0035	25	0.0418	1.49	37.12	28.5	8.62
5	1.005	25	0.1988	9.38	233.33	28.5	204.83
8	1.0033	25	0.1883	8.8	219.28	28.5	190.77
11	1.024	25	0.0919	3.68	89.84	28.5	61.34
14	1.0017	25	0.0796	3.1	77.37	28.5	48.86
17	1.0102	25	0.0474	1.72	42.57	28.5	14.06
20	1.0018	25	0.057	2.11	52.66	28.5	24.15
23	1.0022	25	0.0421	1.51	37.67	28.5	9.16
26	1.0023	25	0.0433	1.55	38.66	28.5	10.16
29	1.0085	25	0.015	0.8	19.83	28.5	-8.66
33	1.0184	25	0.0308	1.63	40.01	28.5	11.51
36	1.0169	25	0.0475	2.27	55.81	28.5	27.30
42	1.0075	25	0.0365	1.7	42.18	28.5	13.68
47	1.0056	25	0.0206	1.2	29.83	28.5	1.33
50	1.0064	25	0.0075	0.45	11.18	28.5	-17.32
54	1.018	25	0.0131	0.77	18.91	28.5	-9.59

* Este valor se obtuvo al restar al promedio de concentraciones básicas cada una de las concentraciones.

Grafica 30. Concentración de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 861)

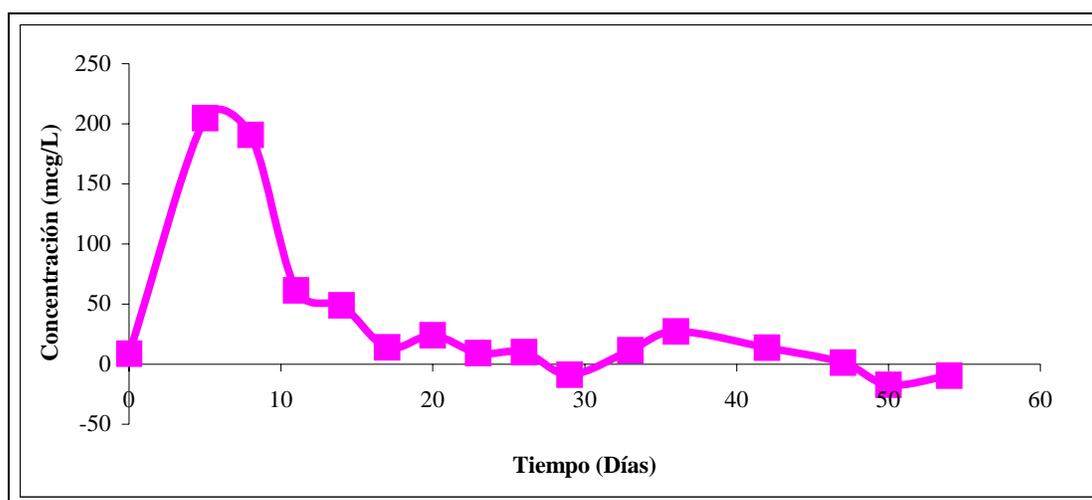


Tabla 42. Resultados de la concentración de Selenio en plasma de la unidad experimental 867 (Grupo tratamiento).

Fecha	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra	mcg/L Se basal	mcg/L Se animal*
0	1.0082	25	0.0457	1.65	40.91	48.15	-7.23
5	1.016	25	0.2179	10.43	256.64	48.15	208.49
8	1.021	25	0.206	9.78	239.47	48.15	191.32
11	1.0064	25	0.0401	1.43	35.52	48.15	-12.62
14	1.0101	25	0.1106	4.6	113.85	48.15	65.70
17	1.0181	25	0.0614	2.3	56.48	48.15	8.32
20	1.0048	25	0.0642	2.43	60.46	48.15	12.30
23	1.0012	25	0.0498	1.81	45.20	48.15	-2.95
26	1.0081	25	0.0459	1.65	40.92	48.15	-7.23
29	1.0217	25	0.0315	1.67	40.86	48.15	-7.28
33	1.0091	25	0.0232	1.24	30.72	48.15	-17.42
36	1.0146	25	0.0466	2.22	54.70	48.15	6.55
42	1.0212	25	0.0461	2.2	53.86	48.15	5.70
47	1.0082	25	0.0293	1.68	41.66	48.15	-6.49
50	1.0113	25	0.166	0.97	23.98	48.15	-24.17
54	1.0134	25	0.0112	0.66	16.28	48.15	-31.86

* Este valor se obtuvo al restar al promedio de concentraciones básicas cada una de las concentraciones.

Grafica 31. Concentración de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 867)

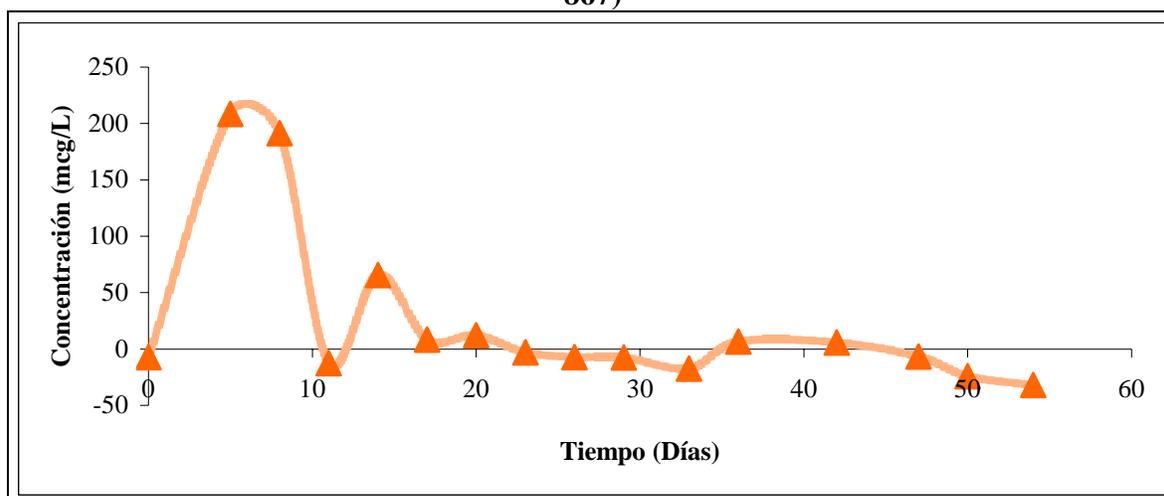


Tabla 43. Resultados de la concentración de Selenio en plasma de la unidad experimental 870 (Grupo tratamiento).

Fecha	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra	mcg/L Se basal	mcg/L Se animal*
0	1.0081	25	0.0544	2	49.60	52.26	-2.66
5	1.0256	25	0.1743	8.02	195.50	52.26	143.23
8	1.0004	25	0.1173	4.94	123.45	52.26	71.19
11	1.0077	25	0.1205	5.11	126.77	52.26	74.51
14	1.004	25	0.0685	2.61	64.99	52.26	12.73
17	1.0158	25	0.0506	1.85	45.53	52.26	-6.729
20	1.0183	25	0.0468	1.69	41.49	52.26	-10.76
23	1.0203	25	0.0414	1.48	36.26	52.26	-15.99
26	1.0323	25	0.0421	1.5	36.33	52.26	-15.93
29	1.014	25	0.0368	1.94	47.83	52.26	-4.42
33	1.013	25	0.0368	1.94	47.88	52.26	-4.38
36	1.0199	25	0.0669	3.36	82.36	52.26	30.10
42	1.0123	25	0.0534	2.59	63.96	52.26	11.70
47	1.012	25	0.0407	2.31	57.07	52.26	4.80
50	1.0123	25	0.0225	1.31	32.35	52.26	-19.90
54	1.0163	25	0.0135	0.79	19.43	52.26	-32.82

* Este valor se obtuvo al restar al promedio de concentraciones básicas cada una de las concentraciones.

Gráfica 32. Concentración de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 870)

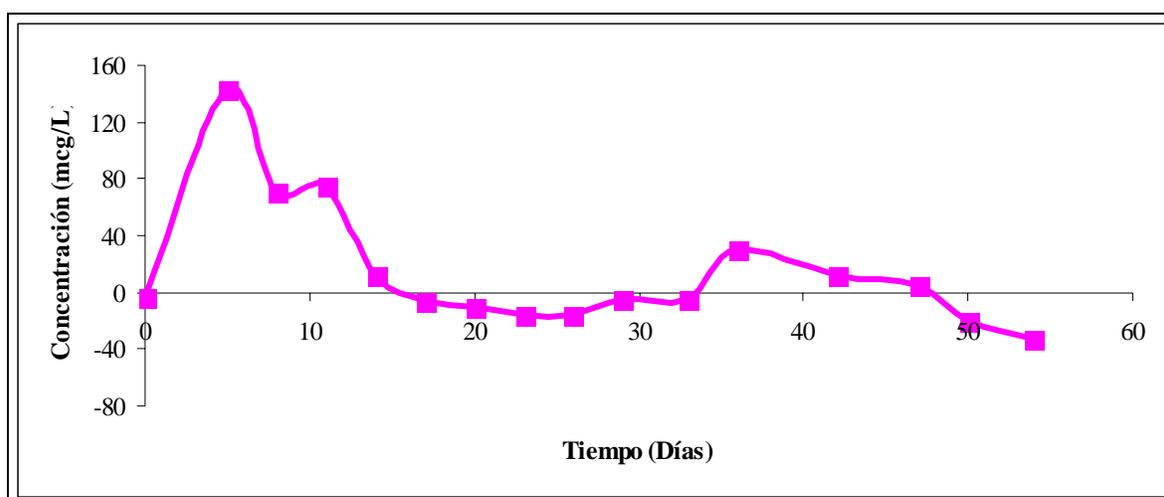


Tabla 44. Resultados de la concentración de Selenio en plasma de la unidad experimental 142 (Grupo tratamiento).

Fecha	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra	mcg/L Se basal	mcg/L Se animal*
0	1.0075	25	0.0367	1.3	32.26	31.93	0.33
5	1.004	25	0.3508	15.92	396.41	31.93	364.48
8	1.0031	25	0.3427	15.72	391.79	31.93	359.86
11	1.0131	25	0.1911	8.96	221.10	31.93	189.17
14	1.003	25	0.1537	6.88	171.49	31.93	139.56
17	1.0232	25	0.0795	3.1	75.74	31.93	43.81
20	1.0053	25	0.0802	3.13	77.84	31.93	45.91
23	1.003	25	0.0648	2.45	61.07	31.93	29.14
26	1.0102	25	0.0595	2.22	54.94	31.93	23.01
29	1.0023	25	0.0501	2.62	65.35	31.93	33.42
33	1.0096	25	0.0262	1.4	34.67	31.93	2.74
36	1.018	25	0.0507	2.44	59.92	31.93	27.99
42	1.0282	25	0.0469	2.24	54.46	31.93	22.53
47	1.012	25	0.0292	1.68	41.50	31.93	9.57
50	1.0131	25	0.0223	1.29	31.83	31.93	-0.10
54	1.036	25	0.023	1.33	32.09	31.93	0.16

* Este valor se obtuvo al restar al promedio de concentraciones básicas cada una de las concentraciones.

Grafica 33. Concentración de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 142)

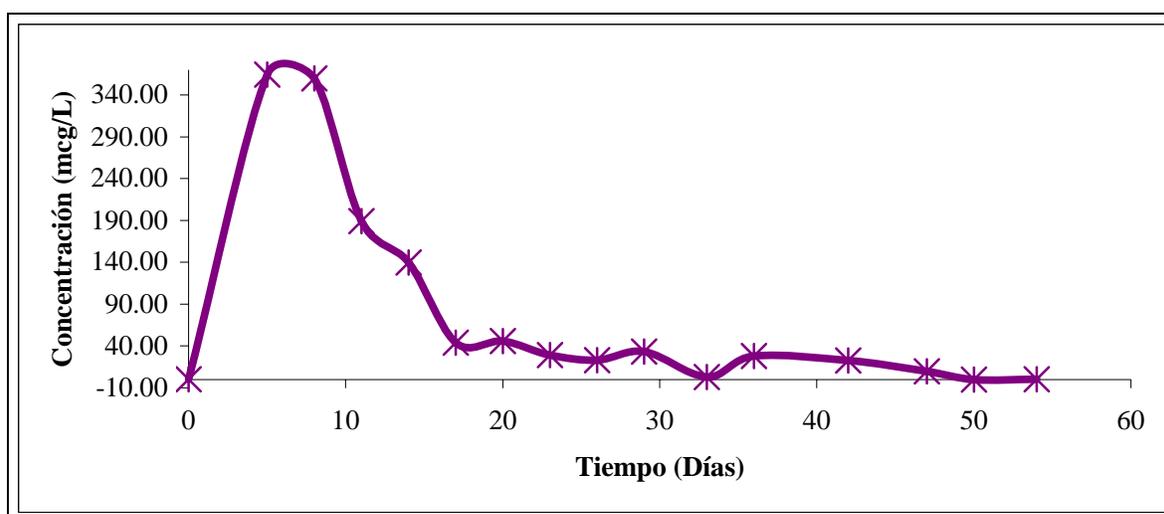


Tabla 45. Resultados de la concentración de Selenio en plasma de la unidad experimental 863 (Grupo placebo).

Fecha	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra	mcg/L Se basal	mcg/L Se animal*
0	1.0091	25	0.0315	1.1	27.25	32.53	-5.28
5	1.0116	25	0.0424	1.52	37.56	32.53	5.03
8	1.0061	25	0.2569	12.44	309.11	32.53	276.58
11	1.0259	25	0.4536	16.95	413.05	32.53	380.52
14	1.0319	25	0.0364	1.28	31.01	32.53	-1.52
17	1.0052	25	0.046	1.66	41.29	32.53	8.76
20	1.0052	25	0.0267	0.92	22.88	32.53	-9.65
23	1.0072	25	0.0253	0.87	21.59	32.53	-10.94
26	1.0119	25	0.0272	0.94	23.22	32.53	-9.31
29	1.0166	25	0.0415	2.18	53.61	32.53	21.08
33	1.0174	25	0.0278	1.48	36.37	32.53	3.84
36	1.0127	25	0.0487	2.34	57.77	32.53	25.24
42	1.022	25	0.0332	1.53	37.43	32.53	4.90
47	1.0086	25	0.0199	1.16	28.75	32.53	-3.78
50	1.0089	25	0.0026	0.15	3.72	32.53	-28.81
54	1.0155	25	0.0172	1	24.62	32.53	-7.91

* Este valor se obtuvo al restar al promedio de concentraciones basales cada una de las concentraciones.

Grafica 34. Concentración de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 863)

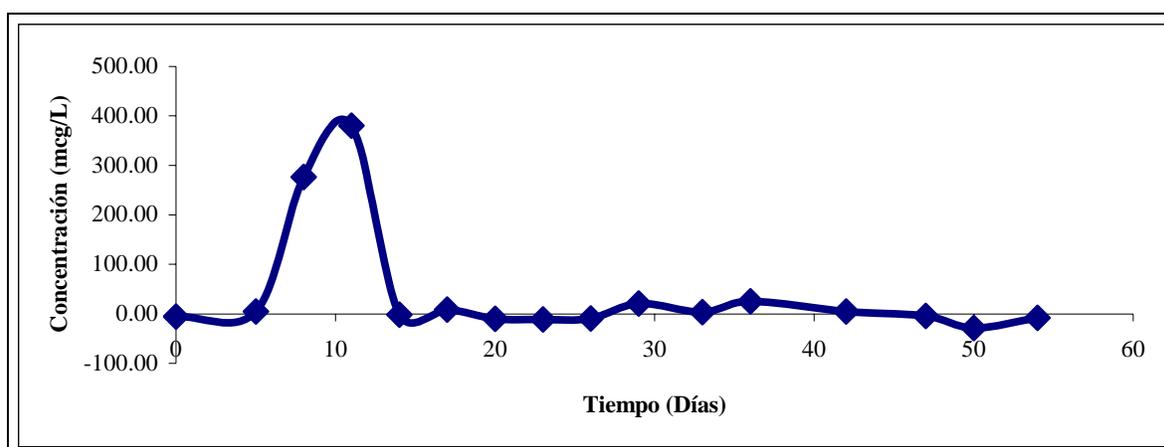


Tabla 46. Resultados de la concentración de Selenio en plasma de la unidad experimental 395 (Grupo placebo).

Fecha	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra	mcg/L Se basal	mcg/L Se animal*
0	1.0096	25	0.0488	1.77	43.83	36.27	7.56
5	1.015	25	0.0489	1.78	43.84	36.27	7.57
8	1.0011	25	0.0288	1	24.97	36.27	-11.30
11	1.0173	25	0.0989	4.02	98.79	36.27	62.52
14	1.0095	25	0.0405	1.44	35.66	36.27	-0.61
17	1.0252	25	0.0306	1.06	25.85	36.27	-10.42
20	1.0057	25	0.0291	1.01	25.11	36.27	-11.16
23	1.0279	25	0.0312	1.08	26.27	36.27	-10.00
26	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-
47	-	-	-	-	-	-	-

* Este valor se obtuvo al restar al promedio de concentraciones basales cada una de las concentraciones.

- Indica que no hay valor, esto se debe a que el animal fue sacrificado antes de terminar el estudio.

Grafica 35. Concentración de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 395)

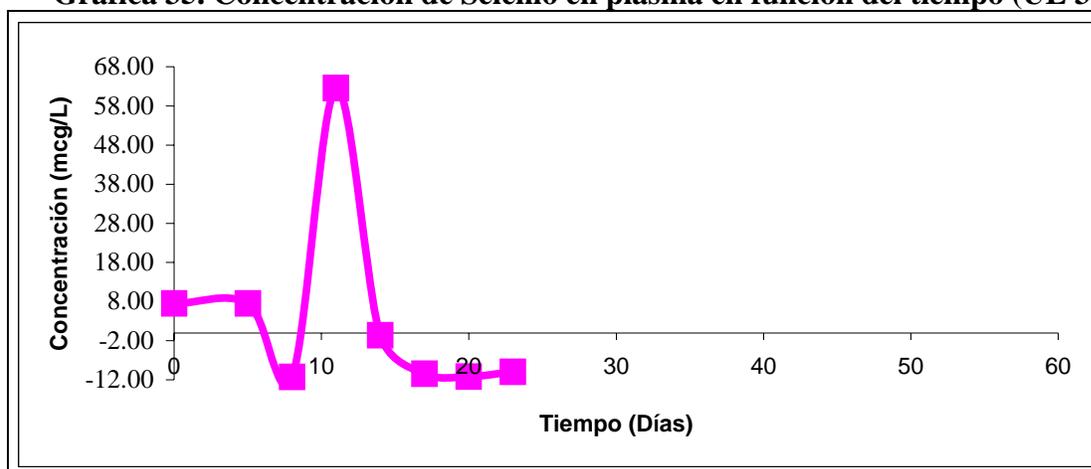


Tabla 47. Resultados de la concentración de Selenio en plasma de la unidad experimental 864 (Grupo placebo).

Fecha	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra	mcg/L Se basal	mcg/L Se animal*
0	1.0084	25	0.04	1.42	35.20	38.69	-3.49
5	1.0137	25	0.0485	1.65	40.69	38.69	2.00
8	1.0078	25	0.0288	1	24.81	38.69	-13.88
11	1.0189	25	0.0447	1.61	39.50	38.69	0.81
14	1.0108	25	0.0333	1.16	28.69	38.69	-10.00
17	1.0118	25	0.0509	1.86	45.96	38.69	7.27
20	1.0001	25	0.0345	1.21	30.25	38.69	-8.44
23	1.0169	25	0.0264	0.91	22.37	38.69	-16.32
26	1.0118	25	0.024	0.82	20.26	38.69	-18.43
29	1.0061	25	0.0214	1.14	28.33	38.69	-10.36
33	1.0098	25	0.0252	1.34	33.17	38.69	-5.52
36	1.0167	25	0.049	2.35	57.78	38.69	19.09
42	1.012	25	0.0347	1.6	39.53	38.69	0.84
47	1.0154	25	0.0173	1.01	24.87	38.69	-13.82
50	1.0035	25	0.00085	0.05	1.25	38.69	-37.44
54	1.0203	25	0.0026	0.19	4.66	38.69	-34.03

* Este valor se obtuvo al restar al promedio de concentraciones básicas cada una de las concentraciones.

Grafica 36 Concentración de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 864)

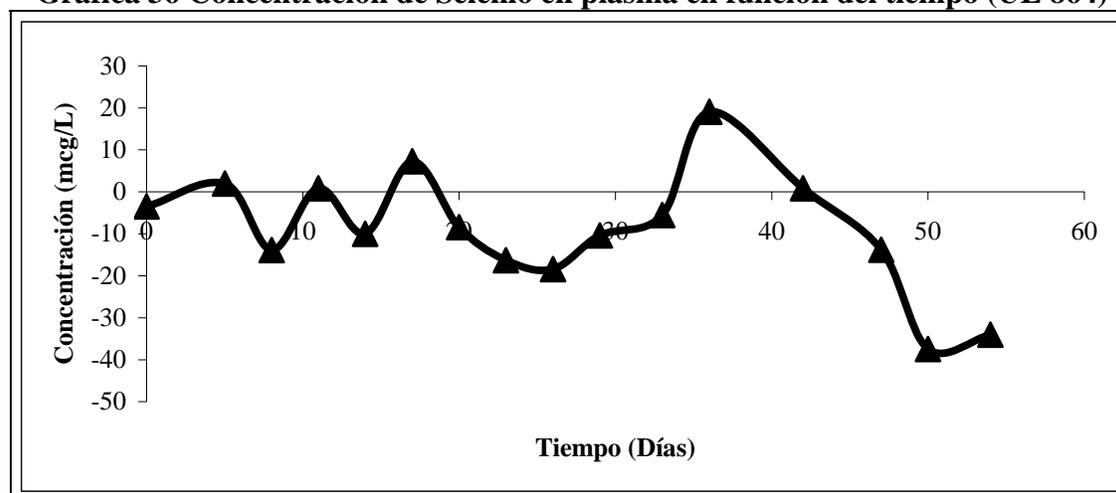


Tabla 48. Resultados de la concentración de Selenio en plasma de la unidad experimental 876 (Grupo placebo).

Fecha	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra	mcg/L Se basal	mcg/L Se animal*
0	1.0027	25	0.0512	1.87	46.62	39.12	7.50
5	1.0087	25	0.0528	1.94	48.08	39.12	8.96
8	1.0062	25	0.0439	1.58	39.26	39.12	0.14
11	1.0164	25	0.0463	1.67	41.08	39.12	1.96
14	1.0041	25	0.0272	0.93	23.16	39.12	-15.96
17	1.0125	25	0.0306	1.06	26.17	39.12	-12.95
20	0.9966	25	0.0328	1.15	28.85	39.12	-10.27
23	1.0295	25	0.0348	1.22	29.63	39.12	-9.49
26	1.0272	25	0.0333	1.16	28.23	39.12	-10.89
29	1.0056	25	0.0254	1.35	33.56	39.12	-5.56
33	1.0147	25	0.0425	2.23	54.94	39.12	15.82
36	1.0114	25	0.0462	2.2	54.38	39.12	15.26
42	1.0113	25	0.0332	1.53	37.82	39.12	-1.30
47	1.0154	25	0.176	1.03	25.36	39.12	-13.76
50	41.0032	25	0.0181	1.06	0.65	39.12	-38.47
54	1.0133	25	0.0059	0.35	8.64	39.12	-30.48

* Este valor se obtuvo al restar al promedio de concentraciones básicas cada una de las concentraciones.

Grafica 37. Concentración de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 876)

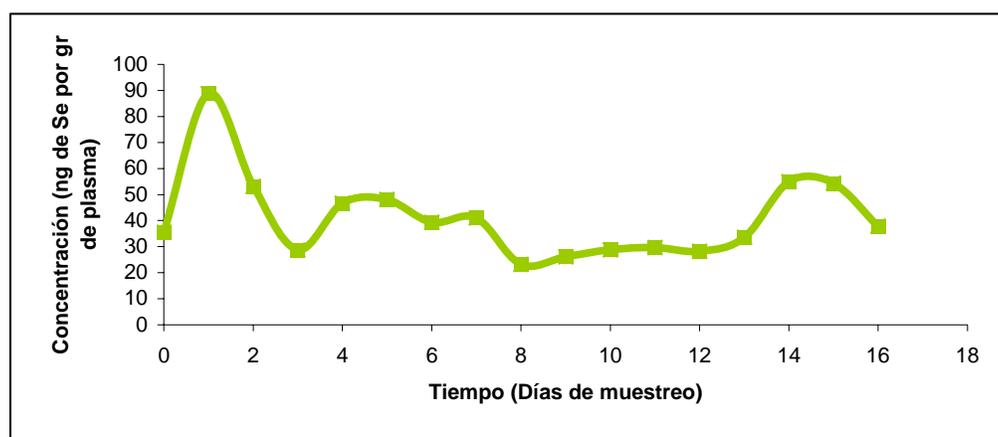
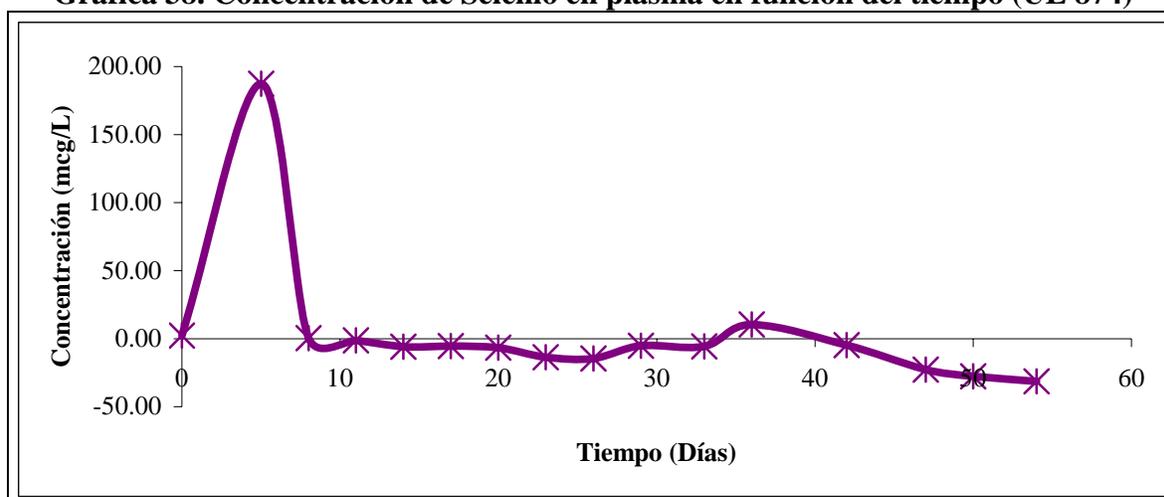


Tabla 49. Resultados de la concentración de Selenio en plasma de la unidad experimental 874 (Grupo placebo).

Fecha	Muestra (g)	Vol aforo en mL	Abs	Conc instr	mcg/L Se Muestra	mcg/L Se basal	mcg/L Se animal*
0	1.0321	25	0.0432	1.55	37.54	35.16	2.38
5	1.0055	25	0.191	8.95	222.53	35.16	187.37
8	1.004	25	0.0401	1.43	35.61	35.16	0.45
11	1.0169	25	0.0388	1.38	33.93	35.16	-1.23
14	1.0231	25	0.0343	1.2	29.32	35.16	-5.84
17	1.0066	25	0.0343	1.2	29.80	35.16	-5.36
20	1.175	25	0.0382	1.35	28.72	35.16	-6.44
23	1.0156	25	0.0257	0.88	21.66	35.16	-13.50
26	1.0152	25	0.0237	0.84	20.69	35.16	-14.47
29	1.0196	25	0.0228	1.22	29.91	35.16	-5.25
33	1.0126	25	0.0224	1.2	29.63	35.16	-5.53
36	1.0109	25	0.0395	1.85	45.75	35.16	10.59
42	1.023	25	0.0276	1.25	30.55	35.16	-4.61
47	1.0549	25	0.089	0.53	12.56	35.16	-22.60
50	1.0061	25	0.0053	0.31	7.70	35.16	-27.46
54	1.0133	25	0.0026	0.16	3.95	35.16	-31.21

* Este valor se obtuvo al restar al promedio de concentraciones básicas cada una de las concentraciones.

Grafica 38. Concentración de Selenio en plasma en función del tiempo (UE 874)



ANEXO IX

Tabla 50. Parámetros farmacocinéticos obtenidos con el programa estadístico WinNonlin

Vaca	Rsq	Corr_XY	t1/2 (día)	Tmax (día)	Cmax (mcg/L)	ABCINF_obs (día*mcg/L)	MRTINF_obs (día)	Fluido
860	0.7013	-0.8374	85005	80000	1466000	11270130	164839	Plasma
861	0.8786	-0.9373	25722	50000	2048300	22007855	121606	Plasma
867	0.9903	-0.9951	193352	50000	2084900	23809439	136106	Plasma
870	0.9988	-0.9994	41654	50000	1432400	16958649	172363	Plasma
142	0.9314	-0.9651	16373	50000	3644800	43849129	120920	Plasma

Vaca con ID 860

Date: 5/31/2005
Time: 16:57:12

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM
Version 4.1 Build 200307301056
Core Version 16May2003

Settings

Model: Plasma Data, Extravascular Administration
Number of nonmissing observations: 8
Dose time: 0.00
Dose amount: 1000.00
Weighting for lambda_z calculation: Uniform weighting
Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation
Lambda_z method: Find best fit for lambda_z

Summary Table

Time day	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC day*ng/mL	AUMC day*day*ng/mL	Weight
0.0000 @	0.0000			0.0000	0.0000	
5.000	5.220			13.05	65.25	
8.000 *	146.6	62.48	84.12	240.8	1864.	1.000
11.00 *	66.93	48.92	18.01	561.1	4727.	1.000
14.00 *	28.40	38.31	-9.907	704.1	6428.	1.000
17.00 *	10.89	29.99	-19.10	763.0	7302.	1.000
20.00 *	15.02	23.49	-8.465	801.9	8030.	1.000
36.00 *	14.25	6.371	7.879	1036.	1.454e+004	1.000
42.00 *	3.160	3.906	-0.7458	1088.	1.647e+004	1.000

Vaca con ID 861

Date: 5/31/2005
Time: 16:57:12

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM
Version 4.1 Build 200307301056
Core Version 16May2003

Settings

Model: Plasma Data, Extravascular Administration
Number of nonmissing observations: 13
Dose time: 0.00
Dose amount: 1000.00
Weighting for lambda_z calculation: Uniform weighting
Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation
Lambda_z method: Find best fit for lambda_z

Summary Table

Time day	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC day*ng/mL	AUMC day*day*ng/mL	Weight
0.0000	8.620			0.0000	0.0000	
5.000	204.8			533.6	2560.	
8.000	190.8			1127.	6386.	
11.00	61.34			1505.	9687.	
14.00	48.87			1671.	1.173e+004	
17.00	14.07			1765.	1.311e+004	
20.00	24.16			1822.	1.419e+004	
23.00	9.170			1872.	1.524e+004	
26.00	10.16			1901.	1.595e+004	
33.00	11.51			1977.	1.820e+004	
36.00 *	27.31	36.47	-9.160	2035.	2.025e+004	1.000
42.00 *	13.68	7.240	6.440	2158.	2.492e+004	1.000
47.00 *	1.330	1.882	-0.5518	2196.	2.651e+004	1.000

Vaca con ID 867

Date: 5/31/2005
Time: 16:57:13

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM
Version 4.1 Build 200307301056
Core Version 16May2003

Settings

Model: Plasma Data, Extravascular Administration
Number of nonmissing observations: 7
Dose time: 0.00
Dose amount: 1000.00
Weighting for lambda_z calculation: Uniform weighting
Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation
Lambda_z method: Find best fit for lambda_z

Summary Table

Time day	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC day*ng/mL	AUMC day*day*ng/mL	Weight
0.0000 @	0.0000			0.0000	0.0000	
5.000	208.5			521.2	2606.	
8.000	191.3			1121.	6466.	
14.00	65.70			1892.	1.382e+004	
17.00	8.330			2003.	1.541e+004	
20.00 *	12.31	12.16	0.1504	2034.	1.599e+004	1.000
36.00 *	6.550	6.852	-0.3020	2185.	1.985e+004	1.000
42.00 *	5.710	5.526	0.1841	2222.	2.127e+004	1.000

Vaca con ID 870

Date: 5/31/2005
Time: 16:57:13

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM
Version 4.1 Build 200307301056
Core Version 16May2003

Settings

Model: Plasma Data, Extravascular Administration
Number of nonmissing observations: 7
Dose time: 0.00
Dose amount: 1000.00
Weighting for lambda_z calculation: Uniform weighting
Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation
Lambda_z method: Find best fit for lambda_z

Summary Table

Time day	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC day*ng/mL	AUMC day*day*ng/mL	Weight
0.0000 @	0.0000			0.0000	0.0000	
5.000	143.2			358.1	1791.	
8.000	71.19			679.7	3719.	
11.00	74.51			898.3	5803.	
14.00	12.73			1029.	7300.	
36.00 *	30.10	30.61	-0.5076	1500.	2.118e+004	1.000
42.00 *	11.70	11.28	0.4226	1626.	2.590e+004	1.000
47.00 *	4.810	4.907	-0.09749	1667.	2.770e+004	1.000

Vaca con ID 142

Date: 5/31/2005
Time: 16:57:13

WINNONLIN NONCOMPARTMENTAL ANALYSIS PROGRAM
Version 4.1 Build 200307301056
Core Version 16May2003

Settings

Model: Plasma Data, Extravascular Administration
Number of nonmissing observations: 15
Dose time: 0.00
Dose amount: 1000.00
Weighting for lambda_z calculation: Uniform weighting
Calculation method: Linear Trapezoidal with Linear Interpolation
Lambda_z method: Find best fit for lambda_z

Summary Table

Time day	Conc. ng/mL	Pred. ng/mL	Residual ng/mL	AUC day*ng/mL	AUMC day*day*ng/mL	Weight
0.0000	0.3300			0.0000	0.0000	
5.000	364.5			912.0	4556.	
8.000	359.9			1999.	1.161e+004	
11.00	189.2			2822.	1.905e+004	
14.00	139.6			3315.	2.510e+004	
17.00	43.81			3590.	2.915e+004	
20.00	45.91			3725.	3.164e+004	
23.00	29.14			3837.	3.402e+004	
26.00	23.01			3916.	3.593e+004	
29.00	33.42			4000.	3.828e+004	
33.00	2.740			4073.	4.040e+004	
36.00	27.99			4119.	4.204e+004	
42.00 *	22.53	35.85	-13.32	4270.	4.791e+004	1.000
47.00 *	9.570	4.317	5.253	4350.	5.140e+004	1.000
54.00 *	0.1600	0.2229	-0.06294	4385.	5.300e+004	1.000

ANEXO X

Tabla 51. Peso (Kg) de las unidades experimentales del Grupo Placebo

ID	Fecha / Peso (Kg)			
	17/01/2006	03/02/2006	10/02/2006	17/02/2006
	0	1	2	3
395	435	438	450	440
861	268	302	284	256
863	271	300	296	290
142	508	547	521	458
876	215	228	232	214

Grafica 39. Perfiles de los pesos de las UE del Grupo Placebo

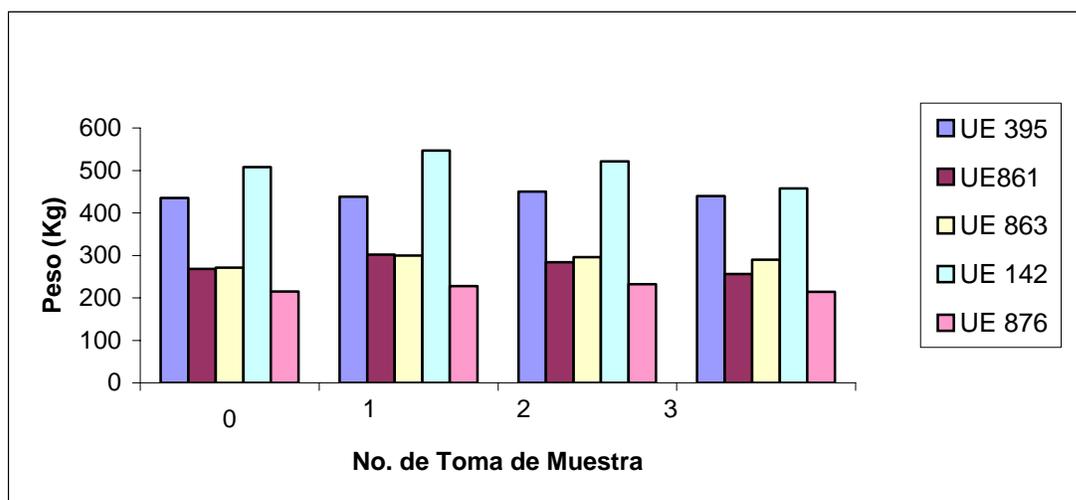
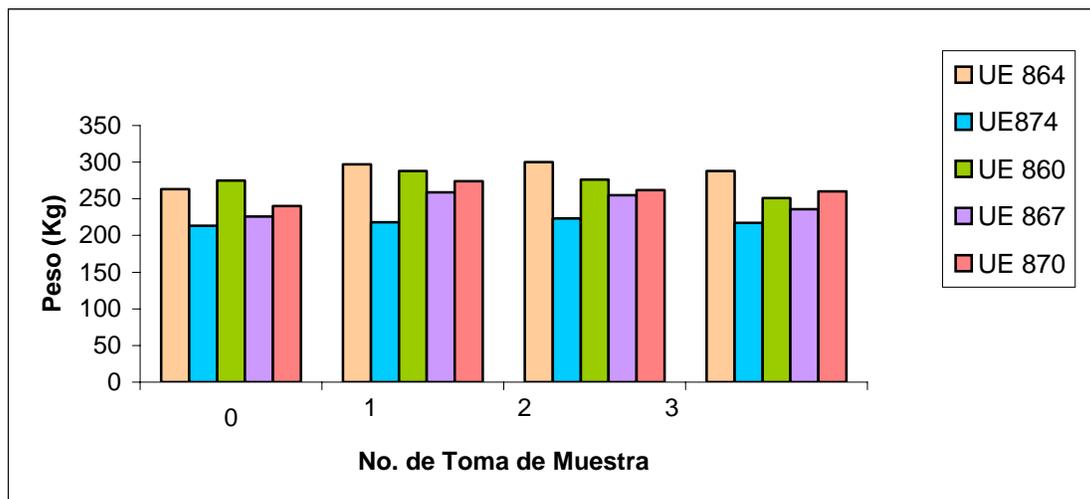


Tabla 52. Peso (Kg) de las unidades experimentales del Grupo Tratamiento

ID	Fecha / Peso (Kg)			
	17/01/2006	03/02/2006	10/02/2006	17/02/2006
	0	1	2	3
864	263	297	300	288
874	213	218	223	217
860	275	288	276	251
867	226	259	255	236
870	240	274	262	260

Grafica 40. Perfiles de los pesos de las UE del Grupo Tratamiento



ANEXO XI

CONCENTRACIONES DE SELENIO EN SANGRE Y PLASMA

País	Muestra	Concentración de Selenio	Referencia
Nueva Zelanda	Sangre Total	X=310±31 nmol Se/L Rango 97 – 810 nmol Se/L	Knowles, Gace, Wurms, Lee (1999)
República Checa	Sangre Total	X=78.25 µg/L Rango 1.33 – 212.40	Pavlata, Pechova, Illek (2000)
República Checa	Sangre Total	69.21±11.22 µg/L 68.42±10.7 µg/L	Pavlata, Pechova, Illek (2001)
Finlandia	Sangre Total	X=191 µg/L Rango 93 – 305	Jukola, Hakkarainen, Saloniemi (1996a)
Ohio, EUA	Plasma	60 – 65 µg/L	Ivancic, Weiss (2001)
Ohio, EUA	Plasma	0.05 µg/mL	Weiss, Todhunter, Hogan (1990)
Washington, EUA	Sangre Total Plasma	Sangre: 0.146 µg/mL Plasma: 0.057 µg/mL Sangre: 0.106 µg/mL Plasma: 0.031 µg/mL	Abdelrahman, Kincaid (1995)
Washington, EUA	Suero	Adecuado: 115.3 ng/mL Excesivo: 287.2 ng/mL	Awadech, Abderahaman, Kinkaid (1996)
Finlandia	Sangre Total	183 – 244 µg/L	Jukola, Hakkarainen (1996)
EUA	Sangre Total	92.6 ng/mL	Waldrom, Ward, Overton (2004)

Nota:

1 nmol de Se = 0.079 µg Se

Si se considera una densidad de 1 g/mL entonces µg/L = ppb = ng/g

(µg/mL)(1000 mL/1L) = µg/L = ppb = ng/g