



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C1

Desarrollo y validación de procesos farmacéuticos.

**Estudio de perfiles de Selenio en sangre y líquido ruminal de
bolos de Selenato de Bario.**

EL SERVICIO SOCIAL TITULACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

Presenta:

ERIKA FABIOLA PÉREZ BECERRIL

Asesoras:

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

Dra. Raquel López Arellano

Cuautitlán Izcalli, Estado de México. 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. A.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos :

El Servicio Social: Desarrollo y Validación de Procesos
Farmacéuticos "Estudio de Perfiles de Selenio en Sangre
y Líquido Ruminal de Bolos de Selenato de Bario".

que presenta la pasante: Erika Fabiola Pérez Becerril
con número de cuenta: 40301913-1 para obtener el título de :
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 2 de julio de 2007.

PRESIDENTE DAR. Juan José Díaz Esquivel

VOCAL DESS. Rodolfo Cruz Rodriguez

SECRETARIO Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

PRIMER SUPLENTE Dra. Gabriela Vargas Martínez

SEGUNDO SUPLENTE Dra. Elizabeth García García

AGRADECIMIENTOS.

Gracias **a Dios** por darme la oportunidad de estudiar, por darme las fuerzas que necesitaba en esos momentos de presión, de angustia y sobre todo por estar ahí cuando más lo necesite.

Gracias **a mis Padres** por su amor, apoyo, comprensión, paciencia y confianza, ya que si ellos alcanzar esta meta en mi vida no hubiera sido posible. Gracias por estar siempre ahí cuando más necesite de ustedes.

Gracias **a mi hermano** Arturo por esas diversiones y pequeñas peleas que me ayudaban a relajarme y a olvidarme un poco de mis presiones.

Gracias **a toda mi familia, mis abues, tíos, primos y a mi padrinos** ya que de alguna u otra manera siempre me apoyaron.

Gracias **a mis asesoras**, la Dra. Alma Revilla Vázquez y a la Dra. Raque López por su apoyo, enseñanza y por su ejemplo, ya que sin su apoyo este trabajo no hubiera sido culminado.

Gracias **a mis sinodales**, DAR Juan José Díaz, DESS Rodolfo Cruz, Dra. Gabriela Vargas y a la Dra. Elizabeth García, por sus consejos y mejorías que le proporcionaron a este trabajo.

Gracias **a Carlos** por su amor, comprensión y apoyo. Por estar ahí, escucharme y apoyarme a realizar este trabajo.

Gracias **a Jorge, Oscar, Abdu, Gaby, Nanci, Vicky y Artemisa** por compartir conmigo su conocimiento, experiencia y su amistad, ya que fueron parte fundamental de éste trabajo.

Gracias **a mis amigos** Pilar, Hugo, Sandra, Pamela, Tamara, Emma, Bruno, Miguel, Jonathan (Bolillo), Jairsiño, Néstor, Gaby y a Daniela, por haber compartido estos años tan trascendentes en mi vida y por compartir todas esas experiencias tanto agradables como poco afortunadas. Gracias.

Gracias **al equipo de básquetbol** y al entrenador Oscar por permitirme formar parte de esta familia y enseñarme que para todo hay tiempo en esta vida.

Gracias **a la UNAM** pero de manera especial **a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C1** por brindarme la oportunidad de aprender y lograr una de mis metas ya que me permitió demostrarme que puedo lograr lo que me proponga.

“Ser feliz no significa que todo esta bien, sino que has decidido ver más allá de lo que no es perfecto.”

ÍNDICE

Contenido.	Página
ÍNDICE GENERAL	I
ÍNDICE DE TABLAS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE GRÁFICOS	VI
1. OBJETIVOS	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO	3
3.1 Generalidades del Selenio	4
3.1.1 Función biológica del selenio	6
3.1.1.1 Actividad antioxidante	6
3.1.1.2 Sistema inmune	8
3.1.1.3 Regulación hormonal	9
3.2 Enfermedades en mamíferos causadas por las deficiencias de Selenio	10
3.3 Métodos de suplementación	13
3.4 Metabolismo del selenio	15
3.4.1 Ruta metabólica propuesta para selenio.	19
3.5 Biodisponibilidad	20
3.5.1 Biodisponibilidad del selenio	22
3.6 Espectrofotometría de absorción atómica	23
4. PARTE EXPERIMENTAL	25
4.1 Reactivos	25
4.2 Estándares	25

4.3 Material	25
4.4. Equipo	26
4.5 Gases	26
4.6 Muestras biológicas	26
4.7 Producto administrado	27
4.8 Condiciones experimentales del estudio	28
4.8.1 Localización	28
4.8.2 Características de las unidades experimentales	29
4.9 Obtención de muestras	29
4.9.1 Tratamiento de muestras	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1 Curva de calibración	33
5.2 Concentración de selenio en sangre	36
5.3 Concentración de selenio en líquido ruminal	39
5.4 Área bajo la curva	42
6. CONCLUSIONES	47
7. REFERENCIAS	48
8. ANEXOS	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los diferentes tipos de Iodotironina desiodinasa y su localización en el organismo.	10
Tabla 2. Diversas enfermedades y condiciones presentes en animales con deficiencia de selenio.	12
Tabla 3. Vías de administración de medicamentos en animales.	14
Tabla 4. Formulación del bolo placebo.	27
Tabla 5. Formulación del bolo de selenato de bario.	27
Tabla 6. Condiciones de digestión ácida para sangre	30
Tabla 7. Condiciones de digestión ácida para líquido ruminal	31
Tabla 8. Datos de la curva de calibración.	32
Tabla 9. Resultados de la lectura por EAA de las soluciones de la curva de calibración.	33
Tabla 10. Parámetros estadísticos de la regresión lineal.	34
Tabla 11. Resultados para la prueba de linealidad para la curva de calibración utilizada	34
Tabla 12. Resultados promedio y su desviación estándar de la concentración de selenio en sangre del grupo control.	35
Tabla 13. Resultados promedio y su desviación estándar de la concentración de selenio en sangre del grupo tratado con bolos de selenato de bario.	36
Tabla 14. Resultados promedio y su desviación estándar de la concentración de selenio en líquido ruminal del grupo control.	38
Tabla 15. Resultados promedio y su desviación estándar de la concentración de selenio en líquido ruminal del grupo tratado con bolos de selenato de bario.	39
Tabla 16. Datos del área bajo la curva para ambos grupos en sangre.	41
Tabla 17. Parámetros farmacocinéticos promedio de ambos grupos.	41
Tabla 18. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 1 del grupo control.	51
Tabla 19. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 2 del grupo control.	52
Tabla 20. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 3 del grupo control.	53
Tabla 21. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 4 del grupo control.	54
Tabla 22. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 13 del grupo tratado.	55
Tabla 23. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 14 del grupo tratado.	56
Tabla 24. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 15 del grupo tratado.	57

Tabla 25. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 16 del grupo tratado.	58
Tabla 26. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 1 del grupo control.	59
Tabla 27. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 2 del grupo control.	60
Tabla 28. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 3 del grupo control.	60
Tabla 29. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 4 del grupo control	61
Tabla 30. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 13 del grupo tratado.	62
Tabla 31. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 14 del grupo tratado.	62
Tabla 32. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 15 del grupo tratado.	63
Tabla 33. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 16 del grupo tratado.	64

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de una subunidad de GSH-Px	8
Figura 2. Fotografía del equipo de espectrofotometría de absorción atómica.	24
Figura 3. Forma de administración de los bolos.	28
Figura 4. Fotografía de borregos de peligüey utilizado en el experimento	28
Figura 5. Fotografía de borregos de pelo cruza Peligüey utilizados para la toma de muestra de líquido ruminal.	29
Figura 6. Diagrama de flujo para el tratamiento de la muestra de sangre.	29
Figura 7. Diagrama de flujo para el tratamiento de la muestra de líquido ruminal.	30
Figura 8. Esquema del tratamiento de muestras.	31

INDÍCE DE GRAFICOS.

Grafico 1. Regresión lineal del sistema.	37
Grafico 2. Promedio de los niveles sanguíneos de selenio del grupo control y del grupo tratado con bolos de selenato de bario.	38
Grafico 3. Promedio de los niveles de líquido ruminal de selenio del grupo control y del grupo tratado con bolos de selenato de bario.	40
Grafico 4. Promedio de los niveles de selenio del grupo control y del grupo tratado con bolos de selenato de bario en sangre y líquido ruminal.	41
Grafico 5. Histograma de frecuencia para el ABC del grupo tratado y el control.	43
Grafico 6. Comparación de ABC del grupo tratado con bolos de BaSeO ₄ y con bolos placebo.	43
Grafico 7. Histograma de frecuencia para la C _{máx} del grupo tratado y del grupo control.	44
Grafico 8. Comparación de la C _{máx} del grupo tratado con bolos de BaSeO ₄ y con bolos placebo.	44
Grafico 9. Histograma de frecuencia para el T _{máx} del grupo tratado con bolos de BaSeO ₄ y bolos placebo.	45
Grafico 10. Comparación de la T _{máx} del grupo tratado con bolos de BaSeO ₄ y con bolos placebo.	45
Grafico 11. Resultados individuales de sangre del ovino 1 del grupo control.	53
Grafico 12. Resultados individuales de sangre del ovino 2 del grupo control.	54
Grafico 13. Resultados individuales de sangre del ovino 3 del grupo control.	55
Grafico 14. Resultados individuales de sangre del ovino 4 del grupo control.	56
Grafico 15. Resultados individuales de sangre del ovino 13 del grupo tratado.	57
Grafico 16. Resultados individuales de sangre del ovino 14 del grupo tratado.	58
Grafico 17. Resultados individuales de sangre del ovino 15 del grupo tratado.	59
Grafico 18. Resultados individuales de sangre del ovino 16 del grupo tratado.	60
Grafico 19. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 1 del grupo control.	61

Grafico 20. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 2 del grupo control.	62
Grafico 21. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 3 del grupo control.	63
Grafico 22. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 4 del grupo control.	63
Grafico 23. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 13 del grupo tratado.	64
Grafico 24. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 14 del grupo tratado.	65
Grafico 25. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 15 del grupo tratado.	65
Grafico 26. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 15 del grupo tratado.	66

1. OBJETIVOS.

Objetivo General:

Comparar el comportamiento de los perfiles de Selenio en sangre y en líquido ruminal en ovinos, después de la administración de bolos que contienen Selenato de Bario en su formulación, mediante la determinación de selenio total por espectrofotometría de absorción atómica.

Objetivos Particulares:

- ❖ Aprender a utilizar el Espectrofotómetro de Absorción Atómica con Generador de Hidruros y del Horno de Microondas para la cuantificación confiable de Selenio.
- ❖ Realizar el pretratamiento de las muestras de sangre y líquido ruminal de ovinos tratados con bolos de Selenato de Bario, para su posterior análisis.
- ❖ Analizar los perfiles de Selenio en sangre y líquido ruminal con el fin de comparar si el comportamiento entre dichos fluidos es diferente significativamente.
- ❖ Determinar los parámetros farmacocinéticos ($T_{m\acute{a}x}$, $C_{m\acute{a}x}$ y ABC) de Selenio en sangre de ovinos tratados con bolos de Selenato de Bario.

2. INTRODUCCIÓN

Se conocen quince microelementos esenciales para el crecimiento y la salud animal. De entre ellos, el cobalto (Co), cobre (Cu), zinc (Zn), selenio (Se), iodo (I), hierro (Fe), manganeso (Mn) y molibdeno (Mo) son considerados de relevancia agropecuaria. Específicamente en rumiantes, y en condiciones de pastoreo, las deficiencias más difundidas son las de Cu, Se, Co, I y Zn. ⁽¹⁾

El estudio de los micronutrientes (vitaminas y microelementos) es una disciplina nueva y está en pleno desarrollo. Los avances logrados indican que las funciones bioquímicas que desempeñan los micronutrientes en el metabolismo y en el sistema inmunitario son de significativa importancia por sus implicancias económicas en salud y producción animal. ⁽²⁾

El conocimiento de nuevas funciones biológicas del Se se produce a partir de 1973 con la identificación de la enzima glutatión peroxidasa (GSHP) como una selenoproteína, y la evidencia científica que los sitios catalíticos activos de la misma incluyen al Se, el cual es indispensable para su actividad biológica. ⁽³⁾

La función biológica del Se más antiguamente conocida es la asociada a vitamina E, con actividad antioxidante y antiinflamatoria, y las principales interrelaciones biológicas de este microelemento son con el azufre y con micronutrientes, tales como: Cu, Zn, vitaminas E y C. Algunas interrelaciones fueron descubiertas recientemente, entre las que la vitamina C promueve la absorción intestinal de Se e incrementa su incorporación en la GSHP, y que el Zn afecta la distribución tisular del Se. ⁽⁴⁾

La vitamina E y el Se son esenciales para proteger el organismo animal de daños causados por la producción de metabolitos nocivos o tóxicos. Estos dos micronutrientes son necesarios y responsables del mantenimiento e integridad

de paredes y membranas celulares en los tejidos. Los dos actúan juntos, la vitamina E con capacidad antioxidante previene la oxidación de ácidos grasos insaturados que produce peróxidos nocivos para las células, y si estos se forman actúa la GSHP catalizando su destrucción. El Cu y el Se protegen a los tejidos de daños oxidativos a través de sus respectivas metaloenzimas superóxidodismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GSHP).⁽⁵⁾

Por lo anterior ya que el selenio es de gran importancia en la nutrición animal, se desarrollo el presente trabajo, para poder evaluar la eficiencia de la suplementación del selenio por medio de bolos elaborados con selenato de bario, ya que la deficiencia de este elemento en los animales provoca muchas enfermedades, entre ellas músculo blanco, retención de placenta, infertilidad, entre otras, lo cual repercute en la industria de la producción animal de manera importante.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades Selenio.

La incorporación de los elementos traza es requerida en las dietas de todos los animales para el mantenimiento de la salud, crecimiento y un sin fin de funciones bioquímicas y fisiológicas. Entre estos elementos traza se encuentra el selenio. Selenio (del griego selénion, “resplandor de la luna”), de símbolo Se, es un elemento semimetálico, metaloide cuyo número atómico es 34. Se encuentra en el grupo 16 (o VIA) del sistema periódico, entre el azufre y el telurio y entre el arsénico y el bromo en el período 4 de la tabla periódica. El selenio fue descubierto en 1817 por el químico sueco Jöns Jakob Berzelius en el lodo recogido en el fondo de una cámara de plomo en una fábrica de ácido sulfúrico.⁽⁶⁾

El selenio existe en una forma reducida tetravalente, el ácido selenhídrico (H_2Se) es un ácido mas fuerte ($pK_a= 3.7$) que el ácido sulfhídrico (H_2S $pK_a=6.9$). El selenio en forma de compuestos de selenol ($R-SeH$) se disocia rápidamente a pH fisiológico lo que resulta importante para su actividad en las reacciones catalíticas. El selenio existe también en varios estados de oxidación y estos permiten la formación de varios compuestos orgánicos de selenio y aminoácidos.⁽¹⁾

Hasta hace algunos años el selenio era un elemento traza esencial y los nutricionistas a partir de allí iniciaron estudios extensivos para descubrir la función metabólica de este elemento y documentar las consecuencias de su deficiencia en alimento para animales y humanos.⁽⁷⁾

Este elemento y sus combinaciones son muy venenosas, el selenio elemental prácticamente no es tóxico y las trazas de éste son esenciales, sin embargo el ácido selenhídrico y otros compuestos son extremadamente tóxicos,

cuya acción fisiológica es muy semejante a la del arsénico. El selenio se encuentra en plantas, suelos y sus deficiencias pueden causar serios problemas en los animales.⁽⁸⁾

Es un elemento bastante escaso ya que su contenido en la corteza terrestre es de 0.09 ppm. Este elemento se encuentra en forma de selenuros, como selenuro de plata, cobre, hierro, mercurio y plomo, mezclados con los correspondientes sulfuros; el selenio esta presente en pasto en la forma de selenito férrico, selenato de calcio y selenio elemental.

El selenio puede estar presente en diferentes estados de oxidación: -2 Selenuros orgánicos e inorgánicos, 0 selenio elemental, +4 Selenito y +6 Selenato. El selenato presenta el estado de oxidación más alto del selenio, es la especie más soluble y es estable en agua, su formación se ve favorecida por condiciones alcalinas, es altamente tóxico, no se compleja y está disponible en suelos para las plantas.⁽⁹⁾

Los complejos de selenio orgánico y los aminoácidos que contienen selenio son considerados los más biodisponibles, cabe señalar que la biodisponibilidad del selenio a partir de la seleniometionina es mayor al 90 %. El selenio en las levaduras esta generalmente en forma de seleniometionina.⁽¹⁰⁾

La analogía química entre el azufre y el selenio es de gran importancia desde el punto de vista biológico, ya que el selenio puede remplazar al azufre en los aminoácidos, glucósidos, glutatión, tiamina y otros compuestos; un ejemplo de esta sustitución es la seleniometionina que es la principal forma de selenio encontrada en los alimentos.⁽¹¹⁾

Existe un microorganismo, en el rumen de los rumiantes el cual tiene la capacidad de incorporar selenito ⁻⁷⁵ [Se] dentro de los aminoácidos azufrados en lugar del azufre, además este microorganismo *Selenomonas ruminatum* tiene

la capacidad de transformar el selenito a selenio rojo elemental, el cual no puede ser utilizado por el rumiante.⁽⁴⁾

Se ha estimado que hay entre 50 y 100 diferentes selenoproteínas en el cuerpo humano incluyendo las que forman parte del músculo cardíaco, eritrocitos y espermatozoides.⁽¹²⁾ Se han caracterizado 14 selenoproteínas en mamíferos las cuales están asociadas a diferentes actividades bioquímicas y fisiológicas⁽¹³⁾:

- Glutación peroxidasa: citosólica, gastrointestinal, extracelular o plasmática e hidróperóxido fosfolípido.
- Selenoproteína P.
- Selenoproteína W.
- Iodotironina desiodinasa: Tipo I, II y III.
- Tioredoxina reductasa: Citosólica y mitocondrial.
- Selenofosfato sintetasa.

En los alimentos el selenio se encuentra presente de manera exclusiva en forma de compuestos orgánicos (fundamentalmente seleniometionina, selenocisteína y selenocistina), la cantidad que se consume de selenio está en función de la concentración y disponibilidad biológica del elemento en el suelo.⁽¹⁴⁾

3.1.1 Funciones biológicas del Selenio.

Las funciones biológicas del selenio incluyen defensa contra el daño oxidativo, regulación de hormonas tiroideas y regulación del estado redox de la vitamina C y otras moléculas.

3.1.1.1 Actividad antioxidante.

La oxidación durante el metabolismo normal celular lleva a la formación de radicales libres, como los que derivan del oxígeno molecular, produciendo más de una especie de radicales con diversas

reactividades; el radical hidroxilo es una de las especies más reactivas, los radicales libres dañan la estructuras celulares y en consecuencia interfieren en las actividades de las enzimas y otras macromoléculas. El daño en los lípidos de la membrana forma poros en ésta permitiendo que algunas sustancias como el calcio difundan hacia el medio intracelular.⁽¹⁵⁾

Las células animales y humanas han desarrollado ciertos mecanismos de defensa que les proporcione protección contra daño oxidativo inducido por los radicales libres. En este caso la concentración de selenio, repercute de manera significativa sobre la acción de la glutatión peroxidasa (GSH-Px), la cual es una enzima que contiene selenio y cataliza la degradación de peróxidos de hidrógeno y peróxidos lípidos, en esta enzima el selenio se encuentra en la forma de seleniocisteína.⁽⁷⁾

Esta contiene aproximadamente el 75% del Se sanguíneo, encontrándose en el interior de los eritrocitos a los que se incorpora sólo durante la eritropoyesis⁽¹⁶⁾. La determinación de esta enzima permite un adecuado diagnóstico del balance de Se en los animales.⁽¹⁷⁾

Cabe señalar que esta enzima esta presente en el organismo en dos formas principalmente:

- Hidroperóxido fosfolípido GSH- Px: el cual se encuentra involucrado en la membrana celular, con una actividad antioxidante.
- GSH-Px Citoplasmática: actividad antioxidante, presente en el citoplasma de las células. (Fig. 1)

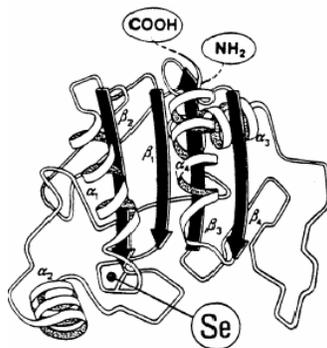


Figura 1. Esquema de una subunidad de GSH-Px

La función principal de la GSH-Px la ejerce en las reacciones celulares de oxidorreducción para protección celular contra daños oxidativos producidos por radicales libres y peróxidos o para evitar los daños oxidativos celulares(18)¹.

Esta selenoenzima está ampliamente distribuida en el organismo, y su función primordial en bovinos es en hígado, riñón, testículos, eritrocitos y plaquetas. Interviene en el metabolismo de prostaglandinas, glutatión, proteínas, así como en la espermatogénesis. Un déficit de Se produce depleción de la actividad de la GSH-Px en todos los sitios estratégicos funcionales del organismo. Así, la deficiencia de Se en toros conduce a una reducción en la producción de espermatozoides y modifica la morfología, motilidad y viabilidad de los espermatozoides generados. La deficiencia de Se es acompañada por cambios en la actividad de enzimas hepáticas seleno-dependientes y sustratos involucrados en el metabolismo y detoxificación de drogas, elementos (entre ellos, mercurio y arsénico) y compuestos extraños en el organismo. Mayor avance aún se produce a partir de la identificación de otras proteínas plasmáticas secretadas por el hígado que fueron denominadas como selenoproteína P y 5-deiodinasa seleno-dependiente, demostrándose que su acción es la de regular la conversión de tetraiodotironina a triiodotironina. La función metabólica específica del Se, reconocida como más importante, es la ejercida a través de su incorporación como selenocisteína en las selenoproteínas mencionadas⁽¹⁹⁾.

3.1.1.2. Sistema inmune.

La relación conocida entre el selenio y la respuesta inmune radica en la efectividad de las células fagocíticas para eliminar a los microorganismos patógenos (inmunidad no específica), niveles de IgG en el calostro (inmunidad humoral) y la función de las células T (inmunidad celular).⁽²⁰⁾

La deficiencia de selenio puede ser la responsable de alterar la respuesta inmune, reduciendo la capacidad de los animales para responder ante los desafíos antigénicos, por el efecto depresivo en la síntesis de anticuerpos neutralizantes.

Los niveles plasmáticos de los peróxidos se incrementan rápidamente cuando existe una deficiencia de selenio, lo cual causa daño en los endotelios capilares, eritrocitos y células plasmáticas modificando el estado de homeostasis celular, al dañar la integridad de la membrana celular, lo que se relaciona con la reducción de anticuerpos reflejando una inmunosupresión, por lo cual se reduce significativamente la respuesta inmune humoral y la función inmune no específica.⁽²¹⁾

La deficiencia de selenio repercute en una baja actividad de GSH-Px, y por ende una disminución en la concentración de inmunoglobulinas y así a una actividad fagocitaria disminuida y por lo tanto una mayor destrucción de los macrófagos.

3.1.1.3. Regulación hormonal.

La iodotironina desiodinasa es una selenoproteína que regula la conversión de tiroxina (T4) a la forma activa T3 o a T3 inversa, esta se encuentra en el organismo (Tabla 1) de 3 tipos ⁽²²⁾

Tabla 1. Clasificación de los diferentes tipos de Iodotironina desiodinasa y su localización en el organismo.

TIPO DE IODOTIRONINA DESIODINASA	LOCALIZACIÓN
Tipo I	Hígado, Riñon, Cerebro, Pituitaria Tejido adiposo café (rumiantes)
Tipo II	Cerebro, Pituitaria Tejido adiposo (humanos)
Tipo III	Cerebro, Piel y Placenta

La importancia del selenio en esta proteína radica en el metabolismo de las hormonas tiroideas, debido a que cuando se presenta una deficiencia en la concentraciones de selenio la estimulación de la hormona plasmática tiroidea (TSH) y los niveles de T4 se ven aumentados, mientras que los de T3 plasmático se ven disminuidos. Por lo anterior cuando la actividad de TSH se ve reducida el crecimiento de los animales deficientes de selenio es lento.⁽²³⁾

3.2 Enfermedades en mamíferos causadas por deficiencias de selenio.

La deficiencia de selenio en la dieta de los rumiantes se asocia principalmente a la degeneración y debilidad muscular. Ésta se presenta en bovinos cuando la cantidad del mineral es menor a 0.1 ppm en la ración. La distrofia muscular nutricional es una enfermedad metabólica que se presenta con mayor frecuencia en ganado ovino y bovino que principalmente se difunde principalmente en áreas donde los alimentos consumidos contienen entre 20 y 30 ppb.⁽²⁴⁾ En esta enfermedad suelen depositarse sales de calcio en las fibras musculares provocando así la degeneración en ciertas partes del cuerpo de los animales afectados, estas sales producen áreas blanquecinas en el músculo.

Los músculos esqueléticos de patas, espalda y el miocardio pueden ser afectados. Cuando los músculos esqueléticos son afectados, los animales jóvenes pueden presentar dificultad para caminar y pueden ser incapaces para levantarse y amamantarse. Cuando el corazón es afectado el animal puede morir súbitamente por fallo del corazón. Algunos animales muestran signos de agotamiento respiratorio y a veces son tratados por el propietario como si se tratara de neumonía, y no responden a tratamientos con antibióticos y su muerte puede ocurrir como resultado de acumulación de líquidos en los pulmones. Esta enfermedad es más común en recién nacidos los cuales empiezan a mostrar signos clínicos a partir del nacimiento 4 o 6 semanas de edad, en el caso de extrema deficiencia puede ocurrir un daño permanente y los animales recién nacidos no responderán a la administración de selenio, en este caso es necesario suplementar a las madres con cantidades adecuadas de selenio durante la gestación.⁽¹²⁾

Además la deficiencia de selenio reduce la respuesta inmune, interfiriendo con su capacidad para controlar infecciones y disminuye la resistencia a las enfermedades. Otra de las enfermedades más importantes es la placenta retenida, infertilidad, y ésta se presenta en vacas lecheras, disminución del crecimiento, enfermedades peridontales, dentales y de oídos.⁽⁴⁾

Generalmente los signos de deficiencias de selenio son más notables en la hembras y sus crías, lo cual se debe a las crecientes demandas para el crecimiento y la dependencia de la única fuente de alimento, la leche. Existen distintas condiciones que se presentan en diferentes animales como son: retención de placenta, mastitis, infertilidad, abortos, nacimiento de terneros prematuros, débiles o muertos, ovarios císticos, metritis, concepción retardada, período de celo errático, débil o silencioso. Generalmente las crías son las más susceptibles a las deficiencias de selenio, el contenido de selenio en la leche esta influenciado por la ingestión de alimentos que contienen este mineral traza.⁽²⁵⁾

Suplementos de selenito, selenato y de proteínas ricas en selenio han sido utilizadas exitosamente para corregir estas deficiencias (Tabla 2). Una dosificación de 5- 12 mg de materia seca /Kg de peso cubre los requerimientos del animal, lo cual provee un margen de seguridad en contra de las variaciones en la dieta.⁽²⁶⁾

Tabla 2. Diversas enfermedades y condiciones presentes en animales con deficiencia de selenio.

Enfermedad o condición.	Principales signos clínicos
Enfermedad del músculo blanco (Miodegeneración nutricional)	Rigidez del músculo esquelético y/o cardiaco afectado. Los signos varían de muerte súbita a debilidad crónica.
Retención placentaria	Placenta retenida.
Aborto	Pérdida del producto.
Debilidad neonatal	Los becerros o corderos nacen débiles.
Diarrea	Pérdida de peso en ganado joven y adulto.
Sistema inmune comprometido	Respuesta inmune suprimida a vacunas y a microorganismos ambientales.
Infertilidad	Disminución en la tasa de concepción, ciclos estrales irregulares y muerte embrionaria temprana.
Cáncer y enfermedad cardiovascular	Tumores
Enfermedad de Keshan	Aumento de tamaño del corazón, arritmia, modificaciones electrocardiográficas.
Enfermedades periodontales y de oídos.	Caries y dolor de oídos.

También provoca una disminución en la actividad sanguínea de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GSH-Px) la cual está relacionada con el normal funcionamiento del sistema inmunológico y del tracto reproductivo tanto en machos como en hembras.⁽²⁷⁾

Varios investigadores han sugerido que una concentración de selenio de al menos 100ng/ml de sangre completa esta asociada con una óptima respuesta inmune y fertilidad. La dosis letal mínima de selenio en forma de selenito de sodio es de 3.3 ppm para el caballo, 10 ppm para la vaca y 17 ppm para el cerdo y las dosis críticas son de 3-5 ppm en bovinos. Niveles muy altos de este elemento tienen probados efectos tóxicos para los animales.

Se admiten 3 formas de intoxicación por selenio:

- Aguda: la muerte puede ocurrir desde pocas horas a algunos días después, los síntomas son ataxia, fiebre, pulso rápido y débil, poliuria, cólico, letargo y falla respiratoria, entre otros.
- Subaguda: se desarrolla después de un período relativamente corto, las lesiones se caracterizan por degeneraciones crónicas en todos los órganos, principalmente en el bazo y en el hígado.
- Crónica: se caracteriza por pelo áspero, embotamiento, falta de vitalidad, crecimiento anormal y posterior pérdida de pezuas y cuernos. Se presenta atrofia del corazón y del hígado.

3.3 Métodos de suplementación.

La forma de dosificación consiste de un vehículo que contiene al activo, hecho al gusto del cliente, para un compuesto con características físicas y químicas específicas. Los animales son medicados con una variedad de formas de dosificación (Tabla 3).⁽²⁸⁾

Tabla 3. Vías de administración de medicamentos en animales.

Vía de administración		Forma de dosificación
ORAL	Boca Tubo estomacal Intraruminal	Bolos Tabletas Cápsulas Sales
INHALACIÓN	Nariz	Aerosoles
OFTÁLMICA	Directamente en ojos	Soluciones y ungüentos
PARENTERAL	Intravenosa Subcutánea Intramuscular Intraauricular Intraperitoneal	Soluciones Suspensiones
TÓPICA	Efecto dérmico local Efecto sistémico	Cremas Implantes Pastas Geles
RECTAL	Recto	Supositorios y cremas.
VAGINAL	Vagina	Supositorio, cremas y geles.
INTRAMAMARIA	Glándulas mamarias	Implantes

Las fuentes de suplementación de selenio actualmente en uso en los Estados Unidos son el selenito de sodio (Na_2SeO_3) y el selenato de sodio (Na_2SeO_4) con levadura orgánica aprobada para algunas especies.

La forma de selenato la cual es usada con menos frecuencia, ha sido considerada preferible, debido a que el selenito es reducido con mayor facilidad a selenio elemental, menos disponible que puede formar compuestos insolubles con otros metales, otras fuentes de selenio incluyen al selenito de calcio, dióxido de selenio y selenato de bario.

- Inyecciones de selenito de sodio en solución.
- Consumo de mezcla de sales minerales (como parte del alimento).
- Fertilizar forrajes con selenio.

- Bolos ruminales de selenio de liberación modificada.
- Selenio en solución oral
- Selenio en agua
- Premezclas para adicionar a alimentos concentrados
- Suplemento mineral a libre acceso.

Soluciones acuosas de selenio han sido exitosamente usadas en forma de toma periódicas orales o como inyecciones intramusculares o subcutáneas. Inyecciones subcutáneas directas, usualmente de selenito de sodio o la dosificación oral con este compuesto en dosis de 10 a 30 mg para el ganado bovino y de 1 a 5 mg para ovejas son medio comunes para prevenir las enfermedades por deficiencia en los animales.⁽²⁹⁾

Las inyecciones de selenato de bario han demostrado tener efecto de larga duración en rumiantes y en forma de bolo o de inyección subcutánea mantuvo los niveles de selenio en sangre por al menos 200 semanas en ovejas y sus corderos. Por lo anterior el uso de mezclas de sales con selenio parece ser el método más prometedor para la prevención de la deficiencia de este elemento.⁽³⁰⁾

El selenito y selenato de sodio son igualmente efectivos, pero el selenato es preferido por ser de toxicidad más baja y menos irritante. Las soluciones de selenato de sodio (1 mg de selenio/ ml) son más disponibles para uso inmediato.

3.4 Metabolismo de selenio.

Los mamíferos pueden utilizar selenio orgánico e inorgánico como fuentes nutricionales de selenio y el selenito es una forma inorgánica representativa.⁽³¹⁾ Estudios recientes revelan que el selenito y el selenato son metabolizados de manera diferente en sangre, el selenito es rápida y selectivamente capturado y

reducido, por lo que se transfiere al plasma en forma de selenuro y se une selectivamente a la albúmina y es tomado por el hígado⁽³²⁾.

Por otro lado el selenato es directamente tomado por el hígado. El selenato y el selenito son metabolizados de forma diferente en sangre una vez que son tomados por el hígado, parecen ser metabolizados de la misma manera por el hígado y en similar eficiencia. Cabe señalar que ambos compuestos de selenio parecen ser utilizados con similar eficiencia en forma de selenoproteínas o excretados en forma de metabolitos metilados por el hígado.⁽³³⁾

El selenato es tomado por el hígado y es utilizado para la síntesis de selenoproteínas o es excretado después de ser metilado o puede ser filtrado por el glomérulo y excretado directamente en la orina en forma de selenato. El selenato es utilizado con menor eficiencia, aproximadamente 0.25 comparada con selenito en sangre total en administración parenteral.

El selenio ingerido por los mamíferos es transformado a formas orgánicas ya sea en forma de residuos de selenocisteína (SeCys) en selenoproteínas a través de intermediario común selenuro, sin tener en cuenta el origen del selenio en la dieta o en forma de residuos de selenometionina (SeMet) en proteínas generales.⁽³⁴⁾

El selenio es un elemento que se absorbe rápidamente en el tracto intestinal. El principal sitio de absorción es entre el duodeno, yeyuno e ileon, no se absorbe en rumen o abomaso de las ovejas, ni en el estómago del cerdo. Se absorbe en forma relativamente eficaz ya sea de los nutrientes que contienen selenio natural o selenito inorgánico. Posiblemente en los rumiantes la absorción de selenio se efectúa como selenometionina y selenocisteína, lo cual se debe a que las bacterias ruminales son capaces de metabolizar el selenio inorgánico e incorporarlo a la proteína bacteriana.⁽³⁵⁾

La absorción del selenio es menor en rumiantes que en no rumiantes, debido a que existen diferentes factores que influyen en ésta, como la forma química del selenio, azufre, arsénico, metales, microorganismo, vitamina E y la ingesta previa de selenio.⁽⁵⁾

La cantidad absorbida de selenio depende de la forma química en la cual es ingerido el selenio. La diferencia de absorción es debida a la mayor pérdida del elemento ocasionada por los microorganismos del rumen, que convierte una porción del selenio en formas insolubles (selenio elemental y seleniuros) y otra porción la incorporan a sus proteínas para la formación de algunos selenoaminoácidos como seleniometionina y selenocistina.⁽³⁶⁾

Los productos ricos en seleniometionina tiene la ventaja de servir como reservorios de selenio, en comparación con las fuentes inorgánicas de selenio que son rápidamente eliminadas por el organismo de ahí que en el caso de selenio orgánico de levaduras, éste sea retenido más efectivamente en el músculo, leche y tejidos. Las reservas de selenio son necesarias para mantener los niveles adecuados de las selenoproteínas que estén involucradas en el metabolismo, la salud y la fertilidad.

Cuando el Selenio es absorbido es transportado principalmente por plasma además de que es incorporado a las células rojas sanguíneas, leucocitos, mioglobina, nucleoproteínas miosina y varias enzimas; posteriormente es reducido por glutatión y a continuación se une a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina, por lo que llega a formar parte de la porción proteica de muchos tejidos en donde es almacenado en forma de seleniometionina y selenocistina.

El selenio se encuentra en todas las células como selenoprotínas, en aminoácidos azufrados y ácidos aminocilnucleícos. El riñón contiene la mayor concentración de selenio, otros tejidos glandulares como el bazo y el páncreas

contienen altas concentraciones de selenio. Tejidos intestinales y el pulmón también pueden contener concentraciones relativamente altas. El músculo cardiaco contiene apreciablemente más que el músculo esquelético, el pelo y la lana pueden contener concentraciones relativamente altas y el tejido nervioso tiene bajas concentraciones.

El contenido de selenio en los tejidos no depende únicamente de la dieta sino también de su forma química. En general el selenio es depositado en tejidos en mayores concentraciones cuando se presenta en la dieta en forma orgánica que en la forma inorgánica.⁽³⁷⁾

El selenio tisular es relativamente lábil tal como se demuestra por su pérdida rápida de los tejidos de animales alimentados con dietas bajas en selenio, después de consumir dietas ricas en ese mineral, la eliminación o excreción de selenio se da a través de pulmones, heces y orina.

Cuando se excreta por pulmones es cuando las concentraciones de éste son tóxicas, y se elimina en forma de dimetilselenuro ($\text{Se}(\text{CH}_3)_2$).

El selenio excretado por heces en rumiantes, es insoluble, ya sea como selenio elemental o selenio reciclado en tracto gastrointestinal que no fue absorbido, resultando pequeñas cantidades disponibles para el consumo de las plantas

Se elimina por orina en animales monogástricos cuando se administra por vía oral o parenteral, y en rumiantes la mayor cantidad se excreta por heces y una pequeña cantidad por orina cuando es administrado por vía oral. La forma química de selenio que se excreta en la orina es el ion trimetilselenuro.⁽³⁸⁾

El selenio que se administra por vía oral se excreta por las heces en mayor cantidad con bajos niveles de consumo. A medida que aumenta el consumo, las

pérdidas fecales permanecen relativamente estables y el selenio respiratorio aumenta en forma constante; la pérdida urinaria aumenta con niveles moderados de complementación y luego desciende, también se excreta a través de bilis, del conducto pancreático y de las células mucosas intestinales. Se sabe que el arsénico reduce la absorción de selenio en el aparato digestivo, también aumenta la excreción de selenio biliar y urinario cuando se inyecta arsénico.⁽³⁹⁾

3.4.1 Ruta metabólica propuesta para Selenio.

La selenocisteína es sintetizada por un RNA_t específicamente cargado vía un selenofosfato rico en energía. La formación de un compuesto selenofosfato lábil está catalizada por una selenofosfato sintetasa, se conocen dos formas de la selenofosfato sintetasa en mamíferos: una de ella es una selenoproteína cuya actividad y expresión están directamente bajo control de la disponibilidad de selenio. La incorporación de la selenocisteína dentro de las proteínas esta catalizada por selenocisteína- RNA_t-sintetasa para apagar a los codones UGA, donde la selenocisteína- RNA_t^{ser(sec)} actúa como un supresor de RNA' s de transferencia.⁽²⁵⁾

Existen diversos factores que influyen en el metabolismo del selenio. Algunos de estos factores son: la forma química, microorganismos, vitamina E y la ingestión previa de selenio.

Los microorganismos del rumen probablemente son los responsables de la absorción de selenio en rumiantes. Un gran porcentaje de selenio inorgánico de la dieta es reducido a formas insolubles por estos microorganismos y una dieta elevada en carbohidratos favorece esta conversión más que una dieta alta en forrajes. Los microorganismos ruminales son capaces de incorporar dentro de sus células durante el crecimiento y también convierten el selenio a formas no disponibles como parte de un mecanismo de detoxificación.

La ingestión previa de selenio en células bacteriana es muy rápida y éste es enlazado a las proteínas bacterianas una hora después de su administración. La amplia variación del contenido de selenio en los microorganismos ruminales es inversamente proporcional a la ingestión previa de selenio por el animal. El riñón y el hígado son los indicadores más sensibles del estado de selenio en el animal, mientras que el selenio y la glutatión peroxidasa de la sangre son usados a menudo para propósitos de diagnóstico. Las concentraciones en plasma o suero reflejan más exactamente los niveles reales de la suplementación y son más sensibles a los cambios en la suplementación a diferencia de la concentración en sangre completa, la cual refleja la suplementación previa o histórica debido a que el selenio es incorporado dentro de los eritrocitos durante su formación.

Cabe señalar que dosis masivas de vitamina E aparentemente disminuyen la volatilización de selenio en ratas e incrementan la retención de selenio en el hígado, y la concentración de vitamina E en el animal afecta el estado de oxidación del selenio en los tejidos.

3.5 Biodisponibilidad.

La rapidez de liberación y absorción de un fármaco en sus diferentes formas farmacéuticas depende de diversos factores, los cuales son estudiados por la biofarmacia.

La biodisponibilidad es la característica biofarmacéutica de un medicamento administrado a un organismo vivo intacto, es la cantidad relativa de fármaco que llega a circulación sistémica y la velocidad a la cual ocurre, por lo cual no se puede estudiar *in Vitro*, por lo cual una administración intravascular tiene una biodisponibilidad total e instantánea.⁽⁴⁰⁾

Biodisponibilidad es el término utilizado para indicar la magnitud y la velocidad con la que el fármaco alcanza su sitio de acción o un fluido biológico desde el cual tiene acceso a su sitio de acción.⁽⁴¹⁾

La forma de evaluar la biodisponibilidad de un medicamento depende del tipo de fluido analizado, por lo que se busca una variable que se relacione linealmente con la cantidad que alcanza la circulación general y/o represente la cinética de disposición de manera correcta.⁽⁴²⁾

El perfil de biodisponibilidad de un medicamento corresponde al perfil cronológico de la presencia del principio activo en el organismo receptor estudiado, tal que puedan describirlo los niveles plasmáticos, es una función directa de la biodisponibilidad del medicamento y de la disposición del principio activo.⁽⁴⁰⁾

Se debe de considerar que la biodisponibilidad se evalúa de dos maneras: absoluta y relativa.

- Biodisponibilidad relativa: consiste en comparar 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.⁽⁴⁰⁾

$$BR = [ABCx / ABCstd] * [Dstd / Dx]$$

- Biodisponibilidad absoluta: se evalúa tras la suposición de que tras una administración intravenosa, toda la cantidad dosis entra al torrente sanguíneo, de esta manera el ABC de la administración intravenosa representa el área que se tiene que obtener tras administrar la misma dosis por otra vía.⁽⁴⁰⁾

$$BA = [ABCx / ABCiv] * [Div / Dx]$$

Los objetivos de los estudios de biodisponibilidad son principalmente:

- Obtener información para elegir una vía de administración.
- Determinar una forma farmacéutica adecuada.
- Elegir una formulación efectiva.
- Realizar control de calidad al medicamento.
- Establecer la bioequivalencia de los medicamentos.

3.5.1 Biodisponibilidad del selenio.

La biodisponibilidad del selenio, depende del método de suplementación utilizado, ya que como se menciono anteriormente existen diferentes formas de suplementación de selenio, pero de manera general se puede dividir en fuentes orgánicas e inorgánicas.

En la actualidad la suplementación se realiza con productos basados en selenitos o selenatos para prevenir su deficiencia, y así mismo se han empleado presentaciones orgánicas de selenio, las cuales incrementan la biodisponibilidad del elemento en los organismos en comparación con las presentaciones inorgánicas. ⁽⁴³⁾

En el caso específico de los rumiantes, se han realizado estudios comparativos entre diferentes métodos de suplementación, observándose mayor disponibilidad de selenio empleando selenato de bario por vía intramuscular, y a su vez mayos biodisponibilidad de selenio cuando éste es suministrado en forma orgánica por vía oral. ⁽⁴⁴⁾

La suplementación de selenio a través de sistemas de liberación lenta, como los bolos intrarruminales, ha sido empleada desde finales de los 60's. En la actualidad el uso de este tipo de dispositivos se emplea comúnmente, pero en la

gran mayoría utilizando fuentes inorgánicas de selenio. Los bolos intrarruminales tienen la ventaja de proporcionar cantidades de selenio por períodos más prolongados de tiempo que cuando se suplementa en forma parenteral, por lo que puede llegar a proporcionar mayor seguridad en la prevención de la deficiencia de selenio, además de que a través de los sistemas de liberación lenta se tiene la oportunidad de proporcionar varios nutrientes, antibióticos y antihelmínticos. Cuando se emplean dispositivos de liberación lenta se tiene la posibilidad de proveer de selenio al animal de una manera constante, y por lo tanto las concentraciones de selenio plasmático pueden llegar a ser un reflejo inmediato del efecto del dispositivo.⁽⁴⁵⁾

Cabe señalar que el selenio se presenta en plasma en una concentración menor a la mitad de la que esta contenida en los eritrocitos, pero los análisis que se realizan en plasma muestran de una manera más rápida las oscilaciones que se presentan cuando hay variaciones en la ingestión.

3.6 Espectrofotometría de Absorción Atómica.

La elección del método analítico depende principalmente del tipo de fluido biológico que se elija y del analito, en éste caso para la cuantificación de selenio se eligió la Espectrofotometría de Absorción Atómica con la técnica de generación de hidruros, debido a que es una técnica muy sensible y específica, capaz de analizar cualitativamente y cuantitativamente metales, desde trazas hasta altos porcentajes, siendo la más empleada para estas determinaciones.⁽⁴⁶⁾

El principio de la técnica de EAA es que los átomos en estado basal fundamentalmente son capaces de absorber energía a longitudes de onda específicas, por lo que la cantidad de energía que absorben es proporcional a la cantidad de analito en la muestra. En ésta existen diferentes mecanismos de atomización como son: flama, sistema de mercurio por vapor frío, horno de grafito y generación de hidruros.⁽⁴⁴⁾

El sistema de generación de hidruros fue el que se utilizó en dicho proyecto, en éste se produce en las muestras una reacción en un sistema externo con un agente reductor usualmente boro hidruro de sodio. Los productos de reacción gaseosa acarrearán la muestra a la celda en la trayectoria de la luz del EAA. Dicha reacción no produce átomos libres pero sí hidruros volátiles. Esta especie molecular no es capaz de causar absorción atómica. Para disociar el gas hidruro en átomos libres, la muestra en la celda debe ser calentada. En algunos sistemas de hidruros en la absorción la celda es montada sobre el horno del espectrofotómetro y la celda es calentada por una flama de aire-acetileno (como en el caso del presente proyecto) y en otros casos la celda es calentada eléctricamente.⁽⁴⁴⁾



Figura 2. Fotografía del equipo de espectrofotometría de absorción atómica.

En cualquiera de los casos el gas hidruro es disociado en la celda caliente a átomos libres y la aplicación de energía da como resultado la excitación de los átomos provocando el desprendimiento de energía de los átomos y finaliza con el decaimiento de éstos y el átomo regresa a su estado basal.

Esta técnica es ampliamente utilizada para determinar selenio en diferentes tipos de muestras, como son fluidos biológicos, tejidos, alimento, etc. En el generador de hidruros, el borohidruro de sodio (NaBH_4) es utilizado como agente reductor para reaccionar con $\text{Se}^{6(\text{VI})}$ y obtener una especie de hidruro de selenio (H_2Se).⁽⁴⁷⁾

4. PARTE EXPERIMENTAL.

4.1 Reactivos.

- Ácido clorhídrico R.A. 36.5- 38% de pureza J. T. Baker de México.
- Ácido nítrico R. A. 65.4% de pureza J. T. Baker de México.
- Peróxido de hidrógeno en solución al 30% J. T. Baker de México.
- Hidróxido de Sodio perlas 98.4% de pureza, bajo en carbohidratos J. T. Baker de México.
- Borhidruro de sodio 99% de pureza, Aldrich Alemania.
- Agua desionizada 18.2 Ω cm Millipore.

4.2 Estándares.

- Estándar de selenio High-Purity 1000 \pm 3 μ g/ml en 2% de ácido clorhídrico con 99.999% de pureza.

4.3 Material.

- Vasos de teflón para horno de microondas HP-500 Plus CEM temperota máxima 200°C y presión máxima 350 psi.
- Tapas de teflón para vasos HP-500 Plus CEM.
- Discos para los vasos HP-500 Plus CEM.
- Membranas de seguridad para los vasos HP-500 Plus CEM.
- Tapones de teflón de seguridad, de color azul y blanco para vasos HP-500 Plus CEM.
- Thermowell de zafiro para sensor de temperatura.
- Sensor de temperatura de fibra óptica CEM modelo RTP-300 Plus rango - 40 a 250°C.
- Micropipeta finnpipette Labsystems capacidad de 1-5 ml.
- Micropipeta finnpipette Labsystems capacidad de 100-1000 μ L.
- Micropipeta finnpipette Labsystems capacidad de 20-200 μ L.
- Micropipeta finnpipette Labsystems capacidad de 5-50 μ L.

- Matraz volumétrico de 100 mL BLAU BRAND Alemania.
- Matraz volumétrico de 25 ml Kimax de México, tipo A.
- Vasos de precipitado de 150 ml Kimax de México.
- Vasos de precipitado de 100 ml Kimax de México.
- Probeta de 1L IVA Argentina Vidrio borosilicato.
- Probeta de 10 ml Kimax de México.
- Puntas azules y amarillas para micropipeta.
- Lámparas de cátodo hueco de selenio HC Lamp- Se (Varian Australia).
- Celda de cuarzo VGA-76 (Varian Australia)
- Papel parafilm
- Agujas vacutainer 21G x 38 mm Becton Dickinson, Cat. No. 367223.
- Tubos vacutainer de 5 mL con EDTA K₃ al 15%. Becton Dickinson.
- Frascos de PVC de 50 mL.

4.4 Equipos.

- Balanza analítica BOECO. Límites de peso 0.01g – 120 g.
- Horno de microondas Mars 5 CEM Corporation Falcon USA.
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica, Software SpectraAA-800. Varian Australia.
- Generador de hidruros VG 77 Varian Australia.

4.5 Gases.

- Acetileno 99.5% de pureza AGA de México.
- Nitrógeno 99.5 % de pureza AGA de México.
- Aire comprimido.

4.6 Muestras biológicas.

- Sangre de borregos pelo cruzado Peligüey
- Líquido intrarruminal de borregos de pelo cruzado Peligüey.

4.7 Producto administrado.

- Bolos placebo

Tabla 4. Formulación del bolo placebo.

INGREDIENTES	Peso (g)	%
Fuente de Selenio	0	0
Densificador	5.7	39.77
Carragenina	1.5	10.47
Methocel 15M	1.5	10.47
Diluyente	5.331	37.20
Lubricante	0.300	2.09
Total	13.331	100

- Bolos de Selenato de Bario.

Tabla 5. Formulación del bolo de selenato de bario.

INGREDIENTES	Peso (g)	%
Fuente de Selenio (Selenato de Bario)	1.326	8.47
Densificador	5.7	36.41
Carragenina	1.5	9.58
Methocel 15M	1.5	9.58
Diluyente	5.331	34.05
Lubricante	0.300	2.09
Total	15.6570	100

- Forma de administración del bolo.

Los bolos de selenato de bario y placebo fueron introducidos en una malla plástica como se muestra en la figura 3 para que si se llegaba a presentar una intoxicación por selenio selenio los bolos fueran identificados y retirados rápidamente.

Administrándose a través de una cánula introducida previamente en el rumen de los borregos.



Figura 3. Forma de administración de los bolos.

4.8 Condiciones experimentales del estudio.

4.8.1 Localización

Las 8 unidades experimentales se alojaron en las instalaciones de la unidad metabólica del Colegio de Postgraduados de Chapingo, ubicada en Montecillos, Texcoco, Estado de México.

4.8.2 Características de las unidades experimentales.

Para el experimento se utilizaron animales de pelo cruce peligüey, machos con un peso inicial promedio de 30.5 Kg.



Figura 4. Fotografía de borregos de pelo cruza peligüey utilizado en el experimento

Los animales se encontraban aislados de manera individual, se alimentaban de manera restringida 2 veces al día, a las 6 y 15 hrs, el alimento proporcionado fue de 600g por cada comida, para obtener aproximadamente un consumo de alimento diario de 1.2 Kg por animal.

El alimento administrado fue elaborado con heno del alfalfa, maíz quebrado, pasta de soya y sales minerales, que no contenían selenio.

4.9 Obtención de las muestras.

- ❖ Las muestras de sangre de cada animal se obtuvieron por punción yugular en tubos vacutainer de 5 mL con EDTA K₃ al 15%. Becton Dickinson diariamente, durante 21 días seguidos.
- ❖ El líquido ruminal se obtuvo cuatro horas después de proporcionado el alimento. La muestra era tomada por la cánula localizada en el rumen, se extraían aproximadamente 20 ml por succión, los cuales eran mezclados con ácido metafosfórico, para neutralizar la actividad de los microorganismos en el líquido ruminal obtenido.



Figura 5. Fotografía de borregos de pelo cruza Peligüey utilizado para la toma de muestra de líquido ruminal.

4.9.1 Tratamiento de las muestras.

❖ SANGRE

• Digestión ácida en horno de microondas.

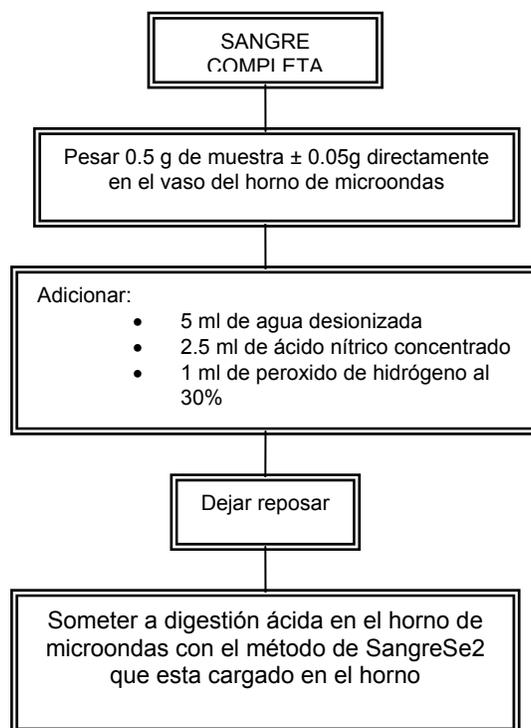


Figura 6. Diagrama de flujo para el tratamiento de la muestra de sangre.⁽⁴⁸⁾

Condiciones del método.

Tabla 6. Condiciones de digestión ácida para sangre.⁽⁴⁸⁾

Etapa	Potencia (W)	Potencia %	Rampa (min)	Presión	Temperatura (°C)	Tiempo de mantenimiento
1	1200	100	4	350	140	2 min
2	1200	100	2	350	180	4 min
3	1200	100	2	350	200	4 min

❖ LÍQUIDO RUMINAL.

• Digestión ácida en microondas.

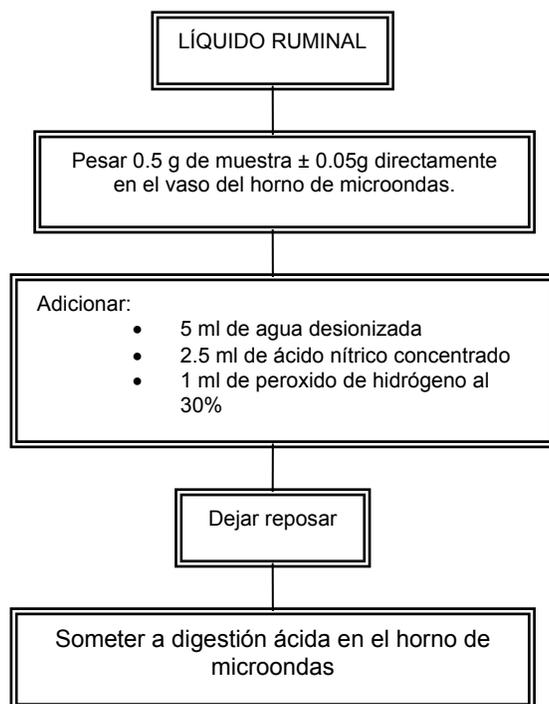


Figura 7. Diagrama de flujo para el tratamiento de la muestra de líquido ruminal.⁽⁴⁹⁾

• Condiciones del método.

Tabla 7. Condiciones de digestión ácida para líquido ruminal.⁽⁴⁹⁾

Etapa	Potencia (W)	Potencia %	Rampa (min)	Presión	Temperatura (°C)	Tiempo de mantenimiento
1	1200	100	5	350	120	2 min
2	1200	100	5	350	170	5 min

Una vez terminado el proceso de digestión ácida en el horno de microondas:

- Dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente.

- Las muestras digeridas se vierten en matraces de 25 ml, enjuagando 3 veces los vasos con ácido clorhídrico 7 M.
- Llevar a la marca de aforo, con ácido clorhídrico 7 M.
- Trasvasar los matraces en frascos de pvc, previamente etiquetados.
- Las muestras pueden ser analizadas por EAA ese mismo día o hasta 2 días después.

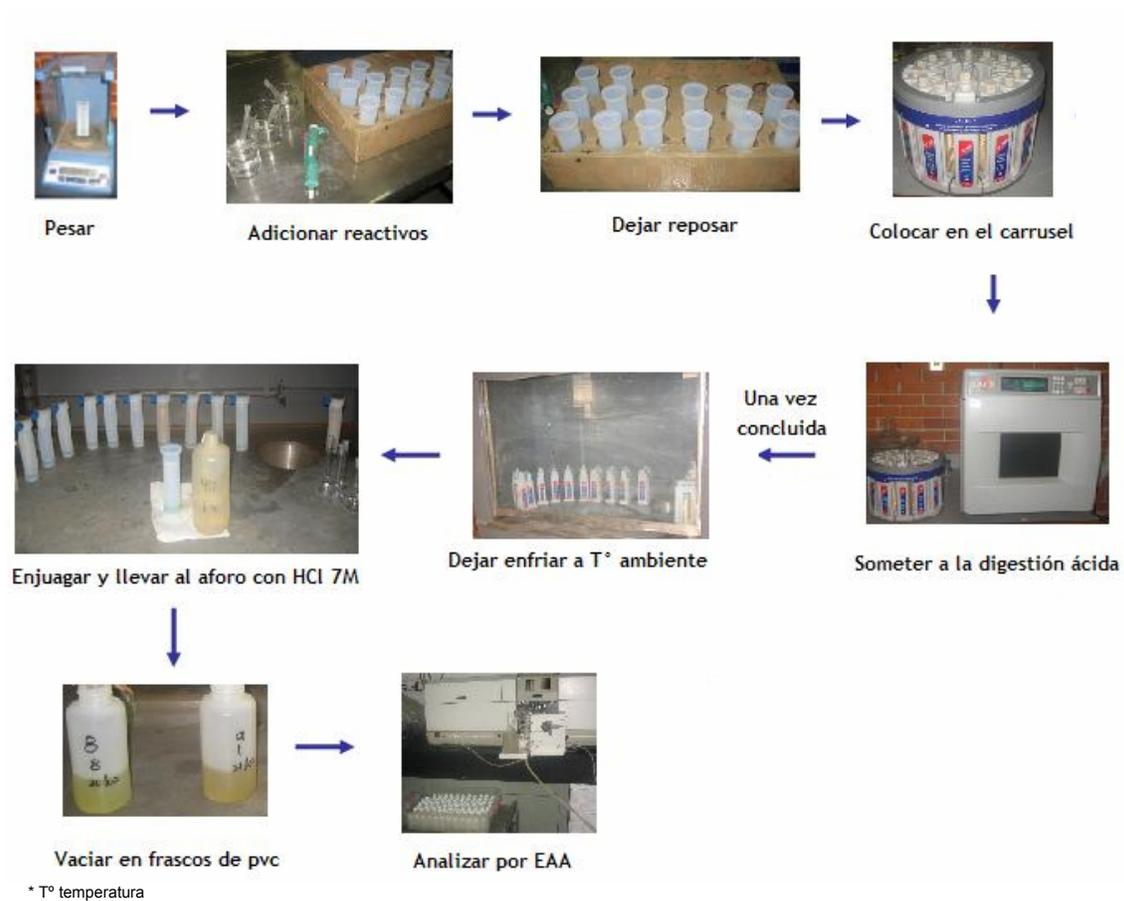


Figura 8. Esquema del tratamiento de muestras.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Linealidad del sistema

La cuantificación de selenio en sangre y líquido ruminal se realizó mediante una curva de calibración de selenio.

La curva de calibración ya había sido elaborada previamente, en un rango de concentración de 0 a 18 $\mu\text{g/L}$ de Selenio, la cual fue preparada de la siguiente manera:

- a) Del estándar de Selenio High-Purity de 1000 $\mu\text{g/mL}$ se tomaron 50 μL con una micropipeta.
- b) El volumen tomado se vació en un matraz volumétrico de 25 mL llevándose a la marca de aforo con agua desionizada. (Solución stock)
- c) De la solución anterior se tomaron los volúmenes que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 8. Datos de la curva de calibración.

SISTEMA	CONC. ($\mu\text{g/L}$)	VOLUMEN (μL)
1	2	50
2	6	150
3	10	250
4	14	350
5	18	450

- d) Los volúmenes se colocaron en matraces de 50 mL y se llevaron a la marca de aforo con ácido clorhídrico 7M.
- e) Las soluciones anteriores se analizaron por EAA con el sistema de atomización de generador de hidruros.

Los datos obtenidos para la curva de calibración son los siguientes:

Tabla 9. Resultados de la lectura por EAA de las soluciones de la curva de calibración.

Sistema	Concentración (µg/L)	Abs	SCE(i)
1	2	0.0277	9.62667x 10 ⁻⁶
1	2	0.0319	
1	2	0.0309	
2	6	0.1127	2.05867 x 10 ⁻⁵
2	6	0.1163	
2	6	0.1191	
3	10	0.203	1.16267 x 10 ⁻⁵
3	10	0.2058	
3	10	0.2078	
4	14	0.29	1.248 x 10 ⁻⁵
4	14	0.2936	
4	14	0.2948	
5	18	0.3711	1.502 x 10 ⁻⁵
5	18	0.3752	
5	18	0.3763	
ERROR PURO			6.934 x 10 ⁻⁵

* SCE(i) Suma de Cuadrados

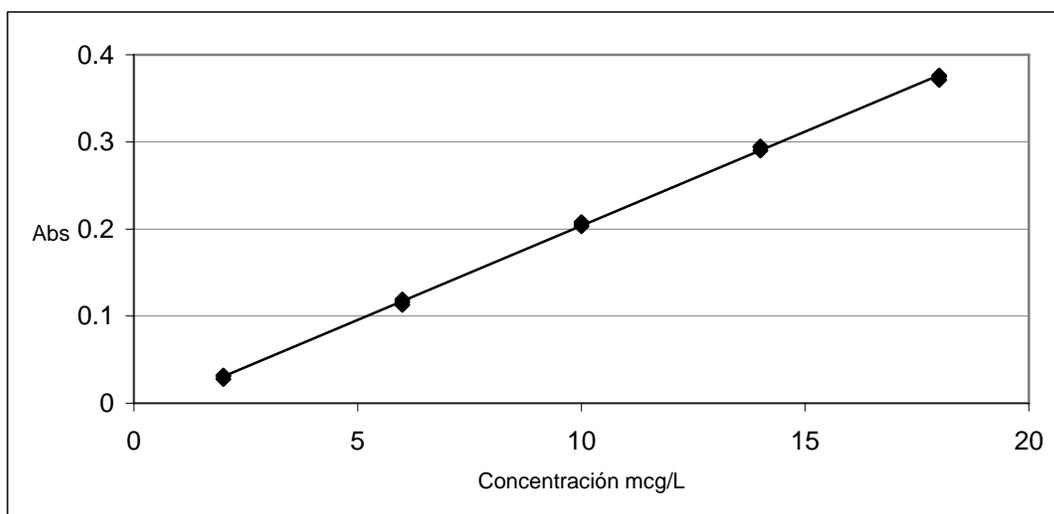


Gráfico 1. Curva de calibración de la absorbancia de selenio en función de la concentración de estándares en soluciones acuosas.

Los parámetros obtenidos en la regresión se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 10. Parámetros estadísticos de la regresión lineal.

PARAMETRO	VALOR
Pendiente (m)	0.0216
Intercepto (b)	-0.0125
Coefficiente de correlación (r)	0.9995
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9990

De acuerdo a los datos anteriores observamos que el coeficiente de determinación explica el 99.90% de la variación en la absorbancia, por los cambios en la concentración de selenio y que el valor del coeficiente de correlación implica una fuerte relación entre la concentración y la absorbancia del selenio.

Tabla 11. Resultados para la prueba de linealidad para la curva de calibración utilizada

Número de niveles del estandar = 5					
Fuente de variación	SCE	gl	CM	F	Valores críticos de $F_{\alpha=0.05}$
Regresión	0.224	1	0.224	32359.534	4.965
Error del modelo	5.4×10^{-5}	3	1.8×10^{-5}	2.596	3.708
Error puro	6.9×10^{-5}	10	6.9×10^{-6}		
Total	0.225	14			

SCE Suma de cuadrados de las desviaciones
gl Grados de libertad
CM Cuadrados Medios

En la tabla 11 se muestra el análisis de varianza que permitió evaluar si los datos de la curva de calibración utilizada se ajustan a una línea recta, por lo tanto sirve para evaluar la linealidad de la curva de calibración. El valor de F correspondiente a la regresión, es mucho mayor que el valor de referencia de la F con una probabilidad de 95% o un nivel de significancia del 5% lo cual indica que los datos se ajustan a una línea recta y por lo tanto la curva de calibración utilizada tiene un comportamiento lineal.

5.2 Concentraciones de selenio en sangre.

En la tabla 12 se muestran los niveles sanguíneos de selenio en el grupo control, así como los días de toma de muestra y las desviaciones estándar de los datos.

Tabla 12. Resultados promedio y su desviación estándar de la concentración de selenio en sangre del grupo control. (n= 4 ± S.D.)

Día de muestreo	Concentración µgSe / g mta	Desviación estándar
0	0.1385	0.0236
1	0.1413	0.0103
2	0.1343	0.0178
3	0.1338	0.0156
4	0.1108	0.0071
5	0.1471	0.0240
6	0.1288	0.0079
7	0.1460	0.0037
8	0.1537	0.0118
9	0.1488	0.0064
10	0.1400	0.0078
11	0.1524	0.0141
12	0.1369	0.0040
13	0.1764	0.0052
14	0.1930	0.0038
15	0.1740	0.0182
16	0.1768	0.0120
17	0.1617	0.0071
18	0.0719	0.0047
19	0.0579	0.0087
20	0.1246	0.0103

En la tabla 13 se muestran los niveles sanguíneos de selenio en el grupo tratado con bolos de selenato de bario, así como los días de toma de muestra y las desviaciones estándar de los datos.

Tabla 13. Resultados promedio y su desviación estándar de la concentración de selenio en sangre del grupo tratado con bolos de selenato de bario. (n= 4 ± S.D.)

Día de muestreo	Concentración $\mu\text{gSe} / \text{g mta}$	Desviación estándar
0	0.1218	0.0139
1	0.4735	0.1242
2	0.4502	0.0957
3	0.3594	0.0806
4	0.4239	0.0969
5	0.3692	0.0964
6	0.4356	0.1276
7	0.4130	0.1315
8	0.3906	0.1166
9	0.3355	0.0937
10	0.3251	0.0635
11	0.3138	0.0491
12	0.2914	0.0434
13	0.3390	0.0522
14	0.2898	0.0633
15	0.3068	0.0562
16	0.2861	0.0565
17	0.2813	0.0859
18	0.1366	0.1051
19	0.2306	0.0509
20	0.1636	0.1165

En la gráfica 2 se muestra la concentración sanguínea de selenio en el grupo control y el grupo tratado con bolos de selenato de bario, en donde se puede observar un incremento considerable de los niveles de selenio en sangre del grupo tratado con bolos de selenato de bario.

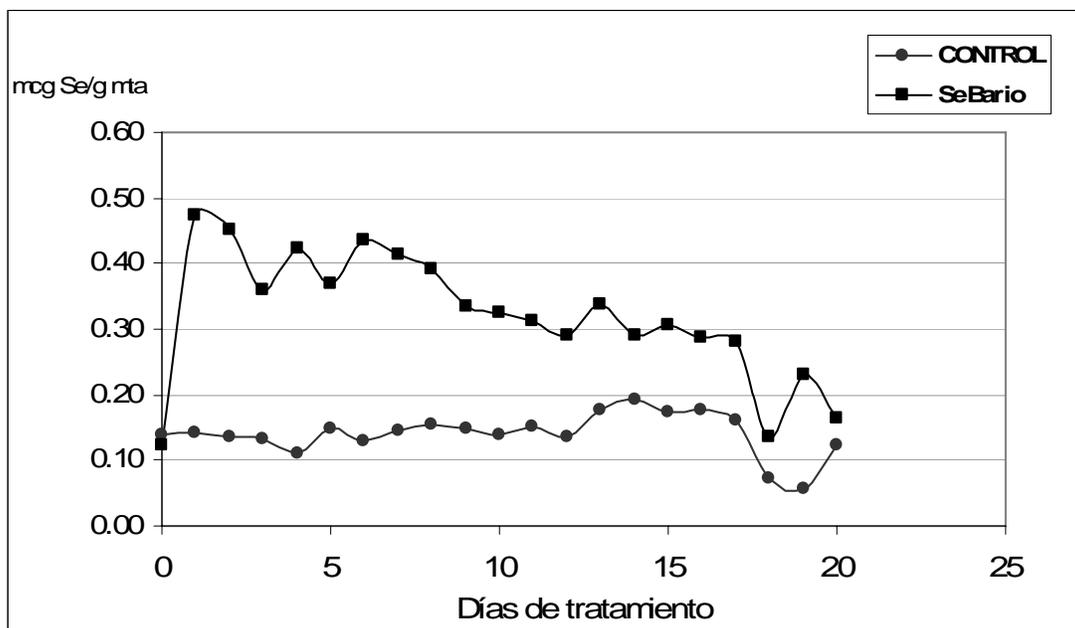


Gráfico 2. Promedio de los niveles sanguíneos de selenio del grupo control y del grupo tratado con bolos de selenato de bario.

Cabe señalar que se presentaron problemas en la administración de los bolos, ya que la matriz de los bolos estaba diseñada para que fuera bioadhesiva, y al ser introducida en la malla plástica no pudo desempeñar dicha función y por lo tanto su degradación fue más rápida de lo esperado.

Debido a lo antes mencionado los bolos fueron retirados 48 hrs después de su administración, porque los animales presentaron signos de intoxicación con selenio: dejaron de consumir alimento y 15 días después les crecieron las pezuñas.

Cuando fueron retirados los bolos, ya se habían desintegrado aproximadamente en un 80% de su peso, a pesar de que los bolos fueron retirados se siguió con el muestreo para determinar el impacto de dicha administración.

5.3 Concentraciones de Selenio en líquido ruminal.

Tabla 14. Resultados promedio y su desviación estándar de la concentración de selenio en líquido ruminal del grupo control. (n= 2 ± S.D.)

Día de muestreo	Concentración $\mu\text{gSe} / \text{g mta}$	Desviación estándar
0	.0255	0.0013
1	.1271	0.0621
2	.0436	0.0125
3	.0295	0.0009
4	.0579	0.0120
5	.0591	0.0227
7	.0655	0.0188
8	.0500	0.0310
9	.0731	0.0407
10	.1286	0.0407
11	.1109	0.0020
12	.1348	0.0360
13	.1583	0.0030
14	.0396	0.0384
15	.0836	0.0370
16	.0807	0.0188

Tabla 15. Resultados promedio y su desviación estándar de la concentración de selenio en líquido ruminal del grupo tratado con bolos de selenato de bario. (n= 2 ± S.D.)

Día de muestreo	Concentración $\mu\text{gSe} / \text{g mta}$	Desviación estándar
0	0.2146	0.0291
1	0.2862	0.1058
2	0.1660	0.0022
3	0.1790	0.1116
4	0.1114	0.0744
5	0.1337	0.1280
7	0.2808	0.0000
8	0.5633	0.4485
9	0.1721	0.0605
10	0.5613	0.5606
11	0.1944	0.0000
12	0.3906	0.4196
13	0.0284	0.0000
14	0.0848	0.0534
15	0.4955	0.5897
16	0.0597	0.0000
17	0.2038	0.2646

En las tablas 14 y 15 se muestran las concentraciones de selenio en el grupo control y en el grupo tratado con bolos de selenato de bario respectivamente, así como los días de toma de muestra y las desviaciones estándar de los datos.

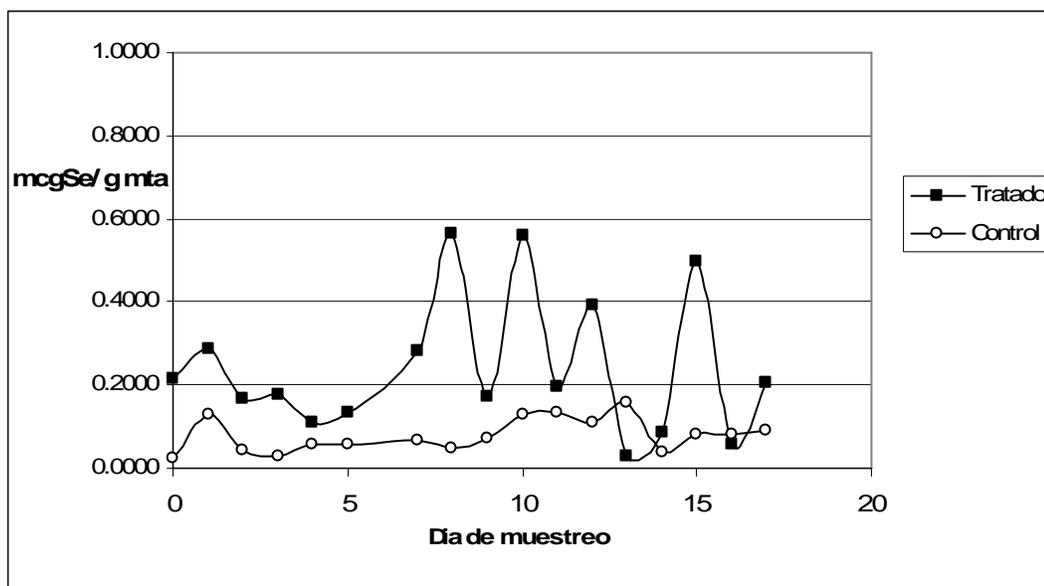


Grafico 3. Promedio de los niveles de líquido ruminal de selenio del grupo control y del grupo tratado con bolos de selenato de bario.

En el grafico 3 se puede observar que en líquido ruminal hay un incremento considerable de los niveles de selenio en el grupo tratado con bolos de selenato de bario con respecto al grupo control al que se le administró el bolo placebo.

A pesar de que los niveles de selenio se elevaron considerablemente después de la administración de los bolos con respecto a los niveles de selenio del grupo control, las máximas concentraciones se obtienen los días 8 y 10, lo cual se atribuye a que el muestreo de líquido ruminal fue alternado y los animales muestreados por día fueron 2.

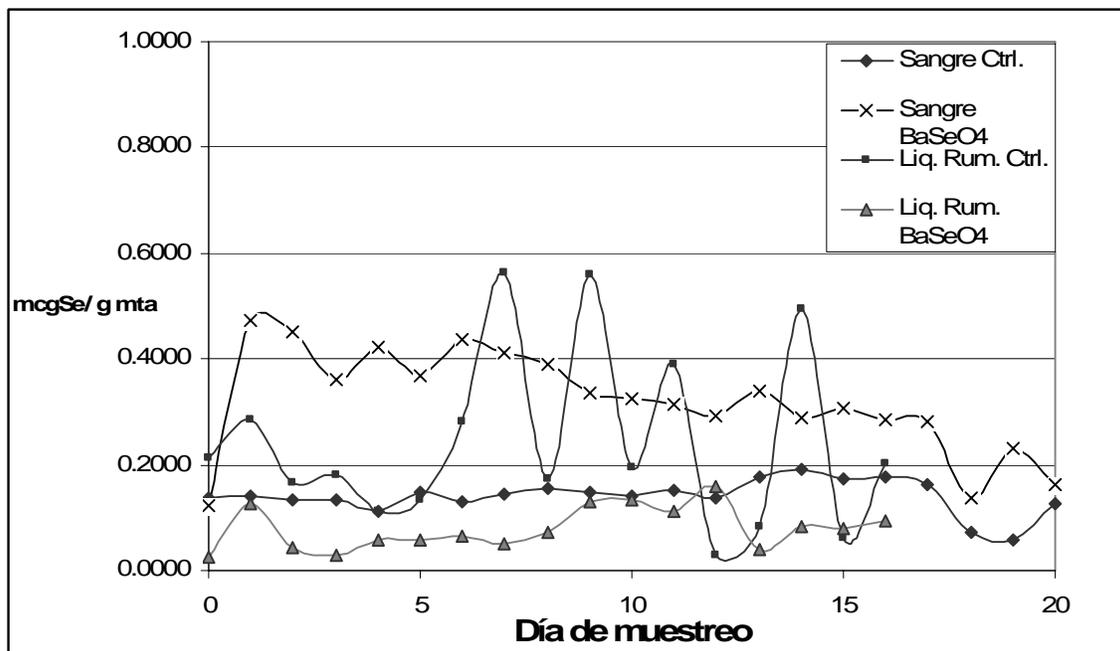


Gráfico 4. Promedio de los niveles de selenio del grupo control y del grupo tratado con bolos de selenato de bario en sangre y en líquido ruminal.

En el gráfico 4 podemos observar que los niveles de selenio son más elevados en los grupos tratados con selenato de bario con respecto a los del grupo control en ambos fluidos. Los niveles de selenio en sangre presentan una tendencia esperada, ya que los niveles se incrementaron a partir del primer día de la administración del bolo y a pesar de que los bolos fueron retirados, la administración de éstos impactó significativamente en los niveles de selenio en sangre, ya que durante los 20 días de muestreo estos se mantuvieron con valores mayores a los del grupo control.

Los niveles en líquido ruminal se elevaron a partir del día 0 y los niveles más elevados de selenio en líquido ruminal se presentaron en el día 8 y 10. Cabe señalar que en líquido ruminal no se presenta una tendencia clara en los niveles de selenio, pero fueron mayores los valores obtenidos para el grupo tratado con bolos de selenato de bario con respecto a los obtenidos para el grupo control.

5.4 Área Bajo la Curva.

Se analizaron los niveles plasmáticos de ambos grupos obteniendo los siguientes resultados promedio de los valores de ABC, tanto para el grupo control y el grupo tratado.

Tabla 16. Datos del área bajo la curva para ambos grupos en sangre.

Grupo Control	ABC (µg min)/ml	Grupo Tratado	ABC (µg min)/ml
OVINO 1	2.8448	OVINO 13	6.0736
OVINO 2	2.8615	OVINO 14	7.4579
OVINO 3	2.8889	OVINO 15	5.2115
OVINO 4	2.6718	OVINO 16	7.6337
PROMEDIO	2.8168	PROMEDIO	6.5942

Tabla 17. Parámetros farmacocinéticos promedio de ambos grupos.

Parámetro farmacocinético	Abreviatura	Grupo control	Grupo tratado
Concentración máxima	C_{max} (µg Se/ g mta)	0.1932	0.5487
Tiempo maximo	T_{max} (Días)	14	1
Área bajo la curva	ABC (µg min)/ml	2.8168	6.5942

En la tabla 17 se muestran los resultados de los parámetros farmacocinéticos en sangre, podemos observar que en sangre los datos concuerdan con lo que se esperaba, debido a los problemas que se presentaron en la formulación y la concentración más alta se presenta en el primer día.

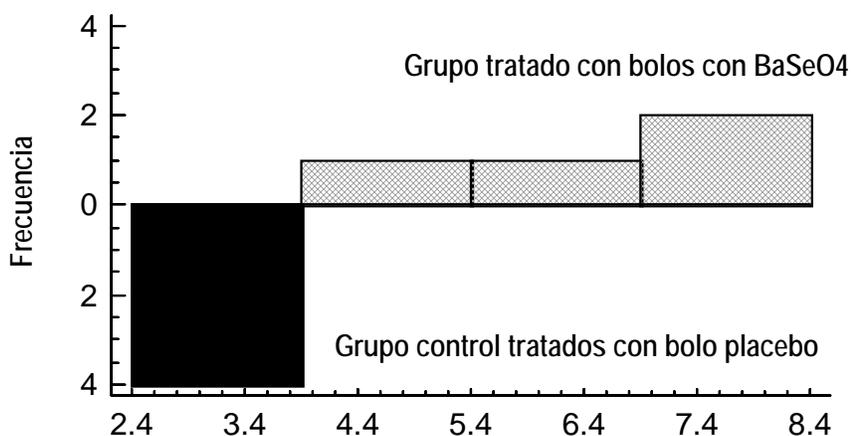


Grafico 5. Histograma de frecuencia para el ABC del grupo tratado y el control.

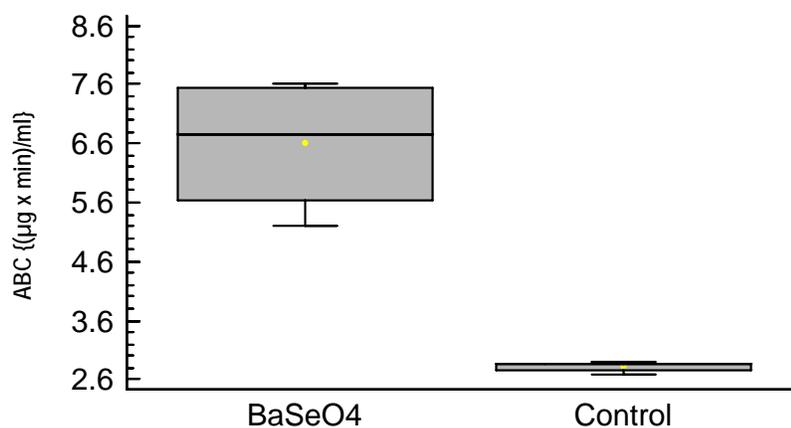


Grafico 6. Comparación de ABC del grupo tratado con bolos de BaSeO4 y con bolos placebo.

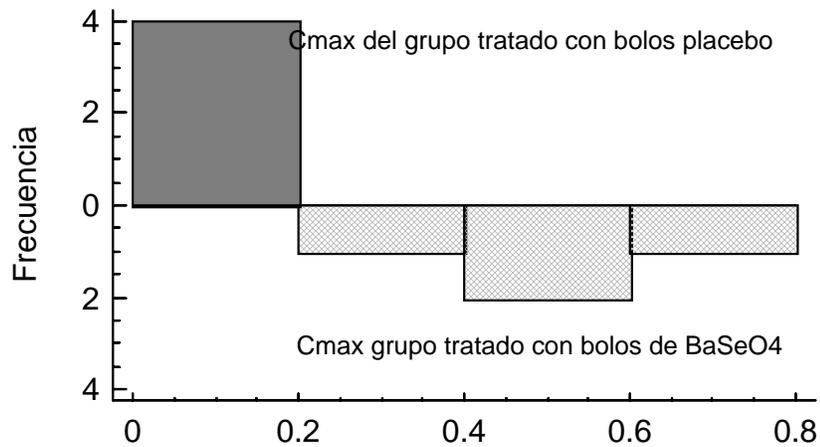


Grafico 7. Histograma de frecuencia para la C_{max} del grupo tratado y del grupo control.

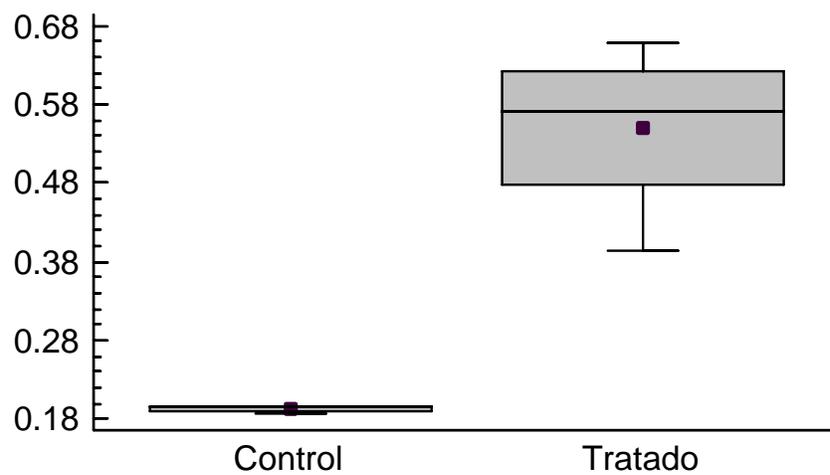


Grafico 8. Comparación de la C_{max} del grupo tratado con bolos de BaSeO4 y con bolos placebo.

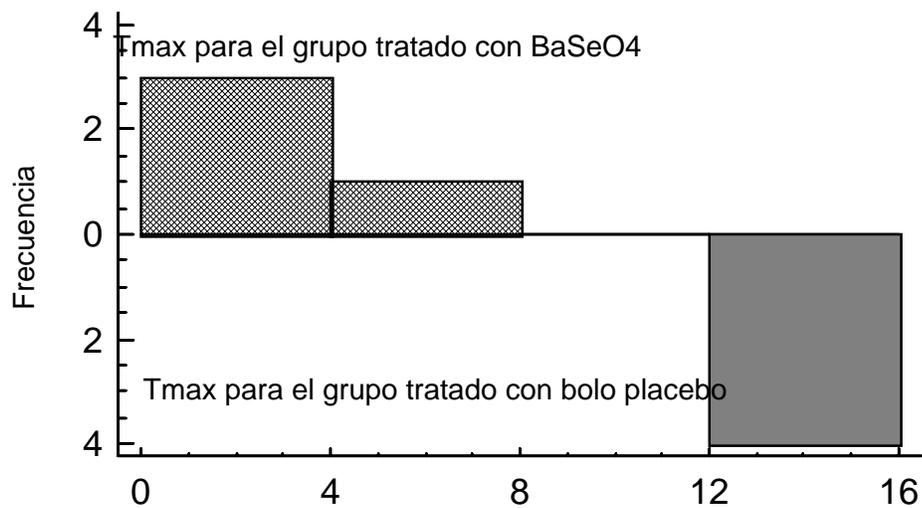


Gráfico 9. Histograma de frecuencia para el $T_{m\grave{a}x}$ del grupo tratado con bolos de BaSeO₄ y bolos placebo.

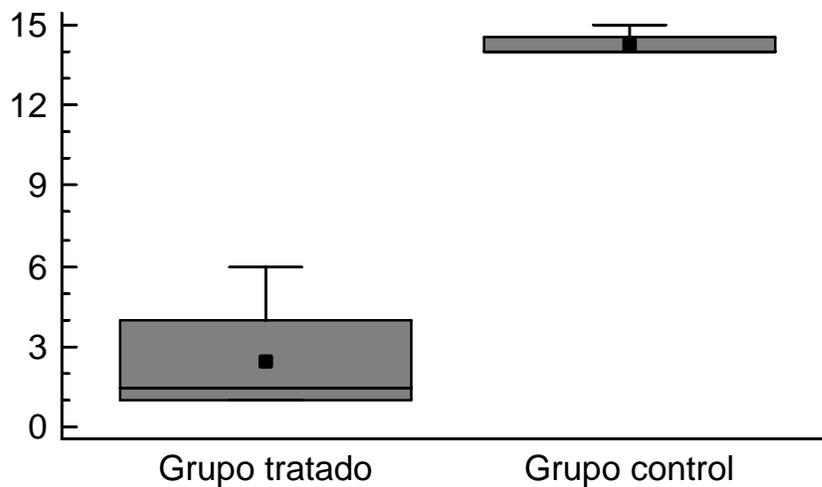


Gráfico 10. Comparación de la $T_{m\grave{a}x}$ del grupo tratado con bolos de BaSeO₄ y con bolos placebo.

En el gráfico 5 se puede observar que los valores obtenidos para el Área Bajo la Curva presenta una mayor variación en los datos del grupo tratado y el grupo control es más homogéneo en sus resultados.

En el gráfico 6 se puede observar que los valores obtenidos para el Área Bajo la Curva del grupo tratado con bolos de selenato de bario son mayores con respecto a los valores obtenidos para el grupo control.

En los gráficos 7 se puede observar que la Concentración máxima presenta una mayor variación en los datos del grupo tratado y el grupo control es más homogéneo en sus resultados y en el gráfico 8 puede observar que los resultados obtenidos para el grupo tratado con bolos de selenato de bario es mayor con respecto a la obtenida para el grupo control,

En los gráficos 9 y 10 se puede observar que el tiempo en el que se alcanzó una mayor concentración en sangre es menor en el grupo tratado con bolos de selenato de bario que el tiempo en el que se alcanzó la concentración máxima en el grupo control, lo cual se debe a la administración del bolo y a su rápida desintegración.

6. CONCLUSIONES.

- ❖ Se evidenció que el grupo de unidades experimentales tratadas con selenato de bario por un tiempo de 48 horas permitió tener niveles de selenio en sangre y en líquido ruminal superiores a las unidades experimentales no tratadas, por 20 días.
- ❖ El comportamiento de los bolos de selenio no fue el esperado debido a que se presentaron problemas porque a las 48 horas después de su administración se observaron signos de intoxicación y se retiraron los bolos.
- ❖ Se determinaron los parámetros farmacocinéticos $T_{m\acute{a}x}$, $C_{m\acute{a}x}$ y ABC de Selenio en sangre, obteniendo los siguientes valores para el grupo tratado: $C_{m\acute{a}x}=0.5487(\mu\text{g Se/ g mta})$, $T_{m\acute{a}x}= 1$ día y $ABC= 6.5942 (\mu\text{g min})/\text{ml}$ y los siguientes para el grupo control $C_{m\acute{a}x}=0.1932 (\mu\text{g Se/ g mta})$, $T_{m\acute{a}x}= 14$ días y $ABC= 2.8168 (\mu\text{g min})/\text{ml}$.
- ❖ Los bolos elaborados con selenato de bario no desempeñaron su actividad bioadhesiva debido a que fueron introducidos en una malla plástica, por lo cual se recomienda realizar nuevamente el estudio sin el uso de la malla plástica y así desempeñar dicha función y controlar la liberación de selenio.

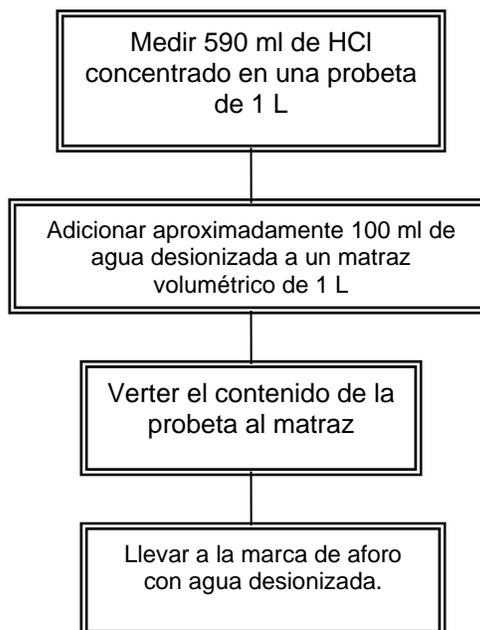
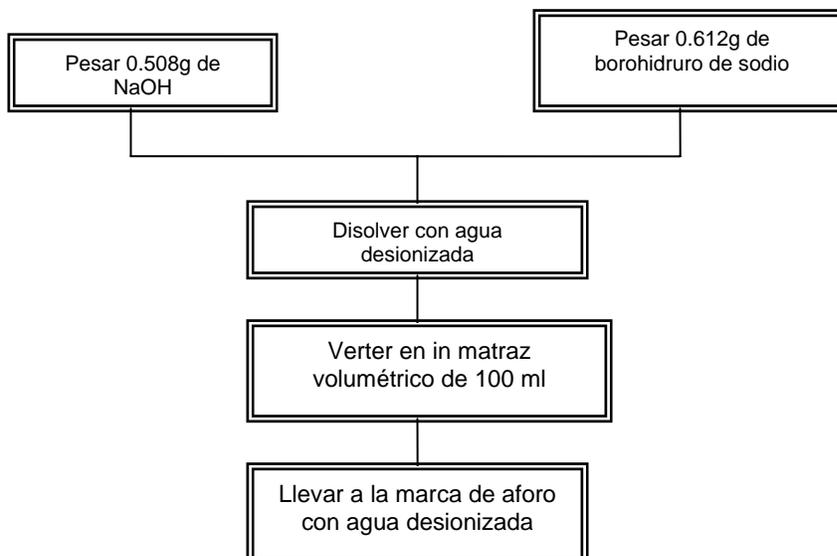
7. REFERENCIAS.

1. Mills, C.F. The physiological and pathological basis of trace elements deficiency disease. In: Trace elements in animal production and veterinary practice. Occasional Publication N° 7. Ed. Suttle, N. F. *et al.* 13r. Soc. An. Prod. pp. 1-10. 1983.
2. ¹ Problems in the diagnosis and anticipation of trace element deficiencies in grazing livestock. *Vet. Rec.* 119:148-152. 1986a.
3. Pierce, S.; Tappel, S. L. Glutathione peroxidase activities from rat liver. *Biochim. Biophys. Acta*, 523:27-29, 1978.
4. Combs, G. F.; Combs, S. B. The role of selenium in nutrition. Academic Press, New York. 532p. 1986.
5. Rickaby, C. D. The selenium requirement of ruminants. In: Recent Advances in Animal Nutrition. Ed. Haresign. Univ. of Nottingham School of Agriculture, Butterworths, London. pp. 121-128. 1981.
6. Tinggi 2003. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: A review. *Toxicol. Lett.* 137,103-110.
7. Edens F. W. 2002. Aplicaciones prácticas de seleniometionina en aves reproductoras. 12ª Ronda Latinoamericana de Alltech, Pp 20-22.
8. IPCS: Internacional programme of chemical Safety Environmental Health Selenium. 1987 Criteria 58. URS: World Health Organization Geneva,.
9. Blood, D. C., Henderson J. *et al.* 1996 Deficiencia de Se- Vitamina E o ambos. *Medicina Veterinaria*. 5ª Edición, Ed. Interamericana.
10. Combs G. F., Coombs S. B. 1986. Absorption and transfer. The role of selenium in nutrition. New York. Academic Press.
11. Hudman J. F., Glenn A. R. 1984. Selenite uptake and incorporation by *Selenomonas ruminatum*. *Arch Microbiol* Pp. 140, 252-256.
12. Daniels L. A. 1996. Selenium metabolism and bioavailability. *Biol Trace Elem Res* 54, 185.
13. Levander O. A. 1977. Metabolic interrelationships between arsenic and selenium. *Environ Health Persp* 19, 159.
14. Völimäki M., Alfthan G. 1987. *Clin Chim Acta*, 166: 171-176.

15. El-Bayoumy K. 2001. The proactive role of selenium on genetic damage and on cancer. *Mutation Research*. 475: 123-139.
16. OH, S., H. E. GANTHER, W. G. HOEKSTRA. 1974. Selenium as a component of glutathione peroxidase isolated from ovine erythrocytes. *Biochemistry*. 13 : 1825-1829
17. MAYLIN, G. A., D. RUBIN, D. LEIN. 1980. Selenium and vitamin E in horses. *Cornell Vet*. 70:272-289.
18. Gerloff, B. J. Effect of selenium supplementation on dairy cattle. *J. Anim. Sci*. 70:3934-3940. 19
19. Chew, B. P.; Hellen, L. M.; Hillers, J. K. Relationship between vitamin A and caroten in blood plasma and milk and mastitis in lactating Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 65:2111-2118. 1982.
20. Swecker W. S., Thatcher C. D., et. al. 1995. Effect of selenium supplementation on colostrum IgG concentration in cows grazing selenium deficient pastures and on post suckle serum IgG concentration in their calves. *Am J Vet Res* 56(4): 450-453.
21. Valladares C. B. 2001. Efecto de selenito de sodio aplicado por vía intramuscular y subcutánea sobre los niveles de selenio, actividad de la glutatión peroxidasa e inmunoglobulinas F5+ de *E. coli* en corderos (Tesis de Maestría) Toluca México: UAEM.
22. Arthur J. R. 1993. The biochemical function of selenium: Relationships to thyroid metabolism and antioxidant systems. Rowett Research Institute Annual Report. Buckburn. Aberdeen, UK.
23. Awadeh F. T., Kincaid R. L., Johnson, K. A. 1998. Effect of level and source of dietary selenium on concentrations of thyroid hormones and immunoglobulins in beef cows and calves. *J Anim Sci*. 76: 1204-1215.
24. Anzola H. J. 2002. Algunas descripciones de la actividad biológica y fisiológica del selenio. Mexico.
25. Serra A. B., Serra S. D., et. al. 1996. Effect of selenium in soluble glass bolus on selenium content on milk and blood of goats. *Biol Trace Elem Res*. 55:207-211.

26. NRC: Mineral Tolerance of domestic animals. 1980. Washington D.C. USA: National Academy Press.
27. Ramírez B. J. 1995. La carencia de selenio, su diagnóstico y suplementación en un sistema de producción caprina en el sureste del estado de Tlaxcala (Tesis maestría), Cuautitlán Izcalli, México UNAM.
28. Blodinger J. 1983. Formulation of veterinary dosage forms. New York: Marcel Decker, 135-173.
29. Underwood E. J. y Suttle N. F. 1999. The mineral nutrition of livestock. 3er ed. Wallingford: CABI publishing, UK.
30. Judson, G. H. et.al. 1991. Long-acting selenium treatment for sheep. Aust. Vet. J. 68:263-265.
31. Thomson C. D. et.al. 1973. Metabolic studies of ⁷⁵Se seleniomethionine and ⁷⁵Se selenite in the rat. Br. J. Nutr. 30(1):139-47.
32. Suzuki et.al. 1997. Metabolism of selenite labeled with enriched stable isotope in the bloodstream. J. of Chrom. B. 692: 15-22
33. Shiobara Y. et. al 1999. Effects of dietary selenium species on Se concentration in hair blood and urine. Toxicol. Appl. Pharmacol.; 152(2):309-314.
34. Shiobara Y. et.al. 2000. Exchange of endogenous selenium for dietary selenium as ⁸²Se-enriched selenite in brain, liver, kidney and testes. Life Sci. 67(25) 3015-30129.
35. Memories of the Symposium on Biotechnology in the feed industry. Organic Selenium metabolism in animals: What rule does Selenium yeast have? 1995. Nottingham: Alltech: 257-267.
36. Harrison J. H., Conrad H. R. 1984. Effect of selenium intake on selenium utilization by the nonlactating dairy cow. J. Dairy Sci, 67:219-223.
37. Chuch D. C. and Pond W. G. 1974. Fisiología en ruminates. Espana, Ed. Acribia.
38. Sunde R.A. Selenium. 1997. Handbook of nutritionally essential mineral elements. USA. Marcel Dekker.

39. Hill K. E., Burk R. F., Lane J. M. 1987. Effect of selenium depletion and repletion on plasma glutathione and glutathione-dependent enzymes in the rat. *J. Nutr* 117: 99-104.
40. Aiche J. M 1983. *Biofarmacia*. Mexico, El manual moderno.14-19.
41. Vila J. J. 2001. *Tecnología farmacéutica. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas*. Ed. Síntesis, España 2001.
42. Garduño Rosas, J. A. 2000. *Curso de Biofarmacia*. Mexico UNAM.25-27
43. Ullrey D. E. 1992. Basis for regulation of selenium supplements in animal diets, *J. Anim. Sci.* 70: 3922-3927.
44. McDowell L.R, Valle G. et.al. Selenium availability and methods of selenium supplementation for grazing ruminants. *Proceeding 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*. Pp. 86-102.
45. Vandame T. F. and Ellis K. J. 2004. Issues in developing ruminal drug delivery systems. *Advanced drug delivery Reviews*, 56: 1415-1436.
46. Beaty, Kerber, Concept, Instrumentation y techniques in Atomic Absortion Spectrophotometry. 2002. Perkin Elmer.
47. YiQiang Z. William T. et.al. 1999. Measurement of Selenite in sediment extracts by using hydride generation atomic absorption spectrometry. *The Sci. of the Tot. Envirom.* 183-193
48. Gleason Huerta Ma. Eugenia. 2004. "Desarrollo y optimización de los métodos de digestión ácida en microondas para la cuantificación de selenio en muestras biológicas". Tesis Q.F.B. Cuautitlan Izcalli (México) México. UNAM.
49. Baeza Hernández Ma. Gabriela. 2005. "Validación de un método en un horno de microondas para la cuantificación de selenio por absorción atómica en materia prima y fluido ruminal". Tesis Q.F.B. Cuautitlán Izcalli (México) México. UNAM.

ANEXO I.**Preparación de soluciones.****+ Ácido Clorhídrico 7M.****+ Borohidruro de Sodio 1%**

ANEXO II

Concentraciones de selenio en Sangre para cada unidad experimental.

Tabla 18. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 1 del grupo control.

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrumento $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g/g mta}$
01/03/07	0	0.5382	3.67	0.1705
02/03/07	1	0.4773	2.68	0.1404
03/03/07	2	0.514	3.00	0.1459
04/03/07	3	0.5349	2.49	0.1164
05/03/07	4	0.5128	2.47	0.1204
06/03/07	5	0.4813	2.40	0.1247
07/03/07	6	0.5052	2.83	0.1400
08/03/07	7	0.5129	3.08	0.1501
09/03/07	8	0.508	3.19	0.1570
10/03/07	9	0.5032	2.99	0.1485
11/03/07	10	0.5162	3.02	0.1463
12/03/07	11	0.5148	3.08	0.1496
13/03/07	12	0.5045	2.73	0.1353
14/03/07	13	0.4925	3.55	0.1802
15/03/07	14	0.4963	3.72	0.1874
16/03/07	15	0.4956	3.61	0.1821
17/03/07	16	0.5283	3.87	0.1831
18/03/07	17	0.4854	3.05	0.1571
19/03/07	18	0.4869	1.35	0.0693
20/03/07	19	0.5166	1.41	0.0682
21/03/07	20	0.4971	2.29	0.1152

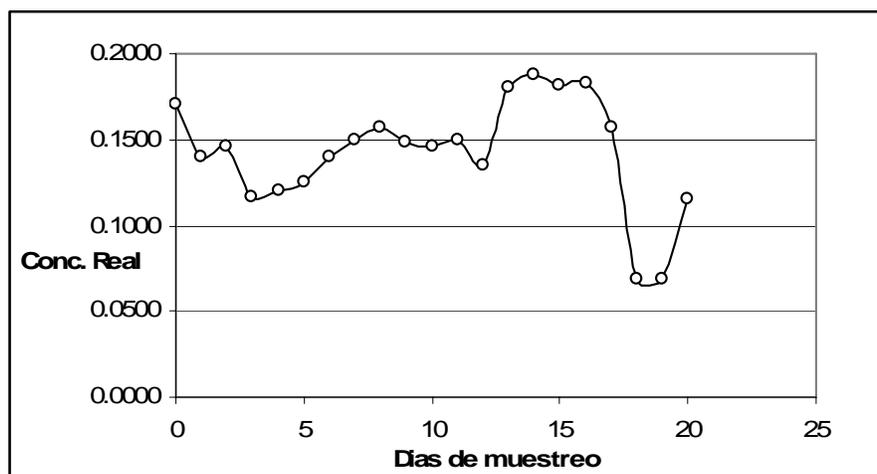


Grafico 11. Resultados individuales de sangre del ovino 1 del grupo control.

Tabla 19. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 2 del grupo control.

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrumento $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g /g mta}$
01/03/07	0	0.5152	2.93	0.1422
02/03/07	1	0.5586	3.21	0.1437
03/03/07	2	0.5165	2.78	0.1346
04/03/07	3	0.5153	3.17	0.1538
05/03/07	4	0.4933	2.09	0.1059
06/03/07	5	0.4820	3.01	0.1561
07/03/07	6	0.5157	2.51	0.1217
08/03/07	7	0.5084	3.01	0.1480
09/03/07	8	0.4779	3.22	0.1684
10/03/07	9	0.5021	3.02	0.1504
11/03/07	10	0.5117	2.88	0.1407
12/03/07	11	0.5064	3.35	0.1654
13/03/07	12	0.5072	2.87	0.1415
14/03/07	13	0.4891	3.45	0.1763
15/03/07	14	0.4918	3.82	0.1942
16/03/07	15	0.5156	3.28	0.1590
17/03/07	16	0.5054	3.39	0.1677
18/03/07	17	0.5133	3.30	0.1607
19/03/07	18	0.5140	1.56	0.0759
20/03/07	19	0.5166	1.26	0.0610
21/03/07	20	0.5016	2.63	0.1311

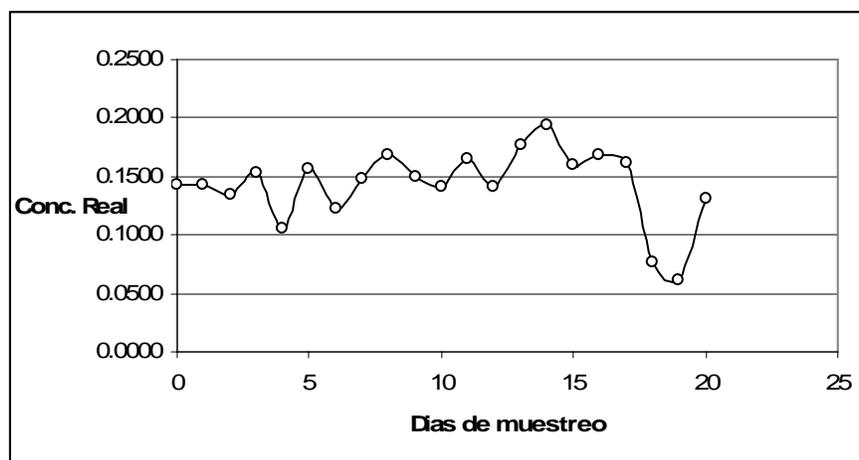


Grafico 12. Resultados individuales de sangre del ovino 2 del grupo control.

Tabla 20. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 3 del grupo control.

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrumento $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g/g mta}$
01/03/07	0	0.5420	2.59	0.1195
02/03/07	1	0.5326	3.26	0.1530
03/03/07	2	0.5148	3.04	0.1476
04/03/07	3	0.5016	2.73	0.1361
05/03/07	4	0.5129	2.29	0.1116
06/03/07	5	0.5219	2.73	0.1308
07/03/07	6	0.5282	2.68	0.1268
08/03/07	7	0.4945	2.85	0.1441
09/03/07	8	0.5315	3.15	0.1482
10/03/07	9	0.5057	3.15	0.1557
11/03/07	10	0.5133	2.96	0.1442
12/03/07	11	0.5094	3.28	0.1610
13/03/07	12	0.5054	2.80	0.1385
14/03/07	13	0.4622	3.33	0.1801
15/03/07	14	0.5320	4.15	0.1950
16/03/07	15	0.5044	3.95	0.1958
17/03/07	16	0.5039	3.84	0.1905
18/03/07	17	0.4839	3.33	0.1720
19/03/07	18	0.4981	1.51	0.0758
20/03/07	19	0.5234	1.14	0.0545
21/03/07	20	0.5141	2.79	0.1357



Grafico 13. Resultados individuales de sangre del ovino 3 del grupo control.

Tabla 21. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 4 del grupo control.

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrumento $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g/g mta}$
01/03/07	0	0.5248	2.56	0.1220
02/03/07	1	0.4896	2.51	0.1282
03/03/07	2	0.5298	2.31	0.1090
04/03/07	3	0.5118	2.64	0.1290
05/03/07	4	0.4972	2.09	0.1051
06/03/07	5	0.5034	3.56	0.1768
07/03/07	6	0.5284	2.68	0.1268
08/03/07	7	0.5142	2.92	0.1420
09/03/07	8	0.5070	2.86	0.1410
10/03/07	9	0.5022	2.82	0.1404
11/03/07	10	0.5103	2.63	0.1288
12/03/07	11	0.5176	2.77	0.1338
13/03/07	12	0.4969	2.63	0.1323
14/03/07	13	0.4940	3.34	0.1690
15/03/07	14	0.4783	3.74	0.1955
16/03/07	15	0.4830	3.07	0.1589
17/03/07	16	0.5022	3.33	0.1658
18/03/07	17	0.5086	3.19	0.1568
19/03/07	18	0.5040	1.34	0.0665
20/03/07	19	0.5065	0.97	0.0479
21/03/07	20	0.5091	2.37	0.1164



Grafico 14. Resultados individuales de sangre del ovino 4 del grupo control.

Tabla 22. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 13 del grupo tratado.

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrumento $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g/g mta}$
01/03/07	0	0.5152	2.43	0.1179
02/03/07	1	0.5098	13.4	0.6571
03/03/07	2	0.5024	7.67	0.3817
04/03/07	3	0.4919	6.7	0.3405
05/03/07	4	0.4878	7.35	0.3767
06/03/07	5	0.5123	7.18	0.3504
07/03/07	6	0.5088	7.77	0.3818
08/03/07	7	0.5124	6.83	0.3332
09/03/07	8	0.5171	7.34	0.3549
10/03/07	9	0.4862	5.96	0.3065
11/03/07	10	0.5027	5.71	0.2840
12/03/07	11	0.5085	5.88	0.2891
13/03/07	12	0.5171	5.39	0.2606
14/03/07	13	0.4611	5.88	0.3188
15/03/07	14	0.4849	5.80	0.2990
16/03/07	15	0.4990	5.42	0.2715
17/03/07	16	0.5057	5.22	0.2581
18/03/07	17	0.4990	4.95	0.2480
19/03/07	18	0.5005	-	-
20/03/07	19	0.4968	4.14	0.2083
21/03/07	20	0.5108	3.86	0.1889

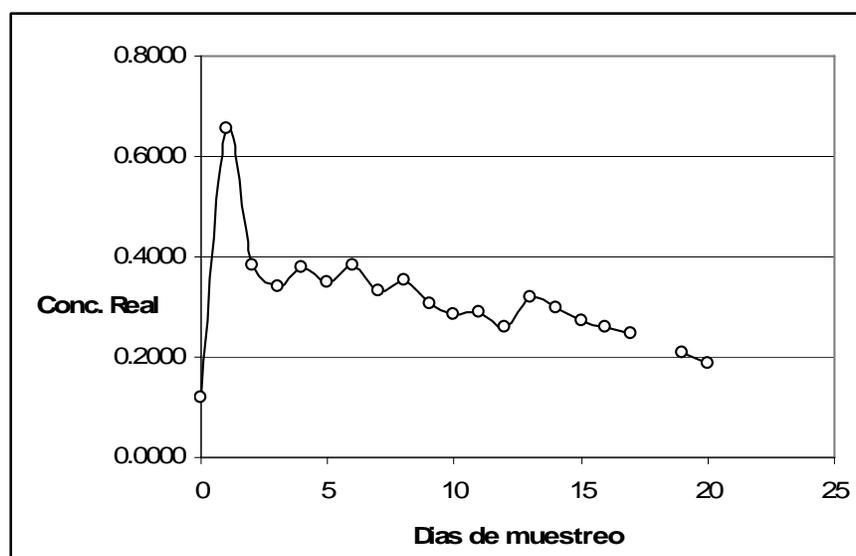


Gráfico 15. Resultados individuales de sangre del ovino 13 del grupo tratado.

Tabla 23. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 14 del grupo tratado.

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrumento $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g/g mta}$
01/03/07	0	0.5168	2.43	0.1176
02/03/07	1	0.5131	9.07	0.4419
03/03/07	2	0.4903	8.86	0.4518
04/03/07	3	0.5039	9.49	0.4708
05/03/07	4	0.5283	11.53	0.5456
06/03/07	5	0.4980	9.6	0.4819
07/03/07	6	0.5026	11.22	0.5581
08/03/07	7	0.5091	9.25	0.4542
09/03/07	8	0.4786	7.71	0.4027
10/03/07	9	0.5072	6.87	0.3386
11/03/07	10	0.4972	7.24	0.3640
12/03/07	11	0.5052	7.13	0.3528
13/03/07	12	0.5214	6.85	0.3284
14/03/07	13	0.4844	7.51	0.3876
15/03/07	14	0.4835	7.19	0.3718
16/03/07	15	0.4820	7.09	0.3677
17/03/07	16	0.4772	6.18	0.3238
18/03/07	17	0.4883	7.36	0.3768
19/03/07	18	0.5009	2.18	0.1088
20/03/07	19	0.5133	5.58	0.2718
21/03/07	20	0.4978	-	-

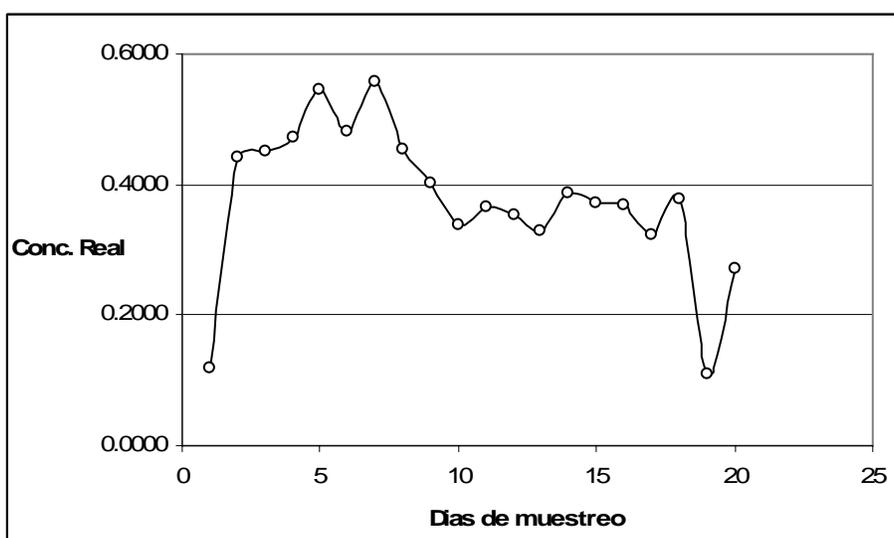


Grafico 16. Resultados individuales de sangre del ovino 14 del grupo tratado líquido ruminal.

Tabla 24. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 15 del grupo tratado.

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrumento $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g/g mta}$
01/03/07	0	0.5094	2.89	0.1418
02/03/07	1	0.5078	8.02	0.3948
03/03/07	2	0.5029	7.69	0.3823
04/03/07	3	0.5047	5.62	0.2784
05/03/07	4	0.4937	6.36	0.3221
06/03/07	5	0.5078	5.08	0.2501
07/03/07	6	0.4997	5.63	0.2817
08/03/07	7	0.5114	5.84	0.2855
09/03/07	8	0.5122	5.38	0.2626
10/03/07	9	0.5132	4.85	0.2363
11/03/07	10	0.4929	5.12	0.2597
12/03/07	11	0.5114	5.25	0.2566
13/03/07	12	0.5137	5.09	0.2477
14/03/07	13	0.4711	5.18	0.2749
15/03/07	14	0.5286	5.65	0.2672
16/03/07	15	0.4996	4.96	0.2482
17/03/07	16	0.4813	4.25	0.2208
18/03/07	17	0.4925	3.54	0.1797
19/03/07	18	0.4767	4.35	0.2281
20/03/07	19	0.5057	3.42	0.1691
21/03/07	20	0.5001	3.79	0.1895



Grafico 17. Resultados individuales de sangre del ovino 15 del grupo tratado.

Tabla 25. Resultados obtenidos en sangre para el ovino 16 del grupo tratado.

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrumento $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g/g mta}$
01/03/07	0	0.4959	2.18	0.1099
02/03/07	1	0.5146	8.24	0.4003
03/03/07	2	0.5064	11.85	0.5850
04/03/07	3	0.4910	6.83	0.3478
05/03/07	4	0.4715	8.51	0.4512
06/03/07	5	0.5122	8.08	0.3944
07/03/07	6	0.5130	10.69	0.5210
08/03/07	7	0.5160	11.95	0.5790
09/03/07	8	0.5137	11.14	0.5421
10/03/07	9	0.5080	9.36	0.4606
11/03/07	10	0.4970	7.81	0.3929
12/03/07	11	0.5046	7.20	0.3567
13/03/07	12	0.5030	6.62	0.3290
14/03/07	13	0.5302	7.95	0.3749
15/03/07	14	0.4849	4.29	0.2212
16/03/07	15	0.5058	6.87	0.3396
17/03/07	16	0.4997	6.83	0.3417
18/03/07	17	0.4910	6.30	0.3208
19/03/07	18	0.5156	4.32	0.2095
20/03/07	19	0.4908	5.36	0.2730
21/03/07	20	0.4998	5.52	0.2761

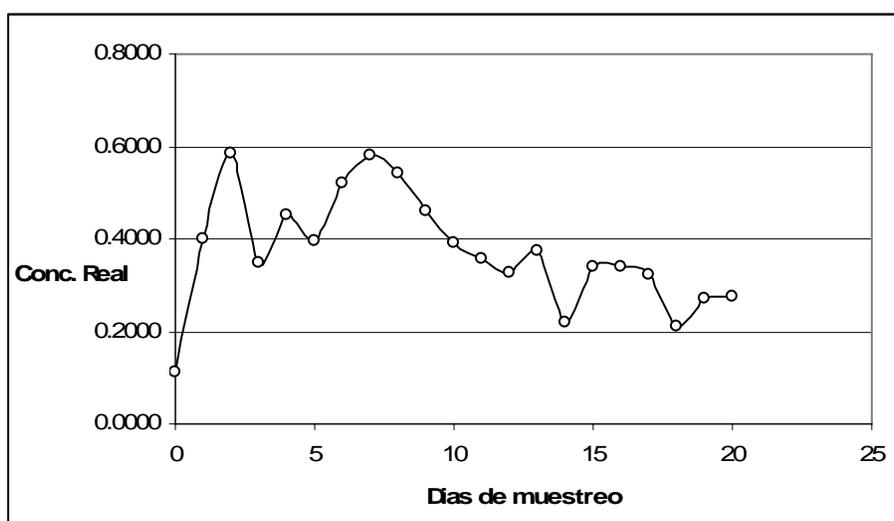


Grafico 18. Resultados individuales de sangre del ovino 16 del grupo tratado.

ANEXO III

Concentraciones de selenio en Líquido ruminal para cada unidad experimental.

Tabla 26. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 1 del grupo control.

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrumento $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g/g mta}$
02/03/2007	1	0.5384	0.57	0.0265
06/03/2007	2	0.5200	1.09	0.0524
08/03/2007	3	0.4818	1.28	0.0664
10/03/2007	4	0.4789	1.51	0.0788
12/03/2007	5	0.4729	1.36	0.0719
14/03/2007	6	0.5178	3.26	0.1574
15/03/2007	7	0.4618	2.96	0.1602
18/03/2007	8	0.4943	1.32	0.0668
20/03/2007	9	0.4977	1.87	0.0939



Gráfico 19. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 1 del grupo control.

Tabla 27. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 2 del grupo control.

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrumento $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g/g mta}$
02/03/2007	1	0.5187	0.51	0.0246
06/03/2007	2	0.4958	0.69	0.0348
08/03/2007	3	0.4854	0.96	0.0494
10/03/2007	4	0.4834	1.01	0.0522
12/03/2007	5	0.5082	0.57	0.0280
14/03/2007	6	0.4905	1.96	0.0999
15/03/2007	7	0.5191	2.27	0.1093
18/03/2007	8	0.5022	0.25	0.0124
20/03/2007	9	0.4934	1.33	0.0674

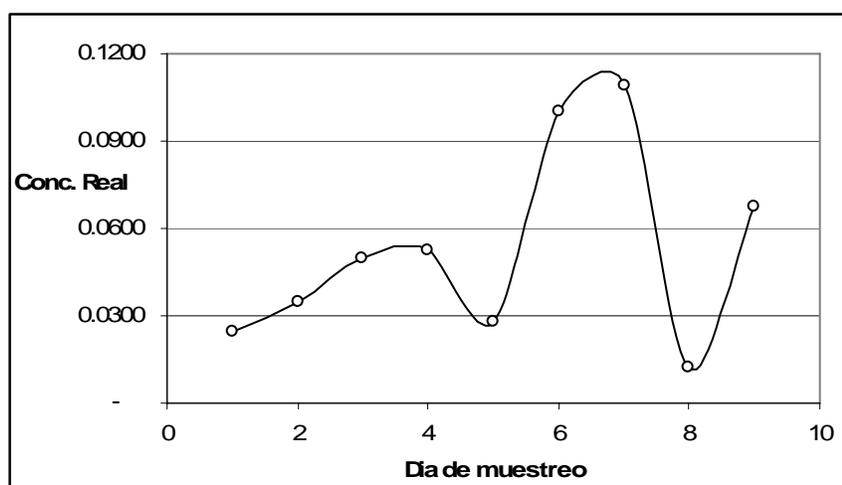


Gráfico 20. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 2 del grupo control.

Tabla 28. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 3 del grupo control.

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrumento $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g/g mta}$
04/03/2007	1	0.5176	3.54	0.1710
07/03/2007	2	0.5019	0.58	0.0289
09/03/2007	3	0.5285	0.91	0.0430
13/03/2007	4	0.5013	0.89	0.0444
16/03/2007	5	0.5001	2.19	0.1095
17/03/2007	6	0.5300	3.40	0.1604
19/03/2007	7	0.4830	2.12	0.1097
21/03/2007	8	0.4668	1.83	0.0980

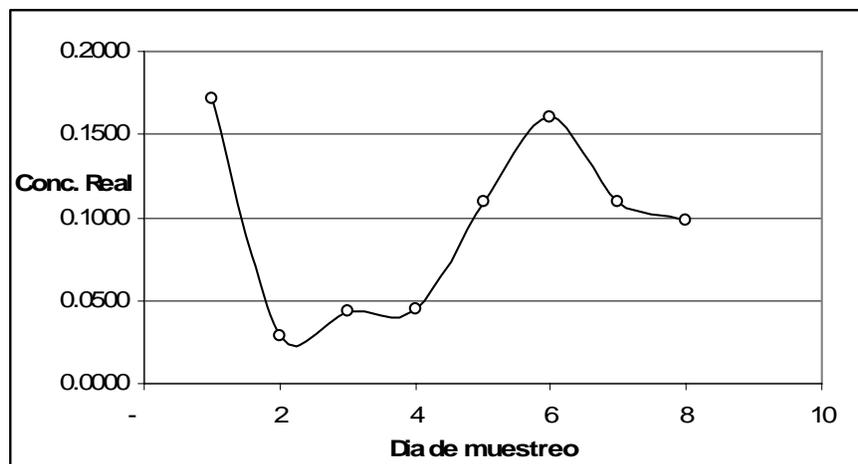


Grafico 21. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 3 del grupo control.

Tabla 29. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 4 del grupo control

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrumento $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g/g mta}$
04/03/2007	1	0.5108	1.70	0.0832
07/03/2007	2	0.4982	0.60	0.0301
09/03/2007	3	0.4822	1.45	0.0752
13/03/2007	4	0.4883	1.99	0.1019
16/03/2007	5	0.5430	2.44	0.1123
17/03/2007	6	0.5044	3.15	0.1561
19/03/2007	7	0.4880	1.12	0.0574
21/03/2007	8	0.4943	1.73	0.0875

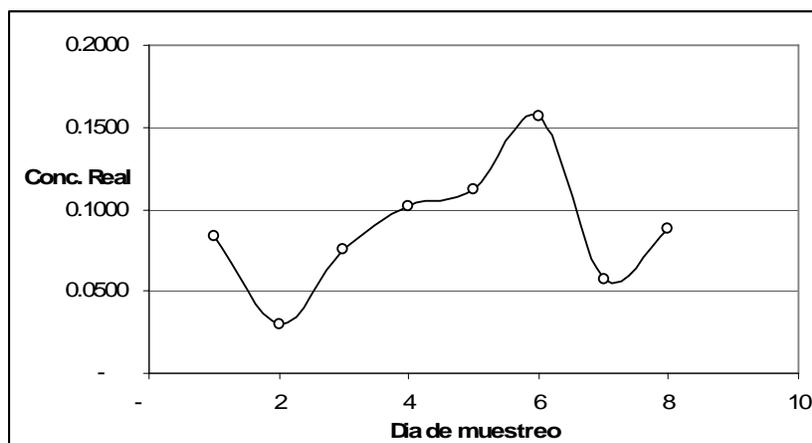


Grafico 22. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 4 del grupo control.

Tabla 30. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 13 del grupo tratado.

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrumento $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g/g mta}$
02/03/2007	1	0.5000	3.88	0.1940
06/03/2007	2	0.4849	3.19	0.1645
08/03/2007	3	0.4717	1.11	0.0588
10/03/2007	4	0.4942	5.55	0.2808
12/03/2007	5	0.5047	4.97	0.2462
14/03/2007	6	0.4715	3.11	0.1649
16/03/2007	7	0.4844	1.82	0.0939
18/03/2007	8	0.4549	2.23	0.1226
20/03/2007	9	0.4900	1.17	0.0597

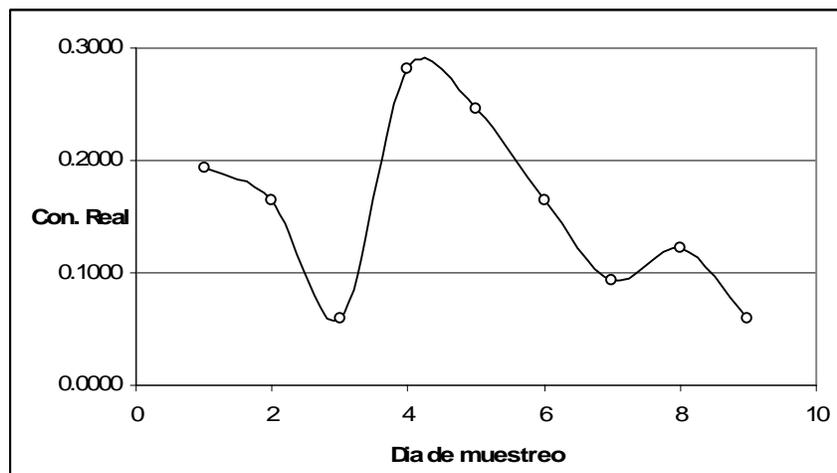


Gráfico 23. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 13 del grupo tratado.

Tabla 31. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 14 del grupo tratado.

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrumento $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g/g mta}$
02/03/2007	1	0.5049	4.75	0.2352
06/03/2007	2	0.5071	3.40	0.1676
08/03/2007	3	0.4954	3.25	0.1640
12/03/2007	4	0.5034	17.73	0.8805
14/03/2007	5	0.4195	16.07	0.9577
16/03/2007	6	0.5038	13.85	0.6873
20/03/2007	7	0.4942	0.93	0.0470

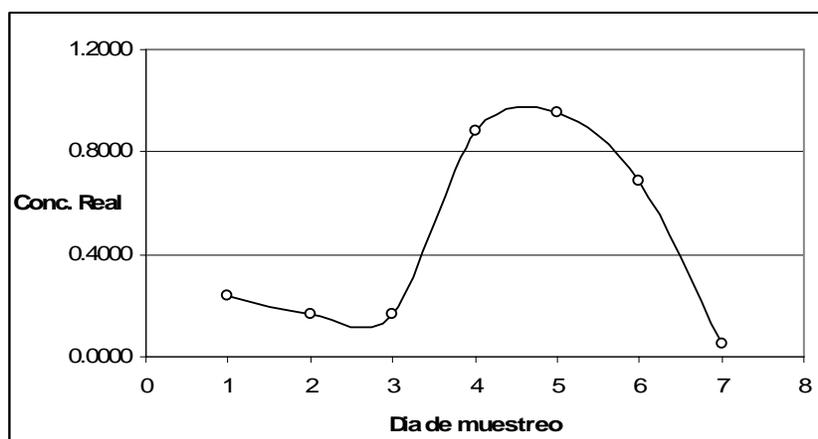


Grafico 24. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 14 del grupo tratado.

Tabla 32. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 15 del grupo tratado.

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrument o $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g/g mta}$
04/03/2007	1	0.4990	4.22	0.2114
07/03/2007	2	0.4994	2.00	0.1001
09/03/2007	3	0.5214	0.90	0.0432
13/03/2007	4	0.5283	4.54	0.2148
15/03/2007	5	0.5118	3.98	0.1944
17/03/2007	6	0.5286	0.60	0.0284
19/03/2007	7	0.5220	1.64	0.0785
21/03/2007	8	0.5232	0.35	0.0167

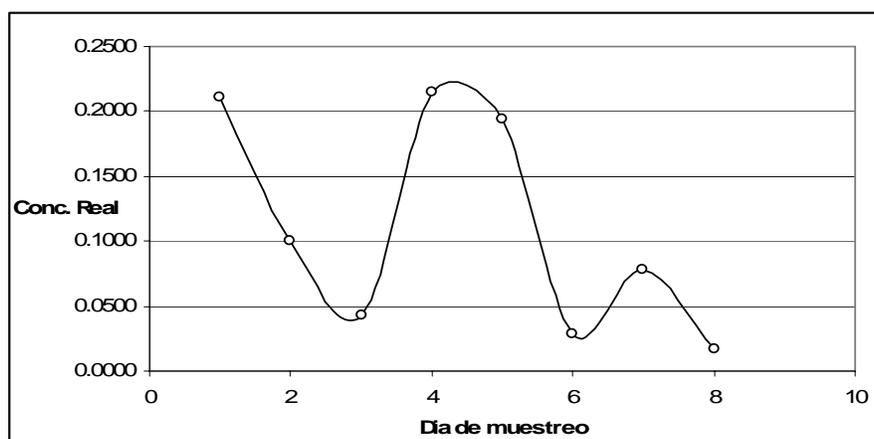


Grafico 25. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 15 del grupo tratado.

Tabla 33. Resultados obtenidos en líquido ruminal para el ovino 16 del grupo tratado.

Fecha	Día de muestreo	Peso de la muestra (g)	Conc. Instrumento $\mu\text{g/L}$	Conc.Real $\mu\text{g/g mta}$
04/03/2007	1	0.5387	7.78	0.3611
07/03/2007	2	0.5225	5.39	0.2579
09/03/2007	3	0.4818	4.32	0.2242
13/03/2007	4	0.4989	2.58	0.1293
19/03/2007	5	0.4923	17.97	0.9126
21/03/2007	6	0.5033	7.87	0.3909

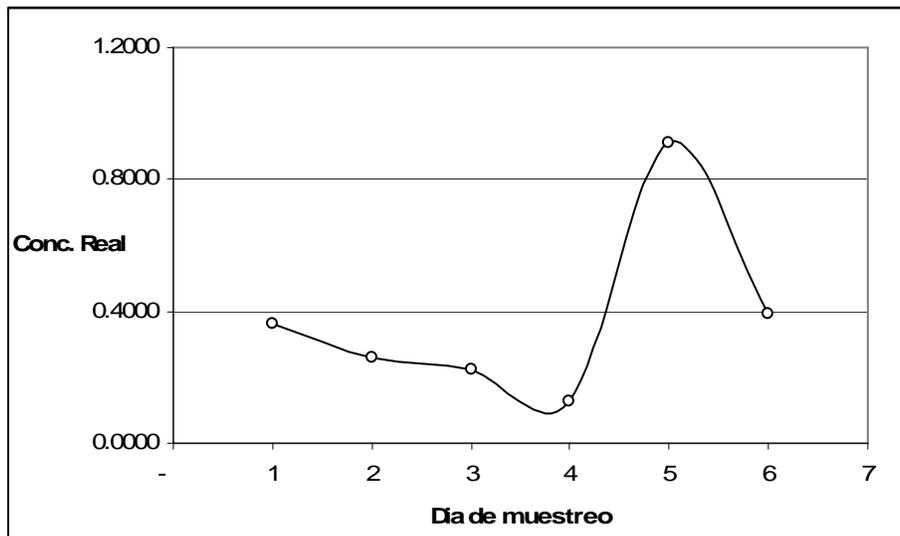


Grafico 26. Resultados individuales de líquido ruminal del ovino 15 del grupo tratado