



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DISEÑO, DESARROLLO Y EVALUACIÓN CITOTÓXICA
IN VITRO, DE MICROESFERAS POLIMÉRICAS
MUCOADHESIVAS PARA LA ADMINISTRACIÓN ORAL DE
SELENITO DE SODIO EN ANIMALES**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN FARMACIA

P R E S E N T A:

GERARDO GÓMEZ TOVAR

**ASESORES: DRA. PATRICIA RAMÍREZ NOGUERA
DR. GUSTAVO R. RIVERA RODRÍGUEZ**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2014



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 ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Diseño, desarrollo y evaluación citotóxica in vitro, de microesferas poliméricas mucoadhesivas para la administración oral de selenito de sodio en animales

Que presenta el pasante: Gerardo Gómez Tovar

Con número de cuenta: 306683932 para obtener el Título de: Licenciado en Farmacia

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 ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de agosto de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	DAR. Juan José Díaz Esquivel	
VOCAL	Dra. Raquel López Arellano	
SECRETARIO	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
1er. SUPLENTE	Dr. José Juan Escobar Chávez	
2do. SUPLENTE	M. en I. Claudia Mariano Hernández	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Dedicatoria

A mí Mama

Te dedico mi tesis con todo mi amor y cariño, siempre has sido la fuerza que me impulsa a seguir adelante para alcanzar todas mis metas. Te entrego esta tesis como testimonio del esfuerzo que ambos hemos hecho a lo largo de todos estos años. No podría pedir más en esta vida, has sido mi ejemplo, mi motivación, la fuente de mi confianza.

Las palabras no bastan para expresar mi agradecimiento, mi admiración y amor hacia la persona más maravillosa que conozco. Sé que estás y seguirás estando orgullosa de mí, por lo tanto te seguiré demostrando con hechos que tu esfuerzo no ha sido en vano y que estoy listo para salir al mundo a triunfar sin ningún temor porque aprendí de la mejor.

A mi familia

Por su apoyo a lo largo de mi vida, su interés, palabras de aliento y buenos deseos. Son parte importante de mi éxito y este logro también es suyo.

A Lulú

Tu eres lo mejor que me pudo pasar en esta etapa de mi vida, el destino te puso en mi camino y estoy agradecido por eso. Eres el amor de mi vida y sé que nos depara un futuro lleno de éxito y de mucha felicidad. Te amo.

Agradecimientos

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - UNAM, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación profesional y por dotarme de instalaciones y personal docente de excelente calidad.

A mis asesores por la paciencia, su tiempo y conocimientos, sin los cuales este trabajo de tesis no hubiera sido posible.

A la Dra. Raquel López Arellano y al D.A.R. Juan José Díaz Esquivel por darme la oportunidad de pertenecer al LEDEFAR, es un orgullo el haber realizado mi trabajo de tesis en sus instalaciones, además de que me llevo un grato recuerdo por todas las anécdotas y excelentes personas que integran ese maravilloso equipo de trabajo.

A la Dra. Patricia Ramírez Noguera, por darme su confianza y abrirme las puertas para realizar parte de mi trabajo de tesis en sus instalaciones. Así como su excelente trato, atenciones y asesoría.

Quiero agradecer al CONACYT/COMECYT por el apoyo brindado mediante el programa “Establecimiento de un centro de estudios de intercambiabilidad de medicamentos de uso veterinario” con clave EDOMEX-2011-C02-176190.

Quiero agradecer también al proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM IN220612 por el apoyo brindando y del cual además fui becario.

Al Dr. Arturo Aguirre Gómez por el apoyo y préstamo de sus instalaciones en el laboratorio 15 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria.

Al Dr. Germán Isauro Garrido Fariña del Laboratorio de apoyo a histología y biología por el apoyo brindado.

A FMC por la donación de los excipientes utilizados, sin su apoyo no hubiera sido posible este trabajo de tesis.

A mis compañeros y amigos por hacer de esta etapa de mi vida una experiencia inolvidable, algunos nos dejaremos de ver y algunos otros los veré con frecuencia, pero les deseo a todos un futuro brillante y mucho éxito en todo lo que se propongan.

Contenido

	Pág.
Lista de Figuras	VI
Lista de Tablas.....	VIII
Lista de Gráficos.....	..X
Resumen.....	XI
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	4
2.1 Generalidades del Selenio	4
2.1.1 Importancia de los minerales en salud animal.....	4
2.1.2 Características del Selenio.....	5
2.1.3 Distribución geológica	5
2.1.4 Distribución del selenio en México	6
2.1.5 Farmacocinética del selenio	9
2.1.6 Funciones del selenio en animales.....	11
2.1.7 Formas farmacéuticas para suplementación de selenio	13
2.2 Citotoxicidad	14
2.2.1 Prueba de viabilidad celular (MTT)	15
2.2.2 Prueba Glutación Reducido (GSH)	16
2.3 Microesferas	16
2.3.1 Polímeros utilizados para síntesis de Microesferas	18
2.3.2 Tipos de microesferas	19
2.3.3 Microesferas mucoadhesivas	20
2.3.4 Mucoadhesión.....	23
2.3.5 Mecanismos de liberación.....	26
2.3.6 Métodos de Preparación de microesferas	28
3. Antecedentes	31
4. Justificación	34
5. Objetivos	35
5.1 Objetivo General.....	35
5.2 Objetivos Particulares	35
6. Hipótesis.....	36

7. Materiales y Métodos	37
7.1 Materiales y Reactivos.....	37
7.2 Preformulación.....	38
7.3 Plan experimental.....	41
7.3.1 Matriz experimental.....	41
7.3.2 Evaluación de resultados	43
7.4 Preparación de Microesferas	43
7.5 Evaluación de microesferas.....	44
7.5.1 Tamaño de partícula	44
7.5.2 Mucoadhesión.....	45
7.5.3 Cuantificación de selenio	46
7.5.4 Grado de hinchamiento	48
7.5.5 Morfología de las microesferas	48
7.5.6 Viscosidad.....	49
7.6 Estudios de citotoxicidad	49
7.6.1 Cultivo celular	49
7.6.2 Estudios de citotoxicidad.....	52
8. Análisis y Discusión	54
8.1 Preformulación.....	54
8.2 Plan experimental.....	62
8.2.1 Tamaño de Partícula	65
8.2.2 Mucoadhesión.....	72
8.2.3 Porcentaje de captura de selenio	79
8.3 Citotoxicidad	89
8.3.1 Viabilidad celular.....	91
8.3.2 Cuantificación de Glutati3n reducido (GSH).....	95
9. Conclusiones	100
10. Literatura Citada	102
11. Anexos.....	113
11.1 Técnica para la determinaci3n de viabilidad celular por medio del ensayo de MTT.	113
11.2 Técnica para la determinaci3n de Glutati3n reducido (GSH).....	115
11.3 Técnica para la cuantificaci3n de prote3nas totales.	118

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Distribución de selenio en la republica mexicana.....	8
Figura 2. Estados productores de ganado bovino.....	8
Figura 3. Metabolismo del selenio.	10
Figura 4. Signos de deficiencia de selenio.....	12
Figura 5. Signos de toxicidad por selenio	13
Figura 6. Suplementos de selenio para ganado.....	14
Figura 7. Estructura básica de microesferas.....	17
Figura 8. Gelificación Iónica.	30
Figura 9. Aparato de cuantificación mucoadhesiva múltiple.....	46
Figura 10. Microondas para digestión acida.	46
Figura 11. Espectrofotómetro de Absorción Atómica	47
Figura 12. Monómeros presentes en el alginato.	56
Figura 13. Bloques monoméricos presentes en alginatos.....	56
Figura 14. Mecanismo gelificación Iónica.	57
Figura 15. Método de difusión en gelificación iónica.....	58
Figura 16. Microesferas obtenidas con diferentes tipos de secado.....	60
Figura 17. Estructura interna y externa de las microesferas de alginato	61

Figura 18. Estructura química de la Hidroxipropilmetilcelulosa	62
Figura 19. Estructura química de la Carboximetilcelulosa.....	63
Figura 20. Estructura química del Carbopol.....	64
Figura 21. Fotografías de los sistemas de microesferas de acuerdo a su tamaño de partícula.	66
Figura 22. Fotografías de los sistemas de microesferas de cada lote (1-13) para la mucoadhesividad.	74
Figura 23. Etapas de mucoadhesión e intercambio hídrico.....	76
Figura 24. Teoría de difusión-entrelazado de mucoadhesión.....	78
Figura 25. Teoría de fractura en mucoadhesividad.....	78
Figura 26. Factores que afectan el porcentaje de captura de fármaco.....	83
Figura 27. Efectos del hinchamiento en las microesferas.....	86

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Selenoproteínas y su función.....	11
Tabla 2. Clasificación polímeros según su origen.....	18
Tabla 3. Ejemplos de polímeros utilizados para microesferas	19
Tabla 4. Tipos de microesferas en el mercado.....	19
Tabla 5. Fuerza mucoadhesiva.....	21
Tabla 6. Teorías de la mucoadhesión.....	25
Tabla 7. Métodos para preparación de microesferas poliméricas.....	29
Tabla 8. Selección del polímero estructurante.....	39
Tabla 9. Evaluación de la Viscosidad	40
Tabla 10. Evaluación de condiciones de secado	40
Tabla 11. Factores considerados en el plan experimental con sus respectivos niveles. ...	42
Tabla 12. Plan experimental.....	42
Tabla 13. Componentes y cantidades de las formulaciones.....	44
Tabla 14. Tamaño apertura de mallas.....	45
Tabla 15. Condiciones operación para microondas digestión acida.....	47
Tabla 16. Factor de conversión de viscosidad.....	49
Tabla 17. Fracción de bloques monoméricos en alginatos según especie.....	59

Tabla 18 Tamaños de partícula de los sistemas microparticulados..	65
Tabla 19. Análisis de varianza del modelo para tamaño de partícula.	67
Tabla 20. Análisis de varianza para los factores que influyen en el tamaño de partícula..	68
Tabla 21. Regresión lineal modelo de tamaño de partícula.	70
Tabla 22. Viscosidad de las mezclas.	71
Tabla 23. Porcentajes de captura de los sistemas microparticulados.	79
Tabla 24. Análisis de varianza del modelo para porcentaje de captura.	80
Tabla 25. Análisis de varianza para los factores que influyen en el porcentaje de captura.	81
Tabla 26. Regresión lineal modelo de porcentaje de captura.	82
Tabla 27. Hinchamiento de las formulaciones.	87
Tabla 28. Análisis de varianza de la viabilidad celular en los 6 grupos experimentales.	93
Tabla 29. Análisis de medias por diferencia mínima significativa de Fisher para la viabilidad celular.	94
Tabla 30. Análisis de varianza para la cuantificación de GSH intracelular de los grupos experimentales.	97

Lista de Gráficos

	Pág.
Gráfico 1. Diagrama de Pareto de los factores que influyen en el tamaño de partícula. ...	69
Gráfico 2. Relación directamente proporcional entre el tamaño de partícula y la viscosidad	72
Gráfico 3. Porcentaje de viabilidad celular para los grupos experimentales.....	92
Gráfico 4. Comparación de medias con intervalos de confianza al 95% para la viabilidad celular.....	93
Gráfico 5. Cuantificación del contenido de GSH por miligramo de proteínas para los grupos experimentales.	97
Gráfico 6. Comparación de medias con intervalos de confianza al 95% para la cuantificación de GSH intracelular de los grupos experimentales.....	98

Resumen

El objetivo general del presente trabajo de tesis fue diseñar y desarrollar un nuevo tipo de microesferas mucoadhesivas, para la administración de selenio en animales. Para lograr esto, se utilizó alginato de sodio como polímero base de las formulaciones y, pensando en un aumento de la mucoadhesión, se seleccionaron diferentes proporciones de otros polímeros altamente adhesivos como la carboximetilcelulosa sódica (CMC), carbopol 971p e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), todo esto mediante un plan experimental con 13 lotes. Para cada formulación se evaluó tamaño de partícula, fuerza mucoadhesiva y porcentaje de carga de selenio. De estas 3 respuestas se determinó que únicamente el porcentaje de captura depende de las proporciones de los polímeros, mientras que en el caso del tamaño de partícula la viscosidad es el parámetro principal. Por su parte la mucoadhesión fue constante en todas las formulaciones. De acuerdo a los resultados, se determinó que la carboximetilcelulosa por sí misma permitió capturar un 60% de selenio, aunque también en combinación con carbopol 971p presentó buenos porcentajes de captura de hasta 58%. Con respecto a la evaluación de la citotoxicidad se evaluaron los 2 mejores lotes y se determinó que existe una diferencia significativa ($P < 0.05$) en la viabilidad celular de los tratamientos con microesferas y los controles. Pero de acuerdo a los resultados, las formulaciones no representan un riesgo para la administración *in vivo*, ya que los porcentajes de viabilidad obtenidos se mantuvieron dentro de los límites permitidos. En la evaluación de GSH no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los grupos de estudio. Por lo que se determinó que no existen evidencias de que las formulaciones sean capaces de modificar el estado redox celular, se observó que el selenio aumenta de forma no dosis-dependiente los niveles de GSH con respecto al control sin que el efecto sea significativo. Por lo que las formulaciones utilizadas en el estudio no mostraron efectos que comprometan la viabilidad celular ni los niveles de GSH intracelular.

Palabras clave: Microesferas, mucoadhesivas, selenio, glutatión, citotoxicidad, MTT, alginato, biopolímeros

1. Introducción

Con la evolución constante en la obtención de fármacos se ha hecho evidente la necesidad de una evolución análoga de las formas farmacéuticas utilizadas para su administración. Dichas formas farmacéuticas deben permitir una mejora significativa en los esquemas de administración y en la biodisponibilidad, ofreciendo ventajas que no se obtienen apegiéndose a un sistema convencional (Bhargava, Rathore, Tanwar, Gupta, & Bhaduka, 2013).

En este sentido explotar la vía oral representa una gran oportunidad para nuevos desarrollos farmacéuticos. Esta es una ruta muy importante utilizada con mayor frecuencia por su facilidad de aplicación. Además de ser sencilla, esta vía presenta la posibilidad de obtener un efecto sistémico, debido principalmente a la gran cantidad de sitios de absorción presentes a lo largo del tracto gastrointestinal. La vía oral tiene la ventaja de no ser una vía inmediata lo cual hace que sea más segura controlando la dosis administrada (Neetika, Arsh, & Manish, 2012).

En este trabajo se muestra el uso de micropartículas para uso veterinario, mediante el desarrollo de una plataforma polimérica para la administración de suplementos que resulten en una mejora de la producción de animales de consumo humano. Dentro de estas microplataformas se desarrollaron microesferas poliméricas, las cuales destacan por su gran versatilidad terapéutica. Estas, se definen como pequeñas partículas sólidas de polímeros naturales o sintéticos de diferente densidad y grado de permeabilidad, con un intervalo de tamaño de 0.1 a 1000 micrómetros ($1 \times 10^{-6} \text{m}$) (Madhav & Kala, 2011).

Las microesferas presentan una gran ventaja sobre otras formas farmacéuticas debido a su pequeño tamaño, el cual permite una mayor dispersión y distribución del fármaco en el sitio de absorción, además de que tienen la capacidad de capturar eficientemente grandes cantidades de la molécula en cuestión (Lohani & Chaudhary, 2012).

Para la elaboración de microesferas se utilizaron polímeros biodegradables e inoos: Alginato de sodio, carbopol 971p, carboximetilcelulosa e hidroxipropilmetilcelulosa. Estos polímeros tienen la capacidad de estructurar el sistema microparticulado, liberar el fármaco de manera controlada y que además le brindan características mucoadhesivas. La razón de esto fue aprovechar las ventajas que la mucoadhesión presenta, entre las que se encuentran: incrementar la biodisponibilidad del fármaco, disminuir concentraciones del mismo debido a una mayor eficiencia en su distribución y absorción, especificidad en tejidos, mayor tiempo de residencia del fármaco en el organismo, entre otras (Andrews, Laverty, & Jones, 2009). Debido a esto se ha optado por la utilización de polímeros mucoadhesivos, ya que el organismo cuenta con una gran cantidad de rutas de administración integradas por membranas que permiten que este fenómeno suceda (Khutoryanskiy, 2011). Por lo tanto, es evidente que es un gran nicho de oportunidad para la administración de sustancias activas.

Mediante el uso de microesferas poliméricas mucoadhesivas se pretende mejorar los actuales regímenes suplementarios de minerales que existen en veterinaria, en específico en animales de consumo humano. Esto es de gran importancia, ya que muchas veces las enfermedades que se presentan en animales se deben simplemente a deficiencias en la alimentación.

En este sentido, uno de los factores que más influye en una pérdida de la calidad de la producción de animales de consumo es la deficiencia de selenio en la dieta. Se ha comprobado que una deficiencia de este mineral puede ocasionar múltiples alteraciones tanto físicas como metabólicas (Palomo Segovia, 2005). Estas patologías generalmente se presentan cuando hay una deficiencia en la dieta de este micronutriente. Esto aplica cuando

el suelo contiene cantidades de selenio menores a 0.5mg/kg en el suelo y menores a 0.1ng/kg en plantas (Hefnawy & Tórtora-Pérez, 2010).

En México esto no es la excepción ya que en la mayor parte del territorio predominan los suelos de origen volcánico, al ser el selenio un mineral que en su forma pura es muy volátil, se provoca su eliminación de los suelos. Además otra de las características de los suelos volcánicos es albergar grandes cantidades de azufre, lo cual tiene como resultado que este mineral desplace al selenio como mineral absorbido por las plantas (López Arellano, Revilla, & Tórtora, 2012) .

En la actualidad algunas de las formas aplicadas para la administración de selenio son: la administración parenteral, soluciones orales y bolos de sales de selenio inorgánico (Kincaid, Rock, & Awadeh, 2007). Dada la naturaleza de este tipo de formulaciones muchas veces se dificulta la administración de minerales en diferentes especies de ganado. Es por esto que optar por desarrollar un sistema de microesferas poliméricas mucoadhesivas con selenio puede hacer frente a muchas adversidades y problemas en la terapia convencional, logrando con esto aumentar la eficacia terapéutica de minerales sobre la producción animal en México (Alagusundaram et al., 2009).

El estudio tiene como finalidad evaluar el efecto de los componentes de la formulación sobre la mucoadhesión de las partículas al epitelio intestinal de pequeños rumiantes, el tamaño de partícula, la capacidad de carga de las partículas con selenito de sodio y estimar la citotoxicidad en la línea celular renal *VERO*. Para esto último se determino la concentración de glutatión reducido (GSH) debido a que es un indicador de estrés oxidativo, y la proporción de células viables por estimación de la reducción de sales de tetrazolio (MTT).

2. Marco Teórico

2.1 Generalidades del Selenio

2.1.1 Importancia de los minerales en salud animal

Los minerales traza son un tema de gran interés en zootecnia, esto es debido a que desempeñan un rol muy importante en el mantenimiento de algunas funciones vitales en los organismos. En general algunas de estas incluyen la capacidad del sistema inmune para responder a organismos patógenos, la reproducción y el crecimiento. (Neospark, 1992). Aunque también juegan un papel muy importante en otras más específicas como: mejorar la actividad antioxidante, actuar como cofactores, activadores de sistemas enzimáticos y también como componentes de compuestos orgánicos (Segovia Palomo, 2005).

Se han identificado como mínimo 8 minerales traza que son esenciales en la alimentación de los animales de consumo humano, estos son: Cobalto (Co), Cobre (Cu), Iodo (I), Hierro (Fe), Manganeso (Mn), Molibdeno (Mo), Selenio (Se) y Zinc (Zn) (Fader, 2001). Es de vital importancia garantizar la ingesta de cantidades suficientes de estos minerales, ya que, de presentarse una deficiencia, las funciones antes mencionadas pueden sufrir de alteración y propiciar enfermedades (Saha et al., 2011).

De estos minerales, uno de los más determinantes para el correcto desarrollo y regulación de las funciones vitales de los animales es el selenio. Por esto resulta muy común hablar de este mineral en lo que se refiere a salud animal, debido a que en la gran mayoría de los casos su presencia en los forrajes es muy baja, particularmente en México.

2.1.2 Características del Selenio

El selenio es un metaloide del grupo 16 de la tabla periódica, tiene un peso atómico de 78.96 g/mol, comparte cierta similitud con el Azufre, ya que su rol es esencial en el organismo. Se considera al selenio como un calcófilo, debido a su tendencia a remplazar al azufre en minerales como: pirita, calcopirita, pirrotina y esfalerita (Broadley et al., 2007) . Cuenta con diferentes estados de oxidación como: Selenuro (Se^{2-}), Selenio elemental (Se^0), Selenito (Se^{4+}) y Selenato (Se^{6+}) (Bruggeman & Maes, 1997).

La presencia y concentración del selenio en suelos está determinada por factores como el pH, condiciones de óxido-reducción, solubilidad de sus sales, interacciones biológicas y reacciones cinéticas (Valdiviezo Morales, 2012). En este sentido, el estado de oxidación tiene un papel muy importante para determinar su presencia en suelos y plantas, ya que se sabe que únicamente las formas solubles, Selenito y Selenato, podrán acumularse en forrajes y las insolubles, Selenuro y Selenio elemental, es difícil que puedan asimilarse por la planta (Ramírez, Robledo, Sandoval, Fuentes-Lara, & Benavides-Mendoza, 2010).

2.1.3 Distribución geológica

El contenido de selenio en la mayoría de los suelos es muy baja (0.01-2mg/kg), la media mundial es de 0.4mg/kg, aunque pueden existir casos de muy alta concentración con cantidades que llegan hasta los 1200mg/kg, en países como Canadá, Estados Unidos, Colombia, Irlanda, Israel, Rusia, China, Australia, donde existe suelos altamente seleníferos (Selinus & Alloway, 2005).

Altas concentraciones de selenio en suelos se pueden encontrar en rocas fosfóricas, esquistos bituminosos orgánicos, carbón y minerales sulfhídricos; lamentablemente otros minerales contienen concentraciones muy bajas de selenio y estos predominan a nivel mundial. (Selinus & Alloway, 2005). El primer caso de preferencia se da en tierras arables que derivan de rocas sedimentarias, por otro lado los suelos derivados de rocas volcánicas presentan cantidades mínimas de selenio debido a la volatización producida por la etapa ígnea. La concentración de selenio no se limita únicamente al origen del suelo, sino que

también a otros múltiples factores, como fuertes precipitaciones pluviales, pueden provocar el empobrecimiento del suelo debido a la lixiviación y acumularlo excesivamente en partes más bajas (Finch & Turner, 1996). En el trabajo de Ramírez-Bribiesca et al, 2009, (Ramírez Bribiesca, 2009) se indica que la deficiencia de selenio resulta común en suelos ácidos de tipo arenoso o calcáreo con declives y erosionados.

En el caso de las plantas, si el suelo es altamente ácido predominarían especies insolubles de selenio, esto se debe a la formación de complejos con óxidos, hidróxidos y óxi-hidroxidos, los cuales mantienen fuertemente unido al selenio evitando que la planta pueda absorberlo. Un suelo neutro o alcalino presenta mejores condiciones para los forrajes, entre otras plantas acumuladoras de selenio (Silva, Quiroga, & Auza, 2000). Otro factor que dificulta la absorción de selenio se debe a que el Ca, P y Mg son elementos antagonistas en la absorción de elementos traza, al igual que los fosfatos y sulfatos. Por lo que, si el suelo es rico en estos minerales la planta los absorberá con más facilidad que al selenio (Hernández-Calva & E., 2006).

Se sabe que las plantas incorporan selenio a su estructura, aunque no se tiene la certeza de que sea esencial para su crecimiento. Es común que se clasifiquen las plantas en tres grupos de acuerdo a su absorción e incorporación de selenio, y son los siguientes: Plantas acumuladoras de selenio (absorben >1000mg/kg), plantas acumuladoras secundarias (50-100mg/kg) y las terciarias (<59mg/kg) (Selinus & Alloway, 2005) .

2.1.4 Distribución del selenio en México

Como se mencionó anteriormente, en el mundo predominan las zonas con deficiencias de selenio en el suelo. En México esto no es la excepción, ya que la mayor parte del territorio cuenta con suelos de origen volcánico. Al ser el selenio un mineral que en su forma pura es muy volátil, se provoca su eliminación de los suelos. Además otra de las características de los suelos volcánicos es albergar grandes cantidades de azufre, lo cual tiene como resultado que este mineral desplace al selenio como mineral absorbido por las plantas (López Arellano et al., 2012). Por estas razones no resulta ilógico encontrar

concentraciones tan bajas en plantas, como las reportadas por Ramírez-Bribiesca et al, 2001, (Ramírez-Bribiesca, Tortora, Huerta, Aguirre, & Hernández, 2001) con valores de 0.05mg/kg.

El contenido de selenio en plantas desde el altiplano de México hasta la península de Yucatán es bajo y estrechamente asociado con las concentraciones del elemento en suelo (Ramírez Bribiesca, 2009). Por su parte Espinosa et al, 2004, (Espinosa, Rosiles, Ochoa, & Olguín, 2004) encontraron que la concentración de selenio en forrajes resultaron deficientes para Guanajuato, mientras que para Veracruz se encontraron dentro del rango considerado como adecuado. No obstante, en Coahuila y Chihuahua, existen zonas con exceso de selenio en el suelo, susceptibles de favorecer la intoxicación, (López Arellano et al., 2012). En sedimentos en Sonora, Becvort-Azurra et al, 2012, (Becvort-Azurra et al., 2012) reportaron valores de selenio de 0.8-1.8mg/kg, los cuales son bastante altos con respecto al promedio.

Estos son solo algunos estudios que se han realizado en el país, desafortunadamente no se cuenta con un estudio a nivel nacional completo en el que se identifiquen adecuadamente y se reporten las zonas del país con sus respectivas concentraciones de selenio. Por lo que solo se conoce si hay deficiencia o exceso de selenio en el suelo al observar síntomas o enfermedades en el ganado, esto repercute en grandes pérdidas a nivel nacional. Por tal motivo en el país se tiene establecido que la suplementación de selenio en animales es necesaria, debido a que predomina la deficiencia. En la Figura 1, se esquematiza un mapa en el cual se recopilan los resultados de diversas fuentes y clasifican los suelos de acuerdo a su contenido de selenio, como comparación en la Figura 2, se indica la producción de carne de ganado bovino producida en los diferentes Estados de la República.

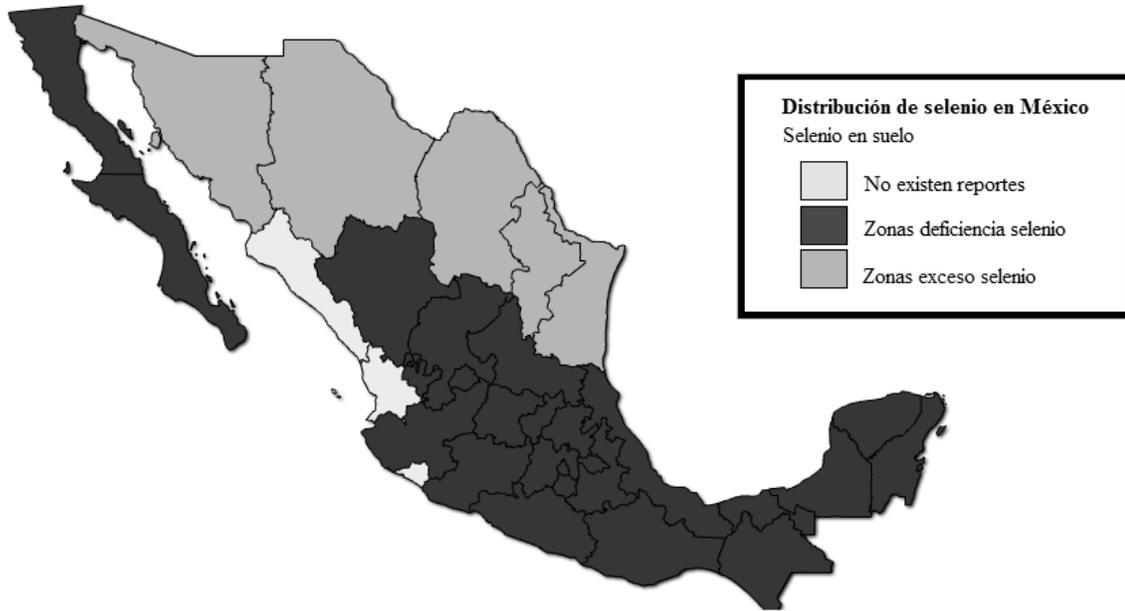


Figura 1. Distribución de selenio en la república mexicana. Mapa donde se ubican las zonas de alta y baja concentración de selenio en suelos, los estados marcados con blanco no cuentan actualmente con reportes de cantidades de selenio en suelo.



Figura 2. Estados productores de ganado bovino. En el mapa se indica la producción de toneladas de carne durante el año 2012, los estados de color negro presentaron una producción superior a 150 mil toneladas, los marcados en blanco una producción entre 50 mil y 150 mil toneladas, finalmente los indicados en gris corresponden a una producción inferior a 50 mil toneladas (SAGARPA, 2012).

Por lo tanto es evidente de acuerdo a los mapas que la producción de ganado bovino en México tiene la necesidad de una suplementación de selenio, simplemente debido a que en la mayoría de los Estados con mayor producción existe una deficiencia muy marcada en el selenio disponible del suelo y plantas.

2.1.5 Farmacocinética del selenio

Idealmente los animales consumen seleniometionina en el forraje por la incorporación a aminoácidos que contengan azufre (Selinus & Alloway, 2005). En el caso de México, dado lo expuesto anteriormente, se opta por la suplementación de selenio. Se utiliza de manera regular selenio de origen inorgánico, principalmente selenito de sodio (Segovia Palomo, 2005).

El selenito se absorbe en el intestino delgado de los animales por un mecanismo pasivo, aunque dependiendo de la especie animal y de la fuente del selenio podrá variar la tasa y el mecanismo metabólico (Kumar Verma, Kumar, Rahal, Kumar, & Roy, 2012). En el caso de los animales monogástricos la absorción de selenio es alta llegando a valores superiores al 50% (Crandell, 1999), en el caso de los rumiantes no supera el 30% (Kumar Verma et al., 2012) debido a que en estos últimos se lleva a cabo una reducción del selenito a formas insolubles por los microorganismos presentes en el rumen (Selinus & Alloway, 2005).

Dentro del organismo el selenio dependiendo de su fuente seguirá diferentes rutas, como se muestra en la Figura 3. Así, en el caso del selenito será transportado al hígado donde ocurrirá una biotransformación por medio de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px) presente, transformándolo en selenodiglutatión y posteriormente en selenuro. Una vez en la sangre el selenuro se distribuirá en los diferentes tejidos del cuerpo que contengan proteínas para que pueda incorporarse en los cuatro grupos de selenoproteínas que existen (Sunde, 1990).

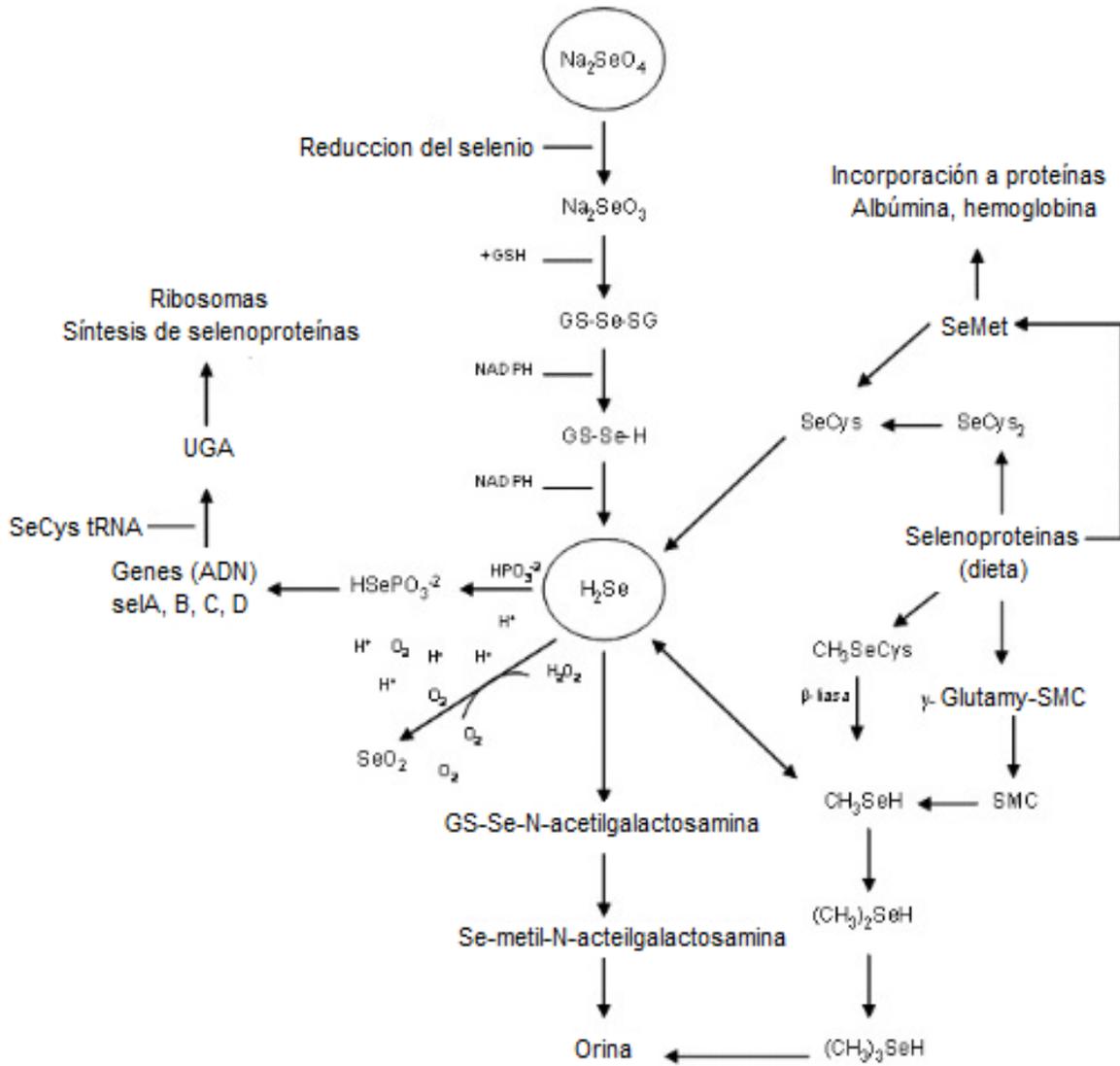


Figura 3. Metabolismo del selenio. Ruta metabólica que puede seguir el selenio en el organismo según su naturaleza (Hernández-mendoza & Rios-lugo, 2009).

La mayoría del selenio que ingieren de forma inorgánica los animales es secretado rápidamente por orina, exhalación y bilis, el remanente se incorpora a proteínas. Los animales monogástricos presentan una mayor eliminación por orina y los rumiantes excretan el selenio en las heces (Selinus & Alloway, 2005).

2.1.6 Funciones del selenio en animales

El selenito de sodio se reduce hasta llegar a selenuro de hidrogeno (H_2Se) a través de la GSH-Px, este compuesto tiene la capacidad de reducir de esta forma especies reactivas de oxígeno (ERO) (Hernández-Mendoza & Rios-Lugo, 2009). Mediante esto se protege las membranas celulares ya que se evita la desnaturalización de proteínas esenciales que provocarían los peróxidos de hidrogeno y lipídicos (Valdiviezo Morales, 2012). Otra ruta que puede seguir el Selenuro, es la de combinarse con grupos fosfato para formar fosfato de selenio hidrogenado ($HSePO_3^{-2}$) para la síntesis de nuevas selenoproteínas (Hernández-Mendoza & Rios-Lugo, 2009).

En el organismo además de la GSH-Px existen otras selenoenzimas, como se muestran en la Tabla 1, las cuales tienen funciones muy importantes ya que transforman los radicales libres que se crean en el metabolismo y los transforman en compuestos no dañinos (Hernández-mendoza & Rios-lugo, 2009).

Selenoproteína	Funciones
Glutación peroxidasa	Enzima antioxidante, descompone el H_2O_2 y otras hidroxiperoxidasas
Tioredoxin reductasa	Provee proteccion a la piel de los radicales libres
Yodotironina deodinasas	Sintesis de hormona tiroidea activa
Selenoproteína IR	Provee proteccion contra radicales libres
Selenoproteína P	Protege las células endoteliales contra oxidantes
Selenoproteína S	Regulación del balance redox celular

Tabla 1. Selenoproteínas y su función. Se indican las principales selenoproteínas en el organismo y sus funciones en el organismo (Kumar Verma et al., 2012).

Es por esto que el selenio es muy importante ya que si estas selenoenzimas no pueden llevar a cabo su función comienzan a surgir diferentes síntomas y afectaciones a la calidad de vida del animal, como consecuencia una baja en la producción. En la Figura 4 se mencionan los principales signos de deficiencia que se presentan en animales monogástricos y rumiantes. En general las deficiencias de selenio producen degeneración o necrosis del musculo esquelético, enfermedad musculo blanco, cojera, anemia, pérdida

de peso y problemas cardiacos (Bautista Bárcenas, 2010). Además afectaciones a la tiroides, afectaciones en el crecimiento, sistema inmunológico y reproductivo, por mala calidad de espermatozoides (López Arellano et al., 2012).

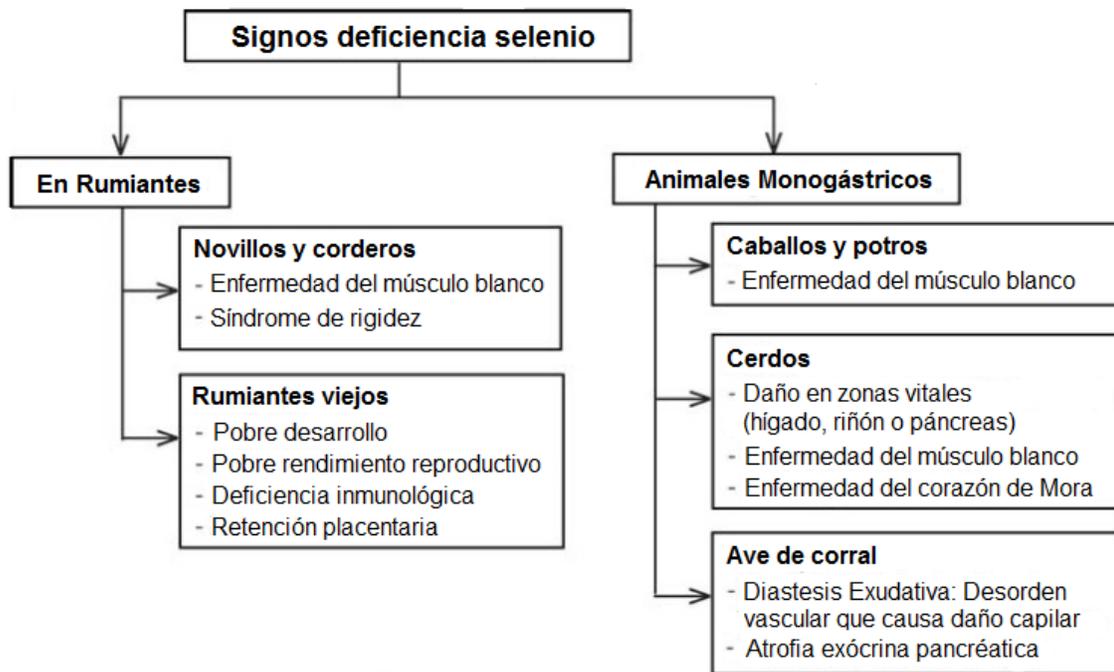


Figura 4. Signos de deficiencia de selenio: Signos y síntomas de deficiencia de selenio en diferentes animales (Saha et al., 2011).

La deficiencia no es la única preocupación que existe sobre el selenio, en algunas regiones del mundo existen concentraciones muy altas de selenoaminoácidos en plantas, por lo cual pueden presentarse casos de toxicidad. Se consideran niveles tóxicos de selenio cuando la alimentación contiene más de 5mg/kg de materia seca. (Ramírez Bribiesca, 2009). En la Figura 5 se muestra un cuadro con los síntomas que se presentan en animales por intoxicación aguda y crónica.

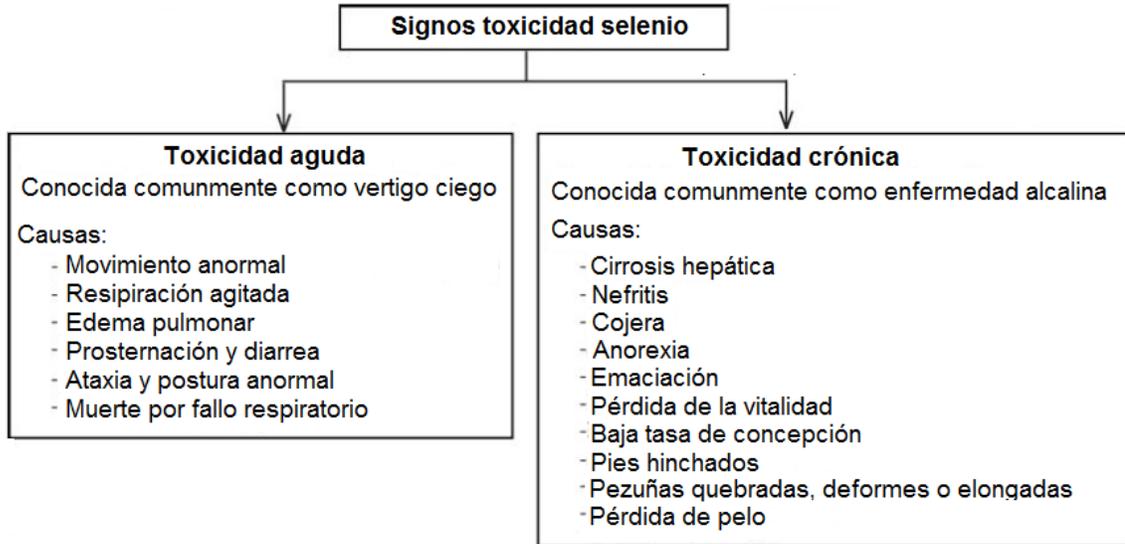


Figura 5. Signos de toxicidad por selenio: Principales signos de toxicidad que se presentan en animales por selenio (Saha et al., 2011).

2.1.7 Formas farmacéuticas para suplementación de selenio

Actualmente se reconocen dos fuentes de selenio para suministrar a los animales, fuentes inorgánicas y orgánicas. En el caso de las formas inorgánicas la que predomina es el selenito de sodio y en las orgánicas la suplementación con selenometionina. (Segovia Palomo, 2005). Se tienen diferentes ventajas al usar alguna de las fuentes de selenio como por ejemplo una menor toxicidad o una mayor acumulación de selenio en el organismo, pero autores como Calamari et al, 2007, (Calamari et al., 2007) concuerdan en que a fin de cuentas ambas fuentes garantizan una actividad antioxidante similar. En la Figura 6 se muestran los tipos de suplementación que se utilizan de acuerdo al ganado y producción.

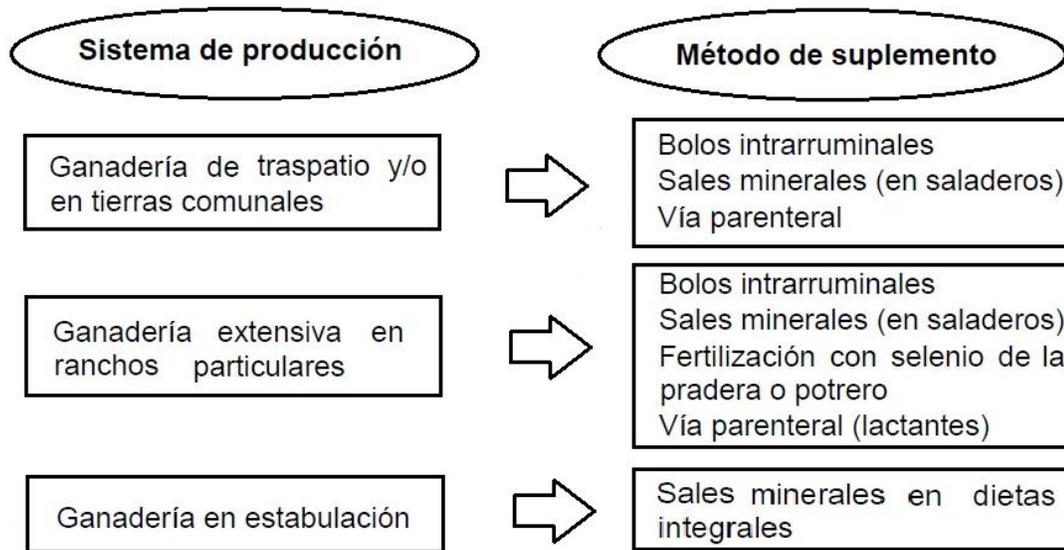


Figura 6. Suplementos de selenio para ganado: Principales métodos de suplementación de acuerdo al sistema de producción utilizado. (Ramírez Bribiesca, 2009).

2.2 Citotoxicidad

Se ha hablado de los síntomas asociados al consumo de selenio a niveles tóxicos, pero estos son evidentes una vez que se han manifestado a nivel del organismo. Como todo nuevo desarrollo farmacéutico es necesario evaluar su capacidad citotóxica, los excipientes utilizados para la elaboración de medicamentos en su mayoría resultan ser biocompatibles. Al momento de mezclar estos excipientes y adicionarles selenio ya no es posible saber si se presentara citotoxicidad, por esta razón se sugiere evaluar la toxicidad asociada a la exposición de las microesferas que se estudiaran en este trabajo. Esto permitirá conocer en parte el compromiso celular durante la exposición. Los resultados serán muy útiles en el caso de considerarse su uso en animales.

Para decir que un compuesto o formulación es citotóxica debe provocar alteraciones morfológicas, alterar el crecimiento celular o en últimas instancias la muerte. Estas pruebas se pueden realizar *in-vitro* utilizando líneas celulares como modelos experimentales, que resultan ser un método práctico pero no tan económico como las pruebas *in-vivo*, su utilización radica en que éticamente resulta ser inapropiado el uso de animales para este tipo de pruebas (Niles, Moravec, & Riss, 2008).

Las variables que se evalúan en los estudios de citotoxicidad por lo general son los efectos producidos por diferentes concentraciones del fármaco o excipientes y el tiempo de exposición. Esto permite estimar como será el efecto en el organismo y si será segura la administración de dicha formulación (Niles et al., 2008).

Existen diferentes pruebas para evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad relacionada a fármacos y xenobióticos en general. En este trabajo de tesis se decidió enfocarse en dos objetivos particulares. En el primero se consideró evaluar la capacidad de las células de realizar sus funciones metabólicas normales, en presencia de selenio, para fundamentar la utilidad del estudio. El segundo, en el efecto que tiene este mineral sobre el estrés oxidativo celular, ya que es bien conocido que presenta propiedades antioxidantes al igual que fomenta el aumento de los niveles de GSH intracelular, pero también existe un efecto de depleción de este antioxidante endógeno si se alcanzan concentraciones muy elevadas del mineral (Limón-Pacheco & Gonsebatt, 2009).

De acuerdo a la naturaleza de las muestras, el mineral empleado y los alcances del proyecto, se decidió optar por evaluar la viabilidad celular utilizando el reactivo MTT y la determinación de los niveles de GSH intracelular. Estas pruebas se explican con más detalle a continuación:

2.2.1 Prueba de viabilidad celular (MTT)

Esta prueba se utiliza para evaluar la viabilidad celular ante algún compuesto, además se podrá saber si existirá un porcentaje de células vivas suficiente como para considerar la formulación como inocua o de baja toxicidad. Esta medición se lleva a cabo mediante la utilización del reactivo Bromuro de 3(4,5 dimetil -2 -tiazol)-2,5-difeniltetrazolico. El reactivo es captado por las células y reducido por la enzima succínico deshidrogenasa mitocondrial, como resultado se obtiene un compuesto color morado (Formazán) el cual de acuerdo a su concentración indicara la capacidad oxidativa de la célula. Esto es muy importante ya que para la célula es primordial su capacidad oxidativa, para así llevar a cabo la respiración celular y obtener energía, por lo que si esta se ve alterada indicara que la sustancia o la formulación son causantes de citotoxicidad celular (Francisco, Arrebola, Alfredo, & Fernández, 2003).

Por lo tanto esta prueba será muy útil para sustentar el estudio con la certeza que existe un porcentaje de células suficiente con la capacidad de llevar a cabo las funciones metabólicas necesarias para su supervivencia. Además servirá para asociar su efecto a nivel del organismo, ya que la muerte celular se relaciona de manera directa con las manifestaciones de toxicidad relacionadas al selenio que se mencionan en la Figura 5, y que de acuerdo a la duración de su exposición se manifestaran de diferente manera.

2.2.2 Prueba Glutación Reducido (GSH)

Esta prueba se utiliza para evaluar si alguna sustancia o compuesto provocara daño a nivel celular debido a la formación de especies reactivas al oxígeno (radicales libres). Las células cuentan con sistemas enzimáticos y moléculas que las protegen del daño celular, el GSH posee una actividad antioxidante muy poderosa por lo que es capaz de oxidarse y así transformar los radicales libres en moléculas inocuas. Por lo que este metabolito es un indicador que se puede utilizar para conocer si existirá estrés oxidativo por la interacción de la formulación con el organismo, ya que si disminuyen sus valores con respecto al estado basal se podrá deducir que se está induciendo la formación de radicales libres y por lo tanto existirá riesgo de daño celular (Cisneros, Oré, Arnao, & Suárez, 2011).

2.3 Microesferas

En el ámbito de la suplementación animal la puerta está abierta para nuevos desarrollos que permitan mejorar la terapéutica actual, una opción son los sistemas microparticulados los cuales podrían mejorar la absorción de selenio en animales, ya que cuentan con una mayor área superficial y podrían aumentar la biodisponibilidad. Entre los sistemas microparticulados, las microesferas han sido objeto de estudio y en general se ha tenido buenos resultados experimentalmente con esta forma farmacéutica, por lo que podrían aplicarse en la terapéutica animal.

Las microesferas se definen como pequeñas partículas esféricas sólidas de polímeros naturales o sintéticos de diferente densidad y grado de permeabilidad, ubicadas en el

intervalo de 0.1 a 1000 micrómetros. En la Figura 7 se puede ver una representación de una microesfera (Madhav & Kala, 2011). Al ser partículas esféricas poseen un flujo libre, por lo cual su manipulación es muy sencilla, además de que su incorporación en procesos industriales se puede llevar a cabo de manera eficiente (Agrawal, Rajput, Shrivastava, Baghel, & Baghel, 2012). Son distribuidores de fármacos a través de una matriz ya sea como una dispersión de partículas o como una estructura compuesta por una fase continua de uno o más polímeros miscibles, en los cuales se dispersa un fármaco a nivel molecular o macroscópico (Prasanth, Moy, Mathew, & Mathapan, 2011).

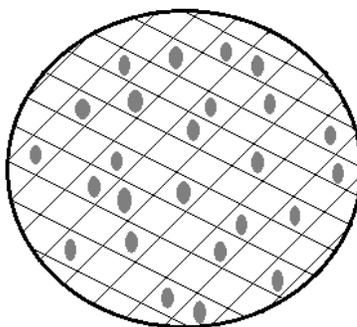


Figura 7. Estructura básica de microesferas: Se ejemplifica la formación de una red polimérica en la cual partículas de la sustancia activa pueden ser atrapadas (Jain, Gulati, Kumar, & Nagaich, 2012).

Las microesferas presentan una cantidad considerable de ventajas sobre otras formas farmacéuticas, algunas de estas son: (Jain et al., 2012)

- Incrementan la biodisponibilidad del principio activo.
- Controlan la liberación del fármaco.
- Pueden liberar el fármaco en un sitio específico, si son modificadas en la superficie.
- Son muy estables por lo que existe muy poca interacción del fármaco con el ambiente.
- Pueden mejorar los esquemas de administración, reduciendo dosis y tomas.

Aunque también presentan algunas desventajas como: (Jain et al., 2012)

- Porcentajes de captura bajos principalmente con fármacos de bajo peso molecular
- Si se consumen con alimentos pueden ser arrastrados limitando la liberación del fármaco y su permanencia

Pero estas propiedades no son las únicas ya que existen polímeros que reaccionan a estímulos, algunos de los más comunes son la temperatura y el pH. Esto resulta en grandes oportunidades de aplicación ya que se puede realizar microesferas que liberen el fármaco en sitios específicos del organismo (Wadood Siddiqui & Kumar Gupta, 2012).

Además al utilizarse polímeros inocuos se pueden administrar por cualquier vía, únicamente es necesario utilizar un tamaño de partícula adecuado y con polímeros que aprovechen al máximo las condiciones del organismo (Rathore, Yadav, Nayak, Saraogi, & Singhai, 2012).

2.3.1 Polímeros utilizados para síntesis de Microesferas

Para la fabricación de microesferas se cuenta con una gama de polímeros muy grande, su utilización dependerá de la aplicación que se tenga pensada, en la Tabla 2 se muestra su clasificación:

Polímeros Naturales	Polímeros Sintéticos
Proteínas	Biodegradables
Carbohidratos	No Biodegradables
Carbohidratos modificados químicamente	

Tabla 2. Clasificación polímeros según su origen. Se muestra la clasificación de polímeros utilizados en la elaboración de microesferas según la fuente de la que proceden (Rathore et al., 2012).

En la Tabla 3 se muestran algunos ejemplos de los polímeros más utilizados para la fabricación de microesferas.

Naturales	Sintéticos	Biocompatibles	Biodegradables
Alginato de sodio	Polivinilalcohol	Esteres de ácido hialurónico	Polilácticos
Pectina	Poliamidas	Polivinilacetatos	Poliglicólicos
Gelatina	Policarbonatos	Etilenglicol	Policaprolactones
Carragenina	Polialquilenglicoles		Polialquilcianocrilatos
	Polivinilésteres		Chitosan
	Acido Polimetacrílico		Polifosfacenos
	Metilcelulosa		Poliortoesteres
	Hidroxipropilmetilcelulosa		Polianhidridos
	Carboximetilcelulosa		

Tabla 3. Ejemplos de polímeros utilizados para microesferas: De acuerdo a su clasificación se muestran los polímeros más utilizados para elaborar microesferas (Lohani & Chaudhary, 2012).

2.3.2 Tipos de microesferas

La función de las microesferas no se limita únicamente al transporte y liberación del fármaco en el organismo, su tamaño y características se pueden utilizar para otros fines, o simplemente se puede mejorar su interacción con el organismo. Es posible utilizarlas para diagnosticar enfermedades al agregar materiales que permitan ser escaneados, provocar adhesión en la mucosa del organismo o sistemas flotantes que se pueden alojar en el estómago (Prasanth et al., 2011).

Por esta razón actualmente se consideran al menos 5 tipos de microesferas, las cuales se muestran en la Tabla 4.

Tipo de Microesfera	Aplicación
Radioactivas	Radioterapia local y prevención de embolias
Fluorescentes	Diagnóstico, imagen, escaneo
Flotantes	Liberación de fármaco en estómago de manera prolongada
Mucoadhesivas	Adhesión a mucosa del organismo para aumentar tiempo de residencia del fármaco y especificidad
Magnéticas	Mejorar liberación del fármaco y terapia más específica

Tabla 4. Tipos de microesferas en el mercado. Se indican los tipos de microesferas actuales y sus aplicaciones en medicina (Rathore et al., 2012)

2.3.3 Microesferas mucoadhesivas

Las microesferas poseen una gran limitante y es que pueden llegar a permanecer muy poco tiempo en el sitio de absorción. Esto se debe a que la liberación de fármaco no es inmediata, es necesario que la microesfera se hinche en el medio y el fármaco salga de las redes poliméricas (Sahil, Akanksha, Premjeet, Bilandi, & Kapoor, 2011).

Para solucionar este problema surge la idea de crear microesferas que tengan la posibilidad de adherirse a las mucosas del organismo para así liberar el fármaco lentamente y este tenga la oportunidad de ser absorbido rápidamente por las membranas debido al contacto íntimo (Jain et al., 2012).

Este sistema presenta una serie de ventajas que no se obtienen al utilizar microesferas convencionales, algunas de estas son: (Lohani & Chaudhary, 2012)

- Fijación en el área de absorción para mejorar y aumentar la biodisponibilidad del fármaco.
- Aumentar el contacto de la formulación con la superficie de absorción.
- Prolongar el tiempo de residencia de la forma farmacéutica en el sitio de absorción, lo que garantizara la liberación total del fármaco.
- Liberación sostenida
- Disminuir la frecuencia de administración
- Reducción en fluctuaciones de la dosis
- Reducción de efectos secundarios debido a que se ubica en el tejido enfermo específico
- Mantener niveles plasmáticos del fármaco en sangre.
- Incrementar el margen de seguridad del fármaco administrado, debido a un mejor control de niveles plasmáticos.
- Protección del fármaco sobre condiciones acidas o alcalinas.

Pero como todos los sistemas también presentan diferentes desventajas las cuales se listan a continuación: (Tangri, Khurana, & Madhav, 2011)

- Si la adhesión es muy fuerte y prolongada puede causar úlceras debido al desprendimiento de la mucosa.
- Actualmente los modelos *in vitro* tienen limitaciones que no permiten analizar efectivamente las propiedades mucoadhesivas.
- Los polímeros pueden sufrir degradación debido a enzimas presentes en el organismo y esto afectar los perfiles de liberación.

Las propiedades mucoadhesivas de las microesferas están ligadas a los polímeros que se utilicen para su preparación, pero no todos estos poseen la misma fuerza mucoadhesiva. En la Tabla 5 se muestra una clasificación que jerarquiza los polímeros de acuerdo a su fuerza mucoadhesiva.

Polimeros	Fuerza mucoadhesiva
Carboximetil celulosa	+++
Carbopol	+++
Acido poliacrílico	+++
Alginato de Sodio	+++
Hidroxietil celulosa	+++
Hidroxipropilmetil celulosa	+++
Gelatina	++
Goma Guar	++
Hidroxipropil celulosa	+
Almido modificado	+
Chitosan	+
Acacia	+
Polietilenglicol	+

Tabla 5: Fuerza mucoadhesiva. Se indica el grado de mucoadhesividad con el que cuentan algunos de los polímeros más utilizados actualmente en la elaboración de microesferas (Lohani & Chaudhary, 2012).

Los polímeros mucoadhesivos pueden ser solubles en agua o insolubles, pero deben permitir contar con redes hinchables, poseer una polaridad óptima que permita el mojado de la esfera por la mucosa y permitir una óptima difusión del contenido al sitio de absorción. Estos polímeros se pueden dividir en tres clases de acuerdo a su adherencia a la mucosa y epitelio: (Lohani & Chaudhary, 2012)

- Polímeros que presentan mucoadhesión debido a que al contacto con agua se vuelven pegajosos.
- Polímeros que se adhieren a través de interacciones no específicas, en su mayoría se deben a electrostática.
- Polímeros que se adhieren a través de receptores específicos en la superficie de absorción.

A nivel molecular deben contar con ciertas características: deben de tener en su estructura grupos que pueden formar enlaces fuertes de hidrogeno (-OH, -COOH), cargas aniónicas fuertes, flexibilidad suficiente para penetrar la mucosa, tensión superficial que permita el mojado de la partícula y un alto peso molecular (Asane et al., 2008).

Según Harshard et al, 2010, (Harshard, Sunil, Nayan, Bhushan, & Sunil, 2010), para que un polímero mucoadhesivo pueda ser utilizado como componente de microesferas, debe cumplir con ciertas características:

- El polímero y sus productos de degradación no deben ser tóxicos y no deben ser reabsorbibles.
- No debe irritar la mucosa de la membrana.
- Debe formar preferentemente enlaces fuertes no covalentes con la mucina epitelial.
- Debe adherirse rápidamente al tejido y poseer especificidad.
- Deben ser estables durante su vida de anaquel.
- El polímero utilizado debe ser económico para que la formulación sea competitiva en el mercado.

Además de las clasificaciones antes mencionadas, los polímeros mucoadhesivos pueden clasificarse también en: no específicos (primera generación) y específicos (segunda generación) (Kaurav, HairiKumar, & Kaur, 2012). En el caso de los de primera generación se dividen en: (Kora Pattabhi Rama Chowdary & Rao, 2004)

- Polímeros hidrofílicos
Son polímeros solubles en agua que se hinchan indefinidamente al contacto con agua y eventualmente se disuelven. (Hidroxipropilmetilcelulosa, carbomeros, carboximetilcelulosa)
- Hidrogeles
Se trata de polímeros que se hinchan al contacto con agua, pero tienen un límite de hinchamiento que una vez alcanzado no permite más absorción de agua. (Carrageninas, carbopoles, goma guar, alginato sódico)
- Polímeros termoplásticos
Son polímeros que al degradarse generan grupos carboxílicos, los cuales le brindan propiedades mucoadhesivas.

En el caso de los de segunda generación, permiten una adhesión más específica en el sitio deseado. Esta es una desventaja grave que sufren los polímeros de primera generación ya que se adhieren a cualquier superficie mucosa con la que entren en contacto, entre estos se incluyen: lecitinas, componentes bacterianos, polímeros tiolados, anticuerpos y algunas secuencias de aminoácidos (Vasir, Tambwekar, & Garg, 2003).

2.3.4 Mucoadhesión

Comúnmente, los términos bioadhesión y mucoadhesión son confundidos, por lo que es necesario indicar que no son lo mismo. El primero se refiere a la adhesión que puede

existir entre un componente biológico y uno sintético, el segundo está relacionado únicamente a la adhesión que existe entre un polímero y una membrana mucosa (Mahammed, Alli, Ali, Fatmah, & Fatmah, 2011).

Esta aclaración es importante ya que las microesferas mucoadhesivas tienen como objetivo aprovechar las membranas mucosas que se encuentran en: ojos, cavidad nasal, urinaria, bucal, vaginal, y tracto gastrointestinal (Vinod, Rohit Reddy, Sandhya, Banji, & Venkatram Reddy, 2012).

▪ **Mecanismos de mucoadhesión**

La mucoadhesión es un fenómeno complejo que envuelve el mojado, absorción y penetración de las cadenas del polímero (Jain et al., 2012). En sistemas sólidos la mucoadhesión ocurre en los siguientes pasos: (Ankita & Prashant, 2012)

1. Contacto íntimo entre un polímero mucoadhesivo y la membrana mucosa.
2. Penetración del sistema mucoadhesivo en el tejido o en la superficie mucosa de la membrana
3. Interpenetración de las cadenas poliméricas con la mucosa, para permitir la formación de enlaces.

La unión entre la mucosa y las microesferas ocurre de forma tanto física como química, resultado del hinchamiento del polímero y la formación de enlaces como: cargas electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y fuerzas de dispersión (Gandhi, Pandya, Umbarkar, & Tambawala, 2011).

▪ **Teorías de mucoadhesión**

Actualmente existen algunas teorías propuestas que pueden mejorar el entendimiento del fenómeno de mucoadhesión, de acuerdo al mecanismo de adhesión existen las de tipo químico (electrónica y absorción) y las de tipo físico (mojado, difusión y fractura) (Vasir et al., 2003). Estas teorías se describen en la Tabla 6.

Teoría	Mecanismo de Mucoadhesión	Comentarios
Teoría de Mojado	Capacidad de un polímero bioadhesivo de extenderse y desarrollar contacto íntimo con la membrana mucosa	El coeficiente de dispersión del polímero debe ser positivo y el ángulo de contacto entre el polímero y las células debe estar cercano a cero
Teoría Electrónica	Fuerzas electrostáticas atractivas entre las glicoproteínas de la red de mucina y el material bioadhesivo	La transferencia de electrones ocurre entre el sistema y la mucosa formando una doble capa de carga eléctrica en la interfase
Teoría de Absorción	Fuerzas de superficie que forman enlaces físicos/químicos semipermanentes	Fuerzas primarias fuertes: enlaces covalentes Fuerzas débiles secundarias: enlaces iónicos, puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals
Teoría de Difusión	Entrecruzamiento físico de la mucina en las cadenas flexibles del polímero e interpenetración de la mucina en la estructura porosa del polímero	Para una máxima difusión y la mejor fuerza bioadhesiva: los parámetros de solubilidad del material bioadhesivo y las glicoproteínas de la mucosa deben ser similares
Teoría de Fractura	Analiza la fuerza tensil máxima desarrollada durante el desprendimiento del sistema bioadhesivo de la superficie mucosa	No requiere de entrecruzamiento físico de las cadenas del polímero bioadhesivo y de la mucosa, por lo que es apropiado para estudiar la bioadhesión de polímeros que no tienen cadenas flexibles

Tabla 6. Teorías de la mucoadhesión. Se presentan las teorías que se utilizan actualmente para explicar el fenómeno de mucoadhesión y su respectivo mecanismo de acción (Sharma, Singh, Kumar, & Singh, 2012).

▪ Factores que afectan la mucoadhesión

La mucoadhesión de las microesferas con la membrana mucosa depende de los siguientes factores: (Tangri et al., 2011)

- Factores relacionados al polímero
 - Peso molecular
 - Concentración utilizada
 - Flexibilidad de las cadenas
 - Factor de hinchamiento
 - Hidrofilicidad
 - Formación de puentes de hidrogeno
 - Ionización del polímero

- Factores físicos
 - pH en la interface del substrato del polímero
 - Fuerza aplicada por la microesfera sobre la mucosa
 - Tiempo de contacto

- Factores fisiológicos
 - Tiempo de recambio de la mucosa
 - Enfermedad

2.3.5 Mecanismos de liberación

Una vez que el fármaco se encuentra asociado a las micropartículas, la acción de éste determinará la actividad del sistema farmacéutico. Dicha actividad está directamente relacionada con la velocidad en que el fármaco se encontrara disponible para su absorción. Por esto es importante mencionar los mecanismos de liberación del fármaco, ya que uno de los puntos principales y ventajas de las microesferas se relacionan con la liberación controlada. La liberación dependerá de la formulación empleada para sintetizar las

microesferas, pero según Imran et al, 2012 (Imran Abdul, Shahi, Thube, & Ankit, 2012), se pueden considerar los siguientes mecanismos:

- Liberación por erosión o degradación del polímero
- Difusión a través de los poros de la estructura
- Liberación de la superficie del polímero
- Liberación iniciada por un campo oscilante o sónico.

La liberación puede verse afectada por algunos factores los cuales deben considerarse y tomarse como punto de partida al momento de establecer un perfil de liberación, se enlistan a continuación los más importantes: (Imran Abdul et al., 2012)

- Fármaco
 - Ubicación dentro de la esfera
 - Peso molecular
 - Propiedades Fisicoquímicas
 - Concentración
- Microesfera
 - Cantidad de polímero empleado
 - Tamaño y densidad
 - Tipo de síntesis
- Condiciones externas
 - PH
 - Polaridad
 - Presencia de enzimas

2.3.6 Métodos de Preparación de microesferas

La preparación de microesferas debe satisfacer ciertos criterios para ser viable, a continuación se mencionan algunos: (Agrawal et al., 2012)

1. La habilidad de incorporar altas concentraciones del fármaco en su estructura
2. Estabilidad de la preparación durante su vida de anaquel
3. Un tamaño de partícula uniforme
4. Liberar el fármaco de manera controlada
5. Ser biocompatible con el organismo para evitar escenarios de citotoxicidad

Existen diferentes técnicas para la elaboración de microesferas a continuación se mencionan las más importantes: (Ali et al., 2012)

- Emulsión entrecruzamiento/desnaturalización química
- Emulsificación/gelación iónica
- Evaporación de solvente
- Microencapsulación en caliente
- Remoción de solvente
- Gelificación iónica
- Spray drying
- Inversión de fase
- Método de coacervación

La selección del método dependerá de los polímeros y el fármaco que se vayan a utilizar, además de otras características como el tamaño de partícula deseado. En la Tabla 7 se describen algunos métodos.

Método de Preparación	Tamaño de partícula (µm)	Polímeros	Comentarios
Evaporación de Solvente	1-100	Polímeros relativamente estables	Polímeros lábiles que podrían degradarse durante la fabricación por presencia de agua
Microencapsulación en Caliente	1-1000	Polímeros hidrolábiles, con peso molecular de 1000 a 50000	Se obtienen superficies externas densas y lisas en las microesferas
Remoción de Solvente	1-300	Polímeros con alto punto de fusión	Se utilizan solventes orgánicos en lugar de agua
Spray Drying	1-10	_____	Utilizada para microesferas de diagnóstico en el intestino
Gelificación Iónica y Extrusión	1-1000	Chitosan, CMC, alginato	Utilizado para encapsular células
Inversión de Fase	0.5-5.0	Poliánhidridos	Existe poca pérdida de polímero y fármaco durante la fabricación

Tabla 7: Métodos para preparación de microesferas poliméricas. Se muestran los métodos más utilizados en la actualidad para la fabricación de microesferas poliméricas y se indica el tamaño de partícula esperado para cada método (Vasir et al., 2003).

▪ Gelificación Iónica

De los métodos anteriores uno de los que destaca por su facilidad y además al ser muy económico es la gelificación iónica. Este método se basa en la utilización de polímeros que formen geles en solución acuosa, y que permitan la incorporación del fármaco ya sea en solución o de manera dispersa. Para llevar a cabo la formación de las microesferas por este método es necesario gotear la solución polimérica en una solución que contenga iones divalentes positivos, ya que la mayoría de los polímeros utilizados para este fin contienen cargas aniónicas por contener grandes cantidades de grupos carboxilos, se produce un entrecruzamiento debido a las cargas formándose así estructuras solidas definidas. Tiene la ventaja de ser un método barato y bastante seguro porque se evita la utilización de solventes, además de que es posible obtener un tamaño de partícula deseado ya que se puede utilizar extrusores de diferentes tamaños para gotear la solución (Vasir et al., 2003). En la Figura 8 se muestra ejemplo de cómo se realizan las microesferas

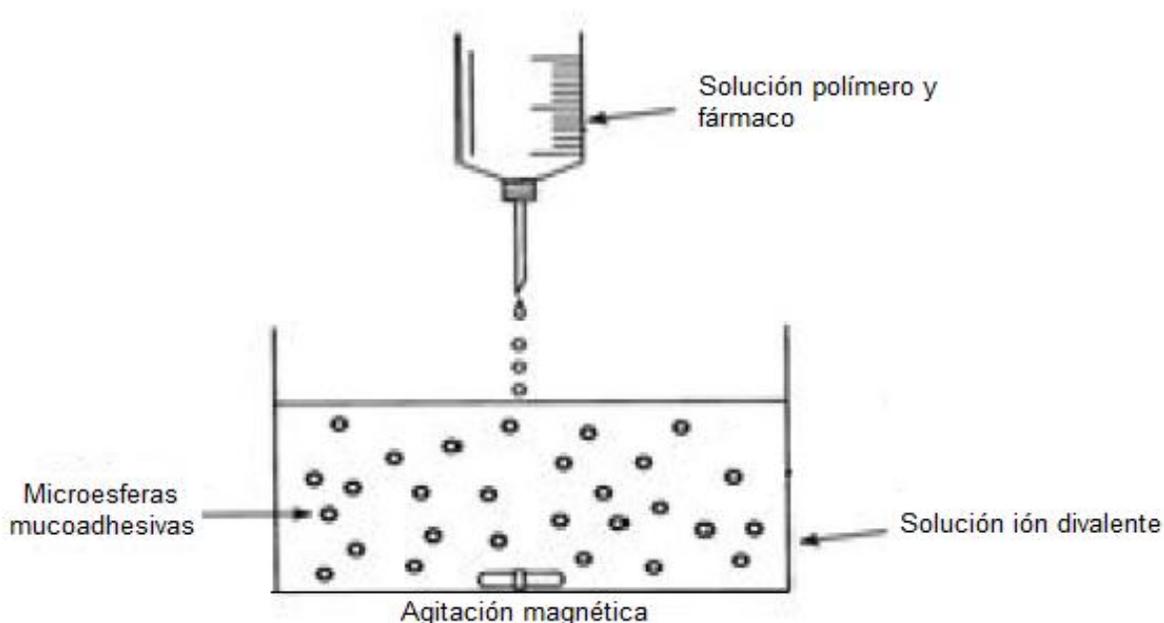


Figura 8. Gelificación Iónica. Representación grafica de la técnica de gelificación iónica, se forma una estructura polimérica por la interacción de enlaces aniónicos del polímero con iones divalentes en la solución.

3. Antecedentes

Actualmente no existen en el mercado microesferas poliméricas mucoadhesivas para la administración de selenio (en ninguna de sus formas) en animales, de hecho la utilización de microesferas es muy limitada en lo que respecta a la administración de cualquier fármaco en animales.

Sin embargo Jay et al, 2006, (Jay, Peevy, Jenkins, & Burg, 2006), utilizaron microesferas poliméricas para la administración de ácidos grasos insaturados en rumiantes, indicando que son un excelente medio para proteger y hacer mas específico su sitio de absorción. Con lo cual de acuerdo a sus resultados concluyen que pueden ser una opción excelente para suplementar nutrientes en animales.

Esta idea al parecer no ha pasado desapercibida, existen actualmente registradas algunas patentes que pretenden hacer uso de de las ventajas que presentan los sistemas microparticulados.

Se tiene registro de patentes como la de Serfontein, 1996, (Serfontein, 1996) que mencionan la utilización de sistemas microparticulados compuestos de polímeros orgánicos que tengan la capacidad de encapsular y liberar de manera controlada sustancias como vitaminas o minerales, esto con el fin de poder suplir deficiencias nutricionales.

De igual manera Harel, 2005, (Harel, 2005) registro una patente en la cual pretende la utilización de micropartículas para la administración de compuestos como: vitaminas, minerales, ácidos grasos, carotenoides, probióticos, hormonas, etc. Además menciona que presentan liberación preferentemente en intestino delgado y otras características como liberación controlada.

Por otro lado Liggins et al, 2006, (Liggins, Toleikis, & Guan, 2006), cuentan con una patente en la cual se pretende el uso de micropartículas para la administración de agentes bioactivos, además menciona que estas pueden contar con una eficiencia de encapsulación de más del 50%.

Nuevamente Harel et al. 2010, (Harel & Carpenter, 2010) registran una patente con la cual pretenden el uso de micropartículas mucoadhesivas para la administración de proteínas en animales y peces, ya que mencionan que la utilización de las mucosas mejora la biodisponibilidad y tiempo de residencia del fármaco administrado.

De acuerdo a esto se puede decir que las microesferas, al ser sistemas microparticulados presentan un gran campo de oportunidad para nuevos desarrollos para terapias en animales, además de que si se agrega la capacidad mucoadhesiva la efectividad de estos tratamientos mejorara. Estas características están ligadas a los polímeros que se utilicen para su fabricación, por lo que es necesario seleccionar los que mejores propiedades aporten al sistema microparticulado.

Actualmente en muchos estudios se ha tenido excelentes resultados en la elaboración de microesferas mucoadhesivas con los siguientes polímeros:

- Alginato sódico
- Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)
- Carboximetilcelulosa (CMC)
- Carbopol 971p

Tomando el caso de Chan et al, 2006, (Chan, Lee, & Heng, 2006), mencionan que la utilización de alginato de sodio puede presentar muchas ventajas, en especial para sistemas que pretendan una liberación en el intestino. Debido a que a pH ácido, como el del estómago, se lleva a cabo la formación de ácido algínico el cual disminuye la entrada o salida de agua, por lo que al reducirse el hinchamiento se puede evitar la salida del fármaco al momento de su encapsulación y también la salida del fármaco al momento de pasar por el estómago.

Por su parte Kamal et al, 2010, (Kamal, Arya, Singh, & Juyal, 2010), mencionan que la CMC aumenta la captura de fármacos y le da una superficie exterior más lisa. Esto es muy útil ya que una mejor captura reduce costos y mejora los tratamientos, una superficie lisa mejora su manipulación ya que factores como el secado de microesferas promueven la formación de superficies rugosas o agrietadas.

En el caso de Belgamwar et al, 2009, (Belgamwar, Shah, & Surana, 2009), indican que el HPMC es muy bueno en las propiedades del gel ya que permite una mejor “jeringabilidad” y aparte puede mejorar la liberación del fármaco de la partícula porque se hincha más.

Sobre el tema de carbopoles Kumar et al, 2011, (Kumar, Singh, Nath, & Kant, 2011), concluyeron que el carbopol 971p da rigidez a las partículas, ayuda a retardar la liberación del fármaco porque se hincha menos y produce una estructura tridimensional que es más resistente a la difusión y erosión.

Finalmente Svanarayana et al, 2012 y Chowdary et al, 2009, (Sivanarayana, Kishore, & Kumar, 2012) y (K P R Chowdary, Deepthi, & Rao, 2009) concuerdan que el Alginato sódico, HPMC, Carbopol 971p y CMC tienen muy buena mucoadhesión. Por su parte (Kao, Lo, Lin, & Yu, 2006; Nunamaker, 2007; Reeves, Ribeiro, Lombardo, Boyer, & Leach, 2010) mencionan que ninguno de los polímeros antes mencionados presentan evidencia de toxicidad a nivel celular.

Debido a estas razones se puede decir que una formulación de microesferas poliméricas mucoadhesivas que incluya los cuatro polímeros podría resultar muy benéfico para los fines de este trabajo de tesis y además será una innovación en los sistemas de administración microparticulados, ya que no existen actualmente investigaciones que tengan el propósito de suplementar selenio a través de este tipo de sistemas.

4. Justificación

La deficiencia de selenio en animales de consumo humano resulta en grandes pérdidas a nivel nacional debido a la pobre calidad de la carne producida por estos animales deficientes. En la actualidad se utilizan suplementos que muchas veces resultan de difícil administración o de un gran costo, además de que presentan altos riesgos de toxicidad debido al margen terapéutico tan estrecho que presenta el selenito de sodio, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas, más económicas y seguras, que faciliten su aplicación a gran escala. El desarrollo de microesferas poliméricas mucoadhesivas que contengan selenio, mejorara la biodisponibilidad de este mineral en el organismo y de esta forma será una opción a considerar y que eventualmente permitirá disminuir considerablemente los costos del tratamiento y del esquema de administración del elemento.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

Desarrollar una formulación con propiedades mucoadhesivas y que tenga la capacidad de capturar grandes cantidades de selenito de sodio, a través de la elaboración de microesferas que sean inocuas a nivel celular y faciliten la absorción del fármaco administrado.

5.2 Objetivos Particulares

- Diseñar microsistemas capaces de capturar una cantidad suficiente de selenito de sodio.
- Caracterizar las formulaciones obtenidas en función de su tamaño de partícula, mucoadhesividad y eficacia de captura de selenito de sodio.
- Evaluar la citotoxicidad de la formulación prototipo, realizando ensayos de viabilidad celular in-vitro (prueba MTT) y los efectos asociados al estado de óxido-reducción en líneas celulares renales (VERO) mediante la estimación de glutatión reducido (GSH).

6. Hipótesis

Mediante el uso de polímeros mucoadhesivos (Alginato de sodio, carbopol 971p, Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y Carboximetilcelulosa (CMC)) se podrán obtener microesferas capaces de encapsular grandes cantidades de selenito de sodio y permanecer adheridos a la mucosa del intestino delgado, de igual forma se estimará si las microesferas obtenidas son citotóxicas y si modifican la concentración de GSH intracelular en las líneas celulares VERO (Células de riñón de mono africano verde). El conocimiento de estos parámetros permitirá su aplicación futura a nivel veterinario.

7. Materiales y Métodos

La elaboración y caracterización de las microesferas poliméricas mucoadhesivas con selenito de sodio se llevo a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR), la cuantificación de selenio por espectrofotometría de absorción atómica se llevo a cabo en el laboratorio 15 de la unidad multidisciplinaria, el análisis por microscopia de contraste de fases se llevo a cabo en el laboratorio de apoyo a histología y biología, los estudios de citotoxicidad se llevaron a cabo en el laboratorio de toxicológica celular de la unidad de investigación multidisciplinaria.

Todos estos ubicados en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (Campo 4), Universidad Nacional Autónoma de México, Km 2.5 Carretera Cuautitlán–Teoloyucan, S. Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Edo. México, CP.54714. Tel: 56231999 ext.39415.

7.1 Materiales y Reactivos

El alginato de sodio (Protanal LF-120M, Manuacol LKX y Keltone LVCR) y las carrageninas (Viscarin GP 209NF, Gelcarin GP 911NF y Gelcarin GP 812NF) fueron proporcionados por FMC Biopolymers, el Carbopol 971p NF fue proporcionado por Lubrizol, la Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y la Carboximetilcelulosa (CMC) por DVA. Todos los demás reactivos y solventes utilizados fueron grado analítico.

7.2 Preformulación

El primer paso, para la elaboración y selección adecuada de los componentes de la formulación fue llevar a cabo diferentes estudios preliminares los cuales tuvieron el propósito de establecer condiciones de preparación, concentración de polímeros, solución crosslink y selección del mejor polímero para estructurar el sistema.

▪ Selección de polímero base

Para la elaboración de las microesferas se busco un polímero que le diera su estructura principal, para ese propósito se contaba con diferentes presentaciones de carrageninas y alginatos.

Se elaboraron 12 lotes en los cuales se vario la concentración del polímero (1.5 y 2.5% p/v), se utilizo una concentración de 10% del agente crosslinker (CaCl_2) en el caso de polímeros aniónicos y para los polímeros catiónicos Tripolifosfato (TPP) y un tiempo de agitación de 5 min. Se evaluó si estos sistemas eran capaces de formar microesferas. Este diseño se muestra en la Tabla 8.

Lote	Polímero	Clase	Concentración polímero (%)	Agente crosslinker	Concentración Crosslinker (%)	Tiempo agitación (min)	Formación microesferas
1		Keltone LVCR	1.5				NO
2			2.5				SI
3	Alginato	Manucol LKX	1.5	CaCl ₂	10	5	NO
4			2.5				SI
5		Protanal LF-120M	1.5				NO
6			2.5				SI
7		Viscarin GP-209	1.5	CaCl ₂			NO
8			2.5				
9	Carragenina	Gelcarin GP-911	1.5		10	5	NO
10			2.5	TPP			SI
11			1.5				NO
12		Gelcarin GP-812	2.5				NO

Tabla 8. Selección del polímero estructurante. Este diseño se utilizó para evaluar los diferentes polímeros disponibles y si eran capaces de formar microesferas a las condiciones establecidas

Por lo tanto se descarto las carrageninas y se selecciono a los alginatos como mejor opción para la elaboración de las microesferas.

▪ Selección de clase de alginato

Para seleccionar la clase de Alginato a utilizarse se realizaron 3 pruebas con polímeros diferentes por duplicado, en los cuales permanecieron las condiciones anteriores de fabricación y se evaluó la viscosidad (Tabla 9).

Lote	Polímero	Concentración polimero (%)	Concentración Crosslinker (%)	Tiempo agitación (min)	Formación microesferas	Viscosidad
1	Keltone LVCR				SI	Muy Baja
2						
3	Manucol LKX	2.5	10	5	SI	Muy Baja
4						
5	Protanal LF-120M				SI	Baja
6						

Tabla 9. Evaluación de la Viscosidad. Se determino la viscosidad de los diferentes tipos de alginatos disponibles para seleccionar el más útil.

▪ Tipo de secado

Por último se realizaron 4 lotes con Protanal LF-120M para evaluar el tipo y tiempo de secado, lo cual permitió seleccionar el más sencillo, rápido y conveniente para retirar el agua de las microesferas poliméricas. Este diseño se muestra en la Tabla 10.

Lote	Polímero	Concentración polimero (%)	Concentración Crosslinker (%)	Tiempo agitación (min)	Tipo de secado	Tiempo secado (hrs)
1	Protanal LF-120M	2.5	10	5	Estufa	6
2					Estufa	12
3					Ambiente	6
4					Ambiente	12

Tabla 10. Evaluación de condiciones de secado. Diseño que permitió seleccionar el tipo y tiempo de secado adecuado para las microesferas.

Por lo que de acuerdo a estos estudios exploratorios se selecciono:

- Alginatos
- Protanal LF-120M
- Concentración polímero: 2.5% final
- Concentración agente crosslinker: 10%
- Tiempo de agitación: 5 min
- Tipo de secado: Ambiente

7.3 Plan experimental

7.3.1 Matriz experimental

Para la optimización del porcentaje de captura de selenio en las microesferas, se planteo un plan experimental con 13 formulaciones diferentes las cuales se aleatorizaron para su preparación. El tamaño de lote para cada formulación fue de 30mL, el porcentaje de selenito de sodio y del alginato de sodio se mantuvieron fijos en todas las formulaciones. La Tabla 11 reagrupa los factores considerados y define sus niveles estudiados. A cada factor se le asocio una X_i , que es una variable codificada, la cual tomo respectivamente los valores entre -1 a 1. Los niveles de cada factor se codificaron con la siguiente ecuación:

$$X_i \text{ codificada} = 2 \frac{X_i \text{ no codificada} - \bar{X}_i}{X_{i_{max}} - X_{i_{min}}}$$

Donde:

$X_i \text{ no codificada}$ = concentración del factor (mg)

\bar{X}_i = representa el nivel central del intervalo de variación de X_i (mg)

Xi_{max} = concentración máxima del factor (mg)

Xi_{min} = concentración mínima del factor (mg)

Factor (unidades)	Niveles de Xi				
	-1	-0.667	-0.333	0.333	1
X1= carbopol 971p (mg)	0	50	100	200	300
X2= carboximetilcelulosa (mg)	0	50	100	200	300
X3= hidroxipropilmetilcelulosa (mg)	0	50	100	200	300

Tabla 11. Factores considerados en el plan experimental con sus respectivos niveles.

La composición de cada formulación se muestra en la Tabla 12, especificando los factores no codificados y los codificados.

Formulación	Factores en unidades experimentales			Factores codificados		
	Carbopol (mg)	CMC (mg)	HPMC (mg)	Carbopol	CMC	HPMC
1	100	100	100	-0.3333	-0.3333	-0.3333
2	200	100	0	0.3333	-0.3333	-1
3	50	200	50	-0.6667	0.3333	-0.6667
4	0	0	300	-1	-1	1
5	100	200	0	-0.3333	0.3333	-1
6	0	100	200	-1	-0.3333	0.3333
7	200	0	100	0.3333	-1	-0.3333
8	300	0	0	1	-1	-1
9	100	0	200	-0.3333	-1	0.3333
10	0	200	100	-1	0.3333	-0.3333
11	0	300	0	-1	1	-1
12	200	50	50	0.3333	-0.6667	-0.6667
13	50	50	200	-0.6667	-0.6667	0.3333

Tabla 12. Plan experimental

7.3.2 Evaluación de resultados

La evaluación de los resultados se hizo mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion XV versión 15.2.05, con el modulo de modelos lineales generalizados

El modelo estadístico que se considero para cada respuesta fue:

$$Y_i = \mu + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_4X_1X_2 + b_5X_1X_3 + b_6X_2X_3 + b_7X_1X_2X_3 \\ + b_8X_1X_1 + b_9X_2X_2 + b_{10}X_3X_3 + error$$

Donde:

μ = media general

X1= nivel de carbopol 971p

X2= nivel de CMC

X3= nivel de HPMC

7.4 Preparación de Microesferas

Las microesferas poliméricas se elaboraron mediante el método de gelificación iónica, en total se realizaron 13 lotes de acuerdo al diseño de mezclas establecido. Para la preparación de cada lote se utilizarón las cantidades expresadas en la Tabla 13, se disolvieron en 30mL de agua ultra pura y se sometieron a agitación magnética durante 5 min.

Para la formación de las microesferas se tomaron 25 mL de la solución de polímeros y se hicieron pasar a través de una jeringa, se recibieron en una solución de CaCl₂ al 10% y se dejaron en agitación por 5 min. Posteriormente se filtraron, se lavaron con agua ultra pura y finalmente se dejaron secar durante 12 hrs.

Formulación	Protanal LF-120M (mg)	Carbopol 971p (mg)	CMC (mg)	HPMC (mg)	Selenito de Sodio 45% (mg)
1	750	100	100	100	350
2	750	200	100	0	350
3	750	50	200	50	350
4	750	0	0	300	350
5	750	100	200	0	350
6	750	0	100	200	350
7	750	200	0	100	350
8	750	300	0	0	350
9	750	100	0	200	350
10	750	0	200	100	350
11	750	0	300	0	350
12	750	200	50	50	350
13	750	50	50	200	350

Tabla 13. Componentes y cantidades de las formulaciones. Estas cantidades fueron las que se utilizaron para las formulaciones del diseño de mezcla para la evaluación de las respuestas.

7.5 Evaluación de microesferas

Para la caracterización de las microesferas poliméricas se realizaron las siguientes pruebas:

7.5.1 Tamaño de partícula

Esta prueba se llevo a cabo mediante un análisis de mallas, para esto se utilizo un juego de tamices estandarizado marca Mont Inox, los números de malla utilizados fueron: 16, 18, 20 y 40. Los tamaños de apertura de malla se indican en la Tabla 14.

Para estimar el tamaño de partícula de cada lote se ensablo el juego de tamices, se introdujeron 100 microesferas de cada lote respectivamente y se sometieron 10 min a un movimiento oscilatorio. Concluido el tiempo de tamizado se conto la cantidad de microesferas retenidas en cada tamiz para su posterior análisis.

Numero de malla	Apertura de malla (μm)
10	2000
12	1700
16	1180
18	1000
20	850
25	710
30	600
40	420
50	300
60	250
70	215

Tabla 14. Tamaño apertura de mallas. Estos son los valores de algunos números de mallas que se utilizan para la determinación del tamaño de partícula.

7.5.2 Mucoadhesión

Para evaluar la mucoadhesión se utilizó la prueba de desprendimiento por lavado *in vitro* (*In vitro* wash-off test). Para esta prueba se utilizó el aparato desintegrador USP, se le adaptó un aparato de cuantificación mucoadhesiva múltiple (Figura 9) el cual permitió aprovechar el movimiento ascendente y descendente para 8 muestras al mismo tiempo. Se colocaron dentro del aparato 8 vasos de precipitado de 150ml con solución fisiológica (0.9%) y se programó el baño de agua a 37°C.

Para la evaluación de las microesferas se utilizó intestino delgado seccionado de borrego criollo cara negra, se cortaron trozos de 1cm x 1cm (procurando no desprender la mucosa) y se colocaron en portaobjetos por medio de ligas. Se colocaron 30 microesferas de cada lote en su respectivo portaobjetos, cada muestra se colocó en el aparato desintegrador y se sometió al movimiento del equipo durante 30 min (cada muestra debía sumergirse en su totalidad en la solución fisiológica de cada vaso).

Terminado el tiempo se realizó una inspección visual y conteo de la cantidad de microesferas que permanecían adheridas al tejido para su posterior análisis.



Figura 9. Aparato de cuantificación mucoadhesiva múltiple. Este aparato fue diseñado para facilitar los estudios de mucoadhesión ya que permite realizar 8 determinaciones simultáneas con el desintegrador de la USP.

7.5.3 Cuantificación de selenio

Para la evaluación del contenido de selenio en las microesferas poliméricas fue necesario realizar una digestión ácida, para esto se utilizó el horno de microondas MARS-digestión CEM (Figura 10).



Figura 10. Microondas para digestión ácida. Equipo empleado para la digestión de las microesferas para retirar la materia orgánica y dejar únicamente el selenio para su cuantificación.

Se colocó en los tubos de teflón 120mg de microesferas poliméricas correspondientes a cada formulación, se le adicionó 2ml de HNO₃ concentrado y 5mL de agua ultra pura a cada tubo y se sellaron. Las muestras se sometieron a digestión ácida utilizando el proceso “Plasma 0 express” cuyas condiciones se muestran en la Tabla 15.

Etapa	Potencia (w)	Potencia (%)	Rampa (min)	Temperatura (°C)	Mantenimiento (min)
1	1600	75	7	120	2
2	1600	75	7	170	5

Tabla 15. Condiciones operación para microondas digestión ácida. Son las condiciones a las que se llevo la digestión ácida.

Una vez terminado el programa se retiraron los tubos y se dejaron enfriar, se vació el contenido de cada tubo en matraces volumétricos de 25mL y se llevaron a la marca de aforo con ácido acético 1N.

La cuantificación de selenio se llevo a cabo mediante el espectrofotómetro de absorción atómica con generador de hidruros SpectrAA marca Varian ® (Figura 11). Las muestras de las formulaciones y la curva de calibración se leyeron en el aparato a una longitud de onda de 190nm, mediante una lámpara de cátodo hueco de selenio VARIAN 5610127000.



Figura 11. Espectrofotómetro de Absorción Atómica. Equipo utilizado para la cuantificación de selenio en las formulaciones elaboradas.

7.5.4 Grado de hinchamiento

Para esta prueba se evaluó el hinchamiento que presentan las microesferas en buffer HCl (pH 1.2) y en buffer de fosfatos (pH 7.2), para tratar de simular el comportamiento de las microesferas en estomago e intestino delgado respectivamente.

Se peso aproximadamente 250mg de microesferas de cada formulación y se coloco en vasos de 50 mL, se adicionó el buffer correspondiente a cada formulación y se dejó en calentamiento a 37°C durante 12 horas en horno.

Se pesó cada muestra de la formulación a los tiempos 30 min, 1hr y finalmente se pesaron las microesferas a las 12 horas. Para realizar esto se filtraron las microesferas y se secó el exceso de líquido sobre las microesferas con papel filtro, posteriormente se pesó en balanza analítica y se regreso a la solución para continuar la incubación.

Para el cálculo del índice de hinchamiento se utiliza la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de hinchamiento} = \frac{(\text{Peso humedo} - \text{Peso seco})}{\text{Peso seco}} * 100$$

7.5.5 Morfología de las microesferas

Para observar las características morfología de las microesferas se utilizó un microscopio de contraste de fase, se observaron únicamente microesferas de alginato al 3.5% ya que es el polímero estructurante.

7.5.6 Viscosidad

Para complementar los estudios se evaluó la viscosidad de las soluciones de los 13 lotes, previo a la formación de las partículas. Para esto se utilizó un viscosímetro Brockfield modelo RVT, se utilizó la aguja del # 3 y se realizaron las lecturas a 100 rpm. En la Tabla 16 se muestra el factor de conversión para obtener la viscosidad final de acuerdo a la respuesta obtenida por cada lectura.

1		2		3		4		5		6		7	
Rpm	Factor												
0.5	200	0.5	800	0.5	2000	0.5	4000	0.5	8000	0.5	20000	0.5	80000
1	100	1	400	1	1000	1	2000	1	4000	1	10000	1	40000
2	50	2	200	2	500	2	1000	2	2000	2	5000	2	20000
2.5	40	2.5	160	2.5	400	2.5	800	2.5	1600	2.5	4000	2.5	16000
4	25	4	100	4	250	4	500	4	1000	4	2500	4	10000
5	20	5	80	5	200	5	400	5	800	5	2000	5	8000
10	10	10	40	10	100	10	200	10	400	10	1000	10	4000
20	5	20	20	20	50	20	100	20	200	20	500	20	2000
50	2	50	8	50	20	50	40	50	80	50	200	50	800
100	1	100	4	100	10	100	20	100	40	100	100	100	400

Tabla 16. Factor de conversión de viscosidad. En la tabla se muestran los factores de conversión de acuerdo a la aguja y rpm empleada en la determinación.

7.6 Estudios de citotoxicidad

Para los estudios de citotoxicidad se utilizó la línea celular VERO (células de riñón de mono africano verde). Todos los procedimientos y condiciones de trabajo se llevaron a cabo en condiciones de esterilidad, mediante la manipulación de las células en un ambiente controlado y utilizando una campana de flujo laminar.

7.6.1 Cultivo celular

Inicialmente el objetivo fue obtener una cantidad suficiente de células VERO para llevar a cabo los estudios de citotoxicidad, por lo tanto fue necesario mantener su proliferación en frascos para cultivo celular y en un medio nutritivo adecuado.

Para el cultivo celular se emplearon las siguientes soluciones (Todas fueron filtradas a través de una membrana con tamaño de poro de 0.22 μm para garantizar su esterilidad):

- **Medio nutritivo DMEM (Dulbecco's Medium Essential Modified)**. Este medio nutritivo es el indicado para este tipo de línea celular, ya que contiene un 8 % de SFB (Suero Fetal Bovino), además de que se le adiciono 1 % de antibióticos (penicilina y estreptomycin) y 1 % de glutamina.
- **Medio PBS 1x (Buffer de Fosfatos Salino pH 7.4)**. Para preparar 1 L de este buffer se requiere:
 - 8.0g NaCl
 - 0.2g KCl
 - 1.44g Na_2HPO_4
 - 0.2g KH_2PO_4
 - Agua Ultra pura
 - Ajustar pH con NaOH 1N
- **Solución de Tripsina 0.025% + EDTA**.

Se emplearon además los siguientes equipos:

- **Campana de flujo laminar**.
- **Cámara de estabilidad**. Las condiciones controladas que se manejaron fueron:
 - Ambiente de 95% Oxígeno y 5% CO_2
 - Temperatura de 37°C
 - Humedad relativa de 60-70%
- **Microscopio óptico**.

El procedimiento empleado para el manejo de las células fue el siguiente:

1. Retirar en condiciones adecuadas el frasco de cultivo de la cámara de estabilidad y observarla al microscopio.
2. Si la confluencia celular total se encuentra por arriba del 80% se procede a realizar el pase de las células a nuevos frascos de cultivo celular. En caso contrario, realizar una limpieza del medio y colocar nuevamente el frasco en la cámara de estabilidad hasta cumplir con este parámetro.
3. Insertar una pipeta de volumen adecuado y retirar el medio de cultivo del frasco. Es importante no tocar la pared que contiene las células, ni la boquilla del frasco al momento de retirar la pipeta.
4. Lavar 2 veces el frasco con PBS. Esto con la finalidad de retirar las células muertas, además de los iones Ca^{++} y Mg^{++} contenidos en el medio nutritivo.
5. Adicionar una cantidad suficiente de la solución de Tripsina + EDTA al frasco, introducirlo cerrado a la cámara de estabilidad aproximadamente de 1 a 2 minutos.
6. Retirar el frasco de la cámara y realizar un golpeteo moderado del frasco para facilitar el desprendimiento de las células.
7. Observar al microscopio el frasco, si se observa que al menos un 90-95% de las células se encuentran en forma libre en la solución proceder inmediatamente a adicionar 1 mL de medio DMEM para neutralizar la acción de la Tripsina. En caso contrario será necesario continuar el golpeteo del frasco hasta obtener el porcentaje de células libres indicado.
8. Retirar la suspensión celular del frasco con ayuda de una pipeta graduada e introducirla en un tubo para centrifuga.
9. Centrifugar a 3500 rpm por 2 minutos.
10. Retirar el sobrenadante del tubo, procurando dejar una pequeña cantidad de solución para poder resuspender las células.

11. Una vez resuspendidas agregar la cantidad necesaria de medio nutritivo para permitir su pase a nuevos frascos de cultivo celular.
12. Introducir a la cámara de estabilidad, es importante que estos no se cierren completamente para permitir el ingreso del ambiente de la cámara al frasco.

Para mantener las funciones metabólicas y el crecimiento celular adecuado, se debe hacer un cambio del medio nutritivo cada 2 días. El procedimiento empleado se menciona a continuación.

1. Insertar una pipeta de volumen adecuado y retirar el medio de cultivo del frasco. Es importante no tocar la pared que contiene las células, ni la boquilla del frasco al momento de retirar la pipeta.
2. Lavar 2 veces el frasco con PBS. Esto con la finalidad de retirar las células muertas y metabolitos.
3. Adicionar una cantidad suficiente de medio DMEM en el frasco para suplementar nuevamente a las células de los nutrientes necesarios.

7.6.2 Estudios de citotoxicidad

Una vez obtenida una cantidad de células adecuadas se procedió a cultivar las células en cajas petri y en placas de 12 pozos, utilizando el procedimiento anteriormente descrito de los frascos de cultivo celular para extraerlas.

En total se utilizaron 4 placas de 12 pozos (Viabilidad Celular MTT) y 24 cajas petri (Cuantificación de Glutación Reducido GSH), se vigilo su proliferación durante algunos días y una vez logrado alrededor de un 80-90% de confluencia se utilizaron para la realizar los estudios.

Se evaluaron las 2 formulaciones que presentaron las mejores características a nivel tecnológico (formulación 5 y 11), para el estudio se utilizó para las muestras 1 microesfera por placa y pozo. Se estableció además el uso de controles positivos y negativos para poder atribuir los resultados obtenidos a las muestras utilizadas y poderlas diferenciar de las condiciones basales. Cada muestra y control se realizó por triplicado y en el caso de la cuantificación de GSH se hicieron 4 veces.

Para los estudios se utilizó un tiempo de exposición de 4 horas de las células con las muestras, el procedimiento que se utilizó para los estudios se explica en los anexos de este trabajo de tesis.

8. Análisis y Discusión

8.1 Preformulación

La realización de estudios de preformulación permitió seleccionar qué polímeros serían útiles para la elaboración de las microesferas, en este sentido no solo las propiedades mucoadhesivas y la captura son el punto principal, otras características como el comportamiento del polímero a cierto pH, temperatura, viscosidad, concentración e inclusive cargas eléctricas, se deben de tener muy en cuenta. Esto es debido a que características como las primeras se refieren al desempeño de la forma farmacéutica, pero las últimas están íntimamente ligadas a su fabricación, por lo que las primeras son consecuencia de las segundas.

Tomando el primer estudio preliminar que se muestra en la Tabla 8, se partió de alginatos y carrageninas para dar la estructura primaria de las partículas. El motivo principal de elegir estas dos familias se refiere a que ambos son polisacáridos con posibilidad de formar una estructura sólida en contacto con iones opuestos a su carga, en primer lugar los alginatos presentan cargas negativas y como se ha indicado anteriormente estas tienen mayores propiedades mucoadhesivas (Asane et al., 2008), en el caso de las carrageninas se cuenta con cargas positivas (Kappa) a excepción del Viscarin GP-209 que es lambda y por lo tanto presenta cargas negativas (Bonferoni et al., 2004). Hablando de un orden de mucoadhesión relacionado a las cargas se toma como referencia la propuesta por Tangri, 2011, en la cual indica el siguiente orden: anión>cación>no iónico (Tangri, 2011).

Fue importante establecer las concentraciones de los polímeros a utilizar, en un concepto relacionado a la mucoadhesividad, en la literatura se indica que es necesario que la concentración de polímeros se encuentre como mínimo entre el 1-2.5% p/v (Yadav, Gupta,

Kumar, Yadav, & Kumar, 2010), pero como se menciona antes esta característica no es la única a considerar. Al referirse a gelificación iónica se debe tener muy claro que la solución tiene un límite en cuanto a viscosidad permitida, debido a que es necesario hacer que pase a través de un extrusor, por lo que una concentración muy elevada puede dificultar este proceso (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2003). Así que fue necesario establecer una concentración lo suficientemente alta que permitiera formar microesferas poliméricas, pero lo suficientemente baja que permitiera su extrusión a través del bisel de una jeringa. Por lo tanto se decidió utilizar las concentraciones 1.5 y 2.5% p/v, de acuerdo a la idea de tomar como base alguno de estos polímeros y añadir otros secundarios en base a un diseño de mezclas que añadan características propias a la formulación final.

Los resultados indicaron que las carrageninas no eran una opción viable para la gelificación iónica, al menos no a las concentraciones seleccionadas. En su investigación Keppeler et al, 2009, (Keppeler, Ellis, & Jacquier, 2009) trabajaron con carrageninas utilizando gelificación iónica, sus resultados fueron positivos en concentraciones de 3 a 6% p/v, por lo que, en el presente trabajo, utilizar esas concentraciones no permitiría la adición de otros polímeros secundarios a la formulación.

En cuanto a los alginatos se logró formar microesferas en ambas concentraciones empleadas, pero no fueron útiles las de concentración de 1.5% p/v, ya que al secarse perdían toda forma y estructura a las condiciones empleadas, por lo que se optó por la concentración al 2.5% p/v.

De acuerdo a los resultados de ese estudio se eligió como polímero principal el alginato, el cual resulta una elección muy útil debido a que al ser un polisacárido natural extraído de algas marinas presenta una gran biocompatibilidad con organismos animales y además posee características importantes como: alta solubilidad, formación de geles y la posibilidad de crear estructuras poliméricas estables mediante el método de gelificación iónica (K. Draget, Smidsrød, & Skjåk-Bræk, 2005).

Para entender como sucede el fenómeno de gelificación iónica en los alginatos, es necesario conocer su estructura química, la cual está integrada por cadenas heteropoliméricas formadas por la combinación de 2 monómeros, estos son: (1,4) β -D-

manuronato y (1,4) α -L-guluronato (Wee & Gombotz, 1998), su estructura se muestra en la Figura 12.

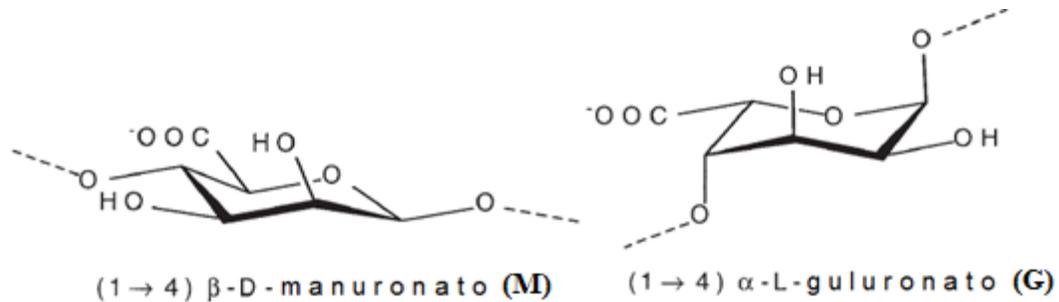


Figura 12. Monómeros presentes en el alginato. Las cadenas heteropoliméricas del alginato se componen de la combinación de estos monómeros. (Myrvold & Onsoyen, 2013).

Estos monómeros pueden formar distintos bloques los cuales darán la estructura final de las cadenas poliméricas del alginato, estas conformaciones darán diferentes propiedades como por ejemplo su solubilidad y formación de geles, en la Figura 13 se muestran las diferentes conformaciones que pueden tener los monómeros (K. Draget et al., 2005).

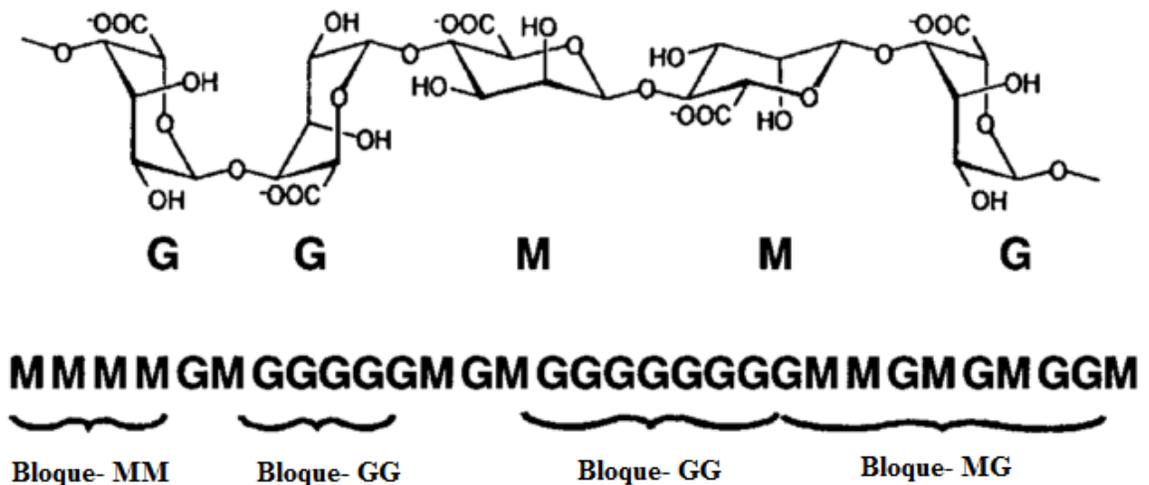


Figura 13. Bloques monoméricos presentes en alginatos. Estas son las posibles combinaciones que pueden formar el guluronato y manuronato.(K. Draget et al., 2005).

Cuando las cadenas de polisacáridos se encuentran en contacto con iones de calcio en solución, ocurre el fenómeno denominado “caja de huevo”, como se muestra en la Figura 14 las cargas negativas de los grupos carboxílicos del alginato interactúan con los iones divalentes de calcio en la solución, formando así estructuras tridimensionales solidas. Estas interacciones únicamente ocurren con el monómero guluronato, por lo que si su proporción es mayor en el polisacárido, se obtendrán microesferas más solidas y estables (Fu et al., 2011).

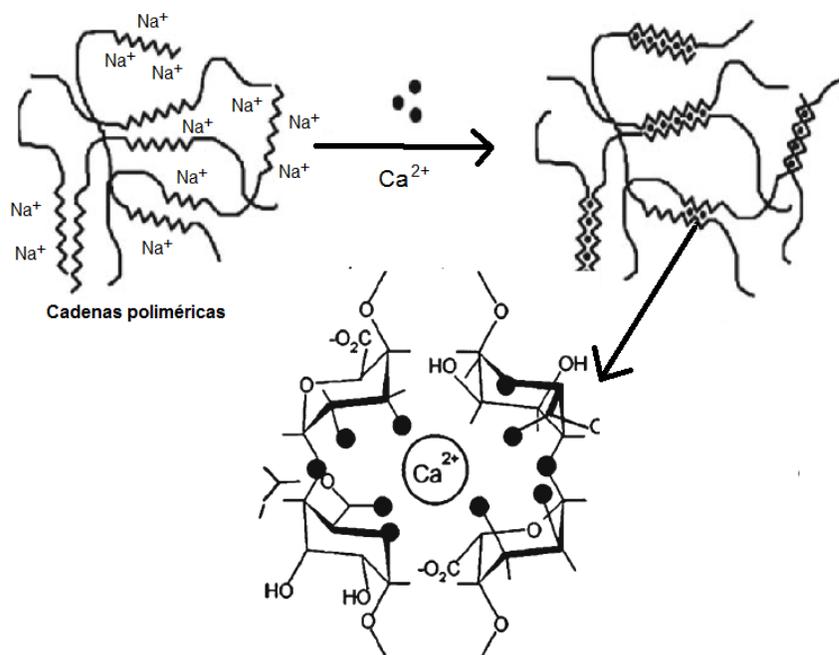


Figura 14. Mecanismo gelificación Iónica. Las cadenas poliméricas del alginato al interactuar con calcio, forman el denominado efecto caja de huevo (Fu et al., 2011).

La gelificación iónica se puede llevar a cabo por dos métodos, estos son: difusión y gelación interna. La diferencia entre estos dos métodos radica en la cantidad de calcio libre disponible en solución, esto puede formar polímeros homogéneos o heterogéneos según la rapidez de reacción, el método de difusión crea polímeros heterogéneos por su gran cantidad de calcio libre, pero tiene la ventaja de poder capturar moléculas de fármaco entre sus cadenas (Steinbuechel, 2009).

En este caso se utilizó el método de difusión, debido a que la sal utilizada (CaCl_2) es muy soluble y la liberación de calcio en solución es inmediata. Al agregar el alginato sódico a la solución de CaCl_2 ocurre un intercambio iónico entre los iones de calcio por los de sodio tanto en la superficie de la microesfera como en el interior, debido a que el alginato se encuentra completamente hidratado, por lo tanto se obtiene una estructura completamente sólida (Steinbuechel, 2009), este método se muestra en la Figura 15.

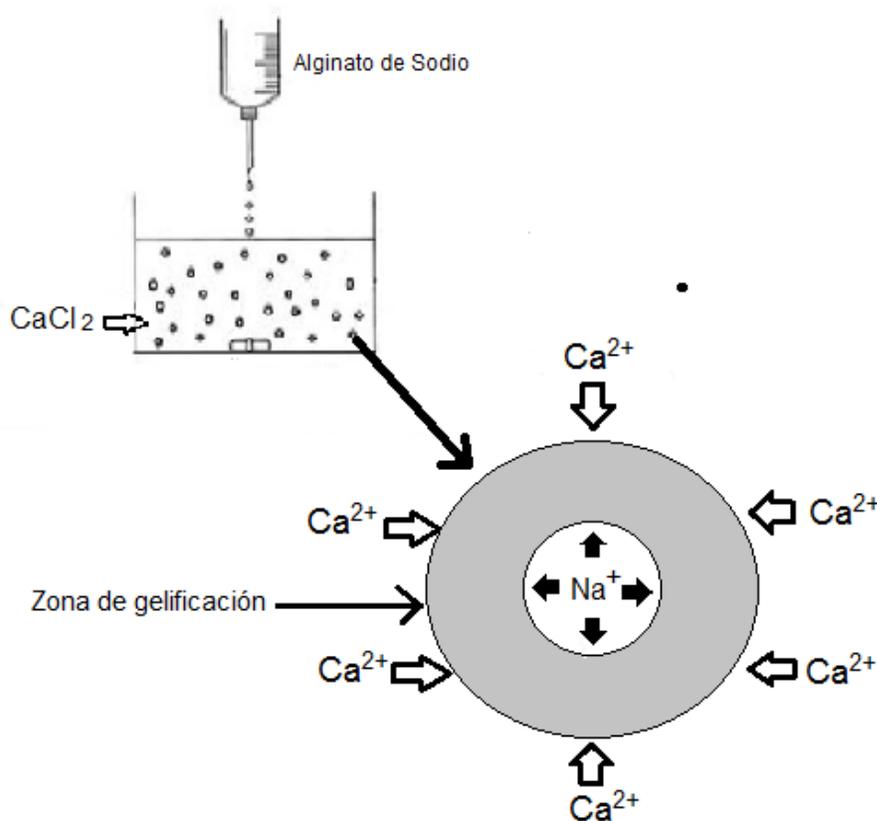


Figura 15. Método de difusión en gelificación iónica. Este método se explica con la difusión de iones de calcio al interior de la microesfera, ya que existe una gran cantidad disponible en solución (K I Draget, 2000).

En el segundo estudio preliminar se evaluaron tres clases de alginato, se pretendió evaluar en este caso la viscosidad como parámetro de eliminación. Los resultados mostrados en la Tabla 9 indican que en el caso del Manuacol y el Keltone presentan muy baja viscosidad, por otro lado el Protanal presenta una viscosidad baja. Estas viscosidades resultaban bastante aceptables para llevar a cabo una extrusión por jeringa, por lo que el parámetro de

selección se tuvo que modificar debido a que estas viscosidades no resultaban ser un problema para la elaboración de microesferas.

Al comparar con la información del fabricante se pudo comprobar que la viscosidad en el caso del manucol y el keltone es muy baja (FMC BioPolymer, 2001, 2005), en el caso del Protanal su viscosidad es mayor en comparación con las otras clases debido a que tienen un mayor peso molecular (Myrvold & Onsoyen, 2013), esta diferencia resulto ser más apropiada para el enfoque del proyecto.

De acuerdo Myrvold, 2013 (Myrvold & Onsoyen, 2013), el Protanal LF-120 M es obtenido de la especie de alga *Lessonia nigrescens*, por lo que de acuerdo a lo mostrado en la Tabla 17 indica que su contenido del bloque polimérico M-G existe en mayor proporción que el G-G. Esto resulta de mucha importancia ya que de acuerdo a Draget, 2001 (Kurt Ingar Draget et al., 2001), los bloques MG aportan una mayor flexibilidad durante la formación de uniones con el calcio, provocando así un mayor empaquetamiento de las cadenas poliméricas, esto aunado a un peso molecular mayor da como resultado la densificación de la estructura de las microesferas, menor porosidad y por lo tanto esto aumentara la captura de fármacos y existirá una menor difusión de estos fuera de la estructura.

Especie de Alga	F_G	F_M	F_{GG}	F_{MG+GM}	F_{MM}
Laminaria hyperborea (tallo)	0.70	0.30	0.57	0.26	0.17
Laminaria hyperborea (hoja)	0.55	0.45	0.26	0.38	0.36
Macrocystis pyrifeira	0.39	0.61	0.16	0.46	0.38
Asophyllym nodosum	0.36	0.64	0.16	0.40	0.44
Lessonia nigrescens	0.40	0.60	0.22	0.38	0.40
Laminaria japonica	0.34	0.66	0.16	0.36	0.48
Laminaria digitala	0.41	0.59	0.25	0.32	0.43

Tabla 17. Fracción de bloques monoméricos en alginatos según especie. Estos son algunos ejemplos del contenido monomérico de alginatos en distintas especies de algas (Myrvold & Onsoyen, 2013).

Por estas razones se decidió utilizar el Protanal LF-120 M ya que el fármaco que se decidió utilizar es el selenio, este mineral presenta un tamaño de partícula muy pequeño y según lo sugerido por Steinbuchel, 2009 (Steinbuchel, 2009), puede existir hasta un 90% de difusión de partículas pequeñas a través de la estructura polimérica, lo cual dificultaría la captura de selenio.

Finalmente en el último estudio preliminar se decidió evaluar el tipo de secado y el tiempo que este duraría, en la Tabla 10 se muestran los sistemas preparados. Este parámetro resulta de gran importancia ya que según Smrdel et al, 2008 (Smrdel, Bogataj, & Mrhar, 2008), el secado puede influir en el tamaño de partícula final y la superficie de las microesferas. Como consecuencia pueden existir afectaciones en la porosidad final y por lo tanto en la liberación del fármaco, en su trabajo Smrdel et al, 2008 mencionan que el mejor tipo de secado en cuanto a los utilizados en la prueba es el secado a temperatura ambiente ya que permite un secado uniforme y controlado, en el caso del secado en estufa este puede colapsar la estructura y crear poros muy grandes por los que se liberaría el fármaco de forma irregular. Esto se demuestra en la Figura 16, donde las microesferas secadas al exterior a temperatura ambiente tienen una estructura más lisa y esférica, a diferencia de las secadas en estufa a 50°C las cuales perdieron su forma esférica.



Figura 16. Microesferas obtenidas con diferentes tipos de secado. En la imagen A se muestran las microesferas completamente hidratadas después de su síntesis, la imagen B se refiere a las microesferas secadas al exterior a temperatura ambiente y la imagen C muestra el resultado de secar las microesferas en estufa a 50°C.

Es por esta razón que el método de secado elegido fue al exterior a temperatura ambiente, el tiempo de secado se dejó en 12hrs ya que con ese tiempo se garantiza una eliminación casi completa del agua sin afectar su estructura.

Para completar este estudio se llevaron a cabo pruebas en el microscopio de transición de fase, marca UNICO®, modelo IV900. Se observó las microesferas para conocer su superficie y si era posible observar su interior. Como resultado se obtuvieron algunas imágenes (Figura 17) que muestran la presencia de canales o espacios que son bastante coherentes ya que debido al efecto de caja de huevo se forman espacios entre las cadenas donde puede capturarse moléculas, también se observa que aunque son bastante esféricas presentan relieves, esto facilitará el mojado de las microesferas y por lo tanto facilitará su hinchamiento y posterior liberación (Tavakol, Vasheghani-farahani, & Hashemi-najafabadi, 2013).

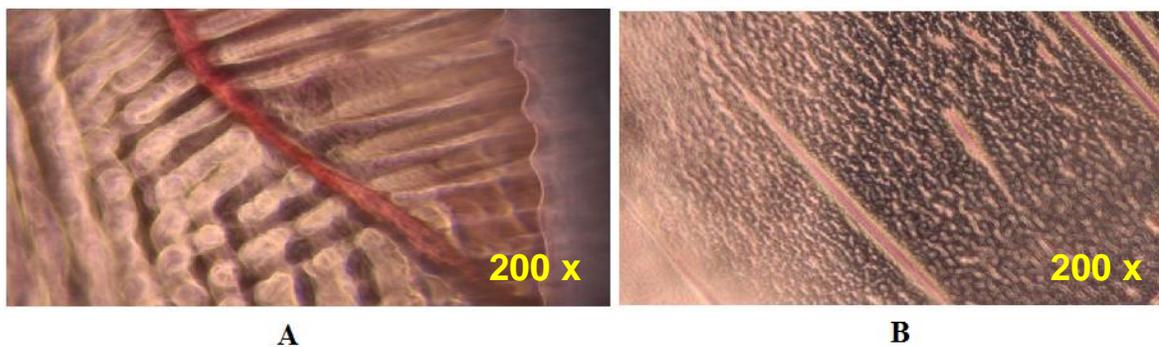


Figura 17. Estructura interna y externa de las microesferas de alginato. En la imagen A se muestra la presencia de espacios entre las cadenas poliméricas debido al efecto caja de huevo, en la imagen B se muestra los relieves presentes en contorno de las microesferas. Estas imágenes fueron tomadas con un microscopio de contraste de fases en las instalaciones del Laboratorio de Apoyo a Histología y Biología, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

8.2 Plan experimental

El alginato de sodio por si solo podría ser un candidato muy completo para elaborar la formulación de microesferas, aun así se cuenta con el riesgo de no ser suficiente para alcanzar los resultados deseados, debido a que el selenito tiene un tamaño de partícula pequeño. En este caso se decidió optar por complementar la formulación con otros polímeros con propiedades similares de captura y mucoadhesión, para así obtener una mejor formulación. Se decidió agregar en este caso HPMC, CMC y carbopol 971p, debido a que en trabajos como los de (Belgamwar et al., 2009; K P R Chowdary et al., 2009; Kumar et al., 2011; Sivanarayana et al., 2012), se han obtenido microesferas con muy buenas características.

En el caso de HPMC se trata de un éter de celulosa (Figura 18), se utiliza muy a menudo para formulaciones de liberación controlada. Esto se debe a que al entrar en contacto con el agua forma una capa de gel y de esta manera se logra que difunda el fármaco del interior al exterior, además de liberarse por la degradación del gel. Esta característica sería de mucha utilidad para las microesferas ya que se lograría un sinergismo para retardar la liberación del fármaco (BHADKE, 2006).

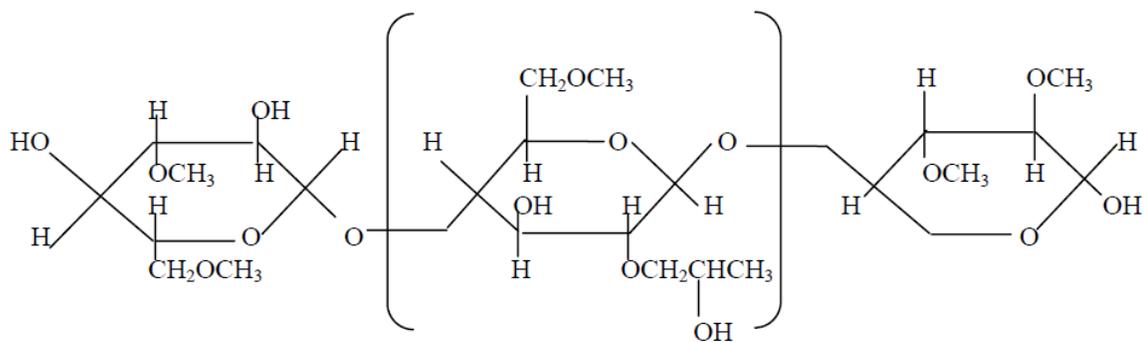


Figura 18. Estructura química de la Hidroxipropilmetilcelulosa (BHADKE, 2006).

La CMC también es un éter de celulosa y uno de los polímeros más utilizados en la actualidad en productos de uso diario y en medicamentos (Figura 19). En la industria farmacéutica se aprovecha su capacidad de formar geles, ya que esto permite elaborar formulaciones de liberación controlada, debido a la formación de canales entre la red polimérica. Debido a su sustitución química es muy soluble en agua, además posee una capacidad de hinchamiento muy importante (Adel, Nada, Abou-Youssef, & El-Gendy, 2010).

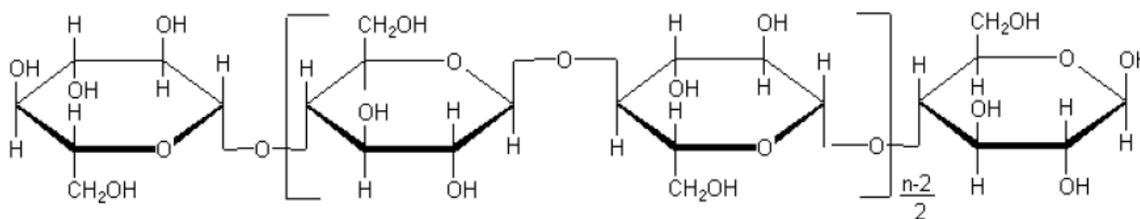


Figura 19. Estructura química de la Carboximetilcelulosa (Adel et al., 2010).

Por otro lado los Carbopoles son polímeros de ácido acrílico entrecruzado con éteres de poli alquenos o divinil glicoles (Figura 20). Dependiendo de su grado de entrecruzamiento y condiciones de manufactura, se pueden obtener distintos grados de carbopoles. En el caso del carbopol 971p se utilizan alil ésteres de pentaeritritol para el entrecruzamiento y para la polimerización se emplea acetato de etilo. Cuentan con muchas características que los hacen muy útiles para su uso en medicamentos, algunas de estas son: prácticamente son inertes biológicamente (por lo que pueden ser un vehículo efectivo) y además se hinchan al dispersarse en agua formando un coloide mucilaginoso que le brinda propiedades muy particulares como la mucoadhesión. Es por estas razones que se utilizan en una gran gama de productos farmacéuticos como: tabletas de liberación controlada, bioadhesivos, cremas, lociones, geles, etc. (Hosmani, Thorat, & Kasture, 2006)

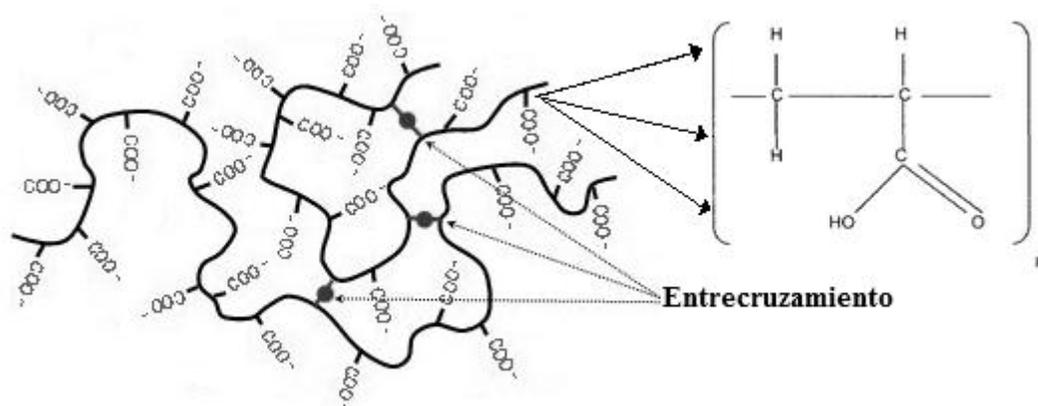


Figura 20. Estructura química del Carbopol. En la imagen se incluye una representación grafica de las cadenas poliméricas del carbopol 971p, se caracterizan por un bajo grado de entrecruzamiento (Hosmani et al., 2006).

De acuerdo a las propiedades de los anteriores polímeros y a la amplia gama de posibilidades que se podría conseguir si se utilizan en conjunto con el alginato se decidió elaborar una formulación que contara con la mezcla de los 4 componentes. Esto resulta benéfico ya que como se menciona anteriormente los tres polímeros cuentan con propiedades mucoadhesivas óptimas y la posibilidad de formar geles y de capturar partículas entre sus redes poliméricas, por lo que estos se adicionarían con los efectos ya presentados por el alginato.

Por lo tanto se diseñó un plan experimental con la finalidad de encontrar la proporción adecuada de los 3 componentes, en el caso del alginato de acuerdo a las pruebas preliminares se decidió mantener una concentración constante de 2.5% p/v en todas las mezclas, para los demás se decidió incluirlos en una proporción final de 1% p/v en la formulación. Esto se realizó pensando en la viscosidad de la solución final ya que se podría dificultar su elaboración de acuerdo a la metodología empleada. De acuerdo a esto el porcentaje final de las mezclas correspondió a un 3.5% p/v del total de polímeros en las mezclas.

Para la evaluación de las microesferas se consideraron las respuestas de mayor importancia para el estudio, siendo estas: tamaño de partícula, mucoadhesión, porcentaje captura de selenio, hinchamiento, morfología y viscosidad. Esto con el fin de poder encontrar un

modelo matemático que pudiera explicar el comportamiento de las microesferas según la proporción de polímeros utilizada.

8.2.1 Tamaño de Partícula

El tamaño de partícula evidentemente en este caso tenía un parámetro establecido, las partículas tendrían que encontrarse al menos en el rango de 1 y 1000 μ m. De acuerdo a lo indicado en la Tabla 7 el método de gelificación iónica cumple el requisito ya que las partículas que se obtienen con este método se encuentra en ese rango, aunque esto dependerá del la extrusión del gel y el contacto de este con la solución de calcio.

Para llevar a cabo la extrusión de las mezclas se utilizó una jeringa con un bisel de 0.4 x 35mm; por lo que se podía espera obtener tamaños mayores a 400 μ m, en la Figura 21 se muestran las microesferas obtenidas de cada sistema. Se decidió utilizar este tamaño de orificio de salida ya que al ser un gel resultaba imposible hacerlo pasar por uno más pequeño. En la Tabla 18 se muestran los tamaños de partícula obtenidos mediante el análisis de mallas.

Formulación	Carbopol 971p (mg)	CMC (mg)	HPMC (mg)	Tamaño de partícula (μ m)
1	100	100	100	783.16
2	200	100	0	874.51
3	50	200	50	742.33
4	0	0	300	692.61
5	100	200	0	802.45
6	0	100	200	727.74
7	200	0	100	817.65
8	300	0	0	939.95
9	100	0	200	761.04
10	0	200	100	783.85
11	0	300	0	786.43
12	200	50	50	755.64
13	50	50	200	792.47
Control	0	0	0	655.2

Tabla 18. Tamaños de partícula de los sistemas microparticulados. En la tabla se muestran los tamaños de partícula obtenidos de acuerdo a las cantidades empleadas de cada componente, además se incluye el control donde únicamente se utilizo alginato.

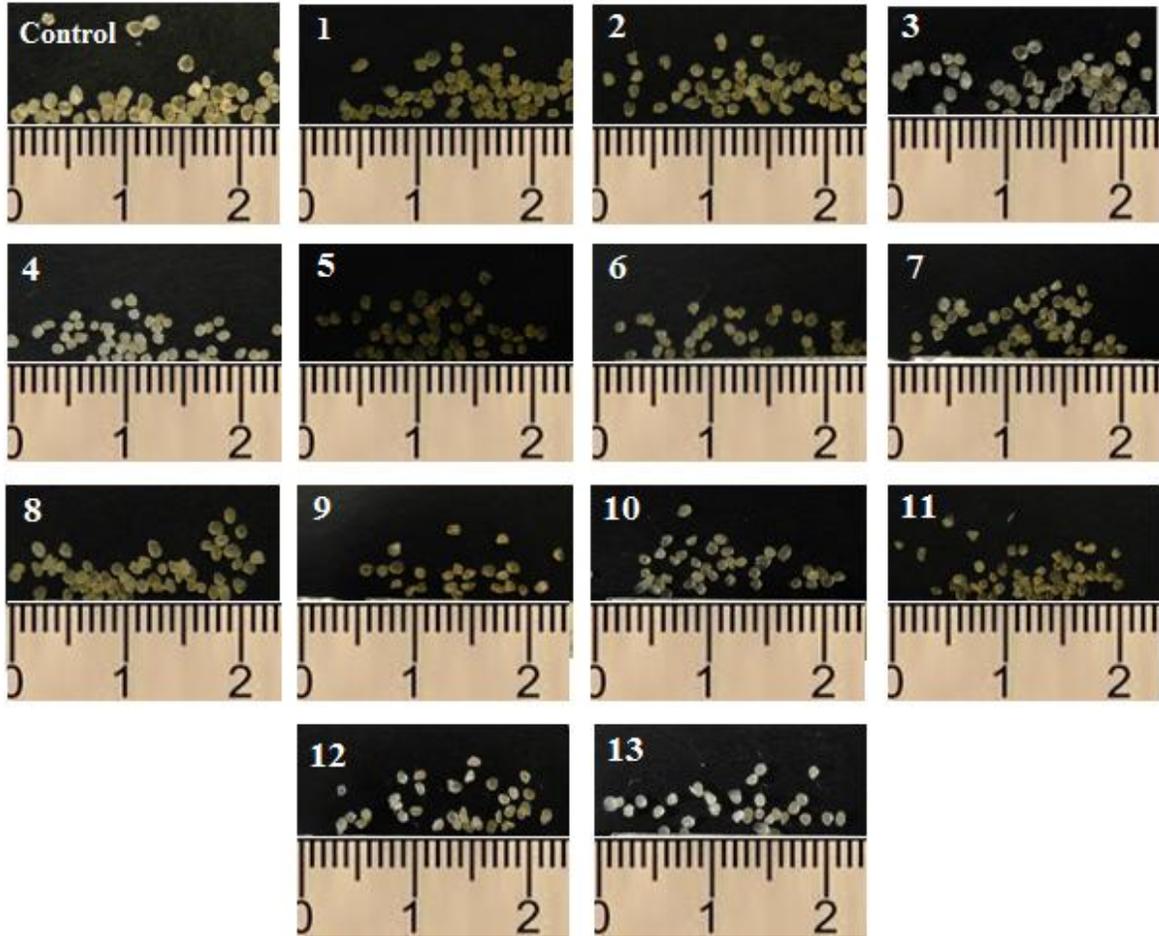


Figura 21. Fotografías de los sistemas de microesferas de acuerdo a su tamaño de partícula. En la imagen se recopilaron las fotografías de los 13 lotes y el control, utilizando una escala milimétrica para comparar su tamaño.

Para la elaboración del modelo matemático que pudiera explicar la variación de las respuestas de acuerdo a las proporciones de excipientes empleados, se utilizaron diseños lineales generalizados. Estos modelos permiten expresar de una forma cuantitativa relaciones entre un conjunto de variables, en la que una de ellas se denomina variable dependiente y las que modifican su magnitud se conocen como variables independientes (Gonzales King-keé, 2001).

Se realizó un análisis de varianza (Tabla 19), en el caso del modelo se obtuvo un valor de P menor a 0.05, por lo que esto indica que el modelo es probable. Aunque este parámetro no indica necesariamente que el modelo sea útil, para esto debe contar con una R^2 ajustada

lo suficientemente alta como para poder explicar un gran porcentaje de la variación de la respuesta, en el caso de este modelo se obtuvo una R^2 ajustada de 91.733, este valor es muy aceptable ya que quiere decir que mediante este modelo se puede explicar el 91.733% de la variación de la respuesta (Villardón, 2005).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	46964.1	8	5870.51	17.65	0.0072
Residuo	1330.7	4	332.675		
Total (Corr.)	48294.8	12			

Tabla 19. Análisis de varianza del modelo para tamaño de partícula. En este caso se puede observar que el modelo es probable ya que su valor de significancia es menor a 0.05

Se analizó además cada factor del modelo obtenido de igual manera mediante un análisis de varianza (Tabla 20), esto con el fin de conocer la variación generada por cada factor del modelo sobre el tamaño de partícula. De acuerdo a los resultados se puede observar que todos los factores indicados en la tabla tienen un valor de P menor a 0.05, por lo que esto quiere decir que si existe una relación entre la proporción de los excipientes y el tamaño de partícula, por lo menos para esos factores. Esto además indica de acuerdo a la los cuadrados medios cuales de esos factores tienen una mayor influencia en el tamaño de partícula, en este caso se puede observar que el carbopol 971p y el factor carbopol 971p * CMC, son los que presentan una mayor influencia y modifican de mayor forma el tamaño de partícula.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Carbopol 971p	10521.9	1	10521.9	31.63	0.0049
CMC	6868.66	1	6868.66	20.65	0.0105
HPMC	9433.66	1	9433.66	28.36	0.006
Carbopol 971p*Carbopol 971p	9092.53	1	9092.53	27.33	0.0064
Carbopol 971p*CMC	8519.21	1	8519.21	25.61	0.0072
Carbopol 971p*HPMC	9092.03	1	9092.03	27.33	0.0064
CMC*CMC	4162.25	1	4162.25	12.51	0.0241
CMC*HPMC	4162.32	1	4162.32	12.51	0.0241
Residuo	1330.7	4	332.675		
Total (corregido)	48294.8	12			

Tabla 20. Análisis de varianza para los factores que influyen en el tamaño de partícula. En la tabla se muestra el grado de influencia del factor debido a la razón de F, todos los factores cuentan con un valor de P menor a 0.05 por lo que son significativos.

De acuerdo al análisis se obtuvo como resultado la siguiente ecuación para el modelo:

$$\text{Tamaño de partícula} = 991916 + 2.43981E6 * \text{Carbopol 971p} + 1.97127E6 * \text{CMC} + 991088 * \text{HPMC} + 1.44865E6 * \text{Carbopol 971p}^2 + 2.42874E6 * \text{Carbopol 971p} * \text{CMC} + 1.44861E6 * \text{Carbopol 971p} * \text{HPMC} + 980132 * \text{CMC}^2 + 980140 * \text{CMC} * \text{HPMC}$$

Esta ecuación permite estimar el tamaño de partícula a determinada fracción de los componentes de la formulación, por lo tanto si se cuenta con un buen modelo se podría calcular las fracciones necesarias de cada excipiente para obtener un determinado tamaño de partícula.

Para tener una mejor idea de que tanto influye cada factor se realizó un diagrama de Pareto utilizando los coeficientes de la ecuación del modelo (Gráfico 1). Se puede observar que el carbopol 971p y el factor carbopol 971p * CMC son los que mayor efecto tienen, aunque de acuerdo a los coeficientes el del carbopol 971p puro presenta una mayor influencia que todos los demás. Es esencial conocer cuál es el factor que tiene más peso sobre el tamaño de partícula, ya que será el factor que se deba controlar más durante el proceso de elaboración, esto quiere decir que si existe una pequeña variación en la

cantidad de carbopol 971p se desencadenara un cambio significativo en el tamaño de partícula de las microesferas.

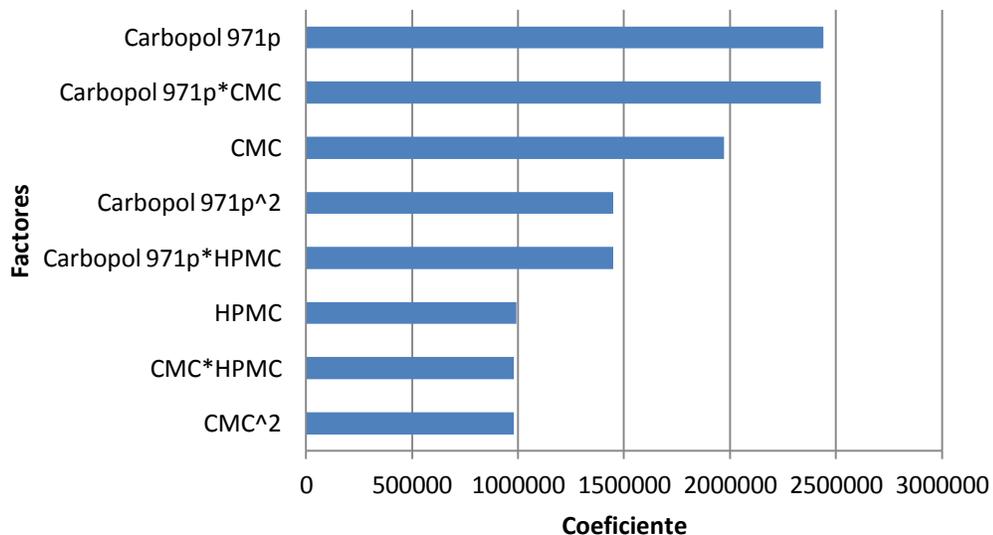


Grafico 1. Diagrama de Pareto de los factores que influyen en el tamaño de partícula. Los factores mostrados tienen un valor de P menor de 0.05 por lo que son significativos, se encuentran ordenados de forma decreciente según su influencia.

No obstante de haber obtenido un modelo con una buena predicción, se necesita además que el error de este sea mínimo. Para conocer esto se utilizan los residuos (Tabla 21), con el valor experimental y el valor predicho, el error se obtiene dividiendo el valor absoluto del residuo más grande entre su respectivo valor experimental, en el caso de este modelo se obtuvo un error del 2.45%. Por lo tanto el valor del error es mínimo y de acuerdo a esto se puede decir que el modelo es bastante bueno para predecir el tamaño de partícula.

Fila	Observado	Ajustado	Residuo
1	783.16	796.594	-13.434
2	874.51	857.975	16.535
3	742.33	746.809	-4.47893
4	692.61	695.55	-2.94017
5	802.45	807.23	-4.77982
6	727.74	734.213	-6.47251
7	817.65	824.546	-6.89597
8	939.95	942.043	-2.09303
9	761.04	742.39	28.6501
10	783.85	765.623	18.2266
11	786.43	789.792	-3.36217
12	755.64	760.119	-4.47892
13	792.47	796.946	-4.47617

Tabla 21. Regresión lineal modelo de tamaño de partícula. Se muestran los valores de respuesta experimentales y calculados, relacionados con sus respectivos residuos. Esto se calculo mediante la ecuación del modelo.

Teóricamente no debería existir una relación entre los componentes de la formulación con el tamaño de partícula, ya que en el caso de la gelificación iónica este depende principalmente del bisel utilizado y al tamaño de la gota de gel que cae en la solución de calcio (Krasaekoopt et al., 2003).

De acuerdo a esto fue necesario encontrar la razón de esta dependencia, según indica Oliveira et al, 2005, la viscosidad de la solución tiene un efecto en el tamaño de partícula de las microesferas obtenidas por el método de gelificación iónica. De manera general el tamaño de la gota obtenida de la extrusión del gel a través del bisel es proporcional a la viscosidad y la tensión superficial que presenta, esto afecta el tamaño de partícula debido a que la gota al no caer de manera inmediata tiende a aumentar de tamaño hasta que su peso rompe la tensión superficial, lo que da como resultado microesferas de un tamaño mayor al esperado (Oliveira, Santana, & Re, 2005).

Para comprobar esto se determino la viscosidad de las 13 mezclas y del control de alginato, para verificar si existía en verdad una relación entre esta y el tamaño de partícula, los resultados se muestran en la Tabla 22.

Formulación	Viscosidad (cps)
1	180
2	225
3	210
4	110
5	195
6	130
7	185
8	255
9	145
10	190
11	220
12	170
13	130
Control	90

Tabla 22. Viscosidad de las mezclas. El tamaño de partícula de las microesferas es directamente proporcional al valor de la viscosidad de las mezclas. La viscosidad se encuentra expresada en centipoise

Observando los resultados de viscosidad obtenidos existe de manera general un incremento en la viscosidad en todas las mezclas con respecto al control, esto es de esperarse ya que se están agregando polímeros los cuales aportan respectivamente viscosidad a la mezcla final. Esto es un indicador de que la viscosidad puede ser la razón principal de la variación en el tamaño de partícula, además de que la mezcla donde se encuentra el carbopol 971p (mezcla 8) y que de acuerdo al modelo es el de mayor influencia, tiene la viscosidad más alta de todas las mezclas. Para observar de manera más clara la proporcionalidad del tamaño de partícula y la viscosidad, se graficaron estas 2 variables (Grafico 2) y se analizo si existe una relación entre ellas.

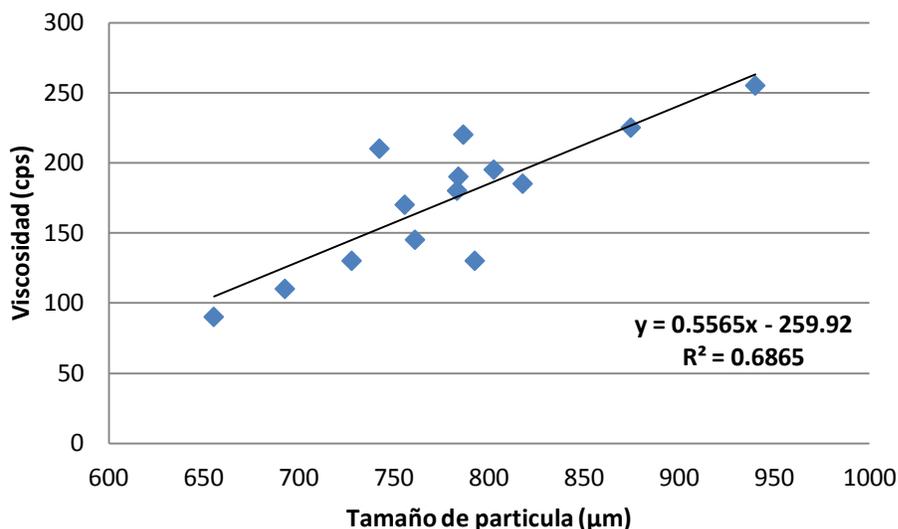


Gráfico 2. Relación directamente proporcional entre el tamaño de partícula y la viscosidad.

Por lo tanto una vez conociendo que la viscosidad es el factor que está modificando el tamaño de partícula se puede optar por alternativas de extrusión, o utilizar la proporción de polímeros adecuada mediante la ecuación del modelo para obtener el tamaño de partícula deseado. Aunque el tamaño de partícula es relativo en este trabajo ya que como objetivo se deseaba que se encontrara en el rango micrométrico, pero al estar pensado para una administración oral realmente el tamaño de partícula no tiene importancia, además de que en todos los casos permaneció dentro del rango. Otro punto a considerar es que los resultados comprueban que limitar el porcentaje de polímeros a 3.5% p/v fue lo correcto debido a que con esa concentración no se excedió la viscosidad crítica para un tamaño micrométrico.

8.2.2 Mucoadhesión

La mucoadhesión es una de las características más importantes de esta forma farmacéutica, las ventajas que se obtienen por parte de las microesferas resultan del hecho de poder

adherirse a la mucosa intestinal para aumentar el tiempo de residencia del fármaco y mejorar su absorción en el organismo. De acuerdo a lo expresado en la Tabla 5, teóricamente es de esperarse un comportamiento mucoadhesivo muy fuerte por parte de todos los polímeros utilizados, debido a que en esencia individualmente son mucoadhesivos.

Lamentablemente desde el punto de vista tecnológico muchas veces esta adhesión puede verse superada por el recambio de la mucosa por parte del organismo, e inclusive por los alimentos que transitan por el tracto gastrointestinal. Estos factores pueden afectar de manera muy marcada el desempeño final de las microesferas por lo que al utilizar los 4 componentes simultáneamente se puede brindar suficiente fuerza al enlace mucoadhesivo, permitiendo que cumpla su función de manera correcta (Tangri et al., 2011).

Para evaluar la mucoadhesividad de las microesferas se utilizó la prueba de desprendimiento por lavado (wash off test), para la cual se colocaron 30 microesferas de cada lote sobre un trozo de intestino delgado de borrego. El objetivo de esta prueba es someter las microesferas adheridas a la mucosa intestinal a un lavado con solución fisiológica y una temperatura de 37°C, dependiendo de la fuerza de mucoadhesión que se genere de cada mezcla será la cantidad final de microesferas que permanecerán adheridas al intestino. Para lograr esto se utilizó el aparato desintegrador de tabletas, ya que este se sugiere en la literatura porque desarrolla un movimiento ascendente y descendente de suficiente intensidad y reproducibilidad, además de que es un aparato de uso muy común disponible en la mayoría de los laboratorios (D. Singh, Singh, Saraf, Dixit, & Saraf, 2010).

En este caso los resultados obtenidos no permitieron generar un modelo matemático, ya que en todos los casos la cantidad de microesferas iniciales permanecieron adheridas a la mucosa durante los 45 minutos que duró la prueba. Se utilizó este tiempo ya que el proceso de descomposición del tejido a partir 1 hora era lo suficientemente considerable como para generarse perforaciones en el intestino. En la Figura 22 se muestra imágenes de la evaluación de mucoadhesividad de cada lote.

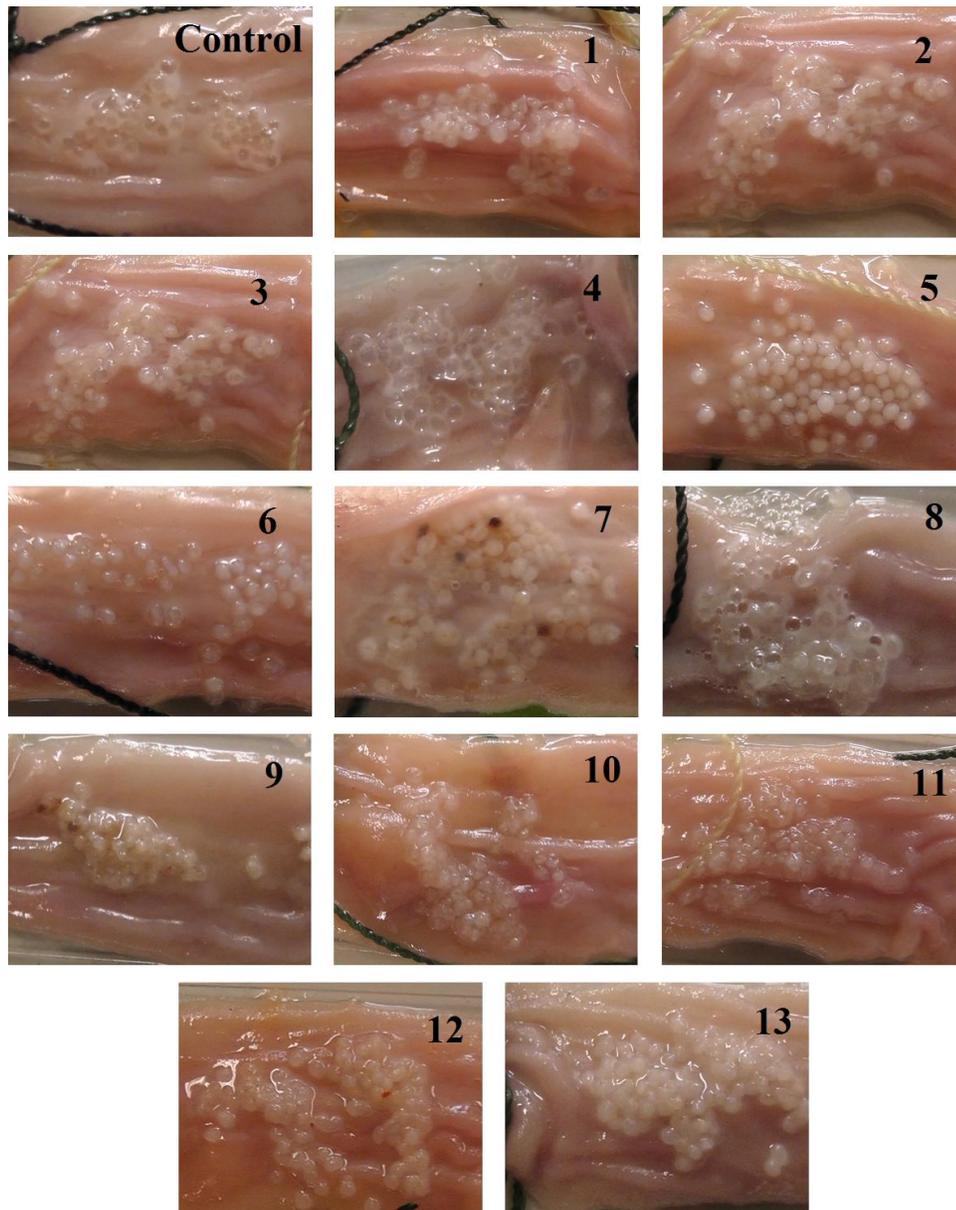


Figura 22. Fotografías de los sistemas de microesferas de cada lote (1-13) para la mucoadhesividad. Las fotografías fueron tomadas al término de los 45 minutos que duraron las pruebas de mucoadhesión.

Este resultado es bastante positivo si se toma en cuenta que de igual manera el tamaño de partícula permanece en niveles aceptables en cualquier proporción de los polímeros, por lo tanto la verdadera respuesta a considerar será el porcentaje de captura que presente cada

mezcla. Dicho esto es necesario indicar que no significa que las cantidades de polímero no tengan influencia alguna, si no que de acuerdo a las pruebas preliminares y a la búsqueda bibliográfica se llegó a las cantidades utilizadas en el diseño de mezclas.

Es evidente que el haber obtenido una mucoadhesión similar en todos los sistemas depende principalmente de las propiedades del alginato, ya que se encuentra en mayor proporción en todas las mezclas. Por lo tanto es necesario entender cómo funciona el mecanismo de mucoadhesión del alginato y de qué forma están interaccionando los demás polímeros en la mezcla.

Como se mencionó anteriormente existen diferentes mecanismos y teorías propuestas por distintos autores para explicar el fenómeno mucoadhesivo. En cuanto al mecanismo de mucoadhesión este se divide en 2 etapas: el contacto y la consolidación. La primera etapa se refiere a la interacción inicial entre las microesferas y la membrana mucosa, en esta etapa se inicia el hinchamiento de la forma farmacéutica. En la segunda etapa los polímeros contenidos en las microesferas comienzan a interpenetrar la membrana mucosa y de esta forma se desarrollan enlaces e interacciones las cuales llevan a la mucoadhesión (S. Singh, Govind, & Bothara, 2013).

El proceso de interpenetración que se mencionó anteriormente durante la etapa de la consolidación es muy importante, ya que se genera una humectación de la microesfera debido a que el agua de la membrana mucosa difunde hacia la forma farmacéutica, provocando con esto una deshidratación de dicha membrana, esto se ilustra en la Figura 23. Esta humectación plastifica la microesfera, permitiendo que los polímeros puedan formar enlaces e interaccionen con las glicoproteínas de la mucosa, por su parte la membrana al existir un gradiente de concentración hacia la microesfera, además de fuerzas osmóticas y capilaridad, se incrementa la consolidación de los enlaces adhesivos por el aumento en el contacto (Sharma et al., 2012).

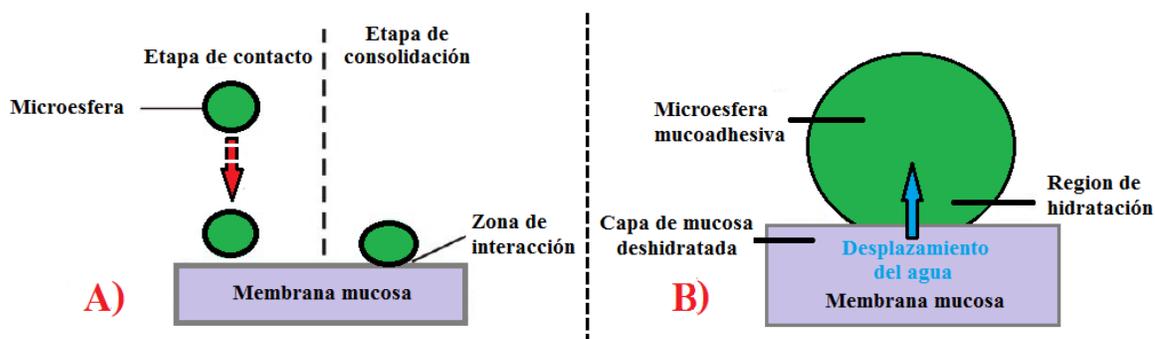


Figura 23. Etapas de mucoadhesión e intercambio hídrico. En la imagen A) se ilustran las 2 etapas de la mucoadhesión, en la imagen B) se ilustra la difusión de agua de la membrana hacia la microesfera (S. Singh et al., 2013).

En el caso de las teorías mucoadhesivas, algunas de estas ocurren de manera simultánea, en la Tabla 6 se indican las teorías aceptadas en la actualidad para explicar el fenómeno de mucoadhesión.

En el caso de los polímeros utilizados la teoría más importante que explica el comportamiento mucoadhesivo corresponde a la teoría de adsorción, esta teoría considera que la presencia de grupos hidroxilo y carboxilo en la estructura del polímero, tendrá como consecuencia la formación de puentes de hidrogeno con la mucosa. Si se toma en cuenta que el alginato posee en su estructura química una gran cantidad de grupos carboxilos y este se encuentra en todas las mezclas, es de esperarse que todas presenten una mucoadhesión bastante considerable. Esta teoría además indica que el enlace será de mayor fuerza de acuerdo a la carga eléctrica, por lo que la carboximetilcelulosa, el alginato y el carbopol presentan interacciones mas fuertes debido a que cuentan con una gran cantidad de cargas aniónicas, la hidroxipropilmetilcelulosa en cambio es un polímero neutro que puede interactuar con la mucosa pero con menor intensidad (PharmaQuest, 2010).

No cabe duda que de acuerdo a la teoría de adsorción todas las mezclas cuentan con una mucoadhesividad bastante efectiva, lamentablemente de acuerdo al método utilizado para su evaluación no fue posible distinguir entre la mucoadhesividad propia del alginato y la adicionada por los componentes de la mezcla. La limitante en este estudio fue la integridad estructural del intestino delgado, ya que el proceso de degradación es un factor que no se puede controlar, en especial a las condiciones a las que debía realizarse el estudio. Si se toma en cuenta lo mencionado por la teoría será evidente que las formulaciones que contengan carbopol 971p y CMC serán las de mayor fuerza mucoadhesiva, ya que la HPMC interactúa con menos fuerza debido a su carga.

Otra teoría a considerar es la de difusión-entrelazado, en esta teoría existe una difusión de las cadenas de polímero hacia la red de cadenas glicoproteicas de la membrana mucosa. En este proceso influyen diferentes factores relativos a la formulación como: bajo peso molecular de los polímeros, baja densidad del entrecruzamiento y flexibilidad de las cadenas. En este caso el alginato cumple con los tres factores que influyen sobre la capacidad de interpenetración polimérica, por lo que esto también explica la fuerza mucoadhesiva que presenta, esto no es casualidad ya que se seleccionó mediante las pruebas preliminares al Protanal LF 120M debido a que se sabía que contaba con flexibilidad en sus cadenas por su mayor cantidad de bloques MG. Otro de los polímeros que en particular cumple con esta teoría es el carbopol 971p, ya que cuenta con un grado de entrecruzamiento bajo, así que se permitirá una difusión de sus cadenas a la mucosa con más facilidad. Por último los polímeros utilizados en el diseño son de bajo peso molecular, por lo tanto existirá una mayor posibilidad de interpenetración de las cadenas poliméricas a través de la membrana mucosa. Para entender con más claridad esta teoría se ilustra en la Figura 24 (Asane et al., 2008).

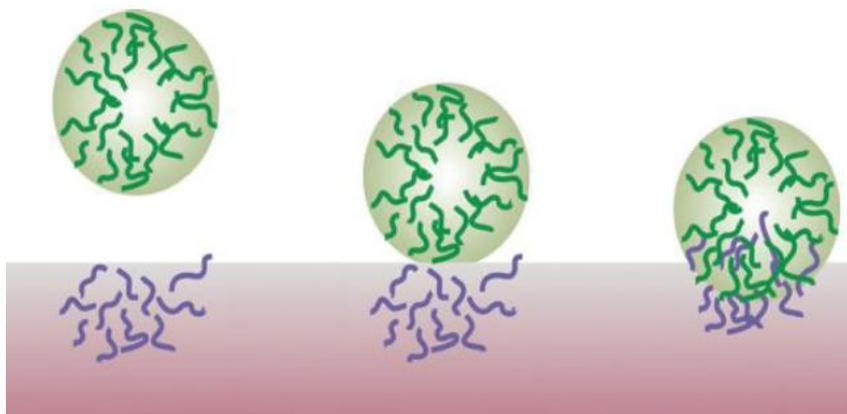


Figura 24. Teoría de difusión-entrelazado de mucoadhesión. En la imagen se muestra la membrana mucosa con sus cadenas de glicoproteína, al igual que el de las cadenas poliméricas de las microesferas. En este teoría se menciona la interpenetración entre ambas cadenas lo que resulta en enlaces mucoadhesivos (S. Singh et al., 2013).

Finalmente la última teoría que involucra todos los polímeros de la formulación es la teoría de fractura, esta analiza la fuerza requerida para lograr la separación de dos superficies tras la adhesión. Esto quiere decir que todos los polímeros se rigen por esta teoría ya que es un requisito que formen enlaces reversibles que puedan ser rotos por el propio organismo, en dado caso que si se tratase de un enlace covalente podrían existir ulceraciones debido desprendimientos de mucosa muy drásticos. La fractura puede llevarse sobre la microesfera, en la interface entre microesfera y mucosa o en la mucosa misma, esto se muestra con más detalle en la Figura 25 (Sharma et al., 2012).

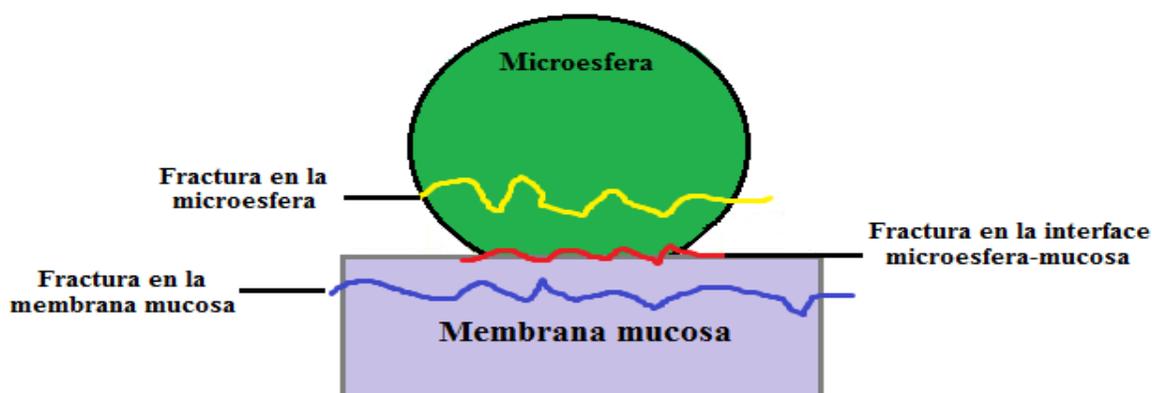


Figura 25. Teoría de fractura en mucoadhesividad. En la imagen se muestra los tipos de fractura que se pueden presentar de la interacción entre las microesferas con la membrana mucosa, en total existen 3 tipos de fractura (S. Singh et al., 2013).

8.2.3 Porcentaje de captura de selenio

Como en todas las formas farmacéuticas el contenido de fármaco es el aspecto de mayor importancia, debido a que de esto depende el efecto terapéutico. En el caso de esta forma farmacéutica en particular, el contenido de fármaco dentro de la microesfera depende de la capacidad de captura que tenga, por lo que de ahí radica la importancia de conocer esta característica. Si no se cuenta con una formulación con la suficiente capacidad de captura, existirán problemas tanto con su capacidad terapéutica y además con los costos durante la fabricación derivados del aumento en la merma del fármaco.

De acuerdo a los resultados del tamaño de partícula y la mucoadhesión, se determino que el parámetro en el que recae la importancia del análisis es el porcentaje de captura. Esto se debe a que dentro de lo establecido en el diseño de mezclas las proporciones utilizadas no afectan negativamente a la formulación, por lo que usar cualquier proporción podría ser correcto, en el caso del porcentaje de captura esto es diferente ya que se busca la mezcla que permita capturar la mayor cantidad de selenio. En la Tabla 23 se muestran los porcentajes de captura obtenidos de la cuantificación del selenio.

Formulación	Carbopol 971p (mg)	CMC (mg)	HPMC (mg)	Porcentaje de captura (%)
1	100	100	100	52.78
2	200	100	0	55.09
3	50	200	50	53.56
4	0	0	300	34.76
5	100	200	0	58.47
6	0	100	200	41.66
7	200	0	100	47.43
8	300	0	0	53.81
9	100	0	200	42.68
10	0	200	100	53.34
11	0	300	0	60.92
12	200	50	50	53.67
13	50	50	200	45.23
Control	0	0	0	39.67

Tabla 23. Porcentajes de captura de los sistemas microparticulados. En la tabla se muestran los porcentajes de captura obtenidos de acuerdo a las formulaciones utilizadas, además se incluye el control donde únicamente se utilizo alginato.

Se realizó un análisis de varianza (Tabla 24), en el caso del modelo se obtuvo un valor de P menor a 0.05, por lo que esto indica que el modelo es probable. Aunque este parámetro no indica necesariamente que el modelo sea útil, para esto debe contar con una R^2 ajustada lo suficientemente alta como para poder explicar un gran porcentaje de la variación de la respuesta, en el caso de este modelo se obtuvo una R^2 ajustada de 94.962, este valor es muy aceptable ya que quiere decir que mediante este modelo podemos explicar el 94.962% de la variación de la respuesta (Villardón, 2005).

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	632.586	2	316.293	114.12	0.0000
Residuo	27.7165	10	2.77165		
Total (Corr.)	660.302	12			

Tabla 24. Análisis de varianza del modelo para porcentaje de captura. En este caso se puede observar que el modelo es probable ya que el valor de significancia es menor a 0.05. En la tabla se observa un valor de P de 0.0000 esto se debe a que el programa estadístico solo proceso hasta 4 cifras decimales y en este caso el valor real es más pequeño.

Se analizó además cada factor del modelo obtenido de igual manera mediante un análisis de varianza (Tabla 25), esto con el fin de conocer la variación generada por cada factor del modelo sobre el porcentaje de captura. De acuerdo a los resultados se puede observar que todos los factores indicados en la tabla tienen un valor de P menor a 0.05, por lo que esto quiere decir que la variación en la proporción de los excipientes de la tabla tiene un efecto sobre el porcentaje de captura. Esto además indica de acuerdo a la los cuadrados medios cual es el factor de mayor influencia en el porcentaje de captura, en este caso se puede observar que la CMC es la que presenta una mayor influencia y modifica la cantidad de selenio que se puede atrapar.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Carbopol 971p	329.071	1	329.071	118.73	0.0000
CMC	583.598	1	583.598	210.56	0.0000
Residuo	27.7165	10	2.77165		
Total (corregido)	660.302	12			

Tabla 25. Análisis de varianza para los factores que influyen en el porcentaje de captura. En la tabla se muestra el grado de influencia del factor debido a la razón de F, todos los factores cuentan con un valor de P menor a 0.05 por lo que son significativos.

De acuerdo al análisis se obtuvo como resultado la siguiente ecuación para el modelo:

$$\text{Porcentaje de Captura} = 57.463 + 9.26531 * \text{Carbopol 971p} + 12.3388 * \text{CMC}$$

Esta ecuación permite estimar el porcentaje de captura a determinada fracción de los componentes de la formulación, por lo que se podrá calcular las fracciones necesarias de cada excipiente para obtener un porcentaje de captura deseado.

De acuerdo a los coeficientes de cada excipiente en la ecuación se puede observar que la CMC tiene el mayor, por lo que este es el componente que más afecta la captura de fármaco. Esto es muy importante saberlo ya que de esta forma se puede descartar las mezclas para solo incluir las que presenten mayores cantidades de CMC, aunque de acuerdo a la Tabla 23 se observa que también la CMC en combinación con el Carbopol 971p presenta buenos porcentajes de captura.

No obstante de haber obtenido un modelo con una buena predicción, se necesita además que el error de este sea mínimo. Para conocer esto se utilizan los residuos (Tabla 26) con el valor experimental y el valor predicho, el error se obtiene dividiendo el valor absoluto del residuo más grande entre su respectivo valor experimental, en el caso de este modelo se obtuvo un error del 4.75%. Por lo tanto el valor del error es mínimo y de acuerdo a esto se puede decir que el modelo es bastante bueno para predecir el porcentaje de captura.

Fila	Observado	Ajustado	Residuo
1	52.78	50.262	2.5176
2	55.09	56.438	-1.3486
3	53.56	55.398	-1.8383
4	34.76	35.858	-1.0989
5	58.47	58.487	-0.0174
6	41.66	44.085	-2.4251
7	47.43	48.212	-0.7823
8	53.81	54.389	-0.5795
9	42.68	42.036	0.6439
10	53.34	52.31	1.0297
11	60.92	60.536	0.3835
12	53.67	52.324	1.3451
13	43.23	43.059	2.1704

Tabla 26. Regresión lineal modelo de porcentaje de captura. Se muestran los valores de respuesta experimentales y calculados, relacionados con sus respectivos residuos. Estos valores se calcularon con la ecuación del modelo.

Por lo tanto de acuerdo al análisis es posible seleccionar las mezclas que resultan más convenientes para la fabricación de microesferas, como ya se mencionó el parámetro de más importancia es el porcentaje de captura. Como se muestra en la Tabla 23 las formulaciones 5 y 11 presentan los mejores porcentajes de captura, la formulación 5 corresponde a 2/3 partes de CMC y 1/3 de carbopol 971p con un porcentaje de 58.47%, la formulación 11 contiene únicamente CMC y presenta un porcentaje de captura de 60.92%.

El porcentaje de captura del control de alginato es de 39.67%, por lo que es posible observar que la adicción exclusiva de CMC a la formulación aumenta hasta en 20% la captura, pero aun si se adiciona en conjunto con otro excipiente se obtienen porcentajes de captura por encima del 50%. En el caso del carbopol 971p de igual manera se obtienen porcentajes de captura de por lo menos 50%, por lo que también es una buena opción, aunque estos porcentajes mejoran cuando se combinan con CMC ya que por sí solo el carbopol 971p presenta casi un 10% de menos de captura que la formulación que contiene exclusivamente CMC. Por último es de observarse que el HPMC representa un problema,

debido a que es evidente que reduce el porcentaje de captura de las formulación, inclusive como se observa en la formulación 4 la captura es menor a la del control.

Existen diversos factores que pueden influir en el porcentaje de captura, los más importantes se muestran en la Figura 26.

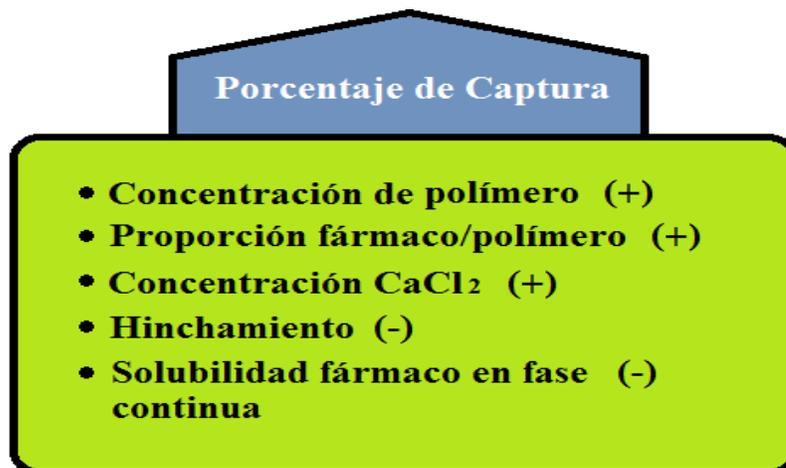


Figura 26. Factores que afectan el porcentaje de captura de fármaco. Los factores que muestran (+) aumentan el porcentaje de captura y los que muestran (-) tienden a disminuirlo (R. C. Dhakar, Maurya, & Saluja, 2012).

▪ **Concentración del polímero**

El incremento en la concentración de los polímeros en la formulación de las microesferas aumenta la eficiencia de captura, esto se puede explicar de tres formas. Primero, el contar con una concentración alta permite al polímero precipitar más rápidamente en la solución y por lo tanto se disminuye la cantidad de fármaco que puede difundir fuera de la microesfera, además en el caso de existir la posibilidad de entrecruzamiento se capturara con más eficiencia el fármaco y se retardara su difusión.. Segundo, una mayor concentración de polímero incrementa la viscosidad de la solución, lo cual retrasa la difusión del fármaco fuera de la microesfera al momento de síntesis, lo que le da tiempo a la microesfera de formarse correctamente y mantener el fármaco en su interior. Tercero, el tamaño de partícula se incrementa con una mayor concentración de polímero, por lo que esto reduce el área superficial de las microesferas en conjunto limitando así la cantidad de fármaco que puede difundir al estar en contacto con la fase continua (R. Dhakar, Dutta Maurya, & Saluja, 2012).

En este caso es evidente que el factor que más influye en las formulaciones realizadas en el diseño corresponde a la viscosidad de las mezclas, como se indico en el (Gráfico 2) los valores de viscosidad influyen directamente en el tamaño de partícula de las microesferas, pero además de acuerdo a Dhakar et al, 2012, la viscosidad también influye en el porcentaje de captura. Por lo tanto esto indica porque se obtuvo mejores porcentajes de captura en formulaciones con mayor contenido de CMC y carbopol 971p, ya que presentan las viscosidades más altas, en caso contrario el HPMC de acuerdo a los resultados presenta una viscosidad bastante baja y eso aumenta la cantidad de fármaco que difunde fuera de la microesfera.

En su investigación Karthikeyan et al, 2008, trabajo con HPMC de diferentes grados de viscosidad, a una viscosidad de 15cps obtuvo microesferas con un porcentaje de captura de 14.1 a 16.4%. Inclusive con mayores valores de viscosidad el porcentaje de captura no rebasa del 40%, por lo tanto concuerda con los resultados obtenidos ya que por sí solo no tiene la suficiente capacidad de retener el fármaco en su interior, por lo que sería recomendable utilizar HPMC de alto peso molecular (Karthikeyan, Karthikeyan, & Ramasamy, 2008).

Por su parte Dandagi et al, 2013, trabajo con microesferas a partir de CMC, en sus resultados obtuvo muy buenos porcentajes de captura mayores al 70%, esto debido a que utilizo la CMC al 2% p/v, por lo que esto concuerda con los resultados obtenidos, ya que un aumento en la concentración de este polímero mejorara la captura de selenio en las microesferas. Además el autor llego a la conclusión de que al aumentar la concentración de CMC existe una mayor posibilidad de entrecruzamiento y por lo tanto las partículas son capturadas más eficientemente (Dandagi et al., 2013).

Por último Hosmani et al, 2009, trabajaron con microesferas de alginato con carbopol 971p, sus resultados fueron similares a los obtenidos, aunque en este caso se obtuvieron porcentajes de captura de hasta 88%, ya que se utilizó el polímero al 2% p/v, por lo que es evidente que un aumento en la concentración del polímero tendrá como consecuencia un incremento en el porcentaje de captura (Hosmani & Pramod, 2009).

▪ **Proporción fármaco/polímero**

Como se mencionó anteriormente un aumento en la concentración de los polímeros le brinda a las microesferas la capacidad de capturar un mayor porcentaje del fármaco en su interior, por lo que es claro que en la proporción fármaco/polímero, el polímero debe encontrarse en mayor cantidad. Si el fármaco se encuentra en una proporción demasiado alta será imposible para los polímeros retenerlo dentro de sus cadenas, así que se debe evitar este caso a toda costa, si no fuera posible debido a otros factores como la viscosidad o el tamaño de partícula, será necesario pensar en cambiar de forma farmacéutica (R. Dhakar et al., 2012).

En sus trabajo Pavanveena et al, 2010, estudiaron diferentes proporciones fármaco/polímero para la síntesis de microesferas, llegaron a la conclusión que la proporción debe ser al menos 1:2, aunque encontraron que a una proporción de 1:3 los porcentajes de captura son un poco mayores. En el caso de las formulaciones realizadas la proporción fármaco/polímero es de 1:3, por lo que es adecuada para un buen porcentaje de captura, por lo que se tiene la opción de que al aumentar esta proporción también se aumente la cantidad de selenio capturada en las microesferas (Pavanveena & Kavitha, 2010).

▪ **Concentración solución crosslink (CaCl_2)**

La concentración de la solución crosslink es un factor importante que puede intervenir con el porcentaje de captura, actualmente existen distas opiniones en cuanto a la concentración ideal, esto debido a que cada investigación cuenta con parámetros distintos por lo que es imposible utilizar la misma concentración para todos los casos.

Por un lado existen estudios como el de Ghareeb et al, 2012, que indican que a concentraciones bajas de CaCl_2 la solución crosslink puede entrar con más facilidad al interior de la microesfera, y por lo tanto formar una estructura polimérica con espacios más pequeños entre las cadenas que mejoran la captura. En caso contrario sugiere que a concentraciones muy elevadas se limita la cantidad de solución que ingresa a la

microesfera y por lo tanto disminuye su captura, además de que limita la liberación del fármaco (Ghareeb, Issa, & Hussein, 2012).

En el caso de los estudios de (K P R Chowdary & Madhavi, 2012), (Gonjari et al., 2009),(Prajapati, Tripathi, Ubaidulla, & Anand, 2008), utilizaron una concentración crosslink de CaCl_2 de 10% obteniendo porcentajes de captura altos (superiores al 60%). Por lo tanto esto quiere decir que la concentración utilizada para la elaboración de las microesferas se encuentra en un rango aceptable ya que se encuentra igualmente al 10%.

▪ Hinchamiento

El hinchamiento en las microesferas es un factor muy importante a considerar para su elaboración, ya que está involucrado en factores como el porcentaje de captura y la capacidad mucoadhesiva. En el caso de la captura de fármaco es importante que al momento de la formación de la microesfera en la solución crosslink, esta no presente un hinchamiento elevado debido a que esto puede provocar que el fármaco difunda fuera de la microesfera con más facilidad. Cuando sucede esto se aumenta el espacio entre las cadenas poliméricas, por lo tanto en el caso del selenio será más sencillo que difunda hacia el exterior por su tamaño de partícula pequeño, esto como consecuencia disminuirá el porcentaje de captura. En la Figura 27 se explica este fenómeno (R. Dhakar et al., 2012).

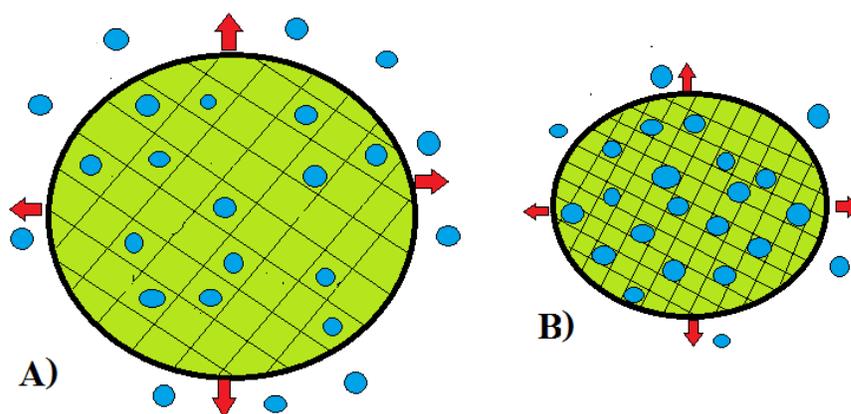


Figura 27. Efectos del hinchamiento en las microesferas. En la imagen A) se muestra el ejemplo de microesferas con alto hinchamiento, el efecto es la aparición de espacios de mayor tamaño y por lo tanto el fármaco escapa con más facilidad. En la imagen B) se muestra el caso contrario de un menor hinchamiento y por lo tanto el fármaco permanece atrapado con más eficiencia.

Este es un asunto muy estudiado en el caso de las microesferas con alginato de sodio, ya que dependiendo del pH en el que se encuentren la cantidad de fármaco en su interior variara. En pH ácido menor a 3, el alginato es convertido en ácido algínico, este compuesto es muy insoluble por lo que será muy difícil que se hinche en medio acuoso. Esto disminuirá la entrada del agua dentro de su estructura y por lo tanto la difusión de fármaco al exterior será menor, logrando así mantener una cantidad de fármaco en su interior relativamente alta (George & Abraham, 2006).

Por lo tanto se evaluó el hinchamiento del sistema control de alginato, de las mezclas puras y de la combinación de los 3 componentes, los resultados se muestran en la Tabla 27.

Sistema	Medio HCl pH (1.2)	Medio buffer fosfatos pH (7.2)
	Hinchamiento (%)	
Control	23.92	51.65
1	32.90	71.51
4	67.11	103.29
8	48.52	61.67
11	24.68	55.16

Tabla 27. Hinchamiento de las formulaciones. Se muestra el hinchamiento de los sistemas de mezclas puras, control y los 3 excipientes, en medio ácido pH (1.2) y medio pH (7.2).

Como se puede observar en los resultados el porcentaje de hinchamiento en todos los casos es diferente, de acuerdo a lo dicho anteriormente, se observa de manera evidente que el sistema control presenta un hinchamiento muy reducido a pH ácido, el cual aumenta a un pH más elevado. Por su parte el sistema 4 que contiene únicamente HPMC muestra un porcentaje de hinchamiento muy elevado, por lo que resulta lógico que se obtuvieran valores de captura inferiores inclusive que el sistema control. En el caso de la CMC (sistema 11) se puede observar que su hinchamiento es bajo y comparándolo con el del Carbopol 971 (sistema 8) se puede observar que existe una diferencia, por lo cual esta puede ser una razón de porque la CMC presentó un mayor porcentaje de captura.

Verificando otros trabajos con estos polímeros, se tiene el caso de Belgamwar et al, 2009, el cual trabajo con microesferas de alginato con carbopol 971p y HPMC. En su experimento llega a las mismas conclusiones. La HPMC presenta un grado de hinchamiento muy elevado (83.32%) y por su parte el carbopol 971p en este caso también es elevado (78.42%), pero menor al del HPMC (Belgamwar et al., 2009).

En el caso de Kesavan et al, 2010, trabajaron con microesferas de alginato de sodio y CMC, en su investigación encontraron que al agregar una mayor concentración de CMC a la formulación la liberación de fármaco se retardaba más. Por lo que este excipiente es muy soluble en agua, pero sus cadenas poliméricas presenta cierta flexibilidad y debido a esto es que se permite un entrecruzamiento más ordenado, atrapando así una mayor cantidad de fármaco y al mismo tiempo hinchándose en menor proporción. (Kesavan, Nath, & Pandit, 2010).

Además de esto Mahammed et al, 2011, mencionan que el alginato y la CMC forman puentes de hidrogeno entre si los cuales provocan además un menor hinchamiento de las microesferas. Esto ayuda a explicar porque se obtuvo un porcentaje bajo de hinchamiento en esta formulación (Mahammed et al., 2011).

▪ **Solubilidad del fármaco en la fase continua**

Si el fármaco es muy soluble en la fase continua, existirá una pérdida de fármaco mucho mayor ya que se facilitará la difusión de este hacia el exterior de la microesfera, por lo que en estos casos es recomendable aumentar la viscosidad de la formulación (R. Dhakar et al., 2012). En este caso el selenito de sodio presenta una solubilidad en agua bastante considerable de alrededor de 85g/100g de agua a 20°C, al igual que un tamaño de partícula muy pequeño, por lo que la posibilidad de que pueda escapar de las microesferas es muy grande (Abdo, 1994).

8.3 Citotoxicidad

Como todo fármaco novedoso o forma farmacéutica que tenga una interacción íntima con células en el organismo, es necesario garantizar que no existirá un efecto tóxico relacionado al contenido y concentración de estos compuestos. En este caso al utilizar microesferas mucoadhesivas se garantiza un contacto directo con las células del intestino delgado, por lo que si los excipientes llegasen a presentar algún efecto tóxico sería muy peligroso, además el selenio que contienen puede llegar a ser tóxico si se rebasan ciertos niveles.

Por esta razón se hace necesario evaluar la citotoxicidad asociada a las microesferas, con el fin de saber si existe algún riesgo en su administración. En los estudios de citotoxicidad se consideran 2 tipos de mecanismos, estos se conocen como citotoxicidad basal y citotoxicidad órgano-específica. En el caso de la citotoxicidad basal, los mecanismos de toxicidad se deben a las interferencias producidas por un xenobiótico o sus metabolitos, sobre los procesos basales comunes de casi todas las células del organismo. Las consecuencias que se generan son: cambios morfológicos, inhibición de la proliferación celular, afectaciones en el metabolismo celular, formación de radicales libres y muerte celular. En el caso de la citotoxicidad órgano-específica, esta se da en órganos que presentan mayor susceptibilidad a ciertos tóxicos, se pueden alterar mecanismos exclusivos de ese órgano o sistema, pero que por lo regular sucede por afectación a procesos basales (Repetto, 1995).

En este caso se utilizó una línea celular epitelial de riñón para estudiar si existen riesgos de citotoxicidad basal con la administración de las formulaciones 5 y 11, puesto que resultaron ser las formulaciones con las características más adecuadas. Las pruebas que se utilizaron para evaluar esto fueron la de viabilidad celular, con el ensayo de MTT, y la cuantificación de GSH, para conocer si se modifican las concentraciones de GSH intracelular durante la exposición de las células a las microesferas.

La razón de utilizar líneas celulares es que representan una gran ventaja sobre las metodologías *in vivo*, algunas de estas ventajas son: (Repetto, 1995)

- Los aspectos éticos y experimentales ligados a los estudios resultan más flexibles, al no tratarse de organismo vivo como tal.
- Con fracciones de órganos se obtiene material suficiente para muchos ensayos, debido a que se utilizan células tumorales que pueden crecer casi indefinidamente.
- Es posible la utilización de células de origen humano, por lo que los resultados pueden ser extrapolados con más facilidad.
- Se permite el estudio sobre determinada población celular o fracción subcelular aislada que se tenga como diana en el tratamiento.
- Los resultados presentan una alta reproducibilidad, debido a que se realizan en condiciones controladas.
- Se puede controlar directamente la dosis del toxico y la duración del contacto con las células.
- Su costo es bastante menor comparado con técnicas *in vivo*, además de que resultan más rápidas.

Aunque las pruebas *in vitro* no quedan exentas de algunas desventajas como son: (Repetto, 1995)

- La carencia de interacciones complejas existentes entre los distintos órganos de un ser vivo, además que la arquitectura tisular es tridimensional y no plana.
- Ausencia de ciertos fenómenos toxicocinéticos que ocurren normalmente en organismos.
- Dificultades para evaluar toxicidades retardadas o crónicas, debido a la duración de las células expuestas al toxico.
- Es necesario utilizar modelos *in vivo* con objeto de complementar y asociar los eventos estudiados.

8.3.1 Viabilidad celular

Los ensayos de viabilidad celular están diseñados para determinar las actividades atribuibles al mantenimiento y sobrevivencia de la célula, estas actividades comúnmente son relacionadas a los mecanismos de obtención de energía, como la producción de ATP y el potencial reductor mitocondrial. Estos ensayos tienen la premisa de que estas actividades se relacionan directamente con la cantidad de células viables, por lo tanto si su actividad cesara por la interacción con algún compuesto, se consideraría que existe citotoxicidad (Niles, Moravec, & Riss, 2009).

Una forma indirecta de evaluar la actividad de las enzimas involucradas en la formación de ATP es mediante la reducción de Bromuro de 3-(4,5 dimetil -2 -tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Bols, Dayeh, Lee, & Schirmer, 2005). El MTT es una sal de tetrazolio que puede ser captada por las células mediante endocitosis y, posteriormente, reducirse por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, obteniéndose de esta manera un compuesto azul insoluble llamado formazán (Éllez, Gonzalez, Gil, & Castro, 2008).

La capacidad de las células para reducir el MTT constituye un indicador de la integridad mitocondrial y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células de reducir el MTT a formazán después de la exposición al tratamiento permite conocer si produce toxicidad (Francisco et al., 2003).

Por lo tanto para el ensayo de MTT se utilizó la línea celular VERO para evaluar los sistemas 5 y 11 de las formulaciones de microesferas, cada una se acomodo en 2 grupos: cargadas con selenio y sin cargar. Se considero un grupo control positivo utilizando peróxido de hidrogeno y un grupo negativo al cual no se le aplico ningún tratamiento. Para los grupos controles se realizaron 2 experimentos por triplicado y para cada grupo de las formulaciones se realizaron 3 experimentos por triplicado, la variable en este caso fue el tiempo de exposición de las células a los tratamientos, el cual consto de un tiempo final de 4 hrs.

Los resultados de la cuantificación del formazan se muestran en el Gráfico 3, se considero la concentración de formazan en el control negativo como el 100% de viabilidad y a partir de esta se calculo la de los otros grupos.

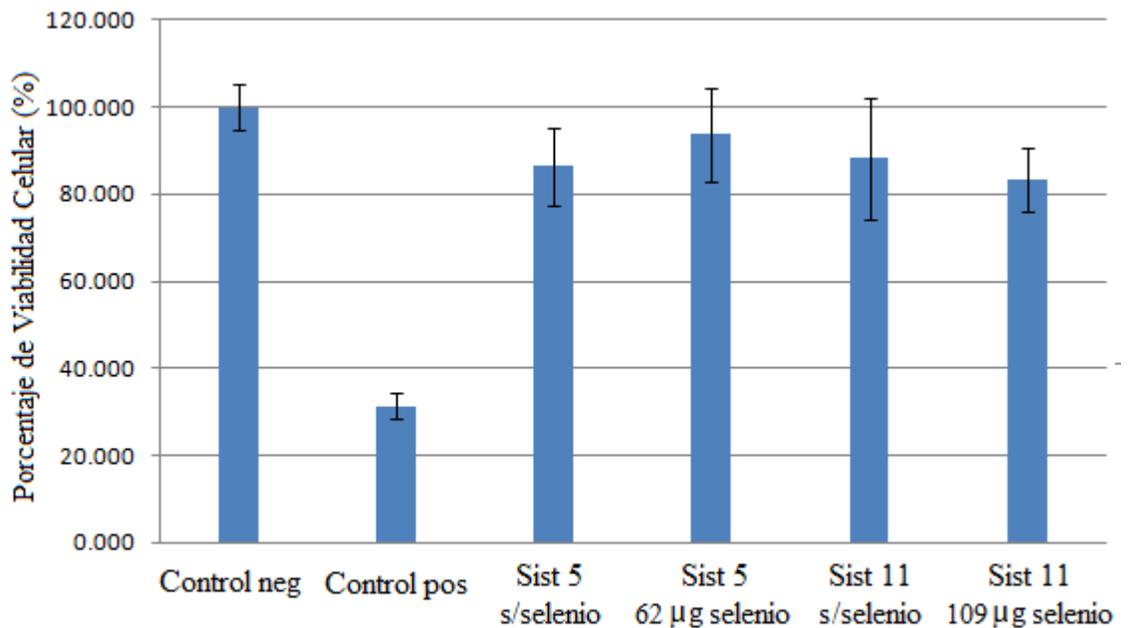


Gráfico 3. Porcentaje de viabilidad celular para los grupos experimentales. Se muestran las medias de los valores obtenidos de cada grupo, además se indica la desviación estándar para mostrar la variación en los datos de cada grupo.

De acuerdo a las medias de las muestras de los grupos, los resultados muestran una disminución de la viabilidad de cada grupo con respecto al control negativo, aunque es necesario considerar la desviación de los datos de cada grupo para determinar si existe alguna influencia o no de los tratamientos sobre las células. Por lo tanto se realizó un análisis de varianza para los 6 grupos experimentales, esto se muestra en la Tabla 28.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	17539.6	5	3507.92	58.81	0.0000
Intra grupos	2505.44	42	59.6533		
Total (Corr.)	20045.1	47			

Tabla 28. Análisis de varianza de la viabilidad celular en los 6 grupos experimentales. El valor de p es menor a 0.05 por lo tanto existe una diferencia significativa entre los grupos evaluados.

De acuerdo a la Tabla 28 se puede ver que existe una diferencia significativa entre las medias de los grupos ya que el valor de P es menor a 0.05. Para identificar cuales medias son significativamente diferentes entre sí se realizó un análisis de comparación de medias con intervalos al 95% de confianza, esto se muestra en el Gráfico 4.

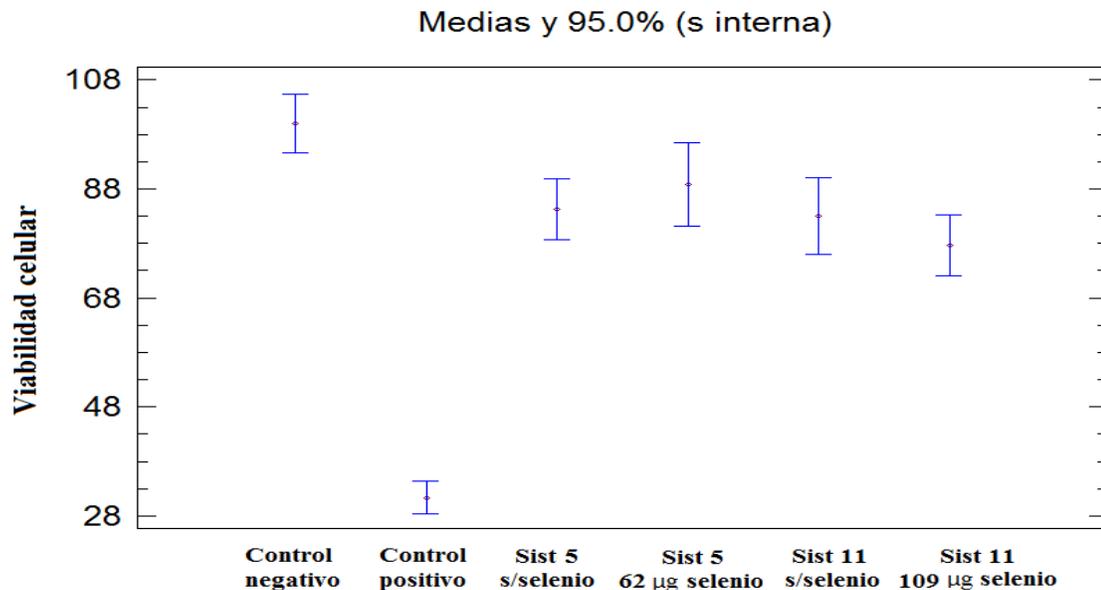


Gráfico 4. Comparación de medias con intervalos de confianza al 95% para la viabilidad celular. Se observa que los tratamientos con microesferas presentan diferencias con ambos controles, por lo que sí se ve disminuida la viabilidad por su presencia.

De acuerdo a esto es posible determinar que existe una diferencia significativa entre las medias de los grupos, aunque esto no quiere decir que todos son diferentes entre sí. Para conocer más a detalle la significancia entre cada grupo se realizó un cuadro comparativo de medias, utilizando el método de diferencia mínima significativa de Fisher (Tabla 29).

Tratamientos	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Control Positivo	6	31.3558	X
Sist 11 c/selenio	9	77.7251	X
Sist 11 s/selenio	9	82.9899	XX
Sist 5 s/selenio	9	84.2755	XX
Sist 5 c/selenio	9	88.806	X
Control negativo	6	100	X

Tabla 29. Análisis de medias por diferencia mínima significativa de Fisher para la viabilidad celular. Los grupos que no presentan diferencias significativas entre sí cuentan con X en común en la tabla de grupo homogéneos, si no comparten X significa que si existe una diferencia entre esos grupo.

Conforme a lo indicado se puede ver con claridad y de acuerdo a un método estadístico potente como el de diferencia mínima significativa de Fisher, que en el caso del grupo control positivo existe una diferencia significativa con todos los demás grupos, esto también ocurre con el grupo control. En el caso de los grupos correspondientes a las microesferas no existe diferencia significativa entre ellos, excepto entre los sistemas cargados de selenio (Cardoso & Veitía, 2008).

Era de esperarse una diferencia entre los grupos frente al control negativo, ya que las células por el simple hecho de contar con un tratamiento modifican sus funciones normales. En el caso del control positivo, contiene peróxido de hidrogeno como tratamiento, por lo que se esperaba que su viabilidad se viera muy reducida, debido al desarrollo de estrés oxidativo. Los tratamientos de microesferas por su parte evidentemente disminuyen la viabilidad debido a que el contacto entre las microesferas y las células provoca daños a su estructura, incluso causa el desprendimiento de estas de los pozos.

Un hecho muy importante se observa entre los grupos de microesferas cargadas con selenio, ya que es evidente que los excipientes no están alterando la viabilidad de forma significativa, hecho que concuerda con lo mencionado por (Kao et al., 2006; Nunamaker, 2007; Reeves et al., 2010) al decir que todos los polímeros utilizados en la formulación presentan alta biocompatibilidad.

Por lo tanto la variación presentada por los tratamientos con microesferas cargadas se atribuye a la diferencia en la dosis del selenio que contiene, ya que aunque es un mineral indispensable para las células, en cantidades elevadas puede llegar a presentar efectos tóxicos (El-Bayoumy et al., 2002). Por lo tanto es coherente que el sistema 5 presente una mayor viabilidad que el sistema 11, ya que el primero tiene una concentración aproximada de 62µg por microesfera y el sistema 11 una concentración de 109µg.

El hecho de que los tratamientos tengan una influencia significativa sobre la viabilidad no significa que las células no puedan proliferar, el valor mínimo obtenido de viabilidad celular de los tratamientos de microesferas es de 77%, por lo que se encuentra sobre los valores aceptables correspondientes al 70%. Por lo tanto en el caso de los cuatro tratamientos con microesferas, no existe una alteración significativa como para impedir que las células lleven a cabo sus funciones metabólicas normales, y que si se utiliza la dosis de selenio adecuada no supondrán un riesgo para su administración *in vivo*.

8.3.2 Cuantificación de Glutación reducido (GSH)

Las células realizan diferentes procesos metabólicos para mantener sus funciones vitales, algunos de estos procesos pueden generar compuestos potencialmente dañinos. Durante la respiración celular se metaboliza la mayor parte del oxígeno hasta obtener como producto final el agua, pero existe un porcentaje de alrededor del 5% del oxígeno que se metaboliza en intermediarios altamente tóxicos como: aniones superóxido, hidróxido y peróxido de hidrógeno. De igual forma múltiples xenobioticos ejercen sus efectos, generalmente tóxicos, sobre la célula mediante procesos oxidativos inducidos por la misma molécula o por sus metabolitos (Ang & Escorza, 2009).

Los compuestos tóxicos que se generan durante estas reacciones se conocen como especies reactivas de oxígeno (ERO) y son oxidantes altamente reactivos con las macromoléculas del organismo. Son capaces de fijarse a componentes estructurales como: ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos; todos estos enlaces desencadenan una serie de mecanismos dañinos para la célula (Alonso & Miranda, 1997).

La respuesta de la célula a la agresión oxidativa implica no solamente cambios cinéticos y moleculares de enzimas, cosustratos, cofactores y moléculas antioxidantes, sino también el encendido de genes y los cambios de la expresión de proteínas, a todo el fenómeno se le conoce como estrés oxidativo (Ang & Escorza, 2009).

En el caso de las moléculas antioxidantes, existen diferentes mecanismos que modulan señales celulares encaminadas a regular el estado redox causado por radicales libres, estos incluyen: sistemas enzimáticos, moléculas exógenas y endógenas, como el glutatión reducido (GSH). El GSH es un tripéptido que cuenta con un enlace gama glutamilo y un grupo tiol libre. El grupo tiol permite que sea extraordinariamente reactivo con radicales libres, por lo que se le considera el principal agente antioxidante celular (Cisneros et al., 2011).

El estrés oxidativo se puede estimar mediante la cuantificación de glutatión reducido (GSH). Esta sustancia es un antioxidante muy potente que en presencia de ERO se oxida dando lugar a glutatión disulfuro (GSSG). Para mantener su rol antioxidante debe de mantener una proporción GSH/GSSG alta, la cual depende en su mayoría de la actividad de la enzima glutatión reductasa. En este ensayo los niveles de glutatión se detectan utilizando el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditio-bis-2-tio-2-nitrobenzoico o DTNB), el cual reacciona con el grupo sulfidrilo del GSH para producir ácido 5-tio-2-nitrobenzoico o (TNB). La concentración de TNB es directamente proporcional a la cantidad de GSH presente en la célula, por lo que al cuantificar este compuesto es posible conocer la concentración de glutatión intracelular (Lewinski, Colvin, & Drezek, 2008).

Para este ensayo se utilizaron de igual manera líneas celulares renales, se evaluaron nuevamente los sistemas 5 y 11, cargados de selenio y sin cargar. Se consideró además un grupo control positivo al que se le agregó peróxido de hidrógeno y un grupo control negativo sin tratamiento alguno. Para cada grupo se realizaron 4 experimentos y se cuantificó la cantidad de GSH presente por miligramo de proteína.

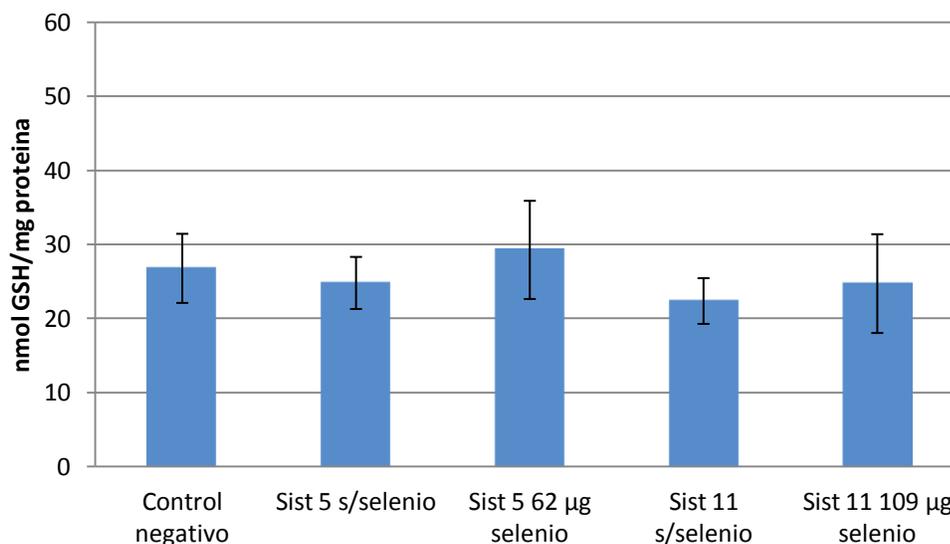


Gráfico 5. Cuantificación del contenido de GSH por miligramo de proteínas para los grupos experimentales. Se muestran las medias de los valores de cada grupo reportadas en nanomoles de GSH por miligramo de proteína, además se indica la desviación estándar para mostrar la variación en los datos de cada grupo.

De acuerdo al Gráfico 5 se puede observar que no existe una diferencia significativa entre los grupos, el control positivo se eliminó del estudio debido a que los niveles de GSH y proteínas fueron menores a lo que se podía cuantificar con la metodología empleada por una citotoxicidad excesiva. Lo mostrado en la grafica corresponde a la media de los valores de cada grupo, por lo que para identificar si existe una diferencia significativa se realizó un análisis de varianza de los 5 grupos evaluados (Tabla 30).

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	106.755	4	26.6889	1.01	0.4325
Intra grupos	395.737	15	26.3825		
Total (Corr.)	502.492	19			

Tabla 30. Análisis de varianza para la cuantificación de GSH intracelular de los grupos experimentales.

Tomando en cuenta los resultados de la Tabla 30, no se identifica una diferencia significativa entre los grupos experimentales, ya que el valor de P es mayor a 0.05. Por lo tanto las medias de cada grupo son iguales y sus intervalos de confianza se interceptan entre sí, esto se muestra en el Gráfico 6.

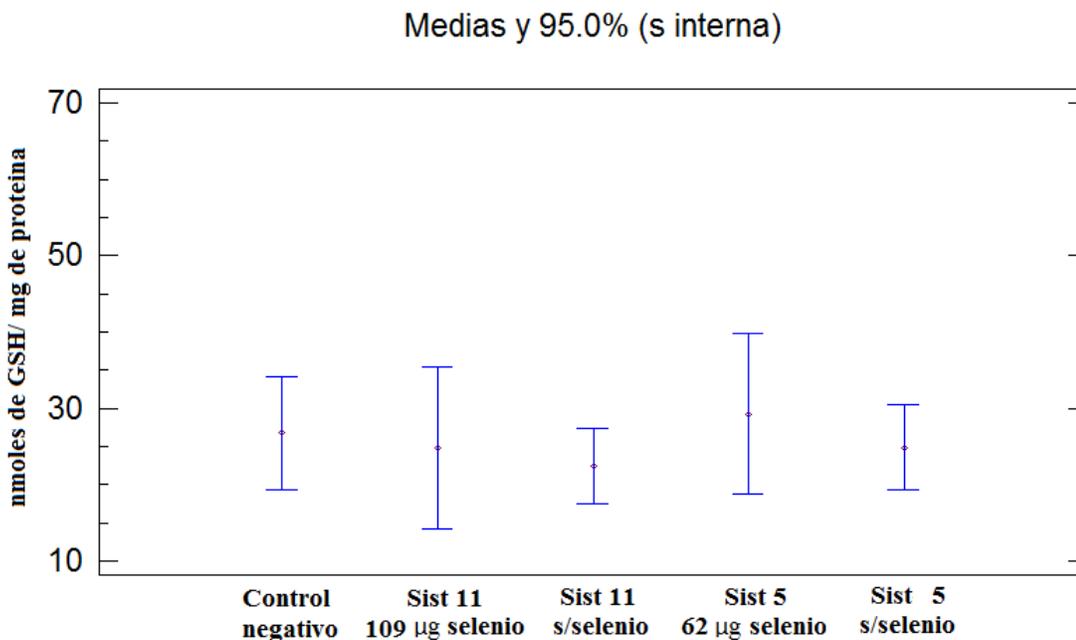


Grafico 6. Comparación de medias con intervalos de confianza al 95% para la cuantificación de GSH intracelular de los grupos experimentales. Los valores de GSH se reportan en nano moles por miligramo de proteínas.

El resultado obtenido del análisis estadístico de la cuantificación de GSH indica que los sistemas evaluados de microesferas no comprometen los mecanismos moduladores antioxidantes del GSH en las células VERO. Esto se refleja al analizar los niveles de GSH intracelular y encontrar que son a los del control negativo. Aunque en este trabajo no se cuantifico el GSSG, se ha encontrado que en circunstancias normales la proporción de GSH debe ser del 90% y el GSSG el 10% restante, cualquier modificación en esa proporción es un indicativo de estrés oxidativo (Beman, Mahmoudabad, Saberi, & Pirzad, 2008).

Este resultado es muy importante ya que no solo se comprueba que los excipientes de la formulación no representan un riesgo potencial en la generación de radicales libres, sino

que además la concentración de selenio en las microesferas tampoco representan un riesgo. Es posible además determinar que el selenio contenido en las microesferas se está liberando ya que si se compara la media de los sistemas sin cargar con la de los sistemas cargados, se observa un aumento en la cantidad de GSH intracelular.

Dentro de las células existen diferentes reacciones entre el selenio y el glutatión, por lo general un aumento en los niveles de selenio intracelulares produce un aumento en la cantidad de GSH en la célula, debido a que se estimula la síntesis de selenoproteínas y estas a su vez por acción de la enzima glutatión reductasa aumentan la cantidad de GSH intracelular. Es posible identificar de acuerdo a los resultados del grupo 5 que los niveles de GSH se ven aumentados por la presencia de selenio, al igual que los del sistema 11.

Aunque esto no quiere decir que sea recomendable seguir aumentando la cantidad de selenio de la dosis, ya que durante la síntesis de selenoproteínas existe una disminución en los niveles de GSH, ya que es un sustrato en esta reacción. Por lo tanto si existen niveles de selenio muy elevados esta relación puede salirse de control y llevar a una disminución muy marcada de los niveles de GSH, dejando expuesta a la célula a los efectos de los radicales libres (Batist, Katki, Klecker, & Myers, 1986).

El selenio es un caso particular dentro de los antioxidantes debido a su relación con el GSH, por lo que también es necesario indicar que el exceso en la cantidad de cualquier antioxidante dentro de la célula tampoco es saludable. Diferentes estudios han determinado que es necesaria la presencia de una cierta cantidad de especies reactivas de oxígeno dentro de la célula para su correcto funcionamiento, las ERO poseen un rol crucial en funciones celulares como: la señalización celular, expresión genética, regulación de las respuestas inmunes y fomentar los mecanismos de defensa antioxidantes (Bouayed & Bohn, 2010).

9. Conclusiones

Mediante este trabajo de tesis se definieron las propiedades y ventajas que una forma farmacéutica novedosa, como las microesferas mucoadhesivas, pueden representar para la terapéutica convencional. Además de que se comprobó que tienen la capacidad de ser un medio eficiente para la administración de partículas pequeñas como el selenio.

La gelificación iónica representó un método muy sencillo para la elaboración de microesferas mucoadhesivas, sin embargo, aun se requieren más estudios para implementar su escalamiento, lo que representara un reto muy grande, debido a la variación del tamaño de partícula.

El potencial mucoadhesivo de las formulaciones resultó ser igual para todos los casos, lo que significa que el alginato por si solo es capaz de brindarle una fuerza mucoadhesiva muy alta a las microesferas, ya que este polímero se encontró en un porcentaje constate en todas ellas. Aunque si llevara a cabo algún otro método que permita evaluar esta fuerza durante mayor tiempo, se hará evidente que los excipientes utilizados en la formulación aportan un aumento en la mucoadhesividad.

Se obtuvieron porcentajes de captura muy altos para un mineral de tamaño de partícula tan pequeño como el selenio, se definió que la utilización de carboximetilcelulosa sódica y carbopol 971p, brinda muy buenos resultados, aunque si se considerará en un estudio posterior su utilización, se recomienda aumentar la concentración de los polímeros complementarios al 2% p/v.

En cuanto a los estudios de citotoxicidad se determino que aunque existió una diferencia significativa entre los tratamientos de microesferas y el control, el porcentaje de viabilidad

se encuentra en niveles por encima del 70%, por lo tanto no existe una afectación en las funciones vitales de las células. Además, de acuerdo a la cuantificación de GSH, se determinó que no existe ninguna diferencia significativa con respecto al control, por lo tanto no existe evidencia de que los tratamientos generen especies reactivas de oxígeno. Es posible indicar que las formulaciones utilizadas en el estudio son biocompatibles y su administración *in vivo* no representará ningún riesgo para las células que se encuentren en contacto con las microesferas mucoadhesivas.

En el caso de considerar ser utilizadas *in vivo*, se requerirá adaptar un medio de transporte para que las microesferas mucoadhesivas sean liberadas directamente en el intestino delgado, ya que presentan adhesión en cualquier mucosa y si se encontraran libres en el estomago se fijarían y no llegarían a su sitio de acción.

10. Literatura Citada

- Abdo, K. M. (1994). *Sodium Selenate and Sodium Selenite* (p. 127). New York.
- Adel, A. M., Nada, A. M., Abou-Youssef, H., & El-Gendy, A. A. (2010). Carboxymethylated Cellulose Hydrogel; Sorption Behavior and Characterization. *Nature and Sciences*, 8(8), 244–256.
- Agrawal, P., Rajput, S., Shrivastava, N., Baghel, S., & Baghel, R. (2012). MICROSPHERES A MAGICAL NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEM: *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutica Sciences*, 1(1), 439–455.
- Alagusundaram, M., C, M. S. C., Umashankari, K., Badarinath, A. V., Lavanya, C., & Ramkanth, S. (2009). MICROSPHERES AS A NOVEL DRUG DELIVERY SYSTEM - A REVIEW. *International Journal of ChemTech Research*, 1(3), 526–534.
- Ali, J., Baboota, S., Khar, R., Md, S., Sahni, J., Singh, G., & Ahuja, A. (2012). Mucoadhesive microspheres as a controlled drug delivery system for gastroretention. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 3(1), 4–14. doi:10.4103/0975-8453.107130
- Alonso, M. L., & Miranda, M. (1997). Archivos de medicina veterinaria Glutación peroxidasa (GSH-Px) en las patologías asociadas a deficiencias de selenio en rumiantes. *Arch. med. vet.*, 29(2), 1–11.
- Andrews, G. P., Laverty, T. P., & Jones, D. S. (2009). Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 71(3), 505–18. doi:10.1016/j.ejpb.2008.09.028
- Ang, M., & Escorza, Q. (2009). la capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *REB*, 28(3), 89–101.
- Ankita, G., & Prashant, U. (2012). Microadhesive Microspheres: A Short Review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3), 24–27.
- Asane, G. S., Nirmal, S. a, Rasal, K. B., Naik, a a, Mahadik, M. S., & Rao, Y. M. (2008). Polymers for mucoadhesive drug delivery system: a current status. *Drug development and industrial pharmacy*, 34(11), 1246–66. doi:10.1080/03639040802026012

- Batist, G., Katki, A. G., Klecker, R. W., & Myers, C. E. (1986). Selenium-induced Cytotoxicity of Human Leukemia Cells: Interaction with Reduced Glutathione. *Cancer Research*, *46*, 5482–5485.
- Bautista Bárcenas, E. (2010). *Evaluacion de dos fuentes de selenio organico para desarrollar leche enriquecida en hatos de bovino doble proposito*. Universidad Veracruzana.
- Becvort-Azcurra, A., Fuentes-Lara, L. O., Benavides-Mendoza, A., Ramirez, H., Robledo-Torres, V., & Rodriguez-Mendoza, M. de las N. (2012). APLICACIÓN DE SELENIO EN TOMATE: CRECIMIENTO, PRODUCTIVIDAD Y ESTADO ANTIOXIDANTE DEL FRUTO. *Terra Latinoamericana*, *30*(4), 291–301.
- Belgamwar, V., Shah, V., & Surana, S. J. (2009). Formulation and evaluation of oral mucoadhesive multiparticulate system containing metoprolol tartarate: an in vitro-ex vivo characterization. *Current drug delivery*, *6*(1), 113–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19418963>
- Beman, A., Mahmoudabad, Z., Saberi, M., & Pirzad, J. (2008). Critical role of GSH in Sulfur Mustard-induced Oxidative Stress and Cytotoxicity in Human Skin Fibroblast Cell Line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, *7*(April 2007), 35–41.
- BHADKE, S. E. (2006). "FORMULATION AND DEVELOPMENT OF REPAGLINIDE MICROPARTICLES BY IONOTROPIC GELATION TECHNIQUE." Rajiv Gandhi University of Health Sciences.
- Bhargava, A., Rathore, R. P. S., Tanwar, Y. S., Gupta, S., & Bhaduka, G. (2013). Oral Sustained Release Dosage Form: An Opportunity to prolong the release of drug. *International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical and BioSciences*, *3*(1), 7–14.
- Bols, N., Dayeh, V., Lee, L., & Schirmer, K. (2005). Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, *6*, 43. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873014005800050>
- Bonferoni, M. C., Chetoni, P., Giunchedi, P., Rossi, S., Ferrari, F., Burgalassi, S., & Caramella, C. (2004). Carrageenan-gelatin mucoadhesive systems for ion-exchange based ophthalmic delivery: in vitro and preliminary in vivo studies. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics: official journal of Arbeitsgemeinschaft für Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V*, *57*(3), 465–72. doi:10.1016/j.ejpb.2003.12.002
- Bouayed, J., & Bohn, T. (2010). Exogenous Antioxidants—Double-Edged Swords in Cellular Redox State: Health Beneficial Effects at Physiologic Doses versus Deleterious Effects at High Doses. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *3*(4), 228–237. doi:10.4161/oxim.3.4.12858

- Broadley, M. R., White, P. J., Bryson, R. J., Meacham, M. C., Bowen, H. C., Johnson, S. E., ... Tucker, M. (2007). Biofortification of UK food crops with selenium. *Proceedings of the Nutrition Society*, 65(02), 169–181. doi:10.1079/PNS2006490
- Bruggeman, C., & Maes, A. (1997). Current State-of-the-Art Regarding Selenium Geochemistry Under Boom Clay Conditions. *Contaminant Hydrology*, 248, 223–248.
- Calamari, L., Cappelli, F. P., Ferrari, A., Bertin, G., Calamari, L., Facoltà, Z., & Cattolica, U. (2007). Glutathione peroxidase responses in mature horses following the withdrawal of an organic selenium supplement. *Italian Journal of Animal Science*, 6(1), 275–277.
- Cardoso, G. C., & Veitía, N. (2008). Aplicación de métodos de comparaciones múltiples en Biotecnología Vegetal. *Biotecnología Vegetal*, 8(2), 67–71.
- Chan, L. W., Lee, H. Y., & Heng, P. W. S. (2006). Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 63(2), 176–187. doi:10.1016/j.carbpol.2005.07.033
- Chowdary, K P R, Deepthi, K. S., & Rao, Y. S. (2009). Mucoadhesive Microcapsules of Indomethacin: Evaluation for Controlled Release and Ulcerogenic Activity. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 1(2), 74–79.
- Chowdary, K P R, & Madhavi, B. L. R. (2012). Preparation and evaluation of HPMC-Alginate mucoadhesive microcapsules of aceclofenac for controlled release. *International Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 3(12), 72–78.
- Chowdary, Kora Pattabhi Rama, & Rao, Y. S. (2004). Mucoadhesive microspheres for controlled drug delivery. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 27(11), 1717–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15516712>
- Cisneros, R., Oré, R., Arnao, I., & Suárez, S. (2011). Relación de glutatión reducido / oxidado (GSH / GSSG) en ratas diabéticas tratadas con maca (*Lepidium meyenii* walp). *Anales de facultad de medicina*, 72(2), 107–111.
- Crandell, K. (1999). Selenium - How Important Is It? *Equine News*, 2(4), 9–11.
- Dandagi, P. M., Belekar, A. M., Mastiholmath, V. S., Gadad, A. P., Sontake, V. W., & Salián, P. S. (2013). An Improvement of the Efficacy of Moxifloxacin HCl for the Treatment of Bacterial Keratitis by the Formulation of Ocular Mucoadhesive Microspheres. *Scientia pharmaceutica*, 81(1), 259–80. doi:10.3797/scipharm.1204-08
- Dhakar, R. C., Maurya, S. D., & Saluja, V. (2012). Variables influencing drug release pattern of microspheres: a technical review. *Journal of drug delivery & therapeutics*, 2(4), 15–22.

- Dhakar, R., Dutta Maurya, S., & Saluja, V. (2012). FROM FORMULATION VARIABLES TO DRUG ENTRAPMENT EFFICIENCY OF MICROSPHERES: A TECHNICAL REVIEW. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2(6), 128–133. Retrieved from <http://www.jddtonline.info/index.php/jddt/article/view/160>
- Draget, K I. (2000). Alginates. In *Handbook oh Hydrocolloids* (p. 450). Woodhead publishing limited.
- Draget, K., Smidsrød, O., & Skjåk- Bræk, G. (2005). Alginates from algae. *Biopolymers Online*, 215–224. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600035.bpol6008/full>
- Draget, Kurt Ingar, Aune, I., Andersen, P. O., Ingar, K., Ga, O., Storbakken, B., ... Smidsrød, O. (2001). Effects of molecular weight and elastic segment τ exibility on syneresis in Ca-alginate gels. *Food Hydrocolloids*, 15, 485–490.
- El-Bayoumy, K., Richie, J. P., Boyiri, T., Komninou, D., Prokopczyk, B., Trushin, N., ... Colosimo, S. (2002). Influence of selenium-enriched yeast supplementation on biomarkers of oxidative damage and hormone status in healthy adult males: a clinical pilot study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 11(11), 1459–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433727>
- Éllez, N. O. T., Gonzalez, E., Gil, E., & Castro, C. (2008). Citotoxicidad in vitro de células tumorales con nanotubos de carbono de pared simple activados con ácido polisulfónico m-aminobenceno y con polietilenglicol *. *Univ. Med. Bogota*, 49(3), 317–327.
- Espinosa, J., Rosiles, M., Ochoa, G., & Olguín, B. (2004). ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CONCENTRACIONES DE SELENIO EN SUELO, FORRAJE Y SANGRE DE BOVINOS CLINICAMENTE SANOS BAJO CONDICIONES DE PASTOREO EN EL TROPICO HUMEDO Y ALTIPLANO MEXICANO. In *XXVIII Congreso Nacional de Buiatría* (pp. 1–4). Morelia, Michoacan.
- Fader, O. W. (2001). Los minerales ne la nutricion y salud animnal en la region central de la provincia de cordoba. *Medicina Veterinaria*. Retrieved May 20, 2013, from [ww.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
- Finch, J. M., & Turner, R. J. (1996). Effects of selenium and vitamin E on the inmune responses of domestic animals. *Research in veterinary science*, 60(2), 97–106.
- FMC BioPolymer. (2001). Sales Specification Manucol LKX.
- FMC BioPolymer. (2005). Sales Specification Keltone LVCR.

- Francisco, D., Arrebola, A., Alfredo, L., & Fernández, R. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia , algunas consideraciones y su utilidad . *revista de toxicología en linea*, 40–52.
- Fu, S., Thacker, A., Sperger, D. M., Boni, R. L., Buckner, I. S., Velankar, S., ... Block, L. H. (2011). Relevance of rheological properties of sodium alginate in solution to calcium alginate gel properties. *AAPS PharmSciTech*, 12(2), 453–60. doi:10.1208/s12249-011-9587-0
- Gandhi, S. D., Pandya, P. R., Umbarkar, R., & Tambawala, T. (2011). MUCOADHESIVE DRUG DELIVERY SYSTEMS-AN UNUSUAL MANEUVER FOR SITE SPECIFIC DRUG DELIVERY SYSTEM. *PHARMA SCIENCE MONITOR AN INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 2(3), 132–152.
- George, M., & Abraham, T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 114(1), 1–14. doi:10.1016/j.jconrel.2006.04.017
- Ghareeb, M. M., Issa, A. A., & Hussein, A. A. (2012). Preparation and Characterization of Cinnarizine Floating Oil Entrapped Calcium Alginate Beads. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(02), 501–508.
- Gonjari, I. D., Hosmani, a H., Karmarkar, a B., Kadam, S. B., Godage, a S., & Khade, T. S. (2009). Microspheres of tramadol hydrochloride compressed along with a loading dose: A modified approach for sustaining release. *Drug discoveries & therapeutics*, 3(4), 176–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22495604>
- Gonzales King-keé, K. C. (2001). *Método de mínimos cuadrados ponderados para la estimación de los modelos lineales generalizados*. Universidad Nacional Mayos de San Marcos.
- Harel, M. (2005). MICROPARTICLES FOR ORAL DELIVERY. *WO Patent 2,005,115,341*. Retrieved from <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2005115341>
- Harel, M., & Carpenter, B. (2010). MICROPARTICULATED VACCINES FOR THE ORAL OR NASAL VACCINATION AND BOOSTERING OF ANIMALS INCLUDING FISH. *WO Patent 2,010,111,565*. Retrieved from <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2010111565>
- Harshard, P., Sunil, B., Nayan, G., Bhushan, R., & Sunil, P. (2010). Different Methods of Formulations and Evaluation of Mucoadhesive Microsphere. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 1(3), 1157–1167.
- Hefnawy, A. E. G., & Tórtora-Pérez, J. L. (2010). The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Ruminant Research*, 89(2-3), 185–192. doi:10.1016/j.smallrumres.2009.12.042

- Hernández-Calva, L. M., & E., R.-B. J. (2006). Diagnóstico del estado del selenio y de la inyección de selenito de sodio en ganado peleador en la meseta mexicana. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 40(1), 47–50.
- Hernández-mendoza, H., & Rios-lugo, M. J. (2009). Rol biológico del selenio en el humano. *Química viva*, 2(8), 64–80.
- Hosmani, A., & Pramod, V. (2009). Preparation and In Vitro and In Vivo Evaluation of Glipizide Mucoadhesive Microspheres using Factorial Design. *Latin American Journal of Pharmacy*, 28(2), 254–260. Retrieved from http://www.latamjpharm.org/trabajos/28/2/LAJOP_28_2_1_13_JOK94G603E.pdf
- Hosmani, A., Thorat, Y., & Kasture, P. (2006). Carbopol and its pharmaceutical significance: a review. *Pharmainfo. net*, 1–22. Retrieved from <http://www.doaj.org/doaj?func=fulltext&ald=340826>
- Imran Abdul, K. T., Shahi, S., Thube, M., & Ankit, S. (2012). Review on Microspheres. *International Journal of Pharmaceutical Research and Allied Sciences*, 1(1), 24–33.
- Jain, N., Gulati, N., Kumar, D., & Nagaich, U. (2012). Microspheres: Mucoadhesion Based Controlled Drug Delivery System. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(3), 28–40. doi:10.5530/rjps.2012.3.3
- Jay, S. M., Peevy, N. J., Jenkins, T. C., & Burg, K. J. L. (2006). Biodegradable microparticles based on poly(D,L-lactide) as a protective transport system in ruminant digestion. *Pharmaceutical Development and Technology*, 11(4), 485–491.
- Kamal, R., Arya, K., Singh, R., & Juyal, V. (2010). MUCOADHESIVE MICROSPHERES OF FAMOTIDINE: PREPARATION CHARACTERIZATION AND IN VITRO. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2(6), 1575–1580.
- Kao, H., Lo, Y., Lin, H., & Yu, S. (2006). Characterization of pilocarpine-loaded chitosan/Carbopol nanoparticles. *Journal of pharmacy and ...*, 58(2), 179–86. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1211/jpp.58.2.0004/abstract>
- Karthikeyan, D., Karthikeyan, M., & Ramasamy, C. (2008). Effect of Different Viscosity Grades of HPMC on Drug Release Profile. *Journal of Pharmacy Research*, 1(1), 23–28.
- Kaurav, H., Hairikumar, S. L., & Kaur, A. (2012). Mucoadhesive Microspheres as carriers in Drug Delivery : a Review. *International Journal of Drug Development & Research*, 4(2), 21–34.
- Keppeler, S., Ellis, a., & Jacquier, J. C. (2009). Cross-linked carrageenan beads for controlled release delivery systems. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 973–977. doi:10.1016/j.carbpol.2009.07.029

- Kesavan, K. K., Nath, G. N., & Pandit, J. K. P. (2010). Sodium Alginate Based Mucoadhesive System for Gatifloxacin and Its In Vitro Antibacterial Activity. *Scientia Pharmaceutica*, 78, 941–957. doi:10.3797/scipharm.1004-24
- Khutoryanskiy, V. V. (2011). Advances in mucoadhesion and mucoadhesive polymers. *Macromolecular bioscience*, 11(6), 748–64. doi:10.1002/mabi.201000388
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13(1), 3–13. doi:10.1016/S0958-6946(02)00155-3
- Kumar, G., Singh, S., Nath, G., & Kant, R. (2011). Evaluation of pH sensitive gastroretentive polymeric blend buoyant beads of acetohydroxamic acid for clearance of Helicobacter pylori. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(3-4), 132–140.
- Kumar Verma, A., Kumar, A., Rahal, A., Kumar, V., & Roy, D. (2012). Inorganic Versus Organic Selenium Supplementation: A Review. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 15(9), 418–425.
- Lewinski, N., Colvin, V., & Drezek, R. (2008). Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, 4(1), 26–49. doi:10.1002/smll.200700595
- Liggins, R., Toleikis, P., & Guan, D. (2006). MICROPARTICLES WITH HIGH LOADINGS OF A BIOACTIVE AGENT. *WO Patent 2,006,002,365*. Retrieved from <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2006002365>
- Limón-Pacheco, J., & Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation research*, 674(1-2), 137–47. doi:10.1016/j.mrgentox.2008.09.015
- Lohani, A., & Chaudhary, G. (2012). Mucoadhesive microspheres: A novel approach to increase gastroretention. *Chronicles of Young Scientists*, 3(2), 121. doi:10.4103/2229-5186.98684
- López Arellano, R., Revilla, A., & Tórtora, J. (2012). La deficiencia de selenio. *Revista Ciencia y Desarrollo*, 1–6.
- Madhav, N. V. S., & Kala, S. (2011). Review on Microparticulate Drug Delivery System. *International Journal of PharmaTech Research*, 3(3), 1242–1254.
- Mahammed, S., Alli, A., Ali, A., Fatmah, K., & Fatmah, N. Y. (2011). ORAL MUCOADHESIVE MICROCARRIERS FOR CONTROLLED AND EXTENDED RELEASE FORMULATIONS. *International Journal of Life Science and Pharma Research*, 1(1), 41–59.

- Myrvold, R., & Onsoyen, E. (2013, April). Alginate. *FMC Biopolymers*. doi:10.1093/toxsci/kft041
- Neetika, B., Arsh, D., & Manish, G. (2012). AN OVERVIEW ON VARIOUS APPROACHES TO ORAL CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEM VIA GASTRORETENTIVE DRUG DELIVERY SYSTEM. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(4), 128–133.
- Neospark. (1992). Role of trace minerals in animal production. *What do i need to know about trace minerals for cattle, horses, sheep and goats?* Retrieved May 20, 2013, from www.neospark.com/images/TRACEMIN.PDF
- Niles, A. L., Moravec, R. a, & Riss, T. L. (2008). Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. *Expert opinion on drug discovery*, 3(6), 655–69. doi:10.1517/17460441.3.6.655
- Niles, A. L., Moravec, R. a, & Riss, T. L. (2009). In vitro viability and cytotoxicity testing and same-well multi-parametric combinations for high throughput screening. *Current chemical genomics*, 3, 33–41. doi:10.2174/1875397300903010033
- Nunamaker, E. (2007). In vivo stability and biocompatibility of implanted calcium alginate disks. *Journal of Biomedical ...*, (2006), 22–30. doi:10.1002/jbm.a
- Oliveira, B. F., Santana, M. H. A., & Re, M. I. (2005). SPRAY-DRIED CHITOSAN MICROSPHERES CROSS-LINKED WITH D , L-GLYCERALDEHYDE AS A POTENTIAL DRUG DELIVERY SYSTEM: PREPARATION AND CHARACTERIZATION. *Brazil Journal of Chemical Engineering*, 22(03), 353–360.
- Palomo Segovia, J. (2005). *Comparación de dos fuentes de selenio (orgánico vs Inorgánico) en ganacias de peso y parámetros ruminales en borregas lactantes.*
- Pavanveena, C., & Kavitha, K. (2010). Formulation and evaluation of trimetazidine hydrochloride loaded chitosan microspheres. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 2(2), 11–14. Retrieved from <http://www.ijaponline.org/Vol2Issue2/3.pdf>
- PharmaQuest. (2010). Bioadhesive system & in situ gel. Retrieved from <http://pharmaquest.weebly.com/articles.html>
- Prajapati, S. K., Tripathi, P., Ubaidulla, U., & Anand, V. (2008). Design and development of gliclazide mucoadhesive microcapsules: in vitro and in vivo evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 9(1), 224–30. doi:10.1208/s12249-008-9041-0
- Prasanth, V. V, Moy, A. C., Mathew, S. T., & Mathapan, R. (2011). Microspheres - An Overview. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 2(2), 332–338.

- Ramírez Bribiesca, E. (2009). Suplementación de selenio en áreas deficientes de México. In *Tecnologías en apoyo a ovinocultores* (pp. 21–25). Retrieved from <http://spo.uno.org.mx/tecnologias-para-ovincultores/>
- Ramírez, H., Robledo, V., Sandoval, A., Fuentes-Lara, L. O., & Benavides-Mendoza, A. (2010). Elementos traza y calidad nutricional, casos del yodo, zinc y selenio.
- Ramírez-Bribiesca, J. E., Tortora, J. L., Huerta, M., Aguirre, A., & Hernández, L. M. (2001). Diagnosis of selenium status in grazing dairy goats on the Mexican plateau. *Small Ruminant Research*, 41(1), 81–85.
- Rathore, B., Yadav, A., Nayak, G., Saraogi, G. K., & Singhai, A. K. (2012). A review on microspheres as drug delivery carriers for management of diabetes mellitus. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, 3(10), 2064–2070.
- Reeves, R., Ribeiro, A., Lombardo, L., Boyer, R., & Leach, J. B. (2010). Synthesis and Characterization of Carboxymethylcellulose-Methacrylate Hydrogel Cell Scaffolds. *Polymers*, 2(3), 252–264. doi:10.3390/polym2030252
- Repetto, M. (1995). *Toxicología avanzada* (p. 531). Madrid, España: Diaz de Santos.
- SAGARPA. (2012). Produccion carne ganado bovino. Retrieved August 07, 2013, from http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=371
- Saha, U. K., Hancock, D. W., Hill, N. S., Kissel, D. E., Mowrer, J. E., Sonon, L. s, & Stewart, L. (2011). Selenium in Georgia Soils and Forages: Importance in the Livestock Industry.
- Sahil, K., Akanksha, M., Premjeet, S., Bilandi, A., & Kapoor, B. (2011). MICROSPHERE : A REVIEW. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry*, 1(4), 1184–1198.
- Segovia Palomo, J. (2005). *Comparación de dos fuentes de selenio (orgánico vs inorgánico) en ganancias de peso y parametros ruminales en borregas lactantes*. Universidad Autonoma de Chihuahua.
- Selinus, O., & Alloway, B. J. (2005). *Essentials of medical geology: impacts of the natural enviroment on public health* (p. 812). Academic Press.
- Serfontein, W. (1996). Sustained release food or feed supplement containing vitamins and minerals. *EP Patent 0,689,834*. Retrieved from <http://www.freepatentsonline.com/EP0689834.html>
- Sharma, D., Singh, M., Kumar, D., & Singh, G. (2012). Novel Paradigms in Mucoadhesive Drug Delivery System. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(08), 2455–2471.

- Silva, J. H., Quiroga, M. A., & Auza, N. J. (2000). Selenio en el rumiante . Relaciones suelo , planta , animal . *Medicina Veterinaria*, 17(10), 229–246.
- Singh, D., Singh, M., Saraf, S., Dixit, V. K., & Saraf, S. (2010). Optimization and Characterization of Gentamicin Loaded Chitosan Microspheres for Effective Wound Healing, 44(2).
- Singh, S., Govind, M., & Bothara, S. B. (2013). A Review on in vitro - in vivo Mucoadhesive Strength Assessment. *PhTechMed*, 2(1), 221–229.
- Sivanarayana, P., Kishore, V. S., & Kumar, P. J. (2012). EFFECT OF CROSS-LINKING AGENT AND POLYMER ON THE CHARACTERISTICS OF DILTIAZEM HYDROCHLORIDE LOADED MUCOADHESIVE MICROSPHERES. *American Journal of Pharmtech Research*, 2(1), 398–409.
- Smrdel, P., Bogataj, M., & Mrhar, A. (2008). The Influence of Selected Parameters on the Size and Shape of Alginate Beads Prepared by Ionotropic Gelation. *Scientia Pharmaceutica*, 76(1), 77–89. doi:10.3797/scipharm.0611-07
- Steinbuchel, A. (2009). *Alginates: Biology and Applications*. (Be. H. A. Rehm, Ed.) (p. 266). Munster, Germany: Springer.
- Sunde, R. A. (1990). Molecular biology of selenoproteins. *Anual Review of Nutrition*, 10, 451– 474.
- Tangri, P. (2011). Recent Advances in Oral Mucoadhesive Drug Delivery Systems: A Review. *International Journal of Pharma Research and Development*, 3(2), 151–162.
- Tangri, P., Khurana, S., & Madhav, N. V. S. (2011). MUCOADHESIVE DRUG DELIVERY : MECHANISM AND METHODS OF EVALUATION. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2(1), 458–467.
- Tavakol, M., Vasheghani-farahani, E., & Hashemi-najafabadi, S. (2013). The effect of polymer and CaCl₂ concentrations on the sulfasalazine release from alginate-N , O-carboxymethyl chitosan beads. *Progress in Biomaterials*, 2(10), 1–8.
- Valdiviezo Morales, L. (2012). *Diseño y caracterización de microcápsulas de seleniometionina*. Colegio de Postgraduados.
- Vasir, J. K., Tambwekar, K., & Garg, S. (2003). Bioadhesive microspheres as a controlled drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, 255(1-2), 13–32. doi:10.1016/S0378-5173(03)00087-5
- Villardón, J. L. V. (2005). Introducción al análisis de la varianza.

- Vinod, K., Rohit Reddy, T., Sandhya, S., Banji, D., & Venkatram Reddy, B. (2012). Critical Review on Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Journal for drug and medicines*, 4(1), 7–28.
- Wadood Siddiqui, A., & Kumar Gupta, A. (2012). Environmental Responsive Hydrogels: A Novel Approach in Drug Delivery Systems. *Journal of drug delivery & therapeutics*, 2(1), 1–8.
- Wee, S., & Gombotz, W. (1998). Protein release from alginate matrices. *Advanced drug delivery reviews*, 31(3), 267–285. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837629>
- Yadav, V. K., Gupta, A. B., Kumar, R., Yadav, J. S., & Kumar, B. (2010). Mucoadhesive Polymers: Means of Improving the Mucoadhesive Properties of Drug Delivery System. *Journal of chemical and pharmaceutical research*, 2(5), 418–432.

11. Anexos

11.1 Técnica para la determinación de viabilidad celular por medio del ensayo de MTT.

- **Reactivos utilizados**
 - Solución de Bromuro de Tiazolil Azul Tetrazólico (5mg/mL en PBS).
 - Solución de extracción del formazán (Nonidet al 0.1% y concentración final 4mM HCl, en isopropanol).
 - Medio PBS 1x (Buffer de Fosfatos Salino pH 7.4). Para preparar 1 L de este buffer se requiere:
 - 8.0g NaCl
 - 0.2g KCl
 - 1.44g Na₂HPO₄
 - 0.2g KH₂PO₄
 - Agua Ultra pura
 - Ajustar pH con NaOH 1N

- **Preparación de los controles y las muestras**
 - Control Negativo
 - No se aplico tratamiento.

 - Control Positivo
 - Se agregaron 15µL de peróxido de hidrogeno al 30% (9.8 M) en cada pozo.

- Sistema de microesferas
 - Se agrego 1 microesfera en cada pozo, se evaluaron diferentes concentraciones de selenito de sodio contenidas en la esfera y esferas sin cargar, de acuerdo a cada sistema evaluado.

- **Procedimiento**
 1. Cambiar el medio nutritivo de cada pozo (1 mL)
 2. Colocar las microesferas según el orden establecido, terminado esto introducir a la incubadora las cajas de 12 pozos.
 3. Pasadas 2 horas a partir de la exposición, agregar 10µL del reactivo de tetrazolio a cada pozo, mantener en incubación.
 4. Al término de 4 horas a partir de la aplicación del tratamiento, retirar el medio nutritivo y en el caso de las microesferas retirarlas con cuidado de los pozos.
 5. Adicionar 1ml de la solución de extracción del formazán a cada pozo.
 6. Someter a agitación las placas de pozos a 150rpm durante 10 minutos.
 7. Retirar la solución y colocarla en tubos ependorf de 1.5mL.
 8. Centrifugar los tubos a 12000rpm, a 4°C, durante 5 min.
 9. Leer el formazán a una longitud de onda de 590nm

- **Determinación de la viabilidad**

Para calcular el porcentaje de viabilidad celular se utilizo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{(\text{Absorbancia de la muestra})}{(\text{Absorbancia del control negativo})} \times 100$$

11.2 Técnica para la determinación de Glutación reducido (GSH)

▪ Reactivos utilizados

- Solución Tritón al 0.1% (100 μ L tritón, concentración final de PMSF 15mM y EDTA 5mM)
- Mezcla de reacción (concentración final 0.52mM DTNB y 0.15mM EDTA, en buffer de fosfatos).
- Stock de GSH (concentración final 50 μ M de glutación).
- Acido perclórico 2.5%
- Medio PBS 1x (Buffer de Fosfatos Salino pH 7.4). Para preparar 1 L de este buffer se requiere:
 - 8.0g NaCl
 - 0.2g KCl
 - 1.44g Na₂HPO₄
 - 0.2g KH₂PO₄
 - Agua Ultra pura
 - Ajustar pH con NaOH 1N

▪ Preparación de los controles y las muestras

- Control Negativo
 - No se aplico tratamiento.
- Control Positivo
 - Se agregaron 15 μ L de peróxido de hidrogeno al 30% (9.8 M) en cada caja petri.
- Sistema de microesferas
 - Se agrego 1 microesfera en caja petri, se utilizaron esferas cargadas de selenio y sin cargar, de acuerdo a cada sistema evaluado.

▪ Procedimiento

1. Cambiar el medio nutritivo de cada caja petri (1 mL)
2. Colocar el tratamiento de microesferas de interés correspondiente e introducir los cultivos a la incubadora.
3. Al término de 4 horas a partir de la aplicación del tratamiento, retirar de la incubadora.
4. Colocar las cajas petri en hielo (a partir de este momento realizar todos los pasos procurando mantener las cajas petri en hielo).
5. Retirar medio y guardar en microtubos de 1.5mL.
6. En el caso de los tratamientos con microesferas, retirar con cuidado y guardar en microtubos.
7. Limpiar cada caja petri con buffer de fosfatos salino pH 7.4 (se prepara como se indica en la página 96).
8. Agregar 1mL de buffer de fosfatos a cada caja y rasurar con rastrillo para retirar las células adheridas.
9. Recuperar la suspensión de células obtenidas y colocarla en microtubos de 1.5mL.
10. Centrifugar los tubos a 12000rpm, a 4°C, durante 5 min.
11. Desechar sobrenadante.
12. Resuspender el remanente y agregar 200µL de la Solución Tritón al 0.1% a cada tubo.
13. Incubar durante 30 minutos en hielo.
14. Someter a sonicación 3 pulsos de 10 segundos a 97Mhz. En hielo.
15. Centrifugar el producto sonicado a 12000 rpm, a 4°C, por 10 minutos.
16. Del sobrenadante obtenido se separan 10µL para la cuantificación de proteínas totales (resguardar la muestra en refrigeración).
17. Se utilizan 180µL del sobrenadante de cada tubo y se le adicionan 180µL de ácido perclórico al 2.5%.
18. Se deja incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.

19. Centrifugar los tubos a 12000rpm, a 4°C, durante 5 min.
20. Del sobrenadante obtenido se toman 50µL y se llevan a un volumen final de 500µL con la mezcla de reacción.
21. De los 500µL de la solución anterior se toman 200µL y se colocan en una placa de 96 pozos.
22. Para la preparación de la curva de calibración se llevara a cabo la lectura de acuerdo a la siguiente tabla:

Pozo numero	1	2	3	4	5
Concentracion de GSH µM	50	25	12.5	6.25	3.125
Solucion de GSH µL	50	25 del pozo 1	25 del pozo 2	25 del pozo 3	25 del pozo 4
Agua desionizada µL	0	25	25	25	25

23. De los sistemas preparados en la tabla anterior se toman 10µL y se llevan a un volumen final de 200µL con la mezcla de reacción en la placa de 96 pozos.

Pozo numero	1	2	3	4	5
Solucion de GSH µL	10	10	10	10	10
nmoles de GSH en 10 µL de muestra	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312
Mezcla de reaccion µL	190	190	190	190	190

24. Se incuba la microplaca con la curva y las muestras a 37°C por 25 minutos.
25. Se realizan las lecturas en un lector de UV/Vis a una longitud de onda de 405nm.

11.3 Técnica para la cuantificación de proteínas totales.

▪ Reactivos utilizados

- Solución albumina sérica bovina (BSA) 1mg/mL
- Reactivo de Bradford (Diluir 1 parte del reactivo azul de Coomassie en 3 partes de agua)
- Medio PBS 1x (Buffer de Fosfatos Salino pH 7.4). Para preparar 1 L de este buffer se requiere:
 - 8.0g NaCl
 - 0.2g KCl
 - 1.44g Na₂HPO₄
 - 0.2g KH₂PO₄
 - Agua Ultra pura
 - Ajustar pH con NaOH 1N

▪ Procedimiento

1. Se utilizan los 10µL reservados del sobrenadante indicados en el paso 16, específicamente en el punto 11.2, correspondiente a la técnica de cuantificación de Glutación Reducido (GSH).
2. Se realiza una curva de calibración utilizando albumina sérica bovina y reactivo de Bradford.
3. Los sistemas de la curva de calibración se preparan en microtubos de 1.5mL de acuerdo a la siguiente tabla:

Volumen de sol. Stock de BSA μL	PBS μL	Proteínas $\mu\text{g/mL}$	Alicuota μL	Solucion diluida de Bradford μL	Proteínas μg	Proteínas $\mu\text{g/mL}$
0	1000	0	40	160	0	0
20	980	100	40	160	4	20
40	960	200	40	160	8	40
60	940	300	40	160	12	60
80	920	400	40	160	16	80
100	900	500	40	160	20	100
120	880	600	40	160	24	120
140	860	700	40	160	28	140
160	840	800	40	160	32	160
180	820	900	40	160	36	180
200	800	1000	40	160	40	200
220	780	1100	40	160	44	220
240	760	1200	40	160	48	240

4. Para la preparación de las muestras se toman los 10 μL reservados del sobrenadante y se llevan a 50 μL con buffer de fosfatos salino pH 7.4.
5. Se toman 40 μL de cada muestra y se colocan en la placa de 96 pozos.
6. Se llevan a 200 μL con solución de Bradford.
7. Se realizan las lecturas en un lector de UV/Vis a una longitud de onda de 595nm.
8. Finalmente se reporta los nanomoles de GSH por mg de proteína.