

T
1104

 XICHMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

122294

2294

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LINEA DE INVESTIGACIÓN:

DISEÑO Y PRODUCCIÓN DE FORMAS FARMACÉUTICAS

**RECUBRIMIENTO PELICULAR DE PELLETS CON METIONINA PARA SU
LIBERACIÓN RUMINAL E INTESTINAL EN OVINOS**

**COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

PRESENTA

IRVIN FABIAN BONOLA GALLARDO

MATRÍCULA 208180775

TUTORA: DRA. LUZ MARÍA MELGOZA CONTRERAS

ASESOR: DRA. MARÍA MAGDALENA CROSBY GALVÁN

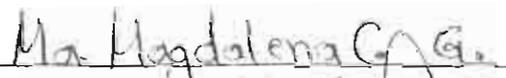
ASESOR: DR. ÁNGEL HORACIO SANDOVAL Y TRUJILLO

FEBRERO, 2011

**“RECUBRIMIENTO PELICULAR DE PELLETS CON METIONINA PARA SU
LIBERACIÓN RUMINAL E INTESTINAL EN OVINOS”**

Vo. Bo. COMITÉ TUTORAL


Tutora: Dra. Luz María Melgoza Contreras


Asesora: Dra. Magdalena Crosby Galván


Asesor: Dr. Ángel Horacio Sandoval y Trujillo


Q.F.B. Irvin Fabian Bonola Gallardo

Matrícula: 208180775

**“RECUBRIMIENTO PELICULAR DE PELLETS CON METIONINA PARA SU
LIBERACIÓN RUMINAL E INTESTINAL EN OVINOS”**

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO



Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

Presidente



Dra. María Josefa Bernad Bernad

Vocal



Dra. Luz María Melgoza Contreras

Secretaria

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo proponer la elaboración de un sistema de liberación modificada que pueda proporcionar metionina a nivel ruminal e intestinal. Esto es importante debido a que la metionina es utilizada en ambos sitios del rumiante, ya que las bacterias lo necesitan para favorecer su proliferación y el propio animal para la elaboración de proteínas, siendo absorbida a nivel intestinal. Se realizó la cuantificación de la metionina mediante métodos farmacopéicos y empleando la técnica descrita por Moore y Stein, validándola en el Laboratorio de Farmacotecnia de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Se propuso realizar recubrimientos para incorporar la metionina a núcleos inertes y posteriormente el recubrir nuevamente con diferentes polímeros funcionales (Eudragit® S100, Eudragit® FS30D, Eudragit® S12.5, Eudragit® NE30D y Surelease®), los cuales deberían proteger la metionina a condiciones de pH bajo, en donde se considera que se ubicarían los pellets en rumen y abomaso. Posteriormente, se realizaron pruebas de disolución para evaluar los pellets y determinar cuáles fueron los que protegen la metionina de un pH bajo. Las condiciones de la disolución fueron: Aparato 1 (canastillas), temperatura de 37°C, 50 rpm y medio de disolución de 500 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M ajustado el pH a 6.0, el cual se modificó después de los tiempos de muestreo a pH 4.0 y finalmente a 7.5.

Después de evaluar los pellets mediante la disolución y cuantificación de la metionina, los polímeros seleccionados para continuar con la siguiente etapa de recubrimiento fueron el Eudragit® FS30D y Eudragit® S12.5, a los cuales, se les incorporó nuevamente metionina, además de sulfato de bario para darle densidad a los pellets. Nuevamente se cuantificó la cantidad de metionina presente en los pellets con el uso de la técnica validada de Moore y Stein, determinando que ambos polímeros presentan ventajas. El Eudragit® FS30D es aquel que protege la

metionina de una forma adecuada hasta el cambio de pH básico, mientras que el Eudragit[®] S12.5 liberó una pequeña cantidad de metionina durante las primeras horas de la disolución. Sin embargo, en la segunda etapa del proyecto, en la que se incluye la metionina externa, los pellets de metionina recubiertos con Eudragit[®] FS30D y metionina externa, liberan una cantidad adicional de metionina, la cual proviene de la parte interna del pellet, en cambio, el Eudragit[®] S12.5 presenta la misma tendencia que la observada en el primer proceso de disolución, liberando solamente la metionina externa al comienzo de la disolución y hasta el cambio de pH a básico, pero no liberó por completo toda la metionina presente en el pellet.

Se logró el diseño de un sistema de liberación modificada que tuviera las características de densidad (proporcionada por el sulfato de bario) para que el pellet fabricado permanezca a nivel de rumen y libere la metionina externa en ese sitio para su aprovechamiento por las bacterias. En este sistema de liberación modificada, el polímero Eudragit[®] FS30D es el adecuado para asegurar que la metionina interna sea liberada hasta la llegada del pellet a nivel intestinal, pudiendo así, ser aprovechada por el animal.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo financiero mediante la beca otorgada con número de Registro 258102, la cual me permitió desarrollar mis estudios en la Maestría en Ciencias Farmacéuticas.

A Colorcon de México y Helm de México por su apoyo con donaciones, capacitación y ayuda en muchos de los procesos que realice durante mi proyecto de tesis. A todas las personas que laboran en estas empresas por su comprensión apoyo, así como el tiempo que me otorgaron.

Un agradecimiento especial para el Laboratorio de Farmacotecnia de la Universidad Autónoma Metropolitana, a todas mis compañeras y amigas que estuvieron en este Laboratorio, por su tiempo, comprensión y apoyo para realizar este proyecto.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi tutora y asesores:

Por darme la oportunidad y confianza para desarrollar este proyecto. Por entenderme y apoyarme cuando necesité su ayuda en situaciones difíciles, por orientarme con su experiencia y concluir el proyecto.

A mis amigos:

Al Maestro Chiharu Murata, por su tiempo, comprensión y apoyo en la parte estadística y que considero, además de un profesor, un amigo que me ayudó en cualquier momento que lo necesité.

A todos mis amigos. Aquellos que estuvieron conmigo al comienzo y al final de esta etapa de mi vida y que me vieron pasar por muchos momentos difíciles. No menciono sus nombres porque no importa su aportación, si no pareciera relevante o si fuera así, a todos les agradezco por su amistad, su tiempo, por ayudarme a no sentirme solo estando conmigo cuando más los necesité, por escucharme, porque hubo quien hizo un esfuerzo por dedicarme más del tiempo que podía darme, sacrificando también muchas de las cosas que quería, demostrándome lo valioso que son los amigos.

A mi familia:

A mi padre, madre y hermanos, por todo el apoyo que me brindaron, por estar conmigo en momentos difíciles, creer en mí y en lo que hacía para superarme personal y profesionalmente. Por aconsejarme y siempre darme una sonrisa, que me ayudo a ser fuerte en momentos difíciles. Por tenerme paciencia y comprender por qué no pude darles el tiempo que merecían en muchos de los momentos que tuve que dejarlos para terminar con esta etapa de mi vida. Les agradezco por todo y porque este logro no es solo mío, sino también de ustedes.

Al resto de mi familia, por creer en mí y demostrarme que siempre han estado para mí en momentos difíciles, sin importar la distancia o la situación.

Le doy gracias a Dios por la bendición que me dio con mi familia, amigos y cada una de las personas que conocí en esta etapa de mi vida, porque sin ellas no habría podido realizar esto.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1. Liberación modificada	5
3.1.1. Factores limitantes de las formas de liberación modificada	6
3.2. Recubrimiento de formas farmacéuticas	7
3.2.1. Recubrimiento Pelicular	8
3.3. Núcleos inertes de azúcar	11
3.4. Pellets de Liberación modificada	11
3.5. Polímeros no funcionales	12
3.6. Polímeros funcionales	12
3.6.1. Surelease [®]	12
3.6.2. Eudragit [®] NE30D	13
3.6.3. Eudragit [®] S100	13
3.6.4. Eudragit [®] FS30D	13
3.6.5. Eudragit [®] S12.5	14
3.7. Liberación controlada en animales	15
3.8. Rumiantes	20
3.8.1. Ecosistema microbiano	22
3.8.2. Metabolismo ruminal de los compuestos nitrogenados	25

3.9.	Degradación ruminal de aminoácidos	26
3.10.	Absorción de aminoácidos	27
3.11.	Metionina	27
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
5.	HIPÓTESIS	32
6.	OBJETIVOS	32
6.1.	Objetivos particulares	32
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	34
7.1.	Pruebas para la identificación de metionina	36
7.2.	Prueba de digestibilidad <i>in situ</i> de polímeros funcionales utilizados en los recubrimientos	37
7.3.	Método para la cuantificación de metionina	38
7.3.1.	Validación del método analítico para la cuantificación de metionina	39
7.3.1.	Especificidad del Método	40
7.3.2.	Linealidad del Sistema	40
7.3.3.	Precisión del Sistema	40
7.3.4.	Linealidad del Método	40
7.3.5.	Exactitud	41
7.4.	Tamaño de partícula de los núcleos inertes	41

7.5. Tamaño de partícula de los núcleos recubiertos con metionina	41
7.6. Elaboración de pellets con metionina	41
7.6.1. Recubrimiento de núcleos inertes con metionina	44
7.6.2. Recubrimiento con Eudragit [®] NE30D	45
7.6.3. Recubrimiento con Eudragit [®] S100	45
7.6.4. Recubrimiento con Eudragit [®] FS30D	46
7.6.5. Recubrimiento con Eudragit [®] S12.5	47
7.6.6. Recubrimientos con metionina externa y sulfato de bario	47
7.6.6.1. Pellets de metionina recubiertos con Eudragit [®] FS30D, metionina externa y Sulfato de Bario	48
7.6.6.2. Pellets recubiertos con Eudragit [®] S12.5, metionina externa y Sulfato de Bario	48
7.7.1. Prueba de disolución	49
7.8. Recubrimiento con Surelease [®]	49
7.9. Prueba de disolución para Surelease [®]	50
7.10. Prueba de disolución en el prototipo ruminal	51
7.11. Análisis estadístico	53
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
8.1. Ensayos realizados a la metionina.	54
8.2. Prueba de digestibilidad <i>in situ</i> de polímeros funcionales utilizados en los recubrimientos peliculares	54

8.3.	Validación del método analítico	55
8.3.1.	Especificidad del Método	55
8.3.2.	Linealidad del Sistema	56
8.3.3.	Precisión del Sistema	57
8.3.4.	Linealidad del Método	57
8.3.5.	Exactitud	58
8.4.	Tamaño de partícula de los núcleos inertes	58
8.5.	Recubrimiento de núcleos inertes con metionina	59
8.6.	Recubrimientos	59
8.6.1.	Recubrimiento con Eudragit® NE30D	60
8.6.2.	Recubrimiento con Eudragit® S100	60
8.6.3.	Recubrimiento con Eudragit® FS30D	60
8.6.4.	Recubrimiento con Eudragit® S12.5	61
8.6.5.	Pellets recubiertos con Eudragit® FS30D – Metionina externa y Sulfato de Bario	62
8.6.6.	Pellets recubiertos con Eudragit® S12.5 – Metionina externa y Sulfato de Bario	62
8.6.7.	Recubrimiento con Surelease®	63
8.7.	Microscopia	63
8.8.	Disoluciones	69
8.8.1.	Disolución de pellets recubiertos con metionina interna y polímero funcional	69

8.8.2. Disolución de pellets recubiertos con metionina interna, polímero funcional, sulfato de bario y metionina externa.	71
8.8.3. Liberaciones de pellets de metionina con Surelease® en el dispositivo ruminal	73
8.9. Análisis Estadístico	75
8.9.1. Análisis estadístico para pellets de metionina recubiertos con metionina interna y polímero funcional	75
8.9.2. Análisis estadístico para pellets con pellets recubiertos con metionina interna, polímero funcional, metionina externa y sulfato de bario	77
9. CONCLUSIONES	79
10. PERSPECTIVAS	81
11. REFERENCIAS	82
ANEXOS	87

1. INTRODUCCIÓN

Existe una gran variedad de especies animales en el mundo que requieren atención y cuidados debido a sus diferencias anatómicas y fisiológicas. Uno de estos grupos son los rumiantes, que tienen como integrantes a los ovinos, caprinos y bovinos. Los alimentos destinados a estas especies exigen de ciertas características debido al complejo tracto gastrointestinal, así como a su forma única de ingerir su alimento mediante la rumia (bolo alimenticio). La vía oral es la forma común por la cual estas especies obtienen su alimento, que suele ser pasto o forraje.

La baja calidad de esta dieta ocasiona una deficiencia nutricional que puede mejorarse con el uso de componentes como los aminoácidos. Uno de los más importantes es la metionina, que se clasifica como aminoácido esencial y que puede encontrarse en el alimento y que es utilizado en diversas actividades metabólicas en estas especies.

Para lograr la degradación del pasto y forraje en el rumiante es necesaria la participación de la flora microbiana del animal, la cual degrada el alimento que será aprovechado para la obtención de nutrientes como carbohidratos, lípidos y proteínas que serán utilizados para la formación de proteína microbiana, carne o leche por parte del animal.^{1,2} Es por eso, que la ventaja económica de cumplir con los requerimientos nutricionales del animal se verá reflejado en el crecimiento y desarrollo corporal, el rendimiento y calidad de la leche en vacas de alta producción y la producción de lana en borregos.³

Se han realizado ensayos en donde se diseñan sistemas de liberación de fármacos o de elementos que requieren los animales para favorecer su crecimiento. Pruebas realizadas en animales, después de la administración de suplementos protegidos o la combinación de componentes que modifiquen la absorción de los mismos, indican que se mejoran ciertos aspectos de la nutrición

animal, que no se ve reflejado con la dieta cotidiana, debido a la deficiencia en los nutrientes presentes en el forraje. ⁴

En este proyecto, se propuso el diseño de un sistema de liberación modificada para la administración de metionina simulando las condiciones del tracto gastrointestinal del rumiante. Para lograr esto, se consideraron el pH de cada una de las partes por donde el aminoácido debe atravesar antes de llegar al sitio de absorción por parte del animal (intestino). Se evaluó de forma *in vitro*, mediante pruebas de disolución en donde se modificó el pH del medio y de esta forma, se simularon los valores de pH del rumiante.

Para realizar este proyecto, se contó con el apoyo del Laboratorio de Farmacotecnia de la UAM-Xochimilco, así como de Colorcon de México para realizar parte de los procesos y de Helm de México al recibir donaciones que fueron útiles para la concluir el proyecto.

2. ANTECEDENTES

Los rumiantes, ya sean bovinos, ovinos o caprinos, se encuentran entre los animales más importantes para el hombre debido a la importancia que tienen en la producción de alimentos y fibras. Sin embargo, al igual que otras especies, existe una serie de problemas en su cuidado y alimentación, que se ve reflejado en su crecimiento y producción, de lana, leche o insumos. Los problemas nutricionales, se presentan a menudo por falta de un nutriente específico en la dieta, el cual, puede proporcionarse mediante suplementos, no obstante, la variación que puede presentarse depende de la cantidad ingerida por el animal o de procesos que ocurren dentro del mismo.³

En los rumiantes, los procesos de fermentación del rumen incluyen la hidrólisis del almidón y glucosa, así como de proteínas y péptidos. Esto beneficia al animal, ya que permite el uso de la celulosa y del nitrógeno no proteico que se encuentra en el forraje de la dieta. No obstante, otros elementos que deben llegar a algún sitio en específico del animal para ser absorbido, también puede ser parte de estos procesos de fermentación.³

Para la administración de fármacos o suplementos en animales, la vía oral ha sido durante mucho tiempo la más conveniente por la facilidad en la administración, sin embargo, presente algunas limitantes, sobre todo en el diseño, ya que muchos de los fármacos deben llegar a un sitio en específico. Es por esto, que se debe de elaborar una forma de dosificación que asegure, ya sea la liberación inmediata o dirigida en un sitio específico.⁵

En veterinaria, algunas de las razones para el desarrollo de sistemas de liberación son el manejo y dosificación de algún elemento en particular, que se vea reflejada en la reducción de costos y desarrollo del animal. Algunos sistemas, incluyen la administración oral de suplementos, en los que se desea minimizar la repetición en las dosis y reducir la contaminación o manipulación de los mismos.⁶

La metionina es un aminoácido esencial que limita el crecimiento y desarrollo corporal de los rumiantes jóvenes, el rendimiento y calidad de la leche en vacas de alta producción y la producción de lana en borregos. De los aminoácidos esenciales, la metionina, puede ser convertida a cisteína, principal aminoácido de la lana, sin embargo, al igual que otros aminoácidos, es rápidamente oxidable y se utiliza en la síntesis de proteína por parte de los microorganismos del rumen.⁴

Es por eso, que la metionina proporcionada en el alimento presenta variabilidad debido a la disponibilidad del aminoácido debido a la actividad de los microorganismos del rumen. Los aminoácidos que llegan al intestino delgado del rumiante, provienen de la proteína de origen microbiano, y la dietaria que escapa a la degradación de los microorganismos del rumen, así como de aminoácidos de origen endógeno.²

Estudios realizados con un análogo de metionina, protegida físicamente, como fue el caso del uso de una película de etilcelulosa y ácido esteárico (Mepron M85, Degusa-Hülls), indican que la protección de la metionina a la degradación fermentativa de los microorganismos ruminales, permiten que llegue el aminoácido hasta el intestino (sitio de absorción), sin embargo, esto depende principalmente de la permanencia del producto en el rumen. El aumento de peso, así como de la producción de lana son algunos de los beneficios que se obtuvieron con el uso de metionina protegida.^{3,7}

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Liberación Modificada

Las formas de liberación modificada responden al objetivo de mejorar la biodisponibilidad de los fármacos, ajustando la velocidad de liberación a sus propiedades biofarmacéuticas o farmacocinéticas o, en caso necesario, activando el proceso a una zona específica del tracto gastrointestinal.

La liberación en un sitio concreto del tracto gastrointestinal se puede producir por mecanismos inespecíficos si la forma de dosificación se retiene, precisamente en ese lugar; por ejemplo por mucoadhesión.

La activación se puede producir como respuesta a determinadas condiciones de pH o por efecto del proceso de degradación catalizado por enzimas propias de un área concreta.

Las formas de liberación modificada son definidas por la USP como aquellas cuyas características de liberación del fármaco sobre la evolución temporal y/o localización, son elegidos para llevar a cabo los objetivos terapéuticos o la conveniencia que no ofrece las formas convencionales.⁸

Las ventajas potenciales de liberación modificada en comparación con las formas de dosificación convencional son:⁸

- 1) Mejora el control sobre el mantenimiento de la concentración terapéutica del fármaco en plasma, y que permite:
 - (a) Mejorar el tratamiento de muchas enfermedades crónicas, enfermedades donde el síntoma se produce cuando la concentración plasmática del fármaco cae por debajo de la concentración mínima efectiva.

- (b) La reducción en la incidencia y la gravedad de efectos adversos secundarios sistémicos, relacionados con las altas concentraciones plasmáticas de los fármacos.
 - (c) Una reducción en la cantidad total de fármaco administrado durante el periodo del tratamiento. Esto contribuye a reducir la incidencia de efectos locales y sistémicos.
- 2) Mejora el cumplimiento del tratamiento, resultado de la reducción en el número y frecuencia de las dosis requeridas para mantener el efecto terapéutico deseado.
 - 3) Existe una reducción en la incidencia y severidad de efectos gastrointestinales, que pueden ser producidos por algunos fármacos que son administrados por formas de dosificación convencionales.
 - 4) Se dice que el factor costo-beneficio que conlleva el tratamiento farmacológico, puede ser mejorado mediante su manejo con productos basados en formas de liberación modificada.

3.1.1. Factores limitantes de las formas de liberación modificada

Algunos de los factores que son determinantes en el diseño de una forma farmacéutica de liberación modificada son los siguientes: ⁸

- 1) Factores fisiológicos variables: pH gastrointestinal, actividad enzimática, grados de tránsito intestinal y gástrico, alimentación, enfermedades y grados de severidad de éstas, los cuales influyen en la biodisponibilidad al interferir con la precisión del control de la liberación y la absorción del fármaco.
- 2) La velocidad de tránsito de las formas de liberación modificada a través del tracto gastrointestinal limita el periodo máximo al cual puede mantenerse una respuesta terapéutica.

- 3) Como regla general, las formulaciones de liberación modificada cuestan más por unidad de dosis que las formas de dosificación convencionales que contienen el mismo fármaco. Sin embargo, se ve compensado este punto por una disminución en el número de unidades de dosificación.

Existen factores que influyen en la estrategia de diseño de una forma de liberación modificada, es necesario tener en cuenta la fisiología del tracto gastrointestinal, las propiedades fisicoquímicas del fármaco, el diseño de la forma de dosificación, el mecanismo de liberación del fármaco, los factores de enfermedad en particulares, y las propiedades biológicas del fármaco. Todos estos pueden influir en o interactuar entre sí.⁸

3.2. Recubrimiento de formas farmacéuticas

Las razones para realizar el recubrimiento de formas farmacéuticas varían, desde la estética hasta la necesidad de controlar la biodisponibilidad del fármaco, siendo las necesidades particulares:⁹

- Proteger el fármaco de las condiciones ambientales con miras a mejorar su estabilidad.
- Enmascarar sabores u olores desagradables.
- Facilitar la ingestión del producto por el paciente.
- Mejorar la identificación del producto, desde su elaboración hasta su entrega al paciente.
- Facilitar la manipulación durante otros procesos de fabricación del producto.
- Mejorar el aspecto del producto.
- Reducir el riesgo de interacción entre los componentes incompatibles. Para ello, se usan formas farmacéuticas revestidas de uno o más de los componentes que ocasionan el problema.
- Mejorar la mecánica del producto ya que los productos recubiertos suelen ser más resistentes.

- Modificar la liberación del fármaco.

Esencialmente hay cuatro técnicas principales para el recubrimiento de formas farmacéuticas sólidas:⁹

- 1) Cobertura con azúcar.
- 2) Recubrimiento con película.
- 3) Microencapsulación.
- 4) Recubrimiento por compresión.

El recubrimiento con azúcar es la técnica más antigua y consiste en el depósito, a partir de una solución acuosa de coberturas basadas en su mayor parte de sacarosa como materia prima.⁹

La microencapsulación es una forma modificada del recubrimiento con película que sólo difiere en el tamaño de las partículas que van a ser recubiertas y en los métodos aplicados con este propósito.⁹

El recubrimiento por compresión incorpora el uso de máquinas de comprimidos modificadas que permiten compactar un recubrimiento seco alrededor de núcleo producido por la misma máquina.⁹

3.2.1. Recubrimiento Pelicular

Es la técnica más utilizada para el recubrimiento de comprimidos. Casi todos los productos recubiertos que se introducen ahora en el mercado, utilizan una cubierta pelicular.⁸

Este tipo de recubrimiento consiste en depositar una película delgada, pero uniforme, en la superficie del sustrato. Básicamente, los recubrimientos se aplican de manera continua a un lecho móvil del material, en general con una técnica de rociado.⁸

El recubrimiento pelicular fue introducido en a principios de la década de 1950 para combatir las desventajas del proceso de recubrimiento con azúcar, ofreciendo numerosas ventajas:⁹

- Aumento mínimo de peso (en general del 2 al 3% de peso del núcleo del comprimido)
- Reducción significativa de los tiempos de procesamiento.
- Mayor eficiencia y rendimiento del proceso.
- Mayor flexibilidad en las formulaciones.
- Mejor resistencia al astillado de la cobertura.

El líquido para recubrimiento (ya sea en solución o suspensión) contiene un polímero en un medio líquido idóneo, junto a otros componentes como pigmentos y plastificantes. Esta solución se aplica por aspersion sobre el lecho rotatorio de mezcla de los comprimidos o el lecho fluido. Las condiciones de secado permiten eliminar el disolvente dejando un depósito fino del material de recubrimiento alrededor de cada núcleo.⁸

Las propiedades ideales del polímero son: solubilidad en una amplia gama de sistemas solventes para dar flexibilidad en la formulación, capacidad de producir coberturas con propiedades mecánicas adecuadas y solubilidad apropiada en los líquidos gastrointestinales de modo de no comprometer la biodisponibilidad del fármaco.⁹

En general, los polímeros deberán tener una baja viscosidad a una concentración dada para favorecer la aplicación sencilla y sin problemas de sus soluciones o suspensiones en un equipo de recubrimiento pelicular.⁹

Los éteres de celulosa son de los polímeros más utilizados para el recubrimiento pelicular, en particular la hidroxipropil-metilcelulosa. Las alternativas a los éteres de celulosa son ciertos acrílicos, como los copolímeros de metacrilato, metilmetacrilato y los vinilos como el alcohol polivinílico.⁹

Los copolímeros de ácido metacrílico y diferentes ésteres acrílicos o metacrílicos de interés farmacéutico se conoce comercialmente como Eudragit[®]. Estas resinas acrílicas son particularmente atractivas en el campo como consecuencia de su elevada estabilidad química, compatibilidad con diferentes materiales y del considerable número de variedades disponibles, que cubre un amplio espectro de características de solubilidad y permeabilidad y de formas de presentación.

Los Eudragit dan lugar a películas funcionales para la liberación modificada en comprimidos y pellets recubiertos. Los Eudragit[®] son biocompatibles y farmacológicamente inertes, excretándose por el organismo.

En lo concerniente a los animales destinados a la alimentación, las oportunidades y los cambios en esta área se guían por las expectativas del consumidor y las prácticas en la agricultura. Uno de los objetivos principales es disminuir los costos de la carne mediante el desarrollo de fármacos que alteren el crecimiento de la masa animal.¹⁰

Numerosas oportunidades existen en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos en veterinaria, que cubran las necesidades de animales de compañía y de granja. Esta razón, asociada a la búsqueda en la reducción de la frecuencia de administración ha estimulado el desarrollo de sistemas de liberación modificada para el uso en animales.

La mayoría de los fármacos que se han implementado en estos dispositivos incluyen antibióticos, antiparasitarios, hormonas, esteroides para el control de la fertilidad (en animales de compañía) y promotores del crecimiento.

Entre las tecnologías en las que se han formulado satisfactoriamente estos compuestos están: sistemas implantables subcutáneos, sistemas de liberación de

orden cero de liberación pulsátil, microesferas y microcápsulas para la inyección directa del fármaco en el sitio de acción, formulaciones de liberación controlada de base oleosa, collares que contienen al fármaco antiparasitario, dispositivos oftálmicos y dispositivos tópicos orales, entre otros.¹⁰

Existe una tipo particular de forma farmacéutica que implica el uso de núcleos inertes, a los cuales se les recubre con polímeros funcionales o no funcionales, cuya función es formar una capa uniforme sobre el núcleo y de esta forma, incorporar el fármaco a su superficie.

3.3. Núcleos inertes de azúcar

Para aplicar las cubiertas que se depositan sobre la superficie de los pellets, la etapa inicial implica el uso de núcleos inertes, los cuales tienen como función ser la base en la cual, se adhiera una película continua de los componentes que están siendo agregados al núcleo. El uso de núcleos inertes (esferas de azúcar) para la administración de principios activos ha sido un tema de interés en la industria farmacéutica. Hay factores que son importantes para lograr el éxito en la fabricación con los núcleos inertes, como son la rugosidad y esfericidad de la superficie, el tamaño de las partículas y su distribución, densidad, friabilidad y la dureza del sustrato de inicio.¹¹

3.4. Pellets de Liberación modificada

La liberación de fármacos en formas farmacéuticas modificadas, prolongadas, retardadas o específicas, ocurre en un lugar concreto y se puede realizar por mecanismos inespecíficos (como la mucoadhesión) o, como respuesta a determinadas condiciones de pH o efecto de un proceso de degradación catalizado por enzimas de un área concreta.

Los pellets recubiertos, se basan en el uso de núcleos, a los cuales, se incorporan cubiertas de materiales con solubilidad dependiente o no del pH, siendo de suma importancia aquellos que emplean polímeros dependientes del pH, debido a que se controla eficazmente la liberación en función del pH del medio. ¹¹

3.5. Polímeros no funcionales

El Opadry[®] II y el Advantia[®] son polímeros no funcionales, los cuales, permiten al principio activo o a otros componentes de la formulación adherirse a la superficie que se recubre. El Advantia[®] está formado a base de componentes de celulosa y que contiene hasta un 25% de sólidos, se adhiere fácilmente a la superficie a la cual se recubre y no retrasa los perfiles de disolución, mientras que el Opadry[®] II es un polímero hidrosoluble y también independiente del pH, que permite la liberación rápida e inmediata del principio activo. ^{12, 13}

3.6. Polímeros funcionales

3.6.1. Surelease[®]

El Surelease[®] es un sistema que se encuentra conformado de un 25% de sólidos. Para mejores resultados, el producto puede ser diluido hasta obtener un 15% de sólidos (P/P). El polímero es etilcelulosa, el cual se mezcla con agua amoniacal, y que no necesita de la adición de otros componentes, ya que forma una dispersión de partículas de etilcelulosa que constituyen una red firme al momento de su uso. Este polímero funcional, se basa en la liberación del principio activo independiente del pH del medio. ¹²

3.6.2. Eudragit® NE30D

El Eudragit® NE30D es la dispersión acuosa de un copolímero neutro basado en etil acrilato y metil metacrilato, que se encuentra al 30% (en base a la cantidad de polímero seco), y que también contiene 1.5% de nonoxinol 100 como emulsificante. La dispersión de Eudragit® NE30D se prepara adicionando componentes como Polisorbato 80 (en solución acuosa al 30%) como emulsificante y monoestearato de glicerilo como anti adherente, aproximadamente al 2% y 5% en relación al polímero seco, respectivamente. Este otro polímero funciona de forma parecida al Surelease[®], donde la liberación del principio activo es independiente del pH del medio. ¹⁴

3.6.3. Eudragit® S100

El Eudragit® S100 es una mezcla de copolímeros aniónicos basados en ácido metacrílico y metil metacrilato. Para la preparación de la suspensión con Eudragit® S100, se recomienda usar una cantidad de 9.94% de polímero en base al peso final de la suspensión, tomando en cuenta que el polímero y los demás componentes se disuelven en agua. Se necesita además, el uso de algún agente estabilizante como el amoniaco, el cual se emplea regularmente al 1N en una cantidad del 6.75% del total de la suspensión, así como un plastificante (trietilcitrato) y anti-adherente (talco micronizado). Estos dos componentes se emplean en la misma proporción (4.97% del peso en la suspensión final). Este polímero dependiente del pH, permite la liberación del principio activo a partir de un pH 7. ¹²

3.6.4. Eudragit® FS30D

El Eudragit® FS30D es una dispersión acuosa que contiene un 30% (P/P) de polímero seco, así como 0.3% de laurilsulfato de sodio y 1.2% de polisorbato 80

como emulsificantes, de tal forma que la concentración total de sólidos es de 31.5% (P/P). La solución de Eudragit[®] FS30D ya contiene emulsificante (1.2% en relación al polímero seco), sin embargo, para la preparación de la dispersión con Eudragit[®] FS30D, suele utilizarse una mayor cantidad, la cual se encuentra generalmente al 33% en agua, con una concentración final de aproximadamente 1.6% de emulsificante en base a la sustancia seca. A la dispersión se le adiciona plastificante, tal como el trietilcitrate (5% en base al polímero seco) y algún agente que evite la adhesión, como puede ser el monoestearato de glicerilo (4% en relación al polímero seco). El Eudragit[®] FS30D, es otro polímero dependiente del pH, permite la liberación del principio activo a partir de un pH 7.¹⁵

3.6.5. Eudragit[®] S12.5

El Eudragit[®] S12.5 es una solución de Eudragit[®] S100 en alcohol isopropílico. La concentración de polímero seco es de 12.5% (P/P) y contiene 1.25% (P/P) de dibutiltalato como plastificante, de tal forma que la concentración total de sólidos es de 13.75% (P/P). Esta solución ya contiene plastificante (10% en relación al polímero seco) y en la mayoría de los casos no requiere que se agregue una cantidad adicional. Sin embargo, cuando la superficie que se va a recubrir presenta una naturaleza muy hidrofóbica o de difícil adherencia puede ser necesario agregar algo de plastificante (usualmente 2-5% en relación al polímero seco).^{12, 13}

La concentración final de la dispersión de recubrimiento debe ser ajustada aproximadamente al 8% (P/P) en sólidos; considerando también el agente antiadherente (talco, aerosil 200 o monoestearato de glicerilo). En este caso, la cantidad de talco recomendada es del 30% en relación al polímero seco, además de que el Eudragit[®] S12.5 contiene aproximadamente un 3% de agua. El Eudragit[®] S12.5, funciona de la misma forma que el Eudragit[®] S100, liberando el fármaco a partir de pH 7.^{12, 13}

3.7. Liberación controlada en animales

El desarrollo de los sistemas de liberación controlada se ha concentrado especialmente a la industria farmacéutica humana, sin embargo, a mediados de los años 70's el uso de tecnologías de liberación modificada y controlada se extendió a su aplicación en el campo de la medicina veterinaria ofreciendo numerosos beneficios y oportunidades para su uso.⁶

En la medicina veterinaria, las principales razones para el desarrollo de tecnología de liberación controlada y/o prolongada son reducir el estrés resultado de la administración al animal, mejoramiento del manejo y dosificación reducción de costos en términos monetarios y tiempo.⁶

Los sistemas de liberación controlada son más convenientes que otras formas farmacéuticas que necesitan dosificaciones repetidas y por la capacidad de administrar cantidades conocidas de fármaco. Una ventaja adicional, es que algunos sistemas de esta liberación controlada reducen la exposición de los humanos a compuestos que pueden resultar inseguros en su manejo.⁶

El principal mercado para la aplicación de la tecnología de liberación controlada en el campo veterinario es la prevención de enfermedades de animales de compañía y animales destinados para la alimentación humana. Otros mercados incluyen el control de la fertilidad de animales de compañía, promoción del crecimiento y la suplementación de agentes nutricionales para animales productores de alimento. Otros mercados de interés son el manejo de la medicina zoológica de animales de vida salvaje.⁶

En medicina veterinaria los sistemas de liberación controlada están divididos en dos categorías: animales destinados para la alimentación, el cual es el principal sector del mercado total y el de animales de compañía.

Los rumiantes incluyen ovejas y ganado vacuno, estos son animales de gran importancia económica por ello se gasta una gran cantidad monetaria durante su vida de pastoreo en los campos abiertos.⁶

Los rumiantes principalmente bovinos, ovinos y caprinos se encuentran entre los más importantes y prolíficos animales, ya que los humanos obtienen de ellos alimentos y fibras. Al igual que con todas las especies de mamíferos, hay una serie de problemas concretos de salud, un considerable potencial para la manipulación del metabolismo y la aparición regular de deficiencias nutricionales que pueden influir en su bienestar y la productividad.⁴

Los problemas nutricionales se presentan a menudo de la falta de un nutriente específico, por ejemplo, un elemento traza en el forraje. Estos a veces son proporcionados a través de un suplemento en el forraje, pero esto puede dar lugar a variaciones considerables entre los animales, en la cantidad ingerida por cada uno de los animales. Algunos fármacos para el control de enfermedades, por ejemplo antibióticos, tendrán que darse de forma continua, pero sólo en condiciones específicas de la enfermedad para realizar la función requerida, mientras que otros pueden ser necesarios en intervalos regulares o estaciones del año.⁴

En el mundo moderno, es de gran importancia el optimizar técnicas de producción animal, mediante una serie de principios activos que se puedan utilizar para manipular aspectos del metabolismo, para mejorar ya sea la cantidad o la calidad del animal, como puede ser el uso de promotores de crecimiento o agentes nutrimentales.

Desde el comienzo de la década de 1980, se han comercializado complejos dispositivos para la administración de medicamentos como medios para controlar enfermedades. Tales dispositivos retículo-rumen han mostrado ventajas frente a otras formulaciones como polvos, soluciones transdérmicas o soluciones orales.⁴

Algunos de los dispositivos retículo-ruminales actualmente comercializados proporcionan una liberación constante de los principios activos (antihelmínticos, nutrientes de crecimiento, etc.) durante la vida útil del producto; algunos tienen una liberación sostenida, pero no bien controlada, mientras que otros dan un mayor control. Para algunas aplicaciones, esta variabilidad no es ideal, ya que el medicamento puede ser puesto en libertad sin necesidad.

Ejemplos de estos medicamentos son los utilizados cuando se proporciona un antihelmíntico innecesariamente en un momento en el que el nivel de parásitos es bajo o la liberación del fármaco puede ser inferior al necesario para eficacia durante los periodos cuando el nivel de parásitos es alto. En el caso de un nutriente, el material podría ser siempre en un momento del año en que la deficiencia en la hierba no se expresa. ⁴

Los animales domésticos pueden ser clasificados de acuerdo con la mayoría de sus habilidades en la dieta de especies herbívoras (comúnmente caballos, vacas, ovejas, cabras y ciervos), animales omnívoros (cerdos) y carnívoros (perros y gatos). Una característica distintiva de los herbívoros es su dependencia nutricional en los procesos de fermentación bacteriana. Una clasificación diferente, se refiere a la disposición anatómica del tracto gastrointestinal. ⁴

La fisiología del aparato digestivo de los rumiantes provee grandes retos y oportunidades para el desarrollo de sistemas de liberación controlada, ya que está constituido de cuatro cámaras denominadas: retículo, rumen, omaso y abomaso, figura 1. ⁴

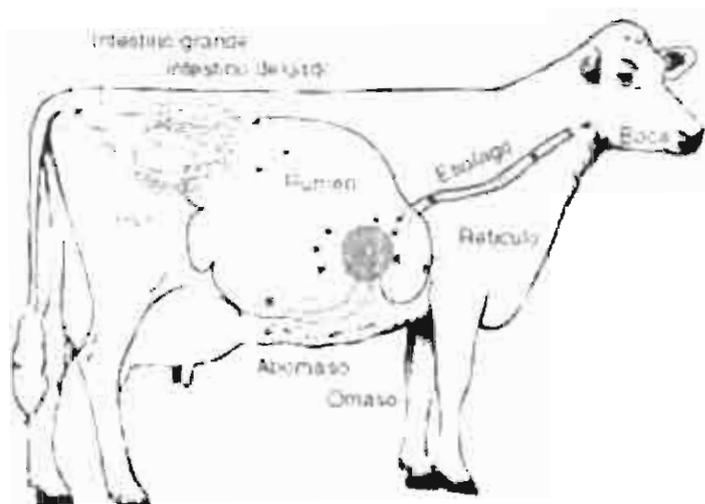


Figura 1. Sistema digestivo de un rumiante.

El volumen del retículo-rumen varía de 100 a 225 Litros en el ganado adulto y es de 10-25 Litros en las especies ovina y la caprina. Dependiendo de la hora a partir de la alimentación y la bebida, el contenido de agua del rumen puede variar considerablemente, con una consistencia, desde un estado líquido a un semisólido. A pesar de la gran cantidad de ácidos grasos volátiles producidos, el pH ruminal se mantiene normalmente en una pequeña gama (pH 5,5 - 6,5). Esto se consigue debido a la secreción de agentes amortiguadores en la saliva (pH de 8.0 a 8.4) y un sistema de amortiguación que tiene una considerable capacidad que opera a nivel del epitelio del rumen. Debido al gran volumen de la panza, cualquier fármaco que se disuelve tiende a estar en baja concentración. Por otra parte, la microflora del rumen puede inactivar algunos medicamentos por cambios químicos o metabólicos por lo que se requiere que se brinde protección ante el sistema del rumen a un medicamento que está destinado a ser absorbido en el tracto inferior, o de otra manera mejorar la absorción del fármaco en los sitios más bajos del intestino. ⁴

Los sistemas de liberación controlada post-ruminales deben cumplir con ciertos criterios de importancia: ¹⁶

- Eficacia: el sistema de liberación debe proveer de protección durante su paso por el rumen y estar biodisponibles para su liberación post-ruminal. De forma ideal algunos nutrientes y fármacos deberían estar completamente protegidos de la fermentación en el rumen y completamente libres y disponibles para su absorción y para ejercer su función post-ruminal.
- Seguridad: los componentes utilizados en la formulación de estos sistemas de liberación deben ser seguros para los animales y para los humanos.
- Costo: los sistemas de liberación controlada deben tener con ellos un beneficio alto que compense su aumento en costo, comparado con el sistema de liberación convencional.

Los polímeros utilizados para estos sistemas también siguen ciertos criterios importantes:

- Inerte, no absorbible eliminado de manera inalterada.
- No mutagénico y no teratogénico.
- Que no produzca efectos adversos tras su administración continua.
- Térmicamente estable.
- Insoluble en los fluidos ruminales.

Los productos veterinarios requieren y se encuentran bajo regulaciones para productos humanos pero también requieren de análisis detallados de residuos, seguridad en el manejo del producto y análisis de residuos en tejidos, particularmente para productos destinados al consumo por animales productores de alimentos. ⁶

Los niveles de residuos de fármaco en los tejidos deben asegurar que no sean un riesgo para los seres humanos, por lo que los niveles de estos deben comprobar no ser tóxicos.

Esta cuestión por lo tanto afecta fuertemente el costo del producto en particular, influye sobre la formulación que será dirigida a una determinada y específica aplicación.

3.8. Rumiantes

Los rumiantes se caracterizan por su capacidad para alimentarse de pasto o forraje, esta característica se basa en la posibilidad de poder degradar los carbohidratos estructurales del forraje, como celulosa, hemicelulosa y pectina, muy poco digestibles para las especies no-rumiantes. Basada en esta diferencia fundamental, la fisiología digestiva del rumiante adquiere características particulares.¹⁷

La degradación del alimento se realiza mayoritariamente por digestión fermentativa y no por acción de enzimas digestivas, y los procesos fermentativos los realizan diferentes tipos de microorganismos a los que el rumiante aloja en sus divertículos estomacales (DE). Por esta razón, se debe tener presente que al alimentar a los rumiantes, primero se está alimentando a los microorganismos ruminales, y para su buen desarrollo, tiene que haber un medio ruminal favorable para ello. De esta forma hay una simbiosis entre las bacterias y el animal.¹²

Esta digestión fermentativa, si bien favorece al rumiante al permitirle degradar hidratos de carbono estructurales, también afecta la digestión de todos los demás componentes de la dieta, expuestos a los mismos procesos fermentativos, sin que esto represente siempre una ventaja desde el punto de vista del mejor aprovechamiento del alimento.¹⁷

En un rumiante adulto, el estómago puede llegar a ocupar hasta el 75 % de la cavidad abdominal y junto con su contenido representa alrededor del 30 % del peso vivo del animal. Se divide en cuatro cavidades: el retículo, el rumen, el omaso y el abomaso. Solo este último es glandular y funcionalmente análogo al estómago de los no-rumiantes, mientras que los anteriores están cubiertos por un epitelio queratinizado y carecen de glándulas.¹⁷

El retículo toma su nombre de la disposición en forma de red de los pliegues de su mucosa y está en contacto con el diafragma, comunicándose con el rumen a través del pliegue retículo-ruminal que los convierte en una sola unidad funcional llamada retículo-rumen. El rumen, es el compartimiento más voluminoso y está en contacto con la pared abdominal izquierda. La superficie visceral presenta surcos que se corresponden con proyecciones internas llamadas pilares. Los surcos longitudinales derecho e izquierdo lo dividen en los sacos dorsal y ventral. El surco craneal separa el saco ciego cráneo-dorsal del cráneo-ventral. Por último, el surco caudal junto a los surcos coronarios dorsal y ventral delimitan los sacos ciegos caudo-dorsal y caudo-ventral. La mucosa del rumen presenta papilas digitiformes cuyo tamaño y grado de queratinización dependen del estímulo provocado por el tipo de dieta que está consumiendo el rumiante.¹⁷

El omaso se ubica a la derecha de la red y posee forma esférica. Se comunica con la red por el esfínter retículo-omasal y con el abomaso por el esfínter omaso-abomasal. Presenta dos partes claramente diferenciadas, el cuerpo y el canal omasal. El cuerpo es ocupado por un número variables de hojas o láminas, que insertadas en la curvatura mayor del omaso dirigen su borde libre hacia el canal del omaso, que se encuentra en su curvatura menor y comunica ambos esfínteres. Por último, el abomaso se ubica a la derecha y ventralmente en la cavidad abdominal, tiene forma de saco alargado con un extremo ciego denominado fundus y un extremo pilórico que desemboca en el duodeno. La mucosa es de tipo glandular y en el fundus presenta pliegues que aumentan su superficie.¹⁷

Histológicamente todas las divisiones del estómago poseen las cuatro capas típicas de los órganos tubulares del aparato digestivo. La mucosa, cubierta por un epitelio plano estratificado queratinizado y aglandular en los DE, cambia bruscamente en el abomaso a un epitelio cilíndrico simple que cubre una lámina propia rica en glándulas del mismo tipo que las halladas en no-rumiantes (regiones cardial, fúndica y pilórica). La muscular de la mucosa está ausente en el rumen, y la submucosa está formada por tejido conjuntivo laxo con una rica red vascular y plexos nerviosos (plexo submucoso o de Meissner). La muscular consta de dos

capas de músculo liso en los DE, una circular interna y otra longitudinal externa, entre las cuales se encuentra el plexo mientérico o de Auerbach. En el abomaso se agrega una tercera capa oblicua interna. La serosa está compuesta por el mesotelio y por tejido conjuntivo laxo con grasa, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios.

A pesar de que se ha popularizado el término “preestómagos” para hacer referencia al retículo, rumen y omaso, estudios embriológicos demuestran que éstos en realidad se originan de la porción glandular del estómago y no una estructura “previa” como podría ser el esófago. Histológicamente, se comprueban diferencias entre ambos, ya que mientras el esófago posee músculo estriado en toda su longitud, este sólo se interna brevemente en la gotera esofágica, y los DE poseen músculo liso.¹⁷

3.8.1. Ecosistema microbiano

Las bacterias representan la fracción de la población ruminal imprescindibles para la vida del rumiante. El neonato adquiere esta flora por el contacto directo con otros bovinos o bien por contacto indirecto a través de elementos contaminados como forrajes o agua de bebida.

Si bien existe una amplia variedad de bacterias y alternativas para clasificarlas, resulta útil agruparlas en base a los sustratos que emplean y a los productos finales de su fermentación, tabla 1.

Grupo de bacterias	Característica funcional	Principales productos finales de su metabolismo
Celulolíticas	fermentan hidratos de carbono estructurales de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectinas)	AGV (especialmente acetato)
Amilolíticas	fermentan hidratos de carbono de reserva de granos (almidón)	AGV (especialmente propionato)
Sacarolíticas	fermentan hidratos de carbono simples (azúcares vegetales)	AGV (especialmente butirato)
Lactolíticas	metabolizan el lactato	AGV (especialmente propionato)
Lipolíticas	metabolizan las grasas	Acidos grasos libres y AGV (especialmente propionato)
Proteolíticas	degradan las proteínas	AGV y amoníaco (NH_3)
Metanógenas	producen metano	metano (CH_4).
Ureolíticas	hidrolizan la urea	CO_2 y NH_3 .

Tabla 1: Clasificación funcional de las bacterias ruminales

El número de bacterias varía entre 10^{10} y 10^{11} por gramo de líquido ruminal, lo cual representa entre 3 y 8 kilos de bacterias en el rumen de un bovino adulto. Esta concentración varía en relación directa con el contenido energético de la dieta. Otro factor que afecta el desarrollo bacteriano es el pH ruminal. Dentro del rango fisiológico, la flora celulolítica desarrolla mejor en el extremo menos ácido (6.0 a 6.9) mientras que a la flora amilolítica le es favorable el extremo más ácido (5.5 a 6.0). La importancia nutricional de las bacterias radica en que son responsables de la mayor parte de la actividad celulolítica del rumen, y por otro lado son capaces de sintetizar sus proteínas a partir de compuestos nitrogenados no proteicos (NNP), especialmente amoníaco (NH_3).¹⁷

Los protozoos representan la microfauna ruminal, desarrollan preferentemente a pH superior a 6 y a pesar de estar normalmente presentes no son imprescindibles para la función ruminal ni para la supervivencia del animal. Normalmente son adquiridos por el ternero por contacto directo con otros rumiantes. Si bien, se encuentran en menor concentración que las bacterias, a razón de 10^4 a 10^6 /ml de líquido ruminal, al tener mayor tamaño poseen una masa total que puede llegar a ser semejante a la bacteriana.

Desde el punto de vista metabólico los protozoarios se diferencian de las bacterias por poseer una menor capacidad celulolítica (5 al 20 % del total) y además, son incapaces de sintetizar proteínas a partir de NNP. Son beneficiosos al moderar la fermentación amilolítica, debido en parte a que consumen preferentemente bacterias amilolíticas y además engloban trozos de almidón que pasan al intestino dentro del protozoo y evitan la fermentación ruminal, proveyendo de esa forma una fuente directa de glucosa para el animal. Con respecto al metabolismo proteico favorecen al rumiante aumentando el valor biológico de la proteína, pero se cree que es a un elevado costo energético por la recirculación de nitrógeno. Esto es que utilizan las proteínas sintetizadas por las bacterias. A esto se le suma el dogma de que la mayoría de los protozoos mueren en el rumen para formar sus proteínas, por lo cual sus proteínas son liberadas al medio ruminal donde las bacterias las van a degradar en las cadenas carbonadas y amoníaco para cubrir sus necesidades. Para comprender la importancia y significado de la recirculación de nitrógeno tenemos que conocer que otra característica de los protozoos es que tienen movilidad propia. De esta forma calcular la cantidad exacta de protozoos en el rumen se hace difícil. Esto hace que no se sepa exactamente cuanto de esa proteína alcanza el duodeno.¹⁷

Los hongos representan alrededor del 8 % de la biomasa ruminal. Poseen una importante actividad celulolítica, en especial cuando el rumiante consume forrajes demasiado maduros o encañados. Los hongos no predominan en el rumen debido a su baja tasa de multiplicación en comparación con las bacterias, algunas de las cuales a su vez reprimen su crecimiento, como el *Ruminococcus spp.*¹⁷

3.8.1. Metabolismo ruminal de los compuestos nitrogenados

A nivel intestinal la degradación de las proteínas es similar en rumiantes y en no-rumiantes. Las proteínas y los péptidos son degradados hasta oligopéptidos por la acción de las enzimas proteolíticas pancreáticas (tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa), luego los oligopéptidos son degradados por las oligopeptidasas de la membrana apical de los enterocitos liberando aminoácidos dipeptidos y tripéptidos que finalmente son absorbidos. Sin embargo, a diferencia de los no rumiantes, la proteína que llega al intestino del rumiante es diferente de la ingerida con la dieta, debido a que los microorganismos ruminales degradan más de la mitad las proteínas consumidas. Lo hacen mediante proteasas de membrana que desdoblan las proteínas en péptidos y algunos aminoácidos libres, los que son absorbidos por el microorganismo.

Una vez incorporados al microorganismo, los péptidos son hidrolizados hasta aminoácidos, los cuales pueden ser empleados para sintetizar proteína microbiana o bien, como ocurre con la mayor parte de ellos, son utilizados como fuente energética. En este caso los microorganismos separan el grupo amino del aminoácido y lo liberan al medio ruminal como un producto de desecho, y emplean la cadena carbonada para obtener energía como si se tratara de un hidrato de carbono. Por otro lado, los grupos amino ($-NH_2$) libres se convierten, por adiciones de H^+ y luego en amonio (NH_4^+), por lo cual la concentración de este último sirve como un indicador de la actividad proteolítica en el rumen. Los protozoarios poseen mayor capacidad proteolítica que las bacterias y los hongos, pero debido a que se encuentran en menor cantidad son responsables solo del 10 al 20% de la actividad proteolítica ruminal, a la que los hongos contribuyen en un porcentaje todavía menor y son fundamentalmente las bacterias las que realizan la mayor parte de la degradación proteica a nivel ruminal (más del 50%).¹⁷

RECIBIDO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS DEL CONICET

3.9. Degradación ruminal de aminoácidos

Al plantear la suplementación de las raciones con aminoácidos puros de origen sintético, resulta necesario conocer el valor de su degradabilidad en el rumen. Es sabido que la concentración de estos aminoácidos en el rumen, resultado de la proteólisis de la proteína ingerida es baja, lo que indica una rápida desaparición de los aminoácidos del alimento en el rumen. Esto sugiere su rápida utilización por los microorganismos ruminales que los incorporan a sus proteínas o los desaminan produciendo una elevación del Nitrógeno amoniacal.¹⁸

Los aminoácidos pueden clasificarse en tres grupos según su velocidad de degradación ruminal:

- Degradación rápida: Arginina y Treonina.
- Degradación media: Lisina, Fenilalanina, Leucina e Isoleucina.
- Degradación lenta: Valina y Metionina.

Los trabajos realizados *in vitro*, con líquido ruminal de vacas, o *in vivo* con animales canulados en rumen a los que se infundieron aminoácidos sintéticos, indican unos valores de degradabilidad más altos *in vivo* que *in vitro*.¹⁸

Se ha encontrado que la infusión intraruminal de dosis altas de aminoácidos implica también el aumento considerable de otros aminoácidos. La alanina es el aminoácido que más aumenta en la mayoría de las infusiones y la metionina el que consigue producir un mayor incremento del resto de aminoácidos en el rumen tras la infusión de una dosis alta (600 mMol). Este resultado podría ser consecuencia de un cierto efecto tóxico de la metionina que produciría una depresión del metabolismo degradativo del rumen o bien una estimulación de la síntesis de proteína microbiana, tal como ha sido observado en estudios con vacas lecheras.¹⁸

3.10. Absorción de aminoácidos

La absorción de proteínas intactas sólo ocurre normalmente en mamíferos recién nacidos, ya que de esta forma obtienen anticuerpos presentes en el calostro. Algunas horas o días después del nacimiento ocurre el llamado cierre intestinal, fenómeno que consiste en un cambio en el tipo de células de la mucosa de dicho órgano y que ocasiona que el animal pierda la capacidad de absorción de proteínas intactas.

Los aminoácidos se absorben ya sea por transporte activo o por difusión. En general los isómeros L (que es la configuración natural) son absorbidos en forma activa, mientras que los isómeros D se absorben por difusión. La única excepción la constituye la metionina, la cual es absorbida por transporte activo, independientemente de su configuración. Los D-aminoácidos no sólo se absorben más lentamente, sino que además su eliminación por la orina es más rápida en comparación a los de configuración L. ¹⁹

3.11. Metionina

La proteína disponible para la absorción en el intestino del rumiante es derivada de los microorganismos ruminales y de la proteína de la dieta que logra escapar de la degradación a su paso por el rumen. ²⁰

La alimentación con una dieta que contenga más proteína puede conducir a una mayor cantidad de residuos y a una contaminación del medio ambiente por exceso de proteína degradable en el rumen en forma de urea, que será excretada por los microorganismos ruminales. Por esta razón es de importancia la forma en la que se aumenta el rendimiento de proteína y así poder hacer más eficiente la utilización de esta. ²⁰

La metionina, es un aminoácido esencial, que limita el crecimiento y desarrollo corporal de los rumiantes jóvenes, el rendimiento y calidad de la leche en vacas de alta producción y la producción de lana en borregos ³

Algunas investigaciones han mostrado que las deficiencias de metionina pueden afectar a la síntesis de grasa de la leche debido a que la metionina es un donador del grupo metilo en las reacciones de trans-metilación en la biosíntesis de lípidos.²⁰

La metionina y lisina son aminoácidos de suma importancia en el rendimiento y producción de leche y proteína. El alto costo de producción de la lisina con protección contra el rumen como lisina no degradable, contrasta con el hecho de que la metionina protegida puede ser relativamente barata. La suplementación de metionina o metionina y lisina post-ruminal ha hecho posible obtener efectos positivos sobre la producción de leche y la concentración de proteína de la leche.²¹

Desafortunadamente la metionina cristalina puede ser degradada por las bacterias ruminales antes de su llegada al intestino delgado para su absorción, por lo que el paso de metionina al intestino delgado no se ve aumentado, ya que la metionina libre será principalmente degradada en el rumen esto hace necesario que sea suministrada en una forma en la que este protegida a su paso por el rumen, para estar disponible en cantidades suficientes para su absorción en el duodeno para sus propósitos metabólicos.²⁰

A fin de aumentar la digestibilidad de metionina en el intestino delgado, se han enfocado algunos esfuerzos a la alimentación con fuentes de proteínas de baja digestibilidad ruminal, sin embargo, no han resultado del todo eficaces ya que han dado como resultado la escases de Nitrógeno disponible en el rumen, lo que origina una disminución de proteína microbiana.²⁰

Entre los métodos que se han utilizado para disminuir la degradabilidad microbiana de los aminoácidos e incrementar su flujo y disponibilidad en el

intestino delgado están: el uso de aminoácidos e ingredientes proteínicos tratados químicamente, con calor, y el uso de aminoácidos protegidos físicamente.³

De forma alternativa también se han enfocado más estudios en el uso de "metionina protegida" para proteger a este aminoácido a su paso por el rumen para su posterior absorción en el intestino delgado. Se ha encontrado que existe un aumento en el contenido de proteína de la leche y/o el incremento en la producción de leche, al suministrar formas de metionina protegida.²⁰

En el ganado ovino, los aminoácidos azufrados tienen gran importancia en la composición estructural de la fibra de lana y en la síntesis de proteína de la misma, pero dada su rápida degradación en el rumen, la suplementación en forma oral al igual que en el ganado bovino resulta poco eficiente. Por tanto, proveer los mismos en una forma de baja degradabilidad ruminal permitiría garantizar su disponibilidad a nivel del intestino delgado, a fin de ser absorbidos y destinados a la producción de lana.⁷

De los aminoácidos esenciales la metionina, es importante dado que puede ser convertida en cisteína que es el principal aminoácido de la lana. La administración de metionina presenta respuestas variables, en algunos casos provoca un aumento en el diámetro de fibra promedio, en el largo de mecha, en el peso de vellón sucio o en la resistencia a la tracción mientras que en otros no aumenta el volumen de lana producido por animal.⁷

Desde el punto de vista productivo tanto el volumen producido como la calidad de la lana, son de gran importancia, por ejemplo, la resistencia a la tracción y el coeficiente de variación del diámetro promedio de fibra son dos características que han sido incorporadas en el conjunto de variables que definen el precio de la lana ovina. El grado de resistencia de una fibra depende de su solidez y firmeza así que la ruptura de la fibra se considera una consecuencia de estrés nutricional, ambiental o sanitario.⁷

4.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para muchos organismos, el crecimiento y la reproducción están limitados por la disponibilidad de nutrientes que a su vez depende de la capacidad de los organismos para utilizar diferentes fuentes de energía como lípidos, carbohidratos y proteínas. Los rumiantes, son importantes para la especie humana ya que de ellos se obtienen el alimento y materias primas que se utilizan en la industria.

Además, hay regiones en donde son utilizados como tracción en el trabajo diario o como medio de transporte de personas o mercancía, es por esto, que deben proporcionarse fuentes alternativas que compensen la baja calidad de los nutrientes encontrados en los pastos y forrajes utilizados en su alimentación.¹

La metionina es uno de estos nutrientes, siendo un aminoácido esencial que desempeña el papel de intermediario en la biosíntesis de cisteína, carnitina, taurina, lecitina, fosfatidilcolina y otros fosfolípidos.²² En el rumiante, se absorbe por transporte activo en el intestino delgado y contribuye en el rumen a la población bacteriana para la síntesis de proteínas por parte de los microorganismos, proteínas microbianas que posteriormente aprovechará el rumiante.³

Para aumentar la cantidad de metionina que puede ser absorbida en el intestino delgado es conveniente incluirla en la ración diaria como fuente de lenta degradación en el rumen, optimizar la fermentación ruminal y síntesis de proteína microbiana y suministrar este aminoácido asegurando su resistencia a la fermentación microbiana.⁵ Para lograr esto, la metionina debe atravesar la boca (pH 7-8) para llegar al retículo-rumen (pH 5.5-7) y posteriormente pasar por el omaso (pH 7.2) y abomaso (pH 3-5) para llegar finalmente al Intestino (pH 7-8).^{22, 23}

Debido a los diferentes pH que se presentan en el sistema digestivo de los rumiantes y dada su rápida degradación en el rumen debido a la oxidación, el

suplemento oral de metionina resulta poco eficiente. De este modo, cuando la metionina es administrada a través del alimento, la respuesta en el animal es variable, debido a la disponibilidad del aminoácido en el intestino delgado, la cual está limitada por la actividad de los microorganismos del rumen. Sin embargo, con el uso de polímeros adecuados que protejan a la metionina de los diferentes pH's del tracto gastrointestinal del rumiante para liberarlo sólo en partes específicas como lo son el rumen e intestino se podría optimizar la administración de este aminoácido, beneficiando al animal.^{1,3,24,25,26}

En este proyecto se diseñará un sistema de liberación modificada en forma de pellets y se evaluará la misma simulando las condiciones de pH de los diferentes compartimentos del sistema gastrointestinal del rumiante.²⁷

5. HIPÓTESIS

El uso de polímeros que protejan la metionina beneficiará su paso a través del sistema digestivo del rumiante hasta llegar al rumen e intestino, en donde será liberado.

6. OBJETIVOS

Objetivo General

Elaborar un sistema de liberación modificada para la administración de metionina a nivel de rumen e intestino en el rumiante.

6.1. Objetivos particulares

- I. Realizar la identificación y cuantificación de la metionina como materia prima.
- II. Evaluar los polímeros seleccionados para los recubrimientos mediante la prueba de digestibilidad *in situ*.
- III. Llevar a cabo la validación de la técnica analítica que será utilizada para la cuantificación de metionina durante las distintas etapas del proyecto.
- IV. Desarrollar los recubrimientos de los núcleos inertes con metionina, así como de los siguientes recubrimientos con los polímeros funcionales.

- V. Incorporar la metionina externa junto con sulfato de bario a los pellets con recubrimiento funcional donde se logra proteger la metionina interna de los distintos pH que simulan las condiciones del tracto gastrointestinal del rumiante.
- VI. Evaluar los recubrimientos mediante pruebas de disolución simulando los pH del tracto gastrointestinal del rumiante.
- VII. Diseñar un prototipo que simule las condiciones del tracto gastrointestinal del rumiante.
- VIII. Evaluar los pellets recubiertos con polímero funcional en el prototipo ruminal diseñado para este proyecto.
- IX. Cuantificar la metionina durante las diferentes etapas del proyecto.

7.1. MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto se realizó en varias etapas, en la primera se evaluó la materia prima (metionina) de acuerdo a la monografía correspondiente, así como una prueba de digestibilidad de los polímeros que serán utilizados en los recubrimientos. Posteriormente, se realizaron los recubrimientos sobre los núcleos inertes que serían evaluados con pruebas de disolución para determinar cuáles serían los que continuarían con el último proceso de recubrimiento.

Materias primas y reactivos utilizados:

Metionina Marca JT. Baker.

Metionina Degusa®

Bromuro de Potasio Marca Sigma-Aldrich.

Ácido Fórmico al 95% Marca Fermont.

Ácido Acético Glacial Marca Fermont.

Ácido Perclórico Marca JT. Baker.

Solución de Cristal Violeta.

Alcohol Etilico Marca JT. Baker.

Ácido Acético Glacial Marca JT. Baker.

Acetato de Sodio Anhidro Marca JT. Baker.

Sulfato de Bario Marca JT. Baker.

Dimetilsulfóxido Marca JT. Baker.

Hidróxido de Sodio Marca J.T. Baker.

Ninhidrina Marca Merck.

Solución Valorada de Ácido Perclórico 0.09846 N.

Eudragit[®] S12.5 SP donado por Helm.

Eudragit[®] FS30D donado por Helm.

Eudragit[®] NE30D donado por Helm.

Eudragit[®] S100 donado por Helm.

Surelease[®] donado por Colorcon.

Opadry[®] I y II claro donado por Colorcon.

Talco micronizado donado por Helm.

Equipos y materiales:

Micropipetas de 100-1000 μ L, 20-200 μ L Marca Brand.

Micropipeta 20-200 μ L Marca Axygen.

Tamices No. 8, 10, 12, 14, 16, 18 Marca Cole-Parmer.

Espectrófotometro Cary 50Bio Marca Varian.

Infrarrojo Thermo Mattson Modelo IR3000.

Balanza Sartorius Modelo BP3015.

Balanza Analítica Mettler Toledo.

Potenciómetro Hanna Instruments Modelo 8417.

Estufa Figursa Modelo HR-33.

Agitador de propela Agit 5 marca Ika-Werke.

Bomba peristáltica modelo 5055 marca Watson-Marlow.

Bomba peristáltica marca MilliPore.

Equipo de lecho fluido (Fluid Bed Spray Granulator FBS-1) marca N.R. Industries.

Bombo convencional (acoplado a motor universal Erweka).

7.1. Pruebas para la identificación de metionina

Antes de comenzar el proceso de manufactura de los pellets protegidos se realizaron las pruebas farmacopéicas correspondientes a la metionina de acuerdo a lo indicado en la FEUM y USP: ^{25,28,29}

- a) Identificación por Infrarrojo
- b) Rotación Específica: Entre +22.4° y 24.7° en una solución que contenga 20mg/mL en HCl 6N.
- c) pH: entre 5.6 y 6.1 en una solución 1 en 100.
- d) Pérdida por secado: no menos de 0.3%, pesando 1g durante 3 horas a 105° C.
- e) Residuo de ignición: No más del 0.4%.
- f) Cloruros: 0.75 g de muestra no contienen más de 0.05% de cloruros.
- g) Sulfatos: 0.33 g de muestra no contiene más de 0.03% de sulfatos.
- h) Punto de fusión: 280°C – 282°C utilizando tubo capilar
- i) Metales pesados: menos de 0.0015%.
- j) Pureza cromatográfica: Cualquier mancha secundaria en el cromatograma obtenido en la solución de la muestra no es más grande ni más intensa que la mancha principal obtenida en el cromatograma obtenida con la solución

de Referencia, lo que equivale a no más de 0.5% de impurezas individuales y no más de 2.0% de impurezas totales.

- k) Valoración: 98.5 - 101.5% calculado en base seca. Se transfirieron cerca de 140 mg de metionina a un matraz erlenmeyer de 125 ml y se disolvieron en una mezcla de 3 ml de ácido fórmico y 50 ml de ácido acético glacial. Posteriormente se titulo con solución valorada de ácido perclórico 0.1 N, determinando potenciométricamente el final de la valoración. Se realizó un blanco de reactivos para hacer las correcciones necesarias. Cada mililitro de ácido perclórico equivale a 14.92 mg de metionina.^{25, 29}

7.2. Prueba de digestibilidad *in situ* de polímeros funcionales utilizados en los recubrimientos

Las características de la fermentación ruminal y digestibilidad de los alimentos pueden ser determinados por métodos *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. Para la prueba de digestibilidad *in situ* de polímeros de acrilatos y metacrilatos, se utilizaron bolsas marca Ankon (3x5 cm, tamaño de poro de 0.57 μm), incubadas en una vaca Holstein con fistula ruminal por determinados periodos de tiempo.

En cada bolsa, se colocaron 0.5 gramos de polímero y para evitar que la muestra saliera, las bolsas se cerraron con una selladora eléctrica. Las muestras se prepararon por triplicado y una vez listas, se depositaron en una malla dispuesta con una cuerda la cual se sujeto a la cánula ruminal de la vaca. Los periodos de incubación ruminal fueron 6, 12, 24 y 48 horas. Para ajustar los datos por contaminación, durante cada periodo se incubaron dos bolsas vacías como blancos. Una vez terminado el tiempo de prueba, las bolsas se retiraron del rumen simultáneamente e inmediatamente se lavaron con agua corriente hasta que el agua proveniente de las bolsas se observara totalmente clara. Posteriormente, se secaron las bolsas en una estufa a 55°C durante 48 horas.³⁰

7.3. Método para la cuantificación de metionina

La cuantificación de la metionina liberada de los pellets fabricados durante el proyecto se cuantificó por espectrofotometría UV de la siguiente forma: ³¹

Preparación de reactivos:

Preparación de la hidridantina: el compuesto se prepara por la reducción de la ninhidrina utilizando ácido ascórbico. Se pesan 80 g de ninhidrina que se disuelven en 2000 mL de agua a 90°C. Por otra parte, se disuelven 80 g de ácido ascórbico en 400 mL de agua a 40°C. Ambas soluciones se mezclan e inmediatamente comienza la cristalización de la hidridantina, por alrededor de 30 min. Durante una hora la solución se deja enfriar a temperatura ambiente o se utiliza agua fría. Posteriormente, la hidridantina se filtra, se lava con agua y se seca dentro de un desecador con pentóxido de fósforo protegiéndola de la luz. El compuesto es almacenado a temperatura ambiente protegido de la luz.

Reactivo de ninhidrina-hidridantina: para la preparación de 1 mL de reactivo se necesitan pesar 20 mg de ninhidrina que se disuelven en 0.75 mL de DMSO y por otra parte 3 mg de hidridantina que se disuelven en 0.25 mL de Buffer de Acetatos 4 N pH 5.5. Ya disueltos se mezclan antes de usarse.

Procedimiento:

Preparación del estándar (solución stock): se pesan 14 mg de metionina SR, se colocan en un matraz volumétrico de 500 mL, se disuelven en agua y se lleva a volumen. En la siguiente tabla se describen brevemente las alícuotas que se utilizan para la curva de calibración.

Curva de Calibración					
μL de Stock	μg Metionina/ 500 μL	Agua (μL)	Reactivo ninhidrina – hidridantina (μL)	Tiempo de Ebullición (min)	Etanol al 50% (mL)
15	0.42	485	200	30	1
30	0.84	470	200	30	1
40	1.12	460	200	30	1
80	2.24	420	200	30	1
120	3.36	380	200	30	1
160	4.48	340	200	30	1

Tabla 2: Curva de calibración para la cuantificación de metionina.

Preparación de la muestra: se pesa aproximadamente 1 g de pellets, los cuales se trituran y disuelven en 500 mL de buffer de acetatos 0.1M pH 7.2. Posteriormente, se toma una alícuota de 15 μL de muestra y se agregan 485 μL de agua. En seguida se adicionan 200 μL del reactivo de Ninhidrina-Hidridantina, se mezclan e inmediatamente se colocan en un baño de agua en ebullición durante 30 minutos.

7.3.1. Validación del método analítico para la cuantificación de metionina

La técnica analítica utilizada fue adaptada a la reportada por Moore y Stein,³¹ la cual se validó en el Laboratorio de Farmacotécnica de la UAM Xochimilco. El método utilizado es el mencionado anteriormente y la forma de realizar las pruebas de Especificidad, Linealidad del Sistema, Precisión del Sistema, Linealidad del Método, Exactitud y Precisión del Método se describen a continuación:³²

7.3.1. Especificidad del Método

Se realizó una curva de calibración y posteriormente se cuantificó lo obtenido de la preparación de dos placebos diferentes, así como de un estándar con una concentración de 1.12 µg metionina/500 µL, al cual se realizaron 5 lecturas y un duplicado de las muestras a la misma concentración preparado con el placebo utilizado y la cantidad de metionina correspondiente a la concentración utilizada para la preparación del estándar. A la curva de calibración se le determinó el análisis de regresión lineal, calculando la ordenada al origen, pendiente y coeficiente de determinación (r^2), mientras que a las muestras se les determinó el promedio y coeficiente de variación.

7.3.2. Linealidad del Sistema

Se prepararon 5 puntos a diferentes concentraciones como las utilizadas en la curva de calibración: 0.84, 1.12, 2.24, 3.36 y 4.48 µg/500µL, en donde cada punto se realizó por triplicado. A los resultados se les determinó el análisis de regresión lineal, calculando la ordenada al origen, pendiente y coeficiente de determinación.

7.3.3. Precisión del Sistema

A partir de los datos obtenidos en la Linealidad del Sistema, se preparó el punto de 1.12 µg/500µL por sextuplicado y se determinó el coeficiente de variación en la muestra.

7.3.4. Linealidad del Método

A partir de placebo, se adicionó la cantidad de metionina correspondiente a las concentraciones: 1.12, 2.24 y 3.36 µg/500µL, en donde cada punto se realizó por triplicado. A la curva de calibración utilizada se determinó el análisis de regresión

lineal, y a los datos obtenidos de las muestras se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.

7.3.5. Exactitud

A partir de los puntos preparados en la Linealidad del Método, se prepararon otros 3 puntos a las mismas concentraciones y se determinaron los mismos parámetros que en la prueba mencionada anteriormente.

7.4. Tamaño de partícula de los núcleos inertes

Para determinar el tamaño de partícula de los núcleos inertes, se pesaron aproximadamente 100 g de esferas. Se pesaron por otra parte las mallas 10, 12, 14, 16, 18, 20 y la base y la cantidad de núcleos pesados se colocaron sobre la malla 10 y se sometió a tamizado a través de un tamizador marca Erweka durante 10 minutos. Al término del tiempo, se pesaron las mallas con la muestra y por diferencia se obtuvo el porcentaje retenido en cada malla.

7.5. Tamaño de partícula de los núcleos recubiertos con metionina

Para determinar el tamaño de partícula de los núcleos recubiertos con metionina, se realizó el mismo procedimiento que el indicado para el tamizado de los núcleos inertes, pero sólo fueron utilizadas las mallas 10, 12, 14 y base.

7.6. Elaboración de pellets con metionina

Durante el proceso de fabricación de los pellets con metionina se utilizaron diversos polímeros funcionales, los cuales fueron seleccionados basándonos en la liberación de la metionina a un pH superior a 7. Sin embargo, también se realizó

un recubrimiento con polímeros neutros (Eudragit[®] NE30D). Además, se fabricó independientemente otro sistema, el cual tendría como polímero funcional de liberación lenta el Surelease[®].

A continuación se menciona como se realizó el recubrimiento inicial de los núcleos inertes a los cuales se adhirió metionina, posteriormente un polímero funcional (4 diferentes Eudragits[®] de manera independiente) y finalmente se seleccionaron los pellets recubiertos con Eudragit[®] FS30D y Eudragit[®] S12.5 para incorporarles la metionina externa junto con sulfato de bario, este último para proporcionarle densidad a los pellets.

Para el proceso de recubrimiento con el polímero funcional, así como de aquellos que continuaron con el proceso de recubrimiento que incluyen el sulfato de bario, se utilizó un bombo convencional (acoplado a motor universal Erweka) al cual se colocaron ocho baffles de manguera de silicona los cuales se fijaron con cinta canela, para favorecer el giro de los pellets y así permitir el recubrimiento adecuado de los mismos, sin que estos se adhieran a la superficie del bombo. Las suspensiones utilizadas para el proceso se hicieron pasar a través de una manguera de silicona (Tygon 3350, 1/8*1/4) con ayuda de una bomba peristáltica (MilliPore) y de una línea de aire comprimido.

A continuación se muestra un diagrama que describe la forma en la que se realizaron los recubrimientos, así como de una imagen que describe como están distribuidos los componentes del pellet en los recubrimientos.

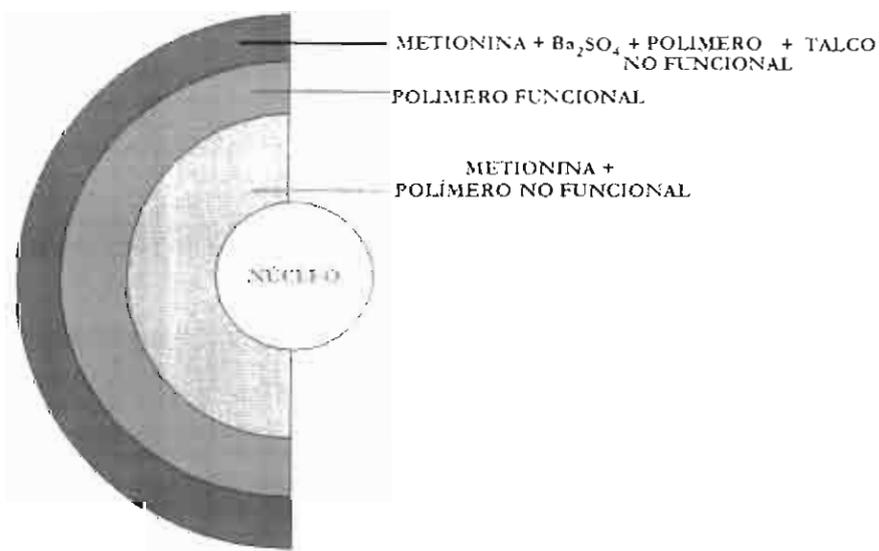
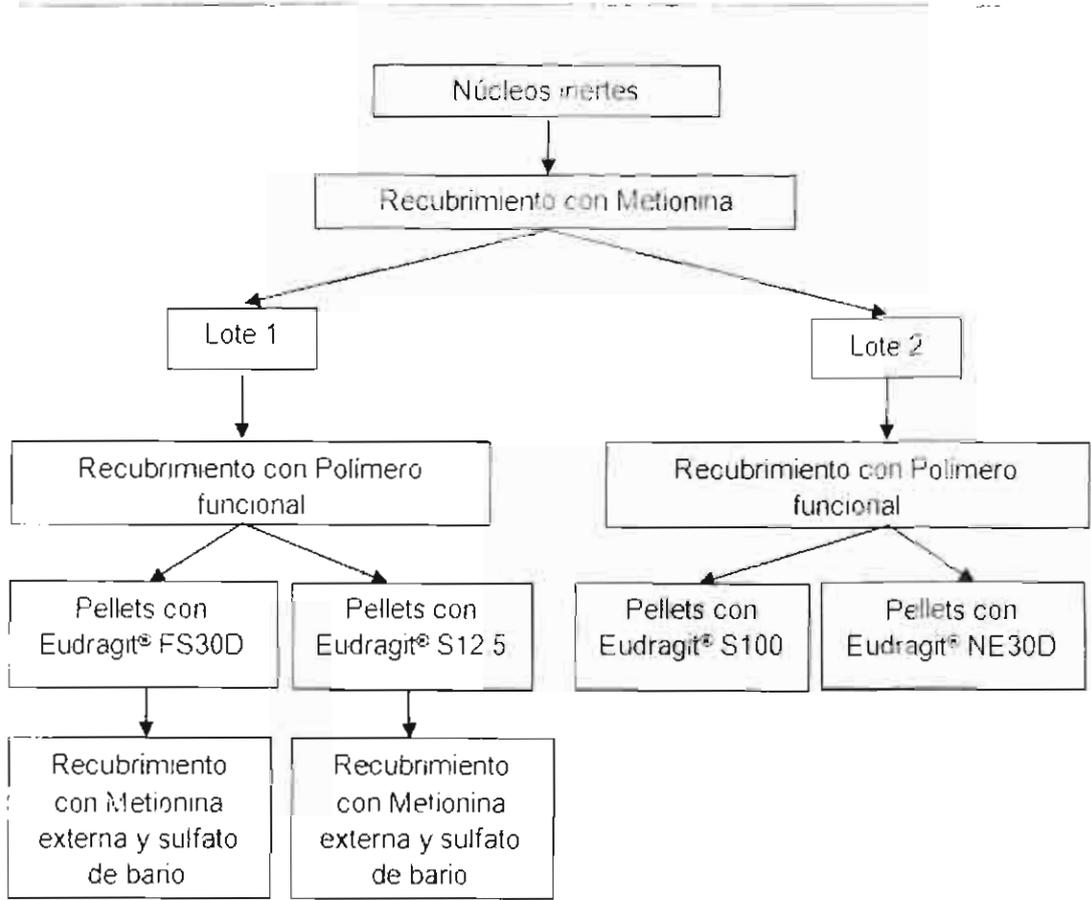


Figura 2. Pellets recubiertos con metionina, polímero funcional, sulfato de bario y metionina externa.

7.6.1. Recubrimiento de núcleos inertes con metionina

Para el recubrimiento inicial de los núcleos inertes con metionina se pesaron 1100 g de núcleos con un tamaño de malla de 16-18 micras. Por otra parte se pesaron 206.3 g de metionina (62.5%) y 123.7 g de Opadry® I claro (123.7%) los cuales se disolvieron en 1526.3 g de agua con ayuda de un agitador de propela Agit 5 marca Ika-Werke. Para el proceso se empleó una bomba peristáltica modelo 5055 marca Watson-Marlow y un equipo de lecho fluido (Fluid Bed Spray Granulator FBS-1) marca N.R. Industries. Las condiciones del proceso se encuentran en la tabla 3.

Parámetro	Inicial	Trabajo	Final
Temperatura (°C)	85	80	80
Presión de Aire (Bar)	76	100	176
Bomba peristáltica (rpm)	3.50	3.50	3.50

Tabla 3: Condiciones del proceso para el recubrimiento de núcleos inertes con metionina.

Posteriormente, se fabricaron otros pellets empleando en esta ocasión 950 g de núcleos inertes, 178 g de metionina (63.1%) y 104 g de Opadry® I claro (36.9%). Se utilizó el mismo equipo empleado en el recubrimiento anterior y las condiciones del proceso se encuentran en la tabla 4:

Parámetro	Inicial	Trabajo	Final
Temperatura (°C)	83	80	80
Presión de Aire (Bar)	76	100	176
Bomba peristáltica (rpm)	3.50	3.50	3.50

Tabla 4: Condiciones del proceso para el recubrimiento de núcleos inertes con metionina.

7.6.2. Recubrimiento con Eudragit® NE30D

Para el recubrimiento con Eudragit® NE30D de los núcleos con metionina se preparó una dispersión mezclando los componentes indicados a continuación con las siguientes recomendaciones: se calentó agua a una temperatura de 70-80°C, de la cual se utilizaron aproximadamente 17.8 g y se adicionaron 2.8 g de una solución acuosa al 33% v/v de Polisorbato 80 y 2.3 g de Monoestearato de Glicerilo. Se mezcló durante 10 minutos y posteriormente se agregaron 71.3 g de agua. Se dejó enfriar la suspensión y después se adicionaron 155.8 g de Eudragit® NE30D. Finalmente, se tamizó la dispersión por una malla 30 antes de utilizarse. Se utilizaron 400 g de pellets malla 14 y las condiciones del recubrimiento fueron las siguientes: distancia del bombo de 10 cm, velocidad de giro de 16 rpm, presión de aire entre 20 y 25 psi, temperatura de precalentamiento de 45°C y de trabajo de 40-45°C.

7.6.3. Recubrimiento con Eudragit® S100

Para el recubrimiento con Eudragit® S100 de los núcleos con metionina se preparó una dispersión mezclando los siguientes componentes: 363.2 g de agua se mezclaron con 74.6 g de Eudragit® S100 durante 5 minutos, después se adicionaron lentamente 50.6 g de una solución 1 N de amoníaco y se agitó durante 60 minutos. Posteriormente, se agregaron 37.3 g de Trietilcitrate y de nuevo se agitó durante 60 minutos. Por otra parte, se disolvieron 37.3 g de talco micronizado en 181.6 g de agua durante 10 minutos con un agitador de propela y después se agregó esta solución a la preparada con el polímero. La dispersión se tamizó por malla 30 antes de utilizarse. Se manejaron 450 g de pellets malla 14 y las condiciones del recubrimiento fueron las siguientes: distancia del bombo de 10 cm, velocidad de giro de 16 rpm, presión de aire de 20 psi, temperatura de precalentamiento de 40°C y de trabajo de 30-35°C.

Terminado el proceso y después de haber tamizado los pellets se realizó un segundo recubrimiento con Eudragit[®] S100. Para ello, se realizó una dispersión de la siguiente forma: 114.1 g de Eudragit[®] S100 se mezclaron con 561.4 g de agua durante 5 minutos, después se adicionaron lentamente 77.5 g de una solución 1 N de amoníaco y se agitó durante 60 minutos. Al finalizar el tiempo, se agregaron 57.0 g de Trietilcitrato y se agitó nuevamente durante 60 minutos. Por otra parte, se disolvieron 57.0 g de talco micronizado en 280.7 g de agua durante 10 minutos con un agitador de propela y después se agregó esta solución a la preparada con el polímero. La dispersión se tamizó por malla 30 antes de utilizarse. Se utilizaron 294.2 g de pellets malla 14, los cuales tienen incorporada la metionina interna y las condiciones del recubrimiento fueron las siguientes: distancia del bombo de 10 cm, velocidad de giro de 16 rpm, presión de aire de 20 psi, temperatura de precalentamiento de 40°C y de trabajo de 30-35°C.

7.6.4. Recubrimiento con Eudragit[®] FS30D

Para el recubrimiento con Eudragit[®] FS30D de los núcleos a los cuales se incorporó metionina se preparó una dispersión mezclando los componentes indicados a continuación: se calentó agua a una temperatura de 70-80°C, de la cual se utilizaron aproximadamente 113 g y se adicionaron 8.8 g de una solución acuosa al 33% v/v de Polisorbato 80, 9.0 g de Trietilcitrato y 7.2 g de Monoestearato de Glicerilo. Se mezcló durante 10 minutos y después se adicionaron 264 g de agua. Se dejó enfriar y se agregaron 598 g de Eudragit[®] FS30D. Finalmente, se tamizó la dispersión por una malla 30 antes de utilizarse. Se utilizaron 450 g de pellets malla 14 y las condiciones del recubrimiento fueron las siguientes: distancia del bombo de 10 cm, velocidad de giro de 16 rpm, presión de aire entre 20 y 25 psi, temperatura de precalentamiento de 40°C y de trabajo de 25-33°C.

Al final de este proceso, se dejó secar los pellets y se procedió a realizar un segundo recubrimiento. En esta ocasión se tamizó el producto obtenido

anteriormente y se realizó posteriormente la dispersión de la misma forma mencionada anteriormente, utilizando en esta ocasión las siguientes cantidades: 37 g de agua, 1 g de una solución acuosa al 33% v/v de Polisorbato 80, 3.3 g de Trietilcitrate y 2.6 g de Monoestearato de Glicerilo. Posteriormente se agregaron 86 g de agua, se dejó enfriar y se agregaron 217 g de Eudragit[®] FS30D. La dispersión se tamizó por malla 30 y para este segundo proceso se emplearon 325 g de pellets malla 14, los cuales se obtuvieron del proceso anterior y se procedió a realizar el recubrimiento bajo las mismas condiciones del proceso mencionado anteriormente.

7.6.5. Recubrimiento con Eudragit[®] S12.5

Para el recubrimiento de los núcleos de metionina con Eudragit[®] S12.5, se utilizaron 350 g de pellets malla 14 obtenidos en el recubrimiento inicial con metionina. La dispersión para este recubrimiento se preparó mezclando 300 g de Eudragit[®] S12.5, 11.3 g de talco micronizado y 345 g de alcohol isopropílico.

Las condiciones del recubrimiento fueron las siguientes: distancia del bombo de 10 cm, velocidad de giro de 17 rpm, presión de aire de 25 psi, temperatura de precalentamiento de 45-50°C y temperatura de trabajo de 30-35°C.

Finalizado este recubrimiento, se realizó el tamizado de los pellets y posteriormente, se procedió a recubrir nuevamente empleando las mismas cantidades utilizadas para la preparación de la dispersión y el total de pellets obtenidos en el proceso.

7.6.6. Recubrimientos con metionina externa y sulfato de bario

En esta etapa del proyecto fueron seleccionados dos productos obtenidos de la primera etapa del proyecto, en donde se recubrieron los pellets de metionina con los distintos polímeros funcionales. Los pellets seleccionados con los polímeros

Eudragit[®] FS30D y el Eudragit[®] S12.5, fueron recubiertos con sulfato de bario y metionina como se explica a continuación.

7.6.6.1. Pellets de metionina recubiertos con Eudragit[®] FS30D, metionina externa y Sulfato de Bario

Ya realizado el recubrimiento de los núcleos con la metionina interna y Eudragit[®] FS30D, se procedió a realizar el recubrimiento para incorporar la metionina externa, incluyendo sulfato de bario, el cual tiene como objetivo darle una mayor densidad al pellet. Se preparó una dispersión mezclando 140 g de metionina con 1972 g de agua, posteriormente se adicionaron los siguientes componentes: 108 g de Opadry[®] II claro, 140 g de Sulfato de Bario y 36 g de talco micronizado. Para el proceso se utilizaron 202.1g de pellets malla 14 y las siguientes condiciones: distancia del bombo de 10 cm, velocidad de giro de 17 rpm, presión de aire de 25 psi, temperatura de precalentamiento de 45°C y de trabajo de 40°C.

7.6.6.2. Pellets recubiertos con Eudragit[®] S12.5, metionina externa y Sulfato de Bario

Ya realizado el recubrimiento de los núcleos con metionina y Eudragit[®] S12.5, se procedió a realizar el recubrimiento para incorporar la metionina externa, incluyendo el sulfato de bario. Se preparó una dispersión mezclando 140 g de metionina con 1972 g de agua, posteriormente se adicionaron los siguientes componentes: 108 g de Opadry[®] II claro, 140 g de Sulfato de Bario y 36 g de talco micronizado. Para el proceso se utilizaron 268.6 g de pellets malla 14 y las siguientes condiciones: distancia del bombo de 10 cm, velocidad de giro de 17 rpm, presión de aire de 25 psi, temperatura de precalentamiento de 45°C y de trabajo de 40°C.

7.7. Prueba de disolución

Para realizar la prueba de disolución se utilizó un disolutor Hanson. Las condiciones del análisis fueron las siguientes: Aparato 1 (canastillas), temperatura de 37°C, 50 rpm y medio de disolución de 500 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M pH 6.0. Se tomaron 0.3 mL cada hora durante un total de 10 horas. Después, se modificó el pH a 4.0 utilizando 28 mL de ácido acético 6 N, tomando 0.3 mL de muestra cada 10 minutos durante 40 minutos y finalmente, se modificó nuevamente el pH a 7.5 utilizando 43 mL de hidróxido de sodio 6 N, muestreando 0.3 mL cada 15 minutos durante 1.5 horas. Los medios de disolución fueron seleccionados en base al pH de los sitios en donde se requiera proteger o dosificar la metionina.³³

7.8. Recubrimiento con Surelease®

Para lograr la liberación sostenida de la metionina a nivel ruminal, se propone un recubrimiento con un polímero pH independiente que sea capaz de liberar la metionina gradualmente. El objetivo de lograr la liberación sostenida de la metionina es proporcionársela a las bacterias presentes en el rumen para su aprovechamiento. El pellet permanece un período largo de tiempo en este compartimiento y para evaluar la liberación sostenida de la metionina, se incluyó en este proyecto el recubrimiento con un polímero funcional que libere la metionina gradualmente. Para la fabricación del dispositivo de liberación sostenida propuesto, se realizaron dos recubrimientos, el primer recubrimiento tuvo como objetivo la incorporación de la metionina sobre núcleos inertes de almidón, azúcar y dextrosa; el segundo recubrimiento fue funcional para controlar la liberación del aminoácido.

Para el recubrimiento inicial de los núcleos inertes con metionina y Advantia® (polímero no funcional), se preparó una dispersión pesando 72.27 gramos de metionina y 161 gramos de Advantia®, los cuales se disolvieron por separado en

1000 g de agua cada uno. Posteriormente, se mezclaron ambas soluciones y se continuó con la agitación. La solución resultante fue asperjada sobre el lecho formado por 542.8 gramos de núcleos inertes con un tamaño malla entre 20–30 micras.

El proceso de recubrimiento se llevó a cabo en un bombo convencional (acoplado a motor universal Erweka), con ocho baffles de manguera de silicona los cuales se fijaron con cinta canela. La solución pasó a través de una manguera de silicona (Tygon 3350, 1/8*1/4) con ayuda de una bomba peristáltica (MilliPore) y un compresor de aire (Craftsman). El precalentado y secado de los pellets se realizó con una secadora de cabello convencional y las condiciones del proceso fueron las siguientes: temperatura de 39 a 42°C, velocidad de precalentado: 15 rpm y de proceso de 17 rpm con una presión de aire de 20 psi.

Para el segundo recubrimiento, en donde se adhirió el Surelease[®], se preparó una dispersión en agua, pesando 292 gramos del producto Surelease[®] (clasificado por Colorcon como “todo en uno”), cuyo polímero funcional es la etilcelulosa y 194.6 gramos de agua. Se mezclaron en un agitador de propela Agit 5 marca Ika-Werke. El proceso de recubrimiento se llevó a cabo en un equipo de lecho fluido (Fluid Bed Spray Granulator FBS-1) marca N.R. Industries. Este segundo proceso de recubrimiento se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: temperatura de 79°C, presión 2 Bar y velocidad del equipo 69 rpm. La bomba peristáltica se manejó a 2.75 rpm y durante la aspersion se observaron aumentos en la velocidad del equipo de 69 a 86, 102 y 113 rpm.

7.9. Prueba de disolución para Surelease[®]

Para realizar la prueba de disolución con Surelease[®], se utilizó un disolutor Hanson, las condiciones mencionadas en el apartado de la prueba de disolución para los otros polímeros, así como los tiempos de muestreo y la cantidad de

muestra tomada en cada tiempo. El objetivo principal de realizar esta prueba en particular, es cuantificar la metionina que será liberada a pH ruminal.

7.10. Prueba de disolución en el prototipo ruminal

Además, se realizó el diseño de un prototipo que simule las condiciones del tracto gastrointestinal del rumiante desde el punto de vista del pH. Las condiciones de la prueba consisten en los pH mencionados para el proceso de disolución, sin embargo, se comienza la prueba con 50 mL de Buffer de acetato de sodio 0.1 M pH 6.0. Se tomaron 0.3 mL cada hora durante un total de 10 horas. Después, se modificó el pH a 4.0 utilizando cerca de 2.8 mL de ácido acético 6 N, tomando 0.3 mL de muestra cada 10 minutos durante 40 minutos y finalmente, se modificó nuevamente el pH a 7.5 utilizando aproximadamente 4.3 mL de hidróxido de sodio 6 N, muestreando 0.3 mL cada 15 minutos durante 1.5 horas. El dispositivo consta de 3 compartimientos y para cada modificación de pH se realizó el cambio de compartimiento para el buffer utilizado. A continuación se muestra el diagrama del prototipo utilizado para la evaluación de los pellets.

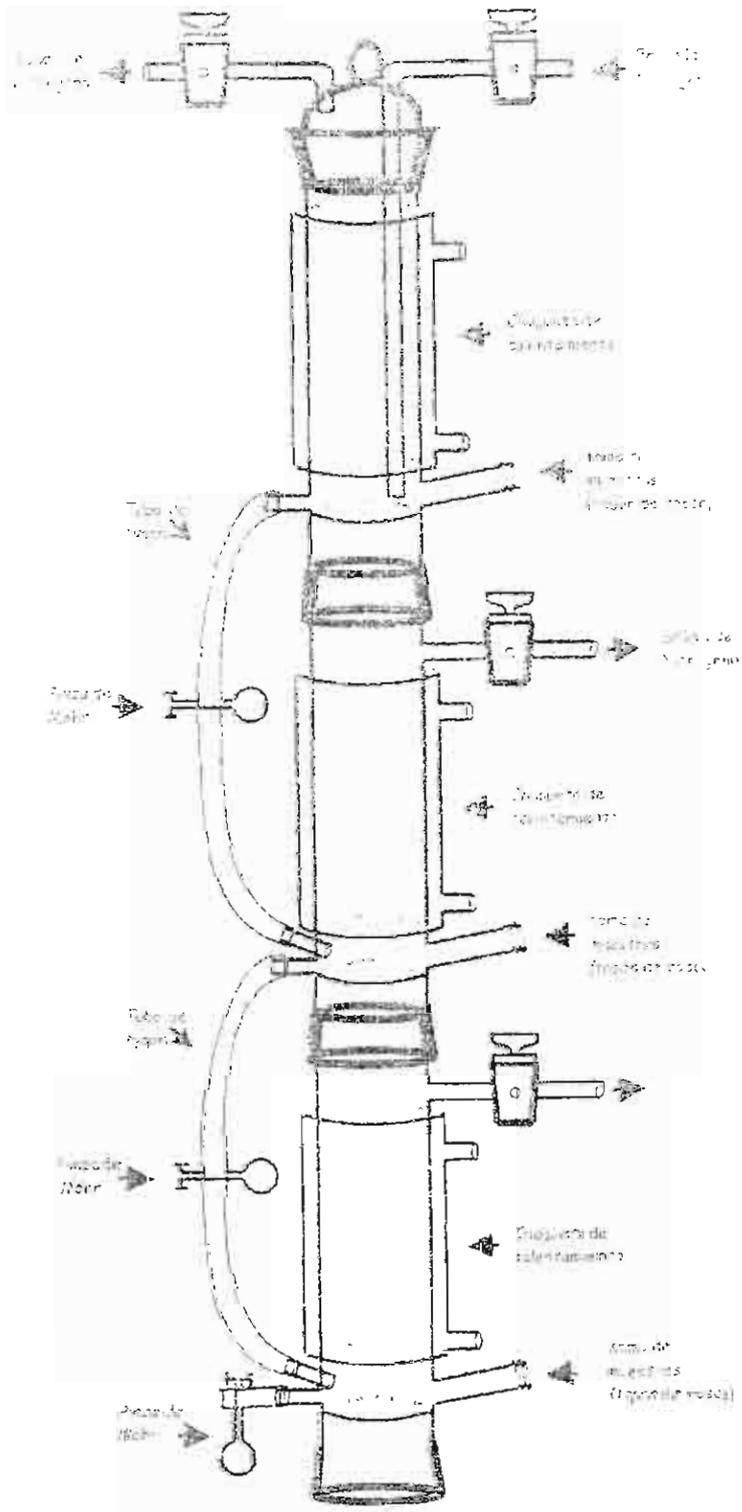


Figura 3: prototipo de dispositivo ruminal

7.11. Análisis estadístico

Para la evaluación de los datos obtenidos en las pruebas de disolución, se realizó el cálculo mediante el paquete estadístico JMP® 8.0 de SAS Institute, Inc.³⁴, utilizando un modelo de regresión lineal múltiple. Con este análisis se busca el modelo que mejor se ajuste al comportamiento de los datos obtenidos en las disoluciones durante las distintas etapas del proyecto.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1. Ensayos realizados a la metionina.

Las pruebas de identificación realizadas a la metionina como materia prima, indican que cumple con las especificaciones indicadas en las monografías correspondiente de la FEUM y USP, ver anexo 1.

8.2. Prueba de digestibilidad *in situ* de polímeros funcionales utilizados en los recubrimientos peliculares

De acuerdo a los resultados de la prueba de digestibilidad *in situ*, los polímeros Eudragit[®] FS30D, Eudragit[®] NE30D, Surelease[®] y Eudragit[®] S100 no presentan digestión en los horarios de muestreo. Los valores cercanos al 100% indican que se recuperó todo el polímero, en cambio, valores por debajo, indicarían que hubo degradación del polímero, tabla 5. Es el resultado de esta prueba lo que indica que las bacterias presentes en el líquido ruminal no degradan los polímeros que utilizamos en los recubrimientos para este proyecto.

Hora de muestreo	Surelease [®]	Desv. Std	FS30D	Desv. Std	NE30D	Desv. Std	S100	Desv. Std
6	99.83	1.10	100.27	0.35	102.63	0.95	96.12	7.02
12	102.92	0.50	102.58	0.79	104.23	0.52	96.92	0.89
24	103.16	0.40	103.54	0.43	104.22	0.22	94.98	1.01
48	101.56	0.14	101.81	1.02	103.21	0.64	96.49	0.41

Tabla 5. Digestibilidad *in situ* (Porcentaje de polímero recuperado)

8.3. Validación del método analítico

Para el término de la validación del método analítico se determinaron los siguientes parámetros:

- a) Especificidad del Método
- b) Linealidad del Sistema
- c) Precisión del Sistema
- d) Linealidad del Método
- e) Exactitud

A continuación se muestran los resultados de la validación del método analítico, siendo importante mencionar que el coeficiente de variación para cada prueba es menor del 2%, por lo que se considera adecuada la técnica analítica para la cuantificación de la metionina.

8.3.1. Especificidad del Método

El resultado de la curva de calibración, así como de los placebos (núcleos inertes), el estándar y las muestras indican que es específico el método como se puede observar en la tabla 6.

Parámetro	Valor cuantificado
Placebo	0.03 µg metionina/500 µL
Concentración de 1.12 µg metionina/500 µL	1.16 µg metionina/500 µL
Desviación Estándar	1.94
Coefficiente de Variación	1.67

Ecuación de regresión	$y = 0.13891 \cdot \text{conc} - 0.07134$
Coefficiente de correlación (r)	0.98818

Tabla 6. Parámetros evaluados en la especificidad del método

8.3.2. Linealidad del Sistema

En la siguiente tabla se encuentran los valores de la respuesta obtenida correspondiente a las distintas concentraciones utilizadas para determinar la linealidad del sistema, así como la ecuación de regresión lineal y el coeficiente de correlación, tabla 7.

Concentración (μg metionina/500 μL)	Valor obtenido (μg metionina/500 μL)	Desv. Std.	CV
0.84	0.65	0.010	1.54
1.12	1.15	0.020	1.74
2.24	2.07	0.015	0.72
3.36	3.29	0.006	0.18
4.48	4.54	0.025	0.55

Tabla 7. Valores obtenidos de los distintos puntos cuantificados en la linealidad del sistema.

La curva de calibración utilizada para la cuantificación de los valores en la linealidad del sistema es la utilizada en la especificidad del método. Los resultados indican que la curva de calibración es lineal y reproducible.

8.3.3. Precisión del Sistema

La curva de calibración utilizada en la especificidad y linealidad del método fue la misma para cuantificar el estándar en esta etapa de la validación (tabla 8), la cual indica que el método es preciso.

Concentración (μg metionina/500 μL)	Valor obtenido (μg metionina/500 μL)	Desv. Std.	CV
1.12	1.15	0.015	1.30

Tabla 8. Valor obtenido para precisión del método

8.3.4. Linealidad del Método

A continuación se encuentran los valores obtenidos de la linealidad del método, tablas 9 y 10:

Concentración (μg metionina/500 μL)	Valor obtenido (μg metionina/500 μL)	Desv. Std.	CV
1.12	1.08	0.015	1.39
2.24	2.20	0.012	0.55
3.36	3.59	0.025	0.70

Tabla 9. Valor obtenido para linealidad del método

Parámetro	Valor cuantificado
Ecuación de regresión	$y = 0.14590 \cdot \text{conc} - 0.02817$
Coefficiente de correlación (r)	0.98617

Tabla 10. Curva de calibración para linealidad del método.

Los valores del coeficiente de variación y el coeficiente de correlación indican que el método es lineal.

8.3.5. Exactitud

A continuación, se encuentran los valores obtenidos de la exactitud, tabla 11. La curva de calibración corresponde a la misma utilizada para linealidad del método e indican que el método es exacto y los valores son reproducibles.

Concentración (μg metionina/500 μL)	Valor obtenido (μg metionina/500 μL)	Desv. Std.	CV
1.12	1.08	0.016	1.48
2.24	2.18	0.030	1.38
3.36	3.56	0.041	1.15

Tabla 11. Valor obtenido en la exactitud del método

8.4. Tamaño de partícula de los núcleos inertes

Después de realizar el tamiz de los núcleos inertes se obtuvieron como resultado los siguientes porcentajes de núcleos retenidos en las distintas mallas utilizadas: Malla 14= 0.6 gramos (0.59% retenido), Malla 16= 68.4 gramos (68.19% retenido), Malla 18= 30.3 gramos (30.20% retenido), Malla 20= 0.8 gramos (0.79% retenido), Malla 30= 0.1 gramos (0.09% retenido) y Base= 0.1 gramos (0.09% retenido), ver anexo 2.

8.5. Recubrimiento de núcleos inertes con metionina

El tiempo de proceso para el recubrimiento inicial de la metionina fue de 6.5 horas con un 95.2% de eficiencia. Cuando se tamizó el producto, la mayor cantidad retenida se ubicó en la malla 14 con el 87.75%, es decir, 1194.9 gramos.

Para el segundo lote fabricado el tiempo de proceso fue de 2 horas 20 minutos, con un 95.5% de eficiencia y una ganancia en peso del 23.9%. Cuando se tamizó el producto, la mayor cantidad retenida se encontró en la malla 14 con el 85.03%, es decir, 1000.6 gramos.

8.6. Recubrimientos

Se presentan los resultados de los rendimientos y ganancias en peso obtenidos en los recubrimientos realizados con los polímeros funcionales y la incorporación de la metionina externa. Cabe recordar que sólo continuaron con la última etapa del proyecto los pellets recubiertos con Eudragit[®] FS30D y S12.5, ya que fueron seleccionados por proteger la metionina interna después de haberse realizado la prueba de disolución.

En el recubrimiento donde se incorporaba la metionina en los núcleos inertes, se obtuvo una buena eficiencia en el proceso, sin embargo en la siguiente etapa, es decir en los recubrimientos de protección, la eficiencia bajó y se debió a que no se logró controlar la velocidad de dosificación porque la bomba peristáltica con la que se trabajó no funcionaba a bajas dosificaciones y combinado con la volatilidad de algunos solventes utilizados y el uso de un equipo abierto (bombo convencional) los rendimientos bajaron. Los resultados obtenidos en cada uno de los procesos se resumen a continuación.

8.6.1. Recubrimiento con Eudragit[®] NE30D

El tiempo de proceso fue de 1 hora 47 minutos. El peso teórico esperado era de 449.9 gramos, sin embargo se obtuvieron 434.6 gramos, lo que equivale a un 96.6% de eficiencia y una ganancia en peso del 8.65%. El tamizado realizado después del recubrimiento muestra los siguientes resultados: Malla 10= 122.9 gramos (27.3 % retenido), Malla 12= 124.4 gramos (27.7 % retenido), Malla 14= 159.8 gramos (35.5 % retenido), Base= 42.8 gramos (9.5 % retenido).

8.6.2. Recubrimiento con Eudragit[®] S100

El primer recubrimiento con Eudragit[®] S100 tuvo una duración de 1 hora 8 minutos. El peso teórico esperado era de 549.2 gramos, sin embargo se obtuvieron 483.1 gramos, lo que equivale a un 88.0% de eficiencia y una ganancia en peso del 20.78%. Después del tamiz, los resultados obtenidos son los siguientes: Malla 10= 34.3 gramos (7.10% retenido), Malla 12= 3.4 gramos (0.70% retenido), Malla 14= 304.2 gramos (62.97% retenido), Base= 141.2 gramos (29.23% retenido).

El tiempo de proceso durante el segundo recubrimiento con Eudragit[®] S100 fue de 2 horas 36 minutos. El peso teórico que debió obtenerse es de 522.3 gramos, sin embargo se obtuvieron 428.8 gramos, lo que equivale a un 82.1% de eficiencia y una ganancia en peso del 45.75%. Después del tamizaje los resultados obtenidos son los siguientes: Malla 10= 8.1 gramos (1.89 % retenido), Malla 12= 223.3 gramos (52.08 % retenido), Malla 14= 195.5 gramos (45.59 % retenido), Base= 1.9 gramos (0.44 % retenido).

8.6.3. Recubrimiento con Eudragit[®] FS30D

El primer proceso de recubrimiento de núcleos con metionina y Eudragit[®] FS30D se realizó en 2 horas 37 minutos. Del peso teórico esperado de 545.2 gramos se

obtuvieron 506.4 gramos, lo que equivale a un 92.9% de eficiencia y una ganancia en peso del 12.5%. Los resultados del tamizado de los pellets es el siguiente: Malla 10= 125.8 gramos (24.84% retenido), Malla 12= 11.3 gramos (2.23% retenido), Malla 14= 339.4 gramos (67.02% retenido), Base= 29.9 gramos (5.90% retenido).

El segundo proceso de recubrimiento con Eudragit[®] FS30D se realizó en 55 minutos, con un peso teórico de 393.7 gramos, no obstante, se alcanzó un peso de 382.5 gramos, lo que equivale al 97.2% de eficiencia y 17.7% en ganancia en peso. Al tamizar los pellets se obtuvieron los siguientes resultados: Malla 10= 0.4 gramos (0.10% retenido), Malla 12= 40.4 gramos (10.56% retenido), Malla 14= 313.0 gramos (81.83% retenido), Malla 16 14.4 gramos (3.76% retenido), Base= 14.3 gramos (3.74% retenido).

8.6.4. Recubrimiento con Eudragit[®] S12.5

El tiempo de proceso en el primer recubrimiento fue de 1 hora 13 minutos. El peso teórico propuesto fue de 402.5 gramos, sin embargo, se obtuvieron 360.2 gramos, lo que equivale al 89.5% de eficiencia y una ganancia en peso del 2.9%. Realizado el tamizado se obtuvieron los siguientes resultados: Malla 10= 8.5 gramos (2.36% retenido), Malla 12= 7.5 gramos (2.08% retenido), Malla 14= 344.0 gramos (95.50% retenido), Base= 0.2 gramos (0.06% retenido).

En el segundo recubrimiento el tiempo de proceso fue de 3 horas y el peso teórico esperado era de 412.7 gramos, sin embargo se obtuvieron 371.3 gramos, correspondiente al 90.0% de eficiencia y 3.1% de ganancia en peso.

Malla 10= 5.2 gramos (1.40% retenido), Malla 12= 38.3 gramos (10.32% retenido), Malla 14= 275.7 gramos (74.25% retenido), Base=52.1 gramos (14.03% retenido).

8.6.5. Pellets recubiertos con Eudragit[®] FS30D – Metionina externa y Sulfato de Bario

El tiempo de proceso en el recubrimiento fue de 2 horas 40 minutos. El peso teórico esperado era de 626.1 gramos, no obstante, se obtuvieron 440.3 gramos, lo que equivale al 70.3% de eficiencia y 17.9% de ganancia en peso. Esta baja eficiencia se debe a problemas con la pistola de aspersión, la cual se tapó en algunas ocasiones, ocasionando que solamente se elevaran los pellets por la presión del aire y se perdiera una cantidad durante el proceso. Los resultados del tamizado son los siguientes: Malla 10= 81.3 gramos (18.46 % retenido), Malla 12= 150.4 gramos (34.16 % retenido), Malla 14= 161.2 gramos (36.61 % retenido), Malla 16 32.6 gramos (7.40 % Retenido), Base= 14.8 gramos (3.36 % retenido).

8.6.6. Pellets recubiertos con Eudragit[®] S12.5 – Metionina externa y Sulfato de Bario

El tiempo de proceso fue de 3 horas 45 minutos y el peso teórico que debió obtenerse es de 692.6 gramos, obteniéndose un peso final de 337.9 gramos, lo que equivale al 48.8% de eficiencia y una ganancia en peso del 25.80%. La baja eficiencia fue el resultado de problemas con la pistola de aspersión, tapándose en varias ocasiones y provocando que no saliera la dispersión y solo fueran expulsados del bombo los pellets a causa de la presión del aire para el secado. Del tamizado se obtuvieron los siguientes resultados: Malla 10= 134.5 gramos (1.40% retenido), Malla 12= 102.1 gramos (10.32% retenido), Malla 14= 97.1 gramos (74.25% retenido), Base= 4.2 gramos (14.03% retenido).

8.6.7. Recubrimiento con Surelease®

El peso final en el recubrimiento con Surelease® fue de 374.3 gramos, lo que significa que la eficiencia del proceso fue de 85.8% mientras que la ganancia en peso obtenida fue de 16.53%. Estos pellets son un proceso independiente a los recubrimientos con los polímeros funcionales dependientes del pH, el cual tiene como objetivo proteger a la metionina que debe ser liberada gradualmente en el rumen para su aprovechamiento por las bacterias ruminales. De ahí la importancia de ver el comportamiento en la liberación usando este polímero.

8.7. Microscopia

Se tomaron microfotografías de los pellets usando un microscopio modelo CMEX marca Novex Holland. A continuación, de la figura 4 a la 14, se muestran algunas de las microfotografías que se tomaron de la metionina, los núcleos inertes y los pellets en diferentes etapas del proceso de fabricación. En la figura 4, se puede observar la microfotografía de la metionina.

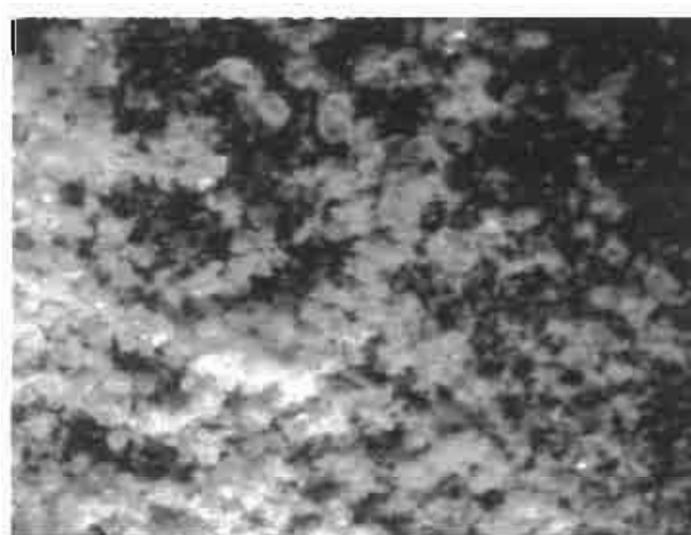


Figura 4: Metionina DL-Degusa®

En la figura 5, podemos observar la forma de los núcleos inertes que fueron utilizados como base para el recubrimiento con metionina y el polímero no funcional.

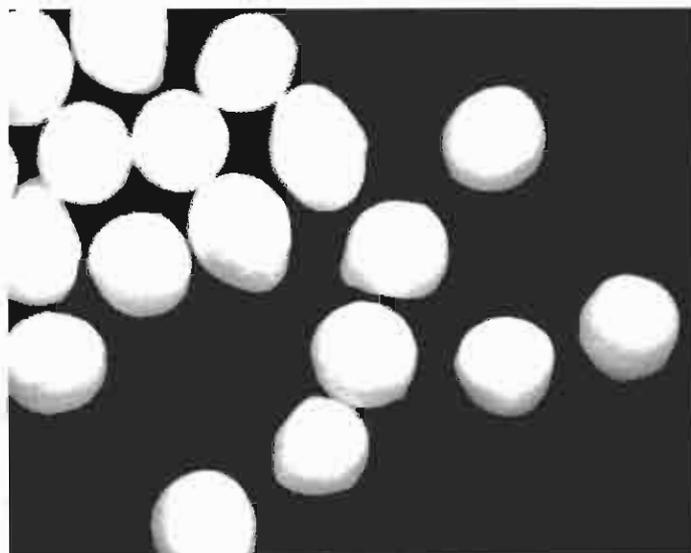


Figura 5: Núcleos inertes malla 14-18 Lote: ST501013

En la figura 6, se observan los pellets recubiertos con metionina y Opadry® I claro, en donde se puede ver que los pellets parecen tener una forma uniforme.

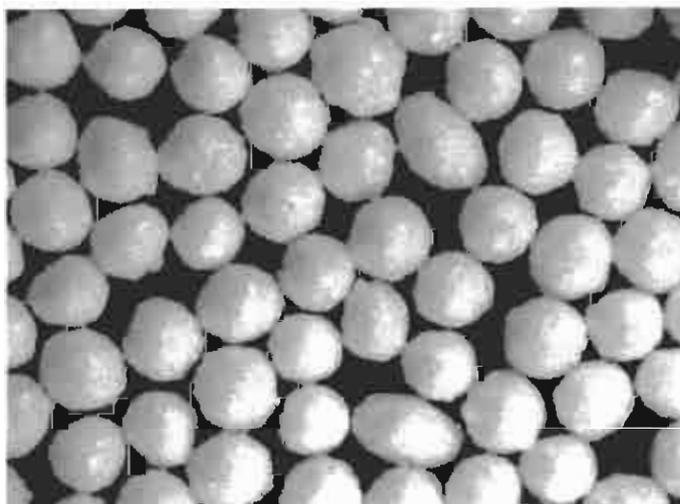


Figura 6: Núcleos inertes recubiertos con metionina y Opadry® I claro

En la figura 7, se pueden ver los pellets de metionina recubiertos con Surelease[®], en donde se pueden observar pellets de distintas formas, incluso algunos que se encuentran unidos entre ellos.

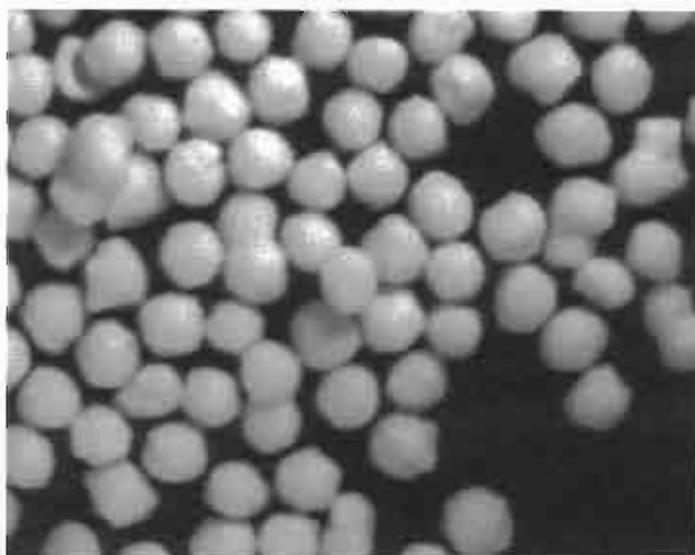


Figura 7: Núcleos inertes con metionina recubiertos de Surelease[®]

En la figura 8, se puede ver la forma de los pellets de metionina recubiertos con Eudragit[®] NE30D, siendo irregular e incluso, se puede observar que pareciera que hay pellets unidos entre sí.

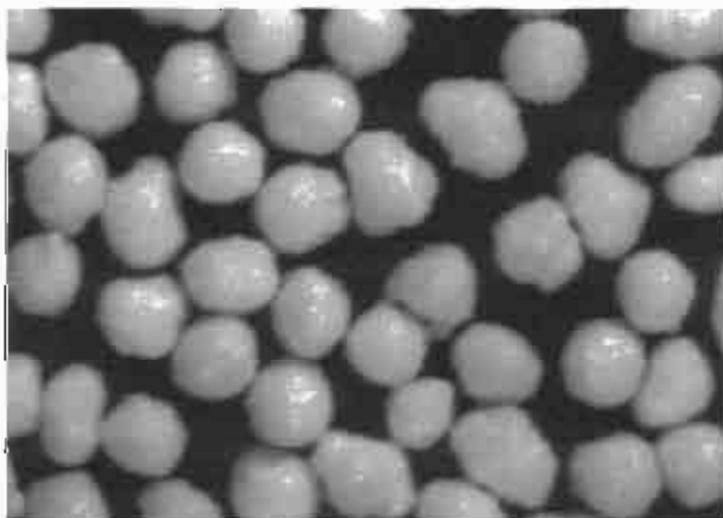


Figura 8: Núcleos inertes con metionina recubiertos de Eudragit[®] NE30D

En la figura 9, se puede ver la forma de los pellets de metionina recubiertos con Eudragit® S100, en donde se observa la unión de varios pellets.

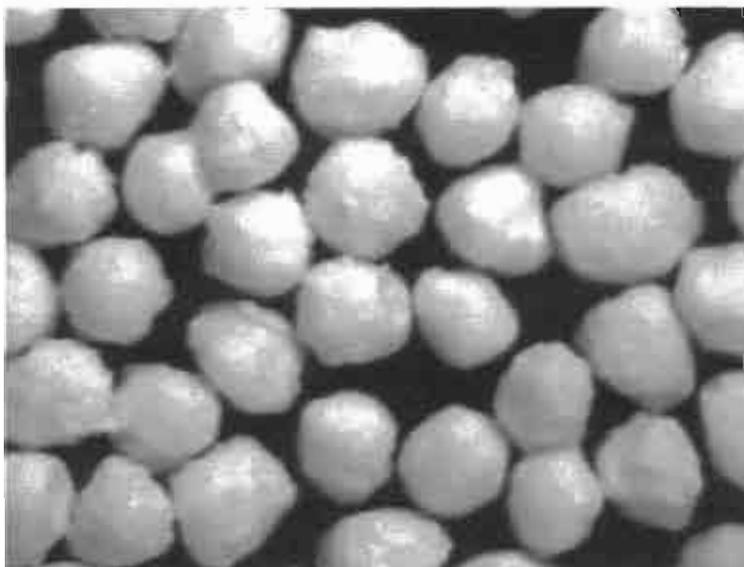


Figura 9: Núcleos inertes con metionina recubiertos de Eudragit® S100

En la figura 10, se puede ver la forma uniforme de los pellets de metionina recubiertos con Eudragit® S12.5.

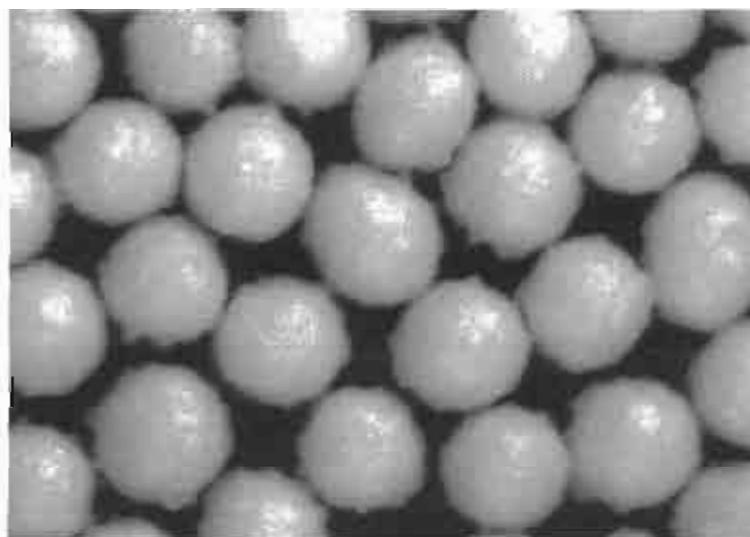


Figura 10: Núcleos inertes con metionina recubiertos de Eudragit® S12.5

En la figura 11, se puede ver la forma uniforme de los pellets, aunque rugosos recubiertos con Eudragit® FS30D.

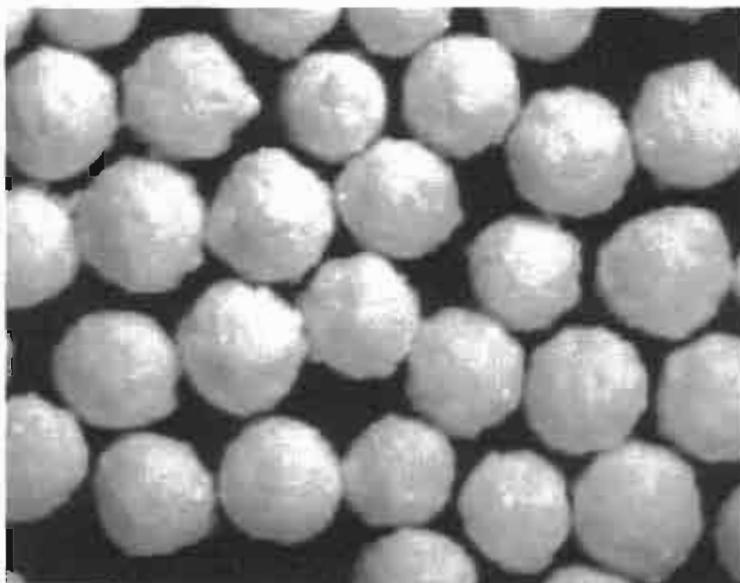


Figura 11: Núcleos inertes con metionina recubiertos de Eudragit® FS30D

En las figuras 12 y 13, se puede ver la forma uniforme de los pellets de metionina recubiertos con Eudragit® FS30D y Eudragit® 12.5 después del proceso de recubrimiento con metionina externa y sulfato de bario.

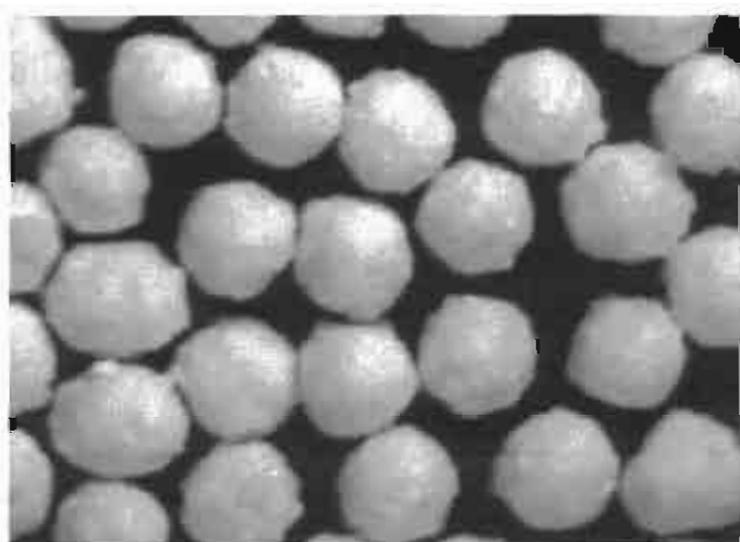


Figura 12: Núcleos inertes con metionina recubiertos de Eudragit® FS30D, sulfato de bario con metionina externa

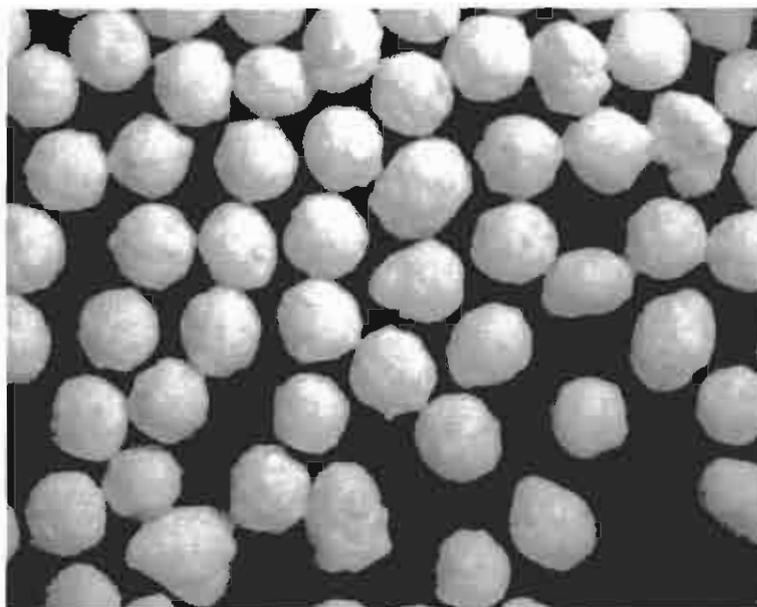


Figura 13: Núcleos inertes con metionina recubiertos de Eudragit® S12.5, sulfato de bario con metionina externa

En las figura 14, se puede ver la forma de algunos de los pellets que contienen Eudragit® 12.5, al final del proceso de recubrimiento con metionina externa y sulfato de bario.

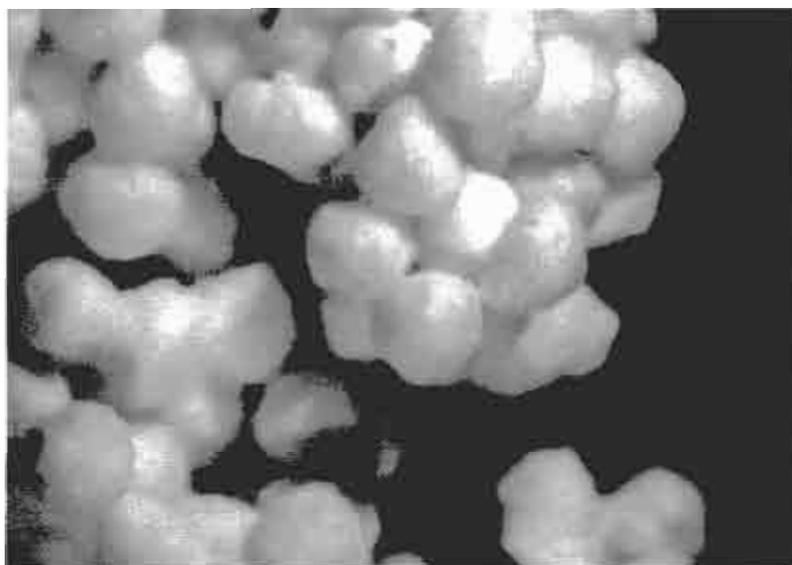


Figura 14: Núcleos inertes con metionina recubiertos de Eudragit® S12.5, sulfato de bario con metionina externa

Las microfotografías muestran pellets esféricos en la mayoría de los procesos de recubrimiento, así como de problemas que se presentaron en alguno de ellos, como fue el caso del recubrimiento de pellets con Eudragit® S12.5, metionina externa y sulfato de bario (figura 14), en donde se formaron racimos debido a lo delicado del proceso de recubrimiento, al disminuir rápidamente la temperatura y tener problemas en el proceso. Este problema se atribuye principalmente a la bomba peristáltica, la cual no dosificaba a bajas velocidades la dispersión, motivo por el cual no se podía recubrir de una manera uniforme. Sin embargo, los procesos se terminaron y gran parte de los lotes cumplieron con las especificaciones.

8.8. Disoluciones

Se muestran los resultados de las disoluciones de los pellets con metionina en las distintas etapas de fabricación.

8.8.1. Disolución de pellets recubiertos con metionina interna y polímero funcional

En la primera etapa de fabricación de núcleos recubiertos con metionina y el correspondiente polímero funcional, se cuantificó como valor máximo en las disolución los siguientes resultados: para el Eudragit® S12.5 se cuantificó el 63.1%, Eudragit® FS30D el 99.3%, Eudragit® S100 el 99.1%, Eudragit® NE30D el 19.9% y para el Surelease® el 56.2%, figura 15. La cantidad de metionina que se cuantificó en los pellets con Eudragit® FS30D es de 94 mg/g de pellets, Eudragit® S100 69.33 mg/g de pellets, Eudragit® NE30D 71.33 mg/g de pellets, Eudragit® S12.5 94 mg/g de pellets y para el Surelease® 110.32 mg/g de pellets. Para ver los detalles del porcentaje disuelto vea el anexo 3.

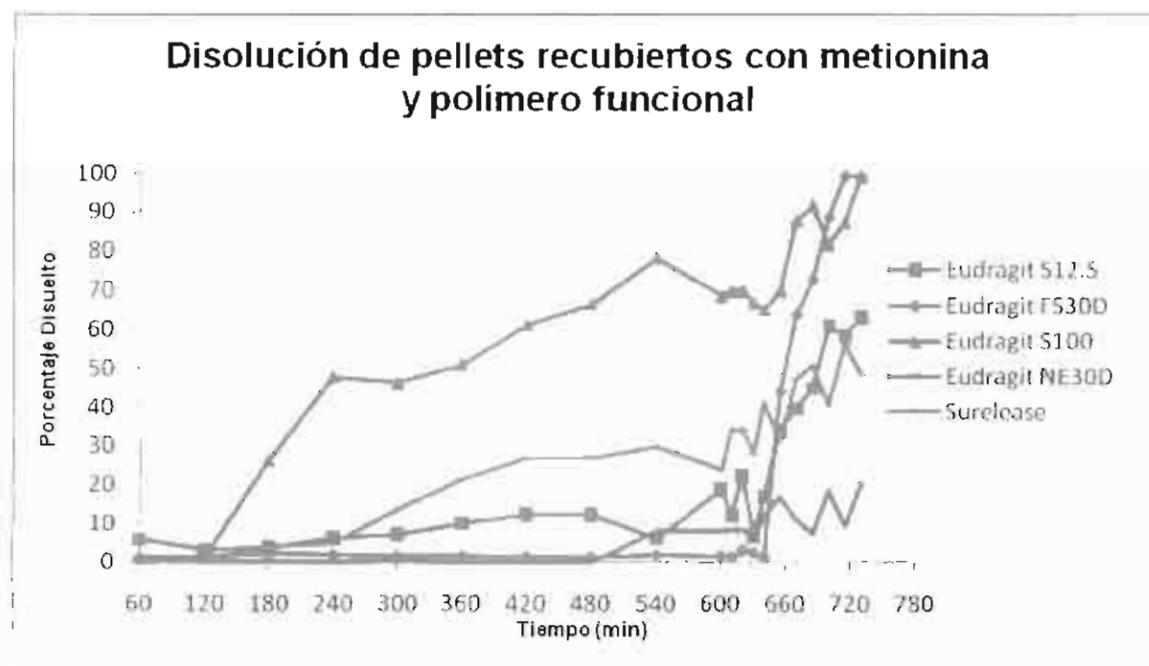


Figura 15: Disolución de pellets recubiertos con metionina interna y polímero funcional. Los primeros 600 minutos el pH en la prueba es de 6.0, posteriormente se modifica a pH 4.0 y a los 640 minutos se cambia a pH 7.5.

En el gráfico se muestra que los polímeros que protegen la metionina interna son el Eudragit[®] FS30D y Eudragit[®] S12.5. Este último, libera metionina durante las primeras horas de la disolución, sin embargo, es constante y cuando se realiza el cambio de pH para que se disuelva por completo el polímero, libera la metionina interna, no totalmente, pero se consideraron los pellets fabricados con estos polímeros para la siguiente etapa de recubrimiento con metionina externa y sulfato de bario.

Los pellets de metionina interna recubiertos con Eudragit[®] FS30D son los que liberan la metionina solamente en el pH básico. En esta etapa del proyecto, los pellets con Eudragit[®] FS30D y Eudragit[®] S12.5, son los que protegen la metionina a los pH en donde no se desea que sea liberada. Mientras que de los polímeros neutros (Eudragit[®] NE30D y Surelease[®]) que liberan gradualmente la metionina, el

Surelease[®] fue el polímero que liberó la metionina lentamente durante la disolución.

8.8.2. Disolución de pellets recubiertos con metionina interna, polímero funcional, sulfato de bario y metionina externa.

Para la segunda etapa de fabricación de los pellets, la cual consistió en recubrir los núcleos que contienen metionina y el polímero funcional con otra capa de metionina, se muestran los resultados de la disolución realizada para esta etapa, en donde el valor máximo obtenido para los pellets fabricados con Eudragit[®] S12.5 como polímero funcional fue de 70.3% y para los de Eudragit[®] FS30D de 99.6% (figura 16). Para ver los detalles del porcentaje disuelto vea el anexo 4. La cantidad de metionina que debía cuantificarse en esta etapa del proyecto es de 164 mg/g de pellets para el producto Eudragit[®] FS30D y 119 mg/g de Pellet para Eudragit[®] S12.5.

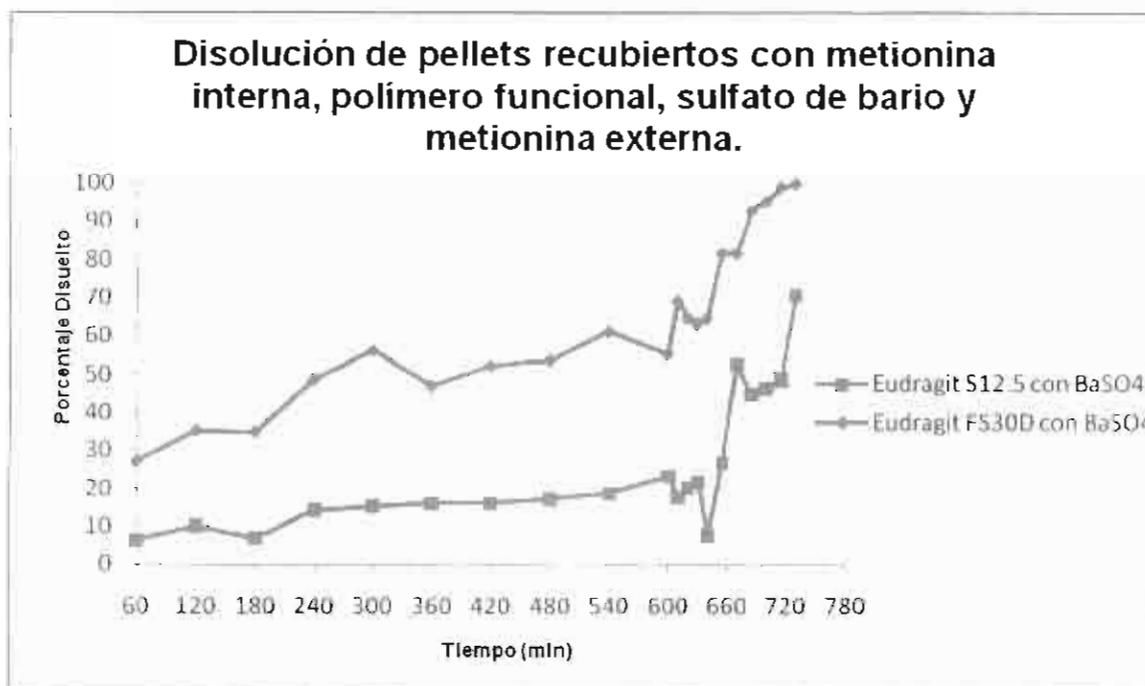


Figura 16: Disolución de pellets recubiertos con metionina interna, polímero funcional, sulfato de bario y metionina externa. Los primeros 600 minutos el pH en la prueba es de 6.0, posteriormente se modifica a pH 4.0 y a los 640 minutos se cambia a pH 7.5.

En el gráfico se puede observar la liberación de la metionina externa en el Eudragit[®] FS30D durante las primeras horas del proceso, sin embargo, también se libera una pequeña cantidad de metionina interna. Pese a esto, se libera por completo toda la metionina cuando se realiza el cambio de pH a básico, mientras que en los pellets recubiertos con Eudragit[®] S12.5, se observa que se libera la metionina externa durante las primeras horas de la disolución y cuando se realiza el cambio de pH se libera el resto de la metionina, sin llegar a hacerlo completamente como se observa en la figura 15, donde se presenta la misma tendencia, en donde no se libera por completo la metionina interna.

Se logró el diseño de un sistema de liberación modificada que tuviera las características de densidad (proporcionada por el sulfato de bario) para que el

pellet fabricado permanezca a nivel de rumen y libere la metionina externa en ese sitio para su aprovechamiento por las bacterias. En este sistema de liberación modificada, el polímero Eudragit[®] FS30D es el adecuado para asegurar que la metionina interna sea liberada hasta la llegada del pellet a nivel intestinal, pudiendo así, ser aprovechada por el animal.

8.8.3. Liberaciones de pellets de metionina con Surelease[®] en el dispositivo ruminal

Al realizar la disolución de los pellets de metionina recubiertos con Surelease[®] en el dispositivo ruminal, se cuantificó como valor máximo el 54.8% a los 640 minutos, como se muestra en la figura 17. Este polímero es de liberación lenta, para los detalles del porcentaje disuelto, vea el anexo 5. El objetivo de realizar este recubrimiento es proteger a la metionina que será dosificada a nivel ruminal, para que sea gradual la liberación y de esta forma, las bacterias presentes en el rumen puedan aprovecharla sin que sea degradada por las condiciones presentes en esta zona. El pellet permanece durante un período largo de tiempo, por lo cual debe liberarse lentamente para que sea completamente aprovechada la metionina por las bacterias.

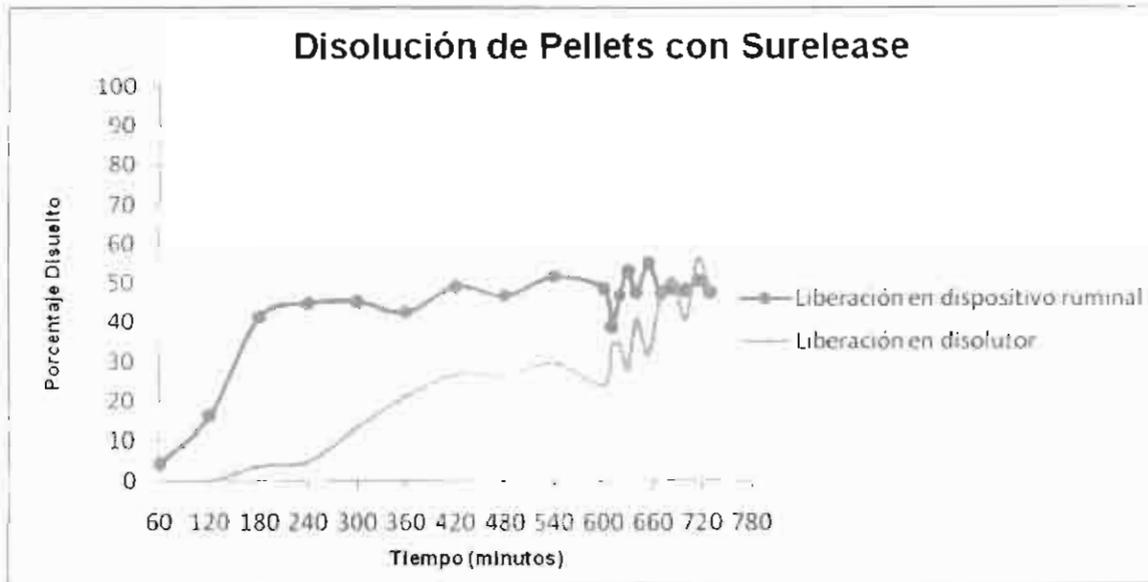


Figura 17: Disolución de pellets con Surelease® en el dispositivo ruminal y disolutor.

En la figura 17 se observa que la forma en la cual se liberó la metionina interna es diferente a la cuantificada cuando se utilizó el disolutor o el dispositivo ruminal, sin embargo, la cantidad cuantificada al final de la prueba es similar en ambos procesos, liberando el 56.2% cuando se utilizó el disolutor (anexo 3) y el 54.8% en el dispositivo ruminal (anexo 5). La forma en la cual se liberó la metionina en el disolutor y en el dispositivo ruminal es diferente debido al movimiento que se presenta en el disolutor y al volumen del medio, que es mayor que el utilizado en el dispositivo ruminal. Además, en el dispositivo ruminal la liberación de la metionina se debe a un proceso de difusión y la toma de la muestra se realiza en el mismo sitio, por lo cual, se cuantifica la metionina que se encuentra en el punto en el cual la aguja está en contacto con el medio.

Por eso, consideramos importante retomar en posteriores proyectos este procedimiento, para comparar el comportamiento de la disolución en este dispositivo y en el disolutor.

Este polímero puede ser utilizado para un posterior recubrimiento al realizado con metionina externa, sulfato de bario, polímero no funcional y talco micronizado,

cuyo objetivo será el dosificar la metionina liberada a nivel de rumen, para que las bacterias presentes en ese sitio puedan utilizarla sin que sea degradada por las condiciones anaerobias del sitio de liberación.

8.9. Análisis Estadístico

Las siguientes figuras muestran el resultado del análisis estadístico de las disoluciones en la primera y segunda etapa del proyecto respectivamente. Se observa el promedio de las disoluciones así como el intervalo de confianza para cada uno de los resultados.

8.9.1. Análisis estadístico para pellets de metionina recubiertos con metionina interna y polímero funcional

El análisis estadístico aplicado a los datos recopilados muestra describe la variabilidad de los datos, en este caso del 85.8% para el Eudragit[®] FS30D, 57.7% para el Eudragit[®] NE30D, 63.6% para el Eudragit[®] S100, 86.3% para Eudragit[®] S12.5 y 84.4% para el Surelease[®]. El comportamiento de la liberación en las disoluciones con los polímeros utilizados es diferente para cada uno de ellos. Esto se debe al proceso de recubrimiento, ya que no se puede asegurar que en cada uno de ellos el recubrimiento sea homogéneo y la liberación de la metionina en cada una de las disoluciones se comporte de la misma forma.

En seguida, se encuentran las ecuaciones para realizar los cálculos estadísticos y determinar el coeficiente de correlación de los datos y en el anexo 6, se encuentran los estimadores de parámetros con los cuales, se determinó que modelo estadístico elegir, así como la significancia estadística ($p < 0.05$).

Eudragit[®] FS30D

$$\% \text{Disuelto} = 11.59503 - 0.0388117 * \text{Tiempo (min)} + 0.0009083 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^2 + 5.2092e-6 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^3 + 6.9771e-9 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^4$$

Eudragit® NE30D

$$\%Disuelto = -14.46594 + 0.0363052 * \text{Tiempo (min)} + 7.0349e-5 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^2$$

Eudragit® S100

$$\%Disuelto = 31.207255 + 0.0631998 * \text{Tiempo (min)} + 9.9537e-5 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^2 + 7.3116e-7 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^3$$

Eudragit® S12.5

$$\%Disuelto = 11.253493 - 0.0064 * \text{Tiempo (min)} + 0.0003671 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^2 + 2.6204e-6 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^3 + 3.9428e-9 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^4$$

Surelease®

$$\%Disuelto = 10.461065 + 0.0334572 * \text{Tiempo (min)} - 2.1278e-5 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^2 + 1.1217e-6 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^3 + 2.3499e-9 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^4$$

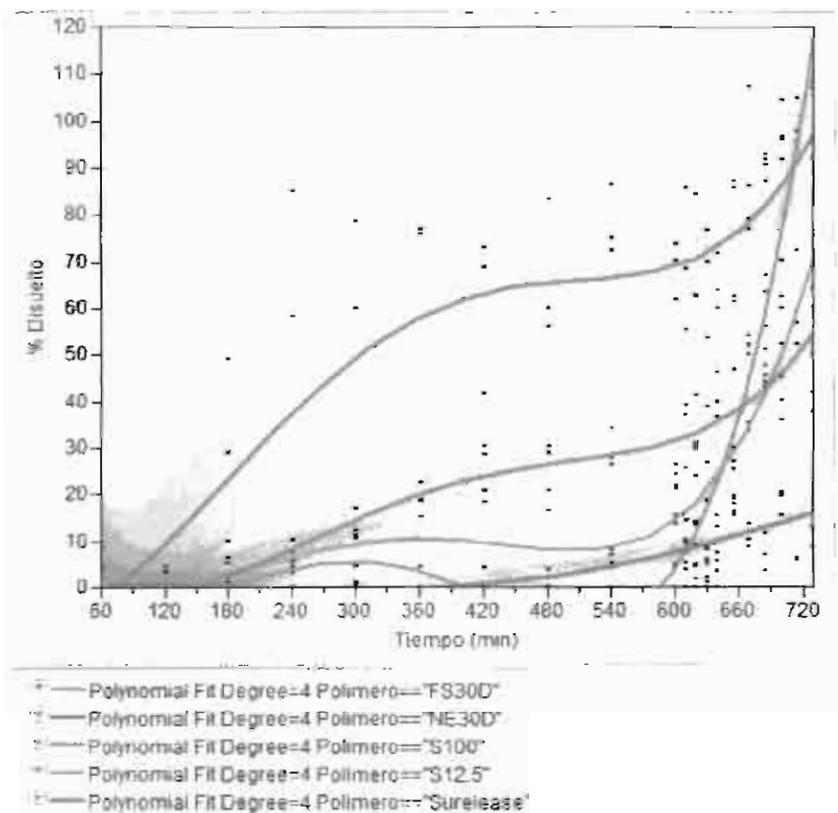


Figura 19: Análisis estadístico realizado para pellets recubiertos con metionina interna y polímero funcional.

8.9.2. Análisis estadístico para pellets con pellets recubiertos con metionina interna, polímero funcional, metionina externa y sulfato de bario.

En el caso de los pellets recubiertos que continuaron con la siguiente etapa, la cual consistió en el recubrimiento con metionina y sulfato de bario, el análisis estadístico explica la variabilidad del 62.2% para los pellets de Eudragit® FS30D y del 69.7% para los pellets recubiertos con Eudragit® S12.5. El comportamiento en cada una de las disoluciones es distinto debido a que en cada una de ellas la forma en la cual se libera la metionina es diferente. No es buena esta variabilidad porque indica que los procesos de recubrimiento no son homogéneos. A continuación, se muestran las ecuaciones para realizar los cálculos en el paquete estadístico y determinar el coeficiente de correlación de los datos. En el anexo 7, se encuentran los estimadores de parámetros con los cuales, se determinó que modelo estadístico seleccionar para cada uno de los polímeros, así como la significancia estadística que presenta cada modelo.

Eudragit® FS30D con metionina externa y sulfato de bario

$$\%Disuelto = 21.645618 + 0.0608361 * \text{Tiempo (min)} + 0.0004434 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^2 + 1.0381e-6 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^3$$

Eudragit® S12.5 con metionina externa y sulfato de bario

$$\%Disuelto = 26.284825 - 0.0237611 * \text{Tiempo (min)} + 0.0002804 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^2 + 2.4894e-6 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^3 + 3.7626e-9 * (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^4$$

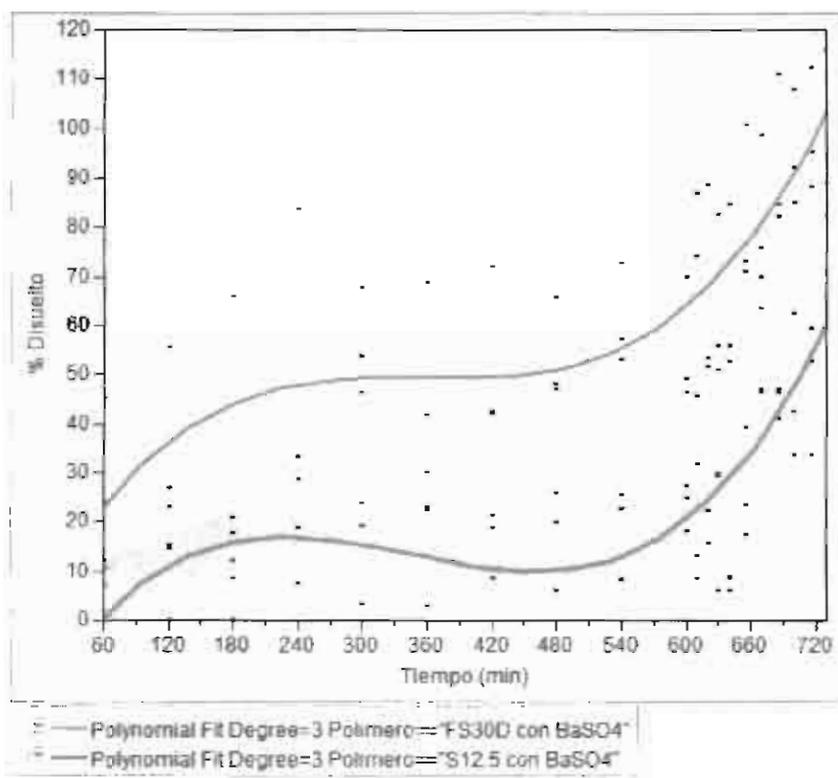


Figura 20: Análisis estadístico realizado para pellets recubiertos con metionina interna, polímero funcional, metionina externa y sulfato de bario.

Los modelos estadísticos que describen los datos obtenidos de los polímeros, presentan una elevada significancia estadística (ver anexo 7), siendo los más adecuados para describir la variabilidad de los datos.

9. CONCLUSIONES

1. El análisis de la metionina cumplió con las especificaciones de la monografía de la FEUM y USP.
2. Los polímeros no muestran degradación en la prueba de digestibilidad *in situ* por lo que son adecuados en la etapa de protección a nivel ruminal.
3. El método analítico muestra que la cuantificación de la metionina utilizando placebo es adecuada, tomando en cuenta los valores de especificidad, linealidad, precisión y exactitud, lo que indica que esta técnica por espectrofotometría UV es adecuada para este proyecto.
4. En el recubrimiento de los núcleos inertes con metionina interna, la eficiencia es adecuada y los procesos no presentaron problemas.
5. Los recubrimientos realizados con los polímeros funcionales Eudragit[®] FS30D y Eudragit[®] S12.5, son los adecuados para proteger la metionina de los cambios de pH hasta su liberación a pH 7.5.
6. El Eudragit[®] FS30D protege la metionina interna de mejor forma que el Eudragit[®] S12.5 en la liberación cuando se mantiene el pH a 6 y 4.
7. Los pellets finales, los cuales contenían la metionina externa y sulfato de bario y que fueron sometidos a la prueba de disolución, mostraron que ambos polímeros protegen la metionina interna, pero el Eudragit[®] S12.5 no libera por completo la metionina interna a diferencia del Eudragit[®] FS30D que sí la libera en su totalidad.
8. Se cuantificó la metionina durante las diferentes etapas del proyecto, al realizarse el recubrimiento de los pellets con metionina interna y los diferentes polímeros funcionales, así como de aquellos seleccionados para

continuar con el siguiente recubrimiento, el cual consistió de metionina externa y sulfato de bario (Eudragit[®] FS30D y Eudragit[®] S12.5).

9. Se logró el diseño del prototipo ruminal el cual, se utilizó para evaluar los pellets con Surelease[®]. Los resultados que se obtuvieron indican que la cantidad de metionina cuantificada en el prototipo ruminal corresponde a la cuantificada utilizando el disolutor, pese a que la liberación se realizó por dos métodos diferentes y el comportamiento en la liberación es diferente.
10. Las condiciones de las pruebas realizadas para evaluar la liberación de la metionina en las diferentes etapas de proyecto son las mismas, simulando las condiciones de pH del tracto gastrointestinal del rumiante. Por lo cual, al realizarse el análisis estadístico, los modelos utilizados para describir la variabilidad de los datos, indican que el grado máximo del modelo es significativo ($p < 0.05$), por lo que se considera adecuado cada modelo para describir la variabilidad de los datos obtenidos en las disoluciones.

10.PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en este proyecto se proponen algunos puntos para dar seguimiento a la investigación:

1. Realizar pruebas *in vitro* utilizando líquido ruminal en el dispositivo ruminal, ya que los polímeros no son degradados por las bacterias ruminales como se describió en la prueba de digestibilidad y el dispositivo favorece las condiciones anaerobias que necesitan las bacterias presentes en el líquido ruminal.
2. Realizar pruebas *in situ* e *in vivo* con los pellets elaborados en este proyecto, debido a que estas condiciones, pueden mostrar cómo será realmente el comportamiento de los pellets en el animal.
3. Utilizar una técnica por cromatografía de líquidos en la cuantificación de la metionina en las diferentes etapas del proyecto y si se realiza la cuantificación *in vivo* o *in situ*, comprobar que es la técnica adecuada para esta cuantificación, realizando su correspondiente validación.

Es importante mencionar que algunas de estas perspectivas ya son estudiadas en otros trabajos realizados en nuestro grupo de investigación.

11. REFERENCIAS

1. Church C. D., 1993. El rumiante: fisiología digestiva y nutrición, Editorial Acribia, España, pp. 1-45.
2. Ludden P., et. al., 1995. Supplemental protein sources for steers fed corn-based diets: I. Ruminal characteristics and intestinal amino acid flows, *J. Anim. Sci.*, 73: 1466-1475.
3. Lara B., et. al., 2003. Degradabilidad ruminal *in situ* e *in vitro* de la metionina protegida, *Téc. Pecu. Méx.*, 41 (1), pp. 91-103.
4. Vandamme Th. F., et. al., 2004. Issues and challenges in developing ruminal drug delivery systems, *Adv. Drug Del. Rev.*, 56: 1415-1436.
5. Abdul S., et. al., 2004. A flexible technology for modified release of drugs: multi layered tablets, *J. Control. Rel.*, 97: 393-405.
6. Rothen-Weinhold A., et. al., 2000. Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals, *Phar. Sci. Technol. Today*, 3 (7): 222-231.
7. Frey A., et. al., 2003. Efecto de la administración oral de DL-metionina protegida sobre la producción y calidad de lana de borregas Merino preñadas en la Patagonia Argentina, *Arch. Latinoam. Prod. Anim.*, 11 (2): 138-142.
8. Aulton M., 2004. Farmacia: Ciencia y diseño de formas farmacéuticas, 2ª ed., ED. Churchill Livingstone, 294-296, 422-443.
9. Gennaro A., 2003. Remington Farmacia, 20ª ed., Tomo 1, Editorial Médica-Panamericana, Argentina: 1036-1039.

10. Rathbone M., 2009. Controlled release drug delivery in farmed animals: commercial changes and academic opportunities, *Curr. Drug. Del.*, 6 (4): 383-390.
11. http://www.books.google.com/books?id=RZ8fvw3XUKcC&pg=PA1&dq=Pellets+sensibles+a+est%C3%ADmulos+para+liberaci%C3%B3n+controlada+de+medicamentos:+reticulaci%C3%B3n+de+matrices+y+formaci%C3%B3n+de+cubiertas+in+situ,+Facultad+de+Farmacia&hl=es&ei=AlUTafbHsOB8gb-0MywCQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCoQ6AEwAA#v=onepage&q=Pellets%20sensibles%20a%20est%C3%ADmulos%20para%20liberaci%C3%B3n%20controlada%20de%20medicamentos%3A%20reticulaci%C3%B3n%20de%20matrices%20y%20formaci%C3%B3n%20de%20cubiertas%20in%20situ%2C%20Facultad%20de%20Farmacia&f=false
Revisado: 07/ENE/11 (18:00)
12. <https://www.colorcon.com/spanish/home> Revisado: 06/ENE/2011 (17:30)
13. <http://www.corporate.evonik.com/en/Pages/default.aspx>
Revisado 06/ENE/2011 (19:45)
14. http://www.solimide.eu/en/pharmapolymers/eudragit/quality/spezifikationen_neu.Par.0001.TRow.0009.TCell.0002.File.tmp/7.1.06_INFO7.6e_NE30D_200409.pdf Revisado: 07/ENE/2010 (15:46)
15. http://www.solimide.eu/en/pharmapolymers/eudragit/quality/spezifikationen_neu.Par.0001.TRow.0015.TCell.0002.File.tmp/7.1.12_INFO7.12e_FS30D_200409.pdf Revisado: 07/ENE/2010 (15:43)
16. Wu S., et. al., 1997. Rumen-stable delivery systems. *Adv. Drug. Del. Rev.*, 28 (3): 323-334.
17. <http://www.fcv.unlp.edu.ar/sitios-catedras/41/material/fisio.pdf>
Revisado: 04/ENE/2011 (18:13) Relling A., et. al., Fisiología digestiva y

metabólica de los rumiantes. Cátedra de Fisiología: Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.L.P, Argentina.

18. <http://www.agro.etsia.upm.es/fedna/capitulos/98CAPIV.pdf>

Torre C. et. al. Utilización de aditivos en rumiantes: Vitaminas y aminoácidos. XIV Cursos de Especialización: Avances en nutrición y alimentación animal. Revisado: 15/OCT/2010 (19:08)

19. Mora B., 2007. Nutrición animal, 3ª reimpresión, ED. EUNED, Costa Rica: 53-54

20. Yang W., et. al., 2010. Effects of rumen-protected methionine on dairy performance and amino acid metabolism in lactating cows, *American J. of Animal and Vet. Sci.* 5 (1): 1-7.

21. Noftsgger S., et. al., 2003. Supplementation of methionine and selection of highly digestible rumen undegradable protein to improve nitrogen efficiency for milk production. *J. Dairy Sci.*, 86:958–969.

22. Mathews C., et. al., 2003. Bioquímica, 3ª ed., ED. Addison Wesley, España, pp. 93, 841-843.

23. Sood A., et. al., 2003. Design of controlled release delivery systems using a modified pharmacokinetic approach: a case study for drugs having a short elimination half-life and a narrow therapeutic index. *Int. J. Pharm.*, 261: 27-41.

24. Bernad M., et. al., 2003. Sistemas de Liberación Controlada de Activos Farmacéuticos, 1ª ed., *Tópicos Selectos de Tecnología Farmacéutica*, México: 7-17.

25. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), 2007. Secretaria de salud, 9ª ed., México, p. 1130.

26. http://www.books.google.com.mx/books?id=sJi_t9m0IIIEC&pg=PA59&dq=POLIMEROS+EUDRAGIT+LIBERACION+CONTROLADA+DE+FARMACOS&hl=es&ei=8KloTdDxMsSblgfJI4C1AQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=2&ved=0CCoQ6AEwAQ#v=onepage&q&f=false Revisado: 08/ENE/2010 (13:05)
- Sá Barreto L., Tesis de doctorado: Utilidad de algunos copolímeros acrílicos para el control de liberación de fármacos en pellets matriciales elaborados por extrusión-esferonización Facultad de Farmacia, España (Universidad de Santiago de Compostela): 3,5,8. Revisado:07/ENE/2011 (18:00)
27. Waterman R.C., et. al., 2007. Supplemental methionine and urea for gestating beef cows consuming low quality forage diets, *J. Anim. Sci.*, 85: 731-736.
28. The Merck Index, 2001. CambridgeSoft Meck, 30ª ed., USA.
29. The United States Pharmacopeia (USP 30 NF 25), 2007, USA, p. 2609.
30. Rymer C., et. al., 2005. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Sci. Techn.*, 123-124: 9-30.
31. Moore S., et. al., 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds, *J. Biol. Chem.*, 907-913.
32. Validación de Métodos Analíticos (Guía del CIPAM), 2002, Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 1ª ed.
33. Hernández E., et. al., 2007. Caracterización de alcohol polivinílico usado en recubrimiento de base acuosa, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38 (2): 15-25.

34. Jump 8.0, 2008. A guide to statistical and data analysis using JMP® and JMP IN® software, SAS Institute, ED. Duxbury, USA.

ANEXO 1

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

LABORATORIO DE FARMACOTECNIA



INFORME DE CONTROL DE CALIDAD PARA METIONINA

Prueba	Especificación	Resultado
Identificación IR	La identificación al IR de la muestra corresponde a la Referencia	Cumple
Rotación Específica	Entre +22.4° y +24.7°	+23.0°
pH	Entre 5.6 y 6.1	6.0
Pérdida por Secado	No menos de 0.3%	0.0%
Residuo de Ignición	No más del 0.4%	0.0%
Cloruros	0.75 g de muestra no contienen más de 0.05% de cloruros	Cumple
Sulfatos	0.33 g de muestra no contiene más de 0.03% de sulfatos	Cumple
Punto de Fusión	280°C – 282°C	280°C
Metales Pesados	Menos de 0.0015%	0.0%
Pureza Cromatográfica	Cualquier mancha secundaria en el cromatograma obtenido en la solución de la muestra no es más grande ni más intensa que la mancha principal obtenida en el cromatograma obtenida con la solución de Referencia, lo que equivale a no más de 0.5% de impurezas individuales y no más de 2.0% de impurezas totales.	Cumple
Valoración	98.5% - 101.5% en b.s.	99.52% b.s.

Referencias:

- 1) Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), 2007. Secretaría de salud, 9ª ed., México: 1130.
- 2) The United States Pharmacopeia (USP 30 NF 25), 2007, USA, p. 2609.

Analista

Q.F.B. Irvin Fabian Bonola Gallardo

ANEXO 2

Peso de los núcleos inertes= 100.3 g

Número de Malla	Peso de la malla vacía (g)	Peso Final (g)	Diferencia (Malla con muestra – Vacía) (g)	Peso Acumulado (g)	Porcentaje Individual	Porcentaje Acumulado
10	475.8	475.8	0	0	0	0
12	455.0	455.0	0	0	0	0
14	429.8	430.4	0.6	0.6	0.5982	0.5982
16	407.7	476.1	68.4	69.0	68.1954	68.7936
18	392.6	422.9	30.3	99.3	30.2093	99.0029
20	396.3	397.1	0.8	100.1	0.7976	99.8005
30	377.0	377.1	0.1	100.2	0.0997	99.9002
Base	283.7	283.8	0.1	100.1	0.0997	99.9999
Promedio=					99.9999%	99.9999%

Tabla 12: determinación del tamaño de partícula de los núcleos inertes.

ANEXO 3

Tiempo (min)	Eudragit [®] S12.5	Eudragit [®] FS30D	Eudragit [®] S100	Eudragit [®] NE30D	Surelease [®]
60	5.7	0.8	1.4	0.0	0.0
120	3.1	1.2	1.0	0.0	0.0
180	3.5	2.1	26.0	0.0	3.7
240	6.1	1.8	47.7	0.0	4.9
300	7.1	1.5	46.2	0.3	13.5
360	10.0	1.5	51.0	0.0	21.3
420	12.2	1.5	61.3	0.0	26.7
480	12.3	1.3	66.4	0.0	26.7
540	6.2	1.8	78.0	8.0	29.6
600	18.7	1.6	68.5	8.1	24.1
610	12.2	1.3	69.8	8.4	34.0
620	22.3	3.1	69.9	8.3	34.1
630	6.7	2.4	66.8	6.0	28.1
640	17.0	1.2	65.2	12.0	40.9
655	33.9	44.1	69.9	16.6	31.9
670	39.7	64.0	87.8	10.9	47.3
685	44.9	72.7	91.7	7.5	50.9
700	60.9	88.7	81.6	18.5	40.5
715	58.5	99.3	87.5	9.2	56.2
730	63.1	99.3	99.1	19.9	48.5

Tabla 13: Resultados de la disolución de núcleos inertes con metionina en la primera etapa del proyecto, la cual incluye el recubrimiento con el polímero funcional. La tabla muestra el porcentaje disuelto por polímero a un determinado tiempo.

ANEXO 4

Tiempo (min)	Eudragit® S12.5	Eudragit® FS30D
60	6.2	27.1
120	9.9	35.1
180	6.8	34.8
240	14.2	48.5
300	15.2	56.0
360	16.1	46.9
420	16.1	52.1
480	17.2	53.6
540	18.7	61.0
600	23.3	55.0
610	17.7	68.8
620	20.1	64.5
630	21.6	63.1
640	7.7	64.4
655	26.7	81.5
670	52.2	81.4
685	44.7	92.5
700	46.2	94.9
715	48.5	98.7
730	70.3	99.6

Tabla 14: Resultados de la disolución de núcleos inertes con metionina en la segunda etapa del proyecto, en donde se recubre nuevamente con metionina. Los resultados en la tabla muestran el porcentaje disuelto a un determinado tiempo.

ANEXO 5

Tiempo (min)	Porcentaje disuelto
60	4.3
120	16.3
180	41.2
240	44.7
300	45.2
360	42.4
420	49.0
480	46.7
540	51.4
600	48.4
610	38.8
620	46.6
630	52.9
640	47.2
655	54.8
670	47.1
685	48.7
700	48.0
715	50.4
730	47.5

Tabla 15: Resultados de la disolución de núcleos inertes con metionina recubiertos con Surelease® en el dispositivo ruminal

ANEXO 6: Análisis Estadístico de pellets recubiertos con metionina interna y polímero funcional

▼ Polynomial Fit Degree=4 Polimero=="FS30D"

% Disuelto = 11.59503 - 0.0388117 *Tiempo (min) +
 0.0009083 * (Tiempo (min)-497.75)^2 + 5.2092e-6 * (Tiempo
 (min)-497.75)^3 + 6.9771e-9 * (Tiempo (min)-497.75)^4

▼ Summary of Fit

RSquare	0.867746
RSquare Adj	0.858127
Root Mean Square Error	14.33904
Mean of Response	24.565
Observations (or Sum Wgts)	60

▶ Lack Of Fit

▼ Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	4	74196.990	18549.2	90.2165
Error	55	11308.447	205.6	Prob > F
C Total	59	85505.437		<.0001*

▼ Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	11.59503	17.47474	0.66	0.5098
Tiempo (min)	-0.038812	0.031681	-1.23	0.2258
(Tiempo (min)-497.75)^2	0.0009083	0.000142	6.38	<.0001*
(Tiempo (min)-497.75)^3	5.2092e-6	6.738e-7	7.73	<.0001*
(Tiempo (min)-497.75)^4	6.9771e-9	1.66e-9	4.20	<.0001*

▼ Polynomial Fit Degree=2 Polimero=="NE30D"

$$\% \text{ Disuelto} = -14.46594 + 0.0363052 \cdot \text{Tiempo (min)} + 7.0349e-5 \cdot (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^2$$

▼ Summary of Fit

RSquare	0.591507
RSquare Adj	0.577174
Root Mean Square Error	4.890788
Mean of Response	6.683333
Observations (or Sum Wgts)	60

▶ Lack Of Fit

▼ Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	2	1974.2743	987.137	41.2686
Error	57	1363.4290	23.920	Prob > F
C. Total	59	3337.7033		<.0001*

▼ Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	-14.46594	2.824692	-5.12	<.0001*
Tiempo (min)	0.0363052	0.004258	8.53	<.0001*
(Tiempo (min)-497.75)^2	7.0349e-5	1.856e-5	3.79	0.0004*

▼ Polynomial Fit Degree=3 Polimero=="S100"

$$\% \text{ Disuelto} = 31.207255 + 0.0631998 \cdot \text{Tiempo (min)} + 9.9537e-5 \cdot (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^2 + 7.3116e-7 \cdot (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^3$$

▼ Summary of Fit

RSquare	0.654978
RSquare Adj	0.636494
Root Mean Square Error	18.99422
Mean of Response	61.84333
Observations (or Sum Wgts)	60

▶ Lack Of Fit

▼ Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	3	38353.955	12784.7	35.4361
Error	56	20203.712	360.8	Prob > F
C. Total	59	58557.667		<.0001*

▼ Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	31.207255	13.45486	2.32	0.0240*
Tiempo (min)	0.0631998	0.025756	2.45	0.0173*
(Tiempo (min)-497.75)^2	9.9537e-5	0.000131	0.76	0.4507
(Tiempo (min)-497.75)^3	7.3116e-7	3.886e-7	1.88	0.0651

▼ Polynomial Fit Degree=4 Polimero=="S12.5"

% Disuelto = 11.253493 - 0.0064 *Tiempo (min) +
 0.0003671*(Tiempo (min)-497.75)^2 + 2.6204e-6*(Tiempo
 (min)-497.75)^3 + 3.9428e-9*(Tiempo (min)-497.75)^4

▼ Summary of Fit

RSquare	0.8726
RSquare Adj	0.863335
Root Mean Square Error	7.63861
Mean of Response	22.205
Observations (or Sum Wgts)	60

▶ Lack Of Fit

▼ Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	4	21980.509	5495.13	94.1779
Error	55	3209.150	58.35	Prob > F
C. Total	59	25189.658		< 0.0001*

▼ Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	11.253493	9.309041	1.21	0.2319
Tiempo (min)	-0.0064	0.016877	-0.38	0.7060
(Tiempo (min)-497.75)^2	0.0003671	7.58e-5	4.84	< 0.0001*
(Tiempo (min)-497.75)^3	2.6204e-6	3.589e-7	7.30	< 0.0001*
(Tiempo (min)-497.75)^4	3.9428e-9	8.84e-10	4.46	< 0.0001*

▼ Polynomial Fit Degree=4 Polimero=="Surelease"

$$\% \text{ Disuelto} = 10.461065 + 0.0334572 \cdot \text{Tiempo (min)} - 2.1278e-5 \cdot (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^2 + 1.1217e-6 \cdot (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^3 + 2.3499e-9 \cdot (\text{Tiempo (min)} - 497.75)^4$$

▼ Summary of Fit

RSquare	0.855207
RSquare Adj	0.844676
Root Mean Square Error	6.84351
Mean of Response	28.15167
Observations (or Sum Wgts)	60

► Lack Of Fit

▼ Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	4	15213.980	3803.50	81.2129
Error	55	2575.849	46.83	Prob > F
C. Total	59	17789.830		< .0001*

▼ Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	10.461065	8.340066	1.25	0.2150
Tiempo (min)	0.0334572	0.01512	2.21	0.0311*
(Tiempo (min)-497.75) ²	-2.128e-5	0.000068	-0.31	0.7552
(Tiempo (min)-497.75) ³	1.1217e-6	3.216e-7	3.49	0.0010*
(Tiempo (min)-497.75) ⁴	2.3499e-9	7.92e-10	2.97	0.0045*

ANEXO 7: Análisis Estadístico de pellets recubiertos con metionina interna, polímero funcional, metionina externa y sulfato de bario

▼ Polynomial Fit Degree=3 Polimero=="FS30D con BaSO4"

% Disuelto = 21.645618 + 0.0608361 *Tiempo (min) + 0.0004434*(Tiempo (min)-497.75)^2 + 1.0381e-6*(Tiempo (min)-497.75)^3

▼ Summary of Fit

RSquare	0.64211
RSquare Adj	0.622937
Root Mean Square Error	15.78233
Mean of Response	63.97667
Observations (or Sum Wgts)	60

▼ Lack Of Fit

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Lack Of Fit	16	1548.547	96.784	Prob > F
Pure Error	40	12400.033	310.001	0.9927
Total Error	56	13948.580		Max RSq 0.6818

▼ Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	3	25025.927	8341.98	33.4909
Error	56	13948.580	249.08	Prob > F
C. Total	59	38974.507		<.0001*

▼ Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	21.645618	11.17966	1.94	0.0579
Tiempo (min)	0.0608361	0.0214	2.84	0.0062*
(Tiempo (min)-497.75)^2	0.0004434	0.000109	4.07	0.0001*
(Tiempo (min)-497.75)^3	1.0381e-6	3.229e-7	3.22	0.0022*

▼ Polynomial Fit Degree=4 Polimero=="S12.5 con BaSO4"

% Disuelto = 26.284825 - 0.0237611*Tiempo (min) +
 0.0002804*(Tiempo (min)-497.75)² + 2.4894e-6*(Tiempo
 (min)-497.75)³ + 3.7626e-9*(Tiempo (min)-497.75)⁴

▼ Summary of Fit

RSquare	0.718468
RSquare Adj	0.697992
Root Mean Square Error	10.48263
Mean of Response	24.97
Observations (or Sum Wgts)	60

▶ Lack Of Fit

▼ Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio
Model	4	15423.462	3855.87	35.0898
Error	55	6043.704	109.89	Prob > F
C. Total	59	21467.166		< 0.001*

▼ Parameter Estimates

Term	Estimate	Std Error	t Ratio	Prob> t
Intercept	26.284825	12.775	2.06	0.0444*
Tiempo (min)	-0.023761	0.02316	-1.03	0.3094
(Tiempo (min)-497.75) ²	0.0002804	0.000104	2.70	0.0093*
(Tiempo (min)-497.75) ³	2.4894e-6	4.926e-7	5.05	<.0001*
(Tiempo (min)-497.75) ⁴	3.7626e-9	1.213e-9	3.10	0.0030*