

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

DISEÑO Y FARMACOCINÉTICA DE UN SISTEMA MATRICIAL DE HICLATO DE
DOXICICLINA DE LIBERACIÓN PROLONGADA EN BECERROS.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

DINORAH VARGAS ESTRADA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. HÉCTOR SUMANO LÓPEZ

COMITÉ TUTORAL

DR. JESÚS GRACIA MORA

DR. ALEJANDRO VILLA GODOY



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mis padres por su ternura y cariño.

A Ivan Juárez por su apoyo incondicional, su confianza y motivación.

A mis mascotas, un remanzo de paz, tranquilidad y cariño.

Agradecimientos

A CONACYT y DGEP por el apoyo económico otorgado para lograr la realización de mi posgrado.

Al laboratorio PARFARM SA de CV, por el apoyo financiero y algunos de los componentes del formulado diseñado en este trabajo.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por brindarme un espacio para lograr mi superación académica y profesional.

A todos los compañeros del Departamento de Fisiología y Farmacología por su ayuda, principalmente a Luis, Jeny y Agustín.

Al Centro de Enseñanza, Práctica, Investigación en Producción y Salud Animal (CEIPSA) y Al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agro-Silvo Pastoril. CEIEPASP por brindarme un espacio para el desarrollo experimental de campo.

Al MC Francisco Gonzáles Aviña y MVZ Juan Carlos Jacinto por sus atenciones y ayuda brindadas para la realización de la parte experimental de campo.

Al Dr. Héctor Sumano por guiarme en esta investigación.

A la Dra. Norma Gonzáles Monzón por su asesoría y apoyo en la parte química, por sus críticas y consejos en la revisión de la tesis.

A la Dra. Lilia Gutiérrez Olvera por sus consejos

A la Dra. María José Bernad Bernad por su asesoría en la parte química.

Al Dr Fernando Osnaya Gallardo por sus críticas y consejos en la revisión de la tesis.

CONTENIDO

I- Resumen

II- Abstract

III- Planteamiento del problema

1.Introducción

1.1 Clasificación farmacodinámica de los antibióticos

1.2 Hiclato de doxiciclina

1.2.1 Actividad antimicrobiana

1.2.2 Mecanismo de acción

1.2.3 Resistencia

1.2.4 Características químicas

1.2.5 Farmacocinética

1.2.5.1 Absorción

1.2.5.2 Distribución

1.2.5.3 Biotransformación y eliminación

1.2.6 Toxicidad y efectos adversos

1.3 Sistemas de liberación prolongada de medicamentos

1.3.1 Las ciclodextrinas (CD) como sistemas de liberación

1.3.2 Los polímeros como sistemas de liberación modificada

1.3.2.1. Carbopol

1.3.2.2 Poloxámero

1.3.2.3 Chitosan

1.4. Justificación

2-Hipótesis

3-Objetivo general

4-Objetivos particulares

5- Justificación

6-Material y métodos

6.1 Fase I de investigación

Protocolo de preformulación:

6.1.1Definición y perfil del proyecto

- 6.1.2 Estudio de factibilidad
- 6.1.3 Preformulación
- 6.1.4 Formulación
- 6.1.5 Estabilidad
- 6.2 Fase 2 de laboratorio
 - 6.2.1 Ciclodextrinas. Elaboración del complejo de inclusión
 - 6.2.2 Preparación del poloxámero-inyectable
 - 6.2.3 Preparación del carbopol-inyectable
 - 6.2.4 Preparación de chitosan-inyectable
- 6.3. Fase 3 de campo
 - 6.3.1 Evaluación de la toxicidad de hclato de doxiciclina
 - 6.3.2 Análisis de la concentración de doxiciclina por el método espectofotometría UV-visible
 - 6.3.3 Análisis para la evaluación microbiológica
 - 6.3.4 Elección de un preparado de liberación controlada
- 7. Artículos científicos publicados y/o aceptados derivados de DOX-h-LA
- 8. Discusión y Conclusiones
- 9- Cuadros
- 10-Figuras
- 11-Anexos
- 12-Glosario de términos
- 13-Referencias bibliográficas

Palabras clave: Farmacocinética, becerros, diseño farmacéutico, doxiciclina

12- Glosario de términos

AUC = Área bajo la curva

$AUC_{0-\infty}$ = Área bajo la curva al infinito

AUC_{ss} = Área bajo la curva al estado estable

MRT = Tiempo medio de residencia

A_1 = Intercepto de la fase de distribución

B_1 = Intercepto de la fase de eliminación

alpha, α = Coeficiente de la constante de la fase de distribución

beta, β = Coeficiente de la constante de la fase de eliminación;

K_{12} = El índice de transferencia del primer compartimento a el segundo compartimento;

K_{21} = El índice de transferencia del segundo compartimento a el primer compartimento;

$T_{1/2\beta}$ = Tiempo de la vida media de eliminación;

$T_{1/2ab}$ = Tiempo de la vida media de absorción;

K_{el} = Constante de eliminación;

K_{ab} = Constante de absorción;

C_{max} = Pico de concentración,

T_{max} = Tiempo máximo en que ocurre el pico de concentración;

Cl_B = Depuración corporal;

F = Biodisponibilidad,

F = Biodisponibilidad corregida (considerando la vida media de eliminación).

CMI = Concentración mínima inhibitoria

DOX-h = Doxiciclina hclato

DOX-h-LA = Doxiciclina hclato de larga acción

CD = Ciclodextrina

CI = Complejo de Inclusión

PK = Farmacocinética

PD = Farmacodinamia

IV, SC, IM, PO = Administración endovenosa, subcutánea, intramuscular y oral

I- RESUMEN

Hiclato de doxiciclina se considera un antibiótico tiempo-dependiente, por lo que un diseño parenteral de larga acción podría tener mayor validez farmacológica para este fármaco en rumiantes. Se diseñó un formulado parenteral inyectable, con un vehículo formado por una matriz de poloxámero y beta-ciclodextrina (DOX-h-LA). Después de las pruebas de difusión in vitro se investigó el perfil de las concentraciones séricas y tisulares vs tiempo en ratas Wistar inoculadas con DOX-h-LA por vía subcutánea en dosis de 10 mg/kg. El promedio del índice entre la concentración pulmón:suero varió en un rango de 1.1:1 hasta 9.4:1 en un periodo de 24 h. El análisis histopatológico del sitio de inyección, no muestra toxicidad por lo que se probó en rumiantes. Se midió el perfil de las concentraciones séricas vs tiempo para DOX-h-LA en becerros, y se compararon con los obtenidos con doxiciclina diluida en agua destilada administrada por vía intramuscular (DOX-h-IM) y endovenosa (DOX-h-IV). La biodisponibilidad obtenida con DOX-h-LA fue de 602% y de 115% para DOX-h-IM. La concentración sérica máxima para DOX-h-LA fue de 2.0 µg/mL en un tiempo máximo alcanzado de 25 h, para DOX-h-IM de 2.9 µg/mL y 4.5 h. La vida media de eliminación fue de 40.81 para DOX-h-LA; de 9.56 h para DOX-h-IM y 5.8 para DOX-h-IV. El intervalo de dosificación se calculó tomando en consideración la concentración mínima de inhibición bacteriana en suero de 0.5 µg/mL, donde: para DOX-h-LA fue de 80 h y con los preparados acuosos DOX-h-IV y DOX-h-IM de 9.7 h y de 17 h, respectivamente. Similares resultados farmacocinéticos fueron obtenidos en cabras. Otros estudios como el análisis de residuos se podrían garantizar la incorporación de este preparado al tratamiento antibacterial en rumiantes, sin embargo ya se puede contar con un preparado parenteral cuyo intervalo de dosificación es de 72 h.

II- ABSTRACT

Considering doxycycline-hyclate as a time-dependant antibacterial drug, a parenteral long-acting formulation becomes a pharmacologically sound design for this drug in ruminants. To achieve this end a poloxamer-based matrix/beta-cyclodextrine vehicle was designed as an injectable preparation (DOX-h-LA). After *in vitro* drug diffusion testing, serum and tissue concentrations vs. time profiles were investigated in Wistar rats after the SC injection of 10 mg/kg of DOX-h-LA. Mean lung:serum ratios ranged from 1.1:1 shortly after injection to 9.4:1 towards a 24 h period and no tissue adverse effects were seen after histopathological analysis of injection sites. This encourage studies in ruminants. Serum concentrations vs. time profiles for DOX-h-LA in calves, were compared to the corresponding ones obtained with an aqueous formulation of DOX-h (IM [Dox-hIM] and IV [Dox-hIV]). The bioavailability for DOX-h-LA was of 602% and 115% for DOX-h-IM. Maximum serum concentration (C_{max}) value was 2.0 µg/mL with a time to reach C_{max} (T_{max}) of 25 h with Dox-h-LA, and 2.9 h for DOX-h-IM. The elimination half-life for DOX-h-LA was 40.81 h; and 9.56 h for DOX-h-IM and 5.8 for DOX-h-IV. Dosing interval for doxyxycline as calculated by considering minimal inhibitory concentrations (CMI) of 0.5 µg/mL were: 80 h for DOX-h-LA, and only 9.7 h and 17 h for Dox-h-IV and Dox-h-IM, respectively. Similar pharmacokinetic data was also obtained when injecting Dox-h-LA in goats. Further studies, such as drug residue analysis are warranted to incorporate this preparation for the treatment of antibacterial infections in ruminants. Yet, it is encouraging to report that this is the first long-acting preparation available world-wide and that it can be injected every 72 h and achieve drug concentrations above the CMI.

III. Planteamiento del problema

Generar una nueva opción antimicrobiana parenteral para rumiantes, de costo razonable y diseño farmacéutico-farmacológico ideal en términos de su farmacodinamia-farmacocinética.

Elección. Doxiciclina (DOX-h), en función de que es hasta 60 veces más potente que oxitetraciclina (OXT), que es el inyectable más vendido en Latinoamérica y México. Tiene una distribución elevada, incluso a nivel intracelular, presenta menos resistencia bacteriana, dado que ingresa a las bacterias y protozoarios por difusión simple a diferencia de la OXT que lo hace por transporte activo. Es útil contra una amplia gama de patógenos: *Salmonella sp*, *Staphylococcus sp*, *Streptococcus sp*, *Proteus sp*, *Pasteurella sp*, *Actinobacillus sp*, cepas resistentes de *Anaplasma sp* y otras rickettsias y protozoarios.

Reto. Igual que otras tetraciclinas, es un antibiótico tiempo-dependiente. Por ello el preparado ideal debe permanecer en el organismo el mayor tiempo posible, es decir debe ser un preparado de larga acción (LA). La DOX-h es muy irritante por vía IM o SC, por lo que se debe recubrir y/o bloquear esta propiedad indeseable. Se busca generar al inicio una concentración de carga y luego una concentración estable por muchas horas. Es muy inestable cuando se le cambia el pH y no debe generar residuos peligrosos o debe implementarse una forma de saber si el animal puede incorporarse a la cadena alimenticia.

Logro. Se cuenta ya con DOX-h-LA que tiene una duración de concentraciones eficaces en el plasma de 72-96 h y se logran concentraciones pulmonares promedio de 4 veces mayores a las plasmáticas. Se ha logrado que se obtenga una rápida carga plasmática y después un período prolongado en “estado estable”, lo que resulta ideal para el efecto de este antibiótico tiempo-dependiente. No es irritante y genera en el sitio de inyección una protuberancia (no inflamatoria, solo una masa ocupativa) que desaparece hasta los 30 días, lo que indica al usuario el tiempo de retiro al rastro. El preparado es estable y requiere un mínimo de equipamiento para su manufactura.

Dado el entorno comercial y tecnológico globalizado, México debe enfrentarse al reto de elevar su tecnología farmacéutica, poco se puede hacer a estas alturas en la síntesis de principios activos, países como China e India, son líderes en este rubro y marcan la pauta y los precios a nivel mundial de los genéricos, es inminente la llegada de dichos países para conquistar nuestro mercado. La propuesta de DOX-h-LA que se presenta en este trabajo pretende enarbolar la idea de que en México se pueden realizar diseños farmacéuticos farmacológicamente congruentes y con tecnología de punta. No existe en el mundo otra DOX-h de LA, el diseño de DOX-h-LA es único y su incorporación a la práctica veterinaria puede marcar un nuevo rumbo en la manera en la que se desarrolla la industria farmacéutica veterinaria en México.

1- Introducción

Se ha sugerido que el uso indiscriminado de los antibacterianos para el control o eliminación de las enfermedades ha propiciado el desarrollo de fenómenos de resistencia bacteriana hacia éstos medicamentos, lo que reduce o anula su eficacia clínica.^{1,3} Por esta razón, se convierten las infecciones potencialmente curables, en severas, lo que evidentemente se traduce en enormes pérdidas económicas. Aunque se ha pretendido limitar su uso para retardar la aparición de resistencias, poco se ha logrado, ya que según Burns, 1995⁴ y Heinemann *et al*, 2000⁵ un antibiótico no induce resistencia, solamente selecciona, es una interferencia en el proceso de selección natural. Proceso en el cual, se seleccionan las bacterias más aptas para la supervivencia en el sitio del organismo del que se trate, en presencia del antibacteriano, sobrevivirán solamente aquellas variantes capaces de resistir a las concentraciones de antibiótico presentes en ese lugar. Sin embargo, esto no implica que, con el uso racional de los antimicrobianos, no se pueda limitar al máximo la emergencia de resistencias. Es claro pensar, que, si los antibacterianos se utilizaran, en todos los casos, en forma racional, las resistencias serían mucho más raras de lo que efectivamente son. A continuación se presenta un breve listado de posibles causas del fracaso de un antibiótico: Uso de antibióticos cuando no son necesarios, la dosis incorrecta, cuando no se cumple con el intervalo entre dosis, la duración del tratamiento y el uso de medicamentos de mala calidad.

Esta problemática ha obligado a la industria farmacéutica a introducir nuevas opciones antibacterianas, a combinar los fármacos o a rediseñarlos.⁶⁻⁹ No obstante, el impulso por encontrar alternativas antibacterianas se ha visto frenado en los últimos 30 años, debido a dos factores: el primero, la introducción de más severas reglamentaciones a que son sometidos los nuevos medicamentos, aumentando así la duración de las tareas de investigación. Segundo, una creciente dificultad para investigar nuevos principios activos y los consecuentes cambios en los campos terapéuticos explorados por la industria y en la metodología utilizada en la investigación¹⁰⁻¹³ Estos dos factores provocan un incremento en los costos, así en el período de 1960 a 1980 se estimó que el costo para generar un nuevo fármaco se había elevado 20 veces^A. Para mediados de 1985, la inversión

^AInstituto Nacional Estadística, Geografía e Informática. INEGI.<http://dgenesyp.INEGI.gob.mx/cgi.win/bdi.exe> 05/16/03

ascendía a 150 millones de dólares y para el 2000 hasta 265 millones de dólares. Por otro lado, antes de 1962 un programa típico de investigación requería de 2 a 3 años y para el 2000 se requirió como promedio de 7-10 años ^B y con un elevado riesgo científico-financiero, ya que aunque un antimicrobiano tuviera un excelente actividad biocida tendrá que ser inocuo para el medio ambiente, demostrar que no tiene efecto mutagénico, carcinogénico, genotóxico, teratogénico ni embriotóxico ^{C,14,15}. Deberá ser fácilmente detectado por métodos cromatográficos en tejidos animales al tiempo en que se elimine con relativa rapidez. No deberá promover la generación de cepas resistentes de otras bacterias aparte de la que es objeto de trabajo. Pero además deberá haber salvado el obstáculo de no ser útil para el ser humano, de otra manera ya no podrá ingresar al ámbito veterinario ^{1,16}.

Con base en lo expuesto, para muchos laboratorios veterinarios, el riesgo financiero que representan los costos de seguir toda la metodología ya descrita puede resultar incompatible con su persistencia en el mercado. De tal suerte, no es extraño, que en los últimos 20 años no se haya generado ninguna familia novedosa para medicina veterinaria. Ejemplos notables del desarrollo de últimos antimicrobianos incluyen a las cefalosporinas de 3ª. Generación y las fluoroquinolonas.

No obstante, el último antibacteriano diseñado exclusivamente para uso veterinario, la enrofloxacin está sujeta a revisión de su uso, en muchos países ¹⁶: En contraste, en América Latina se ha recurrido a la adopción de medicamentos que han resultado útiles en otra especie, sin llevar a cabo las pruebas necesarias para su adaptación farmacológica, su aprobación en cuanto a seguridad y efectividad. Esta situación unida a la resistencia bacteriana provoca a corto plazo una falta total de tratamientos eficaces contra algunos agentes patógenos. No es suficiente extrapolar a veterinaria los preparados comerciales de los seres humanos o incluso de otras especies. Por lo que en la actualidad, está siendo blanco de las regulaciones de la Comunidad Europea (EMEA) y Estados Unidos (FDA). La FDA hace énfasis en la falta de estudios de biodisponibilidad (F) de muchos

^B Camara Nacional de la Industria Farmacéutica <http://www.canifarma.org.mx> 05/04/03

^C Food and Drug Administration. FDA. <http://www.fda.gov/eder/handbook> 13/01/03

antibacterianos de uso común en medicina veterinaria; pondera que las dosificaciones parenterales no pueden ser extrapoladas entre especies, ya que las variaciones de absorción, distribución, biotransformación y excreción llegan a diferir enormemente aún dentro de los mismos rumiantes.

Cabe mencionar que en particular los estudios de farmacocinética en rumiantes son escasos; solamente el 22% de las publicaciones de farmacocinética en veterinaria a nivel mundial corresponden a los rumiantes y obvia decir que los parámetros farmacocinéticos son indispensables para establecer las dosis correctas y los regímenes de dosificación adecuados, considerando datos clave como el conocimiento bacteriológico del problema, la susceptibilidad del agente etiológico presuntivo, la biodisponibilidad del antimicrobiano a sistema y a órgano o tejido para determinar que se logren las concentraciones terapéuticas de acuerdo a las propiedades farmacológicas del grupo de antibacteriano (tiempo dependiente o concentración dependiente)¹⁶

Para resolver la adecuación de muchos antibacterianos en la medicina veterinaria, se ha comentado que existen muchos preparados antimicrobianos cuyo diseño farmacéutico podría ser mejorado¹⁷. De hecho, se han modificado radicalmente los medios para desarrollar nuevos fármacos, y hay un auge en el diseño farmacológico de moléculas ya existentes en el mercado, generando nuevas formulaciones que permiten una liberación controlada o sostenida mediante la manipulación de los vehículos.^{18,19}

Estas formulaciones se han convertido en elementos de gran utilidad en medicina veterinaria, ya sea para uso metafiláctico o terapéutico. Permiten con una sola administración mantener concentraciones antibacterianas adecuadas durante largos periodos más compatibles con el manejo moderno de hatos de rumiantes. La liberación sostenida (LS) tiene grandes ventajas frente a las formulaciones convencionales, dentro de las que se podrían mencionar la reducción de efectos adversos, disminución del estrés por manejo, disminución de los costos por manejo, terapias antibacterianas adecuadas en tiempo y concentraciones, mejora de la actividad terapéutica de las sales existentes y disminución de la presentación de resistencias bacterianas algunas de las desventajas de

los preparados LS incluyen: El conocimiento del sitio específico de absorción, potencial presencia de residuos tisulares, reacciones en tejidos, inyectabilidad del producto y su retención en el sitio de aplicación, estabilidad del producto y procesos de manufactura.

En medicina humana como en veterinaria, se han introducido preparados farmacéuticos con características de liberación modificada, a fin de adecuar la farmacocinética del principio activo y optimizar la biodisponibilidad. Se ha tratado de incorporar grupos funcionales a los principios activos, que le den especificidad, mejoren su solubilidad y estabilidad, y favorezcan su llegada al sitio de acción, sin comprometer la eficacia del tratamiento. Esto agrega otra dimensión a las funciones tradicionales del preparado como simple vehículo para el almacenamiento, el transporte y la administración y la dosificación de un fármaco ^{20,21}. La efectividad terapéutica de muchos medicamentos disminuye por su imposibilidad para llegar en concentraciones adecuadas al lugar de acción. Esto puede deberse a su baja solubilidad, o a su inactivación por enzimas y fluidos corporales ^{22,23}, pero además, a esto se le puede agregar, como ya se mencionó, que en las granjas la administración de antibacterianos está sujeta a manejos ineficientes. Por ejemplo en fármacos de intervalos de dosificación corto se podría optimizar la mano de obra si el diseño farmacéutico de los antibióticos se ajustara, no solo a la farmacocinética de estas especies, sino a sus sistemas habituales de manejo.

Finalmente cabe resaltar que las formulaciones parenterales de liberación sostenida son actualmente una atractiva opción terapéutica en el área veterinaria ya que reducen el manejo de los animales y proporcionan un adecuado control terapéutico de las infecciones bacterianas, ajustándose a las propiedades farmacocinéticas, por esta razón, a nivel mundial están tratando de desarrollar formulaciones LA de diversos antibacterianos de utilidad en veterinaria para dar una mejor opción terapéutica. Ejemplos de esta tecnología, son las tetraciclinas, las cuales son un grupo de antimicrobianos más utilizados en la Medicina Veterinaria, desde 1953 y hasta la fecha ^{24,25}. En particular la forma inyectable de oxitetraciclina es uno de los pocos ejemplos de diseño farmacológico para uso exclusivo en la medicina veterinaria ²⁶. El preparado más antiguo es considerado uno de los medicamentos pioneros de liberación prolongada (LP), y dicho efecto se logra por un

vehículo a base de 2-pirrolidona y una pequeña proporción de propilenglicol^{27,28}, vehículos que moderan el efecto irritativo de la oxitetraciclina al tiempo en que le permiten su liberación sostenida para generar concentraciones plasmáticas útiles hasta por 120 horas (Véase Figura 1)^{29,30}. El éxito clínico de este preparado fue notable y se debió no solamente a la potencia antimicrobiana de la oxitetraciclina sino también a que se ha detectado que este antibiótico es más “tiempo dependiente” que “concentración dependiente”, cuando se cuantifica su eficacia clínica.

La doxiciclina, fármaco del que se ocupa el presente trabajo, tiene cierta ventaja respecto a las otras tetraciclinas, por su alta liposolubilidad, lo que le da una amplia penetración tisular. Posee un amplio efecto antibacteriano; es muy activa contra bacterias anaerobias y facultativas³¹⁻³⁴, rickettsias y protozoarios³⁵ y presenta efecto bacteriostático. Además debido a su alta unión a proteínas plasmáticas le confiere una prolongada vida media biológica. Sin embargo, se ha descrito una desventaja de éste tipo de medicamentos, y es que el tratamiento requiere periodos prolongados, que mantengan las concentraciones plasmáticas terapéuticas para inhibir a las bacterias³⁶ (CMI). Existen formulaciones de doxiciclina que se administran tanto por vía oral como parenteral. Sin embargo, la vía parenteral se recomienda para minimizar la irritación del tubo gastrointestinal y el impacto en la flora intestinal, pero existe la desventaja de que su administración por vía IM es muy dolorosa e irritante^{24,37,38}.

Si se toma en cuenta que no se ha generado y es poco probable que se genere en corto plazo una nueva familia de antimicrobianos para medicina veterinaria, la tendencia natural es la de diseñar presentaciones que hagan óptimo el efecto de los antimicrobianos con los que se cuenta. El costo para producir un nuevo preparado es menor y el retorno financiero mayor, amén de los beneficios para la salud animal. Por ejemplo la enrofloxacin que inicialmente salió al mercado al 5%, se rediseñó para que estuviera al 10% al poco tiempo y recientemente se ha diseñado una nueva presentación que prolonga su estancia en el organismo¹⁶. Luego entonces, es factible suponer que si se puede manipular a la doxiciclina inyectable para destacar su característica farmacológica, esto es, que se le

encuentre en el plasma por largos periodos hasta de 5 días, se lograría virtualmente un nuevo antimicrobiano, pero con la ventaja de un gasto de desarrollo farmacológico menor.

1.1 Clasificación farmacodinámica de los antibióticos (dependientes de la concentración o del tiempo)

Los métodos de determinación de la susceptibilidad antimicrobiana son imprescindibles debido a que guían al veterinario en la elección del tratamiento adecuado. Esas pruebas se basan en descripciones hechas por el National Comitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), que inicialmente fueron desarrolladas para aplicación en medicina humana, y aún hoy son utilizadas por muchos laboratorios de diagnóstico veterinario. Entre las pruebas utilizadas, la prueba de dilución en tubos sigue siendo la más usada y probada para la obtención de información cuantitativa para finalmente interpretarse como CMI la más baja concentración capaz de inhibir el crecimiento bacteriano. Sin embargo, estos métodos solamente son orientadores dadas las diferencias que existen entre las pruebas “*in vitro*” y lo que realmente ocurre con los microbios en el organismo.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) es una herramienta valiosa cuando se le interpreta en función de las concentraciones que el fármaco puede alcanzar en el organismo. Para poder hacer una correcta interpretación, se deberá tener un conocimiento completo de la distribución poblacional de la bacteria problema (susceptibilidad de muchos aislamiento de campo), la farmacocinética del agente (no sólo la plasmática, sino la tisular) y los resultados de los estudios de eficacia. Por esta razón surge la disciplina conocida como la modelización farmacocinética-farmacodinámica que representa la unión final entre estos datos y hace posible la administración eficaz y racional de los antibióticos.

Al estudiar la susceptibilidad a un determinado antibiótico a través de su CMI, podremos, al correlacionar este parámetro con sus variables farmacocinéticas, estimar su eficacia “*in vivo*”.³⁹ Los efectos antibacterianos pueden ser medidos “*in vitro*” y aún “*in vivo*” a través de la exposición de cultivos de microorganismos a diferentes concentraciones de antibióticos, tomando muestras a diferentes tiempos durante un período de 24 horas y determinando la cantidad de bacterias en cada muestra se realizan una serie de curvas de

muerte para una determinada bacteria puesta en contacto con un antibiótico al cual es susceptible a concentraciones iguales, menores y mayores que la CMI de ese antibiótico para esa cepa.⁴⁰

De la integración farmacocinética-farmacodinámica, surgen algunos parámetros que son de gran utilidad en la terapéutica y se consideran como determinantes en la eficacia “in vivo” de los agentes antimicrobianos.⁴¹ Dichos parámetros se utilizan de acuerdo a la clasificación del antibiótico por el perfil de su actividad bactericida: a) $T > CMI$, que se refiere al tiempo en el cual las concentraciones de los antibióticos permanece sobre la CMI y es útil para antibióticos clasificados como tiempo dependientes. b) $pico/CMI$, describe la proporción entre el pico de concentración y la CMI y es válido para antibióticos concentración-dependientes y por último, la relación entre AUC/CMI que es útil para antibióticos concentración dependiente o antibióticos independientes.⁴²

El grupo clasificado como concentración-dependiente se caracteriza por alcanzar la muerte bacteriana en dependencia de la concentración del fármaco, en este grupo es necesario altas concentraciones del fármaco, para incrementar la actividad bactericida, (fluoroquinolonas, aminoglicósidos), es mucho más importante la relación C_{max}/CMI que el tiempo que las concentraciones del fármaco se encuentren por encima de la CMI. Con una relación C_{max}/CMI mayor de 8, se puede estar seguro de que el fármaco está ejerciendo el máximo de su acción antimicrobiana y el máximo de su efecto post-antibiótico. No es demasiado importante el intervalo entre dosis, dado que estos agentes funcionan, en general con una dosis diaria. Son fármacos con gran residualidad terapéutica (efecto post-antibiótico). El grupo clasificado como Tiempo-dependiente, se caracteriza por su actividad bactericida totalmente dependiente del tiempo que la concentración de la droga se mantiene por encima de la CMI, pasa a ser más importante que el nivel en que la supere (no es necesario que la concentración supere la CMI en más de 2 a 4 veces) y es suficiente que la concentración supere la CMI en aproximadamente un 50 por ciento del período entre dosis. Se trata de fármacos con poca residualidad terapéutica. Las concentraciones cerca de estos valores no mata el organismo. La ausencia de grandes concentraciones para matar a los microorganismos es una

característica común de los antibióticos beta lactámicos, doxiciclina, vancomicina, clindamicina y los macrólidos. El caso de las tetraciclinas, azitromicina y glucopéptidos es interesante porque si bien son tiempo dependientes, tienen persistencias terapéuticas prolongadas.⁴²

Para lograr el uso correcto y racional de los productos farmacéuticos en la medicina veterinaria, se deben destinar recursos a la investigación básica y aplicada, especialmente vinculada a aspectos de la farmacocinética y la farmacodinamia de los antibacterianos, a la investigación clínica de sus efectos y, especialmente a la educación y entrenamiento de todos aquellos involucrados en la elaboración, comercialización, utilización, fiscalización y control de los antibióticos.

1.2 Hiclato de Doxiciclina (DOX-h)

Es un antibiótico que forma parte del grupo de las tetraciclinas y derivado sintético de la oxitetraciclina . Disponible en el mercado desde 1966 ²⁴, la doxiciclina tiene cierta ventaja sobre otras tetraciclinas en la medicina veterinaria, ya que presenta una amplia penetración tisular debido a su gran solubilidad lipídica, su espectro antibacteriano es muy amplio, su vida media de eliminación prolongada y su eliminación no depende del riñón⁴³. La doxiciclina es capaz de penetrar las membranas celulares y acceder a los organismos intracelulares ^{44,31}. Se ha mencionado que las tetraciclinas, particularmente doxiciclina y minociclina tienen propiedades antiinflamatorias, independientemente de su acción antibacteriana, al reducir la producción de citosina y óxido nítrico ²⁴ y afectan menos la flora bacteriana en comparación con oxitetraciclina y clortetraciclina ⁴⁵.

1.2.1 Actividad Antimicrobiana

El espectro antimicrobiano de doxiciclina es similar a otras tetraciclinas. Son medicamentos de amplio espectro véase Cuadro 1. En general la doxiciclina es más eficaz contra estreptococos, estafilococos y bacterias anaerobias y facultativas ⁴⁶⁻⁵² (a diferencia de la oxitetraciclina que presenta cierta resistencia) ⁴⁵. La mayoría de los miembros de las enterobacterias son sensibles hacia la doxiciclina (*Escherichia coli* ⁵³ y *Vibrio cholerae*). Algunas cepas de *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa* demuestran cierta

resistencia *in vitro*. Similar a las tetraciclinas, la doxiciclina tiene una buena actividad contra micoplasma *sp*³¹, Ureaplasma *sp*, Clamidia *sp*,⁵⁴⁻⁵⁷ Coxiella *sp* y rickettsia. Se han utilizado con buenos resultados en el tratamiento contra *Haemobartonella sp*, en gatos, *Ehrlichia sp*. en perros⁵⁸, *Anaplasma sp*. en bovino y psitacosis en aves⁵⁹, Se considera como un medicamento de elección para el tratamiento de campilobacteriosis y leptospirosis⁶⁰. La doxiciclina en bovinos ha sido utilizada para tratamiento en enfermedades infecciosa del tracto respiratorio superior e inferior^{31,61} también se ha utilizado en el tratamiento de piel y mucosas⁶², en el tracto urinario y genital⁶³, en el tubo gastrointestinal⁵³ y como profilaxis en la cirugía⁴⁴.

1.2.2. Mecanismo de acción

La doxiciclina es un antibiótico bacteriostático; atraviesa la membrana celular de los microorganismos por un proceso de transporte pasivo, a diferencia de otras tetraciclinas que requieren de transporte activo dependiente de energía. En el citoplasma, la doxiciclina se une reversiblemente a receptores de la subunidad ribosomal 30s. Inhiben la síntesis de proteínas al interferir con la unión de la ARN-aminoaciltransferasa al sitio aceptor en el complejo RNA mensajero. Esta unión inhibe la incorporación de aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento, inhibiendo de ésta manera la síntesis de proteínas^{36,64}. Una característica de éste tipo de medicamentos al ser bacteriostático, es que el tratamiento puede necesitar periodos prolongados de estancia, por lo que se le debe manejar como un agente tiempo-dependiente, a diferencia de los antibióticos bactericidas^{44,65}.

1.2.3. Resistencia

La resistencia de algunos microorganismos hacia las tetraciclinas es transmitida por plásmidos (el trasposón Tn10), los cuales codifican para interferir con el transporte activo de las tetraciclinas impidiendo su entrada a las células con ello no logran la concentración de la tetraciclina necesaria en el interior de la célula⁶⁶. Por ello la resistencia a la doxiciclina es menos común. No obstante, se ha propuesto que las bacterias llegan a desarrollar pérdida de permeabilidad pasiva hacia las doxiciclina³².

1.2.4. Características químicas

Todas las tetraciclinas son sales cristalinas, anfóteras y ácidas. El componente higroscópico en solución acuosa forma fácilmente sales con bases o ácidos. La doxiciclina, es soluble en agua. Tiene un peso molecular de 462.4. Aparentemente el coeficiente de partición de la doxiciclina entre octanol y bufer acuoso (HOH) se presenta en un rango de pH de 2.1-8.5 y su punto isoeléctrico ocurre con pH de 5.6¹³. Una reacción similar ocurre también con cloroformo. La fórmula estructural de la doxiciclina posee grupos ácidos, enoles y fenoles. En la Figura 2 se muestra la fórmula estructural de la doxiciclina hclato.

1.2.5. Farmacocinética

La farmacocinética de la doxiciclina difiere grandemente de otras tetraciclinas. La mayor diferencia es el incremento de la solubilidad lipídica y la unión a proteínas plasmáticas⁵³ (en gatos de 98.35 %, en perros de 91.40%). Estas propiedades incrementan la penetración tisular y prolongan la vida media biológica⁴³.

1.2.5.1. Absorción

En la administración oral, debido a su gran liposolubilidad, la absorción es muy rápida y completa (93%) y se ve muy poco afectada por la presencia de comida, a diferencia de la tetraciclina,²² que forma quelatos con algunos iones bi- y trivalentes como el calcio, magnesio, hierro y sales de zinc²⁴ La doxiciclina parece ser menos susceptible para interaccionar con el calcio²⁴ y el zinc, ya que tiene baja afinidad por estos iones⁴⁵, mientras que con el hierro se ha reportado que sí decrece marcadamente su absorción²⁴. El pico de concentración sérica de doxiciclina ocurre entre 2 y 3 horas después de su ingestión. La doxiciclina pueden ser administradas por vía IV o IM, con la desventaja que su administración por vía IM es muy dolorosa^{45,30}. Esto ha evitado que se le comercialice en el mundo.

1.2.5.2. Distribución

La doxiciclina se distribuye en el organismo ampliamente. Se ha reportado que después de la administración oral en perros en dosis de 10 mg/kg, el pico de la concentración sérica (4 µg/mL) fue alcanzado hasta las 2-3 horas y decreció a 1.5 µg/mL después de

las 24 horas³⁶. La vida media biológica en perro se ha reportado de 10-12 horas. En perros la proporción de la concentración tejido /suero fueron las siguientes: en corazón 2, en pulmón,1.3, en músculo1.4, en hígado 2.8 y en riñón de 3.8³⁶. De todas las tetraciclinas solo la doxiciclina y la minociclina muestran una mayor penetración al SNC (7-17 % de la concentración sérica), al ojo, a los bronquios y a las glándulas próstáticas¹.

1.2.5.3. Biotransformación y Excreción

Hasta 1981 no se habían aislado metabolitos de la doxiciclina en orina y en heces, por lo que se consideraba que la doxiciclina no se metabolizaba, no obstante, Bocker⁶⁷ reportó que del 5 % al 10% de la doxiciclina aplicada, si es metabolizada en el organismo. El principal órgano excretor de la doxiciclina es el intestino. En perros, la excreción urinaria, fecal y biliar es de 19%, 75% y menos del 5%, respectivamente³⁶. Aunque la doxiciclina alcanza altas concentraciones en la bilis, la excreción biliar se considera una vía menor en la eliminación del fármaco, la excreción fecal es la mayor ruta de eliminación. La primera generación de tetraciclinas es eliminada principalmente por el riñón, pudiendo alcanzar concentraciones tóxicas cuando la función del riñón se encuentra comprometida. No siendo éste el caso de la doxiciclina, que en caso de ocurrir una falla renal, se da un incremento compensatorio en la excreción fecal del medicamento, por lo que puede recomendarse como tratamiento en pacientes con falla renal⁶⁸. Cuando el pH de la orina es alcalino (7.5-8.0) se incrementa de 19 a 24% la eliminación de la doxiciclina⁶⁹. Las tetraciclinas presentan circulación enterohepática. El tratamiento con doxiciclina en animales de abasto podría ser limitado, debido a la persistencia del fármaco en el organismo, en la leche²³ y el huevo⁷⁰.

1.2.6 Toxicidad y efectos adversos

Se ha publicado, que la doxiciclina, cuando se administra por vía oral, ocasionalmente puede causar vómito y náusea en el perro y gato³⁶, en éste último es más común que ocurran dichos efectos. También se ha reportado que puede llegar a causar fototoxicosis. A la doxiciclina se le ha relacionado con reducida irritación del tracto gastrointestinal y superinfecciones²⁴. En el caballo, se ha recomendado la vía IV de para minimizar la colitis que pudiera causar,¹⁶ aunque se ha reportado que presenta un bajo impacto en la flora

intestinal, ya que cuando es eliminada por ésta vía, se encuentra inactiva, conjugada o quelada, lo que reduce la toxicidad²⁴. Y por último, su administración por vía IM es muy dolorosa y puede causar inflamación y lesión en los tejidos de aplicación.^{71,38}

1.3 Sistemas de liberación prolongada de medicamentos

Para un principio activo, la elección del o los vehículos es determinante en modular la intensidad y la duración de los efectos terapéuticos. La mayoría de los estudios cinéticos se basan en la tasa de depuración del fármaco, dado que es la fase más lenta de una cinética IM o SC, sin embargo, si se diseña un vehículo que obligue a una liberación sostenida y lenta de un fármaco, se dice que se define mejor con un modelo *flip flop* en el que la fase de absorción define mejor la estancia del fármaco en el organismo^{72,20}. Las formas farmacéuticas simples presentan farmacocinéticas con limitaciones, para extender su efecto mas allá de lo que la tasa de depuración permite. Exceptuando el caso de la administración por infusión intravenosa continua, la liberación del principio activo, se produce generalmente de una manera rápida, ocasionando una gran fluctuación entre las concentraciones máxima y mínima que se obtienen, tanto en el plasma, como en los diferentes tejidos, lo que puede traer riesgo de toxicidad en algunos casos, o pérdida de eficacia en otros.⁷³

Hay varios diseños de formas farmacéuticas de liberación modificada⁷⁴ que se pueden observar en la Figura 3, entre ellas se encuentra el sistema de liberación repetida, la cual logra la liberación del principio activo inmediatamente después de su administración y después de manera repetitiva e intermitente por un periodo más prolongado. Sin embargo, no mantiene niveles sanguíneos uniformes dentro del rango terapéutico, otra modalidad son los fármacos de liberación prolongada, en la cual se da una liberación lenta del fármaco durante un periodo prolongado, logrando niveles casi constantes en el tejido o células blanco, otra forma, es la liberación retardada o diferida, que logra concentraciones plasmáticas hasta de 72 h, pero se necesitan de 12 a 24 h para comenzar a liberarse^{20,74}. En la actualidad se están estudiando formas farmacéuticas o sistemas de liberación modificada que incluyen varias modalidades de liberación en una sola presentación y lo

que destaca es que las modificaciones estratégicas en su farmacocinética se basan en la manipulación de su liberación.^{75, 76}

El Objetivo de los sistemas de liberación programada es el hecho de permitir la obtención a lo largo de todo el intervalo de dosificación del medicamento, de niveles plasmáticos y tisulares sostenidos y terapéuticos, con un mínimo de fluctuación en las concentraciones plasmáticas, lo que conlleva por otra parte a un mejor aprovechamiento y rendimiento del fármaco utilizado particularmente en medicina veterinaria donde el manejo no puede realizarse a intervalos cortos. Una ventaja adicional es que la cantidad de fármaco administrada, en términos absolutos, se reduce significativamente, en comparación con formas farmacéuticas convencionales, dado que se logra un estado estable rápidamente.⁷³ Una de las formas de lograr liberación programada es mediante la utilización de vehículos viscosos, formación de suspensiones, que limitan la cesión por disolución, preparación de derivados muy poco solubles en el medio acuoso, utilización de vehículos no miscibles en el agua, implantación de formas farmacéuticas sólidas en tejido subcutáneo, o por último, una de las más exitosas, es la dispersión en microesferas de polímeros.²⁰ Por otra parte, la liberación controlada de fármacos por procesos de difusión se clasifican en 1- Sistema de membrana-reservorio, 2-Sistema matricial: y 3-Sistema de permeación de membrana^{21,77}. En el sistema matricial, el depósito de fármaco se prepara por dispersión homogénea de las partículas de este último en una matriz polimérica, que es la que controla la liberación. Los polímeros pueden ser lipofílicos, hidrofílicos y polímeros porosos²⁰. En el presente trabajo se diseñará un sistema matricial de doxiciclina para la liberación prolongada del fármaco en bovinos a base de ciclodextrinas y polímeros.

1.3.1 Las ciclodextrinas (CD) como sistemas de liberación

La CD son carbohidratos cíclicos formados por glucosa unidas mediante enlaces α -(1,4) glucosídicos. Las CD presentan forma toroidal cuya cavidad muestra propiedades hidrofóbicas y los bordes exteriores resultan ser hidrofílicos^{78,79,73}(Ver figura 4). Una de las propiedades más relevantes de las ciclodextrinas es su habilidad para formar complejos de inclusión (CI) con una extensa variedad de moléculas, tanto en medio sólido como líquido, así como con algunos gases^{18,80}. La formación del CI se refiere al entrapamiento

de una o más moléculas huésped incluida en la cavidad de una molécula anfitrión (CD), sin tener lugar algún enlace covalente entre ambos⁸¹. Son útiles como acarreadores de fármacos al lograr mejorar algunas propiedades físicas como disminuir la inestabilidad del fármaco⁸², mejorar su solubilidad. Las CD cuentan con una estructura química bien definida, con varios lugares susceptibles de sustitución. Se puede contar con diferentes tamaños de cavidades para albergar a huéspedes de diferente tamaño y poseen toxicidad relativamente baja. Tienen cierta solubilidad en el agua. Proporcionan protección en contra de la biodegradación de algunos fármacos albergados lábiles^{83,84}.

Los CI son preparados usualmente en un medio líquido, los métodos dependen esencialmente de las propiedades de la molécula huésped. En general las moléculas hidrofóbicas tienen una alta afinidad por la cavidad de la CD en presencia de agua, debido a que ésta proporciona una matriz microheterogénea semejante a un disolvente no polar⁸⁵. En solución acuosa, la cavidad altamente apolar de la CD es ocupada por moléculas de agua que están en un estado energéticamente desfavorable (repulsión polar-apolar) y son por consiguiente rápidamente substituidos por moléculas “huésped,” menos polares aún, que esa fracción del agua, generando una alta entalpía^D del sistema⁸⁴. Los complejos en solución no son especies estáticas, por el contrario, continuamente se intercambian con las moléculas de substrato libre generando un equilibrio termodinámico y cinético.¹⁸ En solución acuosa, la molécula “huésped” se encuentra dentro de la cavidad de la CD, por lo cual el complejo es rodeado completamente por una multicapa de moléculas de agua⁸⁰.

La solubilidad acuosa del huésped usualmente se incrementa al aumentar la concentración de CD. Hay varios tipos de CD en el presente trabajo se utilizará la β -CD, la técnica que se utilizará para formar el CI de doxiciclina y β -CD es el “método de amasado”, el cual es útil para fármacos solubles en agua, ya que tanto la CD como el substrato pueden ser disueltos en agua^{18,79}. Los CI obtenidos son generalmente amorfos, siendo por ello muy solubles y presentando una alta biodisponibilidad⁸⁶.

^D Entalpía cantidad de energía de un sistema termodinámico para romper enlaces y que éste puede intercambiar con su entorno.

Algunas de las ventajas de las CD como vehículo acarreador de fármacos, que son de interés para la elaboración del sistema matricial son las siguientes:

El mejoramiento de la absorción ocurre debido a que la velocidad y la magnitud de la biodisponibilidad de un fármaco pueden ser optimizados ajustando varios factores que afectan el equilibrio de la disociación del complejo en la formulación y en la biofase en las que el complejo se administra. Solo la forma libre del fármaco que está en equilibrio con el fármaco complejado en la solución es capaz de penetrar las barreras lipofílicas para posteriormente entrar en la circulación sistémica^{81,84,85}.

Reducción de la irritación local. La encapsulación molecular de un fármaco en la cavidad de la CD puede prevenir el contacto directo del medicamento con superficies biológicas, la irritación local disminuye sin afectar los tejidos adyacentes⁸⁷⁻⁸⁹. En la liberación de un fármaco, el complejo se disocia en sus componentes (de acuerdo a la constante de estabilidad) sin pérdida de los beneficios terapéuticos del medicamento. Por consiguiente las CD actúan como portadores que disminuyen el daño al tejido debido a la reducción en las concentraciones efectivas de fármaco en contacto con la membrana. El efecto de protección de las CD puede atribuirse principalmente a la afinidad pobre de los complejos hidrófilos de los medicamentos por las membranas sarcolemas^{80,87}.

Liberación lenta de fármacos. Las CD hidrófilas ionizables refuerzan la absorción del fármaco, mientras que las CD hidrófobas son útiles para la descarga lenta. Se pueden obtener formulaciones de liberación retardada usando la 6-O-(carboximetil)-O-etil- β -CD. Las CD hidrófobas (como los derivados alquilados o acilados) son útiles como portadoras de liberación lenta para fármacos solubles en agua. Se ha reportado que se han preparado sistemas de liberación farmacológica a base de algunos polímeros para complejar la ciclodextrina, la velocidad de liberación de éste fármaco depende del método usado y puede ser incrementado o disminuido, por lo anterior es factible formar un sistema de liberación con ciclodextrina y polímeros (poloxámero, chitosan y carbopol) y liposomas para lograr un sistema de liberación prolongada con doxiciclina^{18,85}.

1.3.2 Polímeros como sistemas de liberación modificada

Una vez incluida la doxiciclina en la ciclodextrina se procederá a incluir esta preparación en un polímero, se realizarán formulaciones con carbopol, poloxámero y quitosan con el fin de seleccionar la presentación que logre una liberación prolongada de más de 2 días.

1.3.2.1. Carbopol

Los carbómeros son polímeros sintéticos de alto peso molecular entrecruzados, derivados del ácido acrílico. Su característica más importante consiste en su gran capacidad de hidratación y que al absorber el agua son fácilmente hinchables. Su naturaleza hidrofílica y su estructura entrecruzada, los hacen candidatos altamente potenciales para su uso en sistemas de liberación controlada de fármacos⁹⁰⁻ además de que generan en la mayor parte de los casos mecanismos de liberación de orden cero ⁹⁴.

El polímero en pH alcalino, sufre una ionización del grupo del ácido carboxílico, debido a que ocurre una repulsión iónica, la cual es manifestada a nivel macro como un aumento de volumen y la cadena del polímero se relaja completamente, lo cual facilita la formación de redes tridimensionales que permiten la liberación o la retención del fármaco. Cuando las cadenas de carbopol se relajan lo suficiente permiten la liberación del fármaco a través de los poros que se forman como producto del hinchamiento. (Véase Figura 5). Como se trata de un polímero sintético, es eliminado del cuerpo sin sufrir degradación alguna, además es importante mencionar que los efectos producidos por el carbopol son más reproducibles que aquellos que puedan obtenerse de polímeros naturales, dado que su método de síntesis es más controlado, lo que permite conocer el porcentaje de polímero obtenido, la cantidad de monómero residual y la composición total del mismo (peso molecular) ⁹⁵.

En los últimos años, las resinas carboméricas han tenido gran éxito como matrices para la liberación controlada de fármacos administrados por vía oral y parenteral.⁹⁶ Este polímero es compatible con muchos ingredientes activos y excipientes, lo que permite diseñar presentaciones con características deseables.^{90, 54} Debido a sus propiedades, ha sido usado como matriz en gel en suspensiones y cremas para uso externo o como matriz bioadhesiva para formulaciones bucales, rectales y nasales. Se ha investigado la adición

de carbopol en diferentes formulaciones como transportador de fármacos. MacLean, (1995)⁹² estudió la liberación de péptido /proteína a partir de un polímero de hidrogel (carbopol-940) por vía SC en ratas, se observó un incremento en la vida media y la concentración. Por otro lado Ikechukwi, (1999)⁹⁶ investigó a su vez, la formulación de carbopol 971 P que contenía apomorfina, agonista dopaminérgico para el tratamiento de Parkinson, para evitar la redosificación (10-15 veces/día), se midió la liberación in vivo después de la administración SC e intranasal en conejos y se observó una liberación sostenida del fármaco por encima de 8 h en comparación con las 3 h que se logran con las presentaciones convencionales. Otros ejemplos de los fármacos que se han estudiado formulados en vehículo de carbopol se incluyen piroxicam⁹¹, y diclofenaco sódico⁹⁰.

1.3.2.2. Poloxámero

También se le conoce como lutrol o pluronic. Estos copolímeros han sido utilizados en las formulaciones farmacéuticas como vehículos de liberación de fármacos, a causa de su habilidad para autoagregarse, formando micellas, microemulsiones o fases líquidas cristalinas. (Véase Figura 6). Tales estructuras son interesantes porque pueden mejorar la solubilidad, pueden también reducir la degradación hidrolítica y se puede lograr una liberación controlada, lo que consigue mejorar la biodisponibilidad⁹⁷⁻¹⁰⁰. Las micelas poseen un centro hidrófobo de óxido de propileno y una corona hidrofílica de óxido de etileno que son capaces de solubilizar sustancias hidrofóbicas, una notable característica de este sistema, es que su autoensamble es altamente dependiente de la temperatura. Más específicamente, un incremento en la temperatura facilita la autoasociación, resultando una fuerte disminución en la concentración crítica de micelización (cmc). Varias técnicas han sido descritas en la literatura para medir la cmc de los polímeros, tales como espectroscopía con luz fluorescente, y resonancia magnética nuclear. La micelización y la gelación son afectadas por varios factores como son: la temperatura, la composición de los copolímeros, el peso molecular, la concentración y la presencia de cosolutos, tales como surfactantes, electrólitos y sustancias hidrofóbicas. Para lograr que el sistema tenga una temperatura de gelación entre la temperatura ambiente y la temperatura corporal dependerá del pH (ionización del fármaco) y la concentración de los componentes de la formulación¹⁰¹⁻¹⁰³.

Estos sistemas de microemulsión presentan varias ventajas sobre las formulaciones basadas en emulsión entre las que se incluyen: buena estabilidad, fácil preparación, se logra un pequeño tamaño de partícula comparado con la emulsión y por último el mejoramiento en el manejo debido a la transparencia de la formulación. Las propiedades de gelación pueden ser controladas al incrementar la concentración de solutos adicionados a la formulación¹⁰⁴.

Las emulsiones oleosas en agua presenta ciertas ventajas en la administración tópica, como son: miscibilidad en agua, puede ser lavable, fácil difusión en el sitio de aplicación y un bajo grado de irritación. Las microemulsiones son sistemas bien conocidos por su excelente larga estabilidad y fácil preparación. Estos son definidos como sistemas que contienen agua, aceite y constituyentes anfifílicos constituidos de un único punto isotrópico óptico y termodinámicamente estable en solución líquida. La emulsión homogenizada es cinéticamente estable, pero termodinámicamente inestable a la dispersión. Por lo anterior el tamaño de la gota de la emulsión aumenta continuamente a través del tiempo separando la emulsión en 2 fases macroscópicas. Las propiedades de las microemulsiones por otro lado, son independientes del tiempo (en la ausencia de degradación química) y son independientes en el orden de la mezcla. La estructura de la microemulsión puede ser aceite en agua (o/w) o agua en aceite (w/o) o bicontinua¹⁰⁵.

Se ha investigado sobre el poloxámero como vehículo para fármacos, tanto para la aplicación oral como parenteral.^{69,106,107} un ejemplo es la formulación que contiene tetraciclina para el tratamiento periodontal, en la que se prepararon 2 poloxámeros semi-sólidos, poli (oxietilen) poli (oxipropilen) y monoglicéridos respectivamente. Su administración se realizó con un equipo inyectable para la liberación del paquete periodontal, la liberación del fármaco, se caracterizó por una transición sólida-gel que partió de la presentación semisólida del paquete peridontal. También se determinó in vitro la liberación del fármaco. Estos estudios indican que ambos poloxámeros y gel monoglicéridos pueden ser aplicados subgingivalmente y producen una significativa mejora en la liberación sostenida de fármacos.¹⁰⁸. Por otra parte se desarrolló una formulación a base de gel de poloxámero 407 para la liberación de insulina en ratas,

aplicada por vía SC, se observó que el efecto hipoglicemiante fue más prolongado que con la formulación convencional (0.5 h a 4 h)⁶⁹, En otras investigaciones se elaboró una formulación tópica con lidocaína y pilocarpina, los resultados mostraron que dicha presentación tuvo un rápido inicio de acción y no fue irritante. Los copolímeros logrados mostraron gelación dependiente de temperatura inversa, la formulación mostró baja viscosidad a temperatura ambiente y se consiguió un gel rígido elástico a temperatura corporal. Esta presentación pudo ocupar la cavidad periodontal y se aplicó fácilmente, debido a la baja viscosidad después de la forma de gel rígido, que aseguró una efectiva fijación de la formulación en el sitio de aplicación. Después del tratamiento el gel puede ser removido por simple lavado con agua fría.¹⁰⁹, Entre otras formulaciones que se han preparado destacan ibuprofeno.¹⁰¹ Estos estudios demuestran que el poloxámero como vehículo para la aplicación parenteral incrementa la estabilidad de los fármacos lábiles y para prolongar la liberación, en aquellos que tienen corta vida media biológica.^{110,111.}

1.3.2.3. Chitosan.

La historia del chitosan data de 1859, pero apenas en los últimos 20 años se ha venido investigado sobre este polímero. Recientemente las microesferas o nanoesferas de chitosan se han considerado con un gran potencial en la aplicación farmacéutica para la liberación controlada de fármacos, principalmente para incrementar la absorción y prolongar la liberación de fármacos y macromoléculas¹¹²⁻¹¹⁶, se ha demostrado que mejora la disolución de fármacos poco solubles en agua y también por sus propiedades bioadhesivas y porque se considera biocompatible, biodegradable y carece de efectos alergénicos (DL₅₀ 16 g/kg administrado por vía oral en ratones) y por su alta densidad de carga.¹¹⁷

El chitosan es un polímero natural biodegradable lineal de biopoliaminosacarido β (1,4) unida a N-acetil-glucosamina. El chitosan consta de copolímeros de glucosamina y N-acetil-glucosamina (Ver Figura 7). El chitosan tiene un amino básico y dos grupos hidroxilo libre por cada C₆ formados. Es fácilmente obtenido por desacetilación alcalina de chitin el segundo polisacárido más ampliamente distribuido en la naturaleza, después de la celulosa¹¹⁸. Debido a la fácil disponibilidad de los grupos amino libres de chitosan puede

cargarse positivamente y debido a las fuerzas electrostáticas pueden interaccionar con superficies mucosas cargadas negativamente en su superficie o bien quelar metales iónicos (cobalto).

El chitosan es una base débil e insoluble en agua y disolventes orgánicos, es soluble en soluciones ácidas y ligeramente soluble en soluciones alcalinas⁵³. Su formación de gel puede ser obtenido por interacción de chitosan con iones opuestos de bajo peso molecular como polifosfatos, sulfatos y con la unión de glutaraldeido. La propiedad de gelación del chitosan permite un amplio rango de aplicaciones como la de recubrir productos farmacéuticos y alimentos.¹¹⁹⁻¹²² Entre otras aplicaciones farmacéuticas en que se ha utilizado destacan su uso como vehículo para la comprensión directa de las formas farmacéuticas sólidas, como desintegrante. El 93% de los fármacos cargados en chitosan presentan un perfil de liberación cercano al orden-cero.

Las microesferas o nanoesferas de chitosan es que permite la liberación de fármacos en el sitio específico del tratamiento si se manipulan y se escogen cuidadosamente las combinaciones de polímeros y fármacos. Por ejemplo se han desarrollado membranas utilizando salicato y chitosan sensibles al pH, a la temperatura y a la luz, por otro lado, se han desarrollado membranas que tienen características mucoadhesivas para la aplicación transmucosal.¹²¹ Las microesferas han sido investigadas tanto para la administración de fármacos por vía oral como parenteral.

El uso de chitosan en preparación inyectable ha recibido reciente atención. Los transportadores poliméricos biodegradables ofrecen una ventaja como transportadores de fármacos para la liberación prolongada de componentes de bajo peso molecular hasta fármacos macromoleculares. Jameela *et al*, mostró al usar toxoide de difteria (DT)-cargado en chitosan, que los anticuerpos se mantuvieron constantes por un periodo, de 5 meses demostrando el potencial para el uso de las microesferas de chitosan como vehículo de liberación de fármacos de larga acción. Se ha preparado prednisolona retenida en perlas de gel de chitosan, al 10% de solución acuosa de aminoácidos (pH 9.0) y fue administrada SC en el dorso de ratones y se observó una liberación sostenida que

permitió una dosis efectiva mínima local y una prolongada duración de la actividad del fármaco.

El quitosano es biodegradado naturalmente por hidrólisis con lisozima. El producto de degradación es atóxico, no inmunogénico y no carcinogénico. Por otra parte Onishi y Machida¹⁵ investigaron in vivo la biodegradación del quitosano soluble en agua en ratones. Los resultados muestran que aproximadamente el 50% del material fue desacetilado y que no hay bioacumulación de estos productos. Basado en estos estudios, se hace evidente que el uso del sistema de las micropartículas de quitosano representa una efectiva opción para la liberación de medicamentos por vía parenteral.

De ésta manera la formulación a partir de un polímero (carbopol poloxámero o quitosano) y la ciclodextrina, puede mejorar el efecto sistémico de los antimicrobianos y otros fármacos al tiempo en que se reducen los efectos colaterales y respuestas inmunes de rechazo. No obstante debe cuidarse que sus componentes no sean tóxicos, inmunogénicos y sean preferentemente biodegradables. Si se considera que los antibacterianos tiempo-dependientes requieren sistemas que permitan controlar la velocidad de liberación de un fármaco, se pueden basar en la generación de polímeros y hacer óptima la farmacocinética del principio activo, así como favorecer su llegada al sitio de acción con un régimen de dosificación que permitan una buena absorción y eliminación. Desde esta perspectiva, es factible que se pueda elaborar un preparado de liberación prolongada a base de ciclodextrinas – polímeros que incluyan en su interior doxiciclina y de esta manera alargar su tiempo de acción, una variable, que como ya se mencionó, se considera muy importante para este grupo de antibacterianos y al mismo tiempo aliviar el daño a tejido muscular que sigue a la aplicación de la doxiciclina.

1.4. Justificación

Dado que las tetraciclinas son antibacterianos clasificados como tiempo dependiente, requieren más de una estancia prolongada a concentraciones plasmáticas terapéuticas, que concentraciones elevadas en poco tiempo. Por esta razón, es factible pensar, que su inclusión en un sistema de liberación prolongada, mediante su inclusión en matrices

poliméricas, puede generar preparados farmacéuticos que brinden concentraciones terapéuticas sostenidas por más de 2 días y con ello un diseño de aplicación parenteral mejor, con respecto a los preparados hasta ahora disponibles a nivel mundial. Se eligió a la doxiciclina porque es en términos generales 60 veces más potente que la tetraciclina, de los denominados de corta acción y también por su alta liposolubilidad. Si se estudia la doxiciclina para su inclusión en estos sistemas de liberación y se define la farmacocinética de este tipo de preparados, se puede contar con un nuevo fármaco, sin haber invertido los costos que habitualmente exige el reto de generar un nuevo antimicrobiano en medicina veterinaria, en particular para becerros.

2. Hipótesis

Si se logra una formulación matricial de doxiciclina hiclato a partir de β - ciclodextrina y polímeros (carbopol , poloxámero y quitosan) entonces se puede obtener una liberación sostenida logrando concentraciones terapéuticas por más de 2 días, después de una sola aplicación del preparado después de la aplicación de una dosis de 10 mg/kg por vía subcutánea.

3-Objetivo General

Lograr una formulación de liberación prolongada de hiclato de doxiciclina para aplicación parenteral a partir de preparados a base de β - ciclodextrina y polímeros (carbopol , poloxámero y quitosan) y definir sus variables farmacocinéticas en becerros.

4-Objetivos Particulares

- 4.1 Elaborar el rotocolo de preformulación, Formulación y Estabilidad.
- 4.2 Estudiar las características fisicoquímicas de los disolventes a emplear y los cuales deben de estar aceptados por las regulaciones sanitarias.
- 4.3 Estudiar la formación de complejos de inclusión con la β -ciclodextrinas por el método de amasado
- 4.4 Determinar cuál es la proporción óptima de β -CD:huésped para obtener una formulación final de liberación prolongada que mantenga la concentración terapéutica de DOX-h por más de 48 h.
- 4.5 Elaborar formulaciones a base de DOX-h - β ciclodextrina –carbopol para evaluar los componentes de la mezcla mas adecuados para obtener una formulación estable.
- 4.6 Elaborar formulaciones a base de DOX-h - β ciclodextrina –poloxámero para evaluar los componentes de la mezcla mas adecuados para obtener una formulación estable.
- 4.7 Elaborar formulaciones a base de DOX-h -chitosan para evaluar los componentes de la mezcla mas adecuados para obtener una formulación estable.
- 4.8 Obtener una formulación final de liberación sostenida que mantenga la concentración terapéutica de doxiciclina.
- 4.9 Seleccionar la formulación de liberación sostenida de DOX-h logrando su reproducibilidad.
- 4.10 Evaluar la actividad microbiológica del preparado de liberación sostenida

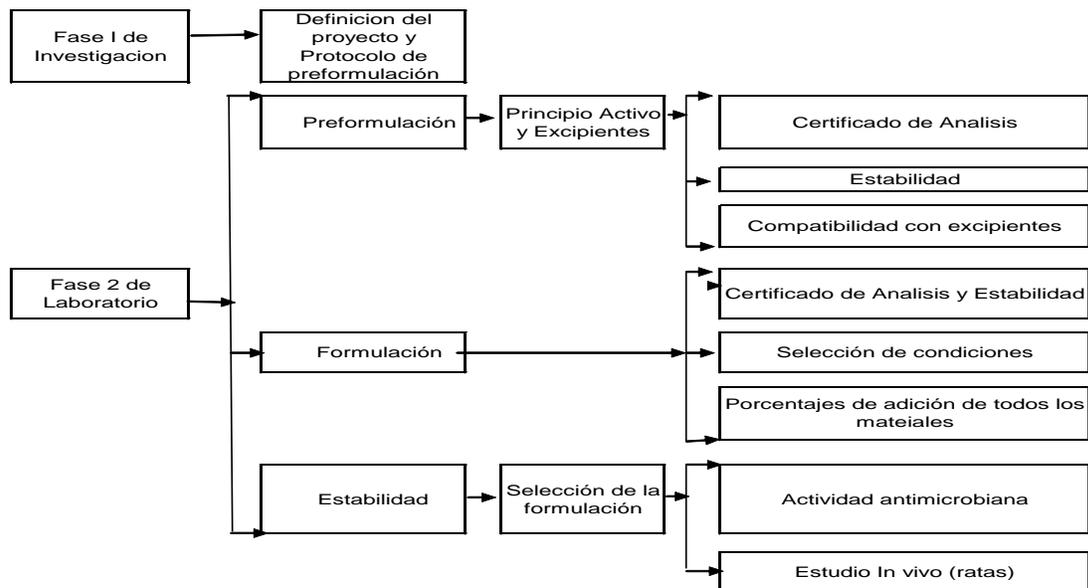
- 4.11 Evaluar la toxicidad de la presentación farmacéutica de liberación sostenida en ratas y después en becerros.
- 4.12 Determinar la concentración plasmática vs. tiempo de la doxiciclina mediante un método microbiológico y de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), posterior a la administración SC del preparado de liberación sostenida de DOX-h en ratas y becerros clínicamente sanos.
- 4.13 Determinación con modelos compartamentales para calcular las variables farmacocinéticas del preparado de liberación sostenida de DOX-h, con la ayuda del programa de cómputo *Origen 4 y Pk Análisis Software*.

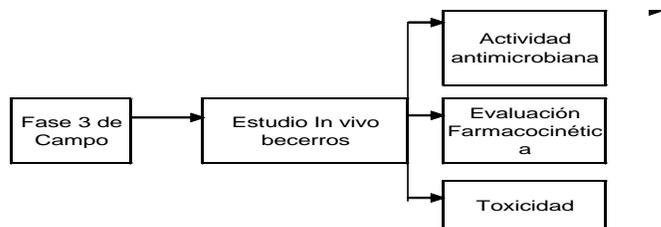
5. Justificación

Dado que las tetraciclinas son antibacterianos clasificados como tiempo dependiente, requieren más de una estancia prolongada a concentraciones plasmáticas terapéuticas, que concentraciones elevadas en poco tiempo. Por esta razón, es factible pensar, que su inclusión en un sistema de liberación prolongada, mediante su inclusión en matrices poliméricas, puede generar preparados farmacéuticos que brinden concentraciones terapéuticas sostenidas por más de 2 días y con ello un diseño de aplicación parenteral mejor, con respecto a los preparados hasta ahora disponibles a nivel mundial. Se eligió a la doxiciclina porque es en términos generales 60 veces más potente que la tetraciclina, de los denominados de corta acción y también por su alta liposolubilidad. Si se estudia la doxiciclina para su inclusión en estos sistemas de liberación y se define la farmacocinética de este tipo de preparados, se puede contar con un nuevo fármaco, sin haber invertido los costos que habitualmente exige el reto de generar un nuevo antimicrobiano en medicina veterinaria, en particular para becerros.

6-Material y métodos

La fase analítica se realizó en los laboratorios del departamento de Farmacia de la Facultad de Química y en los laboratorios del departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ambas de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicada en la Ciudad Universitaria. El presente estudio fue aprobado por el Comité de Investigación de Posgrado, Cuidado y Uso de Animales Experimentales, de acuerdo a la Regulación Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, y fue llevado a cabo en granjas experimentales de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México. El trabajo de campo se realizó en las instalaciones del Centro de Enseñanza, Práctica, Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA), que se encuentra ubicada en la carretera federal México-Cuernavaca en el km 28.9 en la delegación Tlalpan del DF, en la latitud Norte $19^{\circ} 11'$ y longitud oeste de $99^{\circ} 8'$, a una altura de 2760 msnm, con una temperatura promedio de $19^{\circ} C$ y una precipitación pluvial de 800 a 1200 mm¹²³ y en el CEIEPASP. Este centro se localiza en el Km 68 de la carretera Atizapán-Jilotepec, Chapa de Mota, Edo. de México. Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agro-Silvo Pastoril. Las ratas Wistar incluidas fueron obtenidas del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, también de la UNAM. El principio activo y los excipientes utilizados se mencionan adelante. Para el diseño y formación del sistema matricial de liberación prolongada de hiclato de doxiciclina se siguió el siguiente diagrama de flujo





6.1 Fase I de investigación

Protocolo de preformulación. Estudios que se realizaron sobre el principio activo, solo y acompañado de excipientes con el fin de aportar elementos suficientes para obtener un medicamento estable, biodisponible, aceptable por el paciente y el médico, y que pudiera ser fabricado por medio de un proceso industrializable.

En el presente estudio se trabajó con un producto innovador ya que se trata de una nueva ruta de administración, forma farmacéutica y sistema de liberación, aunque el principio activo hiclato de doxiciclina ya es un fármaco conocido por lo que sus propiedades ya se encuentran reportadas, tales como la relación toxicidad-actividad-seguridad, la influencia con la ruta de administración, la frecuencia de la dosis y el riesgo potencial de toxicidad clínica.

Los resultados de los estudios de preformulación tuvieron como propósito obtener información tanto bibliográfica como experimental que permitiera al formulador tomar decisiones sustentadas a lo largo del proceso de desarrollo del medicamento. Ya que un trabajo de preformulación completo, planea y organiza los estudios para que éstos sean útiles y específicos a los objetivos proyectados, reduce el riesgo de fracaso en el desarrollo así como el tiempo y costo empleados, debido a que es posible identificar los factores críticos en el desarrollo de un medicamento.

Después del diseño y administración de varios Sistemas matriciales de hiclato de doxiciclina de liberación prolongada en ratas Wistar y becerros, se procedió a seleccionar uno de los preparados, tomando en cuenta lo siguiente: Estabilidad,

que mantuviera concentraciones terapéuticas de más de 2 días y que no presentara toxicidad en los animales. Se eligió el preparado de hiclato de doxiciclina de larga acción (DOX-h-LA) formulado a base de poloxámero 407 y β -ciclodextrina. Únicamente de este preparado se presenta el protocolo de preformulación y formulación, así como también las pruebas de toxicidad aguda en becerros y ratas, también se inoculó la DOX-h-LA en bovinos adultos, en borregos y cabras, con el fin de determinar si no hay diferencia en las concentraciones séricas en estas especies.

6.1.1 Definición del proyecto y perfil del producto

Se llevó a cabo la definición del medicamento que se deseaba desarrollar, se establecieron los objetivos claros que permitieran concentrarse en el perfil del producto y poder de esta manera plantear la mejor estrategia de trabajo.

a) Nombre del proyecto: Hiclato de doxiciclina inyectable de larga acción (DOX-h-LA)

Principio Activo: Hiclato de doxiciclina

Dosis: 10 mg/kg

Forma Farmacéutica: Inyectable

Vía de Administración: Subcutánea

Tipo de liberación: Liberación modificada

Indicación Terapéutica: Antibiótico de amplio espectro para ganado bovino

b) Tipo de producto



Innovador



Genérico

Combinación de Activos: No

Otra Combinación: doxiciclina + β -Ciclodextrina + poloxámero 407 de esta manera se pretende evitar el dolor y reducir la irritación local a la aplicación parenteral además de incrementar la estabilidad del principio activo y lograr una liberación modificada del activo.

A que mercado va dirigido

Nacional

Internacional



2-Naftacenecarboxamida, 4- (dimetilamino)- 1, 4, 4^a, 5, 5^a, 6, 11, 12^a-octahidro- 3, 5,10,12,12^a-pentahidroxi-6-metil-1-1 1-dioxo-monohidroclorada, compuesto. Con etanol (2:1), monohidrato (4S-(4 α , 4^a α , 5 α , 5a α , 6 α , 12a α))-4-(Dimetilamino))-1.4.4^a.5.5^a.6.11,12^a-octajodrp-3,5,10,,12,12^a-pentahidroxi-6-metil-1,11-de monohidroclorado, compuesto con etilalcohol (2:1), monohidrato (24390-14-5)

b) Propiedades físicas Aspecto: Polvo cristalino amarillo, higroscópico, se solubiliza libremente en agua y en metanol, Con moderación es soluble en alcohol. Si se disuelve en soluciones alcalinas de hidróxido y de carbonatos,. en solución a 1% en agua tiene un Ph de 2 – 3. Rotación óptica – 105° a – 120°. Absorbancia específica de 300 a 335 y la máxima a 349 nm, metales pesados no más de 50 ppm, absorción de luz por impurezas no más de 0.07, etanol no más de 4.3 – 6.0%, agua 1.4 – 2.8%. Peso molecular: 513 g.

c) Estabilidad del Principio Activo. La luz ultravioleta causa oxidación. El agua oxigenada causa oxidación. En pH menor a 2 y mayor de 8 causa pérdida en la potencia antimicrobiana.

d) Incompatibilidades: Con gases disueltos en agua y es incompatible con soluciones alcalinas.

e) Polimorfos: No se han reportado

f) Desempeño Biológico. Su clasificación biofarmacéutica es Clase II – Alta permeabilidad, Baja solubilidad ^E

Fármaco	doxiciclina
Máxima fuerza de dosis	100 mg
Definición de solubilidad	Vss (muy ligeramente soluble en agua)*
Solubilidad (mg/mL)	0.1 / 1
Número de dosis (Do)	4
CLogP	0.60
pK _a (s)	3.66
Clase terapéutica	antibacterial, antimalarial

log P-based	4
CLogP- base	4

^E **Table . Drugs in the Top 200 U.S. Drug Product List^{abc}** *Molecular Pharmaceutics*, ASAP Article 10.1021/mp034006h S1543-8384(03)04006-1 Web Release Date: December 17, 2003 Copyright © 2003 .¹⁶¹

g) Farmacopea en las que se encuentre reportado el principio activo.

Farmacopea	Página	Forma farmacéutica
USP NF 2002	619	Polvo
USP NF 2002	621	Inyectable
Británica 2004	702	Polvo

h) Productos de hiclato de doxiciclina inyectable de larga acción que existan en el Mercado Nacional e Internacional:

Ninguno

i) Patentes del Principio Activo: No existe ninguna patente que trate acerca de un producto matricial de doxiciclina de liberación prolongada.

J) Fabricantes de Materias Primas:

Materia Prima	Proveedor	Dirección
Doxiciclina hiclato	Pronaquim, S.A. de C.V.	Cerrada Calzolco No. 22 Col. Pedregal Sto Domingo 04369 México, D.F Tel: (+55) 5421-1552, Fax: (+55) 5617-5153
Doxiciclina hiclato	Anglo Corp. S.A. de C.V.	Teléfonos: 55-74-29-06 / Fax: 55-74-06-18/ bixter@mail.internet.com.mx / Dirección: Av. México #99-202, Col Hipódromo Condesa CP 06170, Mex. D.F.
β-cyclodextrina. Cycloheptaamylose; Schardinger β-Dextrin; cyclomaltohepatose [7585-39-9] C ₄₂ H ₇₀ O ₃₅ FW 1135 C4767 min 98%	Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V.	Cerestar Pharmaceutical Excipients http://www.cerestarexipients.com/cyclodextrin.html
Antioxidante, Propilenglicol y Etanol	Central de Drogas S.A. de C.V.	Naucalpan de México Tels: 55 60 81 11, 55 60 81 23 www.cedrosa.com.mx
Poloxámero 407	BASF de Mexico, Nutrer de Mexico	Calle 4 #25-C Fraccionamiento Industrial Alce Blanco, Naucalpan Edo. De Mexico. Tel 10 83 45 00 10 83 45 02 www.nutrer.com.mx

6.1.3. PREFORMULACIÓN

Poloxámero 407

Sinónimos: Lutrol F127, Pluronic, Monolan, Pcloxalkol, Copolímero polietilén-propilén glycol, Copolímero polioxiétilén-polioxi-propilén, Supronic, Synperonic

Categoría Funcional: Agente Emulsificante, Solubilizante e Humidificante

Uso	Concentración Recomendada(%) ¹²⁴
Agente gelante	15-50
Agente estabilizante	1-5
Agente Humectante	0.01 – 5

Vía	Concentración en medicamentos aprobados por la FDA ¹²⁵			
Oftálmico	0.16-0.2%			
Oral	5 – 12.6%			
Tópico	1 – 15.5 %			
Seguridad	Vía	Dosis	Tiempo del Tratamiento	Toxicidad ¹¹¹
Conejos y perros	IV	0.5 g/kg/día	14 días	No se observó
Ratas	Oral	3 – 5 % alimento	2 años	No se observó
Ratas	Oral	7.5 %		Disminuyo el porcentaje de crecimiento

Especie	Vía	Toxicidad aguda (LD50) ¹²⁷
Ratón	IV	1 g/ kg
Ratón	SC	5.5 g/kg
Rata	IV	7.5 g/kg

Especie	Vía	Tratamiento	Porcentaje de Poloxámero que se propuso en el preparado DOX-h-LA
Becerro	SC	1 sola aplicación	15% en 100 mL

Especie	Vía	Tratamiento	Cantidad de Poloxámero administrada del preparado DOX-h-LA
Becerro	SC	1 sola aplicación	0.015 g/ kg de peso corporal

Nota: La cantidad de Poloxámero 407 propuesta en el preparado DOX-h-LA esta dentro de las especificaciones de bioseguridad investigadas.

Propilenglicol

Sinónimos: 1,2-Dihidroxiopropano, 2-hidroxiopropanol, metil etilen glicol, metil glico, propano 1,2 diol.

Categoría Funcional: Conservativo antimicrobiano, Desinfectante, Humectante, Plastificante, Solvente, Estabilizante para vitaminas, Cosolvente miscible en agua.

Uso	Forma de dosificación	Concentración recomendada (%) ¹²⁴
Humectante	Tópica	15
Conservativo	Soluciones y	15-30
Solvente o	semisólidos	10-60
Cosolvente	Parenteral Topica	5 - 80

Vía	Concentración en medicamentos aprobados por la FDA ¹²⁵
IM	40-82%
IV	30-82%
Transdermal	25 %

Seguridad	Vía	Dosis	Tiempo Tratamiento	Toxicidad ¹²⁴
Ratas	Oral	30 ml/ kg en la dieta	6 meses	No se observó
Perros	Oral	2 g/kg	2 años	No se observó

Especie	Vía	Toxicidad aguda (LD50) ¹²⁴
Ratón	IV	7.6-8.3 g/ kg
Ratón	SC	15.5-19.2 g/kg
Rata	IV	6.2-12.7 g/kg
Rata	SC	21.7-29 g/kg
Rata	IM	13-20.7 g/kg
Perro	IV	25.9 g/kg

Especie	Vía	Tratamiento	Porcentaje propuesto en DOX-h-LA
Becerro	SC	1 sola aplicación	15% en 100 mL

Especie	Vía	Tratamiento	Cantidad administrada en DOX-h-LA
Becerro	SC	1 sola aplicación	0.015 g/ kg de peso corporal

Nota: La cantidad de propilenglicol propuesta en el preparado de DOX-h-LA está dentro de las especificaciones de bioseguridad investigadas.

Etanol

Sinónimos: Alcohol etílico, hidróxido de etilo, carbinol metílico.

Categoría Funcional: Preservativo antimicrobial, Desinfectante, Solvente.

Uso	Concentración (%) ¹²⁴
Preservativo antimicrobial	10
Solvente en solución inyectable	Variable
Solvente en productos tópicos	60-90

Vía	Concentración en medicamentos aprobados por la FDA ¹²⁵
IM	6.1-12%
IV	0.94 - 49%
SC	0.945 - 6.1- %

Especie	Vía	Toxicidad aguda (LD50) ¹²⁴
Ratón	IV	1.97 g/ kg
Ratón	SC	8.29 g/kg
Rata	IV	1.44 g/kg

Especie	Vía	Tratamiento	Concentración propuesta en DOX-h-LA
Becerro	SC	1 sola aplicación	10% en 100 mL

Especie	Vía	Tratamiento	Concentración administrada en DOX-h-LA
Becerro	SC	1 sola aplicación	0.010 g/ kg de peso corporal

Nota: La cantidad de etanol propuesta en el preparado DOX-h-LA esta dentro de las especificaciones de bioseguridad investigadas.

Bisulfito de Sodio

Categoría Funcional: Antioxidante

Uso	Concentración recomendada (%) ¹²⁴
Antioxidante	0.01-1

Vía	Concentración en medicamentos aprobados por la FDA ¹²⁵
IM	0.1 – 5.18 %
IV	0.1 – 10 %
SC	0.1 – 0.15 %

Seguridad	Vía	Dosis	Toxicidad ¹²⁴
WHO (humanos)	Oral	7 mg/kg/día	No se observó

Especie		Vía	Toxicidad aguda (LD50) ¹²⁴
Rata		IV	0.12 g/kg
Especie	Vía	Tratamiento	Concentración propuesta en DOX-h-LA
Becerro	SC	1 sola aplicación	1% en 100 mL

Especie	Vía	Tratamiento	Concentración administrada en DOX-h-LA
Becerro	SC	1 sola aplicación	0.001 g/ kg de peso corporal

Nota: La cantidad de bisulfito de sodio propuestal en el preparado de DOX-h-LA esta dentro de las especificaciones de bioseguridad investigadas.

Beta ciclodextrina

Sinónimos: beta-cicloamilosa, betadex, beta-dextrina cicloheptaamilosa, cicloheptaglucano, ciclomaltoheptosa, kleptosa.

Categoría Funcional: Solubilizante, Estabilizante.

Vía	Concentración en medicamentos aprobados por la FDA ¹²⁵
IM	44.1 %
IV	0.4 %

Especie	Vía	Toxicidad aguda (LD50) ¹²⁴
Ratón	SC	0.41 g/ kg
Rata	IV	1 g/kg
Rata	SC	3.7 g/kg

Especie	Vía	Tratamiento	Concentración propuesta en DOX-h-LA
Becerro	SC	1 sola aplicación	2% en 100 mL

Especie	Vía	Tratamiento	Concentración administrada en DOX-h-LA
Becerro	SC	1 sola aplicación	0.00022 g/ kg de peso corporal

La cantidad de beta ciclodextrina propuesta en el preparado de DOX-h-LA esta dentro de las especificaciones de bioseguridad investigadas.

b) Efectos secundarios reportados en presencia de algunos de los componentes del vehiculo arriba mencionados:

Excipiente	Preparado y Dosis administrada (mg/kg)	Efecto Secundario Observado	Cita Bibliográfica
β-ciclodextrina	Tetraciclinas con β-ciclodextrina 1:1 molar implante subcutáneo en ratón	Examen Histológico: moderada inflamación a las 24 h,	Domínguez, 2004 ⁽¹⁸⁾
Poloxámero 407	15 mg/ kg de P-407 (22%) o 27.5 mg/kg por vía intramuscular en conejos	No induce hiperlipidemia, no altera los niveles sanguíneos de triglicéridos y colesterol. como se ha reportado previamente. Este porcentaje de adición de P-407 se puede utilizar con seguridad para la liberación farmacéutica controlada.	Blonder, 1999 ⁽¹⁰⁶⁾
Poloxámero 407	1 g/kg en ratas Intraperitoneal	Induce hiperlipidemia asociada con marcada alteración en enzimas responsables del metabolismo lipídico	Johnston, 2003 ⁽¹²⁶⁾
Poloxámero 407	500 mg P-407/kg intramuscular en ratón	Induce hiperlipidemia y lesion vascular, efectos en vivo se elevaron niveles de lípidos oxidados en el plasma. Lo que sugiere la formación de arteroesclerosis.	Johnston, 2003 ⁽¹²⁷⁾
Poloxámero 407	Insulina con poloxámero 407 al 20 y 30% subcutáneo en ratón	No menciona posibles reacciones	Barichello, 1999 ⁽⁶⁹⁾
Poloxámero 407	Poloxámero 407 (intramuscular)	No menciona posibles reacciones de Citotoxicidad, Mutagenocidad, ni Genotoxicidad	Papciak, 1985 ⁽¹²⁸⁾
Poloxámero 407	Poloxámero 407 intramuscular en conejos	Niveles de CPK (Creatinin fosfoquinasa) no mayores de 5 U/ ml Es aceptable como vehiculo IM, ya que causa toxicidad e irritabilidad muscular semejante a los vehiculos tradicionales IM	Johnston, 1985 ⁽¹²⁹⁾

6.1.4. FORMULACIÓN

Formula cuali-cuantitativa de DOX-h-LA:	
Doxiciclina Hiclato	10.0 g
Antioxidante	1.0 g
β-Ciclodextrina	2.0 g
Poloxámero 407	15.0 g
Propilenglicol	15.0 g
Etanol	10.0 g

Agua inyectable cbp 100.0 mL

Todas las materias primas empleadas son grado USP. Todas las materias primas son estériles. (excepto el etanol) al igual que los materiales empleados.

6.1.5 ESTABILIDAD de las materias primas a diferentes condiciones

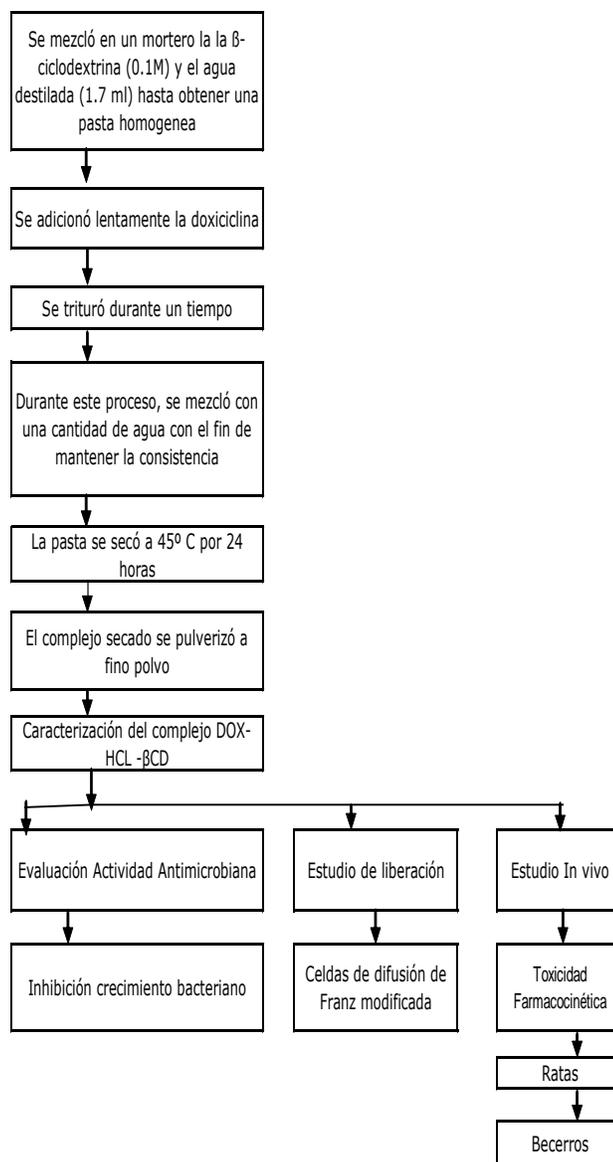
Materia prima	HCl 1 N	HCl 0.5 N	NaOH 0.2 N	Luz UV	H ₂ O ₂	Agua y Aire
doxiciclina pH 2.0	Sin cambio	Sin cambio	Negra	Sin cambio	Negra	Negra
β-Ciclodextrina pH 6.0	Sin cambio	Sin cambio				
Poloxámero 407 pH 6.	Sin cambio	Sin cambio				

b) Modificación de la temperatura de gelación del poloxámero 407 cuando se agregan cada uno de los componentes del preparado propuesto.

PREPARADO	T° GELACION	pH
Poloxámero 407 20 %	22	6
Poloxámero 407 15 %	35	6
Propilenglicol 15% + Poloxámero 407 20%	21	6
Propilenglicol 15% + Poloxámero 407 15%	34	6
Bisulfito de Sodio 0.5 % + Poloxámero 407 20%	23	8
Bisulfito de Sodio 0.5 % + Poloxámero 407 15%	55	8
Bisulfito de Sodio 0.5 % + Propilenglicol 15% +Poloxámero 407 20%	24	6
Bisulfito de Sodio 0.5 % + Propilenglicol 15% +Poloxámero 407 15%	42	6
Bisulfito de Sodio 0.5 % + Propilenglicol 15% +Poloxámero 407 15% + Doxiciclina 10%	37	4.5
Bisulfito de Sodio 0.5 % + Propilenglicol 15% +Poloxámero 407 15% + Doxiciclina 10%+ β-ciclodextrina 2 %.	39	4

6.2 Fase 2 de Laboratorio

6.2.1. Formación del complejo de inclusión de doxiciclina hclato- beta ciclodextrina.



Se preparó el complejo de inclusión por el método de Amasado ⁷⁹, durante un periodo de 24 h. El complejo de inclusión de doxiciclina hclato: β cyclodextrina (DOX-HCL : β -CD), se preparó y normalizó, con concentraciones de doxiciclina del 20%, 10%, 2%. Se utilizaron concentraciones crecientes de ciclodextrina (0.01 M, 0.1 M , 1 M) y concentraciones constantes de la doxiciclina. Se mezcló en un mortero la β-ciclodextrina y el agua destilada necesaria hasta obtener una pasta

homogénea, se adicionó lentamente la DOX-HCL, y se mezcló durante un tiempo. Durante este proceso, se mezcló con la cantidad de agua necesaria con el fin de mantener la consistencia. La pasta se secó a 45° C por 24 horas. El complejo secado se pulverizó a fino polvo.

Evaluación de liberación

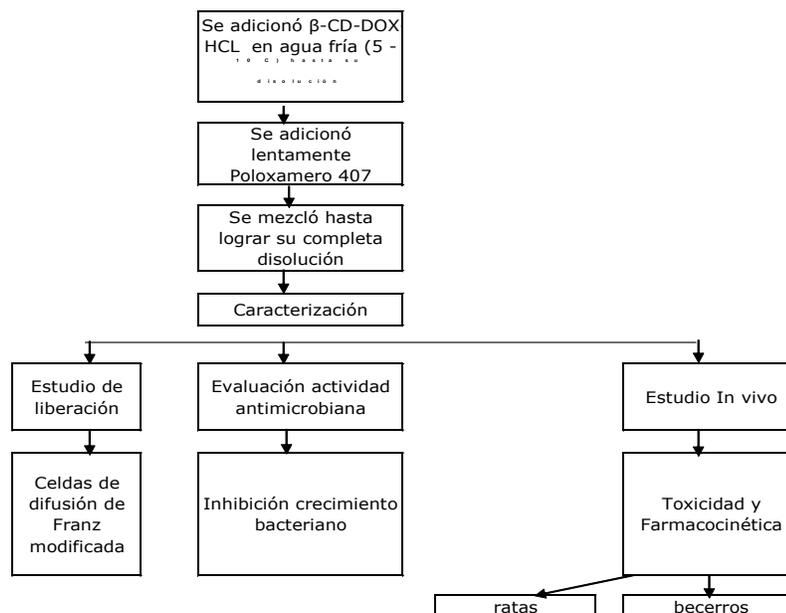
Se midieron las muestras por triplicado con las celdas de difusión de Franz. La concentración de la doxiciclina se determinará por espectroscopia UV-VIS a 350 nm. La curva de calibración de la concentración de la doxiciclina se establecerá usando concentraciones conocidas de DOX-h en solución PBS.

Estudio in vivo

Una vez seleccionada la formulación. Se utilizaron ratas las cuales se dividieron en 2 grupos con 10 animales c/u, que fueron tratados de la siguiente manera: el primer grupo con la preparación seleccionada DOX-h - β -CD en dosis de 10 mg/ kg, Los animales se observaron durante 7 días posteriores a la inoculación para evaluar si existían cambios en el comportamiento y signos de toxicidad aguda.

Una vez que no se halló toxicidad del complejo DOX-h - β -CD en las ratas, se procedió a incluirlos en los polímeros (carbopol, poloxámero y chitosan).

6.2.2. Elaboración del preparado del poloxámero-inyectable

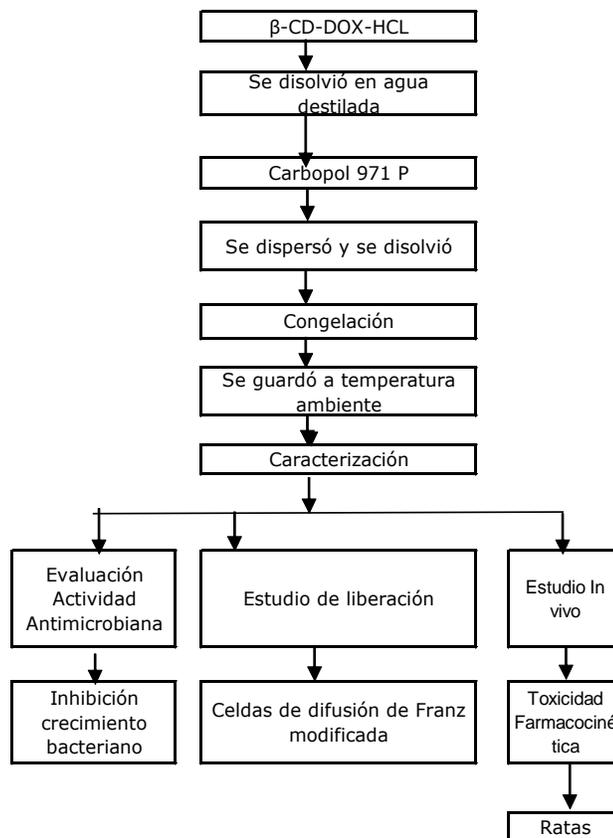


Se preparó la formulación de poloxámero-inyectable según Barichello *et al* (1999)⁶⁹. Por el método frío (cold method).

Material: Pluronic F-127 de BASF con un peso molecular de 10 kD, Agua destilada estéril. Una cantidad previamente pesada de PF127 (20, 15 y 10 %) que fue lentamente adicionada a una solución fría (5-10 °C) del complejo DOX-h , la cual se mezcló gentilmente hasta lograr la completa disolución del polímero.

Excipiente	Porcentaje	de	Inclusión
Poloxámero	15		10
β ciclodextrina	2		1
Doxiciclina hclato	20		15

6.2.3. Preparación del carbopol-inyectable



Se preparó la formulación de carbopol-inyectable según Ikechukwu *et al* (1999)⁹⁶.

6.2.4. Preparación de quitosán.

Se preparó la solución A, en la cual se adiciona el complejo doxiciclina hclato + β ciclodextrina + antioxidante (Ver las combinaciones en el siguiente cuadro) en agua poco a poco, hasta su completa disolución. En la solución B, se adiciona quitosán en agua, se calienta a 50°C, durante este proceso se mezcla con unas gotas de ácido acético glacial, con el fin de lograr la transparencia. Se deja enfriar. Se mezclan ambas soluciones (A y B) a temperatura ambiente y se ajusta a pH 5. formulación del quitosán adicionando una cantidad previamente pesada de quitosán (0.2, 0.5 y 1.0 %) que fue lentamente adicionada en agua destilada (5-10 °C) del DOX-h , la cual se mezcló gentilmente hasta lograr la completa disolución del polímero.

Excipiente	Porcentaje	de	Inclusión	
Quitosán	0.2		0.5	1
Poloxámero	15		10	5
β ciclodextrina	2		1	0
Doxiciclina hclato	20		15	10

Evaluación de la Toxicidad aguda de los preparados de hclato de doxiciclina de liberación prolongada en ratas de laboratorio. Los primeros formulados de lotes pilotos se inocularon a ratas de la cepa Wistar en grupos de 6, se observaron durante 5 días para encontrar algún signo de toxicidad (dolor, inflamación, necrosis).

Obtención de las variables farmacocinéticas a través del análisis del suero de ratas inoculadas con el preparado de doxiciclina de liberación prolongada por medio del método microbiológico de *Bennet et al*³⁰

6.3. Fase 3 de Campo

a) Grupos y productos.

Una vez seleccionado un preparado de cada una de las formulaciones (ciclodextrina, poloxámero, carbopol y quitosán. Se formaron cuatro grupos de diez

becerros cada uno, y recibieron los diferentes tratamientos de DOX-h seleccionados, aplicados por vía SC en dosis de 10 mg/kg.

El grupo 1 DOX-h- β -CD- poloxámero

El grupo 2 DOX-h- β -CD- carbopol

El grupo 3 DOX-h- β -CD- chitosan

El grupo 4 se le aplicará DOX-h en polvo diluida en agua inyectable.

b) Diseño de la prueba. Se tomaron muestras sanguíneas (10 mL) por punción de la vena yugular a los 5, 10, 20 30 minutos, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48, 60, 72 y 96 h. Las cuales se colectaron en tubos con EDTA de 10 mL. Las muestras sanguíneas se centrifugaron a 1,500 X g, por 15 minutos y el plasma obtenido se refrigeró a -20°C. Después se realizó el análisis microbiológico y de cromatografía líquida de alta resolución HPLC. Para evaluar la toxicidad de la doxiciclina, se tomó una muestra sanguínea de 10 mL. antes de la aplicación del producto y a las 24 y 120 h. las cuales se guardaron en tubo de *vacutainer* con EDTA y otro sin aditivo para su posterior análisis de hemograma y química sanguínea respectivamente.

c) Alojamiento y alimentación. Todos los animales recibieron su dieta habitual y agua *ad libitum* y se alojaron en sus corrales, compartiendo con otros animales no incluidos en el estudio y conviviendo con integrantes de otros grupos.

6.3.1. Evaluación de la toxicidad de hclato de doxiciclina

Se evaluó antes de la aplicación del tratamiento, la condición física de los animales (FR, FC, temperatura), se tomaron muestras sanguíneas (10 mL) por punción de la vena yugular., antes del tratamiento y a las 24 y 120 h. post-tratamiento. 5 mL de la muestra se colectó en tubos con EDTA para su análisis hematológico y 5 mL en tubos sin aditivo que se centrifugarán a 1500 X g y se separó el suero para su análisis bioquímico. El análisis hematológico incluyo conteo de WBC y RBC, PCV, VCM, HCM, CHCM, hemoglobina, proteínas totales, y concentración de fibrinógeno. Las muestras colectadas para análisis bioquímico incluyeron ALT, FAS, amilasa, AST, bilirrubinas, Urea, Creatinina, BUN. Los animales se

observaron diariamente para detectar algún signo que mostrara alguna reacción adversa o toxicosis, tales como anafilaxia, lagrimeo, salivación, diarrea, hepatotoxicosis, nefrotoxicosis, hemoglobinuria, reacción inflamatoria en el sitio de administración y fotosensibilización.

Análisis cuantitativo de la concentración de doxiciclina en plasma de becerro.

El estudio cuantitativo de la concentración de doxiciclina será desarrollado usando un método microbiológico de difusión en agar y por el método de espectrofotometría UV-visible en plasma con precipitación de proteínas plasmáticas con metanol.

Método de extracción del complejo doxiciclina- β -CD polímero del suero de los becerros.

Reactivos. Los reactivos y disolventes fueron grado analítico y se pasaron a través de cartuchos Sep-Pak. Los reactivos incluyeron: Metanol, solución amortiguadora de fosfatos salino (PBS) de Biomerieux, Agua grado Milli-Q (millipore), cartuchos Sep-Pak de 360 mg de fase reversa C₁₈ de silicagel de Waters. Los cartuchos, antes de su utilización, se activaron pasando 3 mL de metanol en 6 ml de PBS. La extracción de la doxiciclina del suero, se desarrolló de la siguiente manera: Primero el plasma se aplicó a un cartucho, el fármaco libre y sus metabolitos fueron eluidos con metanol. Las muestras de suero se aspiraron en una jeringa de polipropileno de 5 mL y se pasaron a través de un cartucho Sep-pak C₁₈. El fármaco (doxiciclina y sus metabolitos presentes) y el estándar interno fueron eluidos en tubos de polipropileno de 5 mL con 2 X 1.5 mL de metanol, el cual se evaporó y secó con nitrógeno. El metanol (2X1.5 mL) se pasó a través del cartucho y se colectó en tubos de polipropileno de 5 mL y se evaporó hasta su secado con nitrógeno. Los residuos se reconstituyeron con 200 μ l de fase móvil y 20 μ l se transfirieron a viales de HPLC, para ser inyectado en el sistema de HPLC.

6.3.2 Análisis de la concentración de doxiciclina por el método de espectrofotometría UV-visible.

Para realizar el análisis se decidió utilizar el método utilizado por Santos MDF *et al.*, el cual es un mecanismo de separación de fase reversa para HPLC ¹³¹. Se utilizó Demeclociclina hidrociorada como estándar interno. Acetonitrilo grado HPLC, ácido perclórico, ácido oxálico dihidratado y hidróxido de sodio todos grado analítico, ácido ascórbico, etilacetato, n-hexano, metanol, anhidro-sulfato-sódico, dihidrato dihidrogenofosfato sódico, y agua grado analítico.

Equipo y disolventes. Equipo: Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) modelo Waters 6000 A con inyector Waters modelo U6K y detector ultravioleta UV, visible de arreglo de diodos de 365 nm. Columna de fase reversa (partículas de 5 µm LiChrospher RP-18: 125 X 4 mm, Merck), equipado con una precolumna de (partículas de 5 µm RP-18: 4 X 4 mm, Merck), Fase móvil: agua-acetonitrilo- 70% HClO₄ (699:298.5:2.5, v/v), Na₂ EDTA (0.6 mM) y ácido oxálico (5 mM). El pH se ajustará a 2.5 usando 1 M NaOH. La fase móvil se degasificó antes de su uso. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min¹ y la columna a temperatura ambiente.

Preparación de la muestra. La solución stock de doxiciclina h (10 mg mL¹) y democlociclina (0.5 mg mL¹) se preparó con metanol -0.01 M HCL. Esta solución se guardó a -20 ° C hasta el momento de su análisis. La solución de trabajo se hizo por dilución de la solución madre y solución acuosa 0.001 M HCl. Todas las preparaciones se realizaron en tubos. Para la preparación de las muestras de calibración, doxiciclina- HCl se usó en concentración de 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25 µg mL¹ y 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 y 600 µg mL¹ en agua (matriz de referencia) y plasma de becerro. La concentración de estándar interno (democlociclina-h) fue de 5 µg ml para doxiciclina-HCl en un rango de concentración entre 0 y 300 µg mL¹. Se utilizó un volumen de 250 µl de plasma de becerro o agua como blanco. Se pasaron a los tubos 50 µl de solución de HCl a 0.001 M que contenía doxiciclina y demeclociclina. Enseguida se adicionaron 50 µl de una solución ácido ascórbico acuoso (6 % w/v). Posteriormente se adicionó 1 mL de bufer sulfito-fosfato de pH 6 (25.2 g de sulfito sódico-36.3 g NaH₂PO₄-2H₂O,

y se adicionó a 100 mL de agua bidistilada) y 6 mL de acetato de etilo, se mezcló en el vortex por 2 minutos. Después se centrifugó por 10 min. a 2600 g. 5 mL de fase orgánica, el cual fue transferido a otro tubo que contenía 100 µL de una solución de ácido ascórbico (0.2% (w/v) en metanol) y evaporado por desecación a temperatura ambiente con nitrógeno. La muestra se redisolvió en 300 µL de fase móvil y 4 mL de n-hexano se adicionó. Enseguida, los tubos se mezclaron con vortex por 1 min y se centrifugó por 5 min a 2600 g. Después se eliminó el hexano por aspiración. 100 µL de fase acuosa y se inyectó en el sistema de HPLC.

Estabilidad de doxiciclina y agua en el plasma de becerro. Cantidades conocidas de DOX-h se adicionaron en agua destilada y plasma de becerro blanco en concentraciones de 0.5, 5, 50 y 250 µg mL¹. Se guardaron a temperatura ambiente y a -20° C, y se analizaron en el HPLC. La curva de calibración se calculó por regresión lineal a partir de la razón del área pico contra la concentración.

6.3.3. Análisis para la evaluación microbiológica de doxiciclina

El estudio cuantitativo de doxiciclina se desarrolló usando un método microbiológico de difusión en agar, se utilizó el microorganismo de prueba *Bacillus cereus* ATCC 11778. La solución estándar se preparó usando plasma de bovino y se realizó una serie de diluciones del fármaco control. La concentración de doxiciclina se calculó por interpolación, comparando el diámetro de la zona de inhibición con una curva construida con el estándar. Se tomaron 5 mL de sangre, las muestras obtenidas se centrifugaron, y refrigeraron (- 4°C) hasta el momento de su análisis. El procesamiento de los sueros se llevó a cabo mediante el método microbiológico de Bennet *et al*¹³⁰, tan sensible como el uso de HPLC.

Método de Bennet *et al*. Se utilizó el agar Mueller Hinton (Bioxon)¹ el cual se preparó de acuerdo a las indicaciones del producto. Se utilizó una cepa bacteriana ATCC (*American Type Culture Collection*) 11778 de *Bacillus cereus*.

¹ Becton Dickinson de México, SA de CV.

Estándar bacteriano. En un tubo de tapón de rosca se colocaron 5 mL de agua destilada y una asada del cultivo bacteriano joven (Resembrado 24 horas antes) de *Bacillus cereus*. Y por medio de los estándares de Mc Farland² se realizaron los ajustes necesarios a la dilución para obtener una concentración al 0.5 de Mc Farland. La turbidez al 0.5 de Mc Farland se obtuvo por medio de un espectrofotómetro a una transmitancia del 60-65%, la cual corresponde a una concentración bacteriana de 1×10^{14} .

Preparación de las placas. Se colocaron 300 mL de agar en un refractario tipo Pirex® de 21 X 20 cm, estéril, y se dejó enfriar durante 10 minutos. Por medio de un hisopo estéril se sembró homogéneamente sobre todo el agar (400 µL de la suspensión bacteriana).

Preparación de las diluciones. Se pesaron 20 g de estándar de doxiciclina (98% de pureza), se colocó en un matraz y se aforó a 100 mL con agua desionizada. Se marcaron 10 tubos de 5 mL del 1 al 10 y uno de 15 mililitros con el número 0, en el matraz numerado con el 0 se colocaron 9 mL de agua desionizada y en los demás tubos se colocó 1 mL en cada uno de ellos. Del matraz se tomó 1 mL y se agregó en el tubo 0 y se homogenizó, de este se tomó 1 mL y se agregó al tubo 1, se homogenizó, en seguida se tomó 1 mL y se agregó al tubo 2 y así se continúa hasta completar los 10 tubos, teniendo finalmente las siguientes diluciones:

No	Concentración (µg/mL)
Matraz	200
Tubo 0	20
Tubo 1	10
Tubo 2	5
Tubo 3	2.5
Tubo 4	1.25
Tubo 5	0.625
Tubo 6	0.3125
Tubo 7	0.15625
Tubo 8	0.078125
Tubo 9	0.0390625
Tubo 10	0.01953125

² BioMérieux

Lectura de la placa. Una vez preparada la placa y con ayuda de un sacabocados se realizaron a lo largo del refractario dos hileras de 10 pozos cada una. Se colocó en cada pozo 100 μ L de cada una de las diluciones, se realizó por duplicado. Se realizaron 5 placas en el mismo día con la misma metodología con la finalidad de tener un total de 10 lecturas, se incuban durante 24 horas a 37 °C. Transcurridas las 24 horas se realizaron las lecturas de milímetros de halo de inhibición por pozo y por placa.

Procesamiento de las lecturas de los halos de inhibición. Se obtuvieron medias y desviaciones estándar del diámetro de halo de inhibición de cada una de las diluciones. A partir de los cuales y con ayuda de los programas Microcal Origin³ y Excel⁴, se obtuvieron las gráficas de milímetros de halo de inhibición vs concentración.

Procesamiento de los sueros Se prepararon las placas con la misma concentración bacteriana y del mismo modo en que se prepararon las placas para obtener el estándar mediante las pruebas de Bennet *et al*¹³⁰, se realizaron los pozos en la misma forma que los anteriores y en la misma placa se sembraron los mismos tiempos de muestreo de los 10 grupos, colocándose 100 μ L de suero, se incubaron durante 24 horas y se realizaron las lecturas de los milímetros de halos de inhibición, esto se repitió para cada uno de los tiempos de muestreo de cada uno de los grupos.

Análisis y procesamiento de los resultados. De los resultados obtenidos por tiempo de sangrado y por grupo se extrapolaron en la gráfica de concentración vs halo de inhibición obteniéndose así los μ g/mL de cada una de las muestras de suero. Los análisis farmacocinéticos se procesaron por medio de los programas: *Microcal origin versión 6.0 Software*, en el cual se calculó la regresión lineal y *Micromath PkAnalysis Scientific Software* en el que se obtuvo el modelo

³ Microcal Origin versión 4.0 Scientific and Technical Graphics in Windows. Microcal Software Inc.

⁴ Microsoft Excel. 1985-97

farmacocinético, los parámetros farmacocinéticos que se compararan estadísticamente son aquellos que reflejaron directamente la potencia clínica y la significancia clínica de la formulación prolongada (β -ciclodextrina- polímeros) se estimó el área bajo la curva (AUCs), vida media terminal por regresión lineal, volumen aparente de distribución, pico de concentración sérica del fármaco, valor de vida $\frac{1}{2}$ de eliminación, biodisponibilidad a partir del AUC, y concentración sanguínea definida de mantenimiento, así como el análisis estadístico para cada uno de los productos que se utilizaron. Posteriormente a los datos obtenidos por tiempo de sangrado por grupo se realizó diferencia entre medias y análisis de varianza, con los cuales se realizaron las gráficas de concentración vs tiempo, a partir de las cuales se obtuvieron las farmacocinéticas de cada uno de los grupos.

6.3.4. Elección de un preparado de liberación controlada

Después de las pruebas in vivo en las ratas, (Toxicidad, concentraciones séricas y obtención de las variables farmacocinéticas), aquellos productos que no cumplieron con lograr una liberación sostenida de 120 h se desecharon y únicamente se selecciono el preparado a base de DOX-h- β -CD- poloxámero 15% (DOX-h-LA).

En seguida se resume en un cuadro los resultados obtenidos después de la aplicación de los prototipos seleccionados en dosis de 10 mg/kg por vía SC

Formulado	Concentración sérica a las 120 h	Máxima Concentración	Toxicidad	Facilidad a la aplicación	Se acepta
DOX-h- poloxámero 15%	-----	1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	+++	Si	No
DOX-h- β -CD- -poloxámero 15%	0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	+	Si	Si
DOX-h- β -CD- -poloxámero 20%	0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	+++	Si	No
DOX-h- β -CD- carbopol	-----	0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	++	Si	No
DOX-h- β -CD- chitosan	0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	+++	Si	No
DOX-h- β -CD- chitosan- poloxámero 10 %	0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	+++	Si	No
DOX-h- β -CD- chitosan- poloxámero 5 %	0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	+++	Si	No

+ Inflamación ligera

++Inflamación Media

+++Inflamación grave y dolor.

7- Índice de artículos científicos publicados y/o aceptados derivados de DOX-h-LA

7.1 Pharmacokinetic study of an injectable long-acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in calves. *Research in Veterinary Science*.

7.2. Pharmacokinetics of doxycycline and tissue concentrations of an experimental long – acting parenteral formulation of doxycycline in wistar rats. *Arzneimittel-Forschung. (Drug Research)*.

7.3. Pharmacokinetics of an injectable long – acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in goats. *American Journal of Veterinary Research*.



Pharmacokinetic study of an injectable long-acting parenteral formulation of doxycycline hyclate in calves

D. Vargas-Estrada ^a, J. Gracia-Mora ^b, H. Sumano ^{a,*}

^a *Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Delegación Coyoacán, Ciudad de México C.P. 04510, Mexico*

^b *Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Delegación Coyoacán, Ciudad de México C.P. 04510, Mexico*

Accepted 9 July 2007

Abstract

Doxycycline hyclate (DOX-h) can be regarded as a time-dependant antibacterial. Hence, a parenteral long-acting formulation may be regarded as more pharmacologically sound. A poloxamer-based matrix was used to produce a long-acting injectable preparation (DOX-h-LA) and its serum concentrations vs. time profile investigated after its s.c. injection to calves. Serum concentrations profiles for such a preparation were compared to the corresponding profiles obtained with an aqueous formulation of DOX-h injected either i.m. or i.v. in 10 calves in a crossover study at dose of 10 mg/kg, with washout periods. DOX-h-LA showed the greatest values for bioavailability (602%); maximum serum concentration (C_{\max}) value was 1.99 $\mu\text{g/mL}$ with a time to reach C_{\max} (T_{\max}) of 25 h and an elimination half-life of 40.81 h. Considering minimum effective serum concentration of 0.5 $\mu\text{g/mL}$ a dose-interval of 80 h can be achieved for DOX-h-LA, and only 9.7 h and 17 h after the i.v. or i.m. administration of DOX-h, respectively.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Doxycycline; Calves; Pharmacokinetic; Sustained-release

1. Introduction

Doxycycline, a semi-synthetic derivative of oxytetracycline is a potent antibacterial drug commonly used as doxycycline hyclate (DOX-h). As other tetracyclines it is remarkably tissue-irritating when injected (Ole-Mapenay et al., 1997; Riond et al., 1980); hence, parenteral preparations are not commonly available in most parts of the world. DOX-h differs from oxytetracycline, chlortetracycline and tetracycline in that it is 5–10 times more lipophilic (Riond and Riviere, 1989). Yet, it has a greater plasma protein binding rate than oxytetracycline and chlortetracycline (Shaw and Rubin, 1986). Nevertheless, it possesses higher tissue penetration, larger volume of distribution, better antimicrobial properties and a more prolonged half-life,

than the already mention tetracyclines, both in humans and animals. The bacteriostatic effects of DOX-h are based on hindering bacterial protein synthesis, by interference with the binding of aminoacyl-tRNA to the mRNA ribosome complex thus arresting growth (Suzuka et al., 1966). This antibacterial mechanism of action is mainly regarded as time-dependant (Prescott et al., 2000; Craig, 1998). Also, DOX-h is a relatively inexpensive antibacterial drug, potent and possesses a broad-spectrum antibacterial action. Yet, it has found no place in bovine medicine as compared with oxytetracycline. DOX-h spectrum may be useful to treat important bacterial infections in calves, such as pneumonias (Ole-Mapenay et al., 1997), skin and soft tissue infections (Chopra et al., 1981), genital tract and gastrointestinal tract bacterial diseases such as salmonellosis and colibacillosis (Cunha et al., 1982).

An important limitation of DOX-h to be used in bovine medicine, is that potential tissue irritation impedes daily

* Corresponding author. Tel./fax: +52 55 56 22 59 80.
E-mail address: sumano@servidor.unam.mx (H. Sumano).

i.m. or s.c. injections (Vomand and Sumano, 1990). Considering the above, the objectives of this study were to design a non-irritating, long-acting preparation of DOX-h and establish its pharmacokinetics after its s.c. injection at a dose of 10 mg/kg of body weight in calves and compare these results with i.m. and i.v. pharmacokinetics of an aqueous preparation.

A poloxamer-based matrix was used to produce a long-acting formulation (DOX-h-LA). A poly(ethylene oxide)–poly(propylene oxide)–poly(ethylene oxide) block copolymer (poloxamer) was used as delivery vehicle-matrix, because it improves solubility, reduces hydrolytic degradation, achieves controlled release and often results in improved bioavailability (Kabanov et al., 1992; Tarr and Yalkowsky, 1987). In part these effects are obtained by its reversed temperature-dependant gelation; that is poloxamer-based formulation exhibit low viscosity at room temperature and become gel at body temperature (Schmolka, 1991).

To reduce irritation β -cyclodextrin was included. DOX-h/ β -cyclodextrin complexes may diminish or prevent tissue irritation by reducing the local concentration of free drug below the irritancy threshold (Yoshida et al., 1990; Uekama et al., 1998). Additionally β -cyclodextrin may enhance absorption rate, acting as initial boosting phase (Szeman et al., 1988; Szejtli, 1985).

2. Materials and methods

This study was approved by the Institutional Committee of Research, Care and Use of Experimental Animals (CIC-UAL), according to de Mexican Official Regulation NOM-062-ZOO-1999. This study was carried out at the experimental farm of the Facultad de Medicina Veterinaria of the Universidad Nacional Autónoma de México, located in Mexico City.

A subcutaneous LA preparation (100 mg/mL) of doxycycline hyclate (PARFARM Pharmaceuticals, Mexico City, Mexico) was developed, under sterile conditions. Inclusion complexes of doxycycline 10% (w/v) with β -cyclodextrin (1:0.1 M) (Cerestar Pharmaceutical Excipients, USA) were first formed by the kneading method which can be described as follows: β -cyclodextrin (0.1 M) and distilled water were mixed together in a mortar so as to obtain a homogeneous paste. Then, doxycycline (1 M) was added slowly. The mixture was ground for 30 min and an appropriate quantity of water was added to maintain a suitable consistency. The paste was dried in oven at 40–50 °C for 24 h. The dried complex was pulverized into a fine powder (Bekers et al., 1991). The resulting powder was diluted with a solution of 15% propylenglicol–10% ethyl alcohol in water. Then, this mixture was included in a reverse gel copolymer polyoxypropylene–polyoxyethylene (poloxamer) (BASF (Mexico City, Mexico)) adjusting pH to 7.0 with a phosphate buffer solution under constant stirring at 4 °C to reach a final concentration of 10% of doxycycline in 15% poloxamer. The preparation was regarded

as ready when a microemulsion is formed and this can be pin-pointed when the mixture clarifies. Then, 100 mL vials were prepared, stored at 4 °C and utilized during the following week.

Ten clinically healthy, 3-months-old Holstein–Friesian calves males, weighing a mean of 85 ± 5.8 kg were included in this trial. Animals were determined to be clinically normal on the basis of physical examination. Body weights were recorded for each animal on the day prior to initiation of the study. They had not been medicated with any antibacterial for at least 30 days. Each animal was maintained indoors on a diet of milk, alfalfa hay and pelleted feed concentrate and had access to water *ad libitum*. The same animals were used throughout and received all three treatments according to a three-way crossover model, randomly assigning the calves to a given treatment and with two washout periods of 30 days. Ten percent aqueous solutions were made from powder DOX-h diluted in sterile distilled water immediately before injection. A dose of 10 mg/kg in a volume approximately of 8.5 mL was administered by i.v. or i.m. in the jugular vein or in the semitendinosus/semimembranosus muscle of the right and left hind-limbs, respectively. The experimental, long-acting preparation of DOX-h developed for this trial (DOX-h-LA), was injected s.c. at the same dose. To minimize variations in absorption patterns from sites of injection, all animals received their dose of DOX-h-LA in two equally divided volumes in the neck. In order to achieve a close timing interval between administration of the drug and blood sampling from the jugular vein, a permanent-heparinised long catheter gauge No. 18 (Becton Dickinson®) was placed in each calf. Ten milliliters of blood samples were withdrawn after discarding the first 10 mL of heparinised blood. The times for collection after each dose were: 5, 10, 20, 30 min and 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48, 60, 72 and 94 h post-administration of the drug in all three groups. A basal sample before injection was also obtained. Blood was allowed to clot at room temperature for 2 h, serum harvested by centrifugation at 1500g for 5 min and frozen at –20°C for one week until analyzed.

Serum doxycycline concentrations were determined by the modified agar diffusion analysis, described by Bennett et al. (1966) with *Bacillus cereus* (ATCC 11778) as a test organism grown on Müeller-Hinton agar (Bioxon®). Drug concentrations were determined by comparing the diameter of zones of inhibition with those of various dilutions of the standard prepared in pooled antibacterial-free calf serum by the use of linear regression analysis. The intra-assay coefficient of variance was <4.9 and inter-assay error <4.8. The analytical assay was linear over a range of concentrations from 0.1 to 10 µg/mL, with a percent recovery of 94 ± 2 and a correlation coefficient (r^2) of 0.97 ± 0.1 . Limit of detection was 0.014 µg/mL and limit of quantification was 0.1 µg/mL.

A computerized curve-stripping program (PKAnalyst, Micromath Scientific Software) was used to fit and analyze the concentration vs. time profiles of each individual calf

and for the mean values. Best fitting models were chosen after analysis with residual sum of squares and the minimal Akaike's information criterion. The concentration vs. time profiles of doxycycline hyclate after i.m. administration of the drug were best fitted using a two compartment model with first-order input and first-order output using Model 14 ($r \geq 0.99$). Whose equation is

$$\text{Concentration (Time)} = Ae^{-\alpha \cdot \text{Time}} + Be^{-\beta \cdot \text{Time}} + Ce^{-K_{ab} \cdot \text{Time}}$$

The concentration–time curve of DOX-h i.v. was best fitted using a two compartment model as presented in Model 13 ($r \geq 0.99$), with the following formula:

$$\text{Concentration (Time)} = Ae^{-\alpha \cdot \text{Time}} + Be^{-\beta \cdot \text{Time}}$$

The concentration–time curve of DOX-h s.c. was best fitted using a one compartment open model as presented in Model 3 ($r \geq 0.98$), with the following formula:

$$\text{Concentration (Time)} = \frac{\text{Dose} \cdot K_{ab}}{\text{Volume}(K_{ab} - K_{elim})} e^{(K_{elim} \cdot \text{Time})} - e^{(K_{ab} \cdot \text{Time})}$$

Pharmacokinetic variables obtained with PKAnalyst were: AUC = Area under the curve; AUC_{∞} area under the curve to infinite; MRT = mean residence time; A , B , = hybrid rate constants; α , β = rate constants for the distribution and elimination phases, respectively; $T_{1/2\beta}$ = half-life of the elimination; $T_{1/2ab}$ = half-life of the absorption; K_{elim} = constant for drug elimination; K_{ab} = constant for drug absorption; C_{max} = peak concentration, T_{max} = peak time; C_{s0} = maximum serum concentration at zero.

Other variables, such as $V_{d_{area}}$ = apparent volume of distribution based on trapezoid AUC; $V_{d_{ss}}$ = apparent volume of distribution at steady state; V_{d_c} = apparent volume of the central compartment; AUC_{∞} = area under the curve-infinity and Cl = body clearance, were obtained with standard formulas, as proposed by Welling (1997). Absolute bioavailability ($F\%$) for the s.c. administration was calculated using the equation:

$$F\% = \frac{\text{AUC e.v.}}{\text{AUC i.v.}} \times \frac{\text{Dose i.v.}}{\text{Dose e.v.}} \times 100$$

Data are presented as mean \pm standard deviation of 10 observations for each parameter and for statistical comparisons of C_{max} , T_{max} , AUC, MRT and $T_{1/2\beta}$ among groups the ANOVA and Bonferroni-test, were used.

3. Results

Mean \pm 1 SD serum concentrations–time profiles of doxycycline for the three treatments are presented in Figs. 1 and 2. Table 1 summarizes all pharmacokinetic variables obtained, which showed normal distribution for the three groups. A statistical comparison of means, made for those variables shared by the three administration routes, is also presented in Table 1.

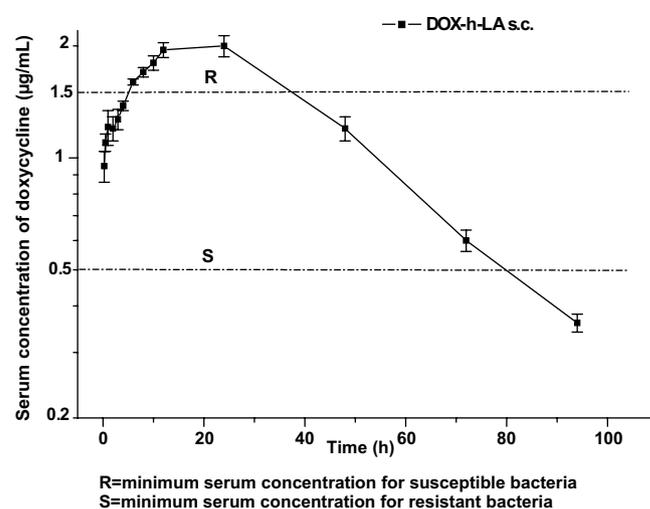


Fig. 1. Mean \pm 1 SD serum concentrations of doxycycline in calves ($n = 10$), following the s.c. injection of 10 mg/kg of a long-acting preparation of doxycycline hyclate.

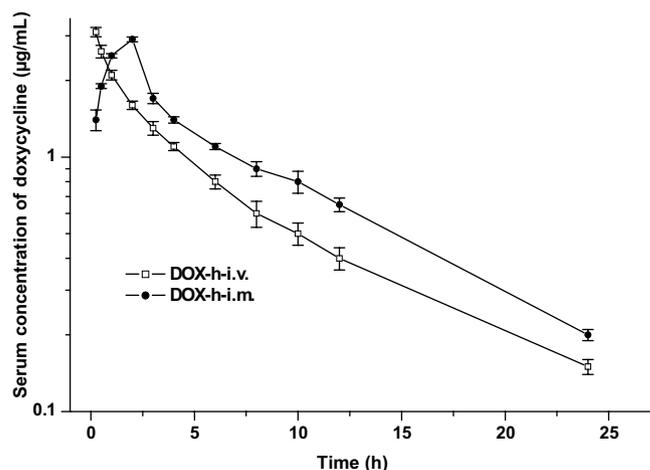


Fig. 2. Mean \pm 1 SD serum concentrations of doxycycline in calves ($n = 10$), following the i.v. or i.m. injection of 10 mg/kg of an aqueous preparation of doxycycline hyclate.

Comparisons for AUC, MRT and $T_{1/2\beta}$, showed that all these variables were statistically larger in group DOX-h-LA as compared to groups DOX-h-i.m. and DOX-h-i.v. (P ranging from <0.05 to <0.001). Bioavailability for the DOX-h-LA group was 602%, while the same variable for the DOX-h-i.m. group was 115%.

The mean elimination half-lives obtained were 40.81 ± 2.97 h for DOX-h-LA; 9.56 ± 1.84 for the DOX-h-i.m. and 5.8 ± 0.66 for DOX-h-i.v. Differences among these means was statistically significant in all comparisons ($P < 0.001$).

Based on an arbitrary minimal therapeutic concentrations a comparative assessment was made of the length of time for which a given serum concentration of doxycycline was maintained or exceeded. Chosen values were: S = for susceptible bacteria, when MICs were ≤ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ and R = for resistant bacteria, when MICs were above

Table 1

Mean \pm SD. of the pharmacokinetic parameters of doxycycline hyclate following i.v., i.m and s.c. injection of 10 mg/kg⁻¹ in calves ($n = 10$) DOX-h powder dissolved in sterile distilled water for administration routes i.v. or i.m. and DOX-h-LA (poloxamer and β -cyclodextrin) for s.c. administration

Parameters	DOX-h i.v.	DOX-h i.m.	DOX-h-LA s.c.
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
AUC ($\mu\text{g h/mL}$)	20.46 \pm 1.13 ^a	20.16 \pm 1.70 ^a	130.68 \pm 5.99 ^c
AUC _∞ ($\mu\text{g h/mL}$)	21.46 \pm 2.71	21.16 \pm 2.01	166.00 \pm 6.11
MRT (h)	12.48 \pm 1.99 ^a	12.00 \pm 1.62 ^a	54.30 \pm 2.75 ^c
A ($\mu\text{g/mL}$)	1.80 \pm 0.35	2.81 \pm 1.56	–
α (h^{-1})	0.25 \pm 0.02	0.96 \pm 0.06	–
B ($\mu\text{g/mL}$)	0.53 \pm 0.09	1.64 \pm 0.20	–
β (h^{-1})	0.04 \pm 0.01	0.07 \pm 0.02	–
$T_{1/2\beta}$ (h)	5.80 \pm 0.66 ^a	9.56 \pm 1.84 ^b	40.81 \pm 2.97 ^c
$T_{1/2ab}$ (h)	–	2.68 \pm 0.08	5.89 \pm 0.35
K_{elim} (h^{-1})	0.03 \pm 0.03	0.16 \pm 0.05	0.02 \pm 0.008
K_{ab} (h^{-1})	–	0.18 \pm 0.06	0.33 \pm 0.008
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	–	2.90 \pm 0.96 ^b	1.99 \pm 0.83 ^c
C_{S_0} ($\mu\text{g/mL}$)	3.10 \pm 0.05	–	–
T_{max} (h)	–	4.50 \pm 0.12 ^b	25.00 \pm 2.03 ^c
$V_{d_{\text{area}}}$ (L/kg)	3.21 \pm 0.13	1.12 \pm 0.09	0.38 \pm 0.01
$V_{d_{\text{ss}}}$ (L/kg)	8.15 \pm 0.15	–	–
V_{d_c} (L/kg)	3.30 \pm 0.09	–	–
Cl (L/h kg)	0.09 \pm 0.05	0.03 \pm 0.001	0.02 \pm 0.002
F (%)	–	115 \pm 2.41 ^a	602 \pm 2.91 ^b

AUC = area under the curve; AUC_∞ = area under the curve to infinite; MRT = mean residence time; A = intercept of the distribution phase, B = intercept of the elimination phase; alpha, α , beta, β = rate constants for the distribution and elimination phases, respectively; $T_{1/2\beta}$ = half-life of the elimination; $T_{1/2ab}$ = half-life of the absorption; K_{elim} = constant for drug elimination; K_{ab} = constant for drug absorption; C_{max} = peak concentration, C_{S_0} = maximum serum concentration at zero time; T_{max} = peak time; $V_{d_{\text{area}}}$ = apparent volume of distribution based on trapezoid AUC; $V_{d_{\text{ss}}}$ = apparent volume of distribution at steady state; V_{d_c} = apparent volume of the central compartment; Cl = body clearance; (F%) = bioavailability.

^{a,b,c} The values within a row with no common superscript differ significantly ($P < 0.05$).

1.5 $\mu\text{g/mL}$. Then, DOX-h-i.v. was above the *S* level for 9.7 h, but only 1.5 h for the *R* level; DOX-h-i.m. formulation exceeded the same concentrations for 17 h and 3 h, respectively and DOX-h-LA extended these time-periods to 80 h and 30 h, respectively. The time at which serum concentrations were above the *S* or *R* concentrations were statistically different when comparing DOX-h-LA with either the DOX-h-i.v. and DOX-h-i.m. preparations ($P < 0.001$).

No inflammatory response was observed at the injection site with the DOX-h-LA preparation. However, a well defined apparently painless bulge remains detectable for up to 30 days beginning with an approximate size of 5 \times 8 \times 1 cm and disappearing steadily. This bulge is not believed to be an inflammatory response, but rather space occupied by poloxamer when becoming gel at body temperature. After this time no lesion could be detected. Animals did not show any sign of pain or discomfort with the long-acting preparation. In contrast pain and swelling were evident with aqueous formulation for 4–5 days.

4. Discussion

A flip-flop pharmacokinetic model can be established by the overall appearance of the serum concentration vs. time profile of the drug, considering that the rate of absorption is slower than the rate of elimination; this is not always a clear-cut panorama. According to Boxenbaum (1998) a flip-flop model can be recognized when the plasma concentration–time profile tends either to closely parallel rate of absorption. This provides a simple and effective way to visualize the shape of the rate of absorption profile. Thus applying the following equation, a “flip-flop” condition may be demonstrated for this preparation:

$$\text{Rate of absorption} = Vz(KC + (\Delta C/\Delta t))$$

where, Vz is the terminal exponential volume of distribution, K is the terminal disposition rate constant once drug absorption is complete (best determined from i.v. dosing), C is the plasma concentration at time t and ΔC is the change in plasma concentration over the time interval Δt . For DOX-h-LA plasma concentration–time data at 24 and 48 h, $\Delta C/\Delta t = 0.024 \mu\text{g/mL/h}$. At the midpoint of this time period (36 h), $(K)(C) = 1.54 \mu\text{g/mL/h}$. Since $KC \gg \Delta C/\Delta t$, rate of absorption \approx rate of elimination, a “flip-flop” condition exists and the DOX-h-LA here described can be regarded as a true long-acting one.

With the purpose of defining bacterial susceptibility to doxycycline, minimal inhibitory concentrations (MIC) reported in cattle can be categorized as sensitive (from $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$) and resistant ($\geq 1.5 \mu\text{g/mL}$) (Brook et al., 2001; Hospenthal and Murray, 2003; Guerin-Fauble et al., 1993; Jee et al., 2004; Yoshimura et al., 2001). For human isolates, Cunha et al. (1982) found MIC for *Escherichia coli* of 1.5 $\mu\text{g/mL}$, for *Staphylococcus aureus* 0.28 $\mu\text{g/mL}$, for *Pasteurella multocida* 0.09 $\mu\text{g/mL}$, and for *Streptococcus pneumoniae* 0.16 $\mu\text{g/mL}$. These data is in agreement with Notari (1980) who suggested a serum concentration from 0.5 to 1 $\mu\text{g/mL}$ as the therapeutic range for this antibacterial drug. Considering the above and the fact that doxycycline can be regarded as a time-dependant antibacterial drug, the best pharmacokinetic–pharmacodynamic profile would be achieved when serum concentrations of the drug are never below the MIC at any time during dosing interval (Prescott et al., 2000; Craig, 1998). Then, for susceptible bacteria, aqueous DOX-h-i.v. should be injected every 9.7 h, aqueous DOX-h-i.m. every 17 h and DOX-h-LA every 80 h. For the two former preparations, it appears unpractical to comply, while a 3 day dosing interval for the DOX-h-LA preparation seems reasonable.

According to Cunha et al. (1982) doxycycline has a maximum clinical efficacy when the drug achieves serum concentrations of four times the MIC. However, AUC_∞/MIC ratios for bovine or human pathogens have not been established. Nevertheless, taking MIC data from Cunha et al. (1982), such ratios for the DOX-h-LA will vary from 27 for *E. coli* to 259 and 461 for *S. pneumoniae* and *P. multocida*, respectively. Empirically, these ratios comply

well with suggested AUC/MIC values for the treatment of pneumonia in humans (Ailani et al., 1999); yet lack of reliable data when relating AUC/MIC ratios for tetracyclines is still lacking.

The DOX-h-LA preparation based on a poloxamer, β -cyclodextrin combination achieved a C_{\max} of $1.99 \pm 0.83 \mu\text{g/mL}$ at a T_{\max} of 25 h. Then serum concentrations declined slowly, always exceeding the lower set limit of $0.5 \mu\text{g/mL}$ for 80 h with a MRT of 54.30 h. In preruminant calves Meijer et al. (1993) found a C_{\max} of $2.3 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$ with a T_{\max} of 3.4 h after repeated oral administration of doxycycline at a dose of 5 mg/kg twice daily during five days. These values largely exceed previously reported data for doxycycline in goats ($C_{\max} = 1.60 \mu\text{g/mL}$ and $T_{\max} = 0.86 \text{ h}$) (Abd et al., 2004). A dose of 20 mg/kg i.m. in goats resulted in a C_{\max} of $3.87 \mu\text{g/mL}$ in neumoniac animals and $5.56 \mu\text{g/mL}$ in healthy ones (Ole-Mapenay et al., 1997). But, the same dose was reported to achieve only a C_{\max} of $1.87 \mu\text{g/mL}$ with a T_{\max} of 0.85 h in African goats (Ole-Mapenay and Mitema, 1995). Thus, considering the above is safe to state that C_{\max} achieved by the DOX-h-LA provides therapeutic levels.

For doxycycline, Ziv and Sulman (1974) found a $T_{1/2\beta}$ of $9.24 \pm 1.0 \text{ h}$ and $9.5 \pm 1.2 \text{ h}$ after intravenous administration to cows and ewes, respectively. After i.v. administration of doxycycline to calves with mature and immature rumen function, a $T_{1/2\beta}$ of 14.9 h and 9.5 to 9.9 h was obtained respectively (Riond et al., 1980; Meijer et al., 1993). In this study $T_{1/2\beta}$ for DOX-h-i.v. was 5.8 h; 9.56 h for DOX-h-i.m. and 40.81 for the DOX-h-LA preparation. For non-LA preparation differences in $T_{1/2\beta}$ among these studies may be related to vehicles used to dissolve and stabilize doxycycline. The drug turns black in less than an hour after dissolving it in injectable water. This was not the case for the LA preparation. In part poloxamer and cyclodextrin–doxycycline complexes may delay such degradation. DOX-h-LA preparation remained unaltered at 4°C for more than 3 months.

Bioavailability of doxycycline for the DOX-h-LA group was 602%, while the same variable for the DOX-h-i.m. group was 115%. It is theoretically possible for a controlled release formulation to have a much greater plasma AUC than a non-formulated form of the drug (Inskip and Darrington, 2000). The combined influences of a low clearance of the drug and its high lipid solubility may account for this unusual high F value.

In spite of the absence of second serum peaks of the drug, redistribution phenomena and enterohepatic recirculation could explain, in part, the large F values obtained. Additionally, it is known that LA preparations usually present large values of F (Gibaldi and Perrier, 1982). In studies in goats, systemic bioavailability of doxycycline after i.m. injection of 5 mg/kg was 99.4% (Abd et al., 2004) and 70% in calves (Riond and Riviere, 1988). It is not uncommon to obtain large F value for sustained release preparations (Gilbert et al., 1987; Lawrence, 1994). It has been stated that it is possible for a

controlled release formulation to have a much greater plasma AUC than a non-formulated form of the same active principle (Inskip and Darrington, 2000). Apart from this, a list of various factors leading to bioavailability higher than 100% has been provided by Toutain and Bousquet-Mélou (2004). They include chemically oriented reasons, sampling and handling errors or experimental design flaws, and analytical deficiencies or miscalculations. A careful review of these and other factors listed by these authors offered no clear explanation as to the large value of F obtained by the DOX-h-LA preparation in this study. Hence, a recycling phenomenon due to the noticeably high lipid solubility of doxycycline (Aronson, 1980; Chopra et al., 1981) and the controlled release of doxycycline from the DOX-h-LA preparation, are so far, the only reasons to explain this result. The adequate C_{\max} obtained for the DOX-h-LA preparation is thought to be partly due to an enhanced absorption caused by β -cyclodextrins.

The principal purpose of designing a DOX-h-LA preparation was to provide, with a single injection, serum doxycycline concentrations equivalent in practical terms to one or various injections of a conventional doxycycline product per day. Being a time-dependant antibacterial drug it can be expected that clinical efficacy of the DOX-h-LA preparation should be at least equivalent to the one obtained with non-LA preparations administered once or twice per day, but with a significant reduction in work load, cost and animal stress. Hence, among other considerations, clinical trials and residue studies are needed to assess if this preparation can be regarded as potentially useful in bovine medicine.

Undoubtedly, further studies may optimize the formulation, and it is necessary to state that the use of this drug could not be recommended until tissue concentration and residue studies have been performed. Also, in spite of evidence that indicate lack of toxicity of poloxamer and β -cyclodextrin in various species (Lawrence, 1994), assessment of the safety of this preparation in the targeted species, is warranted.

References

- Abd, A.M., Aty, E.L., Goudaha, A., Zhou, H.H., 2004. Pharmacokinetics of doxycycline after administration as a single intravenous bolus and intramuscular doses to non-lactating Egyptian goats. *Pharmacological Research* 49, 487–491.
- Ailani, R.K., Agastya, G., Ailani, R.K., Mukunda, B.N., Shekar, R., 1999. Doxycycline is a cost-effective therapy for hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Archives of Internal Medicine* 159, 266–270.
- Aronson, Al., 1980. Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 176, 1061–1068.
- Bekers, O., Uijtendaal, E.V., Beijnen, J.H., Bult, A., Underberg, W.J.M., 1991. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug development and Industrial Pharmacy* 17, 1503–1549.
- Bennett, J.V., Brodie, J.L., Benner, E.J., Kirby, W.M., 1966. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Applied Microbiology* 14, 170–177.

- Boxenbaum, H., 1998. Pharmacokinetics tricks and traps: flip-flop models. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 1, 90–91.
- Brook, I., Elliott, T.B., Pryor, H.I., Sautter, T.E., Gnade, B.T., Thakar, J.H., Knudson, G.B., 2001. In vitro resistance of *Bacillus anthracis* Sterne to doxycycline, macrolides and quinolones. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18, 559–562.
- Chopra, I., Howe, T.G.B., Linton, K.B., Richmond, M.H., Speller, D.C.E., 1981. The tetracyclines: prospects at the beginning of the 1980s. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 8, 5–21.
- Craig, W., 1998. Pharmacokinetic–pharmacodynamic parameters: rationale for antibiotic use in mice and men. *Clinical Infectious Diseases* 26, 1–12.
- Cunha, B.A., Sibley, C.M., Ristuccia, A.M., 1982. Doxycycline. *Therapeutic Drug Monitoring* 4, 115–135.
- Gibaldi, M., Perrier, D., 1982. *Pharmacokinetics*, second ed. Marcel Dekker, New York, pp. 409–417.
- Gilbert, J.C., Richardson, J.L., Davies, M.C., Palin, K.J., 1987. The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F127 solutions for controlled drug delivery. *Journal of Controlled Release* 5, 113–118.
- Guerin-Fauble, V., Flandrois, J.P., Broye, E., Tupin, F., Richard, Y., 1993. *Actinomyces pyogenes*: susceptibility of 103 clinical animal isolates to 22 antimicrobial agents. *Veterinary Research* 24, 251–259.
- Hospenthal, D.R., Murray, C.K., 2003. In vitro susceptibilities of seven *Leptospira* species to traditional and newer antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47, 2646–2648.
- Inskip, P.B., Darrington, R.T., 2000. *Controlled Release Veterinary Drug Delivery*. In: Rathbone, M.J., Gurny, R. (Eds.). Elsevier Science B.V., Amsterdam, pp. 1–15.
- Jee, J.B., Degraevs, F.J., Kim, T.Y., Kaltenboeck, B., 2004. High prevalence of natural chlamydia species infection in calves. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 5664–5672.
- Kabanov, A.V., Batrakova, E.V., Melik-Nubarov, N.S., Fedoseev, N.A., Dorodnich, T.Y., Alakhov, V.Y., Chekonin, V.P., Nazarova, I.R., 1992. A new class of drug carriers: micelles of poly(oxyethylene)–poly(oxypropylene)–poly(oxyethylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain. *Journal of Controlled Release* 22, 141–158.
- Lawrence, M.J., 1994. Surfactant systems microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. *European Journal of Drug and Pharmacokinetics* 19, 257–259.
- Meijer, L.A., Ceysens, K.G.F., De Greve, B.I., De Bruijn, W., 1993. Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline hyclate after oral administration in calves. *The Veterinary Quarterly* 15, 1–5.
- Notari, R.E., 1980. In: Notari, R.E., (Ed.), *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*. An Introduction, third ed. Marcel Dekker, New York, pp. 45–212.
- Ole-Mapenay, I.M., Mitema, E.S., 1995. Some pharmacokinetic parameters of doxycycline in east African goats after intramuscular administration of a long acting formula. *Veterinary Research Communications* 19, 425–432.
- Ole-Mapenay, I.M., Mitema, E.S., Mathio, T.E., 1997. Aspects of pharmacokinetics of doxycycline given to healthy and pneumonic east African dwarf goats by intramuscular injection. *Veterinary Research Communications* 21, 453–462.
- Prescott, J.F., Baggot, J.D., Walker, R.D., 2000. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, third ed. Iowa State University Press, Ames Iowa, USA, pp. 275–289.
- Riond, J.L., Riviere, J.E., 1988. Pharmacokinetics and toxicology of doxycycline. *Veterinary and Human Toxicology* 30, 431–444.
- Riond, J.L., Riviere, J.E., 1989. Doxycycline binding to plasma albumin of several species. *Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics* 12, 253–260.
- Riond, J.L., Tyezkowska, K., Riviere, J.E., 1980. Pharmacokinetics and metabolic inertness of doxycycline in calves with mature or immature rumen function. *American Journal of Veterinary Research* 50, 1329–1332.
- Schmolka, I.R., 1991. In: Tarcha, P.J. (Ed.), *Polymers of Controlled Drug Delivery*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 189–214.
- Shaw, D.H., Rubin, S.T., 1986. Pharmacologic activity of doxycycline. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 189, 808–810.
- Suzuka, I., Kaji, H., Kaji, A., 1966. Binding of specific sRNA to 30S ribosomal subunits: effects of 50S ribosomal subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55, 1483–1486.
- Szejtli, J., 1985. In: Smolen, V.F., Ball, L.A. (Eds.), *Controlled Drug Bioavailability*. John-Wiley and sons, New York, pp. 365–421.
- Szeman, J., Stadier-Szoke, A., Vikmon, M., Szejtli, J., 1988. Stabilization of prostacyclin and furosemide by cyclodextrins. *Chemical Abstracts* 108, 392.
- Tarr, B.D., Yalkowsky, S.H., 1987. A new parenteral vehicle for the administration of some poorly water soluble anti-cancer drugs. *Journal of Parenteral Science and Technology* 41, 31–33.
- Toutain, P.L., Bousquet-Mélou, A., 2004. Bioavailability and its assessment. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27, 455–466.
- Uekama, K., Hirayama, F., Irie, T., 1998. Cyclodextrin drug carrier systems. *Chemistry Reviews* 98, 2045–2076.
- Vomand, K.C., Sumano, L.H., 1990. Adverse drug reactions in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 197, 899–905.
- Welling, P.G., 1997. *Pharmacokinetics, Processes, Mathematics and Applications*, second ed. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 11–34.
- Yoshida, A., Yamamoto, M., Itoh, T., Irie, T., Hirayama, F., Uekama, K., 1990. Utility of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in an intramuscular injectable preparation of nimodipine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 38, 176–179.
- Yoshimura, H., Ishimura, M., Endoh, Y.S., Kojima, A., 2001. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. *Journal of Veterinary Medicine* 48, 555–560.
- Ziv, G., Sulman, F.G., 1974. Analysis of pharmacokinetic properties of nine tetracycline analogues in dairy cow and ewes. *American Journal of Veterinary Research* 35, 1197–1201.

Eiliger Abzug der
Urgent
Rücksendung eines genehmigten Abzuges erbeten an:
Please return one corrected copy to:
ECV - Editio Cantor Verlag · Baendelstockweg 20
88326 Aulendorf (Germany)
Fax + 49 (0)7525 940 127 · Tel. + 49 (0)7525 9400
e-mail: redaktion.nf@ecv.de

Korrektur
proof

AF

AF 0408-02

Pharmacokinetics of Doxycycline and Tissue Concentrations of an Experimental Long-acting Parenteral Formulation of Doxycycline in Wistar Rats

Dinorah Vargas-Estrada, Lilia Gutiérrez, Ivan Juárez-Rodríguez, Héctor Sumano

Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City (Mexico)

Corresponding author: Héctor Sumano, DVM, MD, PhD, Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, Delegación Coyoacán, Ciudad de México C.P. 04510 (México); e-mail: sumano@servidor.unam.mx

Key words

- Antibacterials
- CAS 24390-14-5
- Doxycycline, pharmacokinetics, rat, sustained-release

Arzneimittel-Forschung
(Drug Research)
2008;58(■): ■ - ■

Abstract

Doxycycline hyclate (CAS 24390-14-5, doxycycline-h), an antibacterial with time-dependent action, was formulated as a non-irritating long-acting parenteral formulation based on a β -cyclodextrin: poloxamer-based matrix (doxycycline-h-LA). Tissue and serum concentrations vs time profile were investigated after its subcutaneous injection to Wistar rats. Serum concentration profiles and key pharmacokinetic (PK) variables of doxycycline-h-LA were compared to the corresponding profiles and PK values obtained with an aqueous formulation of doxycycline-h administered either intramuscularly, orally or intravenously to Wistar

rats. In all groups, the dose was 10 mg/kg. Doxycycline-h-LA showed outstanding bioavailability (951 % or 477 % if a correction formula is considered), as compared to the one obtained with an aqueous formulation (106–82 %, respectively). Corresponding values for maximum serum concentration were 3.19 $\mu\text{g/ml}$ and 3.00 $\mu\text{g/ml}$, respectively, and elimination half-lives were completely different: 42.49 h and 2.77 h for doxycycline-h-LA and the aqueous formulation, respectively. Considering minimal inhibitory concentrations of doxycycline for sensitive and resistant bacteria (from ≤ 0.5 to ≥ 1.5 $\mu\text{g/ml}$), doxycycline-h-LA could be injected every 2 or 3 days, while aqueous doxycycline-h would require a dosing interval from 7.5 to 11 h. But if tissue concentrations are taken as braking points, the dosing interval will vary from 48 to 94 h. For doxycycline-h-LA, mean tissue:serum ratios were 2:1 for lungs, 9.8:1 for kidneys and 2.2:1 for intestine homogenates. These values are in close agreement with those found for the distribution of doxycycline in other species.

1. Introduction

Doxycycline, usually available as hydrochloride (CAS 24390-14-5), is a highly lipid-soluble antimicrobial, effective against a broad range of Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Mycoplasma* sp and rickettsias. The antibacterial effects of doxycycline hyclate are mainly based on hindering bacterial protein synthesis by interfering with the binding of aminoacyl-tRNA to the mRNA ribosome complex thus arresting growth [1]. This mechanism of action appears to be time-dependent rather than concentration-dependent [2]. Hence, a clear therapeutic advantage of this drug will be obtained if the elimination half-life can be prolonged by means of a long-acting preparation. It has been proposed that this antibacterial drug may be of use to treat respiratory [3], skin and soft tissue [4], urinary tract, genital tract and

gastrointestinal tract bacterial diseases, including salmonellosis and colibacillosis [5]. Doxycycline calcium or monohydrate are administered orally as conventional oral suspensions, while doxycycline hyclate or monohydrate are available as conventional capsules, film-coated tablets or even delayed-release capsules or tablets. To reduce the risk of esophageal irritation and ulceration, capsules or tablets containing doxycycline hyclate or doxycycline monohydrate should be administered with adequate amounts of fluid or food, and should not be given at bedtime or to patients with esophageal obstruction or compression. Also, depending on the dose, i. v. infusions of doxycycline hyclate usually are given over 1–4 h and extravasation should be avoided. However, doxycycline hyclate has found no place as an extravascularly administered drug because the i. m. or s. c. injection causes severe pain and tissue irritation [6, 7]. In spite of this disadvantage, pharmacokinetic (PK) variables of doxycycline have been established after oral and i. v. administration in calves [8, 9], cats and dogs [10] and other species [11, 12]. In goats, PK was established after i. v. and i. m. administration [3, 13, 14]. Yet, no commercial preparations are available world-wide. The major elimination route of doxycycline in man and dogs occurs through the intestinal secretions into the lumen (75%), with the urinary and biliary excretion accounting for 16 to 22% and <5%, respectively [15]. Renal impairment increases intestinal excretion; hence doxycycline does not accumulate in rats, humans and dogs with renal failure [16, 17]. If urinary pH is increased to 7.5 to 8 in humans, the clearance of doxycycline is increased by 65% [18].

The pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationship of doxycycline suggests that it can be regarded as an antibacterial with time-dependent action. Hence, a parenteral long-acting preparation could improve its antibacterial effects. These considerations were the impetus to prepare an experimental non-irritating, long-acting preparation of doxycycline and determine its pharmacokinetics as well as the tissue concentrations achieved after its s. c. injection to rats.

2. Materials and methods

This study was approved by the Institutional Committee of Research, Care and Use of Experimental Animals (CICUAL) of National Autonomous University of Mexico, according to the Mexican Official Regulation NOM-062-ZOO-1999.

2.1 Animals (care and dosing)

One hundred and ninety-two clinically healthy male Wistar rats were used. The rats were obtained from the Animal House of the Instituto de Fisiología Celular at National Autonomous University of Mexico. The animals had an average weight of 345 g and were 3 months old. They had been non-medicated for at least 30 days prior to this trial and were fed with Rodent Lab Chow 5001® (Purina México, México), and potable-water was made available *ad libitum*. Four experimental groups of rats were randomly formed in accordance with two preparations of doxycycline hyclate and three administration routes with a single dose of 10 mg/kg:

Group 1 (n = 48) received a single i. v. dose of an aqueous preparation of doxycycline hyclate (doxycycline-h) in a volume of approximately 400 μ l.

Group 2 (n = 48) was dosed p. o. with a semi-rigid tube with the same aqueous doxycycline-h.

Group 3 (n = 56) was injected s. c. in the dorsal region with aqueous doxycycline-h under pentobarbital anesthesia.

Group 4 (n = 44) received a single s. c. injection of a long-acting preparation of doxycycline-h in a β -cyclodextrin-poloxamer matrix (doxycycline-h-LA), using the specified dose.

2.2 Chemicals

All injectable preparations utilized in this trial were prepared in a sterile environment with laminar flux air turnover and the resulting preparation was bottled prior to filtration with Durapore 0.45 μ m (Millipore, México D. E.). The aqueous formulation of doxycycline-h (Parfarm Pharmaceuticals, Mexico City, Mexico) was prepared from powder, dissolved in sterile distilled water just before administration. The subcutaneous LA preparation of doxycycline-h (100 mg/ml) was prepared under sterile conditions. First, inclusion complexes of doxycycline 10% (w/v) with β -cyclodextrin (1:0.1 mol/L) (Cerestar Pharmaceutical Excipients, IN, USA) were induced through the kneading method [19]. The resulting powder was diluted with 15% propylene glycol + 10% ethyl alcohol aqueous solution. Then, this mixture was included in a reverse gel made with copolymer polyoxypropyl-polyoxyethylene (poloxamer) (BASF Mexicana, México D.E.). The pH was adjusted to 7.0 with a phosphate buffer solution under constant stirring at 4°C to reach a final concentration of 10% of doxycycline in 15% poloxamer. The preparation was regarded as ready when the microemulsion was formed [20] and this could be pin-pointed when the preparation became clear. Then, 10 ml vials were bottled, sealed and stored at 4°C until utilized within one week. This preparation was stable as assessed by a standard accelerated stability test. Yet, gel formation occurs at 35°C. This change was also reversible, changing to the stable clear-emulsion preparation if refrigerated at 4°C at any time.

2.3 Sample collection and analysis

Blood samples were collected from 4 rats per time in all groups by direct cardiac puncture under sodium pentobarbital anesthesia, according to the following time schedule: groups 1, 2 and 3 at 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h; group 4 at 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120 h after drug injection. A basal sample (400 μ l) before injection was also obtained in all groups. Eight to nine μ l could be collected. Blood was allowed to clot at room temperature for 2 h, serum was harvested by centrifugation at 1,500 g for 5 min and frozen at -20°C for one week until analyzed. After blood collection animals received an overdose of pentobarbital to induce euthanasia.

In group 4, lungs, kidneys and intestine were removed after euthanasia from all 4 rats at each sampling time. Samples were placed into Eppendorf tubes and frozen in liquid nitrogen until analyzed to determine concentrations of doxycycline. In groups 3 and 4, local tissue irritation was assessed by removing the injection site and analyzing it histopathologically at 24 h, 120 h

and 15 days after injection.

Serum and tissue concentrations of doxycycline were determined by the modified agar diffusion analysis [21], using *Bacillus cereus* (ATCC 11778) as a test organism grown on Mueller-Hinton agar (Bioxon®, Becton Dickinson de Mexico S.A de C.V., Carretera Mexico Queretaro, Mexico) and pooled antibacterial-free rat serum as diluent. Doxycycline was extracted from tissues using the method described in [22]. Fortified tissue samples rendered a percent recovery of 88%. The intra-assay coefficient of variance was <1.4 and inter-assay error was <1.5. The analytical assay for tissue samples was linear over a concentration range from 0.1 to 10 µg/ml, with a correlation coefficient (r^2) of 0.92 ± 0.3 . Percent recovery from serum samples was 94 ± 2 and a correlation coefficient (r^2) of 0.97 ± 0.1 was obtained. The limit of detection was 0.03 µg/ml and the limit of quantification was 0.05 µg/ml.

2.4 Data analysis

A computerized curve-stripping program (PKAnalyst, Micro-math Scientific Software, Salt Lake City, UT, USA) was used to fit and analyze the concentration vs. time profiles of each individual rat and for the mean values. Best fitting models were chosen after analysis with residual sum of squares and the minimal Akaike's information criterion. For the p. o. and s. c. route of an aqueous preparation (doxycycline-h) best fit was obtained using a two-compartment model with first-order input and first-order output using Model 13 ($r \geq 0.98$), with the following formula

$$\text{Concentration (Time)} = A \cdot e^{-\alpha \cdot \text{Time}} + B e^{-\beta \cdot \text{Time}} + C e^{K_{12} \cdot \text{Time}}$$

The concentration-time curve of doxycycline-h i. v. was best fitted using a two-compartment model as presented in Model 7 ($r \geq 0.99$), with the following formula:

$$\text{Concentration (Time)} = A e^{-\alpha \cdot \text{Time}} + B e^{-\beta \cdot \text{Time}}$$

for the s.c. administration of doxycycline-h-LA a one compartment open model (Model 14, $r \geq 0.98$) was chosen, with the following formula:

$$\text{Concentration (Time)} = A e^{-\alpha \cdot (\text{Time} - \text{Time}_{lag})} + B e^{-\beta \cdot (\text{Time} - \text{Time}_{lag})} + C e^{-K_{el} \cdot (\text{Time} - \text{Time}_{lag})}$$

Pharmacokinetic variables obtained with PKAnalyst were: AUC = area under the curve; MRT = mean residence time; A, B = hybrid rate constants; α , β = rate constants for the distribution and elimination phases, respectively; K_{12} = transfer rate from the first compartment to the second compartment; K_{21} = transfer rate from the second compartment to the first compartment; $T_{1/2\alpha}$ = half-life of the distribution; $T_{1/2\beta}$ = half-life of the elimination; K_{el} = constant for drug elimination; K_{ab} = constant for drug absorption; C_{max} = peak concentration; T_{max} = peak time; C_{s0} = maximum serum concentration at time zero.

Other variables, such as Vd_{area} = apparent volume of distribution based on trapezoid AUC; $AUC_{0-\infty}$ = area under the curve-infinity and Cl = body clearance, were obtained with standard formulas [23]. Two bioavailability (F%) values were calculated using the following equations [24]:

$$F (\%) = [(AUC_{e.v.}/AUC_{i.v.}) \times (Dosis_{i.v.}/Dosis_{e.v.})] \times 100$$

$$F (\%) = [(AUC_{e.v.}/AUC_{i.v.}) \times (T_{1/2\beta\ i.v.}/T_{1/2\beta\ e.v.})] \times 100$$

■Author: Do you agree to the changed presentation of above two formulas?■

Statistical analysis was carried out by means of ANOVA, followed by Bonferroni t test. Data is presented as mean \pm 1 SD.

3. Results

Mean \pm 1 SD serum and tissue concentrations/time profiles of doxycycline are presented in Fig. 1 and 2. Table 1 shows the corresponding pharmacokinetic variables. Comparison of means revealed statistically significant differences for the doxycycline-h-LA preparation in AUC,

AUC_{0-∞}, MRT, T_{1/2β}, K_{ab}, T_{1/2αβ}, Cl_{cr} and both F values.

The histopathology of the injection sites of the doxycycline-h-LA preparation (group 4) showed a lack of inflammatory response. However, a well defined, apparently painless bulge remained detectable during 5-7 days. This bulge was not accompanied by an inflammatory response, rather the space was occupied by the poloxamer matrix when becoming a gel at body temperature. In this group of rats no lesion or bulge could be detected beyond this time. The animals did not show any sign of pain or discomfort with the long-acting preparation, contrary to the group receiving the s. c. dose of doxycycline-h. In these rats a clear inflammatory response and tenderness were easily distinguished for at least 7 days. Fig. 3 shows typical histopathological images of the injection site at 96 h for the group medicated with doxycycline-h-LA and the comparative image of the group receiving aqueous doxycycline-h. Focal to multifocal inflammatory infiltrates with mononuclear cells, paniculitis, and necrotic-suppurative diffuse myositis became apparent in the latter group. In the former one, only light diffuse mononuclear cells caused by the presence of poloxamer matrix when becoming a gel at body temperature were apparent and the presence of these cells was transient.

■ Fig. 1-3, Tab. 1 ■

4. Discussion

The benefits of controlled delivery of drugs include maintenance of serum drug concentration at an optimal therapeutic level for a prolonged time-interval, reduction in handling and, consequently, a possible improvement in drug-administration compliance [25]. In this context, the doxycycline-h-LA preparation here described was capable of providing, with a single s. c. injection, serum concentrations of doxycycline almost equivalent to the ones that various injections of an aqueous-based doxycycline preparation could have achieved. Yet, this can only be speculated because anticipated severe tissue irritation and animal welfare avoided multiple dose pharmacokinetic assays. However, it appears that due to the rapid body clearance of doxycycline after the s. c. administration of the aqueous preparation therapeutic concentrations of the drug were achieved after 12 h (see Fig. 1). Although it has been stated that high concentrations of doxycycline *in vitro*, equivalent to 8 to 16 times the value of an average minimum inhibitory concentration (MIC), could render doxycycline a concentration-dependent antibacterial [26], cardiac toxicity of this drug has been reported in calves with a single overdose 5-10 times the therapeutic dose (plasma concentrations ranging from 50-100 µg/ml), making the latter approach unsafe [27, 28]. Hence, doxycycline should ■safety■ (not understandable) be regarded as a time-dependent antibacterial drug [26] and improved clinical efficacy of a doxycycline-h-LA preparation should be expected.

It is quite common that long-acting preparations of a drug show considerably greater AUC_{0-∞} values than the corresponding non-long-acting preparations. However, this is not always the case when tissue:serum ratios are investigated [29]. For doxycycline-h-LA, mean tissue:serum ratios were 2:1 for lungs, 9.8:1 for kidneys and 2.2:1 in intestine homogenates. These values are in close agreement with results obtained in dogs after oral ad-

ministration of doxycycline at 10 mg/kg (1.3:1 for lungs and 3.8:1 for kidneys) and in humans with 100 mg of the drug administered orally (1.4:1 for lungs) [30]. These ratios were somehow predictable considering the large volume of distribution values obtained and because doxycycline has been classified as a highly lipid-soluble tetracycline [31].

The MIC values of doxycycline for sensitive and resistant bacteria range from ≤ 0.5 $\mu\text{g/ml}$ to ≥ 1.5 μg , respectively [32–37]. If serum concentrations of this drug are to remain within these limits throughout the dose interval (DI), doxycycline-h-LA should be injected every 2–3 days. But if tissue concentrations are taken as indicative, the DI will vary from 2–4 days. However, if 4 fold MIC values of serum concentrations are necessary to obtain an optimal antibacterial effect [5], the DI of doxycycline-h-LA for *Staphylococcus aureus* (1.12 $\mu\text{g/ml}$), *Streptococcus pneumoniae* (0.64 $\mu\text{g/ml}$) and *Pasteurella multocida* (0.36 $\mu\text{g/ml}$) will be 52, 60, 94 h, respectively. If lung concentrations are considered, the DI will be 54, 64 and 72 h, respectively. These values contrast favorably with maximum DI values for aqueous doxycycline-h, considering the referred MIC limits, ranging from 7.5 h to 11 h.

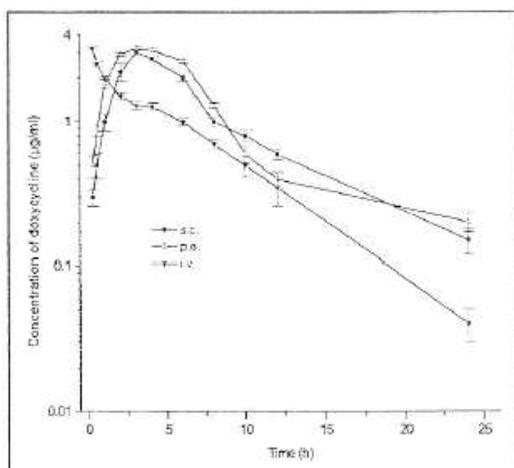


Fig. 1: Mean (± 1 SD) serum concentrations of doxycycline in Wistar rats ($n = 132$) following s.c., p.o. and i.v. injection of 10 mg/kg of an aqueous preparation of doxycycline-hyclate.

It is feasible to assume that a longer action and perhaps better pharmacokinetics can be achieved with other vehicles or by adjusting the ones used in this trial. Nevertheless, this trial is, to the best of our knowledge, the first report of a long-acting preparation of doxycycline with improved pharmacokinetics. For example, a C_{max} value of 3.19 $\mu\text{g/ml}$ with a T_{max} of 2.18 h suggest that a priming effect was made possible, perhaps through improved absorption of the cyclodextrin-doxycycline complexes. Also, serum concentrations above 0.1 $\mu\text{g/ml}$ for 94 h and an MRT of 40.46 h have not been obtained before. Although not comparable, it is of interest to bear in mind that in calves a dose of 5 mg/kg of doxycycline b. i. d., orally, resulted in a C_{max} of 2.3 $\mu\text{g/ml}$ with a T_{max} of 3.4 h [8]. Using the same dose, C_{max} and T_{max} values in goats were 1.60 $\mu\text{g/ml}$ and 0.86 h [13]. To achieve a C_{max} of 3.87 $\mu\text{g/ml}$ an oral dose of 20 mg/kg b.

i. d. was necessary in sick goats [3]. None of the above mentioned studies reported a $T_{1/2\beta}$ as large as the one achieved with doxycycline-h-LA (42.49 h). Hence, it seems reasonable to propose further studies of this LA preparation in other experimental species, bearing in mind humans as target species.

The bioavailability (F) of doxycycline for the doxycycline-h-LA group was 951%, or 477% if the corrected formula for F was considered. The same variable for doxycycline for oral administration in pruruminant calves was 69% [8]. Systemic bioavailability of doxycy-

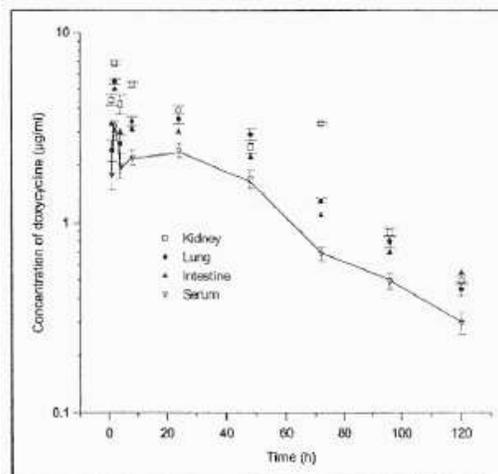


Fig. 2: Mean (± 1 SD) serum and tissue concentrations of doxycycline hyclate in Wistar rats ($n = 32$) following s.c. injection of 10 mg/kg of a long-acting preparation of the drug (DOX-h-LA).

cline after i. m. injection of 5 mg/kg was 99.4% in goats [13] and 70% in calves [38]. As stated before, controlled release formulations often exhibit much greater F values than a non-formulated form of the drug [20, 24, 39]. The combined influences of a low clearance of the drug and its high lipid solubility may account for these unusual high F values. Various factors leading to bioavailability higher than 100% have been reported [39]. They include chemically oriented reasons, sampling and handling errors or experimental design flaws, and analytical deficiencies or miscalculations. A careful review of these and other factors offered no clear explanation as to the large value of F obtained with the doxycycline-h-LA preparation in this study. Hence, a recycling phenomenon due to the noticeably high lipid solubility of doxycycline [4, 38] and the controlled release of doxycycline from the doxycycline-h-LA preparation, inducing flip-flop kinetics, are so far the only tenable explanations. In humans, secondary peaks, typical of recycling phenomena, have been reported in the doxycycline serum concentration-time profiles after oral dosage, perhaps contributed by enterohepatic recycling [40]. Consequently, and considering the adequate PK/PD profile here obtained for doxycycline-h, it is reasonable to propose further studies of this and other improved LA preparations, in order to complete a doxycycline formula for use in the chosen target species.

Table 1: Mean \pm 1 SD pharmacokinetic values of doxycycline hyclate in rats following p. o., s. c. and i. v. injection of 10 mg/kg of an aqueous preparation of doxycycline and after s. c. administration of doxycycline-h-LA.

Parameter	DOX-h i. v. Mean \pm 1SD	DOX-h s. c. Mean \pm 1SD	DOX-h p. o. Mean \pm 1SD	DOX-h-LA s. c. Mean \pm 1SD
AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)	16.02 \pm 1.23 ^a	17.12 \pm 2.11 ^a	17.59 \pm 2.3 ^a	154.0 \pm 1.13 ^b
AUC _∞ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$)	16.39 \pm 2.23 ^a	17.67 \pm 1.03 ^a	18.11 \pm 3.3 ^a	160 \pm 6.23 ^b
MRT (h)	7.04 \pm 0.89 ^a	6.20 \pm 1.09 ^a	3.43 \pm 0.09 ^a	40.46 \pm 3.77 ^b
A ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	2.36 \pm 0.55 ^a			
α (h^{-1})	2.60 \pm 0.02 ^a			
B ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	2.03 \pm 0.09 ^a			
β (h^{-1})	0.013 \pm 0.01 ^a	0.25 \pm 0.05 ^b	0.26 \pm 0.01 ^b	0.4 \pm 0.02 ^c
K ₁₂ (h^{-1})	1.20 \pm 0.01 ^a			
K ₂₁ (h^{-1})	1.29 \pm 0.03 ^a			
K _{e1} (h^{-1})	0.27 \pm 0.03 ^a	0.56 \pm 0.02 ^b	0.57 \pm 0.05 ^b	0.09 \pm 0.03 ^c
K _{ab} (h^{-1})	-	0.25 \pm 0.01 ^a	0.26 \pm 0.03 ^a	0.30 \pm 0.008 ^b
T _{1/2} (h)	2.11 \pm 0.07 ^a	2.77 \pm 0.02 ^b	2.69 \pm 0.03 ^b	42.49 \pm 0.05 ^c
T _{1/2ab} (h)	-	2.78 \pm 0.4 ^a	2.66 \pm 0.58 ^a	0.9 \pm 0.07 ^b
C _{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	-	3.00 \pm 0.35 ^a	3.20 \pm 0.65 ^a	3.19 \pm 0.75 ^a
C ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	3.30 \pm 0.45	-	-	-
T _{max} (h)	-	2.7 \pm 0.65 ^a	2.50 \pm 0.05 ^a	2.18 \pm 0.66 ^a
Cl _B (l/h \cdot kg)	0.44 \pm 0.05 ^a	0.41 \pm 0.02 ^a	0.37 \pm 0.01 ^b	0.09 \pm 0.01 ^c
Vd _{area} (l/kg)	1.34 \pm 0.35 ^a	1.64 \pm 0.35 ^{ab}	1.44 \pm 0.15 ^a	1.01 \pm 0.05 ^{ac}
F (%)	-	106 \pm 7.91 ^a	109 \pm 6.91 ^a	951 \pm 2.91 ^b
F corrected (%)	-	82 \pm 4.91 ^a	95 \pm 6.91 ^a	477 \pm 2.91 ^b

^{a, b, c} The values within a row with no common superscript differ significantly (P < 0.05).

n = 192 rats; AUC = area under the curve; AUC_∞ = area under the curve to infinite; MRT = mean residence time; A = intercept of the distribution phase, B = intercept of the elimination phase; alpha, α , beta, β = rate constants for the distribution and elimination phases, respectively; K₁₂ = the transfer rate from the first compartment to the second compartment; K₂₁ = transfer rate from the second compartment to the first compartment; T_{1/2} = half-life of the elimination; T_{1/2ab} = half-life of the absorption; K_{ab} = constant for drug absorption; K_{e1} = constant for drug elimination; K_{ab} = drug absorption constant; C_{max} = peak concentration, T_{max} = peak time; Cl_B = body clearance; F = bioavailability, F corrected = bioavailability considering elimination half-life.

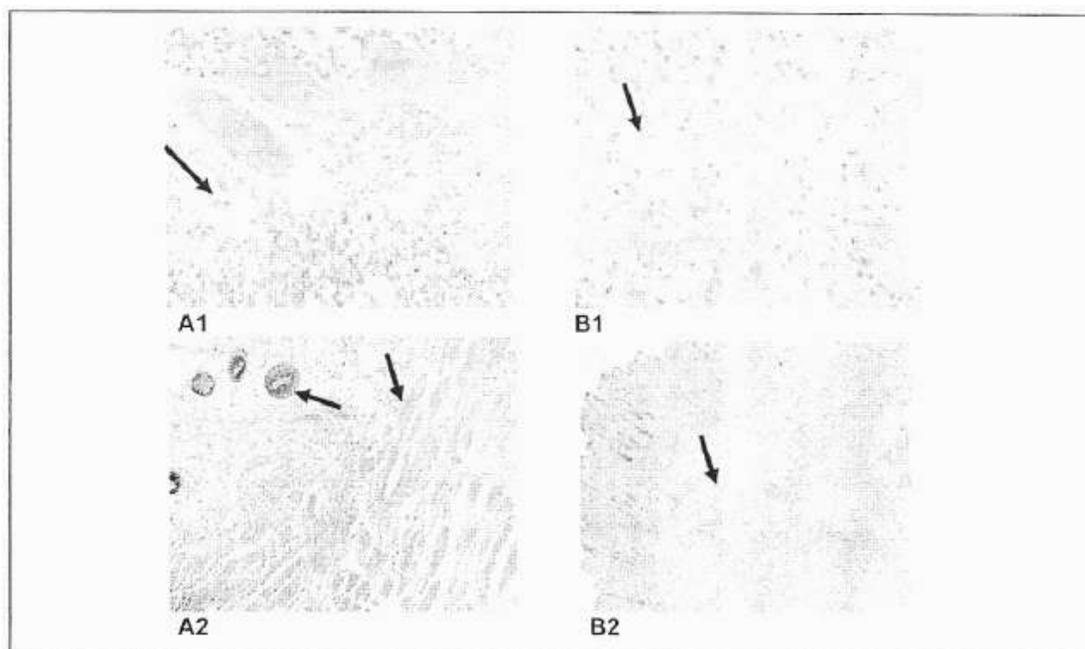


Fig. 3: Histopathologic aspect of the injection sites 120 h after the administration of aqueous DOX-h (A) or the long-acting preparation of doxycycline hyclate, in a β -cyclodextrin-poloxamer matrix (DOX-h-LA) (B). In A1 the arrow shows a large zone of necrotic fat bordered by a layer of macrophages and giant cells. Arrows in A2 show panniculitis, and necrotic-suppurative diffuse myositis. B1 and B2 show light diffuse mononuclear cell infiltration caused by the poloxamer gel.

■ Author: Please give new magnification values. Thank you. ■

References

- [1] Suzuka I, Kajit H, Kajit A. Binding of specific sRNA to 30S ribosomal subunits: effects of 50S ribosomal subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1966;55:1483-1486.
- [2] Craig W. Pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters: rationale for antibiotic use in mice and men. *Clin Infect Dis*. 1998;6:1-12.
- [3] Ole-Mapenay M, Mitema ES, Mathio TE. Aspects of pharmacokinetics of doxycycline given to healthy and pneumonic east African dwarf goats by intramuscular injection. *Vet Res Commun*. 1997;21:453-462.
- [4] Chopra I, Howe TGB, Linton KB, Richmond MH, Speller DCE. The tetracyclines: prospects at the beginning of the 1980s. *J Antimicrob Chemother*. 1981;8:5-21.
- [5] Cunha BA, Sibley CM, Ristuccia AM. Doxycycline. *Ther Drug Monit*. 1982;4:115-135.
- [6] Prescott JF, Baggot JD, Walker RD. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. 3rd ed. ■CityUSA: ■Publisher? 2000, p. 275-289.
- [7] Vomand KC, Sumano LH. Adverse drug reactions in cattle. *JAVMA*. 1990;197:899-905.
- [8] Meijer LA, Ceysens KGE, De Greve BL, De Bruijn W. Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline hyclate after oral administration in calves. *Vet Q*. 1993;15:15.
- [9] Riond JL, Tyezkovska K, Riviere JE. Pharmacokinetics and metabolic inertness of doxycycline in calves with mature or immature rumen function. *Am J Vet Res*. 1989;50:1329-1332.
- [10] Riond JL, Vaden SL, Riviere JE. Comparative pharmacokinetics of doxycycline in cats and dogs. *J Vet Pharmacol Ther*. 1990;13:415-424.
- [11] Ziv G, Sulman FG. Analysis of pharmacokinetic properties of nine tetracycline analogues in dairy cow and ewes. *Am J Vet Res*. 1974;35:1197-201.
- [12] Bousquet E, Pommier P, Wessel-Robert S, Morvan H, Benoit-Valiergue H, Laval A. Efficacy of doxycycline in feed for the control of pneumonia caused by *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma hyopneumoniae* in fattening pigs. *Vet Rec*. 1998;143:269.
- [13] Abd AM, Aty EL, Goudaha A, Zhouh HH. Pharmacokinetics of doxycycline after administration as a single intravenous bolus and intramuscular doses to non-lactating Egyptian goats. *Pharmacol Res*. 2004;49:487-491.
- [14] Ole-Mapenay IM, Mitema ES. Some pharmacokinetic parameters of doxycycline in east African goats after intramuscular administration of a long acting formula. *Vet Res Commun*. 1995;19:425-432.
- [15] Schach Von Wittenau M, Twomey TM. The disposition of doxycycline by man and dog. *Chemotherapy*. 1971;16:217-228.
- [16] Whelton A, Schach von Wittenau M, Twomey TM, Walker WG, Bianchini JR. Doxycycline pharmacokinetics in the absence of renal function. *Kidney Int*. 1974;5:365-371.
- [17] Baumüller A, Madsen PO. Secretion of various antimicrobial substances in dogs with experimental bacterial prostatitis. *Urol Res*. 1977;5:215-218.
- [18] Jaffe JM, Poust RI, Feld SL, Colaizzi JL, Jaffe JM, Colaizzi JL, Poust RI. Influence of repetitive dosing and altered urinary pH on doxycycline excretion in humans. *J Pharm Sci*. 1974;63:1256-1260.
- [19] Bekers O, Oijtendaal EV, Beijnen JH, Bult A, Underberg WJM. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug Dev Ind Pharm*. 1991;17:1503-1549.
- [20] Lawrence MJ. Surfactant systems microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. *Eur J Drug Metab Pharmacokin*. 1994;19: 257-259.
- [21] Bennett JV, Brodie JL, Benner EJ, Kirby WM. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *J Appl Microbiol*. 1966;14:170-177.
- [22] Cinquina AL, Longo E, Anastasi G, Giannetti L, Cozzani R. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J Chromatogr A*. 2003;987:227-233.
- [23] Welling PG. *Pharmacokinetics, Processes, Mathematics and applications*. 2nd ed. Washington DC: ■Publisher? 1997, p. 11-34.
- [24] Gibaldi M, Perrier D. *Pharmacokinetics*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 1982, p 409.
- [25] Brayden DJ. Novel drug delivery strategies in veterinary medicine. *■? Vet J*. 2003;56:310-316.
- [26] Cunha BA, Domenico P, Cunha CB. Pharmacodynamics of Doxycycline. *Clin Microbiol Infect*. 2000;6:270-273.
- [27] Yertham I, Perl S, Sharony D, Vishnitsky Y. Doxycycline toxicity in calves in two feedlots. *J Vet Med B*. 2002; 49: 406-408.
- [28] Chiers K, Weyens P, Deprez P, Van Heerden M, Meulemans G, Baert K, Croubles S, De Backer P, Ducatelle R. Lingual and pharyngeal paralysis due to acute doxycycline intoxication in veal calves. *Vet Rec*. 2004;155:25-26.
- [29] Inskip PB, Darrington RT. Utilization of biopharmaceutical and pharmacokinetic principles in the development of veterinary controlled release drug delivery systems. In: Rathbone MJ, Gurry R, editors. *Controlled Release Veterinary Drug Delivery*. Amsterdam: Elsevier Science; 2000, p. 1-15.
- [30] Shaw DH, ST Rubin. Pharmacologic activity of doxycycline. *J Am Vet Med Assoc*. 1986;189:808-810.
- [31] Barza M, Brown RB, Shanks C, Gamble C, Weinstein L. Relation between lipophilicity and pharmacological behavior of minocycline, doxycycline, tetracycline and oxytetracycline in dogs. *Antimicrob Agents Chemother*. 1975;8:713-720.
- [32] Brook I, Elliott TB, Pryor HI, Sautter TE, Gnade BF, Thakar JH, Knudson GB. In vitro resistance of *Bacillus anthracis* Sterne to doxycycline, macrolides and quinolones. *Int J Antimicrob Agents*. 2001;18:559-562.
- [33] Hospenthal DR, Murray CK. In vitro susceptibilities of seven *Leptospira* species to traditional and newer antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:2646-2648.
- [34] Guerin-Faubleux V, Flandrois JB, Broye E, Tupin E, Richard Y. *Actinomyces pyogenes*: susceptibility of 103 clinical animal isolates to 22 antimicrobial agents. *Vet Res*. 1993;24:251-259.
- [35] Jee JB, Degraives FI, Kim TY, Kaltenboeck B. High prevalence of natural chlamydia species infection in calves. *J Clin Microbiol*. 2004;42: 5664-5672.
- [36] Yoshimura H, Ishimura M, Endoh YS, Kojima A. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. *J Vet Med*. 2001; 48: 555-560.
- [37] Notari RE. Principles of pharmacokinetics: dosage regimen. In: Notari RE, editor. *Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics - an introduction*, 3rd ed. New York: ■ Publisher? 1980, p. 45-212.
- [38] Riond JL, Riviere JE. Pharmacokinetics and toxicology of doxycycline. *Vet Hum Toxicol*. 1988;30:431-444.
- [39] Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Bioavailability and its assessment. *J Vet Pharmacol Ther*. 2004;27:455-466.
- [40] Vu XG, Nix DE, Gillikin S, Schentag GJ. Effect of oral antacid administration on the pharmacokinetics of intravenous doxycycline. *Antimicrob Agent Chemother*. 1989;33:4-436.

Nach Erledigung der Korrektur:
After completing corrections:

PHARMACOKINETICS OF AN INJECTABLE LONG – ACTING PARENTERAL FORMULATION OF DOXYCYCLINE HYCLATE IN GOATS.

Dinorah Vargas, DVM; Lilia Gutiérrez, DVM; Ivan Juárez, MSc; Francisco González, MSc. Héctor Sumano¹, DVM, MD, PhD

Departamento de Fisiología y Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Agro-Silvo Pastoral. Chapa de Mota, Edo. de Mex. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

SUMMARY

Objective — To determine the pharmacokinetic of an experimental, long acting parenteral f determined prior to and at various time-intervals following drug administration.

Results — DOX-h-LA showed the greatest bioavailability (545 %); with a maximum serum concentration (C_{max}) of $2.4 \pm 0.95 \mu\text{g/mL}$ and a peak time (T_{max}) of $19.23 \pm 2.03 \text{ h}$, and an elimination half-life of $40.92 \pm 4.2 \text{ h}$. Considering minimum effective serum concentration of $0.4 \mu\text{g/mL}$ a dose-interval of 84 h can be achieved with DOX-h-LA; while only 11.8 h and 12.99 h dosing intervals are necessary for the IV and IM routes of administration, respectively.

Conclusions and Clinical Relevance — Results indicated that DOX is distributed quickly and widely in the body following a single SC dose of DOX-h-LA. Then, a prolonged half-life follows. This allows a very high bioavailability as compared with the same values after IV and IM administration of DOX-h. Although no local tissue irritation and no clinical side effects were observed, clinical assessment, drug-residue studies and toxicological evaluations are warranted before DOX-h-LA can be regarded as an option for the treatment of antibacterial infections in goats.

Key words: DOXYCYCLINE; GOATS, PHARMACOKINETIC, SUSTAINED-RELEASE.

1. Introduction

Doxycycline, a semi-synthetic derivative of oxytetracycline is a potent bacteriostatic drug commonly used as doxycycline hyclate (DOX-h). It possesses a broad-spectrum antibacterial action through inhibition of protein synthesis.¹ Additionally, it is highly lipophilic, shows large apparent volume of distribution and a prolonged half-life in domestic species.² It has a greater plasma protein binding rate than oxytetracycline and chlortetracycline.³ In dogs, doxycycline is metabolized up to 40%, and is largely excreted in faeces by bile and intestinal secretion (< 5% and 75% respectively) mostly in a microbiologically inactive form.⁴ Urinary excretion accounts only for 16 to 22% of the dose. Renal impairment increases intestinal excretion, hence doxycycline does not accumulate in rats, human beings and dogs with renal failure.^{5,6} DOX-h may be useful to

treat bacterial infections in goats as it has done it in pneumoniae,⁷ skin and soft tissue infections,⁸ urinary tract, genital tract and gastrointestinal tract bacterial diseases such as salmonellosis and colibacillosis.⁹ However DOX-h is remarkably tissue-irritating when injected⁷; and parenteral preparations are not commonly available world wide. Additionally, daily administration of an aqueous preparation would be required to maintain therapeutic concentrations in plasma, as its pharmacokinetics suggests^{10, 11} and because pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationship of DOX-h theorizes that optimal clinical efficacy can be obtained if the drug is regarded as a time-dependant antibacterial.^{12,13} Considering the above, the objectives of this study were to test a new non-irritating, long acting preparation of DOX-h and establish its pharmacokinetics after its SC injection at a dose of 10 mg/kg of body weight in goats and compare these results with the intravascular and intramuscular pharmacokinetics of an aqueous preparation.

2. Materials and methods

This study was approved by the Posgraduate Committee of Research, Care and Use of Experimental Animals, according to de Mexican Official Regulation NOM-062-ZOO-1999, and it was carried out at one of the experimental farms of the Facultad de Medicina Veterinaria at the Universidad Nacional Autónoma de México.

A subcutaneous LA preparation (100 mg/mL) of doxycycline hyclate (PARFARM Pharmaceuticals, Mexico City, Mexico) was developed, under sterile conditions. Inclusion complexes of doxycycline 10% (w/v) with β -cyclodextrin (Cerestar Pharmaceutical Excipients, U.S.A.) (1:0.1M) were first formed by the kneading method which can be described as follows: β -cyclodextrin (0.1 M) and distilled water were mixed together in a mortar so as to obtain a homogeneous paste. Then, 1 M of DOX-h was added slowly. The mixture was ground for 30 min and an appropriate quantity of water added to maintain a suitable paste consistency. The paste was dried in oven at 40-50° C for 24 hours and the dried complex was pulverized into a fine powder.¹⁴ The resulting powder was diluted with a solution of 15% propylenglicol - 10% ethyl alcohol in water. Then, this

mixture was included in a reverse gel copolymer polyoxypropyl–polyoxyethylene (poloxamer) (BASF, Mexico City) adjusting pH to 7.0 with a phosphate buffer solution under constant stirring at 4° C to reach a final concentration of 10% of doxycycline 15% poloxamer. The preparation was regarded as ready when a microemulsion was formed and this could be pin-pointed when the mixture clarified. Finally, 100 ml vials were prepared, stored at 4°C and utilized during the following week.

Ten per cent aqueous solutions were made from powder DOX-h diluted in sterile distilled water immediately before injection. Animals were individually weighed and dose of 10 mg/kg in a volume approximately of 5.0 mL was administered by IV in the jugular vein or intramuscularly in the semitendinosus or semimembranosus muscle of the right or left hind-limbs. The experimental, long-acting preparation of DOX-h developed for this trial (DOX-h-LA), was injected SC at the same dose in the scapular region and to minimize variations in absorption patterns from sites of injection, all animals received their dose of DOX-h-LA in two equally divided volumes.

Thirty clinically healthy, 1-years old Alpine females goats, weighing a mean of 50 ± 5.8 kg were included in this trial. Animals were determined to be clinically normal on the basis of physical examination. They had not been medicated with any antibacterial for at least 30 days. Animals were maintained on a diet of alfalfa hay and pelleted feed concentrate. Goats had access to water *ad libitum*.

In order to achieve a close timing interval between administration of the drug and blood sampling from the jugular vein, a permanent-heparinised long catheter gauge No. 18 (Becton Dickinson®) was placed in each goat and 5 mL blood samples were withdrawn after discarding the first 5 mL of heparinised blood. The times for collection after each dose were: 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, and 24 hours for IV or IM route and 1, 2, 4, 8, 24, 30, 48, 72 and 96 h post-administration of the drug for SC route. A basal sample before injection was also obtained. Blood was allowed to clot at room temperature for 2 h, serum harvested by centrifugation at 1500 g for 5 min and frozen at -20°C for one week until analyzed.

Serum doxycycline concentrations were determined by the modified agar diffusion analysis¹⁵ with *Bacillus cereus* (ATCC 11778) as a test organism grown on Müller-Hinton agar (Bioxon®). Drug concentrations were determined by comparing the diameter of zones of inhibition with those of various dilutions of the standard prepared in pooled antibacterial-free goat serum by the use of linear regression analysis. The intra-assay coefficient of variance was < 1.9 and inter-assay error < 1.8. The analytical assay was linear over a range of concentrations from 0.1 to 10 µg/mL, with a percent

recovery of 94 ± 2 and a correlation coefficient of 0.97 ± 1.1. Limit of detection was 0.07 µg/mL and limit of quantification was 0.1 µg/mL.

A computerized curve-stripping program (PKAnalyst, Micromath Scientific Software) was used to fit and analyze the concentration vs. time profiles of each individual goat and for the mean values. Best fitting models (r ≥ 0.99) were chosen after analysis with residual sum of squares and the minimal Akaike's information criterion. For IM and SC route, best fit were obtained using either of two compartment models with first – order input and first – order output (Model 13 and 14 respectively).

$$\text{Concentration (Time)} = Ae^{-\alpha \cdot \text{Time}} + Be^{-\beta \cdot \text{Time}} + Ce^{-K_{AB} \cdot \text{Time}}$$

$$\text{Concentration (Time)} = Ae^{-\alpha \cdot (\text{Time-Tlag})} + Be^{-\beta \cdot (\text{Time-Tlag})} + Ce^{-K_{AB} \cdot (\text{Time-Tlag})}$$

Variables obtained for the extravascular routes were: *AUC* = Area under the curve; *MRT* = mean residence time; β = rate constants for the elimination phases; $T_{1/2\Box}$ = half life of the elimination; $T_{1/2ab}$ = half life of the absorption; K_{el} = constant for drug elimination; K_{ab} = constant for drug absorption; C_{max} = peak concentration, T_{max} = peak time.

The concentration-time curve of DOX-h IV was best fitted using a two compartment model as presented in Model 13 (r ≥ 0.99), with the following formula:

$$\text{Concentration (Time)} = Ae^{-\alpha \cdot \text{Time}} + Be^{-\beta \cdot \text{Time}}$$

Pharmacokinetic variables obtained with PKAnalyst for the IV route were: *AUC* = Area under the curve; *MRT* = mean residence time; *A*, *B*, = hybrid rate constants; alpha, α , beta, β = rate constants for the distribution and elimination phases, respectively; *K*12 = the transfer rate from the first compartment to the second compartment; *K*21 = transfer rate from the second compartment to the first compartment; $T_{1/2\Box}$ = half life of the elimination; $T_{1/2ab}$ = half life of the absorption; K_{el} = constant for drug elimination; K_{ab} = constant for drug absorption; C_{max} = peak concentration, T_{max} = peak time; C_{s0} = maximum serum concentration at zero.

Other variables, such as Vd_{area} = apparent volume of distribution based on trapezoid *AUC*, AUC_{∞} = Area under the curve-infinity and *Cl* = body clearance, were obtained with standard formulas.¹⁶ Absolute bioavailability (*F*) and a half-life corrected *F* value were calculated using the following equations:

$$F\% = \frac{AUC_{EV}}{AUC_{IV}} \times \frac{Dosis_{IV}}{Dosis_{EV}} \times 100$$

$$F\% = \frac{AUC_{EV}}{AUC_{IV}} \times \frac{t_{1/2IV}}{t_{1/2EV}} \times 100$$

Data is presented as mean \pm standard deviation of ten observations for each parameter and for statistical comparisons of C_{max} , T_{max} , AUC, MRT and $T_{1/2}$ among groups the ANOVA and Bonferroni-test, were used.

3. Results

Mean \pm 1 SD serum concentrations vs. time profiles of doxycycline for the three groups are presented in figure 1 and 2. Table 1 summarizes all pharmacokinetic variables obtained for the three groups and a statistical comparison of means, made for those variables shared by the various administration routes, is also presented in table 1. Comparisons for AUC, MRT and $T_{1/2}$, showed that all these variables were statistically larger in group DOX-h-LA as compared to groups DOX-h-IV or IM ($P < 0.05$). The mean elimination half-lives obtained were 40.92 ± 4.25 hours for DOX-h-LA; 4.11 ± 0.46 for DOX-h-IV and 4.19 ± 0.66 for DOX-h-IM, respectively. Differences among these means was statistically significant in all comparisons ($P < 0.05$).

Based on minimal therapeutic concentrations (MIC) divided from minimal inhibitory concentration values, a comparative assessment was made of the length of time for which a given serum concentration of doxycycline was maintained. Chosen values were: S = for susceptible bacteria, when MICs were ≤ 0.4 $\mu\text{g/mL}$ and R = for resistant bacteria, when MICs were above 1.5 $\mu\text{g/mL}$. Thus, DOX-h-IV was above the S level for 11.9 h, but only 2.7 h for the R level and DOX-h-LA extended these time-periods to 84 h and 53, respectively. The time at which serum concentrations were above the S or R concentrations were statistically different when comparing DOX-h-LA with either the DOX-h-IV ($P < 0.05$).

No inflammatory response was observed at the injection site with the DOX-h-LA preparation. However, a well defined apparently painless bulge remained detectable in 3 animals for 7 days beginning with an approximate size of $2 \times 1 \times 1$ cm and disappearing steadily. This bulge is not believed to be an inflammatory response, but rather space occupied by poloxamer when becoming gel at body temperature. After this time no lesion or induration could be detected. Animals did not show any sign of pain or discomfort with the long-acting preparation. In contrast pain and swelling were evident with aqueous formulation for at least 15 days.

4. Discussion

According to Cunha et al.⁹ doxycycline shows maximum clinical efficacy when serum concentrations of the drug are four times the MIC and remain so as long as possible within the dosing interval. However, AUC_∞/MIC ratios

have not been established for any species. Nevertheless, taking MIC data from Cunha et al.⁹, such ratios for the DOX-h-LA will vary from 27 for *E. coli* to 259 and 461 for *Streptococcus pneumoniae* and *Pasteurella multocida*, respectively. Empirically, these ratios comply well with suggested AUC/MIC values evaluated from an experimental trial published on pneumonia in humans¹⁷ and defining bacterial susceptibility to doxycycline can also be assessed with available MIC values, which can be categorized as sensitive (from ≤ 0.4 $\mu\text{g/mL}$) and resistant (≥ 1.5 $\mu\text{g/mL}$)¹⁸⁻²². These values agree with reports from human isolates, for example: Cunha et al.²³ found for *E. coli* a MIC of 1.5 $\mu\text{g/mL}$, for *Staphylococcus aureus* 0.28 $\mu\text{g/mL}$, for *Pasteurella multocida* 0.09 $\mu\text{g/mL}$, and for *Streptococcus pneumoniae* 0.16 $\mu\text{g/mL}$. Additionally, Notari²⁴ suggested a serum concentration from 0.5 to 1 $\mu\text{g/mL}$ as the therapeutic range for this antibacterial drug. Yet, no similar data could be found for goats after a thorough review of literature. Considering the above and that the best PK/PD of this drug profile is achieved when serum concentrations of the drug are never below the MIC at any time during the dosing interval^{12,13}, it is safe to regard DOX-h-LA as complying with PK/PD profiling of doxycycline. Then, for susceptible bacteria, aqueous DOX-h-IV should be injected every 11.8 h, aqueous DOX-h-IM every 12.99 h and DOX-h-LA every 84 h. For the two former preparations such frequent injection appears unpractical while a 3 day dosing interval for the DOX-h-LA preparation seems a reasonable time schedule.

The DOX-h-LA preparation achieved a C_{max} of 2.4 ± 0.95 $\mu\text{g/mL}$ at a T_{max} of 19.23 h, these values largely exceed previously reported data for doxycycline in goats with a C_{max} of 1.60 $\mu\text{g/mL}$ and a T_{max} of 0.86 h.¹⁰ A dose of 20 mg/kg IM in goats resulted in a C_{max} of 3.87 $\mu\text{g/mL}$ in neumonic animals and 5.56 $\mu\text{g/mL}$ in healthy ones.⁷ But, the same dose was reported to achieve only a C_{max} of 1.87 $\mu\text{g/mL}$ with a T_{max} of 0.85 h in African goats.¹¹ After reaching the C_{max} the serum concentrations of doxycycline declined slowly with DOX-h-LA, but always exceeded the lower set limit of 0.4 $\mu\text{g/mL}$ for 84 hours with a MRT of 44.83 h. The elimination half-life ($T_{1/2}$) for DOX-h-IV was 4.11 h; 4.19 h for DOX-h-IM and 40.92 for the DOX-h-LA preparation.

Bioavailability of doxycycline for the DOX-h-LA group was 545 %, while the same variable in other studies in goats after IM injection of 5 mg/kg was 99.4%.¹⁰ It is not uncommon to obtain large F values for sustained release preparations.²⁵⁻²⁷ According to Toutain and Bousquet-Mélou²⁸ this phenomenon is either a fact or a flaw in sampling handling of samples, experimental design misconceptions, or analytical deficiencies or miscalculations. A careful review of these and other factors listed by these authors offered no clear explanation as to the large value of F obtained by the DOX-h-LA preparation in this study, excepting, a recycling phenomenon due to the noticeably high lipid solubility of doxycycline^{29, 8} and the controlled release of doxycycline from the DOX-h-LA preparation.

The principal purpose of designing a DOX-h-LA preparation was to provide, with a single injection, serum doxycycline concentrations equivalent in practical terms to one or various injections of a conventional doxycycline product per day. A poly (ethylene oxide)-poly (propylene oxide)-poly (ethylene oxide) block copolymer (poloxamer) was used as delivery vehicle-matrix, because it improves solubility, reduces hydrolytic degradation, achieves controlled release and often results in improved bioavailability^{30,31}. Poloxamer possesses reversed temperature-dependant gelation properties, that is, the preparation exhibit low viscosity at room temperature (28-32°C) and become gel at body temperature (37-40°C),³² thus allowing the long-acting effect observed. To reduce irritation and promote an initial priming absorption, β -cyclodextrin was included. DOX-h- β -cyclodextrin complexes may diminish or prevent tissue irritation by reducing the local concentration of free drug below the irritancy threshold,^{33, 34} and it is known that β -cyclodextrin enhances absorption rate of various drugs^{35, 36}.

Being a time-dependant antibacterial drug it can be expected that clinical efficacy of the DOX-h-LA preparation should be at least equivalent to the one obtained with non-LA preparations administered once or twice per day, but with a significant reduction in work load, cost and animal stress. Hence, among other considerations, clinical trials and residue studies are needed to assess if this preparation can be regarded as potentially useful in goat's medicine.

Undoubtedly, further studies may optimize the formulation, and it is necessary to state that the use of this drug could not be recommended until tissue concentration and residue studies have been performed. Also, in spite of evidence that indicate lack of toxicity of poloxamer and β -cyclodextrin in various species,²⁶ assessment of the safety of this preparation in goats, is warranted.

References

1. Suzuka I, Kaji H, Kaji A. Binding of specific sRNA to 30S ribosomal subunits: effects of 50S ribosomal subunits. *P Natl Acad Sci* 1966;55:1483-1486.
2. Riond JL, Riviere JE. Doxycycline binding to plasma albumin of several species. *J Vet Pharmacol Ther* 1989;12:253-260.
3. Shaw DH, Rubin ST. Pharmacologic activity of doxycycline. *J Am Vet Med Assoc* 1986;189:808-10.
4. Schach VWM, Twomey TM. The disposition of doxycycline by man and dog. *Chemotherapy* 1971;16:217-228.
5. Whelton A, Von Wittenau M.S, Twomey TM, et al. Doxycycline pharmacokinetics in the absence of renal function. *Kidney Int* 1974;5:365-371.
6. Baumueller A, Madsen PO. Secretion of various antimicrobial substances in dogs with experimental bacterial prostatitis. *Urol Res* 1977;5: 215-218.
7. Ole-Mapenay IM, Mitema ES, Mathio TE. Aspects of pharmacokinetics of doxycycline given to healthy and pneumonic east African dwarf goats by intramuscular injection. *Vet Res Común* 1997;21:453-462.
8. Chopra I, Howe TGB, Linton KB, et al. The Tetracyclines: prospects at the beginning of the 1980s. *J Antimicrob Chemoth* 1981;8: 5-21.
9. Cunha BA, Sibley CM, Ristuccia AM. Doxycycline. *Ther Drug Monit* 1982;4: 115-135.
10. Abd AM, Aty EL, Goudaha A, et al. Pharmacokinetics of doxycycline after administration as a single intravenous bolus and intramuscular doses to non-lactating Egyptian goats. *Pharmacol Res* 2004;49:487-491.
11. Ole-Mapenay IM, Mitema ES. Some pharmacokinetic parameters of doxycycline in east African goats after intramuscular administration of a long acting formula. *Vet Res Común* 1995;19:425-432.
12. Prescott JF, Baggot D J, Walker RD. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* 3rd ed. Iowa: Iowa State University, 2000;275-289.
13. Craig W. Pharmacokinetic-pharmacodynamic parameters: rationale for antibiotic use in mice and men. *Clin Infect Dis* 1998;26:1-12.
14. Bekers, O, Uijtendaal EV, Beijnen JH, et al. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug Dev Ind Pharm* 1991;17:1503-1549.
15. Bennett JV, Brodie JL, Benner EJ, et al. Simplified, accurate method for antibiotic assay of clinical specimens. *Appl Microbiol* 1966 ;14: 170-177.
16. Welling PG. *Pharmacokinetics, Processes, Mathematics and applications*, 2nd ed, Washington DC: American Chemical Society, 1997;11-34.
17. Ailani RK, Agastya G, Ailani RK, et al. Doxycycline is a cost-effective therapy for hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med* 1999;159:266-270.
18. Riond JL, Riviere JE. Pharmacology and Toxicology of Doxycycline. *J Vet Hum Toxicol* 1968;30:431-443.
19. Brook I, Elliott TB, Pryor HI, et al. In vitro resistance of Bacillus anthracis Sterne to doxycycline, macrolides and quinolones. *Int J Antimicrob Ag* 2001;18: 559-562.
20. Hospenthal DR, Murray CK. In vitro susceptibilities of seven Leptospira species to traditional and newer antibiotics. *Antimicrob Agents Ch* 2003;47:2646-2648.
21. Guerin-Faubleee V, Flandrois JP, Broye E, et al. Actinomyces pyogenes: susceptibility of 103 clinical animal isolates to 22 antimicrobial agents. *Vet Res* 1993 ;24: 251-259.
22. Yoshimura H, Ishimura M, Endoh YS, et al. Antimicrobial susceptibility of Pasteurella multocida isolated from cattle and pigs. *J Vet Med* 2001;48:555-560.
23. Cunha BA, Domenico P, Cunha CB. Pharmacodynamics of Doxycycline. *Clin Microbiol Infec* 2000;6: 270-273.
24. Notari RE. In Principles of pharmacokinetics: dosage regimen. *Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics an introduction*, 4th ed. New York: M

- Dekker, 1987;45–212.
25. Gilbert JC, Richardson JL, Davies MC, et al. The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F127 solutions for controlled drug delivery. *J Control Release*. 1987;5:113-118.
 26. Lawrence MJ. Surfactant systems microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1994;19: 257-259.
 27. Inskip PB, Darrington RT. In Utilization of biopharmaceutical and pharmacokinetic principles in the development of veterinary controlled release drug delivery systems. *Controlled Release Veterinary Drug Delivery*. Amsterdam: Elsevier Science BV, 2000;1-15.
 28. Toutain P L, Bousquet-Mélou A. Bioavailability and its assessment. *J Vet Pharmacol Ther* 2004 ;27:455-466.
 29. Aronson AI. Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines. *J Am Vet Med Assoc* 1980;176:1061-1068.
 30. Kabanov AV, Batrakova EV, Melik-Nubarov NS, et al. A new class of drug carriers: micelles of poly (oxyethylene)- poly (oxypropylene)- poly (oxyethylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain. *J Control Release* 1992;22:141-158.
 31. Tarr BD, Yalkowsky SH. A new parenteral vehicle for the administration of some poorly water soluble anti-cancer drugs. *J Parent Sci Techn*. 1987;41:31-33.
 32. Schmolka IR. *Polymers of controlled drug delivery*, Boca Raton, FL: CRC Press, 1991;189-214.
 33. Yoshida A, Yamamoto M, Itoh T, et al. Utility of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in an intramuscular injectable preparation of nimodipine. *Chem Pharm Bull*. 1990;38:176-179.
 34. Uekama K, Hirayama F, Irie T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chem Rev*. 1998;98:2045-2076.
 35. Szeman J, Stadler-Szoke A, Vikmon M, et al. Stabilization of prostacyclin and furosemide by cyclodextrins. *Chemical Abstracts* 1988 ;108:392.
 36. Szejtli J. *Controlled drug bioavailability*. New York, 1985;365-421.

sumano@servidor.unam.mx

Arzneimittel Forschung Drug Research

ECV · Editio Cantor Verlag · Postfach/P.O.B. 1255 · 88322 Aulendorf (Germany)

Special Section
Biotechnology
in Drug Research

Director Sumano-López, DVM, MD, PhD
Departamento de Fisiología y Farmacología
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica
Universidad Nacional Autónoma de México
Av. Universidad 3000, Delegación Coyoacán
MÉXICO CITY C. P. 04510
MÉXICO

Ihre Nachricht/Your letter Unser Zeichen/Our ref. Datum/Date

Durchwahl/Phone Fax

Schr/csr October 16, 2007

+49 (0)75 25-940 120 +49 (0)75 25-940 127
email: redaktion@ecv.de

Publication of the paper by Vargas-Estrada et al. "Pharmacokinetics of Doxycycline and Tissue Concentrations ..."

Dear Dr. Sumano-López,

Referring to the interim reply of October 8, 2007 we are pleased to confirm that the experts have now approved of publishing the above-referenced paper in "ArzneimForsch/ DrugRes" without any further restriction.

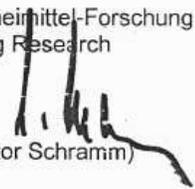
Indeed, there is nothing else to do for you and for the team of authors. The study has been entered firmly into our journal's publication schedule.

About 3 to 4 months prior to publication you will be transmitted the proof as a PDF file thus giving you the opportunity to proofread the text again and to give the permission to print then. Would you please adhere to the instructions which are provided from the secretariat together with the PDF file in order to ensure a proper procedure?

We thank you once again for the cooperation in revising the manuscript, ask for some patience as there is a certain waiting period and remain

With kind regards,

Arzneimittel-Forschung
Drug Research


(Viktor Schramm)

Please note: This letter is sent by email in advance and also by regular mail.

ECV · Editio Cantor Verlag
für Medizin und
Naturwissenschaften
Bändelstockweg 20

Telefon
+49 (0) 75 25-940 0
Telefax
+49 (0) 75 25-940-1 80

Geschäftsführer:
Viktor Schramm, Gescha. Dir. i. V.
Eingetragen
Amtsgericht Ravensburg HRB 174 836

COMMERZBANK AG Filiale Friedrichshafen
Postfach 400 72, 72300 Friedrichshafen
Landesbank Baden-Württemberg
01 9 200 200 01



8-Discusión

La relación entre costo y beneficio en el desarrollo e investigación de nuevos fármacos en la industria farmacéutica, resulta más atractiva para medicina humana que para medicina veterinaria. Las razones incluyen en el primer caso: un mercado natural de 6, 880 millones de seres humanos ^F, la posibilidad de elevar considerablemente el precio de venta y con ello recuperar más rápido y fácilmente las cuantiosas inversiones hechas para obtener el preparado final y los desarrollos fallidos. En contraste, en el desarrollo de muchas entidades farmacológicas en la medicina veterinaria, las consideraciones económicas pesan más sobre las decisiones terapéuticas.

Bajo las condiciones anteriores, es difícil coordinar, conjuntar y solventar un equipo tecnológico que dedique sus esfuerzos al desarrollo e investigación de una nueva entidad farmacológica (NEF)^G en medicina veterinaria. El resultado de la situación descrita es una escasa generación de estos productos en medicina veterinaria. No obstante, como respuesta de la industria se tiene una activa investigación de nuevas y más adecuadas formas farmacéuticas. El auge de los preparados de LA-LS en la industria farmacéutica veterinaria es tal, que se puede afirmar que más del 40% de los preparados farmacéuticos está representado por productos de liberación controlada, cuyos uso principales son el tratamiento de enfermedades respiratorias, aumentar la eficacia alimenticia y mejorar el crecimiento y producción de leche¹³². Por ejemplo, la inyección de ceftiofur cada 12-24 h puede ahora hacerse cada 7 días al aplicar un implante de ceftiofur cristalizado ¹³³, o la manipulación química de la molécula de un macrólido o una cefalosporina para generar tulatromicina ¹³⁴ y cefobecina ^H respectivamente, con $T_{1/2\beta}$ y depuraciones tan prolongadas que solo requieren 1 sola dosis, si es que requieren una segunda dosis se aplica a los 14-21 días. Uno de los preparados pioneros de larga acción (LA) en medicina veterinaria fue

^F <http://www.esi.unav.es/asignaturas/ecologia/Hipertexto/14PolEcSoc/120PobHum.htm>

^G NEF Término que describe un grupo químico novedosos, de una nueva aplicación de un fármaco ya conocido o el rediseño farmacéutico de un preparado cuya farmacocinética se ajuste mejor a la farmacodinamia del principio activo y o las condiciones de manejo de una especie en particular.

^H <http://www.emea.europa.eu/vetdocs/PDFs/EPAR/convenia/V-098-PI-es.pdf>

la oxitetraciclina (OXT) y actualmente es el antibacteriano inyectable más vendido en Latinoamérica y en muchas otras partes del mundo ¹³⁵. No obstante no se hicieron ensayos para lograr un efecto similar con otras tetraciclinas más potentes como la doxiciclina (DOX-h) derivado del mismo grupo que la OXT pero descrito como 60 veces más potente que esta y con menor tasa de resistencia por no requerir de transporte activo para ingresar a la bacteria ^{44,31}. Es posible especular que parte de esta falta de preparados LA de doxiciclina se haya debido a que es un fármaco extremadamente irritante, que induce necrosis tisular severa y en virtud de que la doxiciclina es muy inestable a cambios de pH, a la oxidación, fotólisis e hidrólisis¹³.

Con los antecedentes mencionados y con la motivación de generar una presentación novedosa de doxiciclina, se estableció como meta de este trabajo generar un preparado de doxiciclina que reuniera las siguientes características: 1) forma farmacéutica razonablemente estable, 2) que no generara irritación tisular después de la aplicación, 3) que lograra concentraciones terapéuticas por más de 48 h y 4) si fuera posible que pudiera ser patentable. Posteriormente se obtuvo como bono adicional al diseño logrado que, al menos en bovinos, generara una masa ocupativa en el sitio SC de inoculación, que, sin ser una reacción inflamatoria, permite visualizar que se ha tratado un animal en particular y que durante al menos 30 días no se debe procesar para consumo humano, tiempo en el que esta masa desaparece por completo. Al respecto vale la pena señalar que aún no se realizan estudios de residualidad del preparado en estudio y en el caso de introducir este preparado comercialmente serían imprescindibles, teniendo como límite máximo de residuos el valor de 600 ppm / kg en riñón, 300 ppm / kg en hígado y de 100 ppm / kg en músculo, según recomienda la EMEA en bovinos.¹

Otras ventajas que se buscaron al diseñar un formulado de liberación sostenida-prolongada o de larga acción (LS-LA) frente a las formulaciones convencionales

¹ <http://www.emea.europa.eu/pdfs/vet/mrls/010196en.pdf>

son: La reducción de efectos adversos, disminución del estrés por manejo, disminución de los costos por manejo, terapias antibacterianas adecuadas en tiempo y concentraciones, mejora la actividad terapéutica de las sales existentes y disminución de la presentación de resistencias bacterianas.¹³².

En el presente trabajo, se seleccionaron a la ciclodextrina, al carbopol, al chitosan y al poloxámero para incluirlos en los preparados de LA-LS, ya que por sus características fisicoquímicas tienen la habilidad de transportar fármacos no solo en su papel de vehículos, sino porque también logran modificar algunas propiedades físicas del principio activo, tales como disminuir su inestabilidad a cambios de pH e incrementan la capacidad de disolución. El uso de estos vehículos también tiene que ver con el mejoramiento de la absorción, debido a que la velocidad y la magnitud de la biodisponibilidad del fármaco pueden ser optimizados, principalmente al ajustar varios factores que afecten el equilibrio de la disociación del complejo en la formulación y la biofase en la que el complejo formado se administra lo que trae como consecuencia una reducción de la irritación local al reducir las concentraciones efectivas del fármaco en contacto con las membranas adyacentes al sitio de administración. Y sobre todo la liberación lenta y prolongada de los fármacos. Y lo que es más importante carecen de efectos tóxicos. En este punto cabe hacer mención que cualquiera de los excipientes seleccionados han sido aprobados por la FDA en productos farmacéuticos para uso humano¹²⁵ y ninguno tiene problemas en cuanto a restricciones sanitarias en México por la COFEPRIS.^J

Para estudiar la compatibilidad de la doxiciclina y los excipientes, se realizó una investigación de las propiedades físicas y químicas del principio activo solo y en combinación con cada uno de los excipientes propuestos para el preparado final y que cumplieran con los objetivos de la formulación. Con ello se logró un perfil bien estructurado del estándar y de los vehículos que formarían parte del

^J <http://cofepris.salud.gob.mx/bv/index.htm>

sistema matricial de liberación sostenida de doxiciclina hclato, adicionalmente se ponderó la disponibilidad comercial y el costo de los materiales, puntos clave para el desarrollo farmacéutico veterinario.

En el estudio de preformulación también se seleccionaron los procesos o métodos de formulación tentativos, tomando en cuenta que la DOX-h no sufriera una degradación por sensibilidad al calor, agua o cambios de pH. Para tal fin, se realizó un análisis termogravimétrico de DOX-h, que determina la masa de una muestra como una función de temperatura, o tiempo de calentamiento, también se realizaron pruebas de solubilidad y de estabilidad. De esta manera, se puede asegurar que el principio activo no sufriera una degradación al momento de preparar los diversos sistemas o prototipos diseñados (Ver Anexo 8.1). Inicialmente, se diseñaron preparados a base de quitosán y carbopol y los resultados no fueron satisfactorios, en lo que se refiere a mantener concentraciones adecuadas por un largo periodo de tiempo (arriba de 48 h) y alcanzar concentraciones al menos 2 veces por arriba de la CMI.

En el caso del carbopol 971 P NF la falla en la eficiencia como formador de una matriz de liberación controlada pudo ser debida a su porcentaje de adición, ya que la máxima concentración sérica lograda fue de 0.5 µg/mL a las 24 h, postadministración. El porcentaje de inclusión se aumentó a más del 10%, ya que la densidad del entrecruzamiento de las cadenas del polímero se ve influenciado por el porcentaje de adición del mismo y con esto se buscaba que el principio activo difundiera de manera sostenida y prolongada.⁹⁰ No obstante, dado que es necesario que ocurra erosión de la matriz formada por el carbopol, para que el principio activo difunda, no se logró un punto de equilibrio, amén de que se detectó toxicidad local en las ratas en las que se hicieron ensayos preliminares.

Con respecto al Chitosan, en ensayos preliminares en ratas, aunque si se lograron concentraciones máximas aceptables (1.8-2 µg/mL) a las 2 h

postadministración, solo se consiguió una concentración de 0.3 µg/mL a las 120 h. El porcentaje máximo de adición del chitosan al formulado fue de 1%, con la desventaja de que al aumentar dicho porcentaje se obtuvieron problemas de estabilidad entre los excipientes y el principio activo. Sin embargo podrían realizarse más trabajo de desarrollo farmacéutico con estos dos polímeros para lograr otros nuevos preparados de liberación controlada, mediante la adición de interfaces que estabilicen a los ingredientes.

Los mejores efectos en cuanto a PK se lograron cuando se utilizó una matriz de poloxámero para obtener un formulado de larga – acción. (DOX-h-LA). La formulación se caracterizó por ser un depósito subcutáneo en virtud de sus propiedades termoreversible, que generaron una masa ocupativa visible al clínico y al propietario.

Para el preparado elegido en este estudio, se empleó el copolímero tribloque poli (óxido etileno)-poli (óxido propileno)-poli (óxido etileno) como vehículo-matriz de liberación modificada, se observó que esta matriz reducía la degradación hidrolítica y lograba una liberación controlada y por los datos de la literatura,^{97,100} se pudo predecir un incremento en la biodisponibilidad del fármaco en los animales. La formulación elegida presentó baja viscosidad a temperatura ambiente (28-32°C) y se convirtió en gel a temperatura corporal (37-40°C).^{98,102} Con el propósito de reducir la irritación causada por la doxiciclina, se incluyó la β-ciclodextrina para producir un complejo de inclusión de DOX-h-β-ciclodextrina. Se postuló que tal complejo podría disminuir o prevenir la irritación tisular al reducir la concentración local de fármaco libre y con ello abatir el contacto directo del activo con el tejido.^{85,89} Adicionalmente la β-ciclodextrina puede incrementar la velocidad de absorción inicial actuando como un promotor en la fase de carga.^{84,82}

El porcentaje de adición del poloxámero se seleccionó con base a ensayos para determinar la disminución de la temperatura de gelación de disoluciones

progresivamente más concentradas de P-407. Así mismo se emplearon cosolventes para evitar la gelación rápida con base a lo informado por González, 2007 ¹³⁶ y se verificó la influencia de propilenglicol y etanol en las propiedades de viscosidad y en la temperatura de gelación.

Además fue necesaria la adición de disolventes orgánicos al formulado. Su porcentaje de adición tuvo que ver con la interacción de la doxiciclina, polímeros y excipientes considerando su influencia sobre la liberación controlada. Así la presencia de disolventes orgánicos modificó la temperatura de transición sol-gel, ya que estudios realizados con este tipo de polímeros demuestran que también los disolventes orgánicos tienen una influencia significativa en la velocidad de liberación de fármacos. ¹³⁷ Se estudió la influencia de las sales de doxiciclina hclato, de etanol y propilenglicol en las características reológicas del Poloxámero 407 y se encontró en general que disminuyen la temperatura de gelación, excepto en la adición de etanol que no modifica dicha variable, en concentraciones menores del 10%. Concentraciones mayores de etanol, incrementan la temperatura de gelación, hasta que la formación del gel se inhibe. Estos efectos principalmente pueden atribuirse a la habilidad de varios iones para modificar la estructura del agua y principalmente por la influencia de la hidratación de los bloques de óxido de etileno y de óxido de propileno, además de otros factores como la formación de complejos entre las cadenas polioxietilenadas y la parte hidrofóbica del fármaco y de la interacción de la parte iónica del fármaco con el agua ¹³⁸⁻¹⁴⁰.

La adición de propilenglicol a las disoluciones de P-407 promovió la formación de la fase de cristal líquido al abatir la temperatura de gelación por incremento en las concentraciones del glicol, lo que aumentó la viscosidad de las disoluciones. Las estructuras cristalinas que se formaron mediante arreglos hexagonales y cúbicos le confirieron estabilidad al sistema. El intervalo de estabilidad de estas estructuras varió con el tipo de disolvente empleado, se ha reportado que el etanol y el propilenglicol hinchan los bloques de PEO y PPO y

participan en la formación de la interface polar apolar .^{138,139,141} De esta manera, el porcentaje de adición de los solventes orgánicos en interacción con el polímero, la ciclodextrina y el principio activo lograron una liberación controlada y prolongada que cumplía con el objetivo del presente trabajo.

Una vez seleccionado el preparado de doxiciclina hiclato (DOX-h-LA), se realizaron estudios farmacocinéticos tomando como referente a la doxiciclina de un preparado acuoso. Inicialmente se realizaron estudios farmacocinéticos en ratas a dosis de 10 mg/kg del peso corporal y posteriormente en becerros, bovinos adultos, cabras y borregos. Sin embargo se discuten solamente los resultados obtenidos en los becerros y las cabras en función de que la respuesta farmacológica fue muy similar en las demás especies. Adicionalmente, se determinó la concentración tisular en ratas tratadas por vía SC.

Los productos de liberación modificada típicamente se aplican por vía intramuscular o subcutánea. Los sistemas pueden aplicarse como micropartículas o soluciones que cambian de estado en el sitio de inyección formando algo semejante a un implante. El límite de la cantidad de material que puede inyectarse no está definido del todo, pues en parte dependerá de la perfusión y deberán considerarse las estructuras normales y la fisiología del tejido subcutáneo o intramuscular, según sea el sitio donde se aplicará la inyección. Por tal virtud el preparado DOX-h-LA, se decidió aplicarlo por vía subcutánea, puesto que las inyecciones subcutáneas buscan liberar el producto en el espacio entre la dermis y la grasa subcutánea y con el fin de reducir las variaciones en el patrón de absorción desde el sitio de inyección, se dividió en dos sitios el depósito del gel termoreversible del poloxámero que como ya se mencionó genera una masa ocupativa visible en los animales y que en el caso contrario de aplicarlo en un solo sitio, podría causar mayor compresión al tejido muscular, pudiendo causar dolor. Es común, que las inyecciones subcutáneas formen un depósito, cuyo tamaño, forma y naturaleza está determinado por la composición del preparado que se aplicó, volumen inyectado, propiedades

reológicas del sistema, tasa de dispersión, y las fuerzas internas debido a la contracción de tejidos adyacentes (músculo). Una vez que se ha formado el depósito con el fármaco, éste deberá liberarse y difundir hacia la circulación sanguínea y capilares linfáticos. En el espacio subcutáneo, la cantidad de capilares sanguíneos es menor que en el tejido muscular y dependiendo de la profundidad de la inyección y la cantidad de grasa presente, la tasa de absorción es más lenta que en el músculo. El retardo en la absorción de fármacos depositados en el tejido subcutáneo es mayor para aquellos que tienen altos coeficientes de partición de lípido/agua, pero aún ese factor puede modificarse.

Se realizaron estudios de la farmacocinética en ratas Wistar, clínicamente sanas. El preparado experimental de DOX-h de larga-acción desarrollado para este ensayo (DOX-h-LA), se inyectó SC y se compararon con el preparado DOX-h (un preparado acuoso (DOX-h) por 3 vías de administración (IV, SC y PO con una dosis única de 10 mg/kg).se obtuvieron muestras sanguíneas a diferentes tiempos de muestreo hasta completar 94 h.

Las concentraciones séricas de doxiciclina, inicialmente se llevaron a cabo por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución con lámpara de UV visible, se obtuvo el espectro y la curva estándar (Ver Anexo 8.2 y 8.3), sin embargo debido a lo costoso del método, se realizó una validación del análisis modificado de difusión en agar,¹³⁰ con *Bacillus cereus* (ATCC 11778) como organismo de prueba y agar Mueller-Hinton (Bioxon® para su crecimiento) con excelentes resultados (Ver Anexo 8.4), por lo que se continuó trabajando con esta metodología.

Se utilizó el programa (PKAnalyst, Micromath Scientific Software) para ajustar y analizar el perfil de la concentración vs tiempo en todos los animales. Dicha curva obtenida después de la administración IM, IV .y SC de DOX-h se ajustó mejor cuando se usó un modelo de dos compartimentos de primer – orden de entrada y salida. Los resultados de las variables *AUC*, *MRT* y $T_{1/2\beta}$, entre grupos

mostraron que las diferencias fueron estadísticamente significativas en el grupo de DOX-h-LA cuando se comparó con los grupos DOX-h-IM y DOX-h-IV (en un rango de < 0.05 a < 0.001) en las especies utilizadas.

Se midió la distribución tisular de hidrato de doxiciclina, después de aplicar eutanasia por sobredosis con pentobarbital sódico, se removieron los pulmones, riñones e intestinos. En éste grupo también se realizaron pruebas histopatológicas del sitio de inoculación a las 24 h, 120 h y 15 días después de la inoculación para evaluar la toxicidad aguda de la aplicación del preparado de doxiciclina (DOX-h-LA). La extracción de doxiciclina a partir de los tejidos se realizó el proceso de extracción.¹⁴² Se obtuvo un porcentaje de recobro de $88\% \pm 2.0$.

Los resultados obtenidos con el preparado de larga acción de doxiciclina en ratas muestran una mejor farmacocinética de la doxiciclina. Por ejemplo, se logró una C_{max} de $3.19 \mu\text{g/ml}$ y un T_{max} de 2.18 h. Además, las concentraciones séricas permanecieron arriba de $0.1 \mu\text{g/ml}$ por 94 h y una MRT de 40.46 h, dichos resultados a pesar de que no son comparables, si es de interés mencionar que este valor supera a los encontrados en previos estudios en otras especies, como becerros¹⁴³ y en cabras.¹⁴⁴ Así mismo, ninguno de los antes mencionados estudios reportados supera una $t_{1/2\beta}$ más larga que la alcanzada con DOX-h-LA (42.49 h).

El preparado DOX-h-LA, alcanzó una C_{max} de $2.90 \pm 0.96 \mu\text{g/mL}$ y un T_{max} de 25 h en los becerros y de $2.4 \pm 0.95 \mu\text{g/mL}$ y de 19.23 ± 2.03 h, en cabras, después las concentraciones séricas decrecieron lentamente, pero siempre excediendo el límite menor fijado de $0.5 \mu\text{g/mL}$ hasta completar 80 horas y en cabras de 84 horas con un MRT de 44.83 h. Si se comparan estos resultados con otros ensayos realizados en becerros y cabras, se puede afirmar que la DOX-h-LA logró concentraciones por encima de estos valores, y que provee niveles terapéuticos adecuados y se piensa, que es en parte debido a un

incremento en la absorción causada por la β -ciclodextrina, ya que se ha reportado que en becerros prerumiantes tratados con 5 mg/kg/cada 12 h/ durante cinco días por vía oral se logró una C_{max} de $2.3 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$ y un T_{max} de 3.4 h¹⁴⁵ también en otros estudios en cabras con la misma dosis, ($C_{max} = 1.60 \text{ h}$ y $T_{max} = 0.86 \text{ h}$).¹⁴⁶, por otro lado, en otros resultados reportados en la misma especie pero con dosis de 20 mg/kg IM se logró una C_{max} de $3.87 \mu\text{g/mL}$ en animales neumónicos y de $5.56 \mu\text{g/mL}$ en animales sanos¹⁴⁴. Sin embargo, la misma dosis se reportó en otro ensayo, que alcanzó una C_{max} de $1.87 \mu\text{g/mL}$ con una T_{max} de 0.85 h en cabras africanas¹⁴⁷.

La vida media de eliminación obtenida en becerros, fue de 40.81 ± 2.97 horas para DOX-h-LA; y de $9.56 \text{ h} \pm 1.84$ para la DOX-h-IM y de 5.80 ± 0.66 para DOX-h-IV. Estos resultados son similares en las cabras ($40.92 \pm 4.25 \text{ h}$, 4.19 ± 0.66 y de 4.11 ± 0.46). Las diferencias entre estas medias fueron estadísticamente significativas en todas las comparaciones ($P < 0.001$). Los valores obtenidos con DOX-h-LA superan en mucho a los encontrados para doxiciclina por Ziv & Sulman (1974)¹⁴⁸ ($T_{1/2\beta}$ of $9.24 \pm 1.0 \text{ h}$ y $9.5 \pm 1.2 \text{ h}$) después de la administración intravenosa a bovinos y corderos, respectivamente. También fue superior a los obtenidos con la administración IV de doxiciclina en becerros con función ruminal madura e inmadura, ($T_{1/2\beta}$ de 14.9 h ¹⁴³ y 9.5 a 9.9 h ¹⁴⁵).

Para los preparados de no-LA las diferencias en la $T_{1/2\beta}$ entre estos estudios se puede deber a los vehículos usados para disolver y estabilizar a la doxiciclina. Esta aseveración se pudo demostrar, debido a que el fármaco se tornó a color negro en menos de una hora después de que se disolvió en agua inyectable, este no fue el caso de el preparado LA. en parte debido a que el complejo de poloxámero y β ciclodextrina-doxiciclina puede retrasar la degradación. El preparado DOX-h-LA permaneció inalterado a 4°C por más de 3 meses.

La Biodisponibilidad (F) obtenida para el grupo tratado con el preparado novedoso de larga acción DOX-h-LA en las ratas, el valor fue de 951% o de

477% con la fórmula corregida, en becerros y cabras fue de 602 % y de 545 %, valores que superan en mucho a las encontradas en becerros tratados con Doxiciclina-h acuosa (115%). En otros estudios la misma variable para la doxiciclina por vía oral en becerros prerumiantes fue de 69%.¹⁴⁵ En cabras, se ha reportado que en dosis de 5 mg/kg IM, la F fue de 99.4%¹⁴⁶ y 70% en becerros.
143

No es raro obtener valores de F mayores para preparaciones de liberación sostenida.^{104,98} Se ha sugerido que es posible que un formulado de liberación controlada presente una AUC mucho más grande que un formulado con el mismo principio activo, pero que no sea de liberación controlada.¹⁴⁹ Ya que el uso de estos vehículos tiene que ver con el mejoramiento de la absorción, debido a que la velocidad y la magnitud de la biodisponibilidad del fármaco pueden ser optimizados, principalmente al ajustar varios factores que afecten el equilibrio de la disociación del complejo en la formulación y la biofase en la que el complejo formado se administra. Solo la forma libre del fármaco que está en equilibrio con el fármaco complejado en la solución es capaz de penetrar las barreras lipofílicas para posteriormente entrar en la circulación sistémica, lo que trae como consecuencia una liberación lenta del principio activo.

También la influencia combinada de la doxiciclina caracterizada por su baja depuración y de que presenta un fenómeno de redistribución debido a su notable alta liposolubilidad son razones que pueden explicar el valor de F encontrado.^{24, 65} Ya en humanos, se ha informado de picos secundarios, los cuales son característicos de un fenómeno de reciclaje en la curva sérica de concentración-tiempo después de la administración de doxiciclina por vía oral, tal vez favorecido por el fenómeno de ciclo enterohepático.

Otra explicación de el valor de la Biodisponibilidad obtenida en los becerros, cabras y en las ratas tratadas con el preparado DOX-h-LA es más alta que las reportadas en otros estudios, se da porque los formulados con prolongada

absorción, presentan una cinética de flip-flop ¹⁵³. La razón de este fenómeno es que la pendiente usada para la extrapolación al infinito no es representativa de la fase de eliminación. Sino que la AUC extrapolada producto de las concentraciones obtenidas durante un periodo de tiempo suficientemente largo, es por consiguiente más larga hasta que todo el fármaco haya sido absorbido. De acuerdo a Boxenbaum (1998)¹⁵¹ un modelo farmacocinético de flip – flop puede ser reconocido por la apariencia total de la curva concentración sérica vs. tiempo del fármaco, si se considera que el índice de absorción es mas lento que el índice de eliminación. De acuerdo con este autor un modelo de flip-flop puede ser reconocido cuando el perfil de la curva concentración plasmática contra tiempo tiende a acercarse o ser paralela con el índice de absorción. Esto provee un simple y efectivo camino para visualizar la forma y determinar el índice de absorción. Si se aplica la siguiente ecuación, se puede demostrar una condición "flip-flop" para este preparado: Índice de Absorción= $V_z(KC + (\Delta C/\Delta t))$ Al aplicar esta ecuación al preparado DOX-h-LA se pudo comprobar que en efecto puede ser considerado como un verdadera larga-acción.

Con el propósito de definir la sensibilidad bacteriana de doxiciclina y por el hecho de que doxiciclina es un antibiótico tiempo-dependiente, por lo cual, el mejor perfil farmacocinético-farmacodinámico ideal es mantener concentraciones ligeramente superiores a la CMI durante el mayor tiempo posible^{1,41} se midió el tiempo a lo largo del cual la concentración sérica de doxiciclina fueron mantenidas, según las CMI reportadas en bovinos fueron categorizadas como S = Para las bacterias susceptibles, cuando las CMIs fueron $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ y MR = para bacterias medio resistentes, cuando las CMIs se encontraron arriba de $1.5 \mu\text{g/mL}$.^{32;52,56,60,152} Estos datos son apoyados por Notari (1980) ¹⁵³, quien ha sugerido una concentración sérica desde 0.5 a $1.5 \mu\text{g/mL}$ como el rango terapéutico para este antibiótico. También en este rango se han encontrado para aislamientos en humanos una CMI para *E coli* de $1.5 \mu\text{g/mL}$, para *Staphylococcus aureus* de $0.28\mu\text{g/mL}$, para *Pasteurella multocida* de $0.09\mu\text{g/mL}$, y para *Streptococcus pneumoniae* de $0.16 \mu\text{g/mL}$.¹⁵⁴

Para medir la eficacia clínica de doxiciclina, se usó el parámetro $T > CMI$. En los becerros, la DOX-h por vía IV e IM estuvo por encima del nivel S por 9.7 y 17 h pero solamente por 1.5 h y 3 h para el nivel MR; si se comparan estos resultados con los logrados con DOX-h-LA, estos últimos superaron dichos periodos de tiempo por 80 h y 30 h, respectivamente. ($P < 0.001$). En las cabras, tratadas con DOX-h-LA este periodo de tiempo se extendió a 84 h (S) y 53 (MR).

Cuando se utilizó el índice de $AUC_{0-\infty} / CMI$ ¹⁵⁵ los resultados obtenidos para DOX-h-LA varía de 27 para *E. coli*, de 259 y 461 for *Streptococcus pneumoniae* y *Pasteurella multocida*, respectivamente. El resultado obtenido para bacterias resistentes fue de 110 y de 332 para bacterias sensibles. Aunque en la literatura, estos parámetros aún no han sido determinados para doxiciclina en bovinos, empíricamente, este valor es adecuado con lo sugerido por el valor de AUC/MIC de tetraciclina para *Rickettsia* y *Bartonella* spp.¹⁵⁶ y para el tratamiento de neumonía en humanos.¹⁵⁷

Otros autores han reportado que el índice PK/PD que ha sido aceptado como el mejor pronóstico de la eficacia terapéutica para las tetraciclinas es el índice AUC a el estado estable (AUC_{ss}) / MIC ¹⁵⁸ y aunque el valor de AUC_{ss} obviamente no pudo ser obtenido después de la aplicación de una dosis única de DOX-h-SC en las especies animales utilizadas en este experimento, una repetición teórica de 5-veces la concentración vs. tiempo mostró el perfil que se hubiera obtenido de la dosificación de DOX-h-LA cada 72 h, lo que da una predicción del valor de AUC_{ss} de 227 $\mu\text{g/mL/h}$ y el cual fue calculado por el método trapezoidal. Con este valor obtenido, se calculo el índice AUC_{ss}) / MIC , que dio como resultado 568 o 151, para cepas bacterianas S o MR. En contraste el índice AUC_{ss} para la DOX-H-IV y DOX-h-IM fue de 26.09 $\mu\text{g/mL/h}$ y de 32.2 $\mu\text{g/mL/h}$, respectivamente. En estos últimos casos, el índice AUC_{ss}/MIC fue notablemente más bajo, i.e.: 65.2 y de 17.4 para bacterias S y MR después de la administración de DOX-H-IV, y de 80.5 y de 21.5 considerando el mismo valor después de la administración de DOX-H-IM.

El índice calculado de 568 o de 151 para DOX-H-LA, en el caso de cepas bacterianas clasificadas como S o MR, respectivamente, resultaron ser 8 veces más grandes, que a las obtenidas a partir de la administración DOX-h-IM y además ser considerablemente mayores a las obtenidas para los ensayos experimentales publicados para neumonía en humanos¹⁵⁷. Considerando lo anterior y por el hecho de que las concentraciones séricas de la DOX-h no deben ser menores a la CMI durante todo el tiempo que dure el intervalo de dosificación^{1,41} con seguridad se puede recomendar la aplicación del preparado de DOX-h-LA para cumplir con los perfiles PK/PD antes descritos si es inyectado cada 72 h para las cepas de bacterias susceptible. En contraste, considerando el mismo caso DOX-h-IV debería ser inoculada cada 11.8 h, y el preparado acuoso de DOX-h-IM cada 12.99 h. Para estos dos últimos preparados la frecuencia en el intervalo de inyección es completamente impráctica, a diferencia del intervalo de dosificación requerido para el preparado DOX-h-LA.

Por otro lado, de acuerdo a Cunha y otros (1982)¹⁵⁴ la doxiciclina alcanza una máxima eficacia clínica cuando alcanza concentraciones séricas de 4 veces la CMI y permanece en este intervalo el mayor tiempo posible. Considerando lo anterior se midió el tiempo en horas que se mantuvo cuatro veces la CMI para algunas bacterias en suero y pulmón en ratas con el preparado de doxiciclina hiclato de larga acción. Para *Staphylococcus aureus* se encontró que el tiempo en horas fue de 52 y de 54 en suero y pulmón, para *Streptococcus pneumoniae* de 60 y de 64 horas y para *Pasteurella multocida* de 72 y 94 h. Estos valores muestran un adecuado intervalo de dosificación para cubrir la CMI propuesta para una máxima eficacia.

Es relativamente común que un preparado de larga acción de un fármaco muestre una considerable mayor $AUC_{0-\infty}$ a diferencia de los preparados de liberación inmediata. Sin embargo, esto no es siempre el caso cuando la relación tisular:suero es investigada.⁷¹ Para doxiciclina-h-LA, la media la relación tisular:suero fue de 2:1 para pulmón, 9.8:1 para riñón y 2.2:1 en homogenados de intestino. Estos valores son cercanos con los resultados que se han obtenido

en perros después de la administración oral de doxiciclina en dosis de 10 mg/kg (1.3:1 para pulmones y 3.8:1 para riñones) por otro lado en humanos tratados con 100 mg por vía oral (1.4:1 para pulmones), se han encontrado concentraciones en tejido pulmonar, vías bronquiales, y secreciones bronquiales de 1.1 a 1.4, 0.50 a 0.75 y 0.15 a 0.40 veces las concentraciones en suero, respectivamente.³⁶ Este índice fue de algún modo predecible, si se considera el gran volumen de distribución y debido a que la doxiciclina ha sido clasificada, junto con la minociclina como altamente liposoluble del grupo de las tetraciclinas.¹⁵⁹

Por otro lado, de acuerdo a Cunha et al (1982)¹⁵⁴ la doxiciclina en grandes concentraciones (8 a 16 veces la CMI de los organismos), puede exhibir acción bactericida como concentración dependiente. Tomando los valores ya mencionados de CMI para las bacterias para *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Pasteurella multocida*, se halló que el preparado de DOX-h-LA, según las concentraciones halladas en tejido pulmonar de rata, puede actuar tanto como concentración dependiente, como también concentración dependiente, ya que el tiempo en horas que se mantuvo de 8 a 16 veces la CMI para algunas bacterias, en pulmón de rata, fue de 8-10 horas, de 12 a 90 h. y de 10 a 12 horas, para las bacterias *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *P. multocida*, respectivamente.

Sin embargo, Yeruham et al, 2002¹⁶⁰ reportó toxicidad cuando administró 10 veces la dosis terapéutica de doxiciclina (100 mg/kg, en lugar de 10 mg/kg) durante 10 días en becerros por vía oral (n=10). Observó a los 2-3 días signos de toxicidad y muerte por insuficiencia cardíaca aguda a los 5 días, al examen histopatológico se halló edema pulmonar, degeneración y necrosis de miocardio. Estos resultados muestran claramente que la toxicidad de la doxiciclina es dosis-dependiente, y además que el margen de seguridad es muy pequeño. Estos resultados convierten aún más valioso el preparado DOX-h-LA, que con una sola dosis se alcanzan las concentraciones y la eficacia que ya se discutió

anteriormente y sin causar toxicidad, ni estrés a los animales por la manipulación al tratamiento. (Ver Anexo 8.4 – 8.7)

Se ha reportado que las desventajas de los preparados LA-LS son: presencia de residuos titulares, reacciones en tejidos, inyectabilidad del producto y su retención en el sitio de aplicación y estabilidad del producto. Para evaluar en los becerros, la toxicidad aguda de la aplicación de los diferentes preparados de doxiciclina hclato (DOX-h-LA y DOX-h), se realizaron análisis hematológicos y químicas sanguíneas, sin embargo no se observó ningún signo de toxicidad aguda por la administración del preparado DOX-h-LA. . (Ver Anexo 8.4 – 8.7)

Así mismo, como ya se mencionó, no se observó una respuesta inflamatoria en el sitio de inyección con el preparado DOX-h-LA. Aunque, se detectó un abultamiento bien definido aparentemente indoloro que permaneció por poco más de 30 días con un tamaño aproximado de 5 x 8 x 1 cm. Este abultamiento no se cree que sea una respuesta inflamatoria sino, más bien es ocasionada por el poloxámero que gela con la temperatura corporal. Después de este tiempo no fue posible detectar dicha lesión. Los animales no mostraron ningún signo de dolor o malestar con el preparado de larga-acción. En contraste al dolor e inflamación obtenida con la formulación acuosa por 4-5 días. En las cabras se presentó este abultamiento indoloro solo en 3 animales por no más de 7 días y con un tamaño aproximado de 2 x 1 x 1 cm. En las ratas, también se presentó un pequeño abultamiento bien definido e indoloro, detectable durante 5-7 días. Dicho abultamiento al realizar el análisis histopatológico del sitio de inyección del preparado DOX-h-LA mostró una pequeña respuesta inflamatoria, pero más bien el espacio fue ocupado por la matriz de poloxámero que se vuelve gel cuando se encuentra a temperatura ambiente. En este grupo de ratas no se presenta lesión o abultamiento después de este tiempo. Los animales no mostraron ningún signo de dolor o molestia con el preparado de larga-acción, contrariamente a el grupo que recibió el preparado de doxiciclina-h también por vía SC a la misma dosis, en estas ratas se observó una clara respuesta inflamatoria que se observó

por mínimo 7 días. El Anexo 8.7 muestra una imagen histopatológica típica del sitio de inyección a las 96 h para el grupo medicado con DOX-h-LA y la imagen comparativa del grupo tratado con el preparado acuoso de DOX-h. Se observan infiltrados inflamatorios de distribución focal a multifocal con la presencia de células mononucleares, paniculitis, y miositis necrótica-supurativa difusa en este grupo; mientras que en el primer grupo, solo se observan células mononucleares ligera difusa transitorias causada por la presencia de la matriz de poloxámero gelada a temperatura corporal.

Conclusiones. Con el preparado matricial inyectable DOX-h-LA realizado a base de la combinación de doxiciclina + β -Ciclodextrina + Poloxámero 407 se pudo evitar el dolor y reducir la irritación local a la aplicación parenteral además de una liberación lenta del activo. Con la β -Ciclodextrina y el Poloxámero 407 se mejoró la estabilidad física de la doxiciclina, se logro resistir la oxidación, la fotólisis y la hidrólisis , además que la vida de anaquel se extiende. Por otro lado, la vía parenteral se recomienda para el ganado bovino (rumiantes) debido a que no afecta la microflora y microfauna existente en su pre-estómago útil para el aprovechamiento de alimentos ricos en fibras (celulosa), absorbiendo como productos finales ácido graso volátiles y proteínas microbiana de calidad superior a la vegetal. El metabolismo del nitrógeno y las vitaminas del grupo B se sintetizan mediante fermentación microbiana en el tracto digestivo. De acuerdo con los resultados obtenidos en la PK y en la eficacia farmacológica de la doxiciclina, ya se puede contar con un prospecto novedoso de DOX-h-LA para el uso parenteral en rumiantes y cuyo intervalo de dosificación debe ser aplicado cada 72 h, sin que las CMI para bacterias sensibles caigan por debajo de las recomendadas. Sin embargo, otros estudios podrían optimizar el formulado y también, a pesar de la evidencia que indica que el poloxámero y la β -ciclodextrina carece de toxicidad en varias especies⁹⁸, se debe valorar y garantizar la seguridad de este preparado en las especies a las que va dirigido y además es necesario realizar evaluación de residuos en subproductos de origen animal.

9- Índice de Cuadros

Cuadro 1. Concentraciones mínimas inhibitorias ($\mu\text{g/mL}$) de hiclato de doxiciclina

**CUADRO 1.
CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIA (µg/mL) DE DOXICICLINA**

Organismo	CMI (µg/mL)	No. De Referencia
<i>Chlamydia trachomatis</i>	0.008 - 0.06 - 0.2b	54, 55,57
<i>Bacillus sp.</i>	0.025 - 0.03	32,33
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.25 a,b	46
<i>Staphylococcus intermedius</i>	0.125 a - 8 b	47,49, 62
<i>Staphylococcus coagulasa neg.</i>	0.25a - 8 b	46
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0.25ab	46
<i>Haemophilus influenzae</i>	0.5a 1 b	51
<i>M. Catarrhalis</i>	0.25ab	46
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0.5b	31,61
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	0.12	34
<i>Brachyspira pilosicoli</i>	0.25	50
<i>E. aerogenes</i>	1a 2 b	51
<i>Salmonella sp</i>	2a 4 b	51
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	2a	46
<i>Escherichia coli</i>	1	51

a -(MIC₅₀)

b - (MIC₉₀)

10- Índice de Figuras

Figura 1. Farmacocinética de diferentes presentaciones comerciales de oxitetraciclina convencionales y de larga acción aplicadas por vía IM en bovinos

Figura 2. Fórmula estructural de hclato de doxiciclina

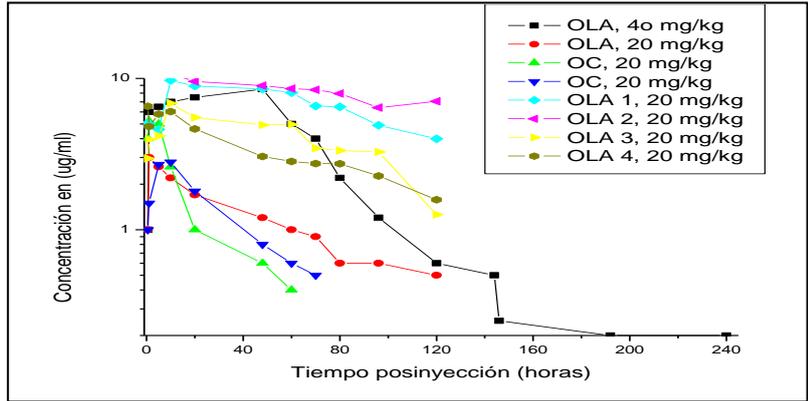
Figura 3. Niveles plasmáticos vs tiempo para una forma farmacéutica convencional y diferentes sistemas de liberación

Figura 4. Esquema de La ciclodextrina

Figura 5 Efecto del pH en la estructura del Carbopol

Figura 6. Esquema del Poloxámero

Figura 7. Esquema de Chitosan



Tipo de preparado y dosis administrada
 Tipo de preparado: OLA- oxitetraciclina de larga acción
 OC- oxitetraciclina convencional

Figura 1. Farmacocinética de diferentes presentaciones comerciales de oxitetraciclinas convencionales y de larga acción aplicadas por vía IM en bovinos. (modificado de 32,118,143)

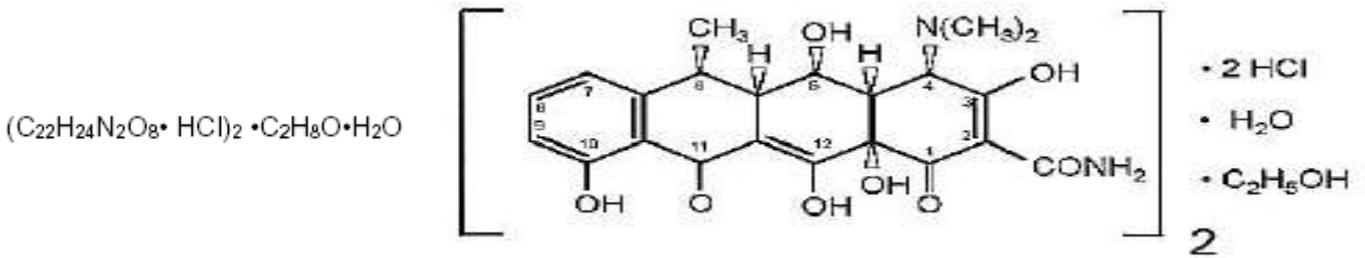


Figura 2. Fórmula estructural de la Doxiciclina Hiclato

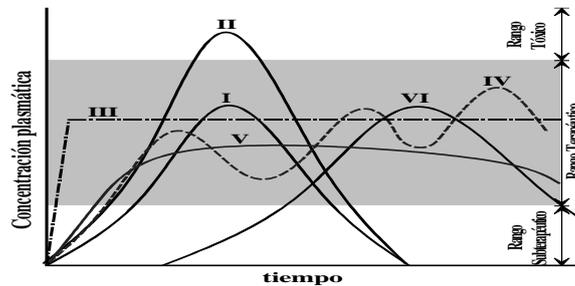


Figura 3. Niveles plasmáticos vs. tiempo para una forma farmacéutica convencional y diferentes sistemas de liberación de activos: I) Liberación convencional o inmediata; II) Liberación inmediata doble dosis; III) Liberación a velocidad constante (SLC ó infusión I.V. continua); IV) Liberación repetida; V) Liberación prolongada; VI) Liberación retardada o diferida.⁸⁰

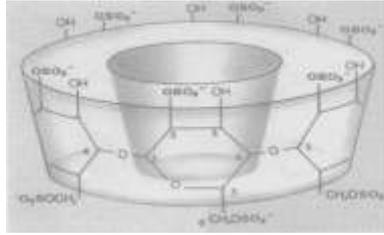


Figura 4. Las ciclodextrinas son carbohidratos cíclicos formados por glucosa unidas mediante enlaces α -(1,4) glucosídicos. Presentan forma tronco-cónica cuya cavidad muestra propiedades hidrofóbicas y los bordes exteriores resultan ser hidrofílicos

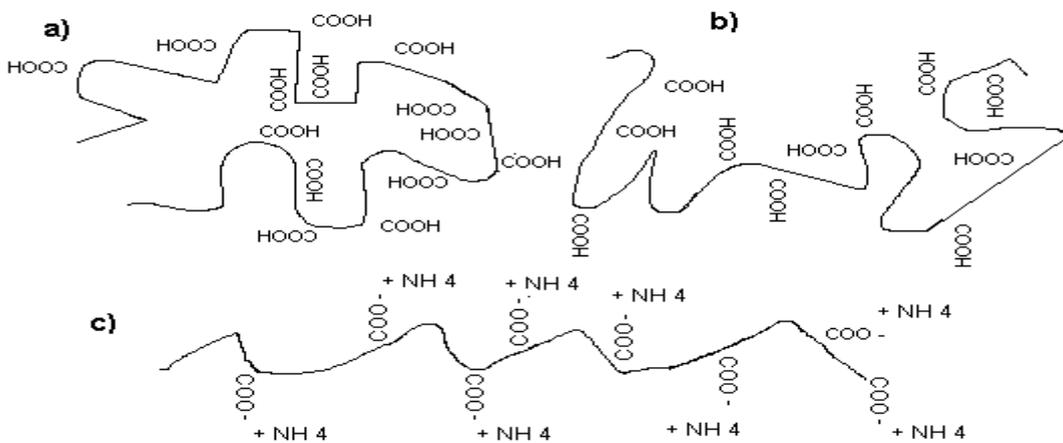


Figura 5 Efecto del pH en la estructura del Carbopol. a) Con pH ácido la cadena se encuentra colapsada, b) con pH neutro, la cadena se encuentra relajada y c) con pH ligeramente básico las cadenas se encuentran completamente relajadas.

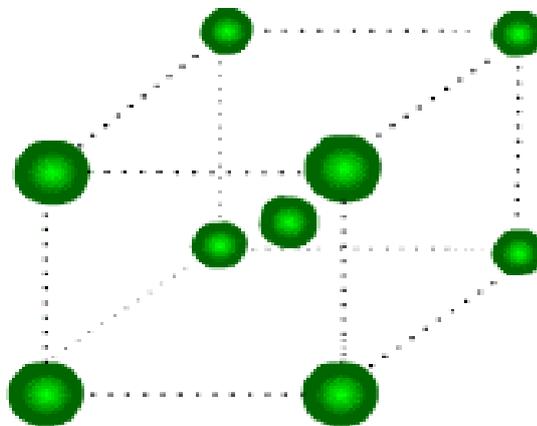
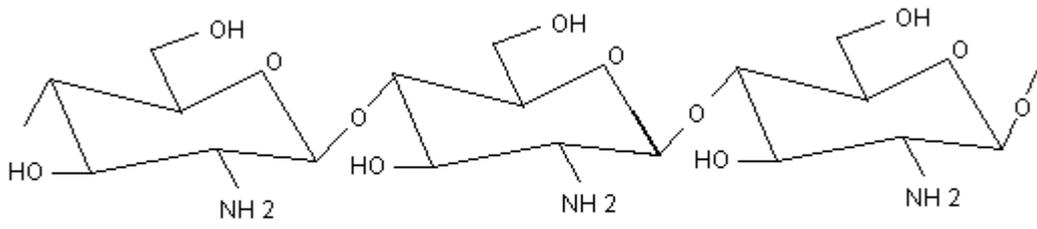


Figura 6. Esquema del poloxámero



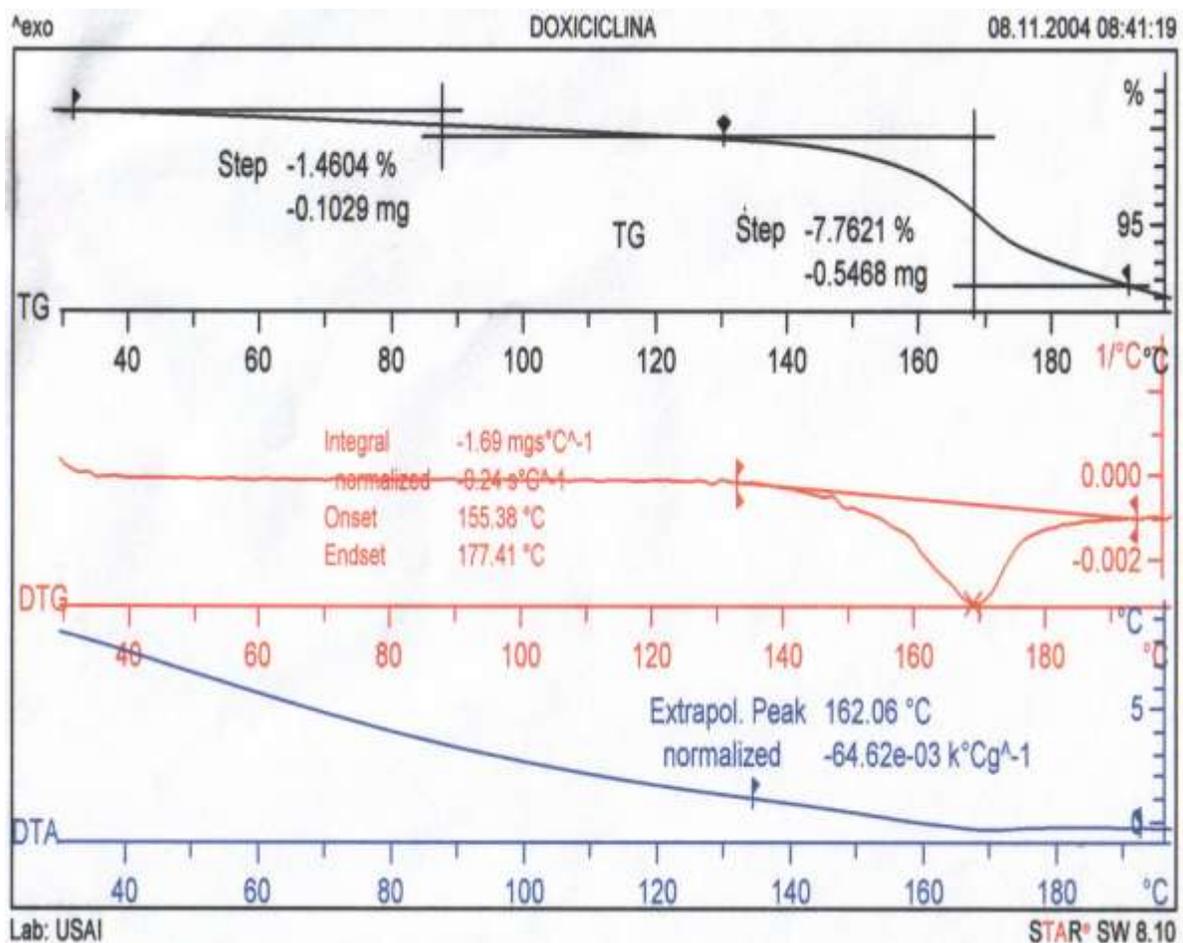
Estructura del Chitosan

Figura 7. Esquema de chitosan

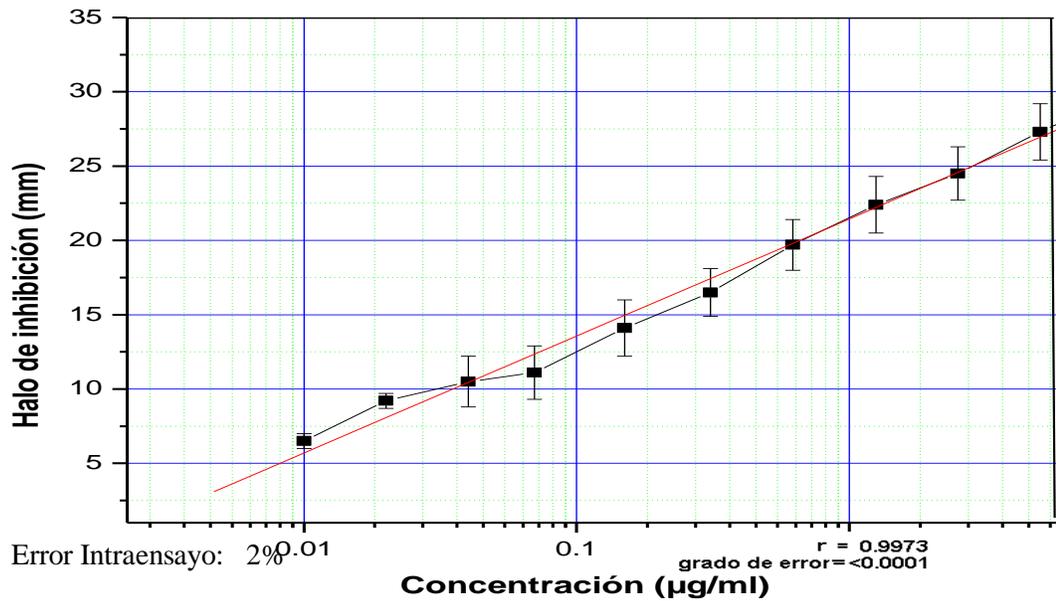
11- Índice de Anexos

- 11.1. Análisis termogravimétrico de hiclato de doxiciclina
- 11.2. Espectro encontrado en UV-visible de la molécula de doxiciclina.
en suero de becerro por medio de HPLC
- 11.3. Curva estándar de hiclato de doxiciclina en suero de rata, mediante
la prueba microbiológica y la prueba cromatográfica de HPLC
- 11.4. Validación del Método microbiológico
- 11.5. Fotografía del sitio de administración después de la inyección de los
preparados de hiclato de doxiciclina en los becerros
- 11.6. Resultados de los exámenes de laboratorio de los becerros después de
la inyección del preparado de hiclato de doxiciclina de liberación prolongada
- 11.7. Gráfico del análisis bioquímico de los becerros inoculados con DOX-h-LA
(dosis de 10 mg/kg) por vía subcutánea
- 11.8. Aspectos histopatológicos del sitio de administración en ratas de laboratorio

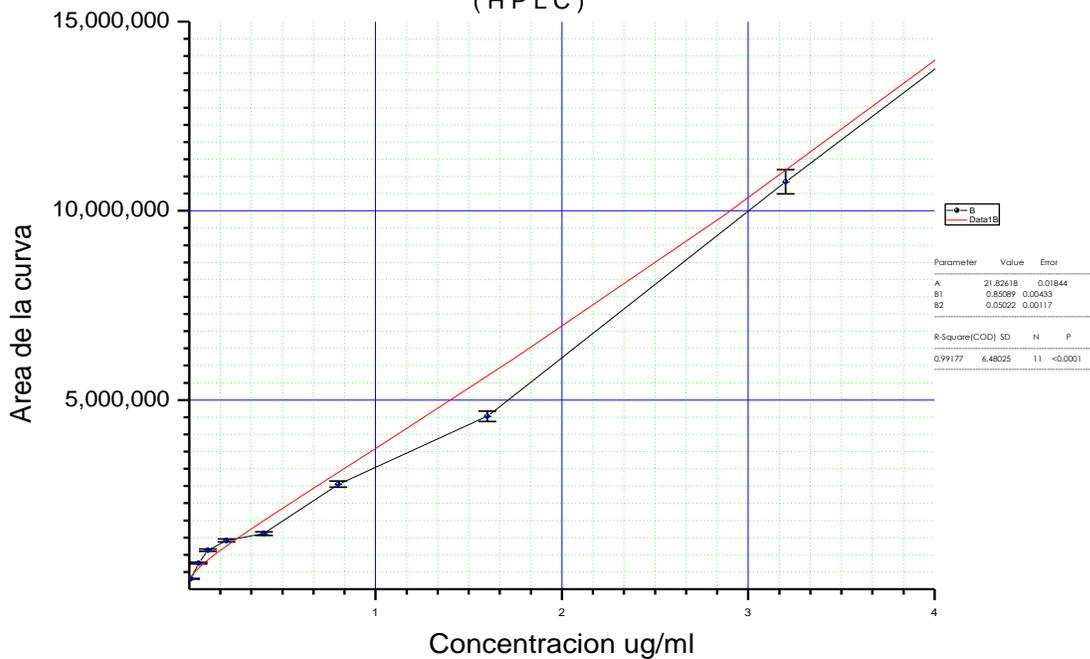
11.1. Análisis termogravimétrico de doxiciclina hclato. Determinación de la masa de una muestra como una función de temperatura, o tiempo de calentamiento



11.3. Curva estandar de doxiciclina en suero de rata, mediante la prueba microbiológica de Bennet et al.¹³⁰ Y la prueba cromatografica de HPLC.



Curva del estandar de Doxiciclina mediante la prueba de Cromatografía de alta resolución (HPLC)



11.4. Validación del Método Microbiológico (*Bennet et al*)¹³⁰

Concentración de doxiciclina µg/mL	Microbiológico	HPLC	DE+
5	4.8	5.1	0.3
2.5	2.4	2.5	0.1
0.5	0.52	0.51	0.2



11.5. Fotografía del sitio de administración después de la inyección de los preparados de doxiciclina hiclato en los becerros. A. Las flechas muestran zonas de abultamiento indoloro de aproximadamente 10 X 10 cm en el sitio de inoculación causada por el gel de poloxámero (DOX-h-LA.) B. Aproximadamente a los 30 días desaparece el abultamiento. C. Zonas de inflamación dolorosa en bovinos a los cuales se le administró una sola dosis de 10 mg/kg por vía SC de DOX-h en polvo disuelta en agua destilada estéril.



A



B C



11.6. Resultados de los exámenes de laboratorio obtenidos a los 5 días después de la inyección del preparado de doxiciclina hclato de liberación prolongada en los becerros.

EXAMENES DE LABORATORIO

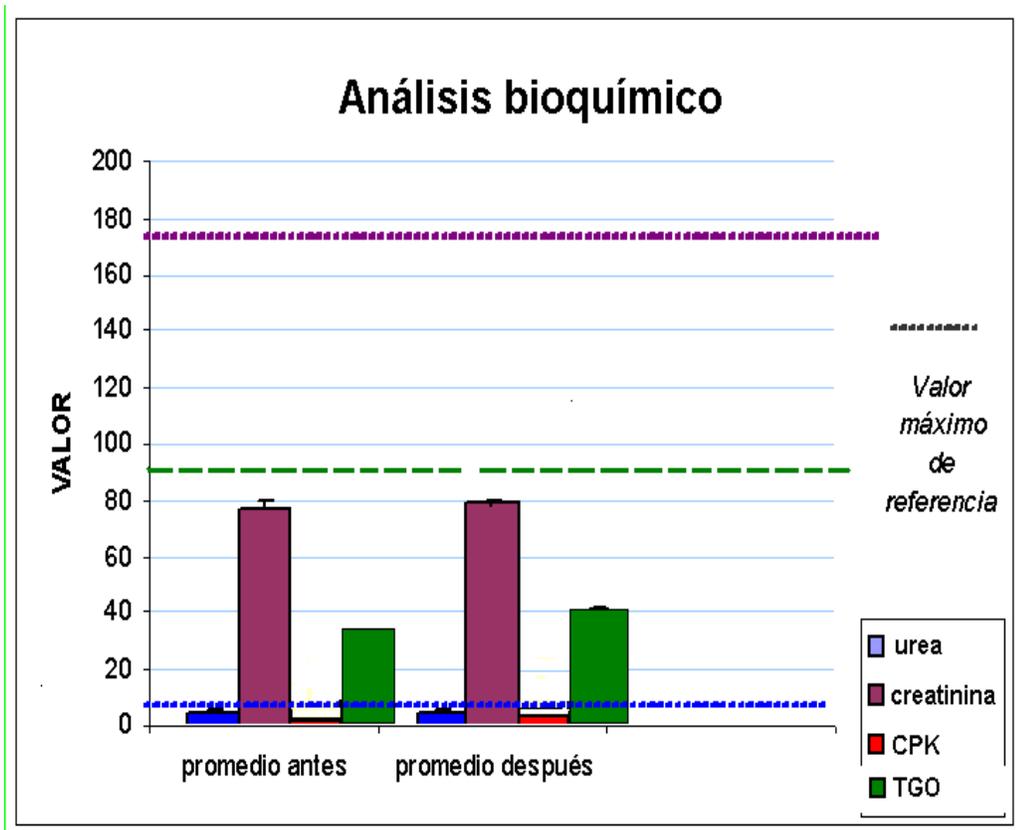
HEMOGRAMA

TIPO DE EXAMEN	VALOR OBTENIDO ANTES	VALOR OBTENIDO DESPUES	VALOR NORMAL
HEMATOCRITO	32.4 – 38.6	33 – 36.7	0.30- 0.40 L/L
HEMOGLOBINA	109 – 140.4	105 – 111.9	90 – 140 g/dl
ERITROCITOS	6.5 – 12.28	7– 9.86	5 - 8 ^{*10-12}
VOLUMEN GLOBULAR	38.3 – 50.7	37.2 – 39	40 – 60 fl
C.M.H.G.	32.1- 35.9	30.2 – 32.5	30 – 36 gm/dl
PROTEINAS PLASMATICAS	6.2 - 8	6.2 - 7	7 – 8.5 gm/dl
PLAQUETAS	379 - 600	350 - 654	100 - 800 ^{*10-3}
FIBRINOGENO	300- 650	485 - 500	300 – 700 mg/dl
LEUCOCITOS	7 – 10.6	6 – 9.1	4 – 12 ^{*10-3}
LINFOCITOS	37 - 60	35 - 69	2 - 65 ^{*10-9}
NEUTROFILOS SEGMENTADOS	3.1 – 3.9	1.7 – 1.8	1 – 4 ^{*10-9}
MONOCITOS	0.3 – 0.31	0.1 – 0.13	0 – 0.8 ^{*10-9}

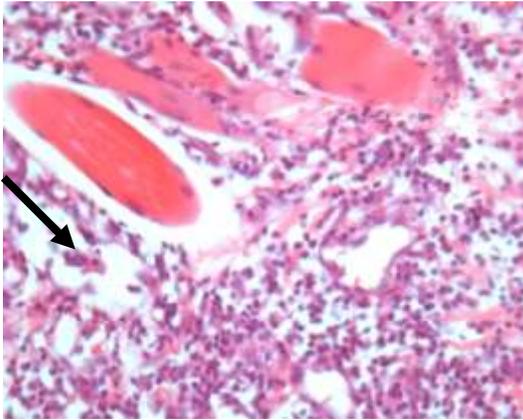
QUIMICA SANGUINEA

TIPO DE EXAMEN	VALOR OBTENIDO ANTES	VALOR OBTENIDO DESPUES	VALOR NORMAL
UREA	2.9 – 6.1	3 – 6.5	2.0 – 6.66 mmol/L
CREATININA	82 - 149	97.9 - 167	88. 4 – 176.8 µmol/L
TGO	10 - 41	9 – 46.1	< 90 U/L
CPK	0 – 0.11	0.1 – 0.13	< 0.120 U/ml

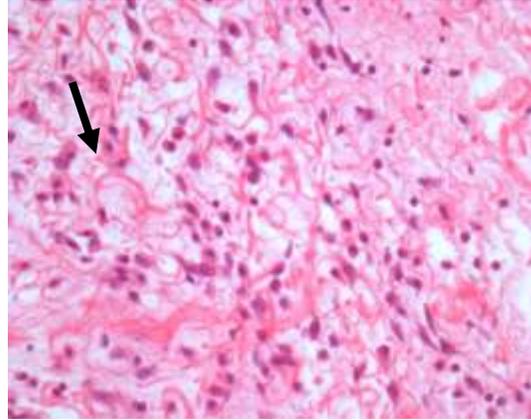
11.7. Gráfico del análisis bioquímico de los becerros inoculados con DOX-HCL-LA en dosis de 10 mg/kg por vía SC. (n=10)



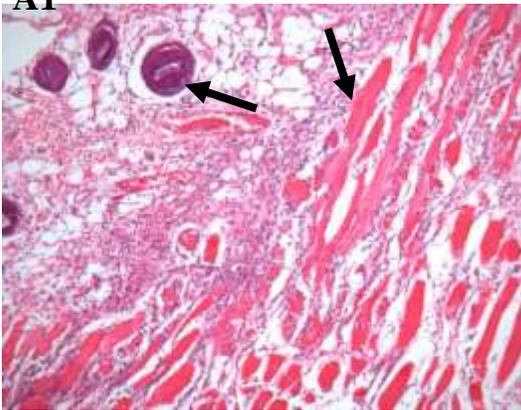
11.8. Aspectos histopatológicos del sitio de administración en ratas de laboratorio.



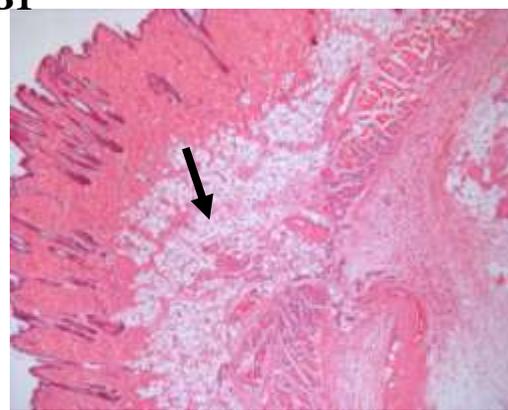
A1



B1



A2



B2

Aspecto histopatológico del sitio de inyección 120 h después de la administración del preparado acuoso de doxiciclina hiclato DOX-h (A) y del preparado de larga acción de doxiciclina hiclato incluida en β -ciclodextrina y poloxámero (DOX-h-LA) (B). En A1 (40 X) las flechas muestran una gran zona de necrosis grasa rodeada por una capa de macrófagos y células gigantes. Las flechas en A2 (10 X) muestran paniculitis, y una miositis necrótica-supurativa difusa.

Las figuras B1 y B2 (40 X y 4 X, respectivamente) muestran una ligera infiltración ligera difusa de células mononucleares causada por el gel de poloxámero.

13- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Prescott JF, Baggot JD and Walker RD. Antimicrobial Therapy in veterinary medicine. Third Edition. Iowa State University Press/Ames. USA, 2000.
2. Saunders GMP. Handbook of veterinary drugs. Philadelphia Pennsylvania. 2002.
3. O'brien TF. The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. Clinical Infectious Disease. 1997; 2: 2-8.
4. Burns, J. Mechanisms of bacterial resistance. Pediatr. Clin. NorthAmerica. 1995;42:497-507.
5. Heinemann, J Ankenbauer R and Amabile-Cuevas C. Do antibiotics maintain antibiotic resistance? Drug Discovery Today. 2000;5(5):195-204.
6. Bernad, BMJ. Dendrímeros . Nuevos Sistemas de liberación de fármacos . Informaceútico. 2002; 9 (3) 13-18.
7. Jaamela SR, Misra A and Jayakrishnan A. Cross-linked chitosan microspheres as carriers for prolonged delivery of macromolecular drugs. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 1994; 6 (7) 621-632.
8. Juárez RI. Farmacocinética de tres preparados de Ivermectina de prolongada estancia en ganado bovino Tesis de maestría, FMVZ, UNAM, México, 2001.
9. Vargas ED. Farmacocinética sérica en porcinos medicados con una nueva molécula de la familia de las cefalonas (CQMEPCT). Tesis de maestría, FMVZ, UNAM, México, 2001.
10. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Volumen 7, México (DF), SSA, 1999.
11. Improving the Ethical Review Process. Int. J. of Pharm Med. 1997;11 (3) 119.
12. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Industria Farmaceútica en México, México (DF), SECOFI, 2000.
13. United States Pharmacopeia Drug Information for the Health Care Professional. Vol. 1, 15th edition. USA, 1997.
14. Novoa HG. Ética y reglamentación de la investigación clínica de medicamentos en México, Revista Mexicana de ciencias farmaceuticas. 1999;30 (2): 32-34.
15. Spilker B. Guide to clinical trials. Raven Press. 1991.
16. Sumano, LH and Ocampo, CL *Tetraciclinas*. In Farmacologia Veterinaria. 3rd pp

- 235-262. McGrawHill/Interamericana, Mexico City. 2006.
17. Papich MG. The β -lactam antibiotics: clinical pharmacology and recent developments. *Comp Equine*. 1987; 9: 68-75.
 18. Dominguez ZR, Cortes ME, Gomes TA, Diniz HF, Freitas CS, Gomes JB, Faria AMC and Sinisterra RD. Bioactive glass as a drug delivery system of tetracycline and tetracycline associated with β -cyclodextrin. *Biomaterials*. 2004; 25 (2);327-333.
 19. Gruet P, Maincent P, Berthelot X and Kaltsatos V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced drug delivery reviews*. 2001; 50(3);245-259.
 20. Domenech J, Martínez J. and Pla JM. *Biofarmacia y Farmacocinética*. Vol II. *Biofarmacia*. Editorial Síntesis, España, 1998.
 21. Polishchuk AY and Zaikov GE. *Multicomponent transport in polymer systems for controlled release*. Vol 3 . Gordon and Breach Science Publishers. Amsterdam. 1997.
 22. Adams R. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. USA. Iowa State University Press, 1995.
 23. Punch PI, Costa ND, Chambers ED, *et al*. Plasma and tear concentrations of antibiotics administered parenterally to cattle. *Res Vet Sci*. 1985;39, 179-187.
 24. Aronson AL, *Pharmacotherapeutics of the newer tetracyclines*. *JAVMA*. 1980; 176 (10):1061-68
 25. Katzung BG. *Farmacología Básica y clínica*. 4ª. Edición, México. El Manual Moderno, 1991.
 26. Salazar MM, Sumano LH and Gracia MI. Bioequivalencia de cuatro marcas de oxitetraciclina. *Veterinaria México*.1995 ;26(3)
 27. Breeze R and Gay C: Plasma levels of a long-acting oxytetracycline in cattle. *Bovine Pract*. 1981; 16,22-23.
 28. Marcotty T, Billiouw M, Chaka G, *et al*. Immunisation against East Coast fever by the infection and treatment method: evaluation of the use of ice baths for field delivery and appraisal of an acid formulation of long-acting tetracycline. *Zambian Vet. J*. 2000.

29. Davey LA, Ferber MT and Kaye B. Comparison of the serum pharmacokinetics of a long acting and a conventional oxytetracycline injection. *Vet Rec.* 1985;117:426-429.
30. Terhune NT and Upson WD. Oxytetracycline pharmacokinetics, tissue depletion, and toxicity after administration of a long-acting preparation at double the label dosage. *JAVMA.* 1989;194:911-917.
31. Bousquet E, et al, Efficacy of doxycycline in feed for the control of pneumonia caused by *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma hyopneumoniae* in fattenin pigs. *Vet Rec.* 1998;143:269.
32. Brook I, Elliott TB, Pryor HI, Sautter TE, Gnade BT, Thakar JH and Knudson GB. In vitro resistance of *Bacillus anthracis* Sterne to doxycycline, macrolides and quinolones. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2001; 18 (6)559-562.
33. Esel D, Doganay M and Sumerkan B. Antimicrobial susceptibilities of 40 isolates of *Bacillus anthracis* isolated in Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2003;22 (1)70-72.
34. Hunfeld KP, Bittner T, Rodel R, Brade V and Cinatl J. New real-time PCR-based method for in vitro susceptibility testing of *Anaplasma phagocytophilum* against antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2004;23 (6)563-571.
35. Mehaffey PC, Barrett MS, Putnam SD and Jones RN. Antigonococcal activity of 11 drugs used for therapy or prophylaxis of malaria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.* 1995;23 (1-2)11-13
36. Shaw, DH and Rubin, ST. Pharmacologic activity of doxycycline. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1986; 189, 808-10.
37. Nows JFM, et al. A comparative study on irritation and residue aspects of five Oxytetracycline formulations administered intramuscularly to calves, pigs and sheep. *Vet Q.* 1990;12:12-129.
38. Vomand, KC and Sumano, LH. Adverse drug reactions in cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1990; 197, 899 – 905.
39. Vogelmann, B and Craig W. Kinetics of antimicrobial activity. *The Journal of Pediatrics.* 1986;108(2):835-840.

40. Andes, D and Craig W. In vitro activities of amoxicillin and amoxicillin-clavulanate against *Streptococcus pneumoniae*: application to breakpoint determination. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42:2375-2379.
41. Craig W A . Pharmacokinetic /Pharmacodynamic Parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of Mice and Men. *Clinical Infectious Diseases.* 1998; 26 1–12.
42. Craig, W. Does the Dose Matter? *Clinical Infectious Diseases.* 2001; 33(Suppl. 3):S233-237.
43. Nakamura Y. Doxycycline. *Fish pathol.* 1982; 17:67-76.
44. Boothe DM. *Small animal clinical pharmacology and therapeutics.* 1a. ed. Saunders. USA. 2001.
45. Rosenblatt JE, Brodie JL, et al: Comparison of in vitro activity and clinical pharmacology of doxycycline with other tetracyclines. *Antimicrob Agent Chemother.* 1966; 134-141.
46. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection.* 2003;9:(8)1- 7.
47. Ganiere JP, Medaille C and Mangion C. Antimicrobial Drug Susceptibility of *Staphylococcus intermedius* Clinical Isolates from Canine Pyoderma. *J. Vet. Med. B.* 2005;52: 25-31.
48. Guerin-Faublee, V, Flandrois, JP, Broye, E, Tupin, F, and Richard, Y. *Actinomyces pyogenes*: susceptibility of 103 clinical animal isolates to 22 antimicrobial agents. *Veterinary Research,* 1993; 24, 251-259.
49. Pellerin JL, Bourdeau P, Sebbag H and Person JM. Epidemiological surveillance of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyodermas. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases.* 1998; 21: 115-133.
50. Pringle M, Landén A, Franklin A. Tiamulin resistance in porcine *Brachyspira pilosicoli* isolates. *Research in Veterinary Science.* Accepted 16 February 2005. ELSEVIER. Available online at www.sciencedirect.com.

51. Traczewski MM and Brown SD. In Vitro Potency and Spectrum of Activity Compared to Ten Other Antimicrobial Compounds. The Clinical Microbiology Institute, Wilsonville, Oregon.
52. Yoshimura, H, Ishimura, M, Endoh, YS & Kojima A. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. *Journal Of Veterinary Medicine*. 2001; 48, 555-560.
53. Goren E, Jong WA, Doornenbal P, and Laurence T. Therapeutical efficacy of doxycycline hyclate in experimental *Escherichia coli* infection in broilers. *The veterinary Quarterly*. 1988;10 (1);48-53.
54. Beale AS and Upshon PA. Characteristics of Murine Model of Genital Infection with *Chlamydia trachomatis* and Effects of Therapy with Tetracyclines, Amoxicillin-Clavulanic Acid, or Azithromycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994;38(9)1937-43.
55. Dailloux M, Ottemer C, Albert H and Weber M. In vitro activity of antibiotics against Chlamydiae. *Pathologie Biologie*. 1990; 38 (5) 426-430.
56. Jee, JB, Degraives, FJ, Kim, TY and Kaltenboeck, B. High prevalence of natural chlamydia species infection in calves. *Journal of clinical microbiology*. 2004; 42, 5664-5672.
57. Sangaré L, Morisset RM and Ravaoarinoro M. In vitro inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth by liposome-encapsulated cyclones. *Pathologie Biologie*. 2001; 49 (1) 53-56.
58. Breitschwerdt EB, et al. Doxycycline hyclate treatment of experimental canine ehrlichiosis followed by challenge inoculation with two Ehrlichia canis strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42:362.
59. Jakoby JR and Gylstorff J. Comparative investigations on chemotherapeutic psittacosis control. Blood levels in blunt-tailed parrots following oral application of different medicated foods and parenteral application of doxycycline in an import station. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 1983;96:261-264.
60. Hospenthal DR and Murray, CK. In vitro susceptibilities of seven *Leptospira* species to traditional and newer antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003; 47, 2646-2648.

61. Waites KB, Crabb DM and Duffy LB. Inhibitory and bactericidal activities of gemifloxacin and other antiagents against *Mycoplasma pneumoniae*. International Journal of Antimicrobial Agents. 2003;21 (6)574-576.
62. Bettenay SV, et al. Doxycycline hydrochloride in treatment of canine pyoderma. Aust Vet Pract. 1998; 28: 14.
63. Su Hua, Morrison R, Messer R, Whitmire W, Hughes S and Caldwell HD. The Effect of Doxycycline Treatment on the Development of Protective Immunity in a Murine Model of Chlamydial Genital Infection. The Journal of Infectious Diseases. 1999;180:1252-8.
64. Suzuka, I, Kaji, H and Kaji, A. Binding of specific sRNA to 30S ribosomal subunits: effects of 50S ribosomal subunits. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1966; 55, 1483–1486.
65. Chopra, I, Howe, TGB, Linton KB, Richmond, MH and Speller, DCE. The Tetracyclines: prospects at the beginning of the 1980s. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1981; 8, 5-21.
66. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2001; Jun.65(2).232-60.
67. Boker R. Analysis and quantitation of a metabolite of doxycycline in mice, rats, and humans by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 1983;274:255-262.
68. Tasker RAR, Ross SJ, Dohoo SE, Elson CM Pharmacokinetics of an injectable sustained release formulation of morphine for use in dogs. J. Vet. Pharmacol Ther. 1997; 20, 362-367.
69. Barichello JM, Morishita M, Takayama K, Nagai T. Absorption of insulin from Pluronic F-127 gels following subcutaneous administration in rats. Int. J. Pharm. 1999; 184. 189-198.
70. Archimbault P, Ambrogg G, Joineaud J. Doxycycline in poultry: bioavailability and transfer to eggs. Rev Med Vet. 1983; 134: 291-295.
71. Riond, JL and Riviere, JE. Pharmacokinetics and toxicology of doxycycline. *Veterinary and Human Toxicology*. 1988; 30, 431-444.

72. Boxenbaum, H. Pharmacokinetics Tricks and Traps: Flip-Flop Models. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*. 1998; 1, 90-91.
73. Weiner, A. Encyclopedia of pharmaceutical technology .Marcel Dekker Inc. USA. 2002.
74. Remington. Farmacia (Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires Argentina. 1998.
75. Magnin D, Lefebure J, Chornet E, Dumitrius. Physicochemical and structural characterization of a polyionic matrix of interest in biomedical fields. *Carbohydrate polymers*. 2004;55.437-453.
76. Toutain PL and Raynaud JP. Pharmacokinetics of oxytetracycline in young cattle: Comparison of conventional vs long-acting formulations.*Am J. Vet. Res.* 1983;44:1203-1209.
77. Rathbone MJ and Gurny R. Controlled Release Veterinary Drug Delivery 1a ed. Elsevier. Amsterdam 2000.
78. Connors KA. The stability of cyclodextrin complexes in solution. *Chemical Review*. 1997; 97;1325-1357.
79. Duchene D, Vauyion C and Glomut F. Cyclodextrins, their value in pharmaceutical. *Technology drug development and industrial pharmacy*. 1986;12:2193-2215.
80. Jones SP, Grant DJW, Hadgraft J. and Parr GD. Cyclodextrins in the pharmaceutical sciences. Part II. Pharmaceutical, biopharmaceutical, biological and analytical aspects, and applications of cyclodextrin and its inclusion compound. *Acta pharmaceutica technologica*. 1984; 30 (4).263-277.
81. Escobar LL. Interacciones no covalentes analgésicos antiinflamatorios / ciclodextrinas. Doctorado en ciencias químicas. Fac.Quim.UNAM. 1998.
82. Szeman, J, Stadier-Szoke, A, Vikmon, M and Szejtli, J. Stabilization of prostacyclin and furosemide by cyclodextrins. *Chemical Abstracts*. 1988; 108, 392.
83. Martínez PR, Las ciclodextrinas y su importancia en la industria química. Facultad de Química. UNAM. Licenciatura Ingeniero Químico, México.D.F. 2000.
84. Szejtli, J. Molecular entrapment and release properties of drugs by cyclodextrins. In *Controlled drug bioavailability*. Vol 3, Eds Smolen V.F.& Ball, L.A. pp 365-421. John-Wiley and sons, New, York. 1985.

85. Uekama K And Otagiri M. Cyclodextrins in drug carrier systems. CRC Critical Reviews in Therapeutic Carrier Systems. 1987; 3(1). 1-40
86. Bekers O, Uijtendaal EV, Beijnen JH, Bult A and Undeberg WJM. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. Drug development and industrial pharmacy. 1991;17:1503-1549.
87. Otero-Espinar FJ, Anguiano-Igeas S, Blanco-Méndez J and Vila-Jato JL. Reduction in the ulcerogenicity of naproxen by complexation with β -cyclodextrin. Int. J. Pharm. 1991; 70: 35-41.
88. Uekama, K, Hirayama, F and Irie, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. Chemistry Reviews. 1998; 98, 2045 - 2076.
89. Yoshida, A, Yamamoto, M, Itoh, T, Irie, T, Hirayama, F and Uekama, K. Utility of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in an intramuscular injectable preparation of nimodipine. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 1990; 38, 176 - 179.
90. Arellano A, Santoyo S, Martin C and Ygartua P. Influence of propylene glycol and isopropyl myristate on the in vitro percutaneous penetration of diclofenac sodium from carbopol gels. J. Pharm. Sci.1998;7.129-135.
91. Doliwa A, Santoyo S, Ygartua P. Effect of passive and iontophoretic skin pretreatments with terpenes on the in vitro skin transport of piroxicam. Int. J. Pharm.2001; 229.37-44.
92. MacLean DS, Robertson JD, Jay M and Stalker DJ. Noninvasive measurement of protein release from subcutaneous depo formulations in vivo using X-ray fluorescence. J. Control Res.1995;34(2)167-173.
93. Valenta C, Schwarz E, Bernkop-Schnurch A. Lizozyme-caffeic acid conjugates: possible novel preservatives for dermal formulations. Int. J. Pharm.1998; 174.125-132.
94. Welin-Berger K, Neelissen JSM, Bergenstahi B. The effect of rheological behaviour of a topical anaesthetic formulation on the release and permeation rates of the active compound. Eur. J. Pharm. Sci. 2001;13.309-318.
95. Alonso BMT. Estudios de liberación del trimetoprim por su incorporación en ciclodextrinas con matrices carbomericas. Tesis de licenciatura de la Facultad de

- Química. para obtener el título de Química Farmacéutica Bióloga en la Universidad Nacional Autónoma de México México, D.F. 2002.
96. Ikechukwu UM, Exaud S, Van den Mooter G, Verbeke N and Kinget R. Bioavailability of apomorphine following intranasal administration of mucoadhesive drug delivery systems in rabbits. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1999; 9:213-219.
 97. Kabanov, AV, Batrakova, EV, Melik-Nubarov, NS, Fedoseev, NA, Dorodnich, TY, Alakhov, VY, Chekonin, VP, Nazarova, IR, Kabanov, VA. A new class of drug carriers: micelles of poly (oxyethylene)- poly (oxypropylene)- poly (oxyethylene) block copolymers as microcontainers for drug targeting from blood in brain. *Journal of Controlled Release.* 1992; 22, 141-158.
 98. Lawrence MJ. Surfactant systems microemulsions and vesicles as vehicles for drug delivery. *European journal of drug and pharmacokinetics.* 1994; 19, 257-259.
 99. Sherlund M, Welin-Berger K, Brodin A, Malmsten M. Local anaesthetic block copolymer system undergoing phase transition dilution with water. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001 ;14:53-61.
 100. Tarr, BD & Yalkowsky, SH. A new parenteral vehicle for the administration of some poorly water soluble anti-cancer drugs. *Journal of parenteral science and technology.* 1987; 41, 31-33.
 101. Passerini N, Albertini B, González-Rodríguez ML, Cavallari C, Rodríguez L. Preparation and characterisation of ibuprofen-poloxamer 188 granules obtained by melt granulation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2002;15:71-78.
 102. Schmolka, IR. Poloxamers in the pharmaceutical industry. In *Polymers of controlled drug delivery.* Ed. Tarcha, P.J. pp 189-214. CRC Press, Boca Raton, Fl. 1991.
 103. Sherlund M, Brodin A, Malmsten M. Micellization and gelation in block copolymer systems containing local anesthetics. . *Int. J. Pharm.* 2000; 211:37-49
 104. Gilbert JC, Richardson JL, Davies MC and Palin KJ. The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F127 solutions for controlled drug delivery. *J. Control Res.* 1987; 5(2):113-118.
 105. Sherlund M, Brodin A, Malmsten M, Holmquist P, Brodin A. Thermosetting microemulsions and mixed micellar solutions as drug delivery systems for periodontal anesthesia. *Int. J. Pharm.* 2000;194:103-116.

106. Blonder MJ, Baird L, Fulfs JC and Rosenthal GJ. Dose-dependent hyperlipidemia in rabbits following administration of poloxamer 407 gel. *J. Pharm. Sci. Tech.* 1999.
107. Veyries ML, Couarraze G, Geiger S, Agnely F, Massias L, Kunzli B, Faurison F and Rouveix B. Controlled release of vancomycin from Poloxamer 407 gels. *International Journal Pharmaceutics.* 1999 ; 192, 183-193.
108. Esposito E, Carotta V, Scabbia A, Trombelli L, Antona PD, Menegatti E and Nastruzzi C. Comparative análisis of tetracycline-containing dental ges. Poloxamer- and monoglyceride-based formulations. *Int. J. Pharm.* 1996;142(1)9-23.
109. Sherlund M, Malmsten M, Brodin A. Stabilization of a thermosetting emulsion system using ionic and non-ionic surfactants. *Int. J. Pharm.* 1998; 173.103-116.
110. Bonhomme-Faivre L, Depraetere P, Savelli MP, Amdidouche D, Bizi E, Seiller M and Orbach-Arbouys S. Charcoal suspension for tumor labeling modifies macrophage activity in mice. *Life Sci.* 2000; 66 (9) 817-827.
111. Vaughn M. Nace. Nonionic Surfactants. Poloxyalkylene Block Copolymers. Marcel Vol. 60. New York, USA. Dekker, Inc. 2000.
112. Chenite S, Chaput V, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, Leroux JC, Atkinson BL, Finette F, and Selmani A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials.* 2000; 21: 2155-2161.
113. Dodane V and Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. 1998; 1: 246-253.
114. Ko JA, Park HJ, Hwang SJ, Park KJ, Lee JS. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2002; 249: 165-174.
115. Onishi H and Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials.* 1999; 20: 175-182.
116. Senel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced drug delivery reviews* (2004) Elsevier (article in press) Available online at www.sciencedirect.com.)
117. Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K and Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International journal of*

- pharmaceutics. (2003) Elsevier (article in press) Available online at www.sciencedirect.com.
118. Felt O, Buri P, Gurny R. Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery drug development and industrial pharmacy. 1998; 24 (11)979-993.
 119. Kelli HM, Deasy PB, Ziaka E and Claffey N. Formulation and preliminary in vivo dog studies of a novel drug delivery system for the treatment of periodontitis. International journal of pharmaceutics. (2004) Elsevier (article in press) Available online at www.sciencedirect.com.
 120. Kofug K, Akamine H, Quian CJ, Watanabek K, Togan Y, Nishimura M, et al. Therapeutic efficacy of sustained drug release from chitosan gel on local inflammation. Int. J, Pharm. 2004; 272: 65-78.
 121. Khor E and Lim LY. Implantable applications of chitin and chitosan. Biomaterials. 2003, 24: 2339-2349.
 122. Tanaka Y, Tanioka S, Tanaka M, Tanigawa T, Kitamura Y, Minami S, Okamoto Y, Miyashita M and Nanno M. Effects of chitin and chitosan particles on BALB/s mice by oral and parenteral administration. Biomaterials. 1997;18: 591-595.
 123. García ME. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Copen (adaptado a la República Mexicana. #a. Edición, México D.F. Instituto de Geografía, UNAM, 1981.
 124. American Pharmaceutical Association and the Royal Pharmaceutical Association and the Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. Edited by A Wade and PJ Weller, Handbook of Pharmaceutical Excipients, Second edition. A joint publication of the The Pharmaceutical Press London. 1994.
 125. FDA/Center for Drug Evaluation / Inactive Ingredient Search for Approved Drug Products/Database Last Updated: July 27, 2005
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>.
 126. Johnston TP, Wasan KM, Goldberg IJ. Poloxamer 407-mediated alterations in the activities of enzymes regulating lipid metabolism in rats. J. Pharm Pharmaceut Sci. 2003; 6(2): 189-197.
 127. Johnston T P, Li Y, Jamal A S, Stechschulte DJ and Dileepan K N. Poloxamer 407-induced atherosclerosis in mice appears to be due to lipid derangements and not

- due to its direct effects on endothelial cells and macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2003;12(3), 147- 155
128. Papciak et al, *Environ. Mutagen.* 1985 ;3:80.
 129. Johnston et al *J. Parenter Sci Technol.* 1985 ; 39:83.
 130. Benet JB., Brodie JL, Benner EJ and Kirby WM, Simplified accurate method for antibiotic assay clinical specimens. *Amer Soc of Microb.* 1996; 14: 170-177
 131. Santos MDF, Vermeersch H, Remon JP, et al Validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of doxycycline in turkey plasma. *J Chromatogr.* 1996; 682:5 301-308.
 132. Brayden DJ. Novel drug delivery strategies in veterinary medicine. *I V J.* 2003;56: 310-316.
 133. Ethell MT, Bennett RA, Brown MP, Merritt K, Davidson JS, Tran T. In vitro elution of gentamicin, amikacin and ceftiofur from poly(methylmethacrylate) and hydroxyapatite cement. *Veterinary Surgery.* 2000, 29 (5), 375-382.
 134. BENCHAJETAL HA. Farmacocinética y concentración pulmonar de tulatromicina en cerdos. *J.Vet. Pharmacol. Therap.* 2004,27; 203 – 210
 135. Evaluación de los tiempos de resguardo en la leche de vacas en lactancia de dos antibióticos de larga acción: amoxicilina LA y oxitetraciclina LA *Avances en Medicina Veterinaria*, Vol.10, N°1, Enero - Junio, 1995
 136. González M.N. Desarrollo Farmacéutico de un Gel con Poloxámero para Aplicación Tópica de Ibuprofeno. Doctorado en Ciencias, México. DF. 2007.
 137. Pandit, N, Wang, D. Salts effects on the diffusion and release rate of propranolol from poloxamer 407 gels. *Int. J. Pharm.* 1998;167: 183-189.
 138. Ivanova, R, Lindman, B and Alexandridis, P. Effect of pharmaceutically acceptable glycols on the stability of the liquid crystalline gels formed by poloxamer 407 in water. *J. Colloid Interface Sci.* 2002;252: 226-235.
 139. Paavola, A, Tarkkila, P, Xu, M, Wahlström, T, Yliruusi, J and Rosenberg, P. Controlled release gel of ibuprofen and lidocaine in epidural use- analgesia and systemic absorption in pigs. *Pharm. Res.* 1998;15: 482-487.
 140. Ricci, EJ, Lunardi, LO, Nanclares, DMA, Marchetti, JM. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. *Int. J. Pharm.* 2005;288:235-244.

141. Wanka, G, Hoffman. Phase diagrams and aggregation behavior of poly(oxyethylene) - poly(oxypropylene) - poly(oxyethylene) triblock copolymers in aqueous solution, *Macromolecules*. 1994;27:4145-4159.
142. Cinquina AL, Longo F, Anastasi G, Giannetti L, Cozzani R. Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *J Chromatogr A*. 2003; 987:227-233.
143. Riond JL, Tyezkowska K, Riviere JE. Pharmacokinetics and metabolic inertness of doxycycline in calves with mature or immature rumen function. *Am J Vet Res*. 1989;50:1329–1332.
144. Ole-Mapenay IM, Mitema ES, Mathio TE. Aspects of pharmacokinetics of doxycycline given to healthy and pneumonic east African dwarf goats by intramuscular injection. *Vet Res Commun*. 1997; 21: 453–462.
145. Meijer LA, Ceysens KGF, De Greve BI, De Bruijn W. Pharmacokinetics and bioavailability of doxycycline hyclate after oral administration in calves. *Vet Q*. 1993;15:15.
146. Abd AM, Aty EL, Goudaha A, Zhouh HH. Pharmacokinetics of doxycycline after administration as a single intravenous bolus and intramuscular doses to non-lactating Egyptian goats. *Pharmacol Res*. 2004;49:487–491.
147. Ole-Mapenay IM, Mitema ES. Some pharmacokinetic parameters of doxycycline in east African goats after intramuscular administration of a long acting formula. *Vet Res Commun*. 1995;19:425–432.
148. Ziv G, Sulman FG. Analysis of pharmacokinetic properties of nine tetracycline analogues in dairy cow and ewes. *Am J of Vet Res*. 1974;35:1197–201.
149. Inskeep PB, Darrington RT. In Utilization of biopharmaceutical and pharmacokinetic principles in the development of veterinary controlled release drug delivery systems. *Controlled Release Veterinary Drug Delivery*. Amsterdam: Elsevier Science BV. 2000;1-15.
150. Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Bioavailability and its assessment. *J Vet Pharmacol Ther*. 2004;27:455-466.
151. Boxenbaum, H. Pharmacokinetics tricks and traps: flip-flop models *Journal of*

- Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.1998; 1: 90–91.
152. Guerin-Faubleee V, Flandrois JP, Broye E, et al. Actinomyces pyogenes: susceptibility of 103 clinical animal isolates to 22 antimicrobial agents. *Vet Res.* 1993;24: 251-259.
 153. Notari RE. In Principles of pharmacokinetics: dosage regimen. Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics an introduction, 4th ed. New York: M Dekker, 1987;45–212.
 154. Cunha BA, Sibley CM, Ristuccia AM. Doxycycline. *Ther Drug Monit.* 1982;4:115–135.
 155. Cunha BA, Domenico P, Cunha CB. Pharmacodynamics of Doxycycline. *Clin Microbiol Infec* 2000;6: 270-273.
 156. Ives, TJ, Marston, EL, Regnery, RL, Butts, JD and Majerus, TJ. *In vitro* susceptibilities of *Rickettsia* and *Bartonella* spp. to 14-hydroxy-clarithromycin as determined by immunofluorescent antibody analysis of infected Vero cell monolayers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2000; **45**, 305-310.
 157. Ailani RK, Agastya G, Ailani RK, et al. Doxycycline is a cost-effective therapy for hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med.* 1999;159:266-270.
 158. Baños DJE, Ferré AM. Principios de farmacología clínica. Bases científicas de la utilización de medicamentos.España. Elsevier. 2002, 31-56.
 159. Barza M, Brown RB, Shanks C, Gamble C, Weinstein L. Relation between lipophilicity and pharmacological behavior of minocycline, doxycycline, tetracycline and oxytetracycline in dogs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1975;8:713-720.
 160. Yeruham I, Perl S, Sharony D, Vishinisky Y. Doxycycline toxicity in calves in two feedlots. *J Vet Med B.* 2002; 49: 406-408.
 161. Nehal A. Kasim, Marc Whitehouse, Chandrasekharan Ramachandran, Marival Bermejo, Hans Lennernäs, Ajaz S. Hussain, et al L. American Chemical Society Molecular Properties Of Who Essential Drugs And Provisional Biopharmaceutical Classification Amidon *Molecular Pharmaceutics*, ASAP Article 10.1021/mp034006h S1543-8384(03)04006-1 Web Release Date: December 17, 2003 Copyright © 2003.