

**Comparación de concentraciones plasmáticas de una formulación oral  
microencapsulada de doxiciclina hclato *in vitro* y en biomodelo canino  
mediante HPLC.**

**Trabajo de grado para optar por el título de Médico Veterinario**

**Elsa Cristina Mazabel Riera**

**Asesor**

**Santiago Monsalve Buriticá**

**MVZ, M.Sc, Dr. Sc. (c)**

**Corporación Universitaria Lasallista**

**Facultad de Ciencias Administrativas y Agropecuarias**

**Medicina Veterinaria**

**Caldas - Antioquia**

**2017**

## **Agradecimientos**

A mis padres, Sonia Riera y Tobías Apel.

A mi tutor, Santiago Monsalve Buriticá.

A el equipo de trabajo de todo el proyecto.

A Colciencias.

A la Corporación Universitaria Lasallista.

Dedicada a mi hermano Miguel Felipe Mazabel Manrique (1995-2017).

## Contenido

Introducción.....	8
Justificación.....	10
Objetivos .....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos.....	11
Marco teórico .....	12
Metodología .....	17
Detectar las concentraciones de doxiciclina de una formulación oral microencapsulada en plasma canino por HPLC. ....	17
Preparación de la muestra:.....	17
Determinación de la concentración de doxiciclina .....	18
Evaluar in vitro perfiles cinéticos de permeabilidad y viabilidad celular a diferentes concentraciones de una formulación oral microencapsulada de doxiciclina hiclato vs control. ....	19
Evaluar los perfiles cinéticos de permeabilidad in vitro:.....	19
Ensayo de viabilidad celular (citotoxicidad): .....	20
Determinar el perfil farmacocinético de una formulación oral microencapsulada de doxiciclina hiclato vs control.....	21
Perfil farmacocinético: .....	21
Resultados .....	23

Conclusiones y recomendaciones.....	33
Referencias .....	36

## Lista de figuras

Figura 1. Cromatograma donde se observa el AUC (en rojo) de una muestra con doxiciclina estándar a una [ ] de 0.5 ppm vs. un cromatograma, donde se observa el AUC (en verde) de una muestra de sangre dopada con doxiciclina a la misma [ ] , en el cual después de aplicar la fórmula del % recuperación nos da un valor de 86.04% .....	23
Figura 2. Curva de calibración para el equipo UPLC-LC-MS/MS, donde se muestra el valor R <sup>2</sup> , m y b.....	25
Figura 3. Cromatograma obtenido del equipo HPLC- CAD, donde muestra el análisis de las muestras obtenidas a los 30 min (E7-1A), 1 h (E7-2A), 2 h (E7- 3A), 3 h (E7-6A) y 5 h (E7-8A), correspondientes a una réplica del tratamiento con doxiciclina libre en la celda de Franz. ....	25
Figura 4. % de liberación de la doxiciclina libre vs. la formulación de doxiciclina microencapsulada. Se puede observar la cinética de liberación más lenta y en menor proporción de la formulación microencapsulada de doxiciclina respecto a la doxiciclina libre.....	26
Figura 5. Media y desviación estándar del % de viabilidad entre TTO vs horas. ....	30
Figura 6. Formato de barras de la media y desviación estándar del % de viabilidad entre TTO vs horas.....	30
Figura 7. Fotografías de los platos de cultivo para cada concentración a las 24, 48 y 72 horas (visto a 10X en microscopio invertido). ....	31
Figura 8. Comparación entre tratamientos según la concentración obtenida y el tiempo.....	33

### Lista de tablas

Tabla 1. ANOVA de la formulación microencapsulada de doxiciclina vs. doxiciclina libre, donde se muestra el valor P de los tratamientos. ....	27
Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías. ....	29
Tabla 3. Cálculo de la viabilidad por tratamiento. ....	29
Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) unidireccional que muestra el valor P de la Cmax, Tmax y AUC entre cada tratamiento. ....	32
Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA), donde se comparan la doxiciclina microencapsulada vs. doxiciclina comercial vs. doxiciclina estándar. ....	33

## Resumen

La administración oral de doxiciclina para el tratamiento de ehrlichiosis canina monocítica (ECM) puede generar múltiples efectos adversos en caninos. Los beneficios de la liberación controlada de fármacos incluyen el mantenimiento de la concentración sérica del fármaco a un nivel terapéutico óptimo durante un intervalo de tiempo prolongado, y, por consiguiente, una posible mejora del cumplimiento de la administración de fármacos. Se pretendió evaluar concentraciones plasmáticas de una formulación oral microencapsulada de doxiciclina hiclato in vitro y en el biomodelo canino. Para esto fueron detectadas concentraciones de un estándar de doxiciclina hiclato por HPLC- CAD y UPLC –LC- MS/MS, de igual manera se evaluó in vitro perfiles de liberación por medio de celdas de Franz y se determinó la viabilidad celular por medio de un ensayo de citotoxicidad en líneas celulares DH82 a diferentes concentraciones (10, 20 y 40 ppm), y diferentes tiempos de exposición (4, 24, 48, 72 horas), de la formulación oral microencapsulada de doxiciclina hiclato vs control. Mediante un ensayo clínico de fase 0 se determinó una curva farmacocinética en el biomodelo canino. El límite de cuantificación detectado por HPLC-CAD y HPLC- MS de doxiciclina en la curva de calibración fue de 0.05 µg/ml y 0.01 µg/ml. En los ensayos de liberación en celdas de Franz hubo una liberación más prolongada del microencapsulado. El ensayo de citotoxicidad demostró una disminución marcada en el porcentaje de viabilidad (10.7%) en el mayor tiempo de exposición (72 horas) al tratamiento. La curva farmacocinética demostró una liberación menos prolongada del microencapsulado respecto al control.

**Palabras claves:** Tetraciclinas, ehrlichiosis monocítica canina, biotecnología, liberación controlada de medicamentos.

## Introducción

La doxiciclina es un antibiótico semisintético de la familia de las tetraciclinas (Ole-Mapenay & Mitema, 1995; Riond, Vaden, & Riviere, 1990; Ruiz, Gutiérrez, Bernad, Caballero, & Vargas, 2015; Ruz et al., 2004) la cual se caracteriza por tener actividad frente a una amplia gama de microorganismos gram positivos y gram negativos (Axisa, Naylor, Bell, & Thompson, 2000; Ruz et al., 2004; Schnabel, Papich, Watts, & Fortier, 2010a). La doxiciclina se considera el tratamiento de elección para múltiples infecciones rickettsiales (Axisa et al., 2000; Castro et al., 2008) incluyendo a la bacteria *Ehrlichia canis* causante de la ehrlichiosis monocítica canina (Breitschwerdt, Hegarty, & Hancock, 1998; Eddlestone et al., 2007). A pesar de ser el tratamiento de elección para esta enfermedad en pacientes caninos su uso ha sido cuestionado debido a la presencia constante de efectos adversos cuando se suministra de manera oral debido a la administración prolongada que se requiere para cumplir con la totalidad del protocolo terapéutico (Hartmann, Krebber, Daube, & Hartmann, 2008; Ruiz et al., 2015; Schnabel et al., 2010a). No obstante, las formulaciones de liberación controlada de doxiciclina como la microencapsulación, pueden reducir estos efectos adversos y podrían mejorar la eficacia de la misma durante largos períodos del tratamiento (Raval, Naik, Amin, & Patel, 2014; Ruiz et al., 2015). En el caso de formulaciones nuevas como la usada en este estudio, es necesario realizar ensayos in vitro para analizar su comportamiento (Marovac, 2001), así como también ensayos farmacocinéticos comparativos in vivo entre formulaciones, con el fin de aclarar las diferencias en los procesos de absorción y disposición que puedan subyacer (Baggot, 1992). Adicionalmente para llevar a cabo el desarrollo de estos ensayos se requiere en primera instancia un método analítico sensible que sea capaz de determinar concentraciones bajas de fármacos en



muestras pequeñas (Ruz et al., 2004), siendo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la más adecuada, ya que esta tiene una sensibilidad, especificidad y velocidad de determinación de ensayos muy alta (Axisa et al., 2000; Bocker, 1980). Con respecto a lo anterior, el propósito de este estudio es comparar las concentraciones plasmáticas de una formulación oral microencapsulada de doxiciclina hclato in vitro y en biomodelo canino mediante HPLC.

## Justificación

La administración oral de doxiciclina para el tratamiento de ehrlichiosis canina monocítica puede generar múltiples efectos adversos en caninos tales como irritación gástrica, vomito, esofagitis, riesgo de ulceraciones, así como capacidad para fijar el calcio (efectos cardiovasculares y depósito en el tejido óseo) (Ruiz et al., 2015; Vargas, Gutiérrez, Juárez, & Sumano, 2008), por lo cual ha habido un mayor interés en la generación de desarrollo de formulaciones de liberación controlada de doxiciclina que abarca la elección de los excipientes (modificación u optimización) con el fin de reducir los efectos adversos (Ruiz et al., 2015; Ruiz, Gutierrez, Caballero, & Vargas, 2014). Adicionalmente, los beneficios de la liberación controlada de fármacos incluyen el mantenimiento de la concentración sérica a un nivel terapéutico óptimo durante un intervalo de tiempo prolongado, la reducción de la manipulación y, por consiguiente, una posible mejora del cumplimiento de la administración (Vargas et al., 2008). Para evaluar estos beneficios se deben considerar los niveles plasmáticos alcanzados del fármaco mediante un perfil farmacocinético, ya que este evalúa la relación que se establece entre el antimicrobiano y el organismo (Beltrán, 2004). A su vez, los niveles de las tetraciclinas en general alcanzan un límite de cuantificación (0.01-0.1 µg/ml), y concentraciones plasmáticas igual de bajas, que generalmente se analizan por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por su alta sensibilidad (Marzo & Dal Bo, 1998).

El presente estudio pretende comparar a través de un ensayo por HPLC la concentración plasmática de una formulación oral de doxiciclina microencapsulada versus control, y de igual manera se pretende determinar si el microestructurado pudiese modificar el perfil farmacocinético de la doxiciclina comparándola con una formulación comercial de la misma *in vitro* y en el biomodelo canino.

## Objetivos

### Objetivo general

- Comparar concentraciones plasmáticas de una formulación oral microencapsulada de doxiciclina hiclato *in vitro* y en el biomodelo canino.

### Objetivos específicos

- Detectar las concentraciones de doxiciclina de una formulación oral microencapsulada en plasma por HPLC.
- Evaluar *in vitro* perfiles cinéticos de permeabilidad y viabilidad celular a diferentes concentraciones de una formulación oral microencapsulada de doxiciclina hiclato.
- Determinar el perfil farmacocinético en plasma en biomodelo canino de una formulación oral microencapsulada de doxiciclina hiclato.

## Marco teórico

La doxiciclina es un antibiótico de segunda generación de la familia de las tetraciclinas (Ole-Mapenay & Mitema, 1995; Riond et al., 1990; Ruz et al., 2004) la cual se caracteriza por ser un isómero estructural de esta (Davis, Salmon, & Papich, 2006; Schnabel, Papich, Watts, & Fortier, 2010b) ya que puede distinguirse de la original por una diferencia estructural en la posición 5 y 6 (Saivin & Houin, 1988). Tiene un amplio espectro de actividad contra una amplia variedad de microorganismos grampositivos y gramnegativos, incluyendo *Chlamydia* spp. y micoplasmas ejerciendo un efecto bacteriostático sobre estas acoplándose con gran afinidad a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano de manera que impide la unión del sitio aminoacil del ácido ribonucleico de transferencia a la subunidad 30S ribosomal, de esta forma se paraliza la incorporación de aminoácidos durante la síntesis proteica (Kukanich & Kukanich, 2014; Maaland, Papich, Turnidge, & Guardabassi, 2013; Vicente & Perez-Trallero, 2010; Womble, Giguere, & Lee, 2007). Se describe a su vez como el tratamiento gold standar en contra de la bacteria del orden rickettsial *Ehrlichia canis* causante de la ehrlichiosis canina monocítica (Eddlestone et al., 2007; Riond et al., 1990; Ruiz et al., 2015) la cual afecta a los monocitos caninos (Gal, Loeb, Yisaschar, & Baneth, 2008). Según el ICA, dentro de los productos medicamentos veterinarios con registro vigente a agosto 2016 la forma farmacéutica más común de la doxiciclina en caninos para administración oral es la tableta, siendo la principal doxiciclina hiclato, sin embargo luego de su uso han sido reportados efectos secundarios debido a su propiedad irritante sobre el tracto gastrointestinal (Hartmann et al., 2008). Dentro de los efectos secundarios principales se reporta el vómito, la irritación gástrica y la esofagitis (Ruiz et al., 2015; Vargas et al., 2008). Un alto acople a proteínas plasmáticas requiere administrar altas

concentraciones del medicamento con el fin de asegurar concentraciones terapéuticas adecuadas (Se describen estos efectos como dependientes de la dosis) (Vicente & Perez-Trallero, 2010). Adicionalmente se reportan alteraciones de la microflora intestinal, capacidad para fijar el calcio (efectos cardiovasculares, como arritmias cardíacas, y depósito en el tejido óseo), lo cual produce decoloración dental por defectos del esmalte, retardo en el crecimiento y sus efectos tóxicos sobre las células hepáticas y renales cuando son usadas altas dosis (Lepper et al., 1951). En las últimas décadas ha habido un creciente interés en la industria farmacéutica veterinaria en el desarrollo de formulaciones de liberación controlada de doxiciclina ya que estos podrían reducir los efectos adversos y mejorar así la eficacia durante largos períodos de tratamiento (Gallardo & Ruiz, 2011; Ruiz et al., 2014); dentro de estas se incluyen formulaciones enterales y parenterales de acción prolongada (Gutiérrez, Velasco, Vázquez, Vargas, & Sumano, 2012; Ole-Mapenay & Mitema, 1995; Ruiz et al., 2015, 2014; Vargas et al., 2008; Zozaya, Gutierrez, Bernad, & Sumano, 2013). Dentro de las formulaciones enterales se describe la microencapsulación (sistema de administración de micropartículas) como uno de los sistemas de suministro de fármacos prometedores ya que permiten la distribución de los mismos a una velocidad controlada durante un periodo de tiempo. Los microencapsulados se componen de un biopolímero (ya sea natural o sintético) que luego de ser mezclado adecuadamente puede encapsular un fármaco de tal manera que el agente activo se libere del material de una manera prediseñada. Se afirma que estos sistemas basados en partículas para la administración de fármacos tienen una biodisponibilidad mejorada, una respuesta terapéutica predecible, mayor eficacia y seguridad, un perfil de liberación controlado y prolongado de fármacos a dosis mucho menores (Raval et al., 2014). En el caso de formulaciones de liberación controlada es

necesario realizar ensayos *in vitro* para analizar su comportamiento (Marovac, 2001). El desarrollo de estudios farmacocinéticos son una herramienta útil para evaluar las propiedades de las formas de dosificación desarrolladas después de su administración *in vivo* (Ruz et al., 2004). Dentro de los ensayos *in vitro* para evaluar las formulaciones de liberación controlada se ha planteado el uso de celdas de Franz con el fin de garantizar la confiabilidad y seguridad de los resultados en los ensayos clínicos obtenidos *in vivo*. Las celdas de Franz representan desde su desarrollo en 1975 uno de los principales métodos utilizados para evaluar la penetración transepitelial y a partir de los últimos años la liberación de fármacos. Esta metodología constituye un sistema compuesto por dos cámaras (una donora y otra aceptora) separadas por una membrana de origen animal, humana o sintética, que permite evaluar la difusión de moléculas biológicamente activas de una cámara a otra (Baena, Dallos, Manzo, & Ponce D`León, 2011). Shanmuganathan y colaboradores utilizaron un modelo de difusión con celdas de Franz como parte de un estudio *in vitro* para la preparación y caracterización de microesferas de quitosan para la liberación de doxiciclina, con el cual lograron definir el sistema de dosificación relativo a la absorción percutánea del fármaco (Shanmuganathan, Shanmugasundaram, Adhirajan, Ramyaa, & Babu, 2008). Los perfiles de liberación *in vivo* de medicamentos han sido descritos en estudios farmacocinéticos. Cuando es administrado uno o más medicamentos se deben considerar los niveles plasmáticos alcanzados por medio de perfiles farmacocinéticos (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) Estos parámetros en su conjunto determinan una curva concentración-tiempo (Beltrán, 2004). En la industria veterinaria en las últimas décadas han sido reportados múltiples estudios de farmacocinética de doxiciclina en diferentes especies animales que comprenden caninos (Gutiérrez et al., 2012; Kukanich & Kukanich, 2014; Maaland et

al., 2013), felinos (Hartmann et al., 2008; Riond et al., 1990), rumiantes (Castro et al., 2008; Ole-Mapenay & Mitema, 1995), equinos (Davis et al., 2006; Schnabel et al., 2010a; Womble et al., 2007; Zozaya et al., 2013), primates (Embers, Hasenkampf, Embers, & Doyle, 2014), ratas (Vargas et al., 2008) y elefantes marinos (Freeman et al., 2013). La realización de estudios farmacocinéticos requieren métodos analíticos sensibles para permitir la determinación de concentraciones bajas de fármaco en muestras pequeñas (Ruz et al., 2004). Se han utilizado varios métodos para determinar concentraciones de doxiciclina en tejidos biológicos que incluyen técnicas microbiológicas, fluorimétricas, cromatografía gas-líquido, cromatografía en capa delgada, técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), técnicas espectrofotométricas de masas y electroforesis capilar (Axisa et al., 2000; Ruz et al., 2004). En este sentido la técnica con HPLC tiene una alta sensibilidad, especificidad y velocidad de detección (Axisa et al., 2000). La cromatografía hace referencia a una serie de técnicas que se utilizan para separar múltiples componentes en una muestra basándose en las afinidades relativas de estos componentes entre la fase móvil y la fase estacionaria. Un cromatógrafo a su vez es un instrumento diseñado para generar tal separación, el cual está compuesto por un sistema de control de fase móvil, un inyector, una columna (fase estacionaria) y un detector. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica que utiliza columnas rellenas de partículas de 3-10 mm de diámetro el cual requiere que la fase móvil sea forzada a través de una bomba (a menudo a presiones superiores a 500 psi) con la finalidad de separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y dicha columna. Un cromatógrafo básico está compuesto por un sistema de control de fase móvil, un inyector, una columna y un detector (Sadek, 2004). Entre los detectores utilizados para el procesamiento de la

doxiciclina con HPLC se encuentra el espectrómetro de masas con tecnología de triple cuadrupolos ((TQD) el cual consta de cuatro barras alargadas en formación cuadrada, conectadas eléctricamente entre sí en pares opuestos. A dichos pares (polos) se les aplica una tensión de radiofrecuencia variable que sintoniza con un determinado ion. Cuando existe sintonía entre el ion que está pasando por ellas y la frecuencia aplicada, este ion continúa su camino desviándose todos los demás fuera del cuadrupolo y de esta manera no impactan en el detector. El triple cuadrupolo consiste en tres cuadrupolos en serie, el primero transmite iones (iones progenitores) de la misma manera que un instrumento de cuádruple único. El segundo contiene un gas de colisión que genera iones adicionales (iones hijos) de los seleccionados por el primer cuadrupolo, estos iones hijos se envían entonces al tercer cuadrupolo para el filtrado final de masas/carga para su detección (Sadek, 2004). Otro detector (a base de aerosoles para la cromatografía líquida) es el detector de aerosoles cargado (CAD) el cual consiste en la conversión del efluente cromatográfico líquido en gotitas de aerosol y la posterior desolvatación (secado) con el fin de eliminar la mayor parte de la fase móvil dejando atrás partículas secas que contienen principalmente las especies de analito menos volátiles. Posteriormente, estas partículas secas interactúan con una fuente de iones que da como resultado la transferencia de carga a las mismas. Los iones en exceso, que tienen mayor movilidad, se recogen en una trampa y la carga asociada con las partículas de analito se miden con un electrómetro (Magnusson, Risley, & Koropchak, 2015).



## Metodología

Para cada uno de los objetivos específicos de este trabajo, se definieron los métodos por los cuales se les dará cumplimiento. A continuación, se describe esta información:

### **Detectar las concentraciones de doxiciclina de una formulación oral microencapsulada en plasma canino por HPLC.**

**Preparación de la muestra:** se realizó según la metodología usada por (Kukanich & Kukanich, 2014), modificada para este estudio. Para determinar la óptima preparación de la muestra se determinó el % de recuperación. En un tubo Eppendorf se doo una muestra de sangre libre de antibióticos (100 µl), con doxiciclina hiclato como estándar externo (0.5 µg/ml). Se adiciono acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1% (300 µl), como método de precipitación de proteínas. Se pasó al vortex (3000 rpm x 30 seg), para homogenizar, luego se centrifugo (14000 rpm x 5 min), con el fin de separar el sobrenadante de las proteínas precipitadas. Se tomó el sobrenadante aparte en otro tubo Eppendorf y se le adiciono nuevamente 300 µl de la solución de acetonitrilo mas ácido fórmico al 0.1%, se repitió el vortex y la centrifugación. Este paso se repitió una tercera vez hasta completar 900 µl de sobrenadante. Se pasó el preparado anterior por un filtro de nylon acoplado a jeringa (acrodisco), con un tamaño de poro de 0.22µm, para garantizar la eliminación de los restos de precipitado, en el plasma luego de la desnaturalización de las proteínas. Por ultimo estos 900 µl del preparado filtrado, se llevó a viales de cromatografía para su análisis cromatográfico, esto con el fin de hallar el porcentaje de recuperación del analito siguiendo la ecuación:

$$\% \text{ Recuperación} = \left( \frac{AUC_{md} - AUC_{msd}}{AUC_e} \right) * 100$$

Donde,  $AUC_{md}$  es el área bajo la curva de la muestra dopada;  $AUC_{msd}$  es el área de bajo la curva de la muestra sin dopar, y  $AUC_e$  es el área bajo la curva del estándar a la misma concentración de la muestra dopada.

**Determinación de la concentración de doxiciclina:** La doxiciclina fue cuantificada por HPLC- CAD y por UPLC- LC- MS/MS. La cuantificación de doxiciclina por HPLC- CAD se realizó según la metodología propuesta por (Ruz et al., 2004), con modificación para el detector. Se usó un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), Ultimate 3000 (Dionex – Thermo Scientific ®), con un detector CAD. La fase móvil está compuesta por A (formiato de amonio pH 2,8), B (metanol) y C (acetonitrilo), se utilizó un gradiente que inició con un 25% de C, 20% de B, y 55% de A, hasta los 7 min, donde se incrementó 30% de C, 20% de B y 50% de A. A los 9 min volvió a las condiciones iniciales por 2 min. El flujo de inyección fue de 1 ml/min y el volumen de inyección fue de 10  $\mu$ l. La separación se llevó a cabo en una columna C18; 5  $\mu$ m; 120 Å; 4.6 x 150 mm, temperatura de horno de 45°C. El tiempo de retención para la doxiciclina fue de 3,967 minutos.

El análisis de doxiciclina por UPLC- LC-MS/MS se realizó según la metodología de (Kukanich & Kukanich, 2014). El equipo de cromatografía usado fue un Xevo TQD (Waters Corporation ®), con un detector TQD. La fase móvil está compuesta por A (agua con ácido fórmico al 0,1%) y B (acetonitrilo), se utilizó un gradiente que inició con un 100% de A, hasta los 2 min, donde disminuyó a un 40% de A, y 60% de B. A los 3 min volvió a las condiciones iniciales por 3.5 min. El flujo de inyección fue de 0.5 ml/min. La separación se llevó a cabo en una columna LC C18; 1.6  $\mu$ m; 100 Å; 50 x 2.1 mm, temperatura de horno 40°C. Los iones de calificación y cuantificación de la doxiciclina fueron masa: carga ( $m/z$ ) 445 y 428, respectivamente.

Para cada equipo se realizó una curva de calibración la cual consistió en nueve puntos de calibración (0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 2, 5 µg/ml), a los cuales se les determino el  $R^2$  (coeficiente de determinación), y la ecuación:

$$y = mx + b$$

Donde,  $y$  es el AUC;  $m$  es el intercepto;  $x$  es la concentración y  $b$  es la pendiente.

**Evaluar in vitro perfiles cinéticos de permeabilidad y viabilidad celular a diferentes concentraciones de una formulación oral microencapsulada de doxiciclina hiclato vs control.**

**Evaluar los perfiles cinéticos de permeabilidad in vitro:** se llevó a cabo mediante estudios de permeabilidad utilizando el método de difusión de Franz (celdas de Franz). El sistema de la celda se mantuvo a una temperatura constante de  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , posicionándola en baño maría sobre una plancha de calentamiento a  $85^\circ\text{C}$ . Se mantuvo a una agitación continua a través de una barra de agitación magnética a 400 rpm, colocada dentro del compartimento receptor. Fueron evaluados 2 tratamientos: a. formulación microencapsulada de doxiciclina hiclato, para lo cual se añadió una concentración conocida de la muestra en el compartimento donador (10 mg de microencapsulado en polvo, diluido en 2 ml de PBS (Phosphate Buffered Saline, por sus siglas en inglés, pH 7.4)) (Mishra & Mishra, 2012), equivalentes a una concentración total de doxiciclina de 500 ppm, y b. doxiciclina hiclato estándar libre (1 mg de doxiciclina hiclato en polvo, diluido en 2 ml de PBS, equivalente a una concentración de 500 ppm también). Estas soluciones pasaron al compartimento receptor a través de una membrana semipermeable de Ester celulosa de 19 mm de diámetro y un tamaño de poro de  $0.2 \mu\text{m}$  (Balanc et al., 2016). Se tomaron alícuotas

de 500 µl del compartimento receptor en intervalos de tiempos definidos (30 min, 60 min, 1.30 h, 2 h, 2.30 h, 3 h, 4 h, 5 h), y se sustituyeron por el mismo volumen con PBS a 37°C. Las muestras obtenidas fueron analizadas mediante HPLC – CAD. El atrapamiento en la membrana y la subsecuente liberación de doxiciclina en el compartimento receptor fue determinado (Shanmuganathan et al., 2008). Los tratamientos fueron realizados por triplicados. Los datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, usando para tal fin el software estadístico GraphPad Prism versión 5.

**Ensayo de viabilidad celular (citotoxicidad):** el ensayo de citotoxicidad se realizó sobre la línea celular histiocítica maligna canina (DH82) donadas gentilmente por el doctor Daniel Aguiar de la Universidad e federal do Mato Grosso (UFMG), estas células se cultivaron en frascos falcón de 25 cm usando medio DMEM con 5% de suero fetal bovino (SFB) e incubado a 37° C con una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. El cultivo se mantuvo hasta que se alcanzó la monocapa. La citotoxicidad de las diferentes concentraciones fue evaluada según el cálculo de viabilidad celular ( $\text{Viabilidad} = \frac{\# \text{ células vivas}}{\# \text{ células vivas} + \# \text{ células muertas}} \times 100$ ), las células fueron sembradas en platos de cultivo (Cellstar) de 12 pozos a una concentración de  $4 \times 10^5$  células /pozo, en cada pozo se adiciono 1 ml de medio DMEM al 10% de SFB, con penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Cuando se observaba monocapa, se disponía a adicionar las diluciones de las 3 concentraciones y el control. Cada uno de los tubos marcados como C1, C2, C3 y PBS (40, 20 y 10 ppm, respectivamente), fueron pasados a otro tubo Eppendorf estéril por un filtro con acople a jeringa (acrodisco) de 0.22µm de tamaño de poro, lo anterior con la intención de evitar la contaminación de los cultivos. De cada uno de las concentraciones y el control filtrados, se tomaban 1200 µl del filtrado y se diluían en 11800 µl de medio

DMEM al 10% SFB con antibiótico, para obtener una dilución de 1/10 (100 µl de filtrado/ 900 µl de medio). Cada una de las diluciones de las tres concentraciones (40, 20 y 10 ppm), y el control diluidas en medio fresco fueron adicionadas a un pozo con las células DH82 cultivadas bajo las mismas condiciones, cada concentración fue adicionada por triplicado y se utilizaron 4 platos de cultivo con 12 pozos cada uno, con el fin de que se leyera un plato por cada tiempo estipulado en el estudio (4, 24, 48 y 72 h). Para el conteo celular, inicialmente se debieron desprender las células de los pozos respectivos para cada una de los tratamientos, para lo cual se usó un scrape el cual se pasa por toda la superficie del pozo, luego se homogenizó con una micropipeta de 1000 µl para posteriormente tomar 20 µl, los cuales se diluyeron en 20 µl de azul de Evans. Se adicionó 10 µl de la dilución 1:1 (medio: azul de Evans) en la cámara de Neubauer y se leyó a 10x en el microscopio. Para el conteo se hizo diferenciación entra las células vivas y muertas en los 4 recuadros grandes de las esquinas en la cámara de Neubauer. Los análisis se expresaron a través de medidas de frecuencia (% de viabilidad y medias entre tratamiento y tiempo). Adicionalmente, los datos fueron analizados por medio de un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, usando para tal fin el software estadístico GraphPad Prism versión 5.

### **Determinar el perfil farmacocinético de una formulación oral microencapsulada de doxiciclina hclato vs control.**

**Perfil farmacocinético:** la formulación oral microencapsulada de doxiciclina se evaluó en perros procedentes de un albergue del municipio de Caldas, Antioquia. Fue realizado un ensayo clínico de fase 0, cruzado y triple ciego en donde se distribuyeron a 4 ejemplares caninos aleatoriamente en los cuales se tuvo: un único tratamiento en el día 0. Para cada experimento el tiempo de administración del fármaco se designó como tratamiento a las 0 horas. Se realizó el primer tratamiento a los pacientes

divididos en tres grupos aleatorizados: a. doxiciclina hiclato comercial para perros a una dosis de 10 mg/Kg para ejemplares #1 y #2; b. formulación oral microencapsulada de doxiciclina a una dosis de 10 mg/Kg para ejemplares #3 y #4, y c. doxiciclina hiclato estándar. Los tratamientos b y c fueron administrados dentro de una capsula de gelatina. Se obtuvieron muestras de sangre (3 ml) mediante venipunción a las 0, 0,1 (6 minutos), 0,2 (12 minutos), 0,5 (30 minutos), 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, y 120 horas después de la intervención. Luego del primer tratamiento se realizó un periodo de lavado entre los tratamientos de 15 días (Kukanich & Kukanich, 2014). Para evaluar efectos indeseables posterior al tratamiento se realizó monitoreo de los ejemplares durante este período. Luego, un único tratamiento en el día 15, donde se realizó el segundo tratamiento a los pacientes dividido en dos grupos aleatorizados de 2 perros por intervención: a. doxiciclina hiclato comercial para perros a una dosis de 10 mg/Kg para ejemplares #3 y #4; y b. formulación oral microencapsulada de doxiciclina a una dosis de 10 mg/Kg para ejemplares #1 y #2. Se obtuvieron muestras de sangre (3 ml) mediante venipunción a las 0, 0,1 (6 minutos), 0,2 (12 minutos), 0,5 (30 minutos), 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, y 120 horas después de la intervención. Luego del segundo tratamiento se evaluaron posibles efectos indeseables que puedan surgir posterior al tratamiento y se les realizó monitoreo clínico por 5 días. Se evaluaron múltiples variables farmacocinéticas como área bajo la curva (AUC), concentración máxima en plasma (Cmax), tiempo máximo en alcanzar la concentración máxima (Tmax), entre otras, por medio del software PK Solutions 2.0™. Estos parámetros se compararon, así como también el tratamiento (doxiciclina microencapsulada) vs. el control (doxiciclina comercial), a través de un análisis de varianza de una sola vía (unidireccional), con el método Turkey para comparaciones múltiples utilizando el software estadístico GraphPad Prism versión 5.

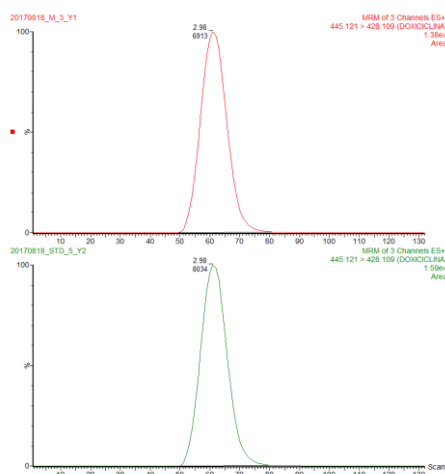
## Resultados

Para cada uno de los objetivos específicos de este trabajo, se describen los resultados obtenidos hasta el momento:

### **Detectar las concentraciones de doxiciclina de una formulación oral microencapsulada en plasma canino por HPLC.**

**Preparación de la muestra:** con la metodología descrita anteriormente para la preparación de la muestra, y según la ecuación de igual manera descrita, se obtuvo un porcentaje de recuperación de 86.04% (Figura 1), el cual a su vez difiere de la metodología de (Kukanich & Kukanich, 2014), modificada para el presente estudio, ya que reportan un porcentaje de recuperación de la doxiciclina de entre 97-103%. Sin embargo, el porcentaje de recuperación obtenido en el presente estudio garantiza la óptima extracción y cuantificación de la doxiciclina de la muestra analizada, ya que la exactitud del método se determina midiendo el porcentaje de recuperación estándar de referencia que va de 80 a 120% (ICH, 2005; Kogawa & Salgado, 2012).

*Figura 1. Cromatograma donde se observa el AUC (en rojo) de una muestra con doxiciclina estándar a una [ ] de 0.5 ppm vs. un cromatograma, donde se observa el AUC (en verde) de una muestra de sangre dopada con doxiciclina a la misma [ ] , en el cual después de aplicar la fórmula del % recuperación nos da un valor de 86.04%*



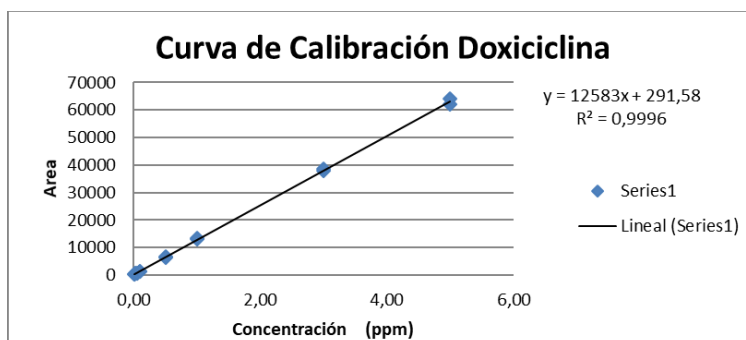
**Determinación de la concentración de doxiciclina:** con el método cromatográfico para el equipo HPLC- CAD descrito anteriormente, se obtuvo un límite de cuantificación (curva de calibración), de 0.05 µg/ml y un límite de detección de 0.016 µg/ml. En un estudio donde utilizan HPLC con un detector DAD para la detección de doxiciclina hiclato, el límite de cuantificación obtenido fue de 0.02 µg/ml (Ruz et al., 2004). En otro, donde utilizan un detector con UV para la determinación de la concentración de doxiciclina en plasma de ejemplares equinos obtuvieron un límite de cuantificación de 0.01 µg/ml (Schnabel et al., 2010a) resultados que difieren de nuestro estudio. Sin embargo, en el estudio realizado por (Davis et al., 2006) el límite de cuantificación de doxiciclina hallado utilizando un detector con UV fue de 0.05 µg/ml siendo similar a los resultados obtenidos en el presente estudio, en el cual se usó un detector CAD. Se reporta que los límites de cuantificación varían de acuerdo con el método de detección (Ruz et al., 2004), con lo cual se puede evidenciar que no siempre esto se cumple, ya que estos valores pueden variar incluso con el mismo método de detección o en su defecto ser iguales entre diferentes detectores, como es el caso del presente estudio. Lo mismo ocurre respecto al equipo UPLC- LC-MS/MS, en el cual se obtuvo un límite de cuantificación de 0.01 µg/ml y un límite de detección de 0.003 µg/ml, que si se compara con el estudio realizado por (Kukanich & Kukanich, 2014) donde utilizan un equipo cromatográfico y un método de detección similar al usado en el presente estudio, obtienen límites de cuantificación en plasma de doxiciclina diferentes también (0.02 µg/ml).

Adicionalmente este sería el primer reporte de detección de doxiciclina por medio de HPLC con un detector CAD, ya que no se han encontrado otros datos similares a los del presente estudio. El  $R^2$  obtenido para la curva de calibración utilizada en el método cromatográfico para el equipo HPLC- CAD y para el equipo UPLC- LC-MS/MS



fue de 0.9983 y 0.9996 (Figura 2), respectivamente. En este sentido, por ser estos resultados cercanos a 1, indican bondad de ajuste al modelo de regresión lineal (Molina & Rodrigo, n.d.).

Figura 2. Curva de calibración para el equipo UPLC-LC-MS/MS, donde se muestra el valor  $R^2$ ,  $m$  y  $b$ .



**Evaluar los perfiles cinéticos de liberación in vitro:** en los dos tratamientos se observa que las concentraciones de las muestras tomadas analizadas por HPLC-CAD, fueron aumentando respecto al tiempo (Figura 3 y 4). A las 2 horas aproximadamente se observa también que el tratamiento con formulación microencapsulada se estabiliza y continua una liberación en menor proporción respecto al tratamiento con doxiciclina libre hasta el final del ensayo, mostrando así resultados que reflejan la cinética de liberación esperada. El porcentaje de liberación de la formulación microencapsulada de doxiciclina fue de 30.4%, mientras que el porcentaje de liberación de la doxiciclina libre fue de 49.6% (Figura 4).

Figura 3. Cromatograma obtenido del equipo HPLC- CAD, donde muestra el análisis de las muestras obtenidas a los 30 min (E7-1A), 1 h (E7-2A), 2 h (E7-3A), 3 h (E7-6A) y 5 h (E7-8A), correspondientes a una réplica del tratamiento con doxiciclina libre en la celda de Franz.

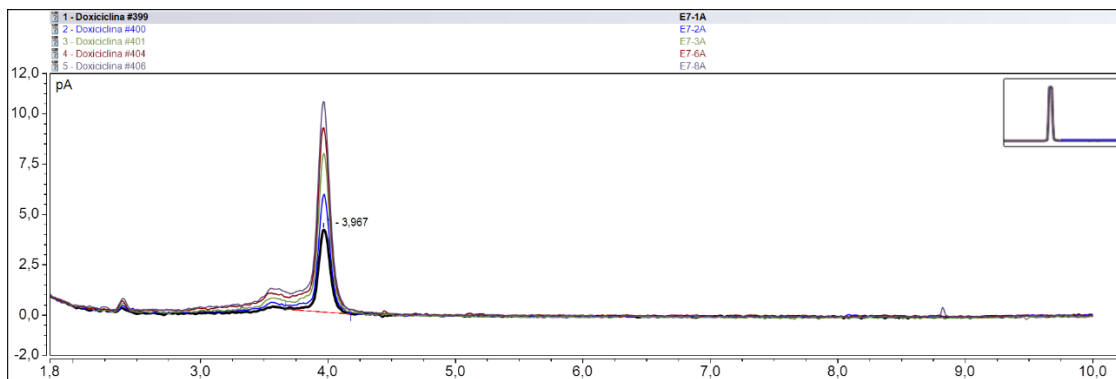
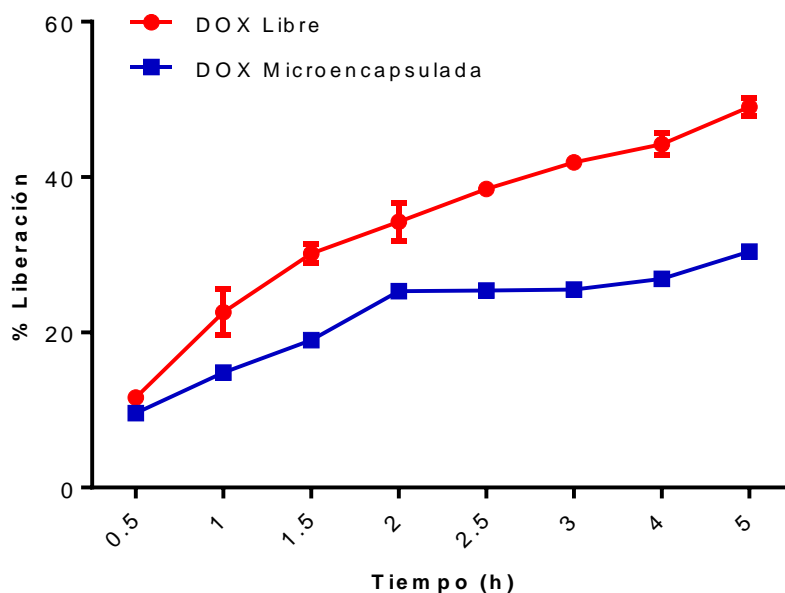


Figura 4. % de liberación de la doxiciclina libre vs. la formulación de doxiciclina microencapsulada. Se puede observar la cinética de liberación más lenta y en menor proporción de la formulación microencapsulada de doxiciclina respecto a la doxiciclina libre.



Al realizar el ANOVA de dos vías, se encuentra que el tiempo de liberación y la formulación tienen un efecto en el contenido de doxiciclina hclato liberada en la celda. Se encuentra que hay diferencia estadísticamente significativa entre la formulación microencapsulada de doxiciclina y la doxiciclina libre ( $P < 0.0001$ ). Adicionalmente al comparar los tiempos de toma de muestras entre los dos tratamientos se encuentra que hay diferencias significativas entre todos los tiempos ( $P < 0.001$ ), excepto a los 30 minutos donde no hay diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) (Tabla 1).

*Tabla 1. ANOVA de la formulación microencapsulada de doxiciclina vs. doxiciclina libre, donde se muestra el valor P de los tratamientos.*

	Valor P	Summary
DOX microencapsulada vs. DOX libre	P < 0.0001	****
Tiempo		
0.5	P > 0.05	ns
1	P<0.001	***
1.5	P<0.001	***
2	P<0.001	***
2.5	P<0.001	***
3	P<0.001	***
4	P<0.001	***
5	P<0.001	***

La microencapsulación aumenta la eficacia terapéutica de los fármacos haciendo uso de la propiedad de la liberación controlada (Lam & Gambari, 2014), siendo una de sus aplicaciones las formas farmacéuticas de liberación prolongada (Singh, Hemant, Ram, & Shivakumar, 2010). En el presente estudio por tratarse de una formulación de liberación controlada se obtuvo como resultado que la liberación de esta fue mucho más prolongada respecto a la doxiciclina libre, ya que se obtuvo un porcentaje de liberación mayor bajo las mismas condiciones y los mismos tiempos de análisis de las muestras tomadas con respecto a la doxiciclina microencapsulada. Adicionalmente la liberación del fármaco puede hacerse por difusión de fármacos a partir de microcápsulas de depósito polimérico o microcápsulas de matriz polimérica. En el sistema de depósito, el fármaco es atrapado dentro del depósito de núcleo por una envoltura de pared polimérica. Cuando el depósito del núcleo está saturado y se mantiene un gradiente de concentración constante del fármaco en la envoltura de la pared, la velocidad del flujo del fármaco es constante. La velocidad de liberación del fármaco se mantiene constante siempre y cuando las concentraciones internas y

externas del fármaco central y el gradiente de concentración a través de la envoltura de la pared sean constantes. Finalmente, cuando las concentraciones de fármaco en el depósito de núcleo y en la capa de pared caen por debajo de la saturación, la tasa de liberación de fármaco disminuye (Lam & Gambari, 2014), explicando así la razón por la que la tasa de liberación de la doxiciclina microencapsulada disminuye. En un estudio donde comparan doxiciclina libre con doxiciclina microencapsulada con polímeros a través de celdas de Franz, obtuvieron como resultado una mayor liberación de doxiciclina libre en menor tiempo respecto a la doxiciclina microencapsulada, el cual atribuyen el patrón de liberación controlada a la naturaleza del polímero microencapsulante como tal para liberar el fármaco. Adicionalmente, reportaron una liberación del 100 % de la doxiciclina comercial en 24 horas y de la doxiciclina microencapsulada en 72 horas (Shanmuganathan et al., 2008), lo cual no se pudo evaluar en el presente estudio por ser de solo 5 horas. En otro ensayo realizado por (Mishra & Mishra, 2012), donde evalúan doxiciclina libre vs. doxiciclina microencapsulada dentro de varios tipos de polímeros, obtuvieron una liberación por encima del 60% de la doxiciclina libre en 5 horas respecto a un rango de entre 20-60% obtenido con las otras formulaciones, donde el componente de una de las formulaciones que es igual al del presente estudio obtuvo el menor porcentaje.

**Ensayo de viabilidad celular (citotoxicidad):** según los resultados estadísticos del ANOVA, se puede decir que no hay un efecto directo entre las diferentes concentraciones del microencapsulado en las diluciones C1, C2 y C3 (40, 20 y 10 ppm, respectivamente), comparado con el control (PBS) a las 24 y 48 horas de tratamiento (Tabla 2). Sin embargo, se observa un efecto a las 4 horas después de adicionar las tres concentraciones. Se observa una amplia disminución en el porcentaje de viabilidad (10.7%) y deterioro celular respecto al tiempo de mayor

exposición (72 horas) en el tratamiento, en cuanto al uso de mayores concentraciones de doxiciclina hclato (40 ppm), en comparación con los otros tratamientos a concentraciones de 10 y 20 ppm y el control (72.78 %, 75.8% y 47.4%, respectivamente), siendo mucho más estable en los tratamientos C2 y C3 con respecto al control (Tabla 3; Figura 5 y 6). En el tratamiento C1 a las 72 h se observaba un deterioro anormal de las células (Figura 7).

*Tabla 2. Análisis de varianza (ANOVA) de dos vías.*

Control vs C1				
time	Control	C1	P value	Summary
4	84,9	68,73	P < 0,05	*
24	87,08	71,45	P < 0,05	*
48	87,66	82,89	P > 0,05	ns
72	47,41	10,79	P<0,001	***
Control vs C2				
time	Control	C2	P value	Summary
4	84,9	68,09	P < 0,05	*
24	87,08	86,11	P > 0,05	ns
48	87,66	81,62	P > 0,05	ns
72	47,41	75,87	P<0,001	***
Control vs C3				
time	Control	C3	P value	Summary
4	84,9	63,71	P<0,01	**
24	87,08	73,47	P > 0,05	ns
48	87,66	84,86	P > 0,05	ns
72	47,41	72,78	P<0,01	**
ns= no significativo				

*Tabla 3. Cálculo de la viabilidad por tratamiento.*

MUESTRAS		% de Viabilidad			
		4 hr	24hr	48hr	72hr
C1	R1	73,48	72,57	80,10	N/A
	R2	61,28	80,95	75,27	15,09
	R3	71,43	60,82	93,30	6,49
C2	R1	74,71	85,82	83,61	N/A

	R2	77,03	88,89	82,61	75,38
	R3	52,54	83,63	78,64	76,36
C3	R1	73,60	N/A	85,55	N/A
	R2	58,19	77,27	91,10	72,08
	R3	59,33	69,67	77,93	73,47
Control (PBS)	R1	90,48	89,52	84,44	45,71
	R2	81,77	87,60	87,08	46,93
	R3	82,46	84,13	91,45	49,59

Figura 5. Media y desviación estándar del % de viabilidad entre TTO vs horas.

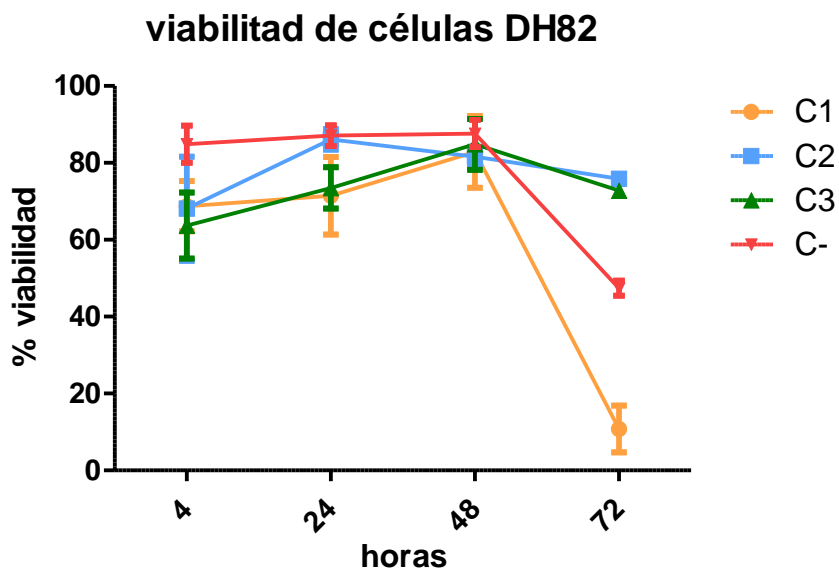


Figura 6. Formato de barras de la media y desviación estándar del % de viabilidad entre TTO vs horas.

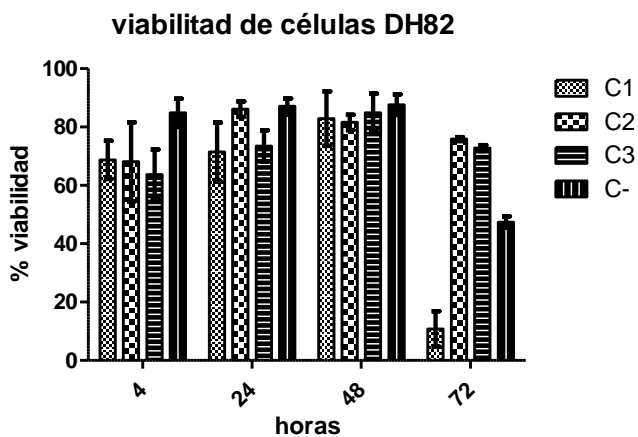
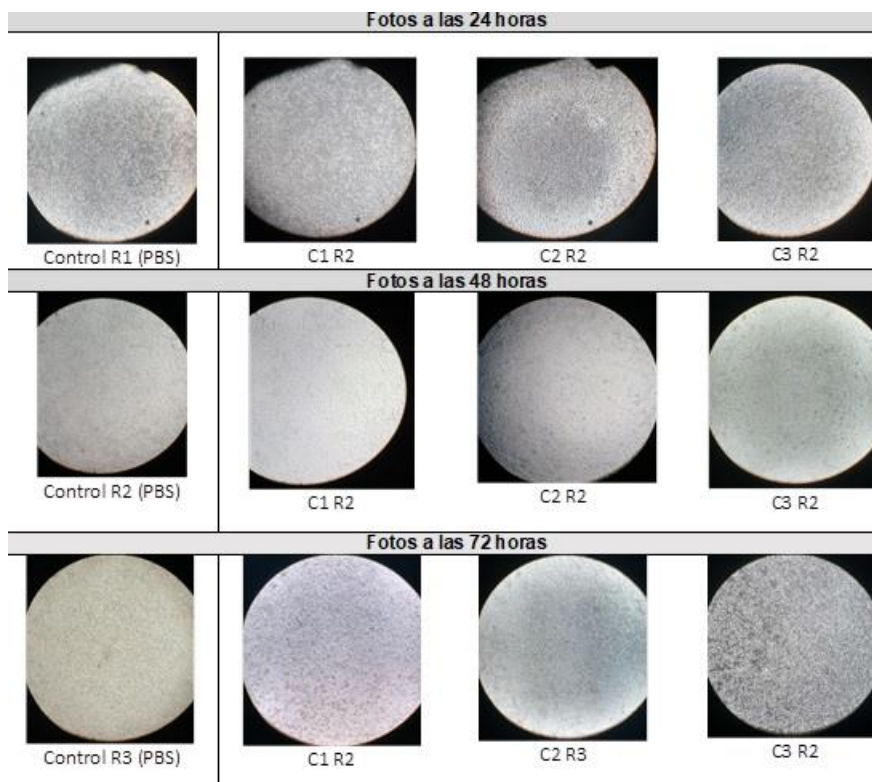


Figura 7. Fotografías de los platos de cultivo para cada concentración a las 24, 48 y 72 horas (visto a 10X en microscopio invertido).



En un estudio realizado por (Karna, Pałka, & Wołczyński, 2001), en el cual se evalúa el efecto de la doxiciclina sobre líneas celulares provenientes de fibroblastos humanos a concentraciones entre 25-100  $\mu\text{g/ml}$  a las 24 horas de exposición, encontraron un porcentaje de viabilidad respecto al control por encima del 90% a una concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$ , lo cual es similar a lo obtenido en el presente estudio para la concentración utilizada de 20  $\mu\text{g/ml}$ . En otro estudio donde se evaluó varias formulaciones microencapsuladas respecto a un control a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  por 24 y 48 horas de exposición, se encontró un porcentaje de viabilidad celular cercana al 100% a las 24 horas, disminuyendo este valor a las 48 horas (Mishra & Mishra, 2012), difiriendo de los resultados obtenidos en el presente estudio ya que se observó que la viabilidad celular aumento a las 48 horas respecto al tiempo de exposición de 24 horas. En un ensayo realizado por (Gomes & Fernandes, 2007), en cual evalúan el efecto de la doxiciclina sobre células osteoblasticas de medula ósea

humana a una concentración de 1, 5, 10, 25, y 50  $\mu\text{g/ml}$  a partir de las 72 horas de exposición, encontraron que la viabilidad celular cae a mayor concentración, incluso por debajo del control. En el presente estudio se encontró un resultado similar, la viabilidad celular es mucho menor expuestas las células a la concentración más alta, sin embargo, dentro de las otras dos concentraciones evaluadas se observa que tuvieron mayor viabilidad respecto al control, por lo cual se sugiere que los mismos componentes que forman el microencapsulado proveen de nutrientes a las células y les permiten sobrevivir un poco más a diferencia del control el cual carece de nutrientes en su composición

**Perfil farmacocinético:** los resultados arrojados por la curva farmacocinética mostraron que para el tratamiento con la formulación microencapsulada de doxiciclina se obtuvo una  $C_{\text{max}}$  de 0.45  $\mu\text{g/ml}$ , un  $T_{\text{max}}$  de 1.5 horas, un  $\text{AUC}(0-t)$  de 6.15  $\mu\text{g-h/ml}$ , un  $\text{AUC}_{\infty}$  de 11.2  $\mu\text{g-h/ml}$ . Para el tratamiento con la doxiciclina comercial se obtuvo una  $C_{\text{max}}$  de 0.3  $\mu\text{g/ml}$ , un  $T_{\text{max}}$  de 4 hora, un  $\text{AUC}(0-t)$  de 4.5  $\mu\text{g-h/ml}$ , un  $\text{AUC}_{\infty}$  de 3.6  $\mu\text{g-h/ml}$ . Para el tratamiento con doxiciclina estándar se obtuvo una  $C_{\text{max}}$  de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , un  $T_{\text{max}}$  de 2 hora, un  $\text{AUC}(0-t)$  de 6.5  $\mu\text{g-h/ml}$ , un  $\text{AUC}_{\infty}$  de 6.9  $\mu\text{g-h/ml}$ . El análisis estadístico con ANOVA unidireccional en el cual se compararon los valores anteriores muestra que no hay diferencias significativas para la  $C_{\text{max}}$ ,  $T_{\text{max}}$ , y  $\text{AUC}$  entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ) (Tabla 4). Adicionalmente cuando se comparan los tratamientos entre sí, respecto a las concentraciones en plasma obtenidas durante los tiempos de cada toma de muestras, se encuentra que hay diferencia significativa entre el tratamiento donde se administró doxiciclina estándar y los otros dos tratamientos ( $P < 0.05$ ) (Tabla 5).

*Tabla 4. Análisis de varianza (ANOVA) unidireccional que muestra el valor P de la  $C_{\text{max}}$ ,  $T_{\text{max}}$  y  $\text{AUC}$  entre cada tratamiento.*

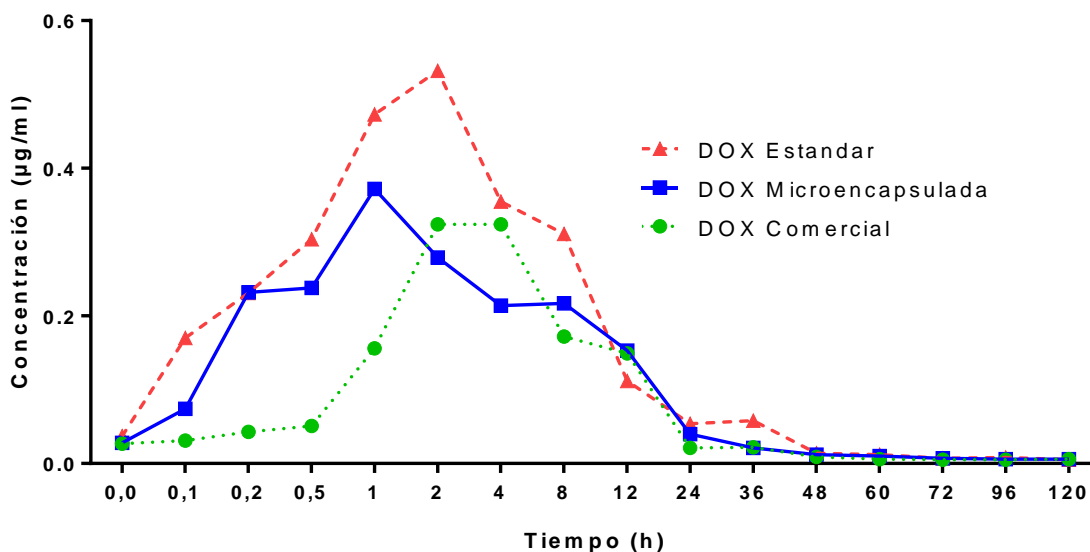


Tukey's multiple comparisons test	Valor P	Significant?	Summary
AUC (0-t)			
DOX comercial vs. DOX microencapsulada	P > 0,05	No	ns
DOX comercial vs. DOX estandar	P > 0,05	No	ns
DOX microencapsulada vs. DOX estandar	P > 0,05	No	ns
AUC(inf)			
DOX comercial vs. DOX microencapsulada	P > 0,05	No	ns
DOX comercial vs. DOX estandar	P > 0,05	No	ns
DOX microencapsulada vs. DOX estandar	P > 0,05	No	ns
Cmax			
DOX comercial vs. DOX microencapsulada	P > 0,05	No	ns
DOX comercial vs. DOX estandar	P > 0,05	No	ns
DOX microencapsulada vs. DOX estandar	P > 0,05	No	ns
Tmax			
DOX comercial vs. DOX microencapsulada	P > 0,05	No	ns
DOX comercial vs. DOX estandar	P > 0,05	No	ns
DOX microencapsulada vs. DOX estandar	P > 0,05	No	ns

*Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA), donde se comparan la doxiciclina microencapsulada vs. doxiciclina comercial vs. doxiciclina estándar.*

Tukey's multiple comparisons test	Valor P	Significant?	Summary
DOX Comercial vs. DOX Microencapsulada	P > 0.05	No	ns
DOX Comercial vs. DOX Estandar	P < 0.05	Yes	*
DOX Microencapsulada vs. DOX Estandar	P < 0.05	Yes	*

*Figura 8. Comparación entre tratamientos según la concentración obtenida y el tiempo.*



Por ser una formulación microencapsulada desarrollada para ser de liberación prolongada se esperaba que su liberación respecto a la doxiciclina comercial hubiese sido más lenta, sin embargo se observa que esta se liberó mucho más rápido que la doxiciclina comercial antes mencionada. Reportes de estudios donde evalúan perfiles farmacocinéticos de doxiciclina en perros de varias formulaciones microencapsuladas reportan un patrón de liberación más prolongada de las mismas, respecto al control (doxiciclina comercial) (Ruiz et al., 2015). Sin embargo, se observa una cinética muy parecida de liberación de la doxiciclina microencapsulada vs. la doxiciclina estándar respecto a los ensayos descritos anteriormente con celdas de Franz.

## **Conclusiones y recomendaciones**

Por haber obtenido porcentajes de recuperación dentro del rango de referencia esperado se puede decir que el método de preparación de la muestra fue confiable. Para la detección de doxiciclina por HPLC, hay que tener en cuenta que los límites de cuantificación de doxiciclina en plasma pueden variar dependiendo del método de detección e incluso si se utiliza el mismo. Con respecto a los ensayos de cinética de liberación mediante celdas de Franz, se obtuvieron resultados esperados en cuanto a la liberación prolongada de la formulación microencapsulada de doxiciclina respecto a la doxiciclina libre, sin embargo, se recomienda realizar otros ensayos en los cuales se puedan simular las condiciones de pH y tiempos del paso del microencapsulado por el tracto gastrointestinal para validar este método en condiciones mucho más similares a lo que ocurre in vivo. Finalmente, respecto al perfil farmacocinético se pudo constatar que no hay diferencias significativas entre la formulación microencapsulada de doxiciclina y la doxiciclina comercial, lo cual puede estar relacionado con los excipientes contenidos en esta.

## Referencias

- Axisa, B., Naylor, A. R., Bell, P. R. F., & Thompson, M. M. (2000). Simple and reliable method of doxycycline determination in human plasma and biological tissues, *744*, 359–365.
- Baena, Y., Dallos, L. J., Manzo, R. H., & Ponce D`León, L. (2011). Estandarización de celdas de Franz para la realización de ensayos de liberación de fármacos a partir de complejos con polielectrolitos Resumen Standardization of Franz cells to evaluate drugs release from drug- Introducción. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, *40*(2), 174–188.
- Baggot, J. D. (1992). Clinical Pharmacokinetics in Veterinary Medicine. *Clinical Pharmscokinetics*, *22*(4), 254–273.
- Balanc, B., Trifkovic, K., Dordevic, V., Markovic, S., Pjanovic, R., Nedovic, V., & Bugarski, B. (2016). Food Hydrocolloids Novel resveratrol delivery systems based on alginate-sucrose and alginate-chitosan microbeads containing liposomes. *Food Hydrocolloids*, *61*, 832–842.  
<http://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.005>
- Beltrán, C. (2004). Farmacocinética y farmacodinamia de antimicrobianos : Utilidad práctica. *Revista Chilena de Infectología*, *21*(Supl 1), 39–44.
- Bocker, R. (1980). Rapid analysis of doxycycline from biological samples by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, *187*, 439–441.
- Breitschwerdt, E. B., Hegarty, B. C., & Hancock, S. I. (1998). Doxycycline Hyclate Treatment of Experimental Canine Ehrlichiosis Followed by Challenge Inoculation with Two Ehrlichia canis Strains. *Antimicrobial Agents and*

*Chemotherapy*, 42(2), 362–368.

Castro, L. J., Sahagún, A. M., Diez, M. J., Fernandez, N., Sierra, M., & Garcia, J. J. (2008). and oral administration. *The Veterinary Journal*, 180, 389–395.

<http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.001>

Davis, J. L., Salmon, J. H., & Papich, M. G. (2006). Pharmacokinetics and tissue distribution of doxycycline after oral administration of single and multiple doses in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 67(2), 310–316.

Eddlestone, S. M., Diniz, P. P., Neer, T. M., Gaunt, S. D., Corstvet, R., Cho, D., ... Breitschwerdt, E. B. (2007). Doxycycline Clearance of Experimentally Induced Chronic Ehrlichia canis Infection in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, 1237–1242.

Embers, M., Hasenkampf, N., Embers, D., & Doyle, L. (2014). Pharmacokinetic Analysis of Oral Doxycycline in Rhesus Macaques. *Journal of Medical Primatology*, 42(2), 57–61. <http://doi.org/10.1111/jmp.12031>. Pharmacokinetic

Freeman, K., Thomasy, S. M., Stanley, S. D., Bonn, W., Gulland, F., Friedlaender, A., & Maggs, D. (2013). Population pharmacokinetics of doxycycline in the tears and plasma of northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*) following oral drug administration. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243(8), 1170–1178.

Gal, A., Loeb, E., Yisaschar, Y., & Baneth, G. (2008). Detection of Ehrlichia canis by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *The Veterinary Journal*, 175, 212–217. <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.01.013>

- Gallardo, V., & Ruiz, M. A. (2011). Oral Suspensions of Morphine Hydrochloride for Controlled Release : Rheological Properties and Drug Release, 629–634.
- Gomes, P. S., & Fernandes, M. H. (2007). Effect of therapeutic levels of doxycycline and minocycline in the proliferation and differentiation of human bone marrow osteoblastic cells. *Archives of Oral Biology*, 52, 251–259.  
<http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.10.005>
- Gutiérrez, L., Velasco, Z., Vázquez, C., Vargas, D., & Sumano, H. (2012). Pharmacokinetics of an injectable long-acting formulation of doxycycline hyclate in dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(1), 1–7. <http://doi.org/10.1186/1751-0147-54-35>
- Hartmann, A., Krebber, R., Daube, G., & Hartmann, K. (2008). Pharmacokinetics of pradofloxacin and doxycycline in serum , saliva , and tear fluid of cats after oral administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31, 87–94. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00932.x>
- ICH. (2005). ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Textt and Methodology Q2(R1). (Vol. 1994).
- Karna, E., Pałka, J., & Wołczynski, S. (2001). Doxycycline-induced inhibition of prolidase activity in human skin fibroblasts and its involvement in impaired collagen biosynthesis. *European Journal of Pharmacology*, 430, 25–31.
- Kogawa, A. C., & Salgado, H. R. (2012). Quantification of Doxycycline Hyclate in Tablets by HPLC – UV Method. *Journal of Chromatography Science*, 40, 1–7.
- Kukanich, K., & Kukanich, B. (2014). The effect of sucralfate tablets vs . suspension on oral doxycycline absorption in dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and*

*Therapeutics*, 1–5. <http://doi.org/10.1111/jvp.12165>

Lam, P. L., & Gambari, R. (2014). Advanced progress of microencapsulation technologies : In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. *Journal of Controlled Release*, 178, 25–45.  
<http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.12.028>

Leeper, M. H., Zimmerman, H. J., Carrol, G., Caldwell, E., Spies, H. W., Wolfe, C. K. & Dowling, H. F. (1951). Effect of large doses of aureomycin, terramycin, and chloramphenicol on livers of mice and dogs. *AMA Archives of Internal Medicine Journal*, 88(3), 284-295.

Maaland, M. G., Papich, M. G., Turnidge, J., & Guardabassi, L. (2013). Pharmacodynamics of Doxycycline and Tetracycline against *Staphylococcus pseudintermedius* : Proposal of Canine-Specific Breakpoints for Doxycycline. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(11), 3547–3554.  
<http://doi.org/10.1128/JCM.01498-13>

Magnusson, L. E., Risley, D. S., & Koropchak, J. A. (2015). Aerosol-based detectors for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1–14.  
<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.07.045>

Marovac, J. (2001). Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. *Revista medica de Chile*, 129(1)

Marzo, A., & Dal Bo, L. (1998). Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes : a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. *Journal of Chromatography A*, 812, 17–34.

Mishra, M., & Mishra, B. (2012). Mucoadhesive microparticles as potential carriers in

inhalation delivery of doxycycline hyclate : a comparative study. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(5), 518–526.

<http://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.05.001>

Molina, G., & Rodrigo, M. (n.d.). El modelo de regresión lineal. *Universitat Id Valencia*.

Ole-Mapenay, I. M., & Mitema, E. S. (1995). Some pharmacokinetics parameters of doxycycline in East African goats after intramuscular administration of a long-acting formulation. *Veterinary Research Communications*, 19, 425–432.

Raval, J. P., Naik, D. R., Amin, K. A., & Patel, P. S. (2014). Controlled-release and antibacterial studies of doxycycline-loaded poly (  $\epsilon$  -caprolactone ) microspheres. *Journal of Saudi Chemical Society*, 18(5), 566–573.  
<http://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.11.004>

Riond, J. L., Vaden, S. L., & Riviere, J. E. (1990). Comparative pharmacokinetics of doxycycline in cats and dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 13, 415–424.

Ruiz, S. M., Gutiérrez, L., Bernad, M. J., Caballero, S., & Vargas, D. (2015). Comparative pharmacokinetics of a new oral long-acting formulation of doxycycline hyclate : A canine clinical trial. *Pharmaceutical Science*, 80, 9–15.  
<http://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.09.012>

Ruiz, S. M., Gutierrez, L., Caballero, S., & Vargas, D. (2014). Pharmacokinetics of an oral extended-release formulation of doxycycline hyclate containing acrylic acid and polymethacrylate in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 76(4), 5–7.



- Ruz, N., Zabala, M., Kramer, M. G., Campanero, M. A., Dios-viéitez, M. C., & Blanco, J. (2004). Rapid and simple determination of doxycycline in serum by high-performance liquid chromatography Application to particulate drug delivery systems. *Journal of Chromatography A*, 1031, 295–301.  
<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.12.028>
- Sadek, P. (2004). *Illustrated Pocket Dictionary of Chromatography*. USA: Wiley-Interscience.
- Saivin, S., & Houin, G. (1988). Clinical Pharmacokinetics of Doxycycline and Minocycline. *Clinical Pharmacokinetics*, 366, 355–366.
- Schnabel, L. V, Papich, M. G., Watts, A. E., & Fortier, L. A. (2010b). Orally administered doxycycline accumulates in synovial fluid compared to plasma. *Equine Veterinary Journal*, 42(3), 208–212.  
<http://doi.org/10.2746/042516409X478514>
- Shanmuganathan, S., Shanumugasundaram, N., Adhirajan, N., Ramyaa, T. S., & Babu, M. (2008). Preparation and characterization of chitosan microspheres for doxycycline delivery. *Carbohydrate Polymers*, 73, 201–211.  
<http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.11.039>
- Singh, M. N., Hemant, K. S. Y., Ram, M., & Shivakumar, H. G. (2010). Microencapsulation : a promising technique for controlled drug delivery. *Research in Pharmaceutical Science*, 5(October), 65–77.
- Vargas, D., Gutiérrez, L., Juárez, I., & Sumano, H. (2008). Pharmacokinetics of Doxycycline and Tissue Concentrations of an Experimental Long-acting Parenteral Formulation of Doxycycline in Wistar Rats. *Arzneimittel-Forschung /*

*Drug Research*, 58(6), 310–315.

Vicente, D., & Perez-Trallero, E. (2010). Tetraciclinas , sulfamidas y metronidazol.

*Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica*, 28(2), 122–130.

<http://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.10.002>

Womble, A., Giguere, S., & Lee, E. A. (2007). Pharmacokinetics of oral doxycycline

and concentrations in body fluids and bronchoalveolar cells of foals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30, 187–193.

<http://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00857.x>. Pharmacokinetics

Zozaya, H., Gutierrez, L., Bernad, M. J., & Sumano, H. (2013). Pharmacokinetics of

a peroral single dose of two long-acting formulations and an aqueous

formulation of doxycycline hyclate in horses. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 12,

1–7.